北 方 园 艺
Northern Horticulture
2017(23):206-210 ·专题综述·

doi:10.11937/bfyy.20171583

柳叶黄酮提取纯化及其生物活性研究进展

赵二劳,闫慧云,高子怡,王桂林

(忻州师范学院 化学系,山西 忻州 034000)

摘 要:黄酮是一类具有多种生物活性的天然功能成分,在食品、医药、保健品等领域应用广泛。该研究综述了柳叶中黄酮提取纯化及其生物活性在我国的研究进展,以期为柳叶黄酮的进一步研究、开发应用提供参考依据。

关键词:柳叶;黄酮;提取;纯化;生物活性

中图分类号:R 282.71 **文献标识码**:A **文章编号**:1001-0009(2017)23-0206-05

柳树叶为垂柳或旱柳的叶,简称柳叶,为常用中药。《本草纲目》记载,柳为本经下品,其性苦寒,无毒,可治风水黄疸、疮痈肿毒、炎热淋疾等症[1]。民间常食用柳叶以清热、利胆和明目[2],常采集柳叶(芽)治疗口腔溃疡[3],也有用柳叶泡水治疗脚癣的做法[4]。现代临床上还将其用于治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病、慢性气管炎和烧烫伤等[5]。许多研究[6-9]已表明,柳叶中含有黄酮类成分,具有抗氧化、抗衰老、抗癌、抗病毒、抑菌、降血糖、降血脂等多种功能活性。我国柳叶资源丰富,提取柳叶中黄酮具有得天独厚的资源优势,一方面,柳叶黄酮的诸多功能活性决定了其具有极大的市场应用潜力;另一方面,从柳叶中提取黄酮类成分具有良好的社会意义、环境效益和经济价值,因此,研究柳叶黄酮的提取纯化极具实际意义。但目前,我国柳叶黄酮的研究开发尚处于初级阶段,如何最大限度的提高柳叶黄酮的提取得率,有效利用柳叶黄酮,是非常值得研究的问题。为此,该研究综述了柳叶中黄酮提取纯化及其功能活性在我国的研究进展,以期为相关领域研究人员对柳叶黄酮的深入研究提供参考,同时为柳叶黄酮的综合利用和深度开发提供参考依据。

第一作者简介:赵二劳(1952-),男,山西原平人,本科,教授,研究方向为天然产物化学。E-mail:zel0350@sina.com.

基金项目:国家级大学生创新创业训练计划资助项目(201610124001);山西省高等学校大学生创新创业训练计划资助项目(2016381);忻州师范学院化学化工创新基地资助项目(2017)。

收稿日期:2017-07-14

1 柳叶中黄酮的提取技术

1.1 乙醇溶剂回流提取

乙醇溶剂回流提取是天然产物活性功能成分提取的一种常用方法,为防止提取过程中加热导

process of fruiting body development, and their activities peaks appeared in the phase of fruiting body rapidly growth and fruiting body maturity respectively. FPase and amylase activities maintained a low level at all phases. For *L. edodes*, the activities of CMCase and FPase were maintained a relatively high level in the phase of mycelial vegetative growth, the activities peaks appeared in the early phase of the young mushroom, then decreased gradually. The activity of amylase was not closely related to the formation of fruiting body and remained at a low level. Laccase activity was almost undetectable at all phases.

Keywords: *Lentinus edodes*; *Pleurotus eryngii*; *Pleurotus ostreatus*; CMCase; FPase; amylase; laccase

致溶剂乙醇蒸发损失，利用回流装置使乙醇蒸汽冷凝后重新回流到提取装置中，使溶剂能得到充分利用[10]。古丽克孜·阿日甫等[11]研究了黄花柳叶中总黄酮的乙醇回流提取工艺。试验得到影响回流提取黄花柳叶中总黄酮得率的因素大小顺序为：提取温度＞乙醇浓度＞回流时间＞料液比。最佳提取条件为：以 50％乙醇为提取剂，料液比 1∶30 g·mL^{-1}，回流温度 70 ℃，回流提取时间 1 h。该工艺条件下，柳叶总黄酮得率为 4.17％。衣晓岩[12]采用单因素试验结合正交设计实验的方法，优化了垂柳叶总黄酮的乙醇回流提取工艺。所得最佳提取工艺条件为：75％乙醇，料液比 1∶11 g·mL^{-1}，提取时间 2.5 h，提取 3 次。该条件下，黄酮得率为 5.15％。试验还得出影响垂柳叶总黄酮提取效果的因素大小顺序为乙醇浓度＞回流次数＞乙醇用量＞提取时间。王立娟等[13]研究了旱柳叶中黄酮的乙醇回流提取工艺，得出提取次数和料液比是影响黄酮得率的主要因素，确定的最佳提取工艺为：60％乙醇为提取剂，料液比 1∶35 g·mL^{-1}，回流温度 65 ℃，提取 3 次，每次 75 min。此工艺条件下，旱柳叶中黄酮提取得率为 3.83％。另外，高素云等[14]研究了柳树叶中黄酮的乙醇回流提取工艺，得到最佳工艺条件为：乙醇浓度 50％，料液比 1∶30 g·mL^{-1}，回流温度 70 ℃，回流时间 1 h，该工艺条件下，总黄酮提取得率为 18.92 mg·g^{-1}。

乙醇溶剂回流提取技术虽具有设备简单、易于操作、所提黄酮杂质少等优点，但也存在提取时间长、乙醇用量大、提取效率低等缺点，故有被淘汰的趋势。

1.2　微波辅助提取

微波辅助提取是利用不同结构的物质吸收微波能的差异，使物质细胞内某些成分被微波选择性加热，导致其细胞结构发生变化或细胞破裂，利于黄酮类成分溶出，从而提高黄酮类成分的提取率[15]。杨武英等[16]研究了微波辅助提取青钱柳叶总黄酮的工艺，考察了溶剂浓度、提取温度、料液比、提取时间对青钱柳叶总黄酮提取率的影响，在单因素分析的基础上，采用正交实验优化了青钱柳叶总黄酮最佳提取工艺条件。结果表明，影响青钱柳叶黄酮提取率因素的大小顺序为微波功率＞提取时间＞乙醇浓度＞料液比。最佳提取工艺条件为：40％乙醇为提取剂，微波功率 2 100 W，料液比 1∶40 g·mL^{-1}，提取时间 25 min。此工艺条件下，青钱柳叶总黄酮提取得率为 5.60％。刘可越等[17]研究了垂柳叶黄酮的微波辅助提取工艺，并与超声波辅助提取法、索氏提取法进行了比较。通过正交实验得到微波辅助提取最佳工艺条件为：70％乙醇为提取剂，微波功率 2 000 W，提取时间 40 min。此工艺条件下，垂柳叶黄酮提取率为 5.45％，其它条件相同时，与索氏提取 8 h，超声波辅助提取 2 h，黄酮提取率相当。

微波辅助提取一种极具发展潜力的新型提取技术，具有较好的选择性、提取速度快、溶剂用量少、提取效率高等优点。但有关柳叶中黄酮的微波辅助提取国内研究很少，目前仅有文献 2 篇，需进一步开展工作深入研究。

1.3　超声波辅助提取

超声辅助提取主要是利用超声波在溶剂和提取样之间产生的空化效应，使溶液内部产生强的冲击波和微射流，导致击碎、乳化和机械振荡等次级效应，实现破坏植物细胞壁，从而加快体系的传质速率，达到快速提取有效成分[18]。汪源浩等[19]采用单因素试验，详细研究了乙醇浓度、体积、提取时间和提取温度对青钱柳叶中黄酮超声辅助提取的影响，得到超声辅助提取最佳工艺条件为：60％乙醇，超声温度 35 ℃，料液比 1∶55 g·mL^{-1}，提取时间 60 min。该提取工艺条件下，黄酮提取率为 1.52％。冯宗帅等[20]在单因素试验的基础上，采用四因素二次回归正交旋转组合设计，研究了青钱柳叶总黄酮的超声辅助提取工艺，并比较了各因素对黄酮提取率的影响。结果表明，各因素对青钱柳叶黄酮提取率影响的大小顺序为：超声时间＞乙醇浓度＞料液比＞超声功率。最佳工艺条件为：60％乙醇为提取剂，超声功率 720 W，料液比 1∶55 g·mL^{-1}，超声时间 34 min。此提取工艺条件下，总黄酮得率为 86.63％。吴茹[21]也研究了超声辅助提取青钱柳叶中总黄酮的工艺，通过响应面优化试验得出影响总黄酮得率的因素主次顺序为超声功率＞乙醇浓度＞超声时间＞料液比，且超声功率和乙醇浓度对总黄酮得率影响极显著；最佳提取工艺条件为：乙醇浓度 48％，超声功率 162 W，料液比 1∶34 g·mL^{-1}，超声时间 41 min。此工艺条件下，青钱柳叶总黄

酮提取得率可达 8.427%。另外，王立娟等[13]研究了旱柳叶中黄酮的超声辅助提取工艺，并与溶剂回流提取法进行了比较。试验结果表明，旱柳叶中黄酮超声辅助提取最佳工艺条件为：以 60%乙醇为溶剂，超声波功率 400 W，料液比 1∶35 g·mL^{-1}，超声处理 3 次，每次 30 min。该工艺条件下，黄酮提取得率为 4.26%。与溶剂回流提取相比，提取时间缩短了 60%，黄酮得率却提高了 11.23%。

超声辅助提取柳叶黄酮具有提取时间短、提取率高、提取温度低等优点。但有关柳叶中黄酮的超声辅助提取国内研究也很少，目前只有文献 3 篇，且仅限于实验室研究，工业化生产还需解决设备放大以及噪音等问题。

1.4 超声协同酶法提取

选用适当的酶可降解植物细胞壁及细胞间质中的纤维素、果胶质，从而减小细胞壁、细胞间质等传质屏障对黄酮溶出的传质阻力，而且可控制或减少其它杂质的溶出，提高提取效率[22]。柯福星[23]研究了超声协同酶法提取青钱柳叶中黄酮，在对酶种类和浓度、提取温度、超声提取时间和超声频率等单因素试验的基础上，通过正交实验优化确定的最佳提取工艺为：以 0.4%的木瓜蛋白酶水溶液为提取剂，超声功率 400 W，超声提取温度 58 ℃，提取时间 70 min。一般来说，采用几种提取技术的协同提取，可有效提高黄酮的提取率，但实际操作过程较复杂，目前仅限于实验室研究，在柳叶黄酮提取中的应用仅有文献 1 篇。

1.5 其它提取技术

近年来，各具特点的超高压提取技术、闪式提取技术和超临界流体萃取等新兴提取技术，在其它天然产物中黄酮类成分的提取中得到了越来越多的研究应用，但在柳叶黄酮的提取研究中尚鲜见报道，因此，极有必要在这方面进行尝试与研究，拓展创新柳叶黄酮的提取技术。

2 柳叶黄酮的纯化技术

天然产物中黄酮类成分以其卓越的生物活性功能受到人们的普遍关注，黄酮类成分的提取纯化也成为天然产物化学的研究热点。因此，天然产物中黄酮类成分的分离纯化技术，诸如：大孔树脂吸附法、吸附柱色谱法、凝胶色谱柱法、膜法、葡聚糖凝胶柱层析法、分子烙印技术和高速逆流色谱法等也日益引起研究者的广泛兴趣，得到较多的研究应用。但有关柳叶中黄酮的提取纯化技术，仅限大孔树脂吸附法和凝胶柱法。吴彩娥等[24]研究了青钱柳叶中黄酮粗提物的大孔树脂吸附纯化工艺。结果表明，AB-8 型大孔树脂对青钱柳叶黄酮具有良好的吸附性能。最适宜进样速度与质量浓度分别为 2 BV·h^{-1}和 1.0 mg·mL^{-1}，80 mL 湿树脂(含水 50%)对黄酮最大吸附量可达 880 mg。洗脱时乙醇的最适宜浓度与洗脱速度分别为 70%和 2 BV·h^{-1}，黄酮最高洗脱率可达 96.72%。纯化后黄酮纯度可达到 66.74%，比原黄酮粗提物纯度提高了近 4 倍。吴茹[21]也研究了青钱柳叶中黄酮粗提物的大孔树脂吸附纯化工艺，并对纯化后的柳叶黄酮进行了初步成分鉴定。发现 HPD-600 大孔树脂对青钱柳叶黄酮的吸附解吸效果最好。得出最佳吸附解吸条件为：流速 2 BV·h^{-1}，上样浓度 1.0 mg·mL^{-1}，洗脱剂乙醇浓度 70%，纯化后黄酮纯度达到 69.76%。纯化后的黄酮利用 HPLC 法分析鉴定，认为可能含有异槲皮素、槲皮素和山奈酚，测定其含量异槲皮素 0.993%，槲皮素 0.249%、山奈酚 0.168%。刘可越[25]研究了垂柳叶中黄酮类成分单体化合物的分离鉴定，对微波辅助提取的垂柳叶粗黄酮，先经过 NKA-12 大孔树脂纯化后的黄酮浸膏，以甲醇为洗脱剂，过 Sephadex LH-20 凝胶色谱柱分离，鉴定出 3 种黄酮类单体化合物，分别为木犀草素-7-*O*-*β*-*D*-吡喃葡萄糖苷、木犀草素和柯伊利素，且柯伊利素为首次在垂柳中发现。另外，应瑞峰等[26]也研究了青钱柳叶黄酮的纯化，对经AB-8型大孔树脂初步纯化后的青钱柳叶黄酮，再由葡聚糖凝胶柱层析分离纯化，得到 3 个黄酮类化合物，分别为异槲皮素、金丝桃甙和山奈酚-3-*O*-*β*-*D*-葡萄糖甙。

3 柳叶黄酮的生物活性

3.1 抗氧化抗自由基活性

机体内过剩的自由基可氧化核酸、核蛋白和脂肪酸等，使之丧失活性或变性，细胞功能发生障碍，导致机体衰老或病变。抗氧化剂能有效清除

自由基发挥抗氧化作用。有关柳叶黄酮抗氧化性的研究很多。刘畅等[27]采用清除 DPPH·法研究了旱柳叶黄酮的抗氧化活性，结果表明，旱柳叶黄酮在质量浓度为 10.5 μg·mL^{-1}时，对 DPPH·的清除率可达 87.9%，而常用抗氧化剂维生素 C 为 96.4%。旱柳叶黄酮的 EC_{50} 为 3.78 μg·mL^{-1}，维生素 C 的 EC_{50} 为 3.09 μg·mL^{-1}，表明旱柳叶黄酮具有较强的抗氧化性。应瑞峰等[26]研究了青钱柳叶黄酮抗氧化性，结果表明，随着青钱柳叶黄酮浓度的增加，清除 DPPH·能力明显提高，清除率与浓度存在着一定的量效关系。清除 DPPH·能力虽不及维生素 C，但显著高于合成抗氧化剂 BHT，表明青钱柳叶黄酮具有较强的抗氧化活性，认为可应用于抗氧化食品配料的开发。冯宗帅[28]的研究表明，青钱柳叶黄酮不但对超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)、羟自由基(·OH)及 H_2O_2 均有不同程度的清除作用，而且对油脂经高温诱导的脂质过氧化反应和酸价上升均有延缓作用，也表明青钱柳叶黄酮具有一定的抗氧化活性。此外，吴茹[21]和刘贤贤等[29]的研究也证明青钱柳叶黄酮具有较强的抗氧化性。

3.2　抑菌活性

许多研究表明，黄酮类化合物具有抑菌活性。冯宗帅[28]采用滤纸片扩散法研究了青钱柳叶黄酮对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的抑制效果，结果表明，青钱柳叶总黄酮对 3 种细菌都有不同程度的抑制作用，其中对枯草芽孢杆菌的抑制能力最强，其次是金黄色葡萄球菌，最弱的是大肠杆菌，吴茹[21]也采用滤纸片法对青钱柳叶黄酮的抑菌活性进行了研究，结果表明，青钱柳叶黄酮对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、沙门氏菌均有抑制作用，抑菌强弱为金黄色葡萄球菌＞沙门氏菌＞大肠杆菌。可以看出青钱柳叶黄酮对革兰氏阳性菌的抗菌能力要强于对革兰氏阴性菌的。

3.3　其它生物活性

许方磊等[5]采用无创尾动脉测压法观察青钱柳叶总黄酮对自发性高血压大鼠收缩压和舒张压的影响，结果显示青钱柳叶总黄酮能明显降低自发性高血压大鼠收缩压和舒张压，表明柳叶黄酮还具有降血压作用。许传莲等[3]的研究表明，长白山大黄柳叶黄酮能通过促进脂肪分解的作用，抑制喂饲高脂食料引起的小鼠肥胖和脂肪肝。刘可越等[30]通过对大鼠脂肪细胞分解活性的研究表明，垂柳叶黄酮能增益去甲肾上腺素(NE)诱导的脂肪细胞分解，并抑制小肠吸收脂肪酸，垂柳叶黄酮具有促进脂肪分解的功效，有望开发成防治肥胖症的天然药物。昌友权等[31]研究了喂食柳叶黄酮对小鼠游泳时间、爬杆时间、血乳酸、血中尿素氮、肝糖原含量和肌糖原含量等的影响，结果表明，柳叶黄酮能增强小鼠游泳时间，延长爬杆时间，降低血乳酸和血中尿素氮含量，提高肝糖原和肌糖原含量。证明柳叶黄酮具有抗疲劳作用。另外，张晶等[32]的研究表明，旱柳黄酮可防治血栓和动脉硬化；刘可越[25]的研究表明，垂柳叶黄酮具有抑制癌细胞转移作用。

4　展望

我国有丰富的柳叶资源，合理开发利用柳叶中的黄酮类成分，具有重要的社会意义、环境效益和经济价值。建立一种科学高效的柳叶黄酮产业化提取纯化工艺，既能为柳叶资源的深度开发、科学利用提供可行途径，也能为开发柳叶黄酮在食品、保健品、医药、卫生等领域的应用提供科学依据和物质基础。但目前，我国有关柳叶中黄酮的提取研究还不多，而有关柳叶黄酮纯化的研究相对更少，整体研究不够系统、深入，且所有研究仅限于实验室层面，未能形成产业。亟需从国家层面投入财力、物力，整合研究队伍，加大研究力度，借鉴其它天然活性成分提取纯化的成功经验，系统研究柳叶黄酮的提取纯化工艺，尝试融合多种提取纯化工艺，实现高效提取纯化或在提取过程中对黄酮提取物的分离纯化，实现柳叶黄酮的规模化、产业化生产。

参考文献

[1]　郑毅男，徐宝军，张晶，等. 旱柳叶活性成分研究[J]. 药学实践杂志，2000，18(5)：280-283.

[2]　左飞鸿，吴国江，李进进，等. RP-HPLC 法同时测定旱柳叶药材中 3 个主要黄酮苷成分的含量[J]. 药物分析杂志，2014，34(5)：903-906.

[3]　许传莲，郑毅男，韩立坤，等. 长白山大黄柳叶黄酮类成分促进脂肪分解作用的研究[J]. 中国药学杂志，2005，40(10)：753-756.

[4]　陈慧杰，阎雪莹，刁磊. 垂柳叶总黄酮醇质体的制备及体外

透皮研究[J].黑龙江畜牧兽医(科技版),2013(15):140-142.
[5] 许方磊,陈慧杰,刁磊.垂柳叶总黄酮软膏剂的制备工艺研究[J].黑龙江畜牧兽医(科技版),2015(11):207-209.
[6] 韩立芹,姜盼,金沙,等.早柳叶中三种黄酮类成分以水杨苷含量的高效液相色谱法测定[J].时珍国医国药,2012,23(2):396-398.
[7] 楚秀丽,杨万霞,方升佐,等.不同种源青钱柳叶黄酮类物质含量的动态变化[J].北京林业大学学报,2011,33(2):130-133.
[8] 杨万霞,余诚棋,方升佐.青钱柳叶中黄酮类化合物的地理变异[J].浙江林学院学报,2009,26(4):522-527.
[9] 谢明勇,王远兴,易醒,等.青钱柳叶中黄酮化合物结构及含量研究[J].分析化学,2004,32(8):1053-1056.
[10] 陈克莉,陈道鸽,张玉宾,等.橙皮苷提取方法的研究进展[J].食品工业,2016,37(12):204-207.
[11] 古丽克孜·阿日甫,李暮春,古丽娜孜·热西提.新疆维吾尔族医药材黄花柳叶中总黄酮含量的测定[J].中国民族民间医药,2011(18):7-8.
[12] 衣晓岩.垂柳叶总黄酮提取工艺的研究[J].黑龙江畜牧兽医(科技版),2015(9):203-205.
[13] 王立娟,李坚,谷肄静.超声波辅助提取旱柳树叶中的总黄酮[J].林产化学与工业,2007,27(S1):133-136.
[14] 高素云,祖丽皮亚·阿不力孜,姑丽各娜·买买提依明,等.柳树叶中总黄酮含量的测定[J].化学世界,2015(1):22-24,33.
[15] 李杰,和素娜,杨晖,等.金银花中黄酮类化合物的提取及其检测方法的研究进展[J].食品研究与开发,2015,36(17):175-178.
[16] 杨武英,上官新晨,徐明生,等.微波辅助法提取青钱柳叶总黄酮工艺研究[J].江西农业大学学报,2007,29(6):1016-1020.
[17] 刘可越,周斌,刘海军.垂柳叶黄酮的微波提取工艺[J].安徽农业科学,2007,35(31):9813,9823.
[18] 史帧婷,包海鹰.桑黄多糖提取工艺研究进展[J].北方园艺,2017(1):191-195.
[19] 汪源浩,苏曦瑶,李沅,等.超声波提取青钱柳叶中的黄酮组分及其含量测定[J].内江科技,2016(5):53-54.
[20] 冯宗帅,吴彩娥,方升佐,等.青钱柳叶总黄酮超声辅助提取工艺优化[J].农业机械学报,2009,40(2):130-134,75.
[21] 吴茹.青钱柳叶总黄酮提取、分离纯化及抗氧化抑菌活性研究[D].南昌:江西农业大学,2015.
[22] 余洪波,张晓星.酶法在中药提取中的研究进展[J].中成药,2005,27(5):591-593.
[23] 柯福星.青钱柳黄酮类化合物的提取与应用研究[D].福州:福建农林大学,2012.
[24] 吴彩娥,方升佐,冯宗帅,等.青钱柳叶总黄酮大孔树脂纯化工艺[J].农业机械学报,2009,40(6):133-137.
[25] 刘可越.垂柳叶中黄酮类化合物的分离、定量与生理活性研究[D].长春:吉林农业大学,2003.
[26] 应瑞峰,季苏杰,李婷婷,等.青钱柳叶中黄酮的分离纯化与抗氧化性研究[J].食品科技,2015,40(12):174-178.
[27] 刘畅,郭建红,赵鑫鹏,等.旱柳叶中黄酮及其抗氧化活性的测定[J].山东化工,2016,45(16):67-68,70.
[28] 冯宗帅.青钱柳叶总黄酮提取分离及抗氧化、抗菌研究[D].南京:南京林业大学,2009.
[29] 刘贤贤,陈刚,杨起群,等.青钱柳叶香豆素、黄酮含量测定及抗氧化活性研究[J].桂林师范高等专科学校学报,2016,30(6):123-126.
[30] 刘可越,刘海军,周斌,等.垂柳叶化学成分及其促进脂肪分解的活性研究[J].复旦学报(自然科学版),2008,47(4):520-523.
[31] 昌友权,郑鸿雁,曲红光,等.柳黄酮抗疲劳作用的实验研究[J].食品科学,2006,27(8):251-253.
[32] 张晶,郑毅男,韩立坤.旱柳叶中抗血栓、抗动脉硬化活性成分的研究[J].中药材,1999,22(3):131-133.

Research Progress on Extraction, Purification and Bioactivities of Flavonoids From Willow Leaves

ZHAO Erlao, YAN Huiyun, GAO Ziyi, WANG Guilin
(Department of Chemistry, Xinzhou Teachers University, Xinzhou, Shanxi 034000)

Abstract: Flavonoids is a kind of natural functional component, which has a variety of biological activities, and it is widely used in food, medicine and health care products. The research progress on extraction, purification and bioactivities of the willow leaf flavonoids were reviewed, which would provide reference for further research and development of the willow leaf flavonoids.

Keywords: willow leaves; flavonoids; extraction; purification; bioactivities