

Groene extractietechnieken in vogelvlucht

Een inleiding tot het thema

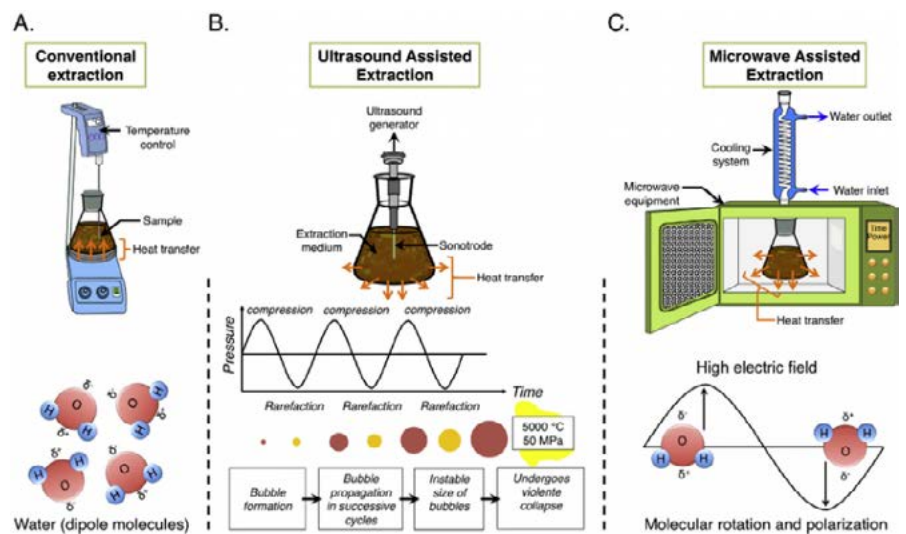
LAN KIAUW DE MUNCK-KHOE | Voor een duurzamere extractie van medicinale en aromatische planten worden steeds vaker zogenaamde groene extractietechnieken gebruikt. Deze technieken maken het mogelijk om op grootschalige maar ecologisch en economisch verantwoorde wijze biomassa van reststromen uit de voedingsindustrie te benutten. Deze biomassa wordt gebruikt voor de isolatie van waardevolle stoffen zoals polyfenolen, carotenoïden, tocoferolen, fyto-sterolen, vetzuren, pectinen, aminozuren, bioactieve peptiden, collageen en vele andere stoffen die een toepassing vinden in voedingsmiddelen (onder andere antioxidanten en kleurstoffen), functionele voedingsmiddelen, voedings-supplementen, cosmetica of farmaceutische producten.

GROENE EXTRACTIE-TECHNIEKEN IN OPKOMST

De milieubelastende aspecten van traditionele extractiemethodes, waarbij vaak grote hoeveelheden organische oplosmiddelen worden gebruikt, hebben geleid tot de ontwikkeling van nieuwe milieu- en energiebesparende en meer kosteneffectieve technieken. Ten opzichte van veelgebruikte traditionele methodes zoals maceratie, Soxhlet*-extractie en hydrodestillatie hebben deze nieuwe technieken een veel kortere extractietijd nodig (minuten versus uren of dagen) en verbruiken ze geen of aanzienlijk minder organische oplosmiddelen zoals ethanol, methanol of hexaan. Ook zijn deze technieken geschikt voor thermolabele stoffen en in veel gevallen zijn ze efficiënter door een hogere selectiviteit en een grotere opbrengst.

Een tegenwoordig veelgebruikte, geavanceerde en groene extractiemethode is superkritische vloeistofextractie (SFE), waarbij meestal superkritische koolstofdioxide ($scCO_2$) als solvens (oplosmiddel) fungeert. In een apart artikel in dit nummer wordt SFE nader besproken door Alasbahi. Een voorbeeld van de toepassing van SFE door een Nederlandse onderzoeksgroep is te lezen in het artikel over lupeolextractie in dit nummer.

De belangrijkste andere methodes zijn *microwave-assisted extraction* (MAE), *ultrasound-assisted extraction* (UAE), *accelerated solvent extraction* (ASE) en *subcritical water extraction* (SWE). Daarbij is SFE met $scCO_2$ vaak een alternatief voor hexaan of andere gangbare extractiemiddelen voor apolaire (lipofiele) stoffen, terwijl SWE vooral geschikt is voor polaire (hydrofiele) stoffen. Superkritische CO_2 -extractie wordt tegenwoordig veel toegepast voor het verkrijgen van vluchtige olie uit aromatische planten.



FIGUUR 1 | Schematische weergave van *ultrasound-assisted* en *microwave-assisted* extractieopstellingen. Bron: <https://extractionmagazine.com/2017/11/28/ultrasound-assisted-extraction-food-natural-products-mechanisms-techniques-combinations-protocols-applications>

Het CO_2 dat gebruikt wordt voor superkritische CO_2 -extractie is 'groen' omdat het een restproduct uit de industrie is dat in het SFE-proces steeds wordt hergebruikt.

Bij MAE, UAE en ASE wordt nog wel gebruik gemaakt van gangbare extractievloeistoffen (organische oplosmiddelen), maar in veel kleinere volumes dan die nodig zijn voor traditionele methodes: minimaal tien keer minder. Hier kan bioethanol een groene optie zijn. Voor SFE, dat in de eerste plaats geschikt is voor apolaire stoffen, is ethanol of een ander polair oplosmiddel nodig als co-solvens (ca. 5%) wanneer meer polaire stoffen geëxtraheerd moeten worden.

Bij MAE wordt het solvens verhit door microgolven tussen 300 MHz en 300 GHz. Het plantenmateriaal wordt in een vat met een microgolfabsorberend solvens geplaatst en enkele minuten blootgesteld aan microgolven, vaak in meerdere cycli. De electromagnetische golven vernietigen de plantenmatrix en -cellwanden, zodat planteninhoudsstoffen kunnen diffunderen en oplossen in het solvens. Geschikte solventia

voor MAE zijn onder andere ethyleenglycol, ethanol, methanol, water en aceton. Bij MAE in een open vat ligt de temperatuur van het systeem rond of onder het kookpunt van het solvens. Bij geslotenvat-MAE kan de temperatuur ver boven het kookpunt stijgen. MAE leent zich voor polaire vloeistoffen en (kleinere) polariseerbare verbindingen zoals fenolzuren, quercetin, resveratrol, maar is minder geschikt voor thermolabele stoffen. Er is ook een MAE-variant waarbij geen solvens wordt gebruikt: *solvent-free* MAE (SFMAE), bijvoorbeeld voor de extractie van vluchtige stoffen uit vers plantenmateriaal. Hierbij verhitten de microgolven het in het plantenmateriaal aanwezige vocht, met disruptie van de plantencellen als gevolg. Bij UAE wordt het te extraheren materiaal in een afgesloten vat met solvens in een ultrasoon bad geplaatst en wordt er gebruik gemaakt van geluidsgolven tussen de 20-2000 KHz.

Het mechanische effect van *ultrasound* zorgt voor verhitting van het solvens en verhoogt het contact tussen solvens en plantenmateriaal en de doordringbaarheid »

van de plantencelwanden. Door een korte ultrasoonblootstelling aan te houden kan de methode ook voor thermolabele stoffen toegepast worden. Een nadeel is dat *ultrasound* een negatief effect kan hebben op bioactieve plantengestoffen door de vorming van vrije radicalen.

ASE wordt ook wel *pressurized solvent extraction* (PSE) of *pressurized liquid extraction* (PLE) genoemd. De extractie gebeurt met organische extractiemiddelen bij een verhoogde druk en temperatuur. De hoge druk houdt het solvens in een vloeibare staat bij een hoge temperatuur, die meestal boven het kookpunt van het solvens ligt. Hetzelfde kan gedaan worden met water, wat het voordeel heeft dat het goedkoop, veilig en milieuvriendelijk is. Er wordt gebruik gemaakt van subkritisch water (**SWE**) van 100°C tot 374°C (de kritische temperatuur van water) bij een druk tot 10 bar. MAE wordt van de hier genoemde groene extractietechnieken het langst toegepast (sinds de jaren tachtig) en wordt onder andere gebruikt voor analytische doeleinden en voor de winning of verwijdering van stoffen in de petrochemische, agrarische en voedingsindustrie. Het zou niet alleen effectiever zijn dan Soxhlet-extractie, maar ook effectiever dan de andere geavanceerde extractiemethodes (zie tabel 1). Soxhlet-extractie is al meer dan een eeuw de meest gebruikte extractiemethode en wordt nog steeds gebruikt als standaard voor de vergelijking van de efficiëntie van nieuwe extractietechnieken.*

Voor de extractie van aromatische planten met superkritische CO₂ wordt soms de samenstelling van het stoom- of hydrodestillatie-extract als model gebruikt bij het vinden van de beste instelling van de extractieparameters waarmee het resultaat die van stoomdestillatie zo veel mogelijk benadert. Afhankelijk van de gebruikte plant kunnen scCO₂-extracten weinig of veel verschillen van destillatie-extracten (zie figuur 2).

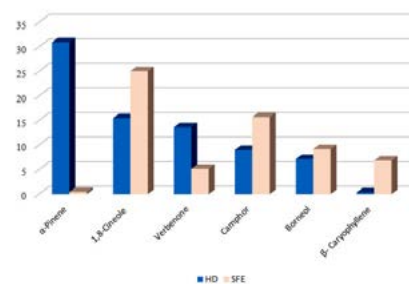
COMBINATIES VAN EXTRACTIETECHNIKEN

De nieuwe extractiemethodes worden vaak ook in combinatie met elkaar gebruikt om de opbrengst verder te verhogen. Zo wor-

den UAE en MAE als voorbehandeling ingezet voor superkritische vloeistofextractie en kan UAE ook tijdens SFE toegepast worden. Voorbehandeling gebeurt ook met enzymen die plantencelwanden open kunnen breken (*enzyme-assisted extraction*), bijvoorbeeld met amylase, pectinase, cellulase of protease. De aard van de plantenmatrix (bloem, blad, zaad, bast, wortel, etc.) en van de gewenste inhoudsstoffen (oplosbaarheid, temperatuurgevoeligheid, etc.) bepalen grotendeels wat de meest geschikte extractiemethode is. De deeltjesgrootte en het watergehalte van het te extraheren materiaal hebben eveneens invloed op de opbrengst van het extract. Ook de toepassing van het extract kan de keuze bepalen voor de extractiemethode. Zo gaf bijvoorbeeld superkritische CO₂-extractie van smaakstoffen uit lavendelsoorten (voor toepassing in voedingsmiddelen en dranken) de beste smaakwaliteit ten opzichte van subkritische waterextractie en Soxhlet-extractie, terwijl de opbrengst verreweg het hoogst was met de Soxhlet-methode [2].

Microwave-assisted en *ultrasound-assisted* extracties kunnen ook gecombineerd worden met een Soxhlet-extractie of (hydro) destillatie voor de verbetering van de opbrengst en kwaliteit van het extract. Een bijzondere plaats tussen de groene extractiemethodes wordt ingenomen door zogenaamde *natural deep eutectic solvents* (NADES), die steeds meer toepassingen beginnen te vinden [3,4]. NADES maakt gebruik van mengsels van twee of meer natuurlijke plantenmetabolieten, zoals organische zuren, suikers, (poly)alcoholen, aminen, aminozuren en cholinechloride. Deze mengsels worden op een zodanige

FIGUUR 2 | Vergelijking van de belangrijkste componenten in de vluchtige olie van *Rosmarinus officinalis* L. verkregen met hydrodestillatie (HD) of superkritische vloeistofextractie (SFE) BRON | Khalili G et al. Orient J Chem 2017;33(5):2537-2541



manier samengesteld dat het smeltpunt van het mengsel lager is dan dat van de afzonderlijke componenten. In dit tijdschrift is eerder een artikel verschenen over dit onderwerp (april 2014).

NIEUWE EXTRACTIEMETHODES LEVEREN NIEUWE EXTRACTSAMENSTELLINGEN

Extracten die verkregen zijn met de nieuwe technieken kunnen qua samenstelling nogal afwijken van extracten die op traditionele manier zijn geproduceerd en waarvan de farmacologische eigenschappen en klinische data zijn beschreven in officiële monografieën.

Dat geeft nieuwe uitdagingen betreffende veiligheid, klinische werkzaamheid en standaardisatie van extractieprocedures. Anderzijds maakt de manipuleerbare selectiviteit van met name SFE het mogelijk om verrijkte extracten te verkrijgen met hoge(re) concentraties van gewenste bioactieve componenten, wat kan leiden tot een betere werking - het maximaliseren van het fytotherapeutische potentieel - of tot nieuwe toepassingsmogelijkheden.

De veelgebruikte *Echinacea*-soorten zijn daar een voorbeeld van. Het bekendst is de toepassing ter ondersteuning van het immuunsysteem, met name tegen gewone verkoudheid. Het is echter al meer dan tien jaar bekend dat de wortels van *E. pallida* polyacetyleen- en polyeenverbindingen met kankerremmende werking bevatten. Deze verbindingen ontbreken vrijwel in *E. purpurea* en *E. angustifolia*. In vergelijking met een Soxhlet-extractie met hexaan als solvens werd met scCO₂-extractie een extract verkregen dat zeer rijk is aan deze verbindingen, met een hoge selectiviteit voor niet-geoxideerde lipofiele stoffen. Het extract vertoonde *in vitro* een cytotoxische werking tegen borstkankercellen (MC-7-cel lijn) en een zwakke werking tegen niet-kleincellige longkankercellen (A549-cel lijn) [5]. Eerder al werd een sterke activiteit waargenomen tegen darmkankercellen (COLO-320-cel lijn) van polyacetylenen uit een hexaanextract van *E. pallida* en een zwakkere werking tegen pancreaskankercellen (MIA PaCa-2 cel lijn) [6]. De selectiviteit van scCO₂-extractie maakt het

* Een Soxhlet-apparaat is een extractieopstelling en dankt zijn naam aan de Duitse chemicus Franz von Soxhlet, die deze opstelling in 1879 bedacht. Deze wordt vaak in laboratoria gebruikt om bestanddelen uit (planten)materiaal te extraheren met een bepaald solvens. Fijngemalen vaste stof (bladeren, wortels, bloemen, zaden etc.) wordt geplaatst in een extractiehuls, vaak gemaakt van cellulose. Door verwarming van een kolf met solvens, verdampt er oplosmiddel dat daarna omhoog stijgt door een buis. Door een daarboven gemonteerde koeler wordt de damp dusdanig afgekoeld dat deze als vloeistof weer naar beneden stroomt en in de huls met het te extraheren monster terecht komt. Doordat er in de loop van de tijd steeds meer solvens verdampt (en weer condenseert), stijgt het solvensniveau in de extractiehuls. Dit gaat door totdat het vloeistofniveau zo hoog is dat de vloeistof via een speciaal glazen overloopbuisje in één keer volledig wordt overgeheveld naar de onderste kolf, waar het oplosmiddel/extractmengsel zich verzamelt. Door te blijven verwarmen, begint het proces van het vollopen van de cellulosehuls met (planten)materiaal weer van voren af aan. Dit proces wordt pas gestopt wanneer vrijwel alle te extraheren stoffen onderin de kolf terecht zijn gekomen. Daarom staat de Soxhlet-extractiemethode ook wel bekend als een continue en/of uitputtende extractie.

TABEL 1 | Enkele voorbeelden van extractieopbrengsten met verschillende extractietechnieken [1]**

PLANT	WERKZAME STOF	OPBRENGST PER EXTRACTIEMETHODE (% NATGEWICHT) (EXTRACTIEDUUR)	
		SFMAE	HD
<i>Ocimum basilicum</i> L.	Eugenol	43,2	11,0
	Linalool	25,3	39,1
	Totale opbrengst	0,029	0,028
		(30 min.)	(4,5 uur)
<i>Mentha crisper</i> L.	Limoneen	9,7	20,2
	Carvon	64,9	52,3
	Totale opbrengst	0,095	0,095
		(30 min.)	(4,5 uur)
<i>Thymus vulgaris</i> L.	γ -Terpineen	17,1	22,8
	Eugenol	51,0	40,5
	Totale opbrengst	0,160	0,161
		(30 min.)	(4,5 uur)

PLANT	WERKZAME STOF	OPBRENGST PER EXTRACTIEMETHODE (% DROOGGEWICHT) (EXTRACTIEDUUR)			
		MAE	UAE	SFE	SOXHLET
<i>Artemisa annua</i> L.	Artemisinin	92,1 (12 min.)		33,3 (2,5 uur)	60,4 (6 uur)
<i>Curcuma longa</i> L.	Curcumin	90,47 (5 min.)	71,42 (5 min.)	69,36 (240 min.)	2,10 (8 uur)
<i>Silybum marianum</i> L.	Silybinin	1,37 (6x 2 min.)			1,09 (12 uur)
<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	Glycyrrhizinezuur	2,26 (4 min.)			2,50 (10 uur)

HD: hydrodestillatie; MAE: microwave-assisted extraction; SFE: supercritical fluid extraction; SFMAE: solvent-free microwave-assisted extraction; UAE: ultrasound-assisted extraction | **Voor de overzichtelijkheid wordt van de extractieparameters die een invloed op het resultaat hebben alleen de extractietijd weergegeven. Voor meer details, zie: Veggi et al., 2013.

Alasbahi geeft elders in dit nummer nog meer voorbeelden van verschillen in samenstellingen van extracten, afhankelijk van de extractiemethode, en daarmee samenhangende verschillen in werking.

SLOTOPMERKINGEN

Met de toenemende toepassing van nieuwe extractietechnieken en de verdere ontwikkeling daarvan voor de productie van fytotherapeutica ontstaat de noodzaak om extractieprocedures preciezer vast te leggen en beter te standaardiseren, de verkregen extracten grondig te analyseren en te vergelijken met traditionele extracten, en uiteraard te testen op werkzaamheid en veiligheid.

Het vergt veel experimenteren en kennis van zaken om het voor elkaar te krijgen om de meest optimale instellingen te vinden van het extractieproces en zo de gewenste kwaliteit en gehalten te bereiken. De groene technieken zijn echter in de eerste plaats ontwikkeld voor toepassing in analytische laboratoria (bijvoorbeeld gehalteevalueringen van pesticiden in agrarische producten) en de industriële winning of verwijdering van enkelvoudige stoffen of stofgroepen in onder andere de voedingsindustrie, waar de nadruk ligt op de opbrengst en zuiverheid van stoffen, en niet op de kwaliteit van complexe extracten. Zo is superkritische CO₂-extractie een relatief milde extractieprocedure, wat niet direct gezegd kan worden van *microwave-assisted* of *ultrasound-assisted* extractieprocessen.

Daarom is het erg belangrijk dat er, ten behoeve van de specifieke productie van fytotherapeutische extracten met behulp van SFE en andere hier besproken technieken, meer onderzoek gericht op fytotherapeutische toepassingen uitgevoerd wordt: gedegen onderzoek dat niet alleen kijkt naar opbrengsten, maar vooral ook naar de kwaliteit en werkzaamheid van de verkregen extracten. █

REFERENTIES | [1] Veggi PC, Martinez J, Meireles MAA. Chapter 2: Fundamentals of microwave extraction. In: Chemat F, Cravotto G (eds): Microwave-assisted extraction for bioactive compounds. Springer Science+Business Media, New York 2013: pp.15-52. [2] Daluiso AE. An evaluation of sustainable sub- and supercritical fluid extraction technologies and traditional soxhlet for the isolation of high quality, natural Lavandula spp. flavours. Thesis, McGill University Montreal, Quebec, Canada. April, 2015. [3] Jablonský M, Škulcová A, Malvis A, Šima J. Extraction of value-added components from food industry based and agro-forest biowastes by deep eutectic solvents. J Biotechnol 2018;282:46-66. [4] Liu Y, Friesen JB, McAlpine JB, Lancin DC, Chen SN, Pauli GF. Natural deep eutectic solvents: properties, applications, and perspectives. J Nat Prod 2018;81(3):679-690. [5] Tacchini M, Spagnoletti A, Brighenti V, Prencipe FP, Benvenuti S, Sacchetti G, Pellati F. A new method based on supercritical fluid extraction for polyacetylenes and polyenes from Echinacea pallida (Nutt.) Nutt. roots. J Pharm Biomed Anal 2017;146:1-6. [6] Chicca A, Pellati F, Adinolfi B, Matthias A, Massarelli I, Benvenuti S, Martinotti E, Bianucci AM, Bone K, Lehmann R, Nieri P. Cytotoxic activity of polyacetylenes and polyenes isolated from roots of Echinacea pallida. Br J Pharmacol 2008;153(5):879-885. [7] Turner RB, Bauer R, Woelkart K, Hulseley TC, Gangemi JD. An evaluation of Echinacea angustifolia in experimental rhinovirus infections. N Engl J Med 2005;353(4):341-348.

GERAADPLEEGDE BRONNEN | Ameer K, Shahbaz HM, Kwon J. Green extraction methods for polyphenols from plant matrices and their byproducts: a review. Compr Rev Food Sci Food Safety 2017;16(2):295-315. doi:10.1111/1541-4337.12253 | Azwanida NN. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. Med Aromat Plants 2015;4:196. doi:10.4172/2167-0412.1000196 | Khaw KY, Parat MO, Shaw PN, Falconer JR. Solvent supercritical fluid technologies to extract bioactive compounds from natural sources: a review. Molecules. 2017;22(7): pii: E1186. doi: 10.3390/molecules22071186 | Shams KA, Abdel-Aziz NS, Saleh IA, Hegazy MEF, El-Missiry MM, Hammouda FM. Green technology: economically and environmentally innovative methods for extraction of medicinal & aromatic plants (MAP) in Egypt. J Chem Pharmaceut Res 2015;7(5):1050-1074.

Drs. L.K. (Lan Kiauw) de Munck-Khoe is afgestudeerd als apotheker, werkzaam bij Springfield Nutraceuticals en redactielid van dit tijdschrift.

mogelijk om verder onderzoek te doen naar de kankerremmende eigenschappen van polyacetylenen uit *E. pallida*.

Uit een ander onderzoek kwamen duidelijke verschillen naar voren in het profiel van werkzame inhoudsstofgroepen, verkregen met superkritische CO₂ of ethanol. De gehalten van polysacchariden, koffiezuurderivaten (echinacoside, cichoreizuur) en alkamides werden vergeleken in een scCO₂-extract en twee verschillende ethanolextracten van de wortels van *E. angustifolia* [7].

In deze studie bevatte het scCO₂-extract (temperatuur, druk, stroomsnelheid, extractieduur en andere parameters werden niet nader gespecificeerd) geen polysacchariden, maar wel de hoogste concentratie alkylamides (73,8%), die beschouwd worden als de stoffen met de belangrijkste immunomodulerende werking. Het 60%-ethanol-extract bevatte 2,3% alkylamides en 48,9% polysacchariden en het 20%-ethanol-extract bevatte 42,1% polysacchariden en slechts 0,1% alkylamides. Echinacoside kon in geen van de extracten aangetoond worden.

Opgemerkt dient te worden dat het in de EMA- en WHO-monografieën van de wortels van *E. angustifolia* DC. om een extract gaat dat verkregen is met 45% ethanol. Overigens had in bovenstaande studie geen van de drie extracten een werking (preventief of therapeutisch) tegen infectie met rhinovirus type 39 ten opzichte van placebo bij gezonde vrijwilligers [7]. Rhinovirus type 39 staat bekend als een van de meest voorkomende veroorzakers van gewone verkoudheid.