

中药提取分离新技术的研究进展

叶陈丽^{1,2}, 贺 帅¹, 曹伟灵², 张忠义^{1*}

1. 南方医科大学珠江医院 药剂科, 广东 广州 510280

2. 深圳市罗湖区人民医院 药学部, 广东 深圳 518001

摘 要: 系统综述了近年来中药有效成分提取分离新技术, 包括超高压提取、超声提取、微波萃取、加压溶剂提取、组织破碎提取、免加热提取、高速逆流色谱分离技术、分子印迹技术。主要介绍了这些提取方法的基本原理、特点、应用进展、存在的问题以及未来发展的方向等, 以期为我国现代中药制药的研究和生产提供参考。

关键词: 中药; 提取技术; 超高压提取; 高速逆流色谱; 分子印迹技术

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)03-0457-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.03.028

Research progress in new technologies for extraction and separation of Chinese materia medica

YE Chen-li^{1,2}, HE Shuai¹, CAO Wei-ling², ZHANG Zhong-yi¹

1. Department of Pharmacy, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510280, China

2. Department of Pharmacy, Shenzhen Luohu People's Hospital, Shenzhen 518001, China

Abstract: Extraction and separation technologies appeared in recent years are particularly reviewed in the principles, features, latest research and application results, and existing problems as well. These new techniques include ultrahigh pressure extraction (UPE), ultrasound-assisted extraction (UAE), microwave-assisted extraction (MAE), pressurized solvent extraction (PSE), smashing tissue extraction (STE), heating-free extraction (HFE), high-speed countercurrent chromatography (HSCCC), and molecular imprinting technique (MIT). Further research topics and application prospects of these extraction and separation technologies are also suggested, so as to provide the reference for the research and production of modern Chinese materia medica.

Key words: Chinese materia medica; extraction technology; ultrahigh pressure extraction; high-speed countercurrent chromatography; molecular imprinting technique

中药制药过程一般包括提取、分离、浓缩、干燥和制剂等环节。中药有效成分的提取分离是中药生产过程的关键环节, 其工艺特点、工艺流程的选择和设备配置都直接关系到被提取有效成分的数量和质量, 从而影响到产品质量的稳定性和有效性等。而且, 生物药、植物药的研制已成为当今世界创新药发展的潮流, 世界各制药大国普遍关注从天然植物中筛选有效成分用于研制新药。因此探明中药提取、分离技术的机制、优化提取工艺参数, 明确应用前景等逐渐成为中药生产和研究的重点内容。随着我国中药现代化进程的不断推进, 中药提取分离

新技术的基础和应用研究十分活跃, 并取得了长足的进步。本文就几种现代中药提取分离新技术的原理、特点和应用现状进行综述, 并探讨其存在的问题及未来的研究方向, 以期为我国现代中药制药的研究和生产提供参考。

1 常温超高压提取(ultrahigh pressure extraction, UPE)

超高压提取全称是超高冷等静压(ultrahigh isostatic hydrostatic pressure at room temperature)^[1]。20世纪80年代日本学者率先开展了高压食品的研究, 1991年第1种高压食品——果酱在日本问世,

收稿日期: 2014-05-12

基金项目: 广州市科学技术项目(2012Y2-00018-2)

作者简介: 叶陈丽, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药新制剂与新技术研究。Tel: 13715355681 E-mail: 838632643@qq.com

*通信作者 张忠义, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药有效成分提取和中药新剂型研究。Tel: (020)61643499 E-mail: zhang43499@sohu.com

标志着高压食品加工技术取得了突破性进展^[2]。随着超高压技术研究的深入和发展, 该技术应用范围不断扩大, 已广泛应用于食品、材料、生物医药、物理化工、生物化学及材料学等诸多领域。

超高压提取包括间歇式、半连续式、连续式和脉冲式4种类型, 其原理是在常温或较低温度的条件下, 迅速施加100~1 000 MPa的流体静压力, 保压一定时间, 使提取溶剂在超高压作用下迅速渗透到固体原料内部, 溶解其化学成分, 并在短时间内达到溶解平衡, 然后迅速卸压, 在超高渗透压差下, 化学成分迅速扩散到组织周围的溶剂中; 同时在超高压作用下, 细胞的细胞壁、细胞膜以及细胞内液泡等结构发生变化, 细胞内容物和溶剂充分接触, 从而达到快速、高效地提取目的。超高压能够对非共价键(氢键、离子键、疏水键)产生影响, 而对共价键影响并不敏感, 故生物大分子成分可发生变性而对小分子物质(如皂苷、黄酮、生物碱、挥发油、单糖、维生素、色素等)的分子结构没有影响^[3]。因此, 高压可使蛋白质变性、酶失活、微生物死亡等; 改变多糖溶液流变学特性、物理化学性质, 可能与多糖的种类有关; 而不破坏小分子物质的分子结构。超高压提取之所以可以维持在接近常温或较低温度, 是因为高压容器壁与周围环境存在热交换, 温度升高的程度远小于理论数值, 这有利于固体原料中的热敏性成分、易挥发性成分的提取; 同时流体静压的压力传递瞬间完成, 使得容器内任何方向和位置的压强相等, 故超高压提取对物料的作用是均匀一致的, 避免局部受热不均, 造成目标成分的结构变化和损失, 从而保证了目标成分具有更高的生物活性^[4]。

目前, 超高压提取广泛应用于单味中药化学成分的提取, 如生物碱、苷类^[5]、黄酮、多糖^[6-7]、鞣质、酚类^[8]、挥发油、有机酸等^[9]。影响超高压提取效果的因素有原料的粉碎度、溶剂、料液比、压力、温度、升压时间、保压时间、泄压时间以及循环次数等^[9]。

超高压提取技术具有操作温度低^[4], 保证提取物更高的生理活性^[10]; 适用范围广, 亲水性和亲脂性等化学成分都可以用该方法提取^[9]; 提取时间短, 一般只需1~20 min^[11]; 提取效率高^[12]; 能耗低^[4]; 提取工艺简单, 绿色环保等特点^[13]。但是, 超高压提取设备昂贵, 是目前实现工业化面临的主要问题, 但随着超高压提取技术的不断发展, 其应用范围和

规模也正在迅速扩大。另外, 超高压提取法对单味及复方中药的适用性和操作条件优化及其提取传质机制研究、中试和工业规模装置的研发等是亟待解决的问题。

2 超声提取(ultrasound-assisted extraction, UAE)

超声波于1830年被发现, 超声提取、超声干燥、超声灭菌、超声过滤、超声清洗等方法目前已广泛应用于食品、医疗卫生和家电等许多领域。超声提取法是利用超声波增大物质分子运动频率和速度, 增加溶剂穿透力, 提高被提取化学成分的溶出度, 缩短提取时间的方法。超声波具有空化、乳化、搅拌、扩散、化学效应、凝聚效应等特殊作用, 可破坏植物细胞, 使溶剂渗透到细胞中, 有利于化学成分的溶解。超声提取浴式系统存在超声能量分布不均一、动力随时间延长降低的缺点, 影响实验结果重复性, 而探针式系统则将超声能量集中在样品区域附近, 使液体空化效率更高^[14]。

影响超声提取效果的因素^[15]: 一是声学参数, 如超声频率、声强、持续时间、超声作用方式、空占比等; 二是工艺参数, 如原料质地、粒度、溶剂、料液比、浸泡时间、物料湿度、提取次数、温度等。声学参数是影响超声提取效率的特有因素, 如声学参数中的声强在1.28 W/cm²的低场强条件下, 提取人参皂苷的得率随声强的升高而增加, 随超声频率的升高而减少, 在2.55 W/cm²的较高场强条件下, 随超声频率的升高先增加后减少; 人参皂苷的得率随超声作用时间的延长而增加, 超过1 h后增加的趋势不明显^[16]。实际上超声提取技术效率的关键工艺参数在不同研究中存在明显差异, 可能与各研究者选择的考察因素、研究对象的差异有关。

超声提取已广泛用于不同药用部位中药的提取, 如根和根茎类: 丹参、三七、人参、葛根、黄芪等; 全草类: 益母草、长春花等; 叶类: 银杏、苦竹、杜仲等; 花类: 曼陀罗、金银花等; 果实和种子类: 山楂、枸杞、沙枣等。该方法具有提取温度低、提取时间短、提取效率高、适用性广、能耗低等特点, 如超声提取辣椒碱, 比热浸渍法快5倍, 且提取效率更高^[17]; 提取多酚, 比索氏提取法快4倍^[18]; 提取多糖, 与热水提取、微波萃取法相比, 提取效率高, 更易于纯化, 并且由于其提取温度低, 所得的多糖的抗氧化活性也较高^[19]。

超声提取仍存在一定的局限性。液体在摩擦或热传导过程中吸收超声波导致液体整体温度升高而

引起升温效应,可能会导致某些提取的化学成分不可预控的物理化学性质改变;超声波提取受热不均匀,提取液比较浑浊,不易滤过;超声波在不均匀介质中传播会发生散射衰减,影响提取效果;噪音污染大,产业化困难,容易造成有效成分的变性、损失等。今后应深入开展超声提取机制、动力学理论的研究;解决超声辐射设备的安全标准问题;研制专用超声提取设备实现工业化应用;超声提取与其他提取技术如超临界萃取、固相萃取、微波提取、高速逆流色谱、酶法提取、真空蒸馏等的集成研究^[15]。

3 微波萃取(microwave-assisted extraction, MAE)

微波是一种频率在300 MHz至300 GHz之间的电磁波,它具有波动性、高频性、热特性和非热特性四大基本特性。微波的热效应是基于极性物质偶极子的转向极化与界面极化,在高频微波场作用下,极性分子会在1 s内发生数十亿次180°的高频变换,产生粒子间的相互摩擦、碰撞,迅速生成大量的热能,引起温度升高。微波提取最早于1986年用微波炉从土壤中萃取分离有机化合物^[20],之后迅速扩展到包括植物药提取等众多领域。微波提取主要利用不同组分吸收微波能力的差异,使机体物质的某些区域或提取体系中的某些组分被选择性加热,使得被提取物质从机体或体系中分离进入到介电常数较小、微波吸收能力相对较差的提取溶剂中,从而获得较高提取率的一种新型提取方法。影响萃取效果的因素有物料粒度、溶剂极性/介电常数、溶剂比例及pH值、萃取时间、萃取器尺寸、微波剂量、温度以及物料含水量等,其中溶剂是首要因素。溶剂对物料的化学成分要有较强的溶解能力,如己醇、己烷等弱极性或非极性溶剂,微波可以透过溶剂,降低微波消耗,且溶剂温度低可防止化学成分受热分解。物料含微量水可有效吸收微波能,促使细胞壁的溶胀破裂,有利于化学成分的溶出。微波连续辐射时间(微波剂量)不宜过长,否则会使系统的温度升高,溶剂剧烈沸腾,造成溶剂大量损失。另外,物料质地和粒度也会影响提取效果,尤其是对黏度较大的溶剂。

微波提取技术具有选择性高、萃取速度快、重现性好、省时节能、提取率高、产品质量好、不易破坏所提成分的生物活性与化学结构等优点。微波提取的应用包括:(1)果胶类成分,如微波辐射能大大加快组织的水解,果胶提取的时间由传统法的

90 min缩短到9.8 min,果胶纯度和酯化度都较高^[21];(2)多糖成分,如微波技术提取青钱柳多糖,与热回流和超声提取相比,提取时间最短,提取率最高达到5.04%^[22];(3)皂苷类成分,如80%乙醇为溶剂提取黄芪皂苷I、II、III、IV,较其他的常规提取方法提取率均为最高,且时间仅为回流提取的1/12、超声提取的1/8^[23];(4)挥发油成分,如薄荷、薰衣草、迷迭香、石菖蒲等涵盖唇形科、芸香科、木兰科、姜科、伞形科、菊科和樟科等富含芳香油的植物^[24];(5)其他成分,如黄酮、生物碱、多酚、蒽类等的提取^[25]。

微波提取也存在不足。微波辐射不均匀,容易造成局部温度过高,导致有效成分的变性、损失,且对富含淀粉或树胶的物料提取,容易产生提取物的变形和糊化,不利于胞内物质的释放。另外,微波提取对提取溶剂也有选择性,如溶剂必须是透明或半透明的,介电常数在8~28内^[25]。目前微波萃取基本上还停留在实验室小样品的提取及分析。所以应该根据目标提取物和药材的复杂性、微波提取的特殊性,深入研究微波提取的传热、传质机制,保证微波辐射的能量均匀分布和辐射安全;加强研究和生产精密、安全的提取设备;加强与其他处理技术在线联用,如与固相微萃取、水蒸气蒸馏法、液相微萃取或检测仪器联用,实现多种化学成分提取和成分分析的连续操作,实现自动化。

4 加压溶剂提取(pressurized solvent extraction, PSE)

加压溶剂提取又名加压流体萃取(PFE)、加速溶剂萃取(ASE)等,是十多年前提出的提取技术,已被美国国家环保局批准为EPA354号标准方法,该法是一种在较高温度(50~200℃)和压力(10.3~20.6 MPa)的条件下,用有机溶剂萃取固体或半固体样品的自动化方法^[26]。加压溶剂提取已广泛应用于药物分析、环境、食品、农检、商检、化工、进出口检验、检疫以及刑侦等诸多领域当中,在中药提取方面的应用较少^[27]。加压溶剂提取技术的主要原理是在密闭容器内,通过升高压力使提取溶剂的沸点随之升高,从而使提取过程在高于正常溶剂沸点的温度而溶剂仍能维持液体状态。高温可以提高溶剂的溶解度;加快分子扩散的速度,提高化学成分的传质提取过程;温度可破坏化学成分与基质间的交互作用,较快完成解吸附过程,维持物料表面平衡;降低溶剂的表面张力与黏度,增强渗透

性和润湿基质的能力,提高提取效率。而高压使得整个提取过程在一个较高的压力条件下进行,使提取溶剂在高于其沸点的温度下仍能维持液体状态而增加溶剂对化学成分的穿透性;能破坏物料细胞壁,促进溶剂扩散和浸润物料的过程,使物料毛细孔内迅速充满溶剂,提高提取率。此外,高压环境使得溶剂较易进入基质表面的水膜,完成提取过程。加压溶剂提取的热降解并不明显,原因在于高压下加热,高温时间一般少于 10 min^[26]。提取过程主要由以下 7 个步骤组成:提取容器的负载、填充有机溶剂、加热、静态提取、置换有机溶剂、排空提取液、提取管的卸载。由于提取容器中钢玻底片和纤维素滤膜自带的滤过功能,并且提取溶剂选用的是色谱纯,所以提取液一般情况下不需要特别处理,只需用微孔滤膜滤过就能直接上柱分析。

加压溶剂提取法与其他溶剂萃取技术相比,具有自动化程度高、萃取时间短、萃取溶剂用量少(萃取 10 g 样品仅用 15 mL 溶剂)、萃取过程密闭(保护不耐氧和对光敏感的成分)、对人体危害小、环境污染少、样品适应性强、提取效率高、重现性好、操作模式多样化以及操作过程自动化(自动进样和自动收集装置)等诸多优点^[28]。影响因素主要有:物料及溶剂特性、料液比、压力、温度、时间、循环次数、添加剂等。高压和高温是提取过程中最主要的 2 个影响因素,而添加剂包括非离子表面活性剂(如十二烷基硫酸钠、Triton X-100)、抗氧化剂(如抗坏血酸)、CO₂(降低 pH 值)、干燥剂等,更有利于目标成分的提取^[29]。

加压溶剂提取法已用于食品和多种单味中药化学成分提取分离,如采用固液萃取、加压溶剂 2 种提取方法提取苹果果皮和果肉中的多酚物质,两者具有相近的萃取效果^[30];加压溶剂提取法提取葡萄籽和茶叶中的儿茶素类多酚优于单纯的溶剂萃取法和超临界流体萃取法提取效果^[31];加压溶剂法提取嘉宝果中的花青素效果较超声辅助及索氏提取法更好^[32];加压溶剂提取法提取槐角总异黄酮得率最高为 28.4%,而微波辅助法 20.5%、超声提取法 19.4%、亚临界水法 23.0%^[33]。雷公藤多苷、雷公藤甲素、黑大豆总异黄酮、香菇多糖、五味子中 4 种木脂素等的加压溶剂提取也获得了良好效果。还有关于加压溶剂提取多酚、异黄酮、木脂素、类胡萝卜素等的研究报道^[34-35]。

加压溶剂提取法存在着仪器成本高、不适用于

热敏化合物、对操作者要求较高等缺点。今后应深入开展加压溶剂提取对中药活性成分稳定性的影响研究;加强提取机制、适用范围选择、提取条件优化的研究;加强研究和生产精密、安全的提取设备;以及与其他分析技术,如 GC、MS、HPLC、高速逆流色谱的联用^[36],便于快速分离检测中药中的低极性成分、中等极性成分和高极性成分。

5 组织破碎提取(smashing tissue extraction, STE)

组织破碎提取法的基本原理是在室温和适当溶剂条件下,将物料在数秒钟内破碎至细微颗粒,同时通过实现高速搅拌、振动、负压渗滤 3 种因素的最佳结合,使化学成分迅速达到物料组织内外平衡,通过滤过达到提取目的^[37]。根据溶质在固液两相间的传质理论,化学成分的提取过程包括:(1)从细胞中溶出;(2)穿过物料与溶剂的界面;(3)在溶剂中溶解和扩散。组织破碎提取法是通过闪式提取器来实现的^[37],适用于植物软、硬材料。提取时既考虑到使物料达到适当粒度,利于组织内外平衡,又不至于因颗粒度太细而影响提取后的过滤效果,故控制破碎颗粒范围在 40~60 目^[38]。当这样细小的颗粒与适当溶剂混合,在高速搅拌与振动下,物料内部的化学成分在极短的时间转移至溶剂中并达到平衡。完成 1 次提取一般在 1 min 左右,残渣在抽滤过程中略经洗滤即可基本实现提取完全的目的^[38]。与传统的提取方法相比,组织破碎提取法适用于不同质地的动植物材料;减少粉尘的污染和溶剂残留,避免回流时细粉沉底爆沸现象,提高了提取效率。该方法具有高效、快速、节能、环保及不破坏热敏成分、规模可调、适宜多种溶剂等特点^[39]。影响提取效果的因素包括溶剂、料液比、物料粒度、介质温度、功率、浸泡时间、提取时间、提取次数等^[37,40]。目前已经应用于生物碱、黄酮、皂苷、多糖、萜类、鞣质、多酚等生物活性成分的提取^[41-43]。

组织破碎提取法不仅适用于不同质地的动植物材料,还可应用于不同类型的化学成分。闪式提取器的破碎刀头按照动物组织匀浆化的均质器设计,避免普通组织捣碎机的单刀切碎,故适用于韧性极强的皮类、毛发类、骨骼类、矿物类药材的提取。而密度小、蓬松的叶、花及全草类,体积大而单次加入药材量较少;非饮片、质地坚硬的根及根茎、干果类等进入内外刃之前须先加工成饮片大小或适当打碎,刀头易产生被卡情况;水作溶剂易引起黏稠性增大及混悬、乳化现象等,造成滤过困难。在

具体应用中需按照操作规程进行摸索试验,才能充分发挥其高效、快速、节能、环保的特点。作为一种技术创新,该仪器吸收了传统的粉碎、搅拌、振动、浸渍及萃取等技术的优点,提取时间缩短至常规方法的数十分之一或数百分之一^[37],无需加热有效避免了对不耐热成分的破坏。

6 免加热提取(heating-free extraction, HFE)

免加热提取法是对浸泡物料的溶媒施加交变压强,强制改变了细胞形状和细胞壁两侧的渗透压,促使细胞不断地进行扩张和挤压运动,促使溶剂反复渗入、渗出,便可将化学成分高效地置换到细胞外,分离除去固相杂质,再利用低温干燥空气热平衡法干燥,得到提取物^[44]。其特点是采用压力交变法,改善细胞壁两侧的渗透压,在低于或等于常温的条件下完成提取(在绝热条件下,压力每提高 100 MPa,水的温度升高 3 ℃左右,由于采用的是交变压力且存在热交换,温度升高程度小于理论数值),适用于热敏性物质,避免加热提取法引起的有效成分散失、挥发和氧化,保留化学成分的生物活性,提取率高,提取物结构疏松,有利于吸收并更好地发挥疗效,并已在之后的研究中得到证实^[45-46]。

免加热提取法已应用于龙血竭、大黄、水蛭、大蒜、辣椒等的有效成分提取研究,并与传统提取方法进行了对比,印证了该法的优势^[44-47]。另外,免加热提取的研究申请了多个专利,包括鲜薄荷、土鳖虫、紫草、灵芝、蜈蚣等的免加热提取工艺研究^[48-49]。目前,免加热提取装置虽然已有公司生产,但是,对该提取过程的影响因素及机制的了解还不够,对其他中药品种的适应性也有待进一步验证。免加热提取法是运用压力交变法实现的,在工业应用上如何避免由此而引起操作复杂化和设备安全问题,需要进一步研究。

7 高速逆流色谱分离技术(high-speed countercurrent chromatography, HSCCC)

高速逆流色谱是 20 世纪 60 年代在液液分配色谱的基础上发展起来的一种高效快速的色谱新技术。不需要固体支撑体来保持固定相,利用两相不相混溶液体作固定相和流动相,其中一相分布在一根空管中为固定相,另一相以一定的流速通过固定相并与之混合。高速逆流色谱是建立在特殊的流体动力学平衡基础上,利用螺旋管的高速行星式运动产生的不对称离心力场,实现两相溶剂体系的充分保留和有效混合及分配,从而实现物质在溶剂中高

效分离^[50-51]。高速逆流色谱具有显著的优点:不用固体载体,无样品的不可逆吸收、降解和失活;操作简便,回收率和产品质量分数高;可采用不同物化特性的溶剂系统和多样性的操作条件,适应性强;分离效率高,样品分离量大;适宜放大,便于工业化生产等^[52]。

影响高速逆流色谱分离条件包括溶剂体系、螺旋管转速、固定相保留量等。利用高速逆流色谱分离的关键技术是摸索待分离的化学成分在两相中的分配系数处于 0.5~2 的溶剂系统。常用于分离生物碱和黄酮类的溶剂系统为氯仿-甲醇-水或正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水系,有机酸类为正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水系,苷类化合物为氯仿-甲醇-水或醋酸乙酯-正丁醇-水系,木质素、香豆素类和萜类为正己烷-醋酸乙酯-乙醇-水等弱极性体系等。高速逆流色谱的应用主要集中在单体成分的分离(如石杉碱甲,毛蕊异黄酮,白藜芦醇,人参皂苷 Rb₁、Re、Rg₁ 等)、标准品制备(如槲皮素、厚朴酚、白鲜碱、京尼平苷等)、质量控制(何首乌、沙棘、雪莲、丹参等中药或提取物的指纹图谱研究)、药物筛选等方面。

新型的高速逆流色谱技术以及与其他技术联用进行提取分离:(1) pH 区带逆流色谱,适用于分离制备有机酸和有机碱,尤其是生物碱类的分离。采用叔丁基甲醚-甲醇-水(4:1:5)体系,从荷叶提取物中分离出质量分数均大于 98%的 *N*-去甲荷叶碱、*O*-去甲荷叶碱、荷叶碱和莲碱^[53]。(2) 与质谱(MS)联用,减少了样品损失、失活、变性和被污染的机率,在线提供所分离组分的质谱信息。采用制备 HSCCC/ESI-MS-MS 联用技术,正己烷-正丁醇-水(1:1:2)为溶剂体系,从茶叶中分离出茶多酚^[54];采用 HPLC-DAD-MS/MS 联用技术,醋酸乙酯-正丁醇-水(2:1:3)为溶剂体系,从枳实粗提取物中获得质量分数均大于 97%的柚皮芸香苷、柚皮苷、新桔皮苷^[55]。(3) 双向逆流色谱(DuCCC),适合于分离极性范围分布较宽的多组分天然粗提物,如肌红蛋白、卵蛋白、血红蛋白、重组酶如嘌呤核苷酸磷酸化酶、尿苷硫酸化酶等,提高了理论塔板数和分离效率。(4) 正交轴逆流色谱,适用于生物大分子样品的分离制备。

与经典的液固色谱柱相比,高速逆流色谱技术也存在不足之处,如分离效率不高,理论塔板数<1 000;一次分离所需时间较长、溶剂消耗多;基本原理、溶剂系统选择及相应的配套检测器不完善;

分离后样品的纯度需 HPLC 等方法测定;混合溶剂的回收较难等。近年来,随着梯度洗脱、pH 区带优化、离子交换顶替、手性选择分离等技术的引入以及高速逆流色谱技术与质谱、HPLC 联用技术的发展,使得高速逆流色谱技术在新药研发、标准品制备、天然产物化学成分研究等领域得到更加广泛的应用,理论体系也将不断完善。

8 分子印迹技术 (molecular imprinting technique, MIT)

分子印迹技术是指制备对某一特定的目标分子(模板分子、印迹分子或烙印分子)具有特异选择性的聚合物的过程。分子印迹聚合物 (molecular imprinted polymer, MIP) 是由模板分子(印迹分子)与功能单体通过静电作用、疏水作用、氢键等非共价作用力形成分子复合物,加入交联剂引发聚合,使该分子复合物结合在聚合物中,得到包含模板分子的高分子聚合物。去除模板分子后,聚合物母体中留下与模板分子结构互补的立体空穴和能与模板分子相互作用的功能基团,从而对模板分子表现出特异选择性和吸附能力^[56]。影响 MIP 制备的因素包括模板分子、功能单体、交联剂、聚合用的溶剂、断“键”用的溶剂、引发剂等。MIP 特点:①构效预定性,根据不同的目的成分制备不同的 MIP;②特异识别性, MIP 具有特殊的分子结构和官能团,能选择性地识别印迹分子;③广泛实用性,具有抗恶劣环境的能力,表现出高度稳定性和较长的使用寿命,且制备简单。

分子印迹技术在中药活性成分提取分离中的应用较为广泛,如黄酮、多元酚、生物碱、甾体、香豆素、木脂素、有机酸等多种结构类型化合物。其具体应用涉及分离手性异构体及结构类似物,直接纯化活性成分并进行测定,洁净生物样品用于体内药物分析,富集微量有效成分,大批量一步分离纯化目标成分,以具有特定药效化合物为模板选择性分离具有相同药效的活性成分等^[57]。分别用丙烯酰胺和 α -甲基丙烯酸作功能单体,加入致孔剂 CaCO_3 ,制备了熊去氧胆酸印迹的核壳微球,以甲基丙烯酸为功能单体,非印记聚合物与印记聚合物对目标分子的吸附量分别是 13.93 和 43.52 mg/g,印记聚合物对目标分子的分离因子为 2.2,该聚合物能将熊去氧胆酸的同分异构体进行有效分离,解决了用鹅去氧胆酸转换制备熊去氧胆酸时混合物难以分离的问题^[58]。采用分子印迹技术合成了以青蒿素为模板分

子,丙烯酰胺为功能单体,乙二醇二甲基丙烯酸酯为交联剂的青蒿素分子印迹聚合物,Scatchard 模型分析表明青蒿素分子印迹聚合物对青蒿素具有良好的特征吸附和选择识别性能,为天然产物中高效分离纯化活性成分青蒿素提供了一种新型材料^[59]。以白术内酯 III 为模板分子、1-乙烯基咪唑为功能单体,采用沉淀聚合法制备了白术内酯 III 分子印迹聚合物,再将其作为固相萃取柱 (SPE) 填料对白术和党参药材提取液中白术内酯 III 及其结构相近的活性成分进行富集分离,结果显示 MIP-SPE 和 C_{18} -SPE 的富集因子分别为 78.90 和 51.56 $\mu\text{g/g}$,分子印迹固相萃取法可以作为定向富集低含量活性成分的有效方法^[60]。以穿心莲内酯为模板分子制备的分子印迹聚合物作为柱填料用于固相萃取,对目标分子的吸附效果明显优于碳十八、三氧化二铝以及空白聚合物^[61]。

分子印迹技术也存在一些不足之处,如 MIP 作为 HPLC 固定相时柱效过低,拖尾现象严重,功能单体的选择有限,不适宜难溶印迹分子的分离,模板昂贵或难于得到,以及制备相对分子质量较高成分的 MIP 困难等缺点。今后应更深入研究借助分子模拟等方法从分子水平上研究其识别过程和作用机制;探索将分子印迹聚合物 MIP 的制备和应用从有机相向水相过渡、从非极性溶剂环境向极性溶剂环境转换的方法;发掘更多的功能单体和交联剂的种类,完善聚合方法,开发新型功能单体和交联剂,探索新的合成方法及模板分子的快速去除方法。由于 MIP 本身具有极高的选择性和特异识别能力,使得该技术在中药有效成分的提取、分离中具有广阔的应用前景。

9 结语

除上述新技术外,超临界流体萃取是一种以超临界流体代替常规有机溶剂对目标组分进行萃取和分离的技术,而常用的 CO_2 超临界萃取技术适合提取亲脂性、相对分子质量小的物质,对于极性大、相对分子质量大的物质,需要加携带剂或在高压下进行。此外,酶法提取、液泛法提取、半仿生提取法、连续逆流提取,大孔吸附树脂色谱技术、分子蒸馏技术、膜分离技术等,都已在中药有效成分提取分离技术中得到了一定的应用。

中药提取技术种类繁多,选择时应从药效、药理、工艺、工程、经济、环保、循环再利用等角度综合考虑。理想的中药提取技术应具有提取效率高、

有效成分损失小、提取物临床疗效好且质量稳定、工艺简便且操作连续自动和安全、提取时间短、经济和环保等特点。尽管植物有效成分的提取方法很多,但真正应用于工业化生产的提取方法多为传统的提取方法(连续回流、回流、煎煮、浸渍、渗漉),这些方法工艺简单,设备投资小,技术含量低,易于操作,但存在有效成分损失大、提取时间长、工序多、提取效率不高等缺点。而其他的提取方法(超高压、超声、微波、超临界流体萃取、酶解),尽管技术含量高,具有提取时间、效率高等诸多优点,但尚未得到广泛地应用。目前需要将现代提取技术和工业生产有机结合,研发出规模化生产的提取设备,优化提取工艺,并集成现代分离和分析测试技术,建立科学规范的质量监测体系,生产出具有“三效”(高效、速效、长效)、“三小”(剂量小、毒性小、副作用小)、“三便”(便于储存、携带和服用)等特点的现代中药。

参考文献

- [1] Zhang S Q, Zhu J J, Wang C Z. Novel high pressure extraction technology [J]. *Int J Pharm*, 2004, 278(2): 471-474.
- [2] 林力丸. 高压在食品方面应用的研究开发和任务 [J]. *食品与开发*, 1991, 26(12): 2-4.
- [3] 闫光军, 张宝江, 徐道娟. 几种常用人参提取工艺研究比较 [J]. *山东医药工业*, 2002, 21(4): 8.
- [4] 陈瑞战, 张守勤, 刘志强. 超高压技术在中药有效成分提取中的应用 [J]. *中草药*, 2007, 38(12): 1905-1908.
- [5] Chen R Z, Meng F L, Zhang S Q, *et al.* Effects of ultrahigh pressure extraction conditions on yields and antioxidant activity of ginsenoside from ginseng [J]. *Sep Purif Technol*, 2009, 66(2): 340-346.
- [6] Yang B, Jiang Y M, Wang R, *et al.* Ultra-high pressure treatment effects on polysaccharides and lignins of longan fruit pericarp [J]. *Food Chem*, 2009, 112(2): 428-431.
- [7] 杜冰, 温升南, 唐健, 等. 超高压提取灵芝孢子粉多糖的工艺研究 [J]. *现代食品科技*, 2009, 25(4): 420-422.
- [8] Xi J, Xue Y, Xu Y, *et al.* Artificial neural network modeling and optimization of ultrahigh pressure extraction of green tea polyphenols [J]. *Food Chem*, 2013, 141(1): 320-326.
- [9] 贺帅, 雷正杰, 张忠义. 超高压技术在提取中药有效成分中的应用 [J]. *中药材*, 2009, 32(3): 466-469.
- [10] Prasada K N, Hao J, Shi J, *et al.* Antioxidant and anticancer activities of high pressure-assisted extract of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) fruit pericarp [J]. *Innovative Food Sci Emerging Technol*, 2009, 10(4): 413-419.
- [11] Zhang S Q, Chen R Z, Wu H, *et al.* Ginsenoside extraction from *Panax quinquefolium* L. (American ginseng) root by using ultrahigh pressure [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 41(1): 57-63.
- [12] Guo X F, Han D M, Xi H P, *et al.* Extraction of pectin from navel orange peel assisted by ultra-high pressure, microwave or traditional heating: A comparison [J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 88(2): 441-448.
- [13] 宁娜, 周晶. 超高压提取技术在中药提取中的研究进展 [J]. *天津药学*, 2008, 20(5): 62-64.
- [14] 刘明言, 王帮臣. 用于中药提取的新技术进展 [J]. *中草药*, 2010, 41(2): 169-175.
- [15] Shirsath S R, Sonawane S H, Gogate P R. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations-A review of current status [J]. *Chem Eng Process*, 2012, 53: 10-23.
- [16] 徐彦渊, 丘泰球, 张晓燕, 等. 超声强化提取人参皂甙过程中声学参数的选择 [J]. *食品研究与开发*, 2006, 27(2): 9-12.
- [17] Boonkird S, Phisalaphong C, Phisalaphong M. Ultrasound-assisted extraction of capsaicinoids from *Capsicum frutescens* on a lab-and pilot-plant scale [J]. *Ultrason Sonochem*, 2008, 15(6): 1075-1079.
- [18] Khan M K, Vian M A, Tixier A S F, *et al.* Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel [J]. *Food Chem*, 2010, 119(2): 851-858.
- [19] Tian Y T, Zeng H L, Xu Z B, *et al.* Ultrasonic-assisted extraction and antioxidant activity of polysaccharides recovered from white button mushroom (*Agaricus bisporus*) [J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 88(2): 522-529.
- [20] Ganzler K, Salgo A, Valko K. Microwave extraction. A novel sample preparation method for chromatography [J]. *J Chromatogr*, 1986, 371: 299-306.
- [21] 姚先超, 张雪红, 梁玉石. 应用响应面分析法优化微波辅助提取剑麻果胶多糖的工艺 [J]. *食品科学*, 2013, 34(18): 56-60.
- [22] Xie J H, Xie M Y, Shen M Y, *et al.* Optimisation of microwave-assisted extraction of polysaccharides from *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja using response surface methodology [J]. *J Sci Food Agric*, 2010, 90(8): 1353-1360.
- [23] Yan M M, Liu W, Fu Y J, *et al.* Optimisation of the microwave-assisted extraction process for four main astragalosides in *Radix Astragali* [J]. *Food Chem*, 2010, 119(4): 1663-1667.
- [24] 邹小兵, 陶进转, 夏之宁, 等. 微波辅助提取挥发油的研究进展 [J]. *中成药*, 2010, 32(6): 1014-1020.
- [25] 张英, 俞卓裕, 吴晓琴. 中草药和天然植物有效成分提取新技术——微波协助萃取 [J]. *中国中药杂志*, 2004, 29(2): 104-108.
- [26] Richter B E, Ezzell J L, John B A J, *et al.* An accelerated solvent extraction system for the rapid preparation of environmental organic compounds in soil [J]. *Am Lab*, 1995, 27(4): 26-28.
- [27] 郑创钦, 李赐恩. 加速溶剂萃取技术在中药有效成分分析中的应用 [J]. *中国医药导刊*, 2010, 12(10):

- 1820-1821.
- [28] 牟世芬. 加速溶剂萃取的原理及应用 [J]. 环境化学, 2001, 20(3): 299-300.
- [29] Mustafa A, Turner C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review [J]. *Anal Chim Acta*, 2011, 703(1): 8-18.
- [30] Alonso-Salces R M, Barranco A, Corta E, *et al.* A validated solid-liquid extraction method for the HPLC determination of polyphenols in apple tissues Comparison with pressurized liquid extraction [J]. *Talanta*, 2005, 65(3): 654-662.
- [31] Piñeiro Z, Palma M, Barroso C G. Determination of catechins by means of extraction with pressurized liquids [J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1026(1/2): 19-23.
- [32] Veggi P C, Santos D T, Angela M, *et al.* Anthocyanin extraction from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins by different techniques: economic evaluation [J]. *Procedia-Food Sci*, 2011, 35(1): 1925-1931.
- [33] 张博雅, 周 丽, 王凤荣, 等. 加压溶剂法提取槐角总异黄酮的研究 [J]. 中草药, 2012, 43(6): 1108-1111.
- [34] Cha K H, Lee H J, Koo S Y, *et al.* Optimization of pressurized liquid extraction of carotenoids and chlorophylls from *Chlorella vulgaris* [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(2): 793-797.
- [35] Mottaleb M A, Sarker S D. Accelerated solvent extraction for natural products isolation [J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 864: 75-87.
- [36] Zhang Y, Liu C, Yu M, *et al.* Application of accelerated solvent extraction coupled with high-performance counter-current chromatography to extraction and online isolation of chemical constituents from *Hypericum perforatum* L. [J]. *J Chromatogr A*, 2011, 1218(20): 2827-2834.
- [37] 刘延泽. 植物组织破碎提取法及闪式提取器的创制与实践 [J]. 中国天然药物, 2007, 5(6): 401-407.
- [38] 李精云, 刘延泽. 组织破碎提取法在中药研究中的应用进展 [J]. 中草药, 2011, 42(10): 2145-2149.
- [39] 刘延泽, 袁 珂, 冀春茹. 中草药化学成分提取的新方法——植物组织破碎提取法 (EMS) [J]. 河南科学, 1993, 11(4): 265-268.
- [40] 于 敏, 韩德强. 闪式提取法提取丹参中有效成分的研究 [J]. 中成药, 2010, 32(9): 1609-1612.
- [41] 毕跃峰, 贾 陆, 张小娟, 等. 不同提取方法对丹参中丹参酮 II_A 和丹酚酸 B 含量测定的影响 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29(7): 1209-1212.
- [42] 汤芳玲, 袁 波, 蔡光明. 小叶黑柴胡中柴胡皂苷的闪式提取工艺的研究 [J]. 中草药, 2009, 40(S1): 160-162.
- [43] 刘 英, 苏柘瑾, 陈 龙, 等. 应用 Box-Behnken 设计优化地榆鞣质的闪式提取工艺 [J]. 华西药学杂志, 2012, 27(3): 304-306.
- [44] 胡迎庆, 王中军, 宋月英, 等. 免加热工艺大黄提取物与生大黄、熟大黄提取物的药效比较 [J]. 中药材, 2002, 25(12): 893-895.
- [45] 史小莲, 刘俊田, 李西宽, 等. 水蛭免加热提取物抗凝血及抗血栓作用 [J]. 中药新药与临床药理, 2004, 15(2): 95-97.
- [46] 曹广军, 张静泽, 陈 莉, 等. 免加热工艺大蒜提取物对结肠癌 THC8908 细胞活性的影响 [J]. 武警医学院学报, 2005, 14(3): 169-170.
- [47] 张 莉, 胡迎庆, 高 颖, 等. 辣椒不同工艺提取物的镇痛作用比较 [J]. 药品评价, 2006, 3(2): 109-111.
- [48] 邓昌沪. 鲜品灵芝分部位提取物及提取方法: 中国, CN1720940 [P]. 2006-01-18.
- [49] 邓昌沪. 免加热提取鲜薄荷挥发油的工艺方法: 中国, CN1721512 [P]. 2006-01-18.
- [50] 李爱峰, 刘宁宁, 柳仁民. 高速逆流色谱原理及其在天然产物化学成分分离中的应用研究进展 [J]. 理化检验: 化学分册, 2008, 44(5): 481-487.
- [51] 辛 莉, 施 江, 刘素云, 等. 高速逆流色谱及其在天然产物分离中的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2009, 30(11): 335-338.
- [52] 陈小芬, 黄新异, 郑媛媛, 等. 高速逆流色谱分离纯化天然产物中生物碱类成分的应用进展 [J]. 中草药, 2011, 42(5): 1026-1032.
- [53] 郑振佳, 杨 滨, 徐美霞, 等. pH 区带逆流色谱法分离制备荷叶中生物碱 [J]. 中草药, 2011, 42(4): 684-686.
- [54] Gutzeit D, Winterhalter P, Jerz G. Application of preparative high-speed counter-current chromatography/electrospray ionization mass spectrometry for a fast screening and fractionation of polyphenols [J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1172(1): 40-46.
- [55] Wang C, Pan Y, Fan G, *et al.* Application of an efficient strategy based on MAE, HPLC-DAD-MS/MS and HSCCC for the rapid extraction, identification, separation and purification of flavonoids from *Fructus Aurantii Immaturus* [J]. *Biomed Chromatogr*, 2010, 24(3): 235-244.
- [56] 丁明玉. 现代分离方法与技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2006.
- [57] 林 喆, 罗 艳, 原 忠. 分子印迹技术在中药活性成分分离纯化中的应用 [J]. 中草药, 2007, 38(3): 457-460.
- [58] Xu Z Y, Wan J F, Liang S, *et al.* Separation of ursodeoxycholic acid from its isomeric mixture using core-shell molecular imprinting polymer [J]. *Biochem Eng J*, 2008, 41(3): 280-287.
- [59] 李小燕, 仝海娟, 雷福厚, 等. 青蒿素分子印迹聚合物分子识别性研究 [J]. 中草药, 2012, 43(4): 795-798.
- [60] 江一帆, 李进进, 袁友泉, 等. 分子印迹聚合物定向分离分析药材中白术内酯III的研究 [J]. 中国药理学杂志, 2012, 47(13): 1077-1080.
- [61] Yin X, Liu Q, Jiang Y, *et al.* Development of andrographolide molecularly imprinted polymer for solid-phase extraction [J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2011, 79(1): 191-196.