

微波辅助萃取技术应用于现代中药的研究开发*

□沈平嫔** 王 娟** (国家中药制药工程技术研究中心 上海 201203)

摘 要:重点研究微波辅助萃取工艺在中药制药工程技术领域中的应用。选择不同药用部位的中药,采用化学分析指标跟踪、药效学平行试验的评价方法,开展了比较系统的工艺技术研究。

微波萃取小型设备及中试的研究结果表明:经过微波辐射后能较好地富集药材中的有效成分,与传统回流提取工艺比较,微波辅助萃取技术不仅萃取时间短、溶剂用量少、有效物质更易溶出,可显著地提高提取效率,更具有提取过程环境清洁、操作简便,更易于实现自动化生产控制,其推广应用可望为现代中药新药的研究开发提供新途径及新工艺。本文还同时介绍运用微波辅助萃取技术开发两种中药六类新药的新进展。

关键词:微波辅助萃取技术 中药 微波辐射 有效成分

为保证中药处方的量效关系的均一性,从中药材中提取出稳定的有效成分十分重要。许多研究者运用微波辅助萃取技术对中药提取工艺进行探索研究,以便将药材中的有效成分或者有效部位尽可能提净,尽量减少损失,以保持“重要特色”前提下,逐步实现中药生产规范化、标准化。

本文归纳总结了国家中药制药工程技术研究中心承担的“微波诱导萃取技术在中药制药关键技术中的应用研究”和“中药微波辅助萃取技术的标准化与产业化研究”两项科技部重点攻关项目的研究成果。

一、材料与方法

1. 材 料

根茎类药材(刺五加、葛根、何首乌、人参、黄芪)、果实类药材(五味子)、花类/全草类药材(金银花、野菊花)均购自上海养和堂中药饮片有限公司;实验中所用的水为超纯水(自制);乙腈(Merk公司,德国)、甲醇(Merk公司,德国)均为色谱纯,乙醇、磷酸、正丁醇均为分析纯试剂(购自国药集团化学试剂有限公司);对照品(异秦皮啶、葛根素、黄芪甲苷、Rg1、绿原酸、五味子醇甲、五味子酯甲)均购自中国药品生物制品检定所。

2. 仪器设置

UV-2102PCS 型紫外可见分光光度计(UNICO 上

收稿日期:2005-10-08

修回日期:2005-11-28

* 科技部重点科技攻关项目(99-929-02-14):微波诱导萃取技术在中药制药关键技术中的应用研究,负责人:沈平嫔,科技部重点科技攻关项目(2004BA721A40):中药微波辅助萃取技术的标准化与产业化研究,负责人:王娟。

** 联系人:沈平嫔,本刊编委,教授,长期从事中药现代化科技创新工作和中药制药工程技术研究工作,Tel:021-38953270,E-mail:spn@nercmtem.com;王娟,博士,副教授,主要研究方向:中药制药工程技术,Tel:021-50805522-4007,E-mail:jwang@nercmtem.com

海仪器有限公司), Waters 510 高效液相色谱仪, 色谱柱为 Shim-pack VP-ODS 色谱柱 ($3.5\mu\text{m}$, $4.6\text{mm}\times 150\text{mm}$), 超纯水制备系统(上海赛鸽电子科技有限公司)。

微波萃取器的小试设备由 Whirlpool VIP272 产品改造而成; 微波萃取器的中试设备是我公司自行设计、并委托南京三乐微波技术发展有限公司与温州设备制造厂共同制造, 最大容积 50L, 最大功率 10kW, 功率可调, 温度和时间可以控制; 粉碎机为 GM 电磁振动给料机。

3. 实验方法

通过预实验, 得知微波辅助萃取工艺与微波功率、微波辐射时间、溶剂浓度、溶剂用量、物料粉碎度、物料含水量等因素有关, 以这些参数作为考察因素, 采用均匀设计列表安排实验。然后将各次实验测定结果用均匀设计(4.0 版软件)自选变量法进行数据分析, 根据回归方程, 求出最优组合, 并进一步综合分析, 得出综合的最优工艺组合, 指导验证实验。

4. 质量分析方法

用化学分析指标跟踪、药效学平行试验的评价方法, 检验实验结果。分析方法采用高效液相色谱法、可见分光光度法等。其中: 对刺五加检测总皂苷与异秦皮啶^[1-2]; 对葛根检测总黄酮与葛根素^[3-4]; 对何首乌检测总蒽醌^[5]; 对五味子检测总木脂素与五味子醇甲; 对金银花及野菊花检测绿原酸等。

二、实验结果

1. 微波辅助萃取刺五加中总皂苷、异秦皮啶有效成分

(1) 微波萃取和传统加热回流方法的比较。

结果: 传统回流法与索氏提取法所需的溶剂较微波萃取法多; 且加热时间为微波萃取法的 24 倍; 微波萃取干浸膏得率较低, 而总皂苷及异秦皮啶含量要高出 1~2 倍。

(2) 不同辐射方式(连续式与间歇式)对微波萃取刺五加的影响。

结果: 干浸膏得率两种方式稍有差别, 含量几乎

相同(图 2); 故可选连续式进行操作, 有利于工业化应用。

(3) 微波功率对萃取刺五加的影响。

结果: 随着微波功率的增大, 刺五加干浸膏得率呈渐增趋势, 功率 680W 时总皂苷和异秦皮啶的含量最高。

(4) 辐射时间对萃取刺五加的影响。

结果: 随着连续微波辐射时间的延长, 刺五加干浸膏得率将逐渐增加, 而有效成分的溶出则在 30min 时有一最大值出现。

(5) 溶剂用量对微波萃取刺五加的影响。

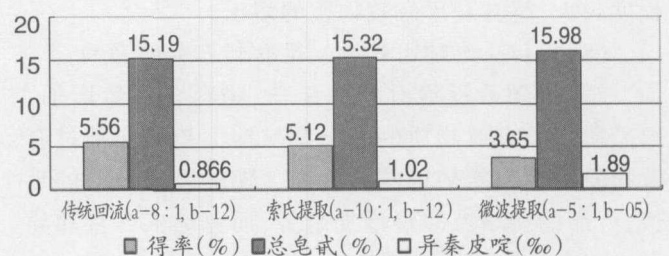


图 1 微波萃取、传统回流及索氏提取刺五加的比较

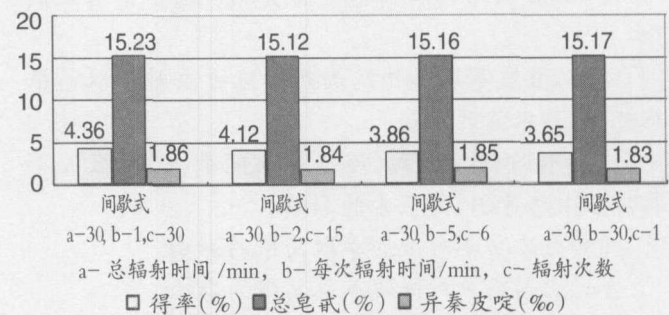


图 2 不同辐射方式对微波萃取刺五加的影响

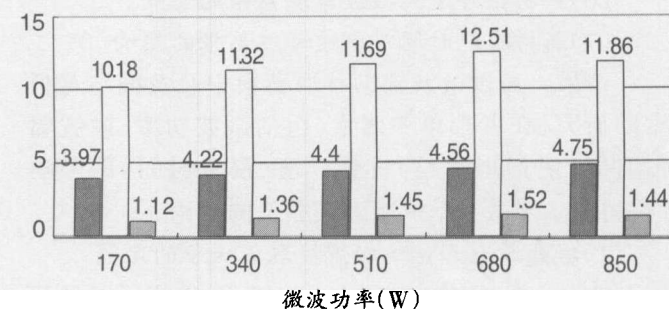


图 3 微波功率对萃取刺五加总皂苷、异秦皮啶的影响

结果:随着溶剂用量的增加,产品得率及有效物质的溶出均呈上升趋势。因此在实际生产过程中应根据需要酌情考虑溶媒的投入量。

(6) 溶剂浓度对微波萃取刺五加的影响。

结果:随着乙醇溶剂浓度的增加,产品的得率呈下降趋势,总皂甙的含量在 85% 时有一较高值,但异秦皮啶的含量则呈增加趋势。

(7) 药材不同粉碎度对微波萃取刺五加的影响。

结果:随着药材粉碎度的增加,刺五加干浸膏得率及有效物质的溶出均呈上升趋势。其中随药材从 0 目~40 目干浸膏得率上升很快,从 40 目~80 目则增加缓慢;从总皂甙含量及异秦皮啶含量看,原料粉碎程度越大,越有利于有效物质的溶出。

(8) 药材浸泡时间对微波萃取刺五加的影响。

结果:随着浸泡时间的延长,物料含水量增加,产品得率及有效物质的溶出都呈增加趋势,不过有效物质的溶出增加得较为缓和。随着浸泡时间的延长,产品的得率有缓慢增加趋势,而总皂甙含量和异秦皮啶含量均呈增加趋势。

2. 微波辅助萃取葛根中总黄酮、葛根素有效成分

(1) 微波萃取和传统加热回流方法对萃取葛根总黄酮、葛根素的比较。

(2) 不同辐射方式(连续式与间歇式)对微波萃取葛根中总黄酮、葛根素的影响。

(3) 微波功率对微波萃取葛根的影响。

(4) 溶剂用量对微波萃取葛根的影响。

(5) 微波辐射时间对微波萃取葛根的影响。

(6) 药材粉碎度对微波萃取葛根的影响。

(7) 药材浸泡时间对微波萃取葛根的影响。

结果:通过微波辅助萃取葛根中总黄酮与葛根素的研究,在考察单一因素(包括微波功率、微波辐射时间、溶剂用量、药材粉碎度、浸泡时间)的影响时,得出了与微波萃取刺五加相似的结论。

3. 微波萃取和传统回流提取五味子的比较

此外,我们在对何首乌、人参、黄芪等药材的研究中,也取得了与上述微波辅助萃取“刺五加、葛根、五味子”相似的结论。

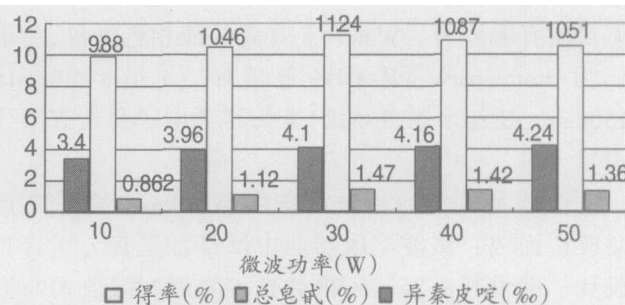


图 4 微波辐射时间对萃取刺五加总皂苷、异秦皮啶的影响

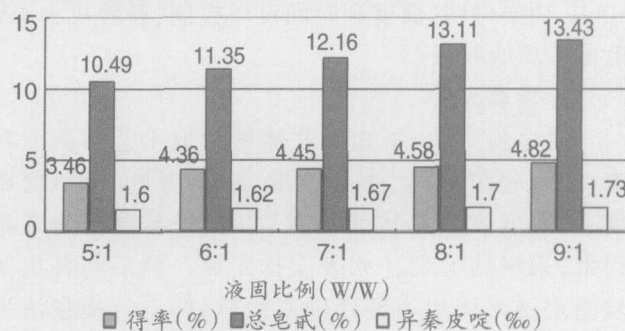


图 5 溶剂用量对萃取刺五加总皂苷、异秦皮啶的影响

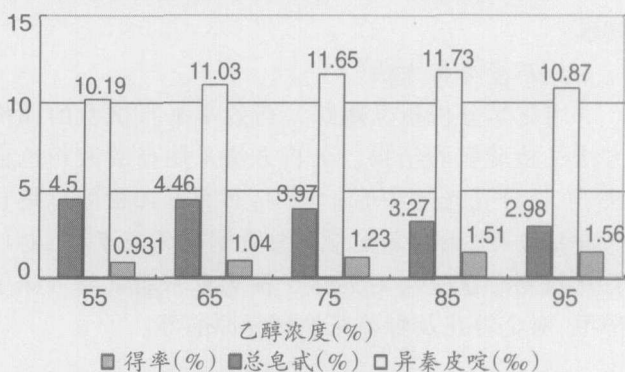


图 6 溶剂浓度对萃取刺五加总皂苷、异秦皮啶的影响

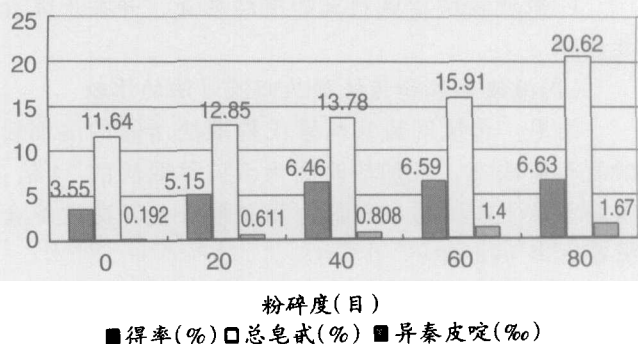


图 7 药材粉碎度对萃取刺五加总皂苷、异秦皮啶的影响

小结：微波萃取法作为一种新的提取工艺，它适用于不同药用部位的植物药，例如：根茎类（刺五加、葛根、何首乌、人参、黄芪等）、果实类（五味子等）、花类/全草类（金银花、野菊花等）等有效成分的提取，提取方式为操作简便的连续式，工艺参数的选择与微波功率、微波辐射时间、溶剂浓度、溶剂用量、原料粉碎度、原料含水量等因素有关。与传统回流法比较，其萃取时间短、溶剂用量少、有效物质更易溶出。

4. 中试放大实验结果

为了将微波辅助萃取技术推广到中药制药的生产实践中，在上述工作基础上，进行了该技术中试放大研究。

(1) 微波辅助萃取刺五加中试放大研究。

在中试设备上，采用图中项目1及项目2的条件进行微波萃取刺五加时，从总皂苷及异秦皮啶的含量测定结果看，采用微波辅助萃取刺五加是可行的。

(2) 微波辅助萃取葛根中试放大研究。

在中试设备上，将浸泡了3h的葛根粗粉以6KW的微波功率分别提取15min及30min时，通过对总黄酮及葛根素含量的测定，表明采用微波辅助萃取葛根是可行的。

(3) 微波辅助萃取何首乌中试放大研究。

在中试设备上，将浸泡了5h的何首乌分别按4Kg、8Kg投料，以6KW微波功率提取40min，通过对总蒽醌含量的测定，表明采用微波辅助萃取何首乌是可行的。

小结：

通过微波辅助萃取设备的中试实验，验证了微波小试基础实验优化出来的工艺条件是正确合理的，且可初步适用于中试设备中。

5. 药效学平行实验结果

(1) 刺五加不同工艺提取物对小鼠镇静催眠作用的活性比较。

小结：刺五加微波醇提取物灌胃给药，可协同戊巴比妥钠阈下催眠剂量对小鼠的作用，缩短动物入睡潜伏期、提高翻正反射消失率、延长睡眠持

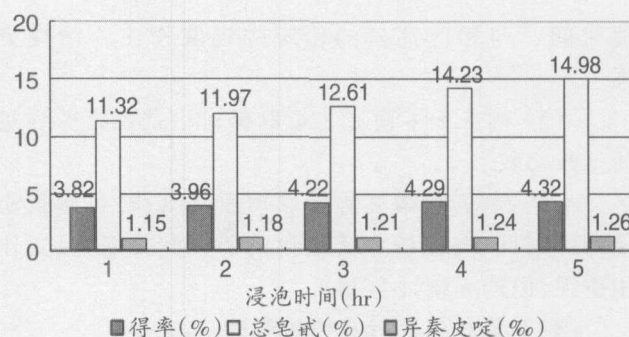


图8 药材浸泡时间对萃取刺五加总皂苷、异秦皮啶的影响

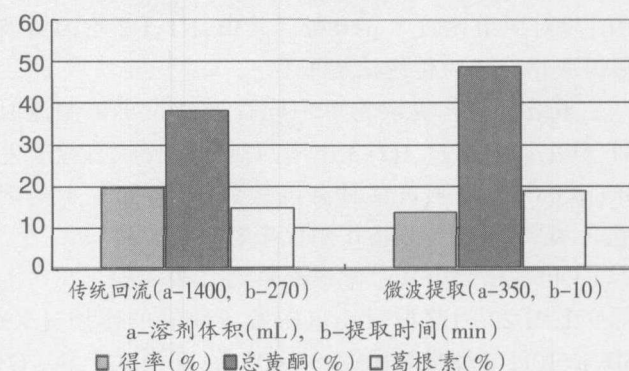


图9 微波萃取与传统回流提取葛根的比较

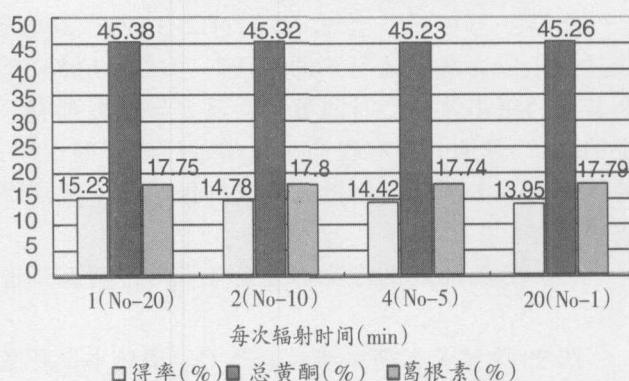


图10 不同辐射方式对微波萃取葛根的影响

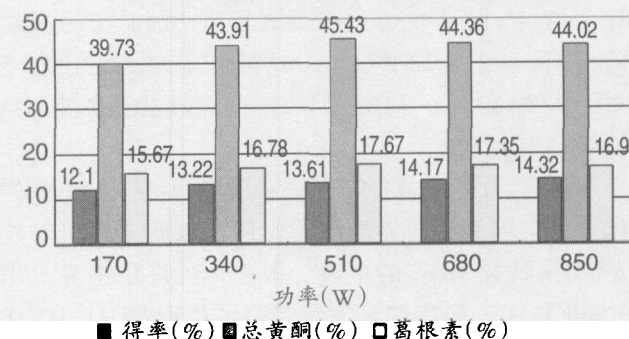


图11 微波功率对萃取葛根总黄酮、葛根素的影响

续时间,与相应剂量的传统醇提取物比,活性更强。

(2) 刺五加不同工艺提取物对小鼠抗疲劳作用的活性比较。

小结:刺五加微波醇提取物灌胃给药,可延长小鼠游泳时间,与相应生药剂量的传统醇提取物比,作用更强,但均无统计学意义。

(3) 黄芪对小鼠耐疲劳的影响。

图 22 为黄芪对小鼠耐疲劳的影响 ($\bar{X} \pm SD, n=10$);与对照组比较 * $p < 0.05$ 。其中,H1、H2 均为微波法提取物;H3 为传统法提取物。

小结:黄芪提取物可不同程度延长小鼠游泳时间,其中以 H2-1、H2-3 作用与对照组比较有显著差异($p < 0.05$),提示黄芪具有抗疲劳作用;同等生药剂量下,黄芪微波提取物作用优于常规提取物。

(4) 葛根对小鼠耐常压缺氧的作用。

上图 23 为葛根对小鼠耐常压缺氧的作用 ($\bar{X} \pm SD, n=10$);与对照组比较 * $p < 0.05$ 。其中,G1、G2、G3 分别为微波法提取物;G4 为传统法提取物。

小结:与对照组比较 G1-1、G2-1、G2-2 可明显延长小鼠在缺氧情况下的存活时间($p < 0.05$),其余各给药组小鼠存活时间虽无明显差异,但都有一定的延长,说明葛根有提高小鼠耐常压缺氧的作用;同等生药剂量下,葛根微波提取物作用优于常规提取物。

(5) 黄芪抗氧化药效学研究(采用含药血清进行)。

图 24 为黄芪含药血清对 Fe^{2+} -Cys 诱导小鼠肝微粒体脂质过氧化反应丙二醛(MDA)含量的影响($\bar{X} \pm SD, n=4$);control 组为无药血清对照,blank 组为微粒体反应体系中未加 Fe^{2+} -Cys 诱导;与对照组比较 * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ 。其中,H1、H2 为微波法提取物;H3 为传统法提取物。

小结:H1、H2 对 Fe^{2+} -Cys 诱导小鼠肝微粒体 MDA 的生成有较明显的抑制作用,表明二者可对抗 Fe^{2+} -Cys 诱导 MDA 的生成,即在体外环境中显示出抗氧化作用,同等剂量下黄芪微波提取物 H1、H2 优于常规提取物 H3。

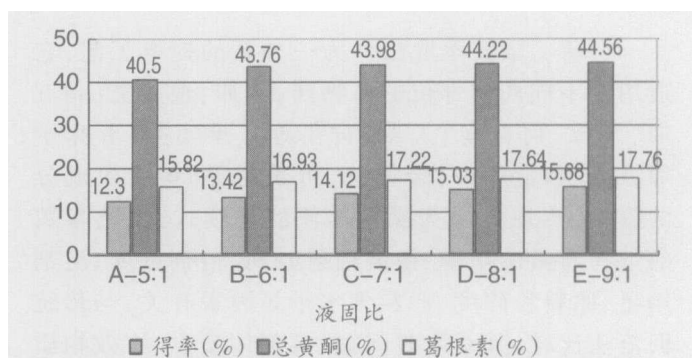


图 12 溶剂用量对萃取葛根总黄酮、葛根素的影响

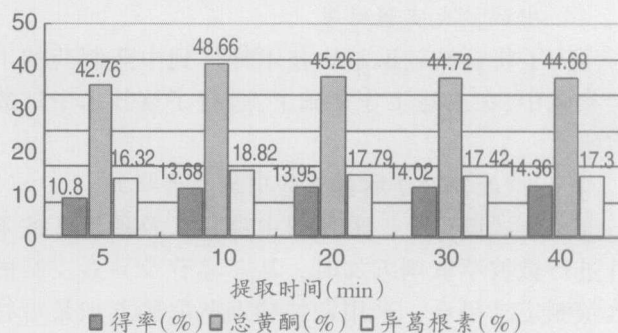


图 13 微波辐射时间对萃取葛根总黄酮、葛根素的影响

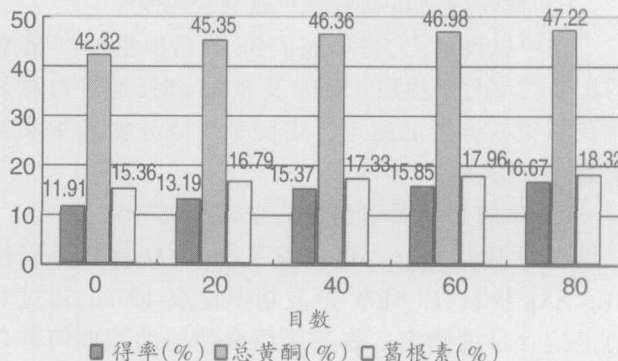


图 14 药材粉碎度对萃取葛根总黄酮、葛根素的影响

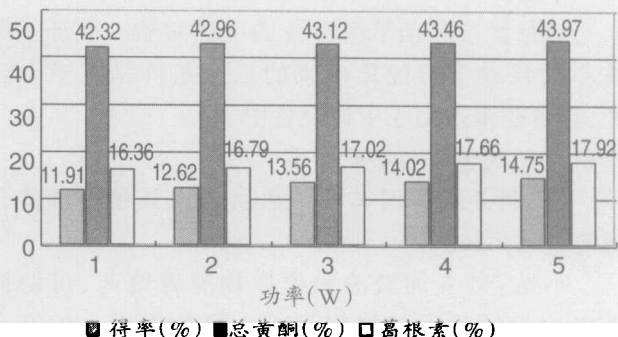


图 15 药材浸泡时间对萃取葛根总黄酮、葛根素的影响

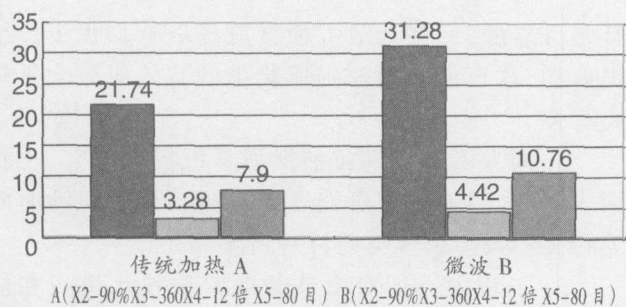


图 16 微波萃取与传统提取五味子中五味子醇甲、总木脂素的比较

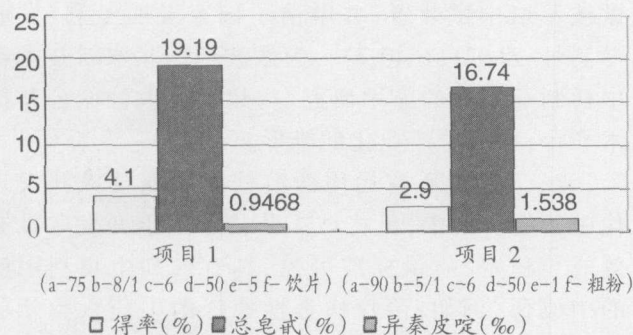


图 17 中试设备中刺五加提取的实验条件及结果

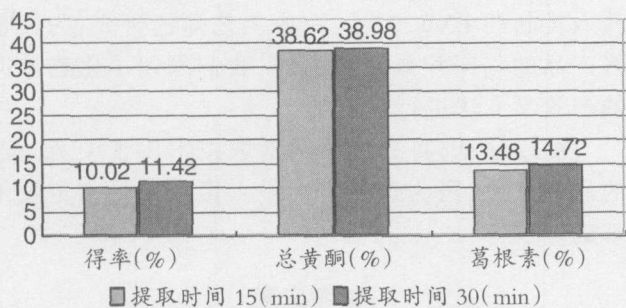


图 18 中试设备微波萃取葛根的结果

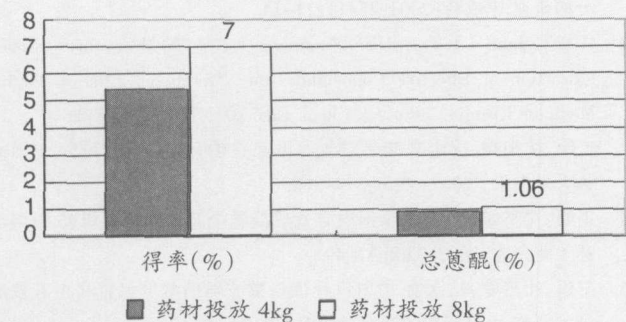


图 19 中试设备微波萃取何首乌的结果

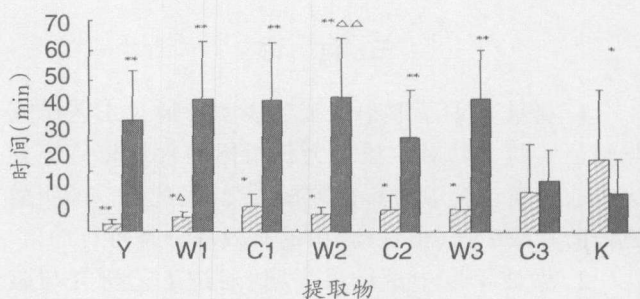


图 20 刺五加不同制备工艺提取物对小鼠镇静催眠作用的活性影响 (n=11, $\bar{X} \pm SD$)

Y-安定注射液, W1, W2, W3-微波提取物, C1, C2, C3-传统提取物, K-空白对照

*P<0.05, **P<0.01, 与空白对照组比; Δ P<0.05, $\Delta\Delta$ P<0.01, 与受试药相应生药剂量组比。

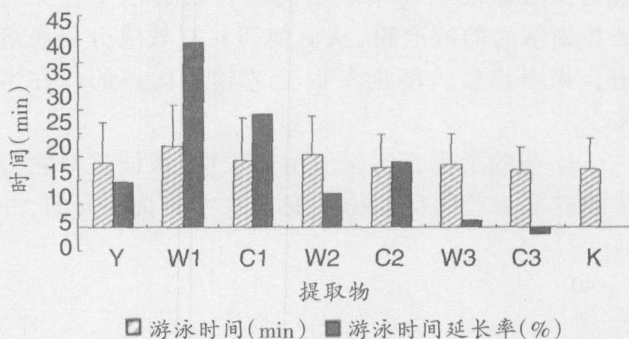
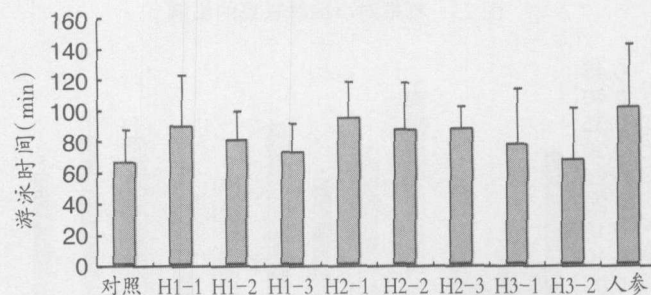


图 21 刺五加不同制备工艺提取物对小鼠镇静催眠作用的活性影响

Y-人参皂苷, W1, W2, W3-微波提取物, C1, C2, C3-传统提取物, K-空白对照

图 22 黄芪对小鼠耐疲劳的影响 ($\bar{X} \pm SD$, n=10) 与对照组比较

三、讨 论

1. 微波辅助萃取小试工艺表明:通过工艺研究与验证实验,其对应质量分析指标的含量较传统方法或均匀设计表中的其它数据更合理、优越。说明微波辅助萃取中药(植物药)中的有效成分是可行的。

2. 微波萃取中试结果表明:通过工艺研究与验证实验,其对应质量分析指标的含量均较均匀设计表中的其它数据优越。与传统回流法比较,微波萃取技术萃取时间短、溶剂用量少、有效物质更易溶出,可显著地缩短提取时间,提高提取效率。同时因为提取过程中直接利用电能,使环境更清洁、操作更简便,更易于实现自动化生产控制。

3. 在工艺研究过程中,通过观察药材细胞微观结构发现微波辅助萃取工艺较传统提取工艺更易破坏细胞内的液泡膜,从而使药材有效成分更易溶出,揭示出微波辅助萃取工艺较为优越的内在本质。

4. 药效学平行实验的结果表明:微波提取物与传统提取工艺的提取物在安全性方面是相同的,并

且是可靠的;而在药效方面微波提取物均优于传统提取物,这可能与微波提取物中的有效成分含量较高有关。

5. 对花类药用部位的微波萃取提取工艺,正在深入研究,因为前期研究表明,其粉碎度、浸泡时间等相关参数与根茎类药材有所不同。

6. 工程中心还对微波辅助萃取技术进行相应的制药工程技术的配套研究。在研究和比较了国内外大量的有关技术和产品的基础上,根据产业化生产的实际需要,创造性地建立了一套可供生产用的微波萃取中试装置,并申请了国家发明专利(发明专利号:ZL02111640.7),为微波辅助萃取新技术在中药制药领域的应用研究,构建了开放性的公共技术平台,形成了产业化的雏形。

7. 工程中心在运用微波辅助萃取技术开发现代中药的实践中,已将该工艺技术用于开发一批有效成分稳定、质量标准可控、具有较高生物利用度的中成药,例如:治疗病毒性疱疹的中药六类新药 BT 一号完成临床前研究,已向 SFDA 申报临床批文(国内第一个),通过专家评审会。治疗冠心病的中药六类新药 BXW 二号,完成工艺筛选研究;为使最终产品的临床疗效达到最佳,我们采用了生物导向的药效学方法进行筛选。

可以预见,将微波辅助萃取技术用于中药新药的研究开发,可为这些产品进入国际市场奠定技术基础。

参考文献

- 1 王娟,沈平嫔,沈永嘉.均匀设计优选微波辅助萃取刺五加中有效成分的研究.中成药,2003,25(1):11~14.
- 2 WANG Juan (王娟),SHEN Pingnang (沈平嫔).Microwave-assisted Extraction of Effective Compounds from Traditional Chinese Herbal Medicine Ciwujia.Chinese J. Chem. Eng.,2003,11(2):231~233.
- 3 王娟,沈平嫔,沈永嘉.微波辅助萃取葛根中有效成份的研究.中国药科大学学报,2002,33(5):379~382.
- 4 王娟,沈平嫔,沈永嘉.葛根中有效成分的微波辅助萃取研究.中国医药工业杂志,2002,33(8):47~49.
- 5 王娟,沈平嫔,沈永嘉.均匀设计优选微波辅助萃取何首乌中有效成分的研究.中草药,2003,34(4):314~317.

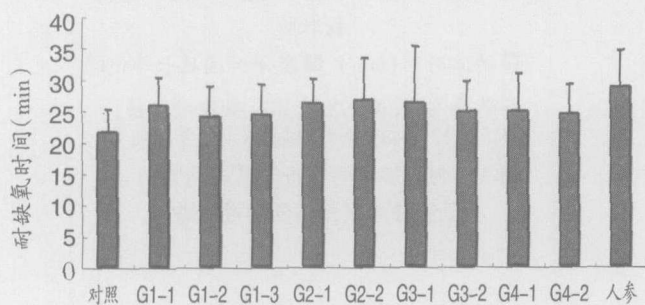


图 23 葛根对小鼠耐缺氧的影响

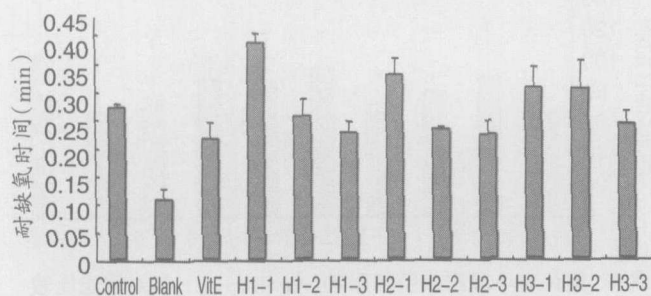


图 24 黄芪对抗氧化作用的影响

Application of Microwave-aided Extraction Technology to R&D of Modern Traditional Chinese Medicine

Shen Pingniang and Wang Juan

(National Research Centre for Pharmaceutical Engineering and Technology of
Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203)

In this article the research results of the two key projects "Application of Microwave-induced Extraction Technology to key Pharmaceutical technology of Traditional Chinese Medicine (TCM)" and "Study of Standardization and Industrialization of Microwave-aided Extraction Technology" both financed by the Ministry of Science and Technology and carried out by the National Research Centre for Pharmaceutical Engineering and Technology is summarized, in which the study on the application of microwave-aided extraction polytechnology in the area of TCM pharmaceutical engineering and technology is emphasized and a systematic study on the polytechnology is conducted by the assessment method of tracing the indexes of chemical analysis and the parallel experiments of pharmacodynamics of different parts of TCM medicinal materials.

The results of the studies carried out by small devices of microwave extraction and pilot test indicate that effective components of medicinal materials can be better enriched through microwave radiation, and by the application of microwave-aided extraction technology the duration of extraction is shorter, less solvent is available for extraction, effective matters can be easily dissolved out and the extraction efficiency can be remarkably improved in comparison with the traditional reflux extraction technology. Meanwhile, the environment of extraction is cleaner and the operation easier so that it is easier to bring about automatic control of production, and the application and spread of this technology are expected to provide a new approach and a new technique for the R&D of new drugs of modern TCM.

In addition, this article refers to a new progress in the development of two Chinese medicaments and 6 new drugs of TCM via microwave-aided extraction technology.

Key words: microwave-aided extraction technology, Chinese medicine, microwave radiation, effective component.

(责任编辑:刘维杰 周立东,英文译审:秦光道)

(上接第 43 页)

and system biology due to the similarity of the process of the research and development of drugs in system biology to that of TCM diagnosis. Therefore it is of great significance that the authors of this article have engaged in the study of the significance of TCM properties in systematics by making use of TCM thinking and the technical means of system biology, and have established a method for the assessment of TCM curative effects on the basis of TCM properties so that the R & D of TCM new drugs and traditional Chinese medical science and the science of Chinese pharmacology could play their leading roles in the change of modes in medical sciences. This also refers to the strategy of TCM development.

Key Words: system biology, theory of drug property, R & D of new drugs

(责任编辑:付建华 索凤梅,英文译审:秦光道)

[World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica] 23