

## 酶技术在中药黄酮类成分研究中的应用

高霞<sup>1,2</sup>, 刘聪燕<sup>2</sup>, 陈彦<sup>2\*</sup>, 王莹<sup>2</sup>, 周静<sup>2</sup>, 瞿鼎<sup>2</sup>

1. 南京中医药大学附属中西医结合医院, 江苏 南京 210028

2. 中国中医科学院江苏分院, 江苏 南京 210028

**摘要:** 近年来, 酶技术在中药黄酮类成分研究中的应用越来越广泛, 查阅国内外文献后发现酶技术在中药黄酮类成分研究中的应用主要体现在3个方面: (1) 单独应用或与其他技术联合应用(包括酶解-超声偶联技术和酶解-微波偶联技术等)于中药黄酮类成分的提取, 使其提取率明显提高; (2) 改变黄酮类成分的结构使其转化成活性更好、生物利用度更高的有效成分; (3) 促进植物体内黄酮类成分的合成。此外, 固定化酶技术在黄酮类成分中的应用也越来越多。酶技术作为中药黄酮类成分研究中的一种新方法, 有助于从复杂的中药中获得更多活性较好的黄酮类成分, 具有较好的应用前景, 但也存在一些问题, 需要更深入的研究。

**关键词:** 酶技术; 中药; 黄酮类成分; 结构转化; 酶解-超声偶联技术; 酶解-微波偶联技术

**中图分类号:** R284 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)16-2412-06

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.16.025

## Application of enzyme technology in flavonoid ingredients of Chinese materia medica

GAO Xia<sup>1,2</sup>, LIU Cong-yan<sup>2</sup>, CHEN Yan<sup>2</sup>, WANG Ying<sup>2</sup>, ZHOU Jing<sup>2</sup>, QU Ding<sup>2</sup>

1. Affiliated Hospital on Intergration of Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

2. Jiangsu Branch of China Academy of Chinese Medical Sciences, Nanjing 210028, China

**Abstract:** In recent years, enzyme technology is widely applied in the flavonoid ingredients of Chinese materia medica (CMM). Based on a large number of domestic and foreign literatures, the application of enzyme technology in the flavonoid ingredients is mainly embodied in three aspects: significantly improving the extraction rate of flavonoid ingredients by using alone or combined with other technology including enzyme-ultrasonic coupling technology and enzyme-microwave coupling technology, obtaining the effective ingredients with a better activity and higher bioavailability by changing the structure of some flavonoid ingredients, and increasing the active flavonoids content in the plants. Moreover, the immobilized enzyme technology is applied more and more. Enzyme technology, a new method in the study on flavonoid ingredients in CMM, can help to obtain more active flavonoids from the complex samples of CMM. Therefore, the enzyme technology has a good application prospect but also with some key problems to be further studied in future.

**Key words:** enzyme technology; Chinese materia medica; flavonoid ingredients; structure transformation; enzyme-ultrasonic coupling technology; enzyme-microwave coupling technology

酶是由生物活细胞产生, 以蛋白质形式存在, 受多种因素调控的可在细胞内或细胞外起催化作用的生物催化剂。与一般催化剂相比有其共同性, 但又有显著的特点, 即酶具有催化效率高、作用专一性

强、反应条件温和等特点, 因而受到重视并得到广泛的应用。20世纪90年代中期酶已经被应用于天然药物及重要活性成分的提取制备中, 并取得了显著的效益<sup>[1]</sup>。

收稿日期: 2014-03-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81173557); 江苏省中医药领军人才项目(LJ200913); 江苏省“333人才培养工程”项目(BRA2011219); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助

作者简介: 高霞(1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向为药剂学。E-mail: gaoxia0218@163.com

\*通信作者 陈彦 E-mail: ychen202@hotmail.com

酶技术应用于中药黄酮类成分的研究中,可实现黄酮类成分的高效提取和分离,还可以促进植物体内黄酮类成分的合成。本文对酶技术在中药黄酮类成分研究中的应用进行了较全面的综述,为中药黄酮类成分的充分研究利用提供了新的方法和思路。

## 1 酶技术在中药黄酮类成分提取中的应用

### 1.1 单独利用酶技术实现黄酮类成分的高效提取

通常对黄酮类化合物的提取以水、乙醇、甲醇等溶剂为提取溶媒,水浸提取成本低,但提取率较低;而用乙醇等有机溶剂提取的成本较高。且水煎煮法和有机溶剂提取法的提取效率受多种因素的影响,如当药材中含有黏液质、果胶和树脂等成分时,提取液的黏稠性增大,提取效率更低,药液也不容易滤过。此外,通常细胞壁是传统方法提取中药中有效成分的主要屏障,因为大部分有效成分存在于细胞壁内,少量存在于细胞间隙,细胞壁一般都是由纤维素构成的,传统的提取方法很难破坏其结构。

中药酶法提取的原理是在传统溶剂提取方法的基础上,利用酶反应的高度专一性,根据药材植物细胞壁的构成,选择相对应的酶如纤维素酶、半纤维素酶、果胶酶以及多酶复合体等,水解或降解细胞壁的组成成分,破坏细胞壁结构,使细胞壁的致密性降低,从而使有效成分充分溶出、溶解、混悬或胶溶于溶剂中,从而提高有效成分的提取率<sup>[2]</sup>。酶法提取具有提取收率高、成本低、环保等优点,还可以控制非目标物的溶出,简化后续精制操作<sup>[3]</sup>。目前,酶法在中药黄酮类成分提取中的应用主要体现在纤维素酶的作用上,用纤维素酶可以破坏细胞壁中纤维素的 $\beta$ -D-葡萄糖链,有利于黄酮类成分的提取。

欧阳辉等<sup>[4]</sup>用酶法直接提取绞股蓝中总黄酮,发现纤维素酶在49℃,pH 3.9,酶用量120 U/mL条件下酶解2.5 h后,总黄酮得率为0.357%,与传统溶剂浸提法的总黄酮得率相比提高了25.0%。王文渊等<sup>[5]</sup>采用纤维素酶和果胶酶组成的复合酶法提取苦瓜叶中的总黄酮,发现纤维素酶浓度为0.8 mg/mL,果胶酶浓度为0.5 mg/mL,提取温度为55℃,提取介质pH 4.5的条件下酶解140 min后,苦瓜叶总黄酮的提取率可达到3.13%,与直接醇提工艺相比总黄酮提取率提高了30.0%以上。沙棘总黄酮是研究最多的沙棘活性成分之一,具有抗心肌缺血、调血脂、抗肿瘤、调节免疫系统等药理作用<sup>[6]</sup>,且在其果渣中的量相当高,已有文献主要探讨了用

有机溶剂结合超声、微波、热加工等物理方法提取沙棘果渣总黄酮<sup>[7-9]</sup>。徐升运等<sup>[10]</sup>采用了生物酶法提取沙棘果渣总黄酮,发现当生物酶用量占沙棘果渣质量4%、pH 5.0、酶解温度60℃、酶解时间120 min,料水质量比1:30时,总黄酮提取率高达0.769%,与有机溶剂回流法和超声波法相比,分别提高了51.91%和48.51%。王宏志等<sup>[11]</sup>用纤维素酶法提取黄芩中黄芩素、汉黄芩素,最佳工艺条件为20倍量水、加酶量20 U/g药材、pH 4.8、温度50℃、时间8 h,与传统水煎提取工艺相比,酶法提取使得黄芩中黄芩素提取率提高了5倍、汉黄芩素提取率提高了近4倍。陈皮主要成分为黄酮类化合物,是强自由基清除剂,具有强抗氧化作用,王岩岩等<sup>[12]</sup>采用纤维素酶提取陈皮黄酮,结果表明,与传统化学法相比,纤维素酶法提取陈皮黄酮较好,在最佳条件下,纤维素酶法所得黄酮提取率可达到6.96%,为化学法黄酮提取率的2.5倍。黄芪中的黄酮类成分具有多种药理活性,具有清除氧自由基、抑制脂质过氧化、增强免疫力、抗病毒以及促进细胞增殖的作用<sup>[13-15]</sup>,贲永光等<sup>[16]</sup>用纤维素酶法提取黄芪总黄酮,发现在最优工艺条件下,黄芪总黄酮的提取率为0.402%,提取率明显增加。

### 1.2 与其他技术联合应用以实现黄酮类成分的高效提取

**1.2.1 酶解-超声偶联技术** 超声波和酶解技术是新兴的天然活性物质辅助提取技术,均能有效提高多种活性物质的提取率。酶解-超声偶联技术已经成为一种新型、快速、有效的总黄酮提取方法,具有提取率高、省时、高效、节能等优点。旷超阳等<sup>[17]</sup>用水酶法与超声法相结合提取连翘中总黄酮,结果显示,在纤维素酶的用量为1.2%、pH 6.0、酶解温度为50℃的条件下酶解4 h,连翘总黄酮的提取率为10.54%,两者结合大大提高了黄酮的提取率。陈雅维等<sup>[18]</sup>采用酶解-超声偶联技术对葛根中总异黄酮进行提取,葛根总异黄酮收率明显提高,提取率为7.10%。

**1.2.2 酶解-微波偶联技术** 微波提取能迅速升温、及时灭酶、缩短提取时间、提高效率,符合环境保护的要求<sup>[19]</sup>,酶解可以破坏细胞壁的致密结构,将酶法与微波提取相结合,可以在温和的条件下,快速、高效地提取出黄酮类成分,提高提取率<sup>[20]</sup>。茶多酚是茶叶中儿茶素类、黄酮类、酚酸类和花色苷类化合物的总称,是一类具有重要药理作用的生物

活性物质<sup>[21]</sup>。但是大多数提取茶多酚工艺的提取率还较低,且茶多酚产品不稳定,舒红英等<sup>[22]</sup>采用复合酶-微波法提取茶多酚,发现复合酶-微波法提取茶多酚比复合酶法、索氏法和微波法耗时少、提取效率高。在 50 ℃条件下用纤维素酶和果胶酶前处理 40 min,微波辐射 8 min,微波功率 500 W,料液质量比 1:30,25%乙醇溶液萃取,提取率可达到 18.4%。复合酶可以将细胞壁及细胞间层的纤维素和果胶质形成的阻挡层有效破解,使大部分茶多酚溶解到乙醇溶液中。另外,微波可以使体系的温度快速达到复合酶酶解的最佳适宜温度,使复合酶的酶解作用得到充分发挥,从而提高提取率。

## 2 利用酶技术对中药黄酮类成分进行结构修饰

部分中药黄酮类有效成分的水溶性、渗透性或稳定性差,口服生物利用度低,导致其疗效不佳,影响其应用;可以利用酶技术对其进行结构转化,从而改善其理化性质,提高生物利用度。水解酶可以水解黄酮苷类成分糖苷键,使糖基水解;糖基转移酶和糖苷酶可以在黄酮类成分上添加糖基,起到转糖基作用,使其糖基化;另外也可以采用单一的酶或者整个微生物细胞对黄酮类成分进行生物催化加氧,使其羟基化<sup>[23]</sup>。

### 2.1 黄酮苷类成分糖基水解

黄酮苷类成分通过水解酶水解,使糖基水解,可以调节它们的吸收渗透性。淫羊藿苷为淫羊藿中主要黄酮类成分之一,具有抗骨质疏松等作用,但它的吸收渗透性低,在肠道的吸收较差,口服直接以原型的形式吸收很少<sup>[24-25]</sup>,需要经肠道酶或菌水解转化为淫羊藿次级苷或苷元才能被很好地吸收并发挥药效<sup>[26]</sup>,且淫羊藿次级苷和淫羊藿苷元的抗骨质疏松等生物活性更强<sup>[27]</sup>。因此,可以在体外选择合适的水解酶,水解掉糖基,制备活性更好的淫羊藿次级苷或苷元。贾东升等<sup>[28]</sup>用纤维素酶水解淫羊藿苷制备次级苷宝藿苷 I,在最佳条件下,宝藿苷 I 平均转化率为 94.38%;用蜗牛酶水解淫羊藿苷制备淫羊藿苷元,在最佳条件下,淫羊藿苷元平均转化率为 92.46%。Xia 等<sup>[29]</sup>采用  $\beta$ -葡萄糖苷酶水解淫羊藿苷获得了宝藿苷 I。Park 等<sup>[30]</sup>利用曲霉属霉菌产生的诱导酶水解淫羊藿苷可制得淫羊藿黄酮次级苷或淫羊藿苷元。蒋艳荣等<sup>[31]</sup>采用  $\beta$ -葡萄糖苷酶酶解淫羊藿总黄酮制备宝藿苷 I,以淫羊藿总黄酮计,宝藿苷 I 收率为 9.25%。沙棘叶中的黄酮类成分主要以糖苷的形式存在,口服后生物利用度低,刘萍

等<sup>[32]</sup>发现沙棘黄酮糖苷经过  $\alpha$ -鼠李糖苷酶、 $\beta$ -葡萄糖苷酶、木聚糖酶、纤维素酶、果胶酶、 $\alpha$ -淀粉酶组成的复合酶预处理后,黄酮糖苷转化率仅为 0.23%,再用柚苷酶水解可获得高含量的黄酮苷元,转化率达 85%以上,显著提高了苷元型沙棘黄酮的量,从而很大程度地提高了沙棘黄酮类物质的生物活性及生物利用度。

### 2.2 黄酮苷元类成分糖基化

黄酮苷元通过糖基转移酶和糖苷酶糖基化,可以调节它们的水溶性。葛根素是葛根中量最丰富的异黄酮,也是其主要有效成分,可以治疗冠心病、心肌梗死、眼部血液循环障碍、突发性耳聋等疾病,但葛根素水溶性差。为提高其水溶性,Li 等<sup>[33]</sup>利用多种不同的酶对其进行结构改造,使其糖基化,最终发现来源于嗜热脂肪芽孢杆菌的麦芽糖淀粉酶是最有效酶,反应后主要得到 2 种产物: $\alpha$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 6)-葛根素和  $\alpha$ -D-麦芽糖基-(1 $\rightarrow$ 6)-葛根素,溶解度分别为葛根素的 14 倍和 168 倍。槲皮素具有多种药理活性,如抗氧化、抗炎、抗癌、镇静等作用<sup>[34]</sup>。但是其在水中的溶解度较低,因此它的应用也受到了很大限制。Hye 等<sup>[35]</sup>以 UDP-葡萄糖为糖基供体,槲皮素为糖基受体,用黄酮糖基转移酶与蔗糖合成酶的融合蛋白对槲皮素进行糖基化反应,得到槲皮素-7,3-二-O-葡萄糖苷,显著地改善了槲皮素的溶解性和生物利用度。

### 2.3 黄酮类成分羟基化

黄酮类成分进行生物催化加氧,使其羟基化,可以改善它们的水溶性,提高生物利用度。葛根素水溶性较差,口服生物利用度低<sup>[36]</sup>,因此临床应用时需加入高浓度丙二醇作助溶剂,不仅增加了成本,而且也降低了用药安全性。有研究报道,采用葛根素羟基化酶对其结构进行羟基化改造,可以大大地提高葛根素的水溶性。Ye 等<sup>[37]</sup>利用具有葛根素羟基化酶活力的哈茨木霉菌株 NJ01 的休眠菌丝转化葛根素形成 3'-羟基葛根素,其在水中的溶解度是葛根素的 1.3 倍,去除自由基能力是葛根素的 20 倍,极大地提高了葛根素的溶解度和去除自由基的活性,同时也方便了应用。

## 3 利用酶技术促进植物体内黄酮类成分的合成

许多药用植物黄酮类活性成分量很低,且在植物体内合成途径复杂,通常有 10 余个甚至几十个酶参与才能完成药用活性成分的合成,可以应用酶分析技术,结合同位素示踪的方法,阐明药用活性成

分在生物体内合成途径,找出关键限速酶,利用基因工程技术克隆目标酶的基因,然后高效表达此基因,促进关键酶的合成,使植物体内黄酮类活性成分增加。另外,大部分中药中含有的次级代谢产物是其药理作用的物质基础,可以在弄清复杂的次生物质代谢途径后,通过纯化关键酶,对代谢途径进行操作,从而获得较多的黄酮类有效成分。黄酮类化合物的生物合成主要是通过苯丙烷类代谢途径合成的,而苯丙氨酸解氨酶(PAL)是该途径的关键酶、限速酶。吴松权等<sup>[38]</sup>应用 RT-PCR 和 cDNA 末端快速扩增法,以膜荚黄芪根总 RNA 为模板克隆了 PAL 基因,为有效利用该基因调控药用植物中黄酮类成分合成奠定了基础。此外,植物激素对植物细胞中各种酶的合成和活性具有调节作用,在植物细胞培养过程中可以加入某些植物激素(生长素和细胞分裂素等),调控相关酶的合成,从而促进黄酮类化合物合成<sup>[39]</sup>。乙烯可以增强 PAL 活性,从而促进黄酮合成;赤霉素可以降低查耳酮合成酶活性,进而抑制黄酮类化合物合成;脱落酸是通过拮抗赤霉素的活性来促进黄酮类化合物合成。研究表明,在植物细胞培养过程中加入较低量的赤霉素以及较高量的脱落酸和乙烯可以提高黄酮的量。

#### 4 利用固定化酶技术高效获取中药黄酮类成分

酶主要以游离和固定化形式应用于药用活性成分的生物转化。固定化酶可以实现酶的重复利用,提高酶的使用效率;多数情况下,可以提高酶的稳定性;可以增加产物的收率,提高产物的质量;且极易与底物和产物分开,简化后续操作。目前酶固定化的方法主要有物理吸附、共价结合、包埋法和交联法。物理吸附是酶固定化最简单的方法,常用的吸附材料包含纤维素、微晶纤维素、高陶土、微/介孔材料、硅烷化分子筛等<sup>[40]</sup>;共价结合法固定化酶是由于酶的侧链上的氨基酸,酶与改性过的硅胶、介孔氧化硅、壳聚糖、纳米纤维等材料共价结合后具有高稳定性和极高的生物催化性<sup>[41-44]</sup>。离子结合法固定化酶的固定化操作简单,成本也较低,但不如共介结合法固定的牢固;包埋法是通过共价键或非共价键将酶截留在凝胶或纤维素中,有文献报道了藻酸盐-明胶-钙载体能够将酶有效地包埋,防止酶泄露并增加固定化酶的机械稳定性<sup>[45]</sup>。另外,具有超分子环芳烃聚合物的溶胶-凝胶基质可以选择性地包埋脂肪酶<sup>[46]</sup>。随着固定化技术的深入研究,各种限制因素的逐步解决,会有越来越多的次级代

谢产物通过固定化酶来进行生产。张涛等<sup>[47]</sup>采用共价交联的方法将  $\beta$ -葡萄糖苷酶固定到球形壳聚糖上,并用固定化酶水解大豆异黄酮,主要水解产物大豆苷元和染料木素的产率都能达到 70%,且重复使用 16 次后固定化  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性几乎没有变化。伍毅等<sup>[48]</sup>采用海藻酸钙包埋  $\beta$ -葡萄糖苷酶使其固定化,再用固定化酶酶解银杏黄酮苷来制备银杏黄酮苷元,发现在最佳条件下黄酮苷转化为苷元的转化率可达 90%,固定化酶储藏 50 d,其相对酶活保持在 80%以上,连续使用 15 次,相对酶活能维持在 60%以上。因此, $\beta$ -葡萄糖苷酶固定化解决了游离酶容易失活和不能重复使用的问题,可以更加有效制备银杏黄酮苷元。

#### 5 问题与展望

酶技术的应用为中药黄酮类有效成分的生产 and 研究提供了新的思路和方法,具有很好的应用价值。它可以显著提高中药黄酮类有效成分的提取率,克服工业常用的醇水提取方法中有效成分提取率低、工序复杂等问题;还可以改变中药中原有黄酮类成分的结构,将其转化成活性更高的成分,从而提高微量有效活性成分的量 and 生物利用度。这些都有利于中药产品实现“三小”(体积小、剂量小、毒副作用小)、“三效”(高效、速效、长效)和“五方便”(生产方便、储存方便、运输方便、携带方便、服用方便)的目标,从而实现中药现代化;另外酶技术的应用,减少了污染物的排放,有利于实现“绿色中药工业化”。

但该技术也存在着局限性,如对实验条件要求较高,为使酶发挥最大作用,需先通过实验确定最适温度、pH 值及反应时间等,还需综合考虑酶的浓度、底物浓度、激动剂和抑制剂等的影响。另外,酶本身还会有残留,因此必须考虑和研究其是否会与中药材或制剂中的有效成分发生降解、沉淀或络合反应等;是否会导致有效成分质和量的变化;对制剂疗效有无影响,是否会产生不良反应;是否会对制剂的质量检测和控制产生干扰;是否会对剂型的选择有影响。因此,酶技术在中药黄酮类成分中的应用还需要进一步深入的研究。

#### 参考文献

- [1] 姜彬慧,胡筱敏,左小红.酶技术与中药现代化[J].世界科学技术—中医药现代化,2004,6(2):46-49.
- [2] 韩丽,王文革,谢秀琼,等.酶技术在中药制剂中的应用[J].中南药学,2003,1(3):157-158.

- [3] 刘富梁, 金卫根, 梁华正, 等. 酶法在中药提取中的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(7): 1152-1153.
- [4] 欧阳辉, 田启建, 余 佶, 等. 酶法辅助提取绞股蓝中总黄酮工艺优化 [J]. 中草药, 2011, 42(5): 886-889.
- [5] 王文渊, 周振华, 龙红萍. 复合酶法提取苦瓜叶总黄酮的研究 [J]. 中国食品添加剂, 2011(4): 107-112.
- [6] 李晓花, 孔令学, 刘洪章. 沙棘有效成分研究进展 [J]. 吉林农业大学学报, 2007, 29(2): 162-167.
- [7] 高 玲. 沙棘化学成分的提取与分离方法研究进展 [J]. 赤峰学院学报: 自然科学版, 2008(10): 17-19.
- [8] 张冬雪. 水浸提沙棘果渣总黄酮工艺研究 [J]. 国际沙棘研究与开发, 2008, 6(4): 10-13.
- [9] 姜少娟, 马养民, 孔东宁, 等. 超声波法提取沙棘果渣中总黄酮的最佳工艺研究 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2007, 34(10): 184-188.
- [10] 徐升运, 赵文娟, 陈卫锋, 等. 生物酶法提取沙棘果渣总黄酮工艺的优化 [J]. 湖北农业科学, 2012, 51(5): 983-986.
- [11] 王宏志, 喻春皓, 高 钧, 等. 酶法提取黄芩中黄芩素、汉黄芩素 [J]. 中药材, 2007, 30(7): 851-854.
- [12] 王岩岩, 李文娟. 纤维素酶提取陈皮黄酮的工艺条件 [J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(2): 71-74.
- [13] Yang C, Yang Y, Aisa H A, et al. Bioassay-guided isolation of antioxidants from *Astragalus altaicus* by combination of chromatographic techniques [J]. *J Sep Sci*, 2012, 35: 977-983.
- [14] Auyeung K K W, Ko J K S. Novel herbal flavonoids promote apoptosis but differentially induce cell cycle arrest in human colon cancer cell [J]. *Invest New Drugs*, 2010, 28: 1-13.
- [15] Kim M C, Lee G H, Kim S J, et al. Immune-enhancing effect of Danggwibohyeoltang, an extract from *Astragali Radix* and *Angelicae Gigantis Radix*, in vitro and in vivo [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2012, 34: 66-73.
- [16] 贲永光, 丘泰球, 李坤平. 纤维素酶法提取黄芪总黄酮的工艺研究 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(10): 2478-2480.
- [17] 旷超阳, 欧阳玉祝, 陈 实. 水酶法协同超声提取连翘总黄酮工艺条件优化 [J]. 食品与发酵科技, 2012, 48(1): 49-51.
- [18] 陈雅维, 周惠云, 王建普. 纤维素酶解-超声偶联法提取葛根中总异黄酮的工艺优化 [J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24: 933-938.
- [19] Lucchesi M E, Chemat F, Smadja J. Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation [J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1043: 323-327.
- [20] 陈惠丹, 金陵洁, 刘 然, 等. 吐温 60 强化酶法-微波提取墨旱莲总黄酮 [J]. 南京工业大学学报: 自然科学版, 2011, 33(4): 99-110.
- [21] Wang C Y, Li Q S, Han G Z, et al. LC-MS/MS for simultaneous determination of four major active catechins of tea polyphenols in rat plasma and its application to pharmacokinetics [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(4): 289-296.
- [22] 舒红英, 罗旭彪, 王永珍. 绿茶中茶多酚的复合酶-微波法提取工艺研究 [J]. 中草药, 2011, 42(7): 1309-1312.
- [23] 崔 莉, 孙 娥, 陈玲玲, 等. 生物转化在黄酮类化合物中的应用 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(3): 764-767.
- [24] Chen Y, Zhao Y H, Jia X B, et al. Intestinal absorption mechanisms of prenylated flavonoids present in the heat-processed *Epimedium koreanum* Nakai (Yin Yanghuo) [J]. *Pham Res*, 2008, 25: 2190-2199.
- [25] 陈 彦, 贾晓斌, Hu Ming. Caco-2 细胞单层研究淫羊藿黄酮类成分的吸收转运 [J]. 中草药, 2009, 40(2): 220-224.
- [26] 贾晓斌, 钱 浅, 孙 娥, 等. 淫羊藿黄酮药代动力学研究进展 [J]. 中成药, 2012, 34(11): 2193-2197.
- [27] 杨乾栩, 刘艳秋, 王 莉, 等. 基于模型群体分析的淫羊藿抗骨质疏松活性成分筛选研究 [J]. 药学报, 2012, 47(9): 1205-1209.
- [28] 贾东升, 贾晓斌, 赵江丽, 等. 纤维素酶水解淫羊藿苷制备宝藿苷 I 的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(6): 888-892.
- [29] Xia Q, Xu D J, Huang Z G, et al. Preparation of icariside II from icariin by enzymatic hydrolysis method [J]. *Fitoterapia*, 2010, 81: 437-442.
- [30] Park J S, Park H Y, Rho H S, et al. Statistically designed enzymatic hydrolysis for optimized production of icariside 2 as a novel melanogenesis inhibitor [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2008, 18: 110-117.
- [31] 蒋艳荣, 张振海, 孙 娥, 等. 酶解淫羊藿总黄酮制备宝藿苷 I [J]. 中国医院药学杂志, 2013, 33(4): 260-263.
- [32] 刘 萍, 郑亚安, 王怡斯, 等. 沙棘叶黄酮糖苷生物转化黄酮苷元研究 [J]. 高校化学工程学报, 2006, 16(6): 146-150.
- [33] Li D, Park S H, Shim J H, et al. In vitro enzymatic modification of puerarin to puerarin glycosides by maltogenic amylase [J]. *Carbohydr Res*, 2004, 339: 2789-2797.
- [34] Wein S, Behm N, Petersen R K, et al. Quercetin enhances adiponectin secretion by a PPAR- $\gamma$  independent mechanism [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2010, 41: 16-22.
- [35] Hye S M, Kim B G, Kim D H, et al. Production of flavonoid O-glucoside using sucrose synthase and

- flavonoid *O*-glucosyltransferase fusion protein [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2009, 19: 709-712.
- [36] Luo C F, Yuan M, Chen M S, *et al.* Pharmacokinetics, tissue distribution and relative bioavailability of puerarin solid lipid nanoparticles following oral administration [J]. *Int J Pharm*, 2011, 410: 138-144.
- [37] Ye H, Yuan S, Cong X D. Biotransformation of puerarin into 3'-hydroxypuerarin by *Trichoderma harzianum* NJ01 [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2007, 40: 594-597.
- [38] 吴松权, 祖元刚, 管清杰, 等. 膜荚黄芪苯丙氨酸解氨酶基因的克隆与序列分析 [J]. *中草药*, 2010, 41(3): 456-460.
- [39] 王军妮, 黄艳红, 牟志美, 等. 植物次生代谢物黄酮类化合物的研究进展 [J]. *蚕业科学*, 2007, 33(3): 499-505.
- [40] Datta S, Christena L R, Rajaram Y R S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials [J]. *Biotechnology*, 2013, 3: 1-9.
- [41] Szymańska K, Bryjak J, Jarzębski A B. Immobilization of invertase on mesoporous silicas to obtain hyper active biocatalysts [J]. *Top Catal*, 2009, 52: 1030-1036.
- [42] Ispas C, Sokolov I, Andreescu S. Enzyme-functionalized mesoporous silica for bioanalytical applications [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 393: 543-554.
- [43] Sakai S, Liu Y, Yamaguchi T, *et al.* Immobilization of *Pseudomonas cepacia* lipase onto electrospun polyacrylonitrile fibers through physical adsorption and application to transesterification in nonaqueous solvent [J]. *Biotechnol Lett*, 2010, 32: 1059-1062.
- [44] Zhao Q, Hou Y, Gong G H, *et al.* Characterization of alcohol dehydrogenase from permeabilized brewer's yeast cells immobilized on the derived attapulgite nanofibers [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2010, 160: 2287-2299.
- [45] Shen Q Y, Yang R J, Hua X, *et al.* Gelatin-templated biomimetic calcification for  $\beta$ -galactosidase immobilization [J]. *Process Biochem*, 2011, 46: 1565-1571.
- [46] Erdemir S, Yilmaz M. Catalytic effect of calix [n]arene based sol-gel encapsulated or covalent immobilized lipases on enantioselective hydrolysis of (*R/S*)-naproxen methyl ester [J]. *J Inclusion Phenom Macrocyclic Chem*, 2012, 72: 189-196.
- [47] 张涛, 黄哲, 林章凛. 固定化  $\beta$ -葡萄糖苷酶双相体系中水解大豆异黄酮 [J]. *化工学报*, 2008, 59(2): 387-392.
- [48] 伍毅, 王洪新, 马朝阳. 固定化  $\beta$ -葡萄糖苷酶水解糖苷型银杏黄酮的研究 [J]. *哈尔滨工程大学学报*, 2009, 30(5): 584-588.