

提取新技术用于黄酮类化合物的研究进展[△]

王 玮*,李苑新[#](广东药学院中药开发研究所,广州 510006)

中图分类号 R281;R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)31-2958-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.31.29

摘要 目的:总结提取新技术用于黄酮类化合物的研究进展,为黄酮类化合物的提取方法遴选提供参考。方法:查阅国内外文献,对不同的提取方法进行归纳。除传统提取方法外,提取新技术包含超临界流体萃取、微波辅助提取、超声提取、酶法提取、超高压提取、半仿生提取、连续逆流提取、双水相萃取技术等。结果:尽管新型提取技术存在一定的局限性,但是具有萃取率高、萃取时间短、更能保留有效成分等优势。结论:提取新技术为黄酮类化合物研究提供了广阔的应用前景。

关键词 黄酮类化合物;提取;新技术

黄酮类化合物是一类广泛存在于植物中的多酚类天然产物,包括黄酮、黄酮醇、异黄酮、花色苷、查尔酮及二氢生物碱等多种类型,在植物体大部分以苷类的形式存在。黄酮类化合物作为一类次生代谢产物在医药领域表现出突出价值,如具有抗肿瘤、抗氧化、抗病毒等作用^[1];在食品行业中,可作为天然甜味剂、天然抗氧化剂、天然色素,还能应用于功能食品,如生物类黄酮口香糖、银杏叶袋泡茶等^[2];在化妆品行业中,因其具有美白、防晒、保湿、抗衰老等多种功效^[3],而且是刺激性较小的天然植物原料而受到人们的青睐。对其进行的研究中,提取占有举足轻重的地位,从提取中获得纯度高、活性强的有效成分是研究人员一直努力的方向。传统提取方法表现出了一些局限性,不能达到满意的提取分离效果,在一定程度上限制了黄酮类化合物的开发和利用。随着现代科学技术的

发展,提取新技术愈发成熟,具有提取率高、成本低、所用时间少、提取物生物活性高等优点,促进了中药提取的发展。现对提取新技术进行综述,希望为今后黄酮类化合物的研究工作提供一些有价值的参考。

1 传统提取方法

黄酮类化合物的传统提取方法包括:有机溶剂法、水提法、醇提法、碱提酸沉法等。这些提取方法提取效率低,杂质含量高,处理复杂,持续时间长。其中,有机溶剂法需要消耗大量的溶剂,渗透能力弱,具有一定毒性,且会带入大量的脂溶性杂质;水提法提取的有效成分含有大量蛋白质和糖类杂质,不易去除,容易霉变^[4],而且仅限于提取黄酮苷类;碱提酸沉法中的酸碱度对提取率影响很大,容易因酸碱度的不恰当而使提取率大大降低。

室均采用每次 40 ml,每天 1 次给药,而该药说明书规定一般感染选用 20~30 ml,每天 1 次,重症感染才考虑使用 40 ml,每天 1 次。因此,建议相关部门加强对痰热清注射剂的监管,针对全院痰热清注射剂使用情况展开处方点评,对此类药物在临床的使用进行合理性评价,必要时可对其采取行政干预。

我院中药注射剂应用基本合理,临床处方基本能结合患者的病情,同时考虑药物疗效和安全性以及药品价格等因素,倾向于选择疗效可靠、安全性好且价格适中的中药注射剂,但也可能存在无明显适应证用药及过度用药现象。因此,应加强中药注射剂合理使用的监管,临床在使用中药注射剂时严格遵循《中药注射剂临床使用指导原则》和药品说明书,以及“辨证论治、辨病辨证相结合、辨病论治”原则,根据患者个体差异,实施个体化给药,选择正确的药物、合适的给药途径及给药剂量、适当的给药速度及给药疗程,保证中药注射剂临床应用的安全、有效。

[△] 基金项目:广东省教育部产学研结合项目(No.2010B090400208)

* 硕士研究生。研究方向:药物新剂型及新技术。电话:020-39352540。E-mail:279428192@qq.com

[#] 通信作者:副研究员。研究方向:药物新剂型及新技术。E-mail:liyx98@163.com

参考文献

- [1] 唐瑾.5 800 张中药处方质量调查与分析[J].中国医院用药评价与分析,2013,13(1):73.
- [2] 刘俊.我院 746 例药品不良反应统计与分析[J].中国药事,2013,27(3):338.
- [3] 刘林红.中药注射剂致不良反应情况分析[J].中国医院用药评价与分析,2011,11(9):845.
- [4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典·临床用药须知:中药卷[S].北京:人民卫生出版社,2010:61,297.
- [5] 黄玉斌,李赞东.2007—2011 年我院中药注射剂应用分析[J].中国执业药师,2013,10(3):12.
- [6] 符冰,卢荣枝.中药注射剂入选国家基本药物目录存在问题的分析:以参麦注射液为例[J].中国药房,2011,22(36):3 369.
- [7] 苗苗,刘俊.中药注射剂不良反应调查分析[J].安徽医药,2012,16(10):1 550.
- [8] 李富善,黄晓玲.痰热清作用机理和临床应用[J].青海医药杂志,2011,41(5):78.

(收稿日期:2014-02-19 修回日期:2014-04-28)

2 提取新技术

2.1 超临界流体萃取(Supercritical fluid extraction, SFE)

SFE是利用处于临界温度和临界压力以上的超临界流体,其兼有气体和液体的双重特点,对物质具有良好的溶解能力,当恢复到常压、常温时,溶解在流体中成分立即以溶于吸收液的液体状态与气态流体分开,从而达到对溶质的提取和分离。超临界流体有CO₂、C₂H₆、NH₃等,其中CO₂最为常用,但是CO₂流体适合萃取脂溶性成分,对于极性较大物质如黄酮苷类,需要提高压力和加入夹带剂^[5],如甲醇、丙酮、水等。另外,表面活性剂^[6]的加入也能提高提取率。Cheihg CI等^[7]用SFE-CO₂技术萃取柑橘果皮中的橙皮苷和柚皮芸香苷,以水为夹带剂,橙皮苷、柚皮芸香苷的提取率分别是乙醇提取的1.9倍和1.2倍,甲醇提取的3.2倍和1.5倍,热水提取的34.2倍和3.7倍。张诗静等^[8]用SFE-CO₂技术提取赶黄草中黄酮类化合物,并与回流、超声提取法进行比较,确定最佳工艺(100 g原料,以70%乙醇溶液作夹带剂,萃取压力30 MPa、萃取时间120 min、萃取温度40 ℃)下的提取率为9.12%,其中总黄酮、槲皮素的提取量最高,分别为47.26、5.79 mg/g,均高于回流及超声提取法的提取量。

SFE技术具有萃取效率高、无溶剂残留、对提取的天然植物中的活性成分和热不稳定成分可防止氧化和挥发等突出优点。SFE-CO₂技术还具灭菌作用,有利于保证和提高产品质量。

2.2 微波辅助提取(Microwave-assisted extraction, MAE)

MAE是将微波与传统的溶剂萃取法相结合后形成的一种新的萃取方法。该方法利用磁控管所产生的超高频率的快速震动,使内分子间相互碰撞、挤压,利于有效成分的浸出。郭梅等^[9]利用MAE技术提取山楂中黄酮类化合物,通过正交试验优化工艺条件,结果表明,影响提取率的主次因素顺序为微波萃取时间>微波功率>料液比>乙醇体积分数。其确定的最佳提取工艺参数:微波功率400 W,时间120 s,60%乙醇,料液比1:40(g/ml)。在此条件下,黄酮类化合物的得率为3.19%。Liu L等^[10]以聚乙二醇水溶液为基础,用MAE法从柿子叶中提取黄酮类化合物,得到的提取率为3.14%,比传统的有机溶剂法高2%。

MAE法的优点在于微波升温快,具有较强的穿透力,使反应物内、外受热均匀,选择性高,提取效率高,浸出过程细粉不凝聚、不糊化,适合对热不稳定物质的提取。

2.3 超声提取(Ultrasonication-assisted extraction, UAE)

UAE利用超声波的空化作用以及次级效应加速提取成分的扩散、释放并与溶剂充分混合而利于提取。高天曙等^[11]采用水提法、乙醇浸提法、UAE法提取鱼腥草中的总黄酮,结果表明,UAE法提取的总黄酮较佳,最佳提取条件为:料液比1:10(g/ml),50%乙醇,提取时间为40 min,功率为250 W。帕丽达·阿布力孜等^[12]利用响应面法优选牛舌草中总黄酮的超声提取工艺参数,其最佳提取工艺条件为:20倍量70%乙醇,温度为60 ℃,UAE,提取时间20 min。所得总黄酮平均提取率为3.92%,优选的提取工艺稳定可行,可推广于大生产应用。

UAE法能大大缩短提取时间,提高产率,且不需要加热,但该提取法对容器壁的厚薄及容器放置要求较高。另外,超声波发生器工作时产生噪声,对环境有一定影响,目前仍处于实验阶段。

2.4 酶法提取(Enzyme-assisted extraction, EAE)

EAE是选择相应的酶破坏细胞壁,从而达到提取、分离细胞内有效成分的目的。该方法可以去除蛋白质、鞣质等大分子物质,也可促进某些极性低的脂溶性成分转化为糖苷类易

溶于水成分以利于提取^[13]。常用的酶有纤维素酶、果胶酶等。肖贵平^[14]利用果胶酶提取莲心中的黄酮类物质,研究酶解温度、pH值、酶用量及酶解时间对莲心黄酮类物质提取效果的影响,通过正交试验设计优选出最佳工艺条件:酶解温度50 ℃,pH4.5,酶用量0.6 mg/ml,酶解时间2 h。卓莉等^[15]研究纤维素酶法提取血橙皮中黄酮类化合物的主要影响因素,结果表明,在料液比为1:30(g/ml)、温度55 ℃、pH 4.50、加酶量为0.060 g、反应1.5 h条件下,黄酮类化合物的提取率可达0.936%。Xu MS等^[16]利用双功能酶从植物中提取出了生物活性物质,如黄酮类物质。

EAE法专一性强、效率高、成本低、安全性高,但是对温度和pH要求十分严格,所以对设备及操作条件的要求高,同时还考虑如何有效去除酶解产物,以免影响后续工作。

2.5 超高压提取(Ultrahigh pressure extraction, UPE)

在常温条件下,溶剂在超高压作用下渗透到固体原料内部,使有效成分溶解在溶剂中,再迅速降压,细胞膜的结构发生变化,使得细胞内的有效成分能够穿过细胞的各种膜而转移到细胞外的提取液中,达到提取中药有效成分的目的。李力等^[17]利用UPE技术提取葡萄籽中黄酮类化合物,得到最佳工艺条件:75%乙醇,提取压力325 MPa,保压时间6 min,提取温度50 ℃,料液比1:35(g/ml),优选结果经验证,得率为7.29%。姜莉等^[18]对银杏叶总黄酮的提取工艺条件进行优选,结果表明,压力400 MPa、提取时间30 min、30%乙醇条件下,总黄酮提取量最高达到55.917 0 mg/g;压力300 MPa,提取时间30 min、30%乙醇条件下,总黄酮提取量最低达到36.738 0 mg/g,均高于对照品最高29.952 0 mg/g的水平。经正交试验优化,得到工艺条件为压力300 MPa,提取时间40 min,60%乙醇时,总黄酮提取量最高,为56.797 8 mg/g。

UPE技术不仅可以提高黄酮的提取率,还可以保留提取物生物活性。因为高压容器和外界环境有良好的热交换,在整个提取过程中基本可以维持在室温下进行,且耗能低,工艺简单、安全^[19]。但是,超高压会影响生物大分子的立体结构^[20],所以不适合大分子物质的提取。

2.6 半仿生提取(Semi-bionic extraction, SBE)

SBE法是将整体药物研究法与分子药物研究法相结合,模拟口服给药后药物经胃肠道转运的环境,为经消化道给药的中药制剂设计的一种新的提取工艺。姜仁禹等^[21]采用均匀设计优选黄芩的SBE工艺条件,得到最佳工艺条件:3煎用水的pH值依次为5.136 8、6.974 1、8.941 3,总煎提时间为3.931 7 h。该法优选出的工艺参数可供在生产中试行。庞中磊等^[22]对柚皮总黄酮SBE工艺进行了研究,获得最佳工艺条件:pH=2.5的盐酸和pH=7.5、pH=8.0的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液作为提取液,料液比为1:25(g/ml),70 ℃下提取60 min,重复提取3次,在此条件下柚皮总黄酮的提取量为50.65 mg/g。

SBE法的优点在于不用乙醇处理,可以提取出更多的有效成分,并可利用一种或几种指标成分的含量控制制剂的内在质量,相对较利于复方成分的提取。

2.7 连续逆流提取(Continuous counter, current extraction, CCCE)

CCCE的原理是使萃取剂与药材在设备内接触并呈逆向流动,这样药材中有效成分浓度与萃取剂中有效成分的浓度差都是最大,从而达到最大限度转移物料中溶解成分的目的。张毅等^[23]确定了CCCE法提取多穗柯黄酮的最佳工艺:提取级数3级,提取温度100 ℃,料液比1:30(g/ml),提取时间40 min。此条件下的提取率可达88.26%,与传统的多次、反复提

取的最大提取率73.88%相比,高出14.38%。另外,战宇等^[24]对CCCE法提取亮叶杨桐叶中类黄酮的工艺条件进行优化,结果表明,4级逆流提取,提取温度100℃,料液比1:30(g/ml),提取总时间55 min,各级提取时间依次为25、15、10、5 min时,提取率可达95.34%。

CCCE技术对药材的物性和形状、粒度要求较高,不适应小批量和复方品种的生产,而且清洗是一大难点。但是,该方法操作简单,提取效率高,大大节约能源和溶剂,且自动化、智能化程度高,能保证产品质量的均一性。因此,该技术具有良好的发展前景,值得进一步开发。

2.8 双水相萃取(Aqueous two phase extraction, ATPE)

ATPE属于液-液萃取,当物质进入双水相体系后,由于表面性质、电荷作用、各种力作用和溶液环境的影响,其在上、下相中的浓度不同,即各成分在两相间选择性分配,从而达到萃取的目的。朱庆英等^[25]从玉米须中提取黄酮类物质,再用双水相萃取黄酮,得到最佳萃取条件[聚乙二醇2000质量分数为15%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数为12%,样品溶液加入量为3 ml, pH值为9,温度25℃]下的萃取率为91%。此外,有研究者应用ATPE技术分离竹叶黄酮^[26]、木豆根^[27]。

ATPE技术分相时间短,大部分杂质能与固体物质一起去掉,易于工艺放大和连续操作,具有生产能力高,且不会引起有效成分失活或变性的优点。但是,在研究过程中存在易乳化、不易定量控制、水溶性高聚物大多数黏度较大等技术难题。

3 结语

新型提取技术的发展,为黄酮类化合物的提取研究带来了广阔的发展空间,可以根据提取物的性质及其杂质、成本、工艺设备等条件,选择合适的提取工艺。对于极性较小的物质,如黄酮类苷元,可以选取SFE、UAE、UPE等,尤其针对热不稳定性物质,SFE、MAE等能够较好地维持其生物活性;对于黄酮苷类,可以首选EAE;大批量提取,选用CCCE、ATPE较为合适;对于复方物质提取,SBE相对有利。相比传统提取技术,提取新技术不仅能提高提取率、减少时间和能耗,同时还能保证和提高生物药理活性。为了克服单个技术的局限性,还可以对新技术进行联用,如SFE联用UAE、EAE联用MAE、SFE联用CCCE等,结合多种技术的优势,从而更好地优化提取工艺。

参考文献

[1] 易文实. 黄酮类化合物的生物活性研究进展[J]. 广州化工, 2012, 40(2): 47.
[2] 彭程程, 王青山, 赵国祥, 等. 黄酮类化合物的研究进展[J]. 农产品加工: 学刊, 2010(5): 38.
[3] 周忠. 异黄酮在化妆品中的应用[J]. 哈尔滨职业技术学院学报, 2007(6): 123.
[4] 赖毅勤, 周宏兵. 近年来黄酮类化合物提取和分离方法研究进展[J]. 食品与药品, 2009, 9(4): 54.
[5] Xi Y, Xia X, Jin R, et al. Effect of entrainer on supercritical CO_2 for extraction of tradition and herbal drugs[J]. *China J Chin Mate Med*, 2009, 34(11): 1 460.
[6] 金承怀, 罗杰英, 袁洪, 等. 超临界二氧化碳萃取丹酚酸B的提取工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(7): 1 170.
[7] Cheihg CI, Chung EY, Chung MS. Enhanced extraction

of flavanones hesperidin and narirutin from *Citrus ushiu* peel using subcritical water [J]. *J Food Eng*, 2011, 108(16): 314.

[8] 张诗静, 史书龙, 孙琴, 等. 超临界 CO_2 萃取赶黄草中黄酮类化合物的工艺研究[J]. 中成药, 2013, 35(9): 2 043.
[9] 郭梅, 任效东, 王娜, 等. 微波辅助提取山楂黄酮类化合物的工艺[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(3): 51.
[10] Liu L, Liu RL, Zhang J, et al. Study on the PEG-based microwave-assisted extraction of flavonoid compounds from persimmon leaves[J]. *J Sep Sci*, 2012, 35(23): 3 412.
[11] 高天曙, 焦凡, 姚静静, 等. 鱼腥草黄酮类成分最佳提取工艺实验研究[J]. 中医学报, 2012, 27(9): 1 163.
[12] 帕丽达·阿布力孜, 从媛媛, 米仁沙·牙库甫, 等. 响应面法优化牛舌草总黄酮的超声提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(3): 48.
[13] 刘景祺, 景涛. 中药提取分离技术的应用进展[J]. 天津药学, 2003, 15(4): 64.
[14] 肖贵平. 果胶酶对莲心中黄酮类物质提取效果研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(3): 267.
[15] 卓莉, 阮尚全, 黄云清. 纤维素酶法提取血橙皮中黄酮类化合物[J]. 贵州农业科学, 2013, 41(6): 158.
[16] Xu MS, Chen S, Wang WQ, et al. Employing bifunctional enzymes for enhanced extraction of bioactives from plants: flavonoids as an example[J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(33): 7 941.
[17] 李力, 谭伟. 超高压提取葡萄籽总黄酮的研究[J]. 食品科技, 2012, 37(11): 219.
[18] 姜莉, 徐怀德, 李海鹏, 等. 超高压提取银杏叶总黄酮技术研究[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(19): 36.
[19] 宁娜, 饶茂阳, 郁建生. 超高压提取技术在中药提取中的研究进展[J]. 铜仁职业技术学院学报, 2012, 10(2): 47.
[20] Oh HE, Pinder DN, Hemar Y, et al. Effect of high-pressure treatment on various starch-in-water suspensions[J]. *Food Hydrocoll*, 2007, 22(1): 150.
[21] 姜仁禹, 孙秀梅, 张兆旺, 等. 黄芩半仿生提取法工艺条件的优选[J]. 世界中西医结合杂志, 2011, 6(3): 230.
[22] 庞中磊, 唐文. 柚皮总黄酮半仿生提取工艺研究[J]. 上海应用技术学院学报: 自然科学版, 2012, 12(1): 46.
[23] 张毅, 宁正祥, 董华强, 等. 多穗柯总黄酮的连续逆流提取研究[J]. 现代食品科技, 2011, 27(5): 550.
[24] 战宇, 梁敏华. 亮叶杨桐叶中类黄酮的连续逆流提取及抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2010, 31(14): 97.
[25] 朱庆英, 黄勇潮. 双水相萃取玉米须黄酮的研究[J]. 中药材, 2012, 35(2): 310.
[26] 郭辉, 张中玉, 罗宇倩, 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.
[27] Zhang DY, Zu YG, Fu YJ, et al. Aqueous two-phase extraction and enrichment of two main flavonoids from pigeon pea roots and the antioxidant activity[J]. *Sep Purif Technol*, 2013, 102(4): 26.

(收稿日期:2013-10-21 修回日期:2014-01-02)