

# 金丝桃素的酶提取工艺优选

李晓坤, 于雷, 郝鹏飞, 杨云\*  
(河南中医学院药学院, 郑州 450008)

**[摘要]** 目的: 探讨贯叶金丝桃中金丝桃素的酶提取工艺。方法: 以高效液相色谱法测定金丝桃素含量为指标, 从纤维素酶、果胶酶、木聚糖酶、 $\beta$ -葡聚糖酶及复合酶 SPE-007A 中筛选出最优酶, 采用单因素试验和正交试验优选提取工艺条件。结果: 最优酶为纤维素酶, 优选酶解工艺为酶用量 2.0%, pH 4.8, 温度 50 °C, 酶解时间 5 h, 浸提倍数 8 倍。结论: 该优选工艺高效、稳定。

**[关键词]** 贯叶金丝桃; 金丝桃素; 酶解提取

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)08-0046-04

## Enzyme Extraction Process of Hypericin

LI Xiao-kun, YU Lei, HAO Peng-fei, YANG Yun\*

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

**[Abstract]** **Objective:** To investigate optimum enzyme extraction technology of hypericin from *Hypericum perforatum*. **Method:** With the content of hypericin was determined by HPLC as index, optimum enzyme was selected from cellulase, pectinase, xylanase,  $\beta$ -glucanase and enzyme SPE-007A, extraction technology conditions was optimized by single factor test and orthogonal test. **Result:** The best enzyme was cellulase, optimum extraction process was as follows: the amount of enzyme 2.0%, pH 4.8, extraction temperature 50 °C, hydrolysis time 5 h, liquid-solid ratio 8 times. **Conclusion:** This optimized technology was efficient and stable.

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

贯叶金丝桃是我国传统的中药材之一, 最早被《本草纲目拾遗》记载, 有疏肝解郁、清热利湿、消肿通乳等功效<sup>[1]</sup>。近年来研究表明, 贯叶金丝桃在抗抑郁、抗病毒、抗肿瘤等方面均有较好的作用<sup>[2-4]</sup>。其中主要活性成分为金丝桃素。目前贯叶金丝桃多用乙醇提取<sup>[5]</sup>, 但普遍存在金丝桃素含量不高、经济效益不好等缺点。酶工程技术是近几年来用于天然植物有效成分提取的一项生物工程技术。在天然植物有效成分的提取过程中, 使用酶可在比较温和的条件下分解植物组织, 以获得更高的提取率。本研究拟通过传统提取技术与现代生物技术相结合的方法, 考察不同种类的酶对贯叶金丝桃药材中金丝

桃素的提取效果, 优选酶解条件。

### 1 材料

2695 型高效液相色谱仪(2996 型 PDA 检测器, 美国 Waters), AE240 型电子分析天平(瑞士 METTLER), BS210S 型电子天平(北京赛多利斯公司), XJA-100A 型高速粉碎机(姜堰市银河仪器厂), 金丝桃素对照品(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, 水为双蒸水, 其余试剂均为分析纯。

贯叶金丝桃药材购自陕西渭南, 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金丝桃 *Hypericum perforatum* L. 的地上部分。

### 2 方法与结果

#### 2.1 金丝桃素 HPLC 含量测定<sup>[6]</sup>

**2.1.1 色谱条件** 依利特 Hypersil ODS2 色谱柱(5.0 mm × 200 mm, 5  $\mu$ m), 流动相甲醇-0.1 mol ·

**[收稿日期]** 20111128(017)

**[第一作者]** 李晓坤, 讲师, 从事中药新药研究与开发, E-mail: gynanxi@163.com

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

$L^{-1} NaH_2PO_4$  (97:3), 柱温 30 °C, 检测波长 590 nm。

**2.1.2 标准曲线** 精密称取金丝桃素对照品 5.20 mg 于 100 mL 量瓶中, 甲醇定容, 取溶液 10.00 mL 于 50 mL 量瓶中, 甲醇定容至刻度, 摇匀, 得 0.010 4  $g \cdot L^{-1}$  对照品溶液。分别精密吸取对照品溶液 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0  $\mu L$  进样, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 以峰面积积分值为纵坐标 ( $A$ ), 以金丝桃素的量 ( $C$ ) 为横坐标进行线性回归, 回归方程  $A = 298.457C - 469.54$  ( $r^2 = 0.9999$ )。金丝桃素在 0.010 4 ~ 0.208  $\mu g$  线性关系良好。

**2.1.3 系统适应性** 分别进行了精密度、重复性、稳定性及加样回收率试验, 试验结果均较好, 表明该方法稳定可行, 可用于金丝桃素的含量测定。

**2.1.4 对照品溶液的制备** 精密称定金丝桃素对照品 1.04 mg, 加甲醇定容至 5 mL 棕色量瓶中, 得金丝桃素对照品甲醇母液。精密量取对照品母液 5 mL, 加甲醇定容至 10 mL 棕色量瓶中, 得 0.010 4  $g \cdot L^{-1}$  的金丝桃素对照品溶液。

**2.1.5 供试品溶液的制备** 精密称取贯叶金丝桃药材粉末约 0.4 g, 精密加入甲醇 100 mL, 称重, 超声提取 1 h, 甲醇补足失重, 过滤, 取续滤液过 0.45

$\mu m$  微孔滤膜, 滤液为供试品溶液。

**2.2 酶的筛选** 将贯叶金丝桃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, 加乙醇提取, 以金丝桃素提取率为指标, 比较不同酶酶解后的提取效果, 筛选出效果最佳酶。

精密称取贯叶金丝桃粉末 (过 40 目筛) 5 g, 加 8 倍量水于 60 °C 温浸 30 min, 调 pH 4.80; 精密称取药材质量 0.5% 的不同酶, 各平行 2 份, 加少量水溶解并于 40 °C 水浴活化 10 min, 加至药材浸泡液中混匀; 50 °C 酶解 2 h, 85 °C 水浴 5 min 使酶灭活, 抽滤, 滤液备用; 取药渣及滤纸, 加乙醇 30 mL (6 倍量), 85 °C 回流提取 2.5 h, 抽滤, 取滤液加乙醇定容至 50 mL, 备用。精密吸取乙醇提取液 5 mL、酶解液 10 mL 至蒸发皿中, 85 °C 水浴蒸干, 加甲醇使残渣充分溶解转移至 10 mL 量瓶中, 甲醇定容至刻度, 混匀, 滤过, 取续滤液得样品液, 按 2.1.1 项下方法测定金丝桃素含量, 并依照以下公式计算金丝桃素提取率, 结果见表 1。

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

表 1 不同酶酶解后乙醇提取液中金丝桃素提取率

No.	不加酶	纤维素酶	果胶酶	木聚糖酶	$\beta$ -葡聚糖酶	SPE-007A
1	0.085 2	0.115 8	0.108 9	0.088 3	0.092 2	0.102 6
2	0.086 7	0.116 9	0.109 1	0.089 8	0.091 3	0.103 4

表 2 金丝桃素提取率方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	临界值	P
组间	0.147 29	5	0.029 458	497.85	8.75	<0.01
组内	0.000 355	6	0.000 059	-	-	-
总和	0.147 645	11	-	-	-	-

由表 1, 2 可知, 各提取方法之间的差异有显著统计学意义。对提取结果进行两两间多重比较检验。采用  $Q$  检验法, 以  $D_T = q_a(k, f_e) \cdot S_e/n^{1/2}$  为标准衡量所有的  $|\bar{x}_n - \bar{x}_1|$ , 凡某 2 个样本均数之差的绝对值超过  $D_T$  者, 便认为相应的两总体均数有显著性差异。

本实验  $D_T = q_a(6, 6)$ , 查多重比较中  $q$  的表,  $q_{0.05}(6, 6) = 5.63$ ,  $q_{0.01}(6, 6) = 7.97$

$D_T(0.05) = q_{0.05}(6, 6) \cdot (S_e^2/n)^{1/2} = 5.63 \times (0.5917/2)^{1/2} = 3.062$

$D_T(0.01) = q_{0.01}(6, 6) \cdot (S_e^2/n)^{1/2} = 7.97 \times (0.5917/2)^{1/2} = 4.335$

由 3 表可知, 酶解与单纯醇提的金丝桃素提取

率之间的差异, 除木聚糖酶无统计学意义外, 纤维素酶、果胶酶、 $\beta$ -葡聚糖酶、复合酶 SPE-007A 均有极显著性差异。由此可见, 酶解提取是较好的提取方法。

与单纯醇提相比, 纤维素酶的显著性最高, 与其他酶相比均有极显著的统计学意义。故本试验选用对金丝桃素提取率较高的纤维素酶进行酶解工艺考察。

**2.3 纤维素酶的单因素试验** 以纤维素酶为水解酶, 酶解温度、pH、加酶量、浸提倍数、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。

**2.3.1 酶解温度** 在 8 倍量水浸提, 加酶量 2.0%, pH 4.8, 酶解时间 6 h 条件下, 酶解温度分别为 35, 40, 45, 50, 55, 60 °C, 结果金丝桃素提取率分别为 0.080%, 0.085%, 0.101%, 0.120%, 0.110%, 0.065%。说明酶解最适温度 50 °C, 该温度下提取率以及反应速度均达到最大值。

**2.3.2 酶解 pH** 在 8 倍量水浸提, 加酶量 2.0%, 温度 50 °C, 时间 6 h 酶解条件下, 考察 pH 4.0, 4.2,

表 3 6 个均数两两间差数的绝对值

$ \bar{x}_n - \bar{x}_1 $	$\bar{x}_2 = 1.163\ 2$	$\bar{x}_3 = 1.089\ 6$	$\bar{x}_4 = 0.890\ 4$	$\bar{x}_5 = 0.917\ 2$	$\bar{x}_6 = 1.030\ 2$
$\bar{x}_1 = 0.860\ 1$	0.303 1 <sup>2)</sup>	0.229 5 <sup>2)</sup>	0.030 3	0.057 1 <sup>2)</sup>	0.170 1 <sup>2)</sup>
$\bar{x}_2 = 1.163\ 2$	-	0.073 6 <sup>2)</sup>	0.272 8 <sup>2)</sup>	0.246 0 <sup>2)</sup>	0.133 0 <sup>2)</sup>
$\bar{x}_3 = 1.089\ 6$	-	-	0.199 2 <sup>2)</sup>	0.172 4 <sup>2)</sup>	0.059 4 <sup>2)</sup>
$\bar{x}_4 = 0.890\ 4$	-	-	-	0.026 8	0.139 8 <sup>2)</sup>
$\bar{x}_5 = 0.917\ 2$	-	-	-	-	0.113 0 <sup>2)</sup>

注:相应两工艺间比较<sup>2)</sup> $P < 0.01$ 。

4.4, 4.6, 4.8, 5.0。结果金丝桃素提取率分别为 0.075%, 0.098%, 0.105%, 0.110%, 0.120%, 0.112%。说明酶的最适 pH 4.8, 该 pH 下金丝桃素的提取率最高。

**2.3.3 酶用量** 固定 pH 4.8, 温度 50 °C, 8 倍量水浸提, 时间 2 h, 加酶量为药材量的 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.8%, 1.0%, 1.5%, 2.0%, 3.0%, 4.0%, 5.0%, 结果金丝桃素提取率分别为 0.092%, 0.095%, 0.102%, 0.106%, 0.117%, 0.123%, 0.127%, 0.124%, 0.123%, 0.122%。说明随着酶用量上升, 酶与底物接触机会增加, 同一时间内水解的分子数不断增加, 致使更多成分分离出来。当达到 2.0% 时金丝桃素提取率达最大值, 高于 2.0% 时, 由于酶与底物接触机会已饱和, 再增加酶用量, 多余的酶反而会相互影响与底物接触的几率, 从而使金丝桃素的提取率略有降低趋势, 因此, 药材所需纤维素酶量适加入量为药材质量的 2.0%。

**2.3.4 浸提倍数** 固定温度 50 °C, pH 4.8, 加酶量 2.0%, 时间 2 h, 浸提倍数 5, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 结果金丝桃素提取率分别为 0.121%, 0.127%, 0.124%, 0.111%, 0.110%, 0.102%, 0.100%, 0.096%。当酶解液浸提倍数为 8 倍时, 金丝桃素提取率达到最大值。

**2.3.5 酶解时间** 固定 8 倍量水浸提, 加酶量 2.0%, pH 4.8, 温度 50 °C, 时间 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 h, 结果金丝桃素提取率分别为 0.098%, 0.104%, 0.106%, 0.110%, 0.112%, 0.116%, 0.116%, 0.117%, 0.116%, 0.117%。选取 6 h 为酶解时长。

**2.4 酶解工艺正交试验** 取酶解时间、酶解 pH、酶用量、酶解温度 4 个主要影响因素为考察因素, 安排正交试验设计见表 4, 酶解后, 按照 2.2 项下操作方法制备金丝桃素样品溶液, 正交试验结果及分析见表 5, 6。

表 4 贯叶金丝桃中金丝桃素的纤维素酶提取工艺正交因素水平

水平	A pH	B 温度/°C	C 酶用量/%	D 时间/h
1	4.6	45	1.5	5
2	4.8	50	2	6
3	5.0	55	2.5	7

表 5 贯叶金丝桃中金丝桃素的纤维素酶提取工艺正交试验安排 %

No.	A	B	C	D	金丝桃素提取率	金丝桃素提取率
1	1	1	1	1	0.089 7	0.087 5
2	1	2	2	2	0.110 3	0.110 7
3	1	3	3	3	0.096 5	0.095 9
4	2	1	2	3	0.122 2	0.123 0
5	2	2	3	1	0.133 6	0.134 2
6	2	3	1	2	0.093 5	0.092 8
7	3	1	3	2	0.112 6	0.117 8
8	3	2	1	3	0.108 7	0.109 1
9	3	3	2	1	0.111 2	0.113 2
$K_1$	5.91	6.53	5.81	6.69		
$K_2$	6.99	7.07	6.91	6.38		
$K_3$	6.73	6.03	6.90	6.55		
R	129.08	128.99	129.11	128.36		

表 6 贯叶金丝桃中金丝桃素的纤维素酶提取工艺方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	0.107	2	0.053	238.739	<0.01
B	0.089	2	0.045	202.703	<0.01
C	0.132	2	0.066	297.297	<0.01
D	0.008	2	0.004	18.018	<0.01
误差	0.002	9	0.000 222	-	

注:  $F_{0.01}(2, 9) = 10.6$ ;  $F_{0.05}(2, 9) = 5.12$ 。

从表 5, 6 可以看出, 影响药材酶解的 4 个因素均有极显著的统计学意义。因素影响大小的顺序为 C(酶用量) > A(酶解 pH) > B(酶解温度) > D(酶解时间)。纤维素酶的最佳酶解条件为  $A_2B_2C_2D_1$ , 即 pH 4.8、温度 50 °C、酶用量 2.0%、酶解时间 5 h、浸提倍数为 8 倍。

**2.5 酶解工艺验证** 称取贯叶金丝桃药材粉末3份,每份20g,精密称定,按照优化出的纤维素酶最佳条件酶解贯叶金丝桃药材,再以乙醇提取,制备贯叶金丝桃提取物,HPLC测定金丝桃素含量,测得药材中金丝桃素质量分数0.095%,计算提取转移率,结果如表7。

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

表7 酶解工艺验证试验

酶种类	批次	干浸膏 得率	浸膏中 金丝桃素 质量分数	金丝桃素 转移率
传统醇提	1	13.113	0.479 6	66.20
	2	12.735	0.491 2	65.85
	3	12.821	0.501 3	67.65
纤维素酶	1	13.615	0.577 6	82.78
	2	13.437	0.588 2	83.20
	3	12.622	0.611 8	81.28

由表7可知,本研究所优选出的酶及其提取条件稳定、高效,为贯叶金丝桃药材酶解提取工艺的研究奠定了基础。

酶解用的水溶液中金丝桃素的量极少,与酶解后乙醇提取的金丝桃素提取量相比相差168~214倍,可以忽略不计,因此本试验不再收集酶解液,药材经酶解后,直接进行乙醇回流提取,见表8。

表8 酶解液与醇提液中金丝桃素量的对比

酶的种类	醇提液	酶解液
纤维素酶	5.91	0.035
果胶酶	5.42	0.025
木聚糖酶	4.45	0.021
$\beta$ -葡聚糖酶	4.55	0.026
复合酶SPE-007A	5.15	0.024

### 3 讨论

在考察金丝桃素的含量测定方法时,根据贯叶金丝桃样品的全波长扫描情况并参照文献[6-7]和《美国药典》24版方法,分别考察270,590nm处金

丝桃素的HPLC含量测定条件,发现590nm时金丝桃素的峰形和分离度均较好,故选定590nm作为金丝桃素的含量测定波长。

与传统的高浓度乙醇提取方法相比<sup>[8,9]</sup>,本研究确立的酶解提取工艺提取率有明显提升,且由于酶所具有的高效性、专一性以及温和性等特点,使本工艺省去了传统醇提取必须预处理贯叶金丝桃药材以除去叶绿素、花青素等干扰物质的过程,在很大程度上降低了生产成本、周期及操作难度。

### [参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2010;215.
- [2] Veronika B, Guido J, Adolf N, et al. Flavonoid from *Hypericum perforatum* show antidepressant activity in the Forced Swimming Test[J]. *Planta Med*,2000. 66;3.
- [3] Agostinis P, Vantieghe A, Merlevede W, et al. Hypericin in cancer treatment: more light on the way [J]. *Int J Biochem Cell Biol*,2002,34(3):221.
- [4] Gulick Roy M. Phase I studies of hypericin, the active compound in St. John's wort, as an antiretroviral agent in HIV-infected adults; AIDS clinical trials group protocols 150 and 258[J]. *Ann Intern Med*,1999,130(6):510.
- [5] Di Carlo G, Borrelli F, Izzo A A, et al. St John's wort: Prozac from the plant kingdom[J]. *Trends in Pharmac Sci*,2001,22(6):292.
- [6] 郝鹏飞,刘富岗,雷雪,等.贯叶连翘中金丝桃素的提取及含量测定[J]. *辽宁中医*,2011,38(11):2241.
- [6] 王利宾,王旭东.双波长分光光度法测定贯叶金丝桃提取物中金丝桃素[J]. *中成药*,2001,23(11):822.
- [7] 裴瑾,万德光,李昌志,等.分光光度法测定金丝桃属药用植物总金丝桃素和总黄酮含量[J]. *成都中医药大学学报*,2002,25(4):43.
- [8] 吴敏,王霞,许平.贯叶金丝桃的研究进展[J]. *中成药*,2004,9(26):760.
- [9] 赵中振.西草药的发展对中医药研究的一些启示[J]. *中国中药杂志*,2009,34(10):1318.

[责任编辑 仝燕]