

双水相萃取在中药活性成分提取分离中的应用进展

刘磊磊, 李秀娜, 赵 帅

吉首大学 林产化工工程湖南省重点实验室, 湖南 张家界 427000

摘 要: 双水相萃取是一种易于放大、可连续化操作、易于集成技术、绿色环保的新型液/液萃取分离技术, 在分离纯化蛋白质、基因、生物纳米分子、细胞和天然产物等领域有着广泛应用。系统综述近 5 年该技术在中药活性成分提取分离中的应用进展, 以期抛砖引玉, 推动中药活性成分分离纯化研究的进步和发展。

关键词: 双水相萃取; 中药; 活性成分; 提取分离; 天然产物

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)05-0766-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.05.025

Advances in application of aqueous two-phase system in separation and purification of active constituents from Chinese materia medica

LIU Lei-lei, LI Xiu-na, ZHAO Shuai

Key Laboratory of Hunan Forest Products and Chemical Industry Engineering, Jishou University, Zhangjiajie 427000, China

Abstract: Aqueous two-phase system (ATPS) is a new liquid-liquid fractionation technique that has been extensively applied in the separation and purification of natural products including proteins, genetic material, bionanoparticles, cells, and secondary metabolites. Advantages of the technique include scale-up potential, continuous operation, ease of process integration, low toxicity, etc. This paper reviewed the applications in separation and purification of the active constituents from Chinese materia medica (CMM) in recent five years, so as to promote the development of separation of the active constituents in CMM.

Key words: aqueous two-phase system; Chinese materia medica; active constituents; extraction and separation; natural products

双水相萃取体系 (aqueous two-phase systems, ATPS) 一般由 2 种聚合物、聚合物和盐、离子液体和盐、小分子亲水有机溶剂和盐组成^[1-4]。当 2 种成相物质在水中充分溶解后, 在分子间相互排斥力和空间阻碍作用的影响下, 经过一段时间平衡, 形成互不渗透的两相体系。随着研究的深入, 一些具有特异分离性能的亲和分配型双水相体系、智能型双水相体系以及胶束和反胶束双水相体系不断地被开发和应用, 并被用于目标分子的选择性分离。常用的能够形成 ATPS 的单体见表 1。ATPS 的萃取原理与常规的液/液溶剂萃取原理相似, 当目标分子进入 ATPS 后, 在分子间氢键、电荷相互作用、范德华力、疏水作用、界面性质作用的影响下, 目标分子从一相传质到另一相, 导致其在两相间的浓度产生差异, 实现分离。因此成相物质的种类和浓度、盐

表 1 常用的形成双水相体系的单体

Table 1 Monomers commonly used to form ATPS

形成双水相的成分 类型	组成单体
聚合物	聚乙二醇、葡聚糖、聚丙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、羟丙基葡聚糖、乙基羟乙基纤维素、琼脂糖、聚乙烯醇
亲水小分子有机溶剂	乙醇、正丙醇、异丙醇、丙酮
离子液体	[BMIm] Cl、[HmIm] Cl、[OMIm] Cl、[BPy] Cl、[TBA] Cl
表面活性剂	TTAC、CPC、C ₁₂ NE、SDBS、SDS
无机盐	Na ₂ HPO ₄ 、K ₂ HPO ₄ 、(NH ₄) ₂ SO ₄ 、K ₃ PO ₄ 、K ₂ SO ₄ 、K ₂ CO ₃

的种类和浓度、溶液 pH 值, 以及目标分子的大小、极性、空间构象等理化性质对 ATPS 的分配行为都

收稿日期: 2014-09-09

基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目 (14JJ6037); 张家界科技局植物开发基础研究专项 (2013YB26); 吉首大学 2013 年人才引进专项 (jsdxrcyjkyxm201301)

作者简介: 刘磊磊 (1984—), 男, 博士, 讲师, 研究方向为中药活性成分分离和表征。Tel: (0744)8231386 E-mail: liull126@126.com

有一定的影响,不同生物大分子和有机小分子的分配系数由此展现出明显差异。

中药体系中微量成分较多,并且初生代谢和次生代谢产物共存,有效与无效成分共存,相互干扰严重,采用传统的分离纯化手段需要经过提取、萃取和多次反复的色谱分离才能得到高纯化化合物。分离步骤繁多、繁琐耗时、产率偏低,很难满足后续活性筛选、结构改造等研究的需要。因此,选择适当的方法,简化分离步骤,一直受到学者的关注和重视。ATPS作为一种新型液/液萃取分离技术,具有易于放大、可连续化操作、易集成技术、绿色环保等优点^[5],自1956年Albertsson^[6]首次应用ATPS技术实现叶绿素的分离以来,在分离纯化蛋白质、基因、生物纳米分子、细胞和天然产物等领域有着广泛应用^[2-4]。本文系统综述近5年ATPS在中药活性成分提取分离中的应用进展,以期抛砖引玉,推动中药活性成分分离的进步和发展。

ATPS作为一种绿色环保的新型分离技术,在中药活性成分分离领域得到了广泛的应用,文献调研显示其研究主要集中于黄酮、生物碱、萜类、多酚、色素和蒽醌等几类化合物,但其分离多局限于样品初级回收,分离对象多为中药的有效组分,需要集成色谱分离手段才能得到高纯单体化合物。

1 ATPS分离纯化中药中黄酮类活性成分

黄酮类化合物是广泛存在于植物中的一大类天然产物,在自然界中大部分以糖苷的形式存在,小部分以游离态苷元形式存在。黄酮类化合物能够抑制特异性关键酶,调节神经递质的释放,显示调血脂、降胆固醇、保肝抗炎等多样的生物活性^[7]。近5年,共有9种黄酮包括金丝桃苷、橙皮苷、芦丁、葛根素、黄芪苷、金雀异黄酮、鹰嘴豆素A、芹黄素和异槲皮苷通过ATPS从中药中分离纯化获得。葛根素能够治疗心血管疾病,Bi等^[8]结合气浮溶剂浮选技术,考察了聚合物的相对分子质量、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的浓度和溶液pH值等因素对ATPS萃取葛根中葛根素效率的影响,发现以50%聚乙二醇(PEG)600和350 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 构建双水相体系,在pH 5.0时,以20 mL/min的浮选速率,浮选100 min,葛根素的回收率达到87%,双水相气浮溶剂浮选比[PEG 600/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] ATPS展现更高的分配因子达到26.1,而ATPS仅为3,最后经高速逆流色谱分离纯度超过95%;范杰平等^[9]利用离子液体耦合超声辅助建立了分离葛根素的新方法,经响应面设计

法优化确定在总体积为5 mL的体系中[Bmim] Br的质量浓度为0.36 g/mL, K_2HPO_4 的质量浓度为0.30 g/mL,加入葛根粉末0.3 g,在420 W、35 °C条件下超声15 min,葛根素的提取率可达到89.90%,与热回流提取和普通超声提取相比,ATPS与超声耦合提取效率更高。对于橘皮中橙皮苷的研究,朱红菊等^[10]采用2种有机溶剂和3种无机盐分别建立异丙醇/ Na_2CO_3 、异丙醇/ K_2HPO_4 、丙酮/ Na_2CO_3 、丙酮/ K_2HPO_4 4种ATPS体系,考察粗提物用量、pH值和温度对橙皮苷的分配效果,发现用28%丙酮和20% K_2HPO_4 组成ATPS体系,在pH 10,粗提物0.4 g,室温条件下,橙皮苷回收率达到96.69%,最后经制备型高效液相制备得到纯度为96.09%的样品;文赤夫等^[11]研究ATPS萃取橙皮苷的成相体系时发现,90%丙酮和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液各取10 mL, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 用量为4.0 g,加入样品0.35 g,pH值为4的条件下,橙皮苷在有机相中的回收率达到98.22%。Bi等^[12]研究黄芩中黄芩苷的双水相气浮溶剂浮选分离时发现,以50%PEG 4000水溶液和300 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液构建ATPS体系,在pH值为2~3条件下,以30 mL/min的浮选速率,浮选30 min,黄芩苷的回收率超过90%,黄芩苷的富集因子超过27,其效果比溶剂浮选、ATPS和液/液萃取的效果都要好。金彦等^[13]结合微波技术考察了28%乙醇和22% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 构建的ATPS体系萃取鹿蹄草中金丝桃苷的能力,经响应面实验设计优化发现在温度为50 °C,液固比为36:1,微波功率为300 W,提取22 min,金丝桃苷的得率可达0.098 2%,质量分数达0.443%。Ma等^[14]建立了一种微波辅助ATPS萃取分离降香叶中金雀异黄酮和鹰嘴豆素A的方法,经响应面设计优化发现以25%乙醇和20% K_2HPO_4 溶液建立ATPS体系,加入1.0 g降香叶干粉,在45.5 °C条件下,300 W微波辅助提取10 min,金雀异黄酮和鹰嘴豆素A的得率分别达到0.103 4%和0.202 3%,其在提取液中的浓度比单纯用微波提取和回流提取的浓度高2~3倍。Zhang等^[15]采用微波辅助ATPS体系对木豆根中金雀异黄酮和芹黄素进行了萃取研究,结果发现28%乙醇和22% K_2HPO_4 建立的ATPS体系效果最好,温度是影响微波提取效果的最主要参数,在料液比为1:30,50 °C条件下,微波辅助提取10 min,金雀异黄酮和芹黄素的得率分别达到0.043 9%和0.020 7%,质量分数比用80%甲醇提取分别增加110%和80%,达到

0.471%和 0.233%。Lin 等^[16]结合微波技术,研究了离子液体 ATPS 体系对罗布麻中金丝桃苷和异槲皮素的分离能力,用正交实验设计优化参数,结果发现 0.4 g/mL 离子液体 [Bmim] [BF₄] 和 NaH₂PO₄ 建立 ATPS 体系,在料液比为 0.02 g/mL, 60 °C 条件下微波辅助提取,金丝桃苷和异槲皮素的回收率分别为 97.29%和 99.40%,其富集效率分别为 66.4%和 65.7%。此外,还有对荷叶^[17]、金银花^[18-19]、山楂叶^[20]、椒蒿^[21]、柠檬渣^[22]、连钱

草^[23]、黄柏^[24]、竹叶兰^[25]、狗枣猕猴桃叶^[26]、竹叶^[27]、蒲公英^[28]和桑黄^[29]等植物中总黄酮进行 ATPS 萃取研究的报道(表 2)。从文献中可以看到,ATPS 技术与其他分离技术(如微波辅助、超声技术、溶剂浮选技术等)进行有效组合,实现了不同技术间的相互渗透、相互融合,能够改善双水相体系相分离时间长,易乳化的缺点,有效提高了 ATPS 的分离效率,进一步拓展了该技术的应用范围。

表 2 ATPS 技术在植物中总黄酮分离富集中的应用

Table 2 Application of ATPS in separation and enrichment of total flavonoids from plants

样品	双水相体系和最佳条件	实验结果	文献
荷叶	PEG4000/(NH ₄) ₂ SO ₄ 质量比 5:2, 25 °C, 3 mL 粗提液, 成相后总质量为 20 g	97.89% ^a	17
金银花	乙醇/(NH ₄) ₂ SO ₄ 体积比 0.7, 盐质量浓度 0.27 g/mL, 50 °C, 超声辅助 75 min, 2.0 g 粉末	1.97% ^b	18
	乙醇/NaH ₂ PO ₄ 36%乙醇, 4.6 g 盐, 25 °C, pH 5.0, 总体积 10 mL, 0.1 g 粉末	98.56% ^a , 49.726% ^b	19
山楂叶	乙醇/(NH ₄) ₂ SO ₄ 5 mL 乙醇, 5 mL 水, 5 g 盐, 0.151 g 粗提物	89.2% ^a	20
椒蒿	乙醇/K ₂ HPO ₄ 7 mL 乙醇, 盐 1.5 g, 3 mL 粗提物, 总体积 10 mL	96.9% ^a	21
柠檬渣	乙醇/(NH ₄) ₂ SO ₄ 60%乙醇, 24 g 盐, 55 °C, 30 min, 料液比 1:20, 2.0 g 粉末	1.58% ^b	22
连钱草	正丙醇/(NH ₄) ₂ SO ₄ 50%正丙醇, 盐 30%, 55 °C, 料液比 1:30, 超声辅助 30 min, 5.0 g 粉末	5.04% ^b	23
黄柏	乙醇/(NH ₄) ₂ SO ₄ 醇水比 0.71, 料液比 1:26, 盐浓度 0.28 g/mL, 超声辅助 77 min, 4 g 粉末	3.23% ^b	24
竹叶兰	正丙醇/(NH ₄) ₂ SO ₄ 质量比 55:20, 超声辅助 50 min, 总体积 25 mL, 1.0 g 粉末	3.53% ^b	25
狗枣猕猴桃叶	PEG400/Na ₂ SO ₄ 质量比 24:15, KCl 2%, pH 9, 25 °C, 双水相总质量 10 g, 3 mL 粗提液	96.90% ^a	26
竹叶	PEG400/(NH ₄) ₂ SO ₄ 质量比 31:11, NaCl 0.7%, pH 3.9, 20 °C, 竹叶提取液 51.5%	97.8% ^a	27
蒲公英	正丙醇/NaH ₂ PO ₄ 2.0 mL 正丙醇, 2.5 g 盐, 50 °C, 超声辅助 30 min, 适量水, 50 mg 粉末	4.12% ^b	28
桑黄	[C ₄ mim] Cl/K ₂ HPO ₄ 3 mL [C ₄ mim] Cl, 2.5 mL 50%盐, pH 9.53, 浮选速率 30 mL/min, 浮选时间 50 min, 1 mL 粗提液	85.31% ^a	29

^a回收率指富集相中目标物质的质量与投入原料粗提液中目标物质的质量之比; ^b得率指富集相中目标物质的质量与投入原料的质量之比, 下表同

^a Recovery rate indicates the ratio between target substance quality in enrichment phase and target substance quality in crude extract of raw material

^b Yield indicates the ratio between target substance quality in enrichment phase and raw material, same as below

2 ATPS 分离纯化中药中生物碱类活性成分

生物碱是一类含有氮元素的碱性有机化合物,活性显著,比如苦参碱、粉防己碱、盐酸小檗碱等都具有显著的抗肿瘤活性,一直备受关注。罗凯文等^[30]采用 20%乙醇和 35% (NH₄)₂SO₄ ATPS 体系,辅助加热回流,对防己粉末中粉防己碱进行了萃取研究,结合高效液相色谱考察了乙醇质量分数、(NH₄)₂SO₄ 体积分数、料液比、pH 值、回流时间和提取次数对粉防己碱萃取率的影响,发现在料液比为 1:8, pH 值为 9 时,粉防己碱在上相中的回收率为 84.50%,回流提取 1 次 120 min,防己粗提物的得率为 1.98%,质量分数为 20.30%。赵鹏等^[31]在研究益母草中水苏碱 ATPS 萃取过程中,考察了乙醇、丙醇、丙酮、PEG 2000 和 (NH₄)₂SO₄、NaNO₃、

Na₂CO₃、Na₃PO₄、Na₂SO₄、K₂HPO₄、NaCl 的成相能力,发现乙醇/K₂HPO₄ ATPS 效果最好,在 4 mL 水和 6 mL 乙醇混合后加入 2 g K₂HPO₄,乙醇相中水苏碱回收率达到 94%,在此条件下,缓慢回流 1~2 h,其得率达到 0.349%。刘小琴等^[32]用乙醇、聚乙二醇和 Triton X-100 与 (NH₄)₂SO₄、K₂HPO₄、Na₂CO₃ 和 Na₂SO₄ 构建 ATPS 体系,结合高效液相色谱考察其对氧化苦参碱和苦参碱的萃取性能,发现 38%乙醇和 18% (NH₄)₂SO₄ 萃取效果最好,在 pH 7.0、30 °C 下搅拌萃取 15 min,氧化苦参碱与苦参碱的分配系数和回收率分别为 4.46、5.10 和 96.17%、95.74%,通过更换上相溶液,用该体系对苦参水提取液萃取 3 次,氧化苦参碱、氧化槐果碱、槐定碱、苦参碱及槐果碱的回收率分别达到 97.89%、98.78%、

98.00%、97.50%和 97.22%，其相对质量分数分别为 35.55%、13.56%、3.64%、12.39%和 4.68%。罗凯文等^[33]用 PEG400/(NH₄)₂SO₄ ATPS 体系对黄柏中盐酸小檗碱进行了提取研究，发现 15% PEG400，(NH₄)₂SO₄ 浓度为 3.4 mol/L，pH 9.0，粗提液加入体积与萃取前下相体积比为 1.0 时，其回收率可达 99.52%。石瑶等^[34]采用 8% PEG6000 和 20% (NH₄)₂SO₄ 构建 ATPS 体系，结合高效液相色谱对丽江山慈菇中秋水仙碱进行了萃取研究，结果显示在 pH 7.0 时，秋水仙碱回收率达 82.09%，富集倍数为 6.84。Jiang 等^[35]将正丙醇、异丙醇、乙醇和 KH₂PO₄、(NH₄)₂SO₄、柠檬酸三钠构建 ATPS 体系，结合高效液相色谱研究了其对蒜粉中蒜碱的萃取能力，经正交实验设计优化后发现 20% 正丙醇和 19% (NH₄)₂SO₄ ATPS 体系，在 pH 2.35、30 ℃条件下，添加一定量的 8.54% NaCl 溶液，蒜碱的得率达到 0.204%，提取效果比传统的好，经阳离子交换树脂分离纯化，质量分数达到 76%。此外，采用 PEG6000/(NH₄)₂SO₄^[36]和 Acetone/KH₂PO₄^[37] ATPS 体系对烟叶中烟碱进行了萃取研究，效果良好；吴佳等^[38]采用正丙醇和 (NH₄)₂SO₄ 组成 ATPS 体系，辅助超声萃取 60 min，对石榴皮中总生物碱进行了萃取研究，得率达到 0.055 9%。

3 ATPS 分离纯化中药中萜类活性成分

刘琳等^[39]采用 25%乙醇和 19% (NH₄)₂SO₄ 建立 ATPS 体系，结合微波技术考察了其对于盾叶薯蓣中多种薯蓣皂苷元的萃取效果，结果显示在料液比为 1:21 时，盾叶新苷、三角叶皂苷、薯蓣皂苷元-葡萄糖三糖苷、薯蓣皂苷元-葡萄糖二糖苷、延龄草次苷的最大分配系数分别达 89、91、93、117 和 153，回收率分别为 99.8%、97.4%、97.3%、86.6%和 63.2%。此外，Liu 等^[40]采用 30%乙醇、17% (NH₄)₂SO₄ 和 40%醋酸乙酯组成三相体系，辅助微波萃取，对盾叶薯蓣中薯蓣皂苷进行了研究，发现薯蓣皂苷元在上相中的回收率达 97.42%，薯蓣皂苷富集于中间相，其中盾叶新苷、三角叶皂苷、薯蓣皂苷元-葡萄糖二糖苷的回收率接近 100%，延龄草次苷和薯蓣皂苷元-葡萄糖三糖苷的回收率分别为 96.03%和 98.82%，多糖基本都富集于下相，回收率达到 72.01%。Liu 等^[41]采用 0.5 mol/L [C₈MIM][PF₆] 和乙醇建立 ATPS 体系，辅助超高压条件对丹参中二萜类成分进行了研究，在料液比为 1:20，200 MPa 超高压条件下，二氢丹参酮、隐丹参酮、丹参

酮 I、丹参酮 II_A 和丹参新酮的得率分别达到 0.406%、0.930%、2.030%、3.740%和 0.059%。肖世基等^[42]利用体积比为 1 的乙醇-水和一定量的 NaH₂PO₄ 组成 ATPS 体系，从雷公藤中富集得到雷公藤甲素的有效部位，雷公藤甲素得率为 0.000 55%，经硅胶柱色谱和重结晶纯化后质量分数达 98.2%。罗建平等^[43]研究乙醇/(NH₄)₂SO₄ ATPS 萃取灵芝酸能力时发现，灵芝酸的提取率和分配系数均随 (NH₄)₂SO₄ 和乙醇量的增加以及温度的升高而增大，随 pH 值的升高而下降；最后在 (NH₄)₂SO₄ 和乙醇的质量分数分别为 22%和 27.63%，温度 70 ℃时，灵芝酸的提取率可达 74.23%，分配系数为 6.63。此外，采用乙醇/(NH₄)₂SO₄ ATPS 体系对柠檬中柠檬苦素^[44]和白英中总皂苷^[45]进行了富集研究，效果良好。张儒等^[46]研究了 PEG 相对分子质量、成相物质质量分数、pH 值和温度等因素对 ATPS 体系萃取人参皂苷的影响，发现 PEG3350 质量分数为 12%，(NH₄)₂SO₄ 质量分数为 16%，pH 值为 7.0，温度为 60 ℃时，人参皂苷回收率可达 88.94%。

4 ATPS 分离纯化中药中多酚类活性成分

Guo 等^[47]采用乙醇/(NH₄)₂SO₄ ATPS 体系，辅助超声技术对丹参中丹酚酸 B 进行了萃取研究，结果显示由 30%乙醇和 22% (NH₄)₂SO₄ 组成的 100 g ATPS 体系，结合中心复合实验设计优化，在固液比为 1:20，pH 值为 2 时，52.1 W 条件下超声 42.6 min，丹酚酸 B 的得率为 4.249%，质量分数为 55.28%，而采用传统的超声溶剂提取（功率 572.1 W，超声 42.2 min，10 g 样品粉末，60%乙醇 100 g），丹酚酸 B 的得率达到 4.312%，但其质量分数仅为 8.29%。郭永学等^[48]采用 29%乙醇和 20% (NH₄)₂SO₄ ATPS 体系对丹参粗提液中丹酚酸 B 的萃取工艺进行了放大研究，在 pH 值为 2.0，30 ℃时，丹酚酸 B 的分配系数为 58.7，回收率为 97.3%，质量分数为 57.4%；放大 40 倍后，其分配系数、回收率和质量分数均无显著差异，分别为 59.3、98.2%和 58.6%。在花青素研究中，Liu 等^[49]采用 25%乙醇和 22% (NH₄)₂SO₄ 构建 ATPS 体系，结合响应面实验设计对紫甘薯中花色苷进行了研究，发现在料液比为 1:45，pH 3.3 条件下，花色苷的提取率和分配因子分别为 90.02%和 19.62，经 HPLC-ESI-MS 色谱确定了 8 种化合物的结构。Wu 等^[50]研究了桑椹中花色苷的双水相萃取效果，发现采用 30%乙醇和 20% (NH₄)₂SO₄ 溶液，在料液比为 1:4，pH 4.5，温度

35 ℃时,花色素提取率能够达到 90%,最后结合 HPLC-ESI-MS 色谱确定了 5 种化合物的结构。张喜峰等^[51]采用响应面设计优化超声集成 ATPS 体系提取葡萄籽中原花青素的最佳工艺条件,发现 21.45%乙醇和 23.46% (NH₄)₂SO₄ 组成 ATPS 体系,在料液比 1:7, 50 ℃下超声提取 45.46 min,葡萄籽中原花青素的提取率可达 30.23%,分配系数可达 11.5。Dang 等^[52]采用微波辅助 ATPS 萃取技术对葡萄籽中多酚类化合物进行了研究,考察了丙酮和柠

檬酸三铵不同比例组成的萃取效果,发现 32%丙酮和 16%柠檬酸三铵组成 ATPS 体系效果最好,总多酚、黄酮和原花青素的得率分别达到 8.27%、5.26%和 3.07%,回收率分别为 97.1%、97.9%和 99.3%,其效果比单纯使用索氏提取、回流提取和 ATPS 提取效果都好。此外,还对路边青^[53]、芒果核^[54]、橡树果实^[55]、桉树^[56]中的总多酚类成分进行了双水相萃取研究,效果良好。双水相萃取技术在植物中总多酚分离富集中的应用见表 3。

表 3 ATPS 技术在植物中总多酚分离富集中的应用

Table 3 Application of ATPS in separation and enrichment of total polyphenols from plants

样品	双水相体系和最佳条件	实验结果	文献
路边青	乙醇/(NH ₄) ₂ SO ₄ : 醇水比 0.8, 盐质量浓度 0.27 g/mL, 固液比 1:20, 60 ℃, 超声辅助萃取 60 min, 1 g 粉末	3.04% ^b	53
芒果核	正丙醇/(NH ₄) ₂ SO ₄ : 60%正丙醇, 盐质量浓度 3 g/L, 固液比 1:20, 超声辅助萃取 15 min, 2 g 粉末	61.96% ^b	54
橡树果实	丙酮/(NH ₄) ₂ SO ₄ : 80%丙酮, 盐质量浓度 0.16 g/mL, 固液比 1:45, 超声辅助萃取 25 min, 1 g 粉末	0.330 3% ^b	55
桉树	PEG2000/(NH ₄) ₂ SO ₄ : 16.37% PEG2000, 15.21%盐, 质量比 1.08, 提取 270 min, 65 ℃, 固液比 1:20, 双水相体系总质量 50 g, 2.5 g 粉末	1.88% ^b	56

5 ATPS 分离纯化中药中其他类型活性成分

其他类型活性成分主要包括蒽醌、香豆素、木脂素、色素等类型化合物。Tan 等^[57-59]采用聚合物/盐、醇/盐和离子液体/盐分别对芦荟中蒽醌类化合物进行了萃取研究,其中在质量比为 2:1 的 PEG6000/(NH₄)₂SO₄ 组成的 ATPS 体系中,通过调节 pH 值至 3.0, 40 ℃条件下,添加 0.6 g NaCl,芦荟叶中蒽醌的回收率达到 90.54%,通过调节 pH 值至 8~14,使蒽醌从聚合物相反萃取至富盐相,其反萃取回收率最高达 70.15%;采用 17.84%正丙醇和 26.66% (NH₄)₂SO₄ 组成 ATPS 体系,在室温不调节 pH 值的条件下,蒽醌在有机相中的回收率达到 95.56%,而采用 1.0 mL [C₄mim] BF₄, 1.0 g Na₂SO₄ 和 5 mL 水组成的 ATPS 体系,在 pH 4.0 时,蒽醌的回收率可达 92.1%。谢玲等^[60]研究了 TritonX-114/(NH₄)₂SO₄ ATPS 体系对蛇床子中蛇床子素的萃取效果,结果显示在 1.0% TritonX-114, (NH₄)₂SO₄ 浓度为 0.8 mol/L, pH 值为 7.0, 温度为 45 ℃时,蛇床子素在离子液体相中的回收率为 98.2%。彭胜等^[61]采用 11% PEG4000 和 8% D40 构建 ATPS 体系,在样品加入量为 8 g, 温度为 60 ℃, pH 7 时,实验重复 3 次,桃叶珊瑚苷有较高的回收

率,可达到 66.32%,质量分数为 48.67%,远高于粗提物中的 8.75%。Montalvo-Hernández 等^[62]研究了西红花中西红花苷在聚合物/聚合物、聚合物/盐、乙醇/盐、离子液体/盐 ATPS 体系中分离效果,发现 19.8%乙醇和 16.5%磷酸二氢钾组成的 ATPS 体系,添加 0.1 mol/L NaCl,超过 75%的总西红花苷富集在上相,效果良好。藤毅等^[63]研究了超声波耦合乙醇/ K₂HPO₄ ATPS 对密蒙花黄色素的萃取效果,发现在 100 mL 50%乙醇中加入 15 g 盐,在 500 W 功率超声 20 min 条件下,3 g 密蒙花粉中黄色素的得率为 27.11%。刘庆华等^[64]利用超声与双水相体系相结合方法对红花红色素进行提取分离,结果发现温度为 40 ℃,料液比为 1:20, 70%丙酮,饱和硫酸铵溶液,超声 2 次,每次 30 min,红花红色素提取率为 0.136%。夏昊云等^[65]采用 β-环糊精/ Na₂SO₄ ATPS 体系对辣椒中辣椒素进行萃取研究,结果显示用 0.5 g β-环糊精, 0.1 g 无水硫酸钠, 温度为 45 ℃, 30 min, 料液比 1:10 时,效果最好,辣椒素回收率可达 86%。信璨等^[66]研究发现采用 25% PEG 400 和 18% Na₂SO₄ 组成 ATPS 体系,在 pH 2.0, 温度为 30 ℃条件下,加入 1 mL 粗提液,月季花色素在上相中的回收率为 98.45%。

6 结语

中药中活性成分复杂,量差异大,对其进行分离纯化繁琐费时,效率和产率偏低,容易丢失微量成分。ATPS作为一种新型的分离技术,能够简化样品前处理过程,在中药活性成分的分离和分析中具有很好的应用前景,但单纯使用ATPS技术分离效率偏低,需要与其他色谱分离手段结合使用分离效果更好。该技术在实际应用中还有待开展大量的研究工作。今后ATPS研究应注意以下几点问题:(1)成本问题,对于PEG/Dextran、PEG/盐ATPS体系,成相聚合物的价格昂贵,黏度大,从聚合物中分离目标物比较困难,一些如超滤、电泳、色谱分离等技术成本也较高,因此采用一些廉价的变性淀粉、乙基羟乙基纤维素、羟基纤维素、聚乙烯醇等代替聚合物,开发新型双水相体系有待进一步研究。(2)分离缺少特异性和专一性,ATPS自首次分离领域应用至今,仅仅作为1种低级的回收技术被使用,其主要原因就是其分离选择性偏低,缺少特异性和专一性,因此一些亲和分配型、智能型和胶束及反胶束双水相体系的构建,及其在天然产物领域的应用有待进一步研究。(3)双水相与其他相关技术的集成研究,双水相体系在应用时存在易乳化、相分离时间较长、分离效率不高等问题,超声、微波辅助、气浮浮选、高效色谱、电泳等技术的引入,能有效地解决这些问题,提高待分离物质的分离效率,简化了分离流程,拓展其应用范围。(4)循环利用问题,在大规模工业生产中,要特别注意原料的回收利用,循环利用环保又节约成本,比如聚合物,其常用的回收技术有2种,一种是加入盐使目标化合物转入富盐相进行回收,另一种是将聚乙二醇相通过离子交换树脂,用洗脱剂先洗去聚乙二醇,再洗出目标化合物,但效率不高,有待进一步研究。

参考文献

- [1] Ratanapongleka K. Recovery of biological products in aqueous two phase systems [J]. *Int J Chem Eng Appl*, 2010, 2(1): 191-198.
- [2] Asenjo J A, Andrews B A. Aqueous two-phase systems for protein separation: Phase separation and applications [J]. *J Chromatogr A*, 2012, 1238: 1-10.
- [3] Federico R R, Jorge B, Oscar A, *et al.* Aqueous two-phase affinity partitioning systems: Current applications and trends [J]. *J Chromatogr A*, 2012, 1244: 1-13.
- [4] Aguilar O, Rito-Palomares M. Aqueous two-phase systems strategies for the recovery and characterization of biological products from plants [J]. *J Sci Food Agric*, 2010, 90(9): 1385-1392.
- [5] 戈延茹, 曹恒杰. 双水相萃取技术及其在药物提取分离中的应用近况 [J]. 中国现代应用药学杂志, 2009, 26(8): 623-627.
- [6] Albertsson P A. Chromatography and partition of cells and cell fragments [J]. *Nature*, 1956, 177(4513): 771-774.
- [7] DivYashree R, Amit K R, Francesca G, *et al.* Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45(12): 2821-2831.
- [8] Bi P Y, Dong H R, Yuan Y C. Application of aqueous two-phase flotation in the separation and concentration of puerarin from *Puerariae* extract [J]. *Sep Sci Technol*, 2010, 75(3): 402-406.
- [9] 范杰平, 曹婧, 孔涛, 等. [Bmim] Br-K₂HPO₄双水相萃取与超声耦合提取葛根中的葛根素及其优化 [J]. 高校化学工程学报, 2011, 25(6): 955-960.
- [10] 朱红菊, 丁玉, 贾亚伟. 桔皮中橙皮苷的新型双水相萃取 [J]. 食品与生物技术学报, 2013, 32(9): 995-1001.
- [11] 文赤夫, 赵凯, 康练常, 等. 双水相技术在萃取橙皮苷中的应用 [J]. 食品科学, 2009, 30(22): 71-73.
- [12] Bi P Y, Chang L, Mu Y L, *et al.* Separation and concentration of baicalin from *Scutellaria baicalensis* Georgi extract by aqueous two-phase flotation [J]. *Sep Sci Technol*, 2013, 116: 454-457.
- [13] 金彦, 姚晓慧, 段明慧, 等. 金丝桃苷双水相提取工艺研究 [J]. 植物研究, 2013, 33(3): 367-370.
- [14] Ma F Y, Gu C B, Li C Y, *et al.* Microwave-assisted aqueous two-phase extraction of isoflavonoids from *Dalbergia odorifera* T. Chen leaves [J]. *Sep Sci Technol*, 2013, 115: 136-144.
- [15] Zhang D Y, Zu Y G, Fu Y J, *et al.* Aqueous two-phase extraction and enrichment of two main flavonoids from *Pigeon pea* roots and the antioxidant activity [J]. *Sep Sci Technol*, 2013, 102: 26-33.
- [16] Lin X, Wang Y Z, Liu X J, *et al.* ILs-based microwave-assisted extraction coupled with aqueous two-phase for the extraction of useful compounds from Chinese medicine [J]. *Analyst*, 2012, 137(17): 4076-4085.
- [17] 陈秀娟, 苏慧英, 王光琴, 等. 双水相分离纯化荷叶中黄酮类化合物 [J]. 广东化工, 2011, 38(224): 9-10.
- [18] 许灵君, 欧阳玉祝, 吴道宏, 等. 双水相体系协同超声提取法分离金银花总黄酮 [J]. 食品与发酵科技, 2010, 46(6): 93-96.
- [19] Liu Y, Han J, Wang Y, *et al.* Selective separation of flavones and sugars from honeysuckle by alcohol/salt aqueous two-phase system and optimization of extraction

- process [J]. *Sep Sci Technol*, 2013, 118: 776-783.
- [20] 赵立辉, 武文洁, 杨昱涵. 双水相系统纯化山楂叶中黄酮类物质的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21(5): 849-853.
- [21] 顾玉娟, 彭 秧. 乙醇-磷酸氢二钾双水相体系萃取测定茺蒿中总黄酮的含量 [J]. 中国酿造, 2012, 31(8): 156-158.
- [22] 汪建红, 廖立敏, 王 碧. 乙醇/硫酸铵双水相体系提取柠檬渣中总黄酮研究 [J]. 华中师范大学学报: 自然科学版, 2013, 47(1): 78-81.
- [23] 成明建, 陈小英, 黄齐慧. 正交试验优选双水相分配与超声提取集成法提取分离连钱草总黄酮的工艺 [J]. 中国药房, 2010, 21(27): 2532-2534.
- [24] 银永忠, 龙进国. 响应面法优化黄柏总黄酮的双水相超声提取工艺 [J]. 食品与发酵科技, 2011, 47(6): 65-69.
- [25] 付艳丽, 高云涛, 李竞春, 等. 星点设计-响应面法优化傣药竹叶兰总黄酮超声-双水相提取工艺 [J]. 中成药, 2010, 32(12): 2059-2063.
- [26] 王 倩, 贾长虹, 常丽新, 等. 双水相萃取法分离纯化狗枣猕猴桃叶总黄酮 [J]. 食品科学, 2011, 32(16): 167-171.
- [27] 张中玉, 罗宇倩, 钱俊青, 等. 双水相萃取法分离竹叶黄酮的工艺研究 [J]. 氨基酸和生物资源, 2012, 34(2): 24-28.
- [28] 阮尚全, 王志鹏, 黄雀宏, 等. 双水相-超声波提取榴莲果皮总黄酮的工艺研究 [J]. 现代食品科技, 2012, 28(12): 1722-1725.
- [29] 戈延茹, 潘 如, 傅海珍, 等. 离子液体双水相溶剂浮选法分离/富集桑黄黄酮类成分 [J]. 分析化学, 2012, 40(2): 317-320.
- [30] 罗凯文, 戚雪勇, 戈延茹, 等. 回流辅助的双水相体系提取防己中粉防己碱 [J]. 江苏大学学报: 医学版, 2013, 23(4): 332-336.
- [31] 赵 鹏, 郭圣荣. 双水相体系萃取分离-分光光度法测定益母草中水苏碱 [J]. 药物分析杂志, 2010, 30(10): 1953-1956.
- [32] 刘小琴, 张 薇, 范华均, 等. 双水相萃取分离苦参生物碱 [J]. 过程工程学报, 2012, 12(4): 641-647.
- [33] 罗凯文, 黄 庆, 戈延茹, 等. 双水相体系分离富集黄柏中盐酸小檗碱 [J]. 现代中药研究与实践, 2012, 26(6): 48-51.
- [34] 石 瑶, 杨亚玲, 李晚谊, 等. 双水相萃取丽江山慈菇中的秋水仙碱 [J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(10): 1412-1416.
- [35] Jiang X M, Lu Y M, Tan C P, *et al.* Combination of aqueous two-phase extraction and cation-exchange chromatography: new strategies for separation and purification of alliin from Garlic Powder [J]. *J Chromatogr B*, 2014, 957: 60-67.
- [36] 刘宝亮, 谷叶辉. PEG 6000/(NH₄)₂SO₄ 双水相同时提取烟叶中茄尼醇和烟碱的研究 [J]. 化工技术与开发, 2012, 41(12): 4-7.
- [37] 刘宝亮, 曹桂萍, 张金涛. 双水相同时提取次烟叶中茄尼醇和烟碱的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(12): 1729-1732.
- [38] 吴 佳, 解成喜. 超声集成双水相体系提取石榴皮中总生物碱的研究 [J]. 分析科学学报, 2012, 28(6): 883-885.
- [39] 刘 琳, 董悦生, 修志龙. 微波辅助双水相提取盾叶薯蓣中的皂苷成分 [J]. 过程工程学报, 2009, 9(6): 1147-1152.
- [40] Liu L, Dong Y S, Xiu Z L. Three-liquid-phase extraction of diosgenin and steroidal saponins from fermentation of *Dioscorea zingibersis* C. H. Wright [J]. *Process Biochem*, 2010, 45(5): 752-756.
- [41] Liu F, Wang D, Liu W, Wang X, *et al.* Ionic liquid-based ultrahigh pressure extraction offivetanshinones from *Salvia miltiorrhiza* Bunge [J]. *Sep Sci Technol*, 2013, 110: 86-92.
- [42] 肖世基, 韦万兴, 刘志平, 等. 液-液三相萃取法分离纯化雷公藤甲素 [J]. 广西大学学报: 自然科学版, 2011, 36(3): 496-499.
- [43] 罗建平, 冯宝军, 潘利华. 乙醇/硫酸铵双水相体系分离灵芝酸的研究 [J]. 食用菌, 2011(2): 58-65.
- [44] 汪建红, 廖立敏, 王 碧, 等. 乙醇-硫酸铵双水相体系提取柠檬渣中柠檬苦素研究 [J]. 食品工业科技, 2014(3): 230-232.
- [45] 郑尚季, 贾玉荣, 秦 峥, 等. 双水相体系萃取白英总皂苷 [J]. 沈阳药科大学学报, 2012, 29(4): 302-306.
- [46] 张 儒, 张变玲, 谢 涛, 等. 双水相体系萃取人参根中人参皂苷的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(11): 1610-1613.
- [47] Guo Y X, Han J, Zhang D Y, *et al.* An ammonium sulfate/ethanol aqueous two-phase system combined with ultrasonication for the separation and purification of lithospermic acid B from *Salvia miltiorrhiza* Bunge [J]. *Ultrason Sonochem*, 2012, 19(4): 719-724.
- [48] 郭永学, 王立红, 张大勇, 等. 乙醇/硫酸铵双水相体系从丹参粗提液中分离丹酚酸 B [J]. 化工学报, 2012, 63(6): 1773-1779.
- [49] Liu X L, Mu T H, Sun H N, *et al.* Optimisation of aqueous two-phase extraction of anthocyanins from purple sweet potatoes by response surface methodology [J]. *Food Chem*, 2013, 141(3): 3034-3041.
- [50] Wu X Y, Liang L H, Zou Y, *et al.* Aqueous two-phase

- extraction, identification and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) [J]. *Food Chem*, 2011, 129(2): 443-453.
- [51] 张喜峰, 李彩霞, 张 瑾, 等. 超声集成双水相体系提取葡萄籽中的原花青素 [J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(4): 444-449.
- [52] Dang Y Y, Zhang H, Xiu Z L. Microwave-assisted aqueous two-phase extraction of phenolics from grape (*Vitis vinifera*) seed [J]. *J Chem Technol Biot*, 2014, 89(10): 1576-1581.
- [53] 欧阳玉祝, 张辞海, 薛 慧, 等. 超声协同双水相体系提取路边青总多酚工艺 [J]. 食品科学, 2011, 32(16): 89-92.
- [54] 高云涛, 付艳丽, 李正全, 等. 超声与双水相体系耦合提取芒果核多酚及活性研究 [J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(9): 164-167.
- [55] 马立然, 黄 亮, 李安平, 等. 超声波辅助双水相体系提取橡胶实仁多酚的研究 [J]. 食品工业科技, 2012, 33(3): 191-194.
- [56] Xavier L, Freire M S, Vidal-Tato I, et al. Aqueous two-phase systems for the extraction of phenolic compounds from eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) wood industrial wastes [J]. *J Chem Technol Biotechnol*, 2014, 89(11): 1772-1778.
- [57] Tan Z J, Li F F, Xing J M. Separation and purification of aloe anthraquinones using PEG/salt aqueous two-phase system [J]. *Sep Sci Technol*, 2011, 46(9): 1503-1510.
- [58] Tan Z J, Li F F, Xu X L. Extraction and purification of anthraquinones derivatives from *Aloe vera* L. using alcohol/salt aqueous two-phase system [J]. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2013, 36(8): 1105-1113.
- [59] Tan Z J, Li F F, Xu X L. Isolation and purification of aloe anthraquinones based on an ionic liquid/salt aqueous two-phase system [J]. *Sep Purif Technol*, 2012, 98: 150-157.
- [60] 谢 玲, 周 军, 田倩倩, 等. 双水相体系萃取分离-高效液相色谱法测定蛇床子中蛇床子素的研究 [J]. 解放军药学学报, 2010, 26(4): 310-314.
- [61] 彭 胜, 彭密军, 卜晓英, 等. 双水相体系萃取分离杜仲叶中桃叶珊瑚甙的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22(2): 264-267.
- [62] Montalvo-Hernández B, Rito-Palomares M, Benavides J. Recovery of crocins from saffron stigmas (*Crocus sativus*) in aqueous two-phase systems [J]. *J Chromatogr A*, 2012, 1236: 7-15.
- [63] 滕 毅, 吴 琼, 何磊磊, 等. 超声波协同乙醇-磷酸氢二钾双水相体系萃取密蒙花黄色素 [J]. 食品工业科技, 2012, 33(20): 273-275.
- [64] 刘庆华, 陈孝娟, 于 萍, 等. 超声结合双水相体系提取红花红色素的研究 [J]. 中国药理学杂志, 2011, 46(19): 1482-1485.
- [65] 夏昊云, 金 瑜. 辣椒素的双水相萃取研究 [J]. 食品工业, 2014, 34(2): 164-167.
- [66] 信 璨, 常丽新, 贾长虹. 双水相萃取法分离纯化月季花色素 [J]. 河北联合大学学报: 自然科学版, 2012, 34(2): 56-60.