

## 优化酶提取贯叶连翘药材活性成分工艺

郝鹏飞, 卫冰, 刘富岗, 杨云\*

(河南中医学院药学院, 郑州 450008)

**[摘要]** 目的: 探讨贯叶连翘中金丝桃素的酶提取法的最优酶及其最佳工艺。方法: 以高效液相色谱法测定金丝桃素含量为指标, 在纤维素酶、果胶酶、木聚糖酶、 $\beta$ -葡聚糖酶、复合酶 SPE-007A 中筛选出最优 2 种酶, 继考察这 2 种酶复合后的浸提倍数、加酶量、pH、温度、酶解时间等因素对提取工艺的影响, 并用正交试验优选提取条件, 从而得到最佳工艺。结果: 最优酶为纤维素酶与果胶酶复合酶, pH 4.8、酶用量(纤维素酶/果胶酶)2.0%/2.0%、温度 50℃、酶解时间 6 h、酶解液浸提倍数 15 倍。结论: 该工艺高效、稳定, 可用于今后对贯叶连翘的研究。

**[关键词]** 贯叶连翘; 金丝桃素; 酶提取; 复合酶

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)14-0039-04

## Optimization of Enzyme Extraction Crafts for Active Components of *Hypericum perforatum*

HAO Peng-fei, WEI Bing, LIU Fu-gang, YANG Yun\*

(Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

**[Abstract]** **Objective:** Choose the best enzyme and craft conditions of hypericin from *Hypericum perforatum*. **Method:** The content of hypericin determined by HPLC was used as an index. The orthogonal experiments were used for the optimal craft conditions choosing two of the best enzymes in cellulase, pectinase, xylanase, glucanase,  $\beta$ -glucanase and enzyme (SPE-007A) to investigate the effect on their complex by solid-liquid ratio, enzyme dosage, pH, temperature and the extraction time. **Result:** The two best enzymes are cellulase and pectinase, the optimum extraction process is as follows pH 4.8, enzyme dosage cellulase-pectinase 2.0%-2.0%, temperature 50℃, extraction time 6 h. **Conclusion:** This method is efficient and stable. It could be used in the future research of *Hypericum perforatum*.

**[Key words]** *Hypericum perforatum*; hypericin; enzyme extraction; compound enzyme

贯叶连翘 *Hypericum perforatum* L. 是藤黄科多年生草本植物<sup>[1]</sup>, 含有多种化学成分, 主要有苯并二萜酮类、间苯三酚类、黄酮类、单宁类等<sup>[2]</sup>。近年来, 由于在治疗抑郁症方面疗效确切<sup>[3]</sup>, 同时具有抗 AIDS 等方面作用, 所以其开发应用在国际上受到广泛关注。其中金丝桃素被认为是贯叶连翘提取物中最具

有生物活性的物质, 具有抗病毒、抗抑郁等作用。国内外已完成了金丝桃素抗爱滋病的 II 期临床试验, 治疗恶性神经胶质瘤的临床研究也在进行之中<sup>[4]</sup>。

国际市场上规定贯叶连翘提取物中金丝桃素的含量不能低于 0.3%<sup>[5]</sup>, 但由于贯叶连翘中金丝桃素的含量非常低, 以目前常用的高浓度乙醇提取工艺很难取得较高的经济效益、科研价值<sup>[6]</sup>。鉴于此, 本研究拟通过现代生物技术与传统提取技术相结合的方法, 考察几种不同酶对贯叶连翘药材中金丝桃素的提取效果, 筛选出对药材酶解效果较好的酶或酶的复合物, 并对筛选出的酶进行提取工艺的优化, 以此工艺制备金丝桃素。

**[收稿日期]** 20110320(004)

**[基金项目]** 河南省郑州市科技攻关(2010-10PTGS486-1)

**[第一作者]** 郝鹏飞, 硕士研究生, Tel: 13653850058, E-mail: hpf\_880129@163.com

**[通讯作者]** \* 杨云, 硕士生导师, 教授, Tel: 0371-65680605, E-mail: yyun@china.com.cn

## 1 仪器与试药

LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津); LC-20AT 型紫外-可见检测器(日本岛津); BS210S 型电子天平(北京赛多利斯公司); METTLER AE240 型电子分析天平(瑞士); 微型植物试样粉碎机(河北省黄骅市新兴电器厂)。

本研究所用贯叶连翘药材购自陕西渭南, 经河南中医学院药学院董诚明教授鉴定为藤黄科植物贯叶连翘 *Hypericum perforatum* 的地上部分。

金丝桃素对照品(购于中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 批号 1158-080715); 纤维素酶、果胶酶、木聚糖酶、 $\beta$ -葡聚糖酶、复合酶 SPE-007A(夏盛实业集团有限公司); 甲醇为色谱纯(天津四友精细化学品有限公司); 双蒸水; 其余所用试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 金丝桃素的含量测定

**2.1.1 对照品溶液的制备** 取金丝桃素对照品 1.04 mg, 精密称定, 以甲醇溶解定容至 5 mL, 得  $0.208 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的金丝桃素对照品甲醇母液。精密吸取对照品母液 0.5 mL, 加甲醇定容至 10 mL, 得  $0.0104 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的金丝桃素对照品溶液。

**2.1.2 样品溶液的制备** 取贯叶连翘药材粉碎, 过三号筛, 称取贯叶连翘药材粉末约 0.4 g, 精密称定; 加以液料比为 150:1 的甲醇并称重, 超声提取 30 min; 补足减失质量, 滤过, 取续滤液过  $0.45 \mu\text{m}$  微孔滤膜, 得贯叶连翘药材样品液。

**2.1.3 标准曲线的建立** 分别精密吸取  $0.0104 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  对照品溶液 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0  $\mu\text{L}$  进样, 依照如下色谱条件测定, 依利特 Hypersil ODS2 色谱柱(5.0 mm  $\times$  200 mm,  $5 \mu\text{m}$ ), 流动相甲醇- $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaH}_2\text{PO}_4$ (97:3), 柱温  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , SPD-20A UV-VIS 检测器, 检测波长 590 nm。以峰面积积分为纵坐标(A), 以金丝桃素的量( $\mu\text{g}$ )为横坐标(C)进行线性回归, 回归方程  $A = 298457C - 469.54$  ( $r = 0.9999$ )。金丝桃素在  $0.0104 \sim 0.208 \mu\text{g}$  线性关系良好。

**2.1.4 样品溶液的含量测定** 取不同批次的贯叶连翘药材样品 5 份, 每份 0.4 g, 精密称定, 按照 2.1.2 项下样品制备方法制备样品, 样品液按照 2.1.3 项下色谱条件测定药材中金丝桃素的含量。

**2.1.5 精密度试验** 精密吸取上述对照品溶液 10

$\mu\text{L}$ , 依照 2.1.3 项下操作方法, 重复进样 5 次, 测定峰面积, RSD 0.55%, 结果表明仪器精密度良好。

**2.1.6 重复性试验** 精密吸取同一对照品溶液 5 份; 依照 2.1.3 项下操作方法, 连续进样 5 次, 每次 10  $\mu\text{L}$ , 测定金丝桃素峰面积, RSD 1.34%, 表明重复性良好。

**2.1.7 稳定性试验** 精密吸取同一对照品溶液 10  $\mu\text{L}$ , 依照 2.1.3 项下操作方法, 分别于 0, 2, 4, 8, 12 h 各测定 1 次, 计算其峰面积的 RSD 0.61%, 表明对照品在 12 h 内稳定性较好。

**2.1.8 加样回收率试验** 称取已测含量的贯叶连翘药材 0.2 g, 精密称定, 分别精密加入适量对照品溶液, 按 2.1.2 项下供试品处理方法制备, 依照 2.1.3 项下色谱条件测定, 代入回归方程, 求得相应的金丝桃素的浓度。计算加样回收率: 平均加样回收率为 98.8%, RSD 0.34%。

由以上试验结果可知, 金丝桃素含量测定方法的系统适应性试验、精密度、稳定性、重复性及加样回收率试验等均较好, 表明该方法稳定可行, 可用于金丝桃素的含量测定。

**2.2 酶的筛选** 将贯叶连翘药材分别以纤维素酶、果胶酶、木聚糖酶、 $\beta$ -葡聚糖酶、复合酶 SPE-007A 酶解后, 以乙醇为提取溶剂提取贯叶连翘药材, 以金丝桃素提取率为指标, 比较不同酶酶解后的提取效果, 筛选出效果最佳的酶。

**2.2.1 酶筛选方法** 称取贯叶连翘药材粉末 5 g, 精密称定, 加蒸馏水 40 mL(8 倍量),  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴温浸 30 min, 以  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 HCl 调 pH 4.80; 精密称取药材质量 0.5% 的不同酶, 每种酶平行 2 份, 加入  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  蒸馏水少许溶解, 于  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴活化 10 min; 加入调整好 pH 和温度的药材浸泡液, 与药材充分混匀;  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  酶解 2 h,  $85 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴 5 min 使酶灭活, 抽滤; 滤液定容至 50 mL, 备用, 药渣及滤纸回收, 加乙醇 30 mL(6 倍量),  $85 \text{ }^\circ\text{C}$  回流提取 2.5 h 后抽滤, 合并滤液, 定容至 50 mL, 备用。精密吸取酶解液 10 mL、乙醇提取液 5 mL 至蒸发皿中,  $85 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴蒸干, 残渣加甲醇使充分溶解, 转移至 10 mL 量瓶中以甲醇定容, 过滤, 取续滤液过  $0.45 \mu\text{m}$  微孔滤膜, 得样品液, 依照 2.1.3 项下色谱条件, HPLC 测定金丝桃素含量, 并依照以下公式计算金丝桃素提取率:

$$\text{提取率} = \frac{\text{提取液中金丝桃素量}}{\text{药材质量}} \times 100\%$$

**2.2.2 结果及分析** 为考察药材酶解与否以及不

同酶酶解后对金丝桃素提取率的差异是否有统计学意义,对试验结果进行统计学分析,见表1。

表1 不同酶酶解后对金丝桃素提取率的影响 %

No.	不加酶	纤维素酶	果胶酶	木聚糖酶	$\beta$ -葡聚糖酶	SPE-007A
1	0.867 7	1.168 6	1.090 6	0.897 6	0.912 6	1.034 2
2	0.852 4	1.157 9	1.088 7	0.883 2	0.921 9	1.026 3

由表1可知,酶解较不酶解金丝桃素提取率较高。故选用对金丝桃素提取率较高的纤维素酶、果胶酶以及纤维素酶果胶酶的复合酶对贯叶连翘酶解的工艺进行考察。

## 2.3 纤维素酶、果胶酶提取工艺

**2.3.1 纤维素酶提取工艺** 以纤维素酶为水解酶,浸提倍数、加酶量、pH、温度、酶解时间为可变因素,研究各因素对金丝桃素提取率的影响规律。经考察,纤维素酶酶解工艺的最佳条件为pH 4.8、温度50℃、酶用量2.0% (相对于药材,下同)、酶解时间5 h、浸提倍数为8倍。

**2.3.2 果胶酶提取工艺** 以果胶酶为水解酶,浸提倍数、加酶量、pH、温度、酶解时间为可变因素,研究各因素对金丝桃素提取率的影响规律。经考察,果胶酶酶解工艺的最佳条件为pH 4.6、酶用量1.5%、酶解温度50℃、酶解时间5 h、酶解液浸提倍数15倍。

**2.4 纤维素酶与果胶酶复合酶单因素试验** 以纤维素酶与果胶酶复合酶为水解酶,浸提倍数、加酶量、酶解时间为可变因素,研究各因素对金丝桃素提取率的影响规律。由于纤维素酶与果胶酶的最适pH分别为4.8、4.6,相差很小,所以对于复合酶最适pH的考察就以正交试验完成;而最适酶解温度两者都为50℃,所以不再考察这2个因素。

**2.4.1 酶解液浸提倍数的考察** 根据纤维素酶与果胶酶的试验结果,选取酶解条件为pH 4.8、加酶量纤维素酶2.0%,果胶酶2.0%,酶解液量分别为药材干重的6,8,10,12,15,18倍,酶解后,按照2.2.1项下操作方法制备金丝桃素样品溶液,依照2.1.3项下色谱条件,注入高效液相色谱仪测定含量,计算金丝桃素提取率分别为0.114%,0.118%,0.120%,0.134%,0.136%,0.122%。随着酶解液浸提倍数的增加金丝桃素提取率不断升高,当酶解液浸提倍数为15时,金丝桃素的提取率达到最大,浸提倍数达到15以上时,金丝桃素的提取率则有下

降趋势,故浸提倍数为15倍时最佳。

**2.4.2 酶解时间的考察** 酶解条件为pH 4.8、酶解液浸提倍数15、加酶量纤维素酶2.0%,果胶酶2.0%、酶解温度50℃,酶解时间分别为3,4,5,6,7,8 h。酶解后,按照2.2.1项下操作方法制备金丝桃素样品溶液,依照2.1.3项下色谱条件,注入高效液相色谱仪测定含量,计算金丝桃素提取率分别为0.105%,0.106%,0.116%,0.124%,10.125%,0.125%。随着酶解时间的延长金丝桃素提取率不断升高,当酶解时间达到6 h以后,金丝桃素提取率的升高趋势平缓,综合考虑能源以及效率因素可知,6 h为最适酶解时间。

**2.4.3 酶用量(纤维素酶,果胶酶)的考察** 酶解条件为pH 4.8、酶解液浸提倍数15、酶解温度50℃、酶解时间6 h、加酶量分别为(2.0%,1.0%), (2.0%,1.5%), (2.0%,2.0%), (1.5%,2.0%), (2.5%,2.0%),酶解后,按照2.2.1项下操作方法制备金丝桃素样品溶液,依照2.1.3项下色谱条件,注入高效液相色谱仪测定含量,计算金丝桃素提取率分别为0.111%,0.121%,0.145%,0.105%,0.121%。当纤维素酶/果胶酶用量为2.0%,2.0%时金丝桃素提取率最大。

**2.5 纤维素酶与果胶酶复合正交试验** 本试验根据纤维素酶与果胶酶复合酶解提取的单因素及各自单因素试验数据,取酶解pH、酶解温度、酶用量、酶解时间4个主要影响因素为考察因素,酶解后,按照2.2.1项下操作方法制备金丝桃素样品溶液,安排正交试验设计见表3,正交试验结果及分析见表4,5。

表3 纤维素酶与果胶酶复合正交试验设计

水平	A	B	C	D
	pH	酶用量	温度/℃	时间/h
1	4.6	2.5/1.5	45	6
2	4.8	2.0/2.0	50	7
3	5.0	2.5/2.0	55	8

从表4,5可以看出,酶解液pH、酶解温度、酶用量、酶解时间等均有极显著的统计学意义。从表5方差分析的结果可以看出,因素影响大小的顺序为B(酶用量)>C(酶解温度)>A(酶解pH)>D(酶解时间)。纤维素酶与果胶酶复合酶解贯叶连翘的最佳条件为 $A_2B_2C_2D_1$ ,即pH 4.8、酶用量(纤维素酶,果胶酶)2.0%/2.0%、温度50℃、酶解时间6 h、酶解液浸提倍数15倍。

表 4 纤维素酶与果胶酶复合 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验安排

	A	B	C	D	y <sub>11</sub>	y <sub>12</sub>	y <sub>i</sub>
1	1	1	1	1	0.991 2	1.050 0	2.04
2	1	2	2	2	1.327 8	1.316 2	2.64
3	1	3	3	3	1.100 4	1.148 8	2.25
4	2	1	2	3	1.162 2	1.142 9	2.31
5	2	2	3	1	1.378 1	1.384 2	2.76
6	2	3	1	2	1.160 6	1.178 9	2.34
7	3	1	3	2	1.156 3	1.132 3	2.29
8	3	2	1	3	1.210 9	1.197 7	2.41
9	3	3	2	1	1.282 7	1.311 3	2.59
K <sub>1</sub>	6.93	6.63	6.79	7.40			
K <sub>2</sub>	7.41	7.82	7.54	7.27			
K <sub>3</sub>	7.29	7.18	7.30	6.96			
R	156.11	156.69	156.29	156.09			

表 5 方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	0.020	2	22.523	<0.01
B	0.116	2	130.631	<0.01
C	0.049	2	56.306	<0.01
D	0.017	2	18.018	<0.01
误差	0.004	9		

注: F<sub>0.05</sub>(2, 9) = 4.26, F<sub>0.01</sub>(2, 9) = 8.02。

**2.6 酶解工艺验证** 称取贯叶连翘药材粉末 12 份, 每份 20 g, 精密称定, 分别按照优化出的纤维素酶最佳条件、果胶酶最佳条件、纤维素酶与果胶酶复合最佳条件酶解贯叶连翘药材 3 份, 共 9 份酶解后, 连同不酶解的 3 份均按照 2.2.1 项下操作方法制备金丝桃素样品溶液, 依照 2.1.3 项下色谱条件, HPLC 法测定金丝桃素含量, 结果如表 6。

$$\text{转移率} = \frac{\text{提取物中鑫丝桃素量}}{\text{药材中鑫丝桃素量}} \times 100\%$$

综上所述, 以酶解后金丝桃素的含量及转移率为指标, 纤维素酶与果胶酶复合均高于其单独使用或不使用, 即利用纤维素酶与果胶酶复合酶解工艺所得金丝桃素含量高, 具有较高的经济价值。

### 3 讨论

在研究过程中发现, 纤维素酶与果胶酶对贯叶连翘药材植物细胞壁均有较好的酶解效果, 且纤维素酶优于果胶酶。对纤维素酶与果胶酶进一步混合使用发现, 效果优于单一酶对贯叶连翘药材的酶解

表 6 贯叶连翘药材活性成分酶解工艺验证

批次	酶种类	金丝桃素 质量分数/%	金丝桃素 转移率/%
1	纤维素酶	0.577 6	82.78
2		0.588 2	83.20
3		0.611 8	81.28
4	果胶酶	0.479 6	73.99
5		0.491 2	75.14
6		0.501 3	74.62
7	纤维素与	0.752 2	92.60
8	果胶复合酶	0.781 7	91.93
9		0.812 5	91.04
10	不酶解	0.437 6	72.54
11		0.458 2	69.21
12		0.481 8	73.08

效果, 最终选定纤维素酶与果胶酶复合使用酶解贯叶连翘药材, 并对纤维素酶与果胶酶的复合应用工艺进行研究, 确定贯叶连翘药材利用纤维素酶与果胶酶复合酶解工艺。

本研究确立的酶提取工艺是通过现代生物技术与传统的乙醇提取工艺相结合的方法, 经考察, 该工艺高效、稳定, 具有良好的经济、科研和社会价值, 为今后贯叶连翘药材中有效成分的酶提取工艺奠定初步基础。

### [参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010:215.
- [2] Linde K, Ramirez G, Mulrow C D, et al. St John's Wort for depression-an overview and meta-analysis of randomized clinical trials[J]. BMJ, 1996, 313(7052):253.
- [3] 林启寿. 中草药成分化学[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1990:72.
- [4] Jeffrey M G, Di-Carlo G, Borrelli F, et al. St John's Wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature[J]. Psychopharmacol, 2001, 153:402.
- [5] 李宏, 姜怀春, 邹国林. 贯叶连翘活性成分的研究新进展[J]. 中草药, 2001, 32(7):657.
- [6] 黄英, 张迪清, 何照范. 金丝桃素提取分离工艺的研究[J]. 食品研究与开发, 2001, 22(3):20.

[责任编辑 全燕]