

香豆素类化合物提取分离工艺进展综述

林 婷¹, 许巧霞¹, 张永敏¹, 艾洁欣², 李 煌^{1*}

1、福建中医药大学, 福建福州 350122

2、福建农林大学金山学院, 福建福州 350002

【摘要】香豆素类化合物广泛分布于自然界中, 且现今研究发现香豆素类化合物具有多种生物活性。单体研究是现今中药有效成分研究的热点。如何高效取得高纯度的目标成分, 减少材料资源的浪费, 与提取分离的条件设计息息相关。故本文以香豆素类化合物为研究对象, 从渗漉法、回流提取法、超声波提取法、半仿生提取法、酶辅助提取法、超临界流体萃取等方面分别阐述香豆素的提取工艺近五年研究进展。还囊括有现今少用的溶剂浮选法与碱提酸沉法以完善提取方法的综述。再根据气相色谱法、大孔树脂色谱法、高速逆流色谱法、制备薄层色谱法等方式对香豆素类化合物的分离方法进行总结, 旨在为香豆素类化合物实验室与工业生产提取分离设计等提供参考与借鉴。

【关键词】香豆素类化合物; 提取; 分离

【中图分类号】R284 **【文献标识码】**A **【DOI】**10.12325/j.issn.1672-5336.2022.24.004

前言

香豆素类化合物是一类以苯骈 α -吡喃酮为母核的具有内酯结构的化合物。常见于蛇床子、秦皮等中药材; 动物和微生物中也有少量分布, 如黄曲霉素类等。香豆素类化合物具有多种生物活性, 如瑞香素具有抗氧化活性^[1]; 羌胡抗炎的物质基础为香豆素类化合物^[2]; 香豆素类化合物存在有一定的降血糖作用^[3]; 胡桐素A可抑制HIV-1逆转录酶活性等。现有关香豆素的研究越来越多, 故对香豆素类化合物提取分离工艺进行综述, 旨在为相关工艺的改进与实验室目标物质提取分离提供参考和借鉴。

1 提取工艺

1.1 溶剂提取法

溶剂提取法是实际工作中最常用的提取手段, 依据成分的溶解性差异进行提取。游离香豆素与香豆素苷极性和溶解性差异较大, 常用此法进行提取。方法包括渗漉、回流提取、超声波提取、半仿生提取法等, 乙醇为常用提取溶剂。

1.1.1 渗漉法

水蒸气蒸馏法温度高, 受热时间长, 易发生物质结构变化, 现已少用于香豆素类成分提取。黄家佳等^[4]通过采用乙醇渗漉法, 规避高温对有效成分的破坏。其实

验结果表明, 提取白芷中香豆素类成分的最佳条件为: 20目过筛、并且采用8倍60%的乙醇、4mL/(min·kg)渗漉速度、浸泡12h。朱金芳等^[5]通过正交试验分析认为各因素对提取率影响大小为: 提取时间<溶剂用量<提取次数。朱金芳等人通过实验和分析认为菊苣中香豆素最佳提取条件为: 提取次数为3、提取时间2.5h、10倍量70%乙醇浸泡6h。该提取条件可提取香豆素0.575g/100g, 效率高, 且适用于工业化生产。

1.1.2 回流提取法

分子量小的游离香豆素具有挥发性, 可采用回流提取法提取。谭荣等^[6]对长毛风毛菊中总香豆素采取乙醇回流进行提取。谭荣等通过实验与数据分析认为最佳提取工艺为: 40%乙醇、料液比1:50(g/mL)、提取次数为5、每次时间为1h。该法操作简单, 提取率高, 易自动化生产。且可通过改变所选溶剂, 降低反应温度, 保护受热易破坏成分, 扩大使用范围。史娟等^[7]采取超声预处理-乙醇回流法提取白花前胡总香豆素。对方差进行分析可知, 提取率影响大小为: 提取温度>乙醇体积分数>料液比>提取时间。根据实验结果与数据分析优化认为该实验提取最佳条件为: 料液比1:40g/mL、59%乙醇、回流温度81℃、回流2h。此条件下白花前胡香豆素提取率最高可达4.249%±0.03%。

1.1.3 超声波提取法

作者简介:林婷(2002.08—), 女, 汉族, 福建省福州市, 本科, 研究方向: 中药学。

***通讯作者:**李煌(1995—), 男, 汉族, 福建省莆田市, 博士研究生, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 中药药效物质基础研究。

利用超声波增加递质的穿透力, 促进有效成分加速溶于溶剂。超声波提取法可在室温下进行, 不破坏受热易分解的有效成分。在现今的科研中常使用该法提取目标物质或作为预处理方便后续提取。童天娇等^[8]采用此法进行秦皮中香豆素的提取。其最佳提取条件为: 表面活性剂用量 3%、50% 乙醇、温度为 60℃、提取 40min、1:10 (g/mL) 料液比。白艳艳等^[9]实验中采用十二烷基硫酸钠作为表面活性剂, 成本低廉, 同时具有强化秦皮香豆素提取的功能。这可能与表面活性剂对分子在胶束溶液中的增溶与释放过程的控制相关。陈建欣等^[10]采用超声-微波协同提取马齿苋中的香豆素, 各条件影响大小为: 乙醇浓度<浸取时间<提取温度<提取功率。在料液比为 60% 乙醇、1:25 (g/mL)、提取功率 500W、温度为 80℃、浸提 17min 的最优条件下, 提取 25g 马齿苋粉末验证, 提取液中香豆素含量可达 8.862mg/g。阿里穆斯等^[11]实验结果表明采用该法提取干-扫日劳中香豆素成分的最佳条件为: 物料大小 80~100 目、提取 20min、超声波功率 175W、温度 25℃、固液比 1:20、70% 甲醇。

1.1.4 半仿生提取法

半仿生提取法是通过模拟口服药物在胃肠道转运吸收的环境, 并且在活性指导下的导向分离方法。王芳等^[12]在单纯的超声波提取法基础上, 加入半仿生提取法原理进行改良。两种提取方法对总香豆素提取率有明显不同。通过实验与数据分析可知 60% 乙醇、1:30 (g/mL) 料液比、提取 45min 为最佳提取条件。郑立卿等^[13]通过使用酸性 (pH=3.2)、中性 (pH=6.8) 和碱性 (pH=8.7) 溶剂分别连续提取 132min、66min、66min。该法提取可保留更多有效成分, 但提取蛇床子素效果不及醇溶液提取。

1.1.5 酶辅助提取法

利用酶选择性充分暴露细胞壁组成成分, 使有效成分更易溶解于溶剂中。刘霞等^[14]采用该法提取四方藤中的总香豆素。实验结果表明最佳提取条件为: 纤维素酶用量 0.5%、pH=5.1、酶解 1.5h、微波萃取 9min。酶辅助提取法使用的酶种类包括有漆酶、果胶酶、木瓜蛋白酶等^[15-17], 以纤维素酶应用最广。

1.1.6 溶剂浮选法

刘西茜^[18]通过实验与数据分析对溶剂浮选法提取茵陈中总香豆素条件进行优化, 认为最佳条件为: 样品生药质量浓度 0.02g/mL、正辛醇作浮选溶剂、pH=9、氮气流速 40mL/min、浮选 40min。该法提取效果为溶剂萃取法的 6.7 倍。

1.2 碱溶酸沉法

香豆素类化合物的内酯结构, 可在碱性条件下断裂酯键增加溶解度, 再酸化溶液环合成内酯环, 溶解度下降析出。使用该法时, 须严格控制反应条件, 避免异构化而无法得到目标产物。且不能使用该法提取部分对酸碱敏感的香豆素类化合物。张新勇^[19]等实验认为 1%NaOH、煎煮 30min 为提取蛇床子总香豆素的适宜提取条件。但该法局限性较多, 条件要求较为严苛, 虽原理简单, 现已少用。

1.3 超临界流体萃取

超临界流体萃取法具有高效性、低成本、选择性易于调节、绿色环保等特点。该法可在室温下进行不破坏部分香豆素。吕新林等^[20]在 60℃、30MPa、95% 夹带剂、15% 乙醇、20g/min CO₂ 体积流量下萃取 1.5h, 提取前胡总香豆素。陈娜等^[21]实验结果认为可显著影响萃取效率的因素其大小关系为: 萃取压力>萃取温度>萃取时间。在 25MPa、40~60 目、35℃、萃取 1.0h 的最佳条件下, 草木犀中香豆素的萃取率可达 0.76%。

2 分离

在同科属植物中, 香豆素类化合物常为结构相似的一族或多族共同存在, 使用常规的溶剂法难以分离得到精制的香豆素类化合物, 故一般采用色谱法进行分离纯化。

2.1 高速逆流色谱法

高速逆流色谱法不需要支持剂, 克服样品不可逆吸附、色谱峰畸形等缺点, 具有分离纯度高、重现性好等优点。蔡海林等^[22]采用硅胶柱色谱法对超临界 CO₂ 流体萃取得到的前胡总香豆素进行了粗分离, 后采用高速逆流色谱法, 根据色谱图手动收集, 分离得到了 4 个单体化合物。进行精分时采用石油醚: 乙酸乙酯: 甲醇: 水 (5:5:5:4) 作为溶剂系统, 设置主机转速 850r/min、流动相 2.0mL/min、检测波长为 254nm。

2.2 大孔树脂色谱法

该法具有两种分离原理, 分别为吸附和分子筛, 一般情况下吸附为一级分离原理。根据极性划分为三类, 具有选择性好、机械强度高、再生处理方便等优点, 但价格较为昂贵。朱金芳等^[23]选用 D101 大孔树脂, 设置上样浓度为 0.35mg/mL, 上样速度 0.067BV/min。洗脱顺序为: 蒸馏水 11BV、0.067BV/min 洗脱; 30% 乙醇 9BV、0.033BV/min 洗脱, 弃洗脱液; 80% 乙醇 9BV、0.033BV/min 洗脱, 最后对得到的组分进行收集。

2.3 气相色谱法

郑抒等^[24]采用气相色谱提取化妆品中的香豆素类化合物。使用弱极性的 Thermo TG-5SILMS 毛细管柱、氦气 1.0mL/min、分流比 1:10、分流流量 10mL/min、1 μL 进样量、进样口 250℃。温度为程序升温: 80℃ 维持 3min; 以 8℃/min 升温至 240℃, 维持 5min。

2.4 制备薄层色谱法

香豆素类化合物具有荧光性, 易在薄层色谱上定位。将所需或疑似的成分分离, 后可采用溶剂将薄层上的香豆素类化合物转移出。制备薄层法仅适用于实验室, 不宜工业化大量生产。

3 结束语

物质提取效率的影响因素有许多, 其中起决定性作用的是提取方法。现代提取手段具有提取效率高等诸多优点。但由于仪器设备条件的限制, 目前以实验室实验居多, 难以实现工业化生产。可通过采用酶处理、超声波预处理与添加表面活性剂等方式提高传统方法的提取效率。酶辅助提取法广泛应用于中药有效成分的提取, 对于香豆素类化合物的提取研究较少。选择合适的酶种类与剂量也是提高效率的不错选择。十二烷基硫酸钠作为表面活性剂常用于皂苷的提取。表面活性剂等材料学的发展也将有利于中药的研究。

参考文献:

[1] 周蕙祯, 罗伟, 陈爽, 等. 瑞香狼毒花中香豆素成分及生物活性研究 [J]. 中草药, 2021, 52(4): 943-950.

[2] 吴秀稳, 杨秀伟. 羌活中的香豆素类成分及其抑制脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞 NO 生成活性的研究 [J]. 中草药, 2020, 51(13): 3383-3392.

[3] 周卫芬, 王秋娟, 韩莹, 等. 香豆素磺酰脲类化合物的降血糖作用研究 [J]. 中国药科大学学报, 2003, 34(2): 64-66.

[4] 黄家佳, 龙晓燕, 王瑞, 等. 白芷中香豆素类成分渗漉提取工艺的优化 [J]. 中成药, 2019, 41(9): 2204-2206.

[5] 朱金芳, 韩海霞, 林聪明, 等. 菊苣中香豆素的提取工艺研究 [J]. 新疆农业科学, 2013, (4): 625-629.

[6] 谭荣, 李本鹏, 蒋向辉, 等. 长毛风毛菊中总香豆素的提取工艺及抗氧化活性研究 [J]. 世界科学技术 (中医药现代化), 2019, 21(5): 906-911.

[7] 史娟, 葛红光, 郭少波, 等. 响应曲面法优化白花前胡总香豆素提取及抑菌和抗氧化活性 [J]. 中国粮油学报, 2022, 37(1): 157-163.

[8] 童天娇, 刘伟, 胥鑫萌, 等. 秦皮中香豆素提取工艺优化及其抗氧化活性研究 [J]. 保鲜与加工, 2021, 21(12): 46-50, 58.

[9] 白艳艳, 曹月欣, 张宪玺, 等. SDS 对香豆素在 SB-16 胶束增溶行为影响 [J]. 山东大学学报: 工学版, 2016, 46(3): 99-105.

[10] 陈建欣, 孙林慧, 李蓓. 马齿苋中香豆素的提取研究 [J]. 广州化工, 2018, 46(2): 92-93, 111.

[11] 阿里穆斯, 崔勋, 庞宗然, 等. 蒙药查干-扫日劳中香豆素类成分的提取工艺研究 [J]. 光谱学与光谱分析, 2014, 34(4): 1085-1088.

[12] 王芳, 宋向文, 韩邦兴, 等. 前胡总香豆素半仿生提取工艺优化 [J]. 安徽科技学院学报, 2019, 33(6): 66-70.

[13] 郑立卿, 刘建华, 董大丽, 等. 均匀设计法优选蛇床子半仿生提取工艺 [J]. 中国医院药学杂志, 2011, (13): 1140-1142.

[14] 刘霞, 李伟, 林银顺, 等. 响应面法优化酶辅助闪式提取前胡总香豆素工艺 [J]. 食品工业, 2017, 38(4): 121-124.

[15] 张伟哲, 白玉莹, 任坤, 等. 响应面法优化酶辅助提取北五味子藤茎木脂素工艺 [J]. 吉林农业大学学报, 2020, 42(1): 41-47.

[16] 杨秀东, 白子凡, 陈鑫, 等. 响应面法优化酶辅助提取鬼针草总黄酮工艺 [J]. 北方园艺, 2020(11): 104-111.

[17] 傅予, 张岩, 陶遵威. Box-Behnken 效应面法优选番石榴叶总黄酮酶辅助提取工艺研究 [J]. 中药材, 2017, 40(9): 2145-2149.

[18] 刘西茜, 董慧茹. 溶剂浮选法分离富集茵陈中总香豆素的研究 [J]. 中草药, 2008, 39(5): 689-692.

[19] 张新勇, 向仁德, 张根元. 酸碱法提取蛇床子总香豆素的工艺研究 [J]. 中成药, 1999(01): 9-10.

[20] 吕新林, 徐国兵, 许雷鸣, 等. 前胡总香豆素提取物质量标准研究 [J]. 中医药学报, 2020, 48(2): 43-46.

[21] 陈娜. 草木犀中香豆素的超临界 CO₂ 超临界萃取工艺研究 [J]. 中国现代应用药学, 2011, 28(10): 927-930.

[22] 蔡海林, 杜良伟, 刘祥英, 等. 高速逆流色谱法分离前胡提取物中香豆素类成分 [J]. 湖南农业大学学报 (自然科学版), 2011, (1): 86-89.

[23] 朱金芳, 韩海霞, 林聪明, 等. 大孔树脂分离纯化菊苣中香豆素的工艺研究 [J]. 中国现代应用药学, 2013, 30(2): 136-139.

[24] 郑抒, 谢静, 秦剑. 气相色谱-质谱法检测化妆品中 8 种香豆素类化合物 [J]. 中国药业, 2022, 31(17): 77-80.