

综 述

酶反应提取技术在中药化学成分提取中的应用

王忠雷¹ 杨丽燕² 曾祥伟³ 李朋收¹ 张小华¹

(1 北京中医药大学中药学院,北京,100102; 2 中国石油大学(北京)理学院; 3 北京丰泰金源药业有限公司)

摘要 酶反应提取技术(生物酶解提取技术)是利用酶反应所具有高度专一性的特点,通过适当的酶选择性地破坏植物细胞壁,使植物细胞内的成分更容易溶解、扩散的原理而应用于中药有效成分提取的新技术。该技术不但具有条件温和、易除杂质、节约能耗、浸出率高、设备简易、减少热敏成分降解等优势,而且具有应用于大规模工业化生产的潜力。其应用前景十分广阔,已经广泛用于中药多糖类、生物碱类、黄酮类、皂苷类、蛋白质类、有机酸类等成分的提取。我们就该技术的应用进展及方法特点做一系统性概述,以期新技术能够更加合理而有效的应用于中药化学成分的提取。

关键词 酶反应提取技术;中药化学成分;应用进展;方法特点

Application Progress on Enzymatic Extraction Technology in Extraction of Chemical Compositions of Chinese Medicine

Wang Zhonglei¹, Yang Liyan², Zeng Xiangwei³, Li Pengshou¹, Zhang Xiaohua¹

(1 School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102;

2 College of Science, China University of Petroleum; 3 Beijing FengTai jin yuan Pharmaceutical Co., LTD)

Abstract Enzymatic extraction technology is based on the highly specific feature of enzyme, which is used to destroy the plant cell wall selectively, making active components inside plant cell more easily to dissolve and spread. Based on the above principle, this new technique is being broadly used in the aspects of TCMs extraction. This technology not only has the advantage of mild conditions, removing impurity easily, saving energy consumption, ratio high leaching, simple equipment and reducing degradation of thermal ingredient, but also has the potential of large-scale industrial production. It has been widely used in the extraction of chemical compositions of Chinese medicine, including polysaccharides, alkaloids, flavonoids, saponins, proteins, organic acids, et al. This article has made a systematic exposition to this technology's application progress and method characteristics, so as to make new technology can be more reasonable and effective in active components' extraction of Chinese Materia Medica.

Key Words Enzymatic Extracting; Chemical Compositions of Chinese Medicine; Application Progress; Characteristics of the Method

doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2013.01.041

随着中药研究与开发现代化的进程,经典的提取方法如溶剂提取法、水蒸气蒸馏法、压榨法及升华法等因有效成分提取率不高、杂质清除率低等弊端,已经难以满足社会发展的需求。而一些新型、高效的提取新技术、新方法,已在近年的中药研究中陆续显现出各自的优势。笔者仅以酶反应提取技术为例,论述其在中药化学成分提取中的应用进展及方法特点,以期中药提取新技术能够更加合理有效地应用于中药研发过程^[1]。

1 酶的古代应用及酶提取技术的形成

一方面,人类在生产活动中有目的地利用生物酶已有几千年历史,例如酿酒、制作饴糖、制酱等。从龙山文化遗存的大量陶制贮酒可以推知,远在5000年前,我们祖先已开始人工酿酒了;早在3000多年前国

人已应用微生物发酵方法进行麻纤维的沤渍脱胶;另外,在1000多年前的《齐民要术》中已有用“鱼酱汁”来调味的论述。但由于历史原因和科技的限制,当时的人们没有意识到、也不可能意识到这是“酶”在起作用^[2]。

另一方面,酶反应提取技术真正形成则源于近代。酶化学是从1814年, Kirchhoff发现淀粉酶以后开始的。1926年, Sumner首次得到尿酶结晶以及 Northrop对蛋白水解酶的研究,逐步建立酶化学的基础。20世纪50年代中期,多学科的互相渗透使酶化学迅速发展。人们通过对氨基酸排列结构,酶的生物催化活性本质以及酶的专一性等的研究,使生物酶的应用逐步发展成为制药工业的重要手段之一。然而酶法在中药提取中的应用到20世纪90年代才陆续见报。21世纪

以来,酶反应提取技术在中药化学成分提取中的应用日益普遍,并取得了较好的效果^[3]。

2 酶反应提取技术的原理及特点

植物类药材约占中药总量的 90%,其活性成分主要存在于植物细胞壁内。因此,细胞壁的多糖类物质所构成的致密结构自然成为了中药有效成分提取的主要屏障。而酶反应提取技术,即向待提取的中药液中加入某些特定的酶,通过破坏构成细胞壁的纤维素的基本单元的 β -葡萄糖苷键等,导致细胞壁等处的纤维素、果胶等物质降解,从而使其致密性降低,以减少细胞原生质中的有效成分向溶媒扩散时细胞壁及细胞间质的阻力,进而有利于有效成分的提取。以上内容即为酶反应提取技术的基本原理。

酶反应提取技术在中药有效成分提取中得到越来越广泛的应用源于其如下特点:在较温和的条件下提取,提取产物活性较高,稳定性较好。但是,酶反应提取技术同时受到最佳反应温度、pH 值、酶及底物浓度、抑制剂和激动剂对提取物的影响等条件的制约^[4]。

3 酶提取技术在中药中的应用

中药品种繁多,有效成分的类型差异较大,因此需要按实际情况选择不同种类的酶来提取。常用的酶反应提取方法有复合酶法、纤维素酶法、果胶酶、超声酶法及转苷酶法等。

3.1 纤维素酶法 植物细胞壁主要成分是纤维素,干燥植物体中纤维素占 $1/3 \sim 1/2$,是形成植物细胞壁的框架。纤维素是 β -葡萄糖以 β -1,4-糖苷键连成的直链分子,而纤维素酶可降解 β -1,4-糖苷键从而破坏植物细胞壁^[5]。韩伟等^[6]采用纤维素酶、果胶酶、蛋白酶等酶法提取积雪草中的积雪草苷,结合正交试验,结果发现,在纤维素酶与底物积雪草质量比 $m(E):m(S)=1:50$ 的时候,具有较理想的提取率。与传统提取方法相比,酶法提取速率快,工艺条件温和,得率高,是一种良好的提取方法。马桔云等^[7]在从中药饮片中提取穿心莲内酯之前,先对原药材饮片进行纤维素酶解处理以破坏 β -葡萄糖苷键,其他条件与原工艺相同,结果发现穿心莲内酯的含量和提取量均较原提取工艺高,且对所提取有效成分没有影响,并考虑将它用于穿心莲提取的工业化生产中。李永生等^[8]通过比较纤维素酶、半仿生、乙醇回流提取方法对川乌中乌头碱、乌头总碱的影响,筛选最佳方法,利用纤维素酶辅助提取川乌生物碱,以乌头碱、乌头总碱提取率为指标,正交试验优化纤维素酶的最佳提取条件,再与半仿生、乙醇提取方法进行比较。实验证明,酶用量 8mg/g 时乌头碱提取率高达 $0.002\ 447\%$,乌头总碱提取率高

达 $0.244\ 410\%$,而半仿生提取乌头碱、乌头总碱的提取率分别为 $0.001\ 735\%$ 、 $0.189\ 340\%$,乙醇回流提取乌头碱、乌头总碱提取率分别为 $0.001\ 869\%$ 、 $0.200\ 720\%$,可知纤维素酶提取法具有明显的优势。张华芳^[9]等研究表明,用纤维素酶法提取羊栖菜多糖,以褐藻胶得率和羊栖菜粗多糖为定量指标,采用正交设计优选酶法提取条件,所得的多糖的质量分数为 4.89% ,较水提醇沉法、碱提醇沉法等有明显提高。

3.2 果胶酶 果胶酶由黑曲霉发酵所得,是分解果胶复合物的酶的总称,可分为果胶甲酯酶和多聚半乳糖醛酸酶。蓝峻峰等^[10]通过添加果胶酶提取叶下珠有效成分,以没食子酸提取率为考察指标,用高效液相色谱法测其含量,利用正交试验设计优选其提取工艺,结果发现,在果胶酶浓度为 1.5g/L 时,叶下珠没食子酸的平均提取率高达 1.053% 。因该工艺条件在较低的温度下、较短的时间内可较大程度提高叶下珠有效成分提取效率,故而有效地降低了提取能耗,而且提取过程中不使用有机溶剂,对环境友好,易于实现绿色工业化生产。李玲等^[11]研究采用果胶酶提取川芎多糖的最佳工艺条件,方法为采用单因素实验和正交设计进行优选,考察酶用量、pH、反应时间和反应温度对川芎多糖提取的影响。结果发现,在果胶酶用量为 1% 条件下,川芎多糖的平均得率高达 11.3% 。

3.3 复合酶法 复合酶法因其操作简单、高效、稳定等优点近几年已被广泛应用在中药活性成分的提取中。刘颖新等^[12]以毛脉酸模的根为原料,采用复合酶提取,通过正交试验优选条件,实验表明,在所用酶量为 3% 时对其有效成分有较理想的提取。王颖莉等^[13]研究酶法结合传统回流法提取远志总皂苷工艺条件,利用可见分光光度法测定远志总皂苷含量,考察植物复合酶的酶解时间、酶解温度对传统提取工艺的强化效果,通过显微结构图和红外光谱图说明了复合酶法强化传统提取法的作用方式及提取物的结构。结果表明酶用量为 0.4% 时,可提高远志总皂苷提取率、缩短提取时间、减少乙醇使用量,这对于远志流浸膏的高效提取具有一定指导意义。另外,刘国际等^[14]以复合酶法提取薯蓣皂苷元,结果发现,复合酶法较其他酶法具有一定优势。且本实验所选用的酶为粗制品,价格廉价,有助于薯蓣皂苷元大规模化生产。张明春等^[15]以水提工艺为对照,研究了纤维素酶与果胶酶复合酶法提取酸枣仁黄酮新工艺。结果发现,在纤维素酶与果胶酶比为 $1:1.30\text{U/g}$ 酸枣仁时提取。该工艺的酸枣仁黄酮提取率比传统水提工艺提高了 54.67% 。张明^[16]以山东大青叶为材料,以复合酶水解、乙醇沉淀法提取

其中的多糖。通过正交试验,结果发现在纤维素酶 1.5%、果胶酶 2.0%、胰蛋白酶 1.5% 的条件下大青叶多糖的平均得率可高达 18.24%。

3.4 转苷酶法 转苷酶是葡萄糖苷转移酶的简称,转苷酶法在中药提取与啤酒发酵等已有应用并显示了明显的优势。许明淑等^[17]以银杏叶为原料,利用 Su-hong475 转苷酶将黄酮苷元转为黄酮苷以提高其水溶性,再以低浓度的乙醇溶液提取,结果表明,总黄酮的提取率比未加酶的对照组增加了 44%。其实,早在上世纪 90 年代,日本学者高根芳春就已采用转苷酶对黄酮苷元进行提取,通过糖基转移获得了更高活性、更便于人体吸收利用的银杏叶的有效成分槲皮素苷,使其黄酮提取率从原先的 0.22% 提升为 0.38%。另外,转苷酶法还有更广泛的应用,如李峰等^[18]用跳跃式糖化与加转苷酶相结合的方法,生产出了更加优质的低醇啤酒。

3.5 超声—酶法 贾永光等^[19]以黄芪饮片为原料,结合单因素实验,采用超声—酶法提取黄芪总多糖,并通过正交试验优化其提取工艺。结果发现,在超声提取时间 30min、酶量 10mg 等条件下,黄芪多糖的提取率为 24.2%,较传统水提工艺有明显提高。陶涛等^[20]以九华山黄精为原料,水为提取溶剂,采用超声波协同纤维素酶方法对其多糖和皂苷进行综合提取。通过单因素和正交试验研究,结果发现,在纤维素酶与底物质量比为 1% 时,多糖和皂苷提取率分别是 39.36% 和 11.69%。相比传统提取方法,多糖和皂苷的提取率均有了提高。另外,徐艳等^[21]研究超声—酶法在黄柏的小檗碱提取中的应用效果,同样采用单因素实验和正交实验,结果发现在超声功率为 80%、加酶 25mL 时黄柏小檗碱的提取率高,且具有高效、节能等优势。周琳等^[22]研究报道了超声—酶法提取三七总皂苷,以三七提取液中总皂苷的含量和提取物得率为指标,并采用四因素、三水平正交设计法,结果发现在纤维素酶与果胶酶用量比为 3:28 时,三七提取液中总皂苷得率高达 35.17%。

4 结语

随着现代科学的迅猛发展与中药现代化步伐的加快,酶反应提取技术因其高效节能、方法简便等优势而在中药提取中的应用日益频繁。虽然目前该方法在实验条件及酶种类等方面存在一定的局限性,但随着技术的不断进步,相信该方法将在中药的提取方面展示更加广泛的应用前景。

参考文献

- [1] 沈文娟,岳亮,何英翠,等.天然药物常用提取技术与方法研究概况[J]. 中南药学,2011,9(2):127-130.
- [2] 姜彬慧,胡筱敏,左小红,等.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):46-48.
- [3] 杨庆隆,许顺荣.浅谈酶在中药制剂中的应用[J]. 中成药,1995,17(6):4-5.
- [4] 刘颖新,范业雪,王振月,等.酶技术在中药有效成分提取与转化中的研究现状[J]. 辽宁中医药大学学报,2008,10(9):46-47.
- [5] 许明淑,罗明芳,邢新会,等.酶法强化中药提取的研究进展[J]. 中国中医药信息杂志,2005,12(12):37-39.
- [6] 韩伟,陈惠丹,樊亮,等.酶法提取积雪草苷[J]. 南京工业大学学报(自然科学版),2009,31(3):18-22.
- [7] 马桔云,吕芳,于喜水,等.纤维素酶用于中药穿心莲提取的初步研究[J]. 黑龙江医药,2001,13(1):16-17.
- [8] 李永生,林强,郑来丽,等.川乌的纤维素酶酶解提取工艺研究[J]. 中草药,2009,40(11):1735-1739.
- [9] 张华芳,金京顺,周来温,等.羊栖菜多糖酶法提取工艺研究[J]. 中草药,2006,37(2):222-224.
- [10] 蓝峻峰,刘琨.叶下珠有效成分的果胶酶法提取工艺[J]. 中药材,2010,33(1):135-137.
- [11] 李玲,王维香,王晓君,等.果胶酶法提取川芎多糖工艺的研究[J]. 中药材,2008,31(4):600-602.
- [12] 刘颖新,王振月,刘利利,等.复合酶法提取毛脉酸模中有效成分的工艺研究[J]. 时珍国医国药,2011,22(11):2601-2603.
- [13] 王颖莉,张丹丹.复合酶法提取远志总皂苷的工艺研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2009,11(6):885-888.
- [14] 刘国际,罗娜,陈俊英,等.不同酶法酶提取薯蓣皂苷元的研究[J]. 郑州大学学报(工学版),2005,26(4):48-50.
- [15] 张明春,解军波,李婷,等.复合酶法提取酸枣仁黄酮研究[J]. 食品科学,2008,29(09):145-148.
- [16] 张明.复合酶法提取大青叶多糖的工艺研究[J]. 安徽农业科学,2010,37(26):172-173.
- [17] 许明淑,邢新会,罗明芳,等.银杏叶黄酮的酶法强化提取工艺条件研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2006,12(4):2-4.
- [18] 李峰,杨昆.转苷酶在低醇啤酒酿造中的应用[J]. 啤酒科技,2004,6(07):25-28.
- [19] 贾永光,吴铮超.超声联合酶法提取黄芪总多糖的影响因素分析[J]. 广东药学院学报,2010,26(2):135-137.
- [20] 陶涛,李立祥,张芳,等.超声波协同纤维素酶对黄精多糖和皂苷的提取研究[J]. 食品工业科技,2011(9):230-234.
- [21] 徐艳,刘少霞,孙娟,等.超声—酶法提取黄柏中小檗碱的工艺研究[J]. 时珍国医国药,2007,18(6):1460-1462.
- [22] 周琳,李元波,曾英,等.超声酶法提取三七总皂苷的研究[J]. 中成药,2006,18(5):642-645.

(2012-06-15 收稿)