

快速溶剂萃取提取白藜芦醇和白藜芦醇苷工艺的响应面优化

曹静亚^{1,2}, 迟晓峰^{1,2}, 陈涛^{1,2}, 董琦^{1,2}, 谭亮^{1,2}, 胡风祖^{1,2*}¹中国科学院藏药研究重点实验室; ²中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810008

摘要: 以白藜芦醇和白藜芦醇苷的总量为指标, 考察了超声、加热回流、快速溶剂萃取(ASE)三种提取方法对青海栽培何首乌中白藜芦醇和白藜芦醇苷提取效果的影响, 通过单因素实验和响应面法优化 ASE 的提取条件, 在单因素实验基础上筛选出乙醇浓度、提取温度、提取时间三个主要因素。结果表明, ASE 在提取效果上优于其他两种方法, 通过响应面分析得出最佳组合条件为: 乙醇浓度 51%, 提取温度 96 °C、提取时间 16 min。快速溶剂萃取法简单、快捷、高效, 适用于何首乌中白藜芦醇和白藜芦醇苷的提取。

关键词: 栽培何首乌; 白藜芦醇; 白藜芦醇苷; 快速溶剂萃取; 响应面法

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

Optimization of Accelerated Solvent Extraction of Resveratrol and Polydatin Using Response Surface Methodology

CAO Jing-ya^{1,2}, CHI Xiao-feng^{1,2}, CHEN Tao^{1,2}, DONG Qi^{1,2}, TAN Liang^{1,2}, HU Feng-zu^{1,2*}¹Key Laboratory of Tibetan Medicine Research, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences;²Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China

Abstract: The total content of resveratrol and polydatin was used as the investigation index. The efficiency of ultrasonic extraction, heating reflux extraction and accelerated solvent extraction (ASE) for the extraction of resveratrol and polydatin in cultivated *Polygonum multiflorum* from Qinghai was compared. The extraction conditions of ASE were optimized through single-factor test and response surface methodology (RSM). To obtain the maximum of extraction yield of resveratrol and polydatin, three main factors including ethanol concentration, extraction temperature and extraction time were selected and further optimized using RSM on the basis of single factor experimental results. As a result, ASE was markedly superior to the other two methods. The optimal conditions of ASE were as follows: 51% of aqueous ethanol, extraction temperature of 96 °C, and extraction time of 16 min. ASE was simple, rapid and efficient, and was appropriate for the extraction of resveratrol and polydatin in *P. multiflorum*.

Key words: cultivated *Polygonum multiflorum*; resveratrol; polydatin; accelerated solvent extraction; response surface methodology

何首乌为蓼科植物何首乌(*Polygonum multiflorum* Thunb.) 的干燥块根, 其性微温, 味苦、甘、涩。何首乌在临床应用上有“生首乌”和“制首乌”之别, 前者功能解毒、消痈、润肠通便, 后者补肝肾、益精血、乌须发、强筋骨^[1]。

何首乌主要含有蒽醌类、芪类和卵磷脂三大类成分, 其中芪类化合物中的白藜芦醇具有明显的抗氧化、抗肿瘤生物活性^[2,3]。白藜芦醇在自然条件下以自由态和糖苷两种形式存在。对白藜芦醇苷的

提取通常采用加热回流的方法, 张建超^[4]等人对虎杖中白藜芦醇苷的提取分离工艺进行了研究, 得到醇提工艺的最优条件为: 95% 乙醇回流提取 3 次, 每次 2 h。该方法操作复杂, 耗时长。而白藜芦醇具有热敏性, 回流提取时间长时, 原料长时间受热, 在提取过程中易遭到破坏^[5]。

ASE 是指在密闭容器内于高温 (50 ~ 200 °C) 和高压 (500 ~ 3000 psi) 条件下, 在短时间内, 用有机溶剂提取固体或半固体样品的一种新型样品前处理方法^[6]。与超声、微波、回流、超临界萃取等成熟方法相比, ASE 有有机溶剂用量少、提取时间短、萃取效率高、操作简单方便、安全和自动化程度高等优点^[7]。因此本研究选用快速溶剂萃取法(ASE)对何

收稿日期: 2013-05-02

接受日期: 2013-09-05

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KSCX2-EW-J-26)

* 通讯作者 Tel: 86-971-6132750; E-mail: hufz@nwipb.cac.cn

首乌中的白藜芦醇和白藜芦醇苷进行提取, 并采用响应面分析法得到了 ASE 提取白藜芦醇和白藜芦醇苷最优的工艺参数, 为白藜芦醇和白藜芦醇苷的提取开发利用提供了技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

本实验中栽培何首乌材料由青海西宁市廿里铺蓓蕾花木有限公司提供, 样品经阴干, 粉碎后, 过孔径 0.175 mm 筛, 冷藏保存; 白藜芦醇(批号: 111535-200502) 购自中国药品生物制品检定所, 白藜芦醇苷(批号: H-012-110420) 购自成都瑞芬思生物科技有限公司; 乙腈(色谱纯) 山东禹王; 自制超纯水; 其余试剂均为分析纯。

ASE350 快速溶剂萃取仪(美国 DIONEX 公司); Agilent1260 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), 色谱柱 Agilent Eclipse-XDB C₁₈(5 μm, 250 × 4.6 mm); MOLELEMENT 元素型超纯水机(上海摩勒生物科技有限公司); METTLER TOLEDO PL203 和 XS204 电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 HPLC 检测条件

色谱柱: Agilent Eclipse-XDB C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相: V(乙腈): V(水) = 23: 77; 流速 1.0 mL/min, 柱温 25 °C, 检测波长 306 nm。

1.2.2 不同提取方法的考察

1.2.2.1 超声提取法

准确称取 0.1 g 何首乌样品, 置于三角瓶中, 精密加入 50% 的乙醇溶液 25 mL, 置于超声波清洗器中, 提取一次, 提取时间 40 min, 提取功率 500 W。提取液过滤后, 经 0.45 μm 滤膜过滤, 进液相进行分析。

1.2.2.2 加热回流法

准确称取 0.1 g 何首乌样品, 置于磨口三角瓶中, 精密加入 50% 的乙醇溶液 25 mL, 称重, 于 70 °C 下回流提取 40 min, 用提取溶剂补重。提取液过滤后, 经 0.45 μm 滤膜过滤, 进液相进行分析。

1.2.2.3 ASE 法

准确称取 0.2 g 何首乌样品, 置于 34 mL 不锈钢萃取池中, 以 50% 的乙醇溶液为提取溶剂, 提取一次, 提取时间 10 min, 提取温度 70 °C。用提取溶

剂将提取液定容至 100 mL, 经 0.45 μm 滤膜过滤, 进液相进行分析。

1.2.3 标准曲线的绘制

精密称取对照品白藜芦醇 0.128 mg 和白藜芦醇苷 1.63 mg, 置于 10 mL 棕色容量瓶中, 用 50% 的乙醇溶液溶解并稀释至刻度, 摇匀。配置成浓度分别为 12.8 μg/mL 和 163 μg/mL 的对照品溶液。吸取以上对照品溶液 1.00、2.00、6.00、8.00、10.00 μL, 注入高效液相色谱仪进行检测, 拟合峰面积(*y*) 和进样量(*x*, μg) 作回归曲线。

1.2.4 白藜芦醇和白藜芦醇苷提取率计算

按上述方法吸取 10 μL 供试品溶液注入高效液相色谱仪, 重复进样三次, 峰面积取平均值。将峰面积平均值代入回归方程, 即可求出供试品溶液中白藜芦醇和白藜芦醇苷的含量 *C*, 带入下式计算白藜芦醇和白藜芦醇苷的提取率。

$$E(\text{mg/g}) = (C \times V) / (I \times W)$$

式中: *C* 为回归方程求出的样品溶液中白藜芦醇和白藜芦醇苷的含量(μg); *V* 为定容体积(mL); *I* 为进样量(μL); *W* 为样品处理前干重(g)。

1.2.5 响应面法提取工艺试验设计

根据前期试验筛选, 本实验主要考察乙醇浓度(%)、提取时间(min)和提取温度(°C) 3 个因素对响应值白藜芦醇和白藜芦醇苷提取率的影响, 首先进行单因素试验。通过单因素预实验, 应用 Design-Expert 7.0.0 软件, 设计 3 因素 3 水平的响应面试验。试验因素与水平设计见表 1。

表 1 响应面试验因素与水平表

Table 1 Factors and levels of response surface experiments

水平 Level	因素 Factor		
	乙醇浓度 A Ethanol concentration (%)	提取温度 B Extraction temperature (°C)	提取时间 C Extraction time (min)
-1	30	70	5
0	50	90	15
1	70	110	25

2 结果与分析

2.1 白藜芦醇和白藜芦醇苷含量的测定

按照“1.2.1”色谱条件, 测得白藜芦醇和白藜芦醇苷对照品与何首乌样品的液相色谱图见图 1。

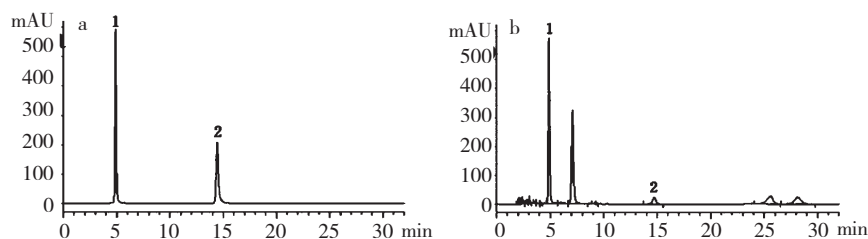


图1 混合对照品(a)及样品(b)的HPLC图

Fig. 1 HPLC chromatograms of the mixed standards (a) and the sample (b)
(1: polydatin; 2: resveratrol); (1: 白藜芦醇苷; 2: 白藜芦醇)

2.2 线性关系

依据“1.2.3”项下标准曲线绘制方法,得回归方程:(1)白藜芦醇 $Y = 6284.61X - 1.69$, $R^2 = 0.9999$,在 $0.0128 \sim 0.128 \mu\text{g}$ 范围内成良好的线性关系;(2)白藜芦醇苷 $Y = 3964.13X - 8.57$, $R^2 = 0.9999$,在 $0.163 \sim 1.63 \mu\text{g}$ 范围内成良好的线性关系。

2.3 不同提取方法的比较

由实验得出,三种不同的提取方法得到白藜芦醇和白藜芦醇苷总含量($n=5$)分别为:超声提取法(21.27 ± 0.37) mg/g,加热回流法(23.69 ± 0.45) mg/g, ASE法(25.43 ± 0.41) mg/g。对白藜芦醇和白藜芦醇苷总含量的影响由高到低顺序为:ASE > 加热回流法 > 超声提取法。其中,ASE作为一种新的提取方法提取效果最好,提取时间少,而且不需要过滤步骤,避免了过滤过程中的损失。所以本实验进一步对ASE提取何首乌中白藜芦醇和白藜芦醇苷的条件进行优化。

2.4 单因素实验结果

2.4.1 循环次数对白藜芦醇和白藜芦醇苷总提取率的影响

保持其它条件不变(乙醇浓度在50%,提取温度70℃,提取时间10 min),考察循环次数分别为1、2、3的条件下,白藜芦醇和白藜芦醇苷总提取率的变化。结果表明,在循环次数为1、2次时,白藜芦醇和白藜芦醇苷总提取率几乎不变,当循环3次时,白藜芦醇和白藜芦醇苷总提取率下降。因此,循环次数选为1次。

2.4.2 乙醇浓度对白藜芦醇和白藜芦醇苷总提取率的影响

保持其它条件不变(提取温度70℃,提取时间10 min,循环1次),考察乙醇浓度分别为0%、30%、50%、70%、100%的条件下,白藜芦醇和白藜芦醇苷

总提取率的变化。结果表明,在乙醇浓度为0%~50%范围内,白藜芦醇和白藜芦醇苷总提取率随乙醇浓度的升高而增加,但当乙醇浓度大于50%时,白藜芦醇和白藜芦醇苷总提取率随乙醇浓度的升高而减小。因此,考虑到得率和成本,乙醇浓度选择50%左右为宜。

2.4.3 提取温度对白藜芦醇和白藜芦醇苷总提取率的影响

保持其它条件不变(乙醇浓度50%,提取时间10 min,循环1次),考察提取温度分别为25、50、70、90、110℃的条件下白藜芦醇和白藜芦醇苷总提取率的变化。结果表明,提取温度对白藜芦醇和白藜芦醇苷提取率有很大的影响,在25~90℃范围内,白藜芦醇和白藜芦醇苷总提取率随温度的升高而增加,超过90℃后提取率几乎不再增加,因此,提取温度以90℃左右为宜。

2.4.4 提取时间对白藜芦醇和白藜芦醇苷总提取率的影响

保持其它条件不变(乙醇浓度50%,提取温度90℃,循环1次),考察提取时间分别为1、5、15、25、35、45 min条件下白藜芦醇和白藜芦醇苷总提取率的变化。结果表明,在1~15 min范围内白藜芦醇和白藜芦醇苷总提取率随提取时间的升高而增加,超过15 min后提取率随提取时间而缓慢下降,可能是时间过长导致白藜芦醇和白藜芦醇苷结构遭到破坏,因此提取时间以15 min左右为宜。

2.5 响应面法优化白藜芦醇和白藜芦醇苷提取工艺

2.5.1 模型方差分析

对白藜芦醇和白藜芦醇苷提取工艺进行响应面分析,其具体试验方案及结果见表2。

表2 白藜芦醇和白藜芦醇苷提取工艺条件的优化试验设计及结果

Table 2 Optimization of extraction conditions and results of experimental design

试验号 No.	A	B	C	提取率 Extraction yield (mg/g)
1	-1	1	0	30.62
2	1	-1	0	26.73
3	0	-1	1	26.84
4	0	0	0	39.94
5	1	0	-1	25.01
6	1	1	0	30.28
7	0	-1	-1	22.52
8	1	0	1	26.67
9	-1	-1	0	22.52
10	0	1	-1	30.02
11	-1	0	-1	22.21
12	0	1	1	30.96
13	0	0	0	40.21
14	0	0	0	39.81
15	0	0	0	39.7
16	0	0	0	40.97
17	-1	0	1	26.18

表3 方差分析结果表

Table 3 ANOVA of regression analysis

参数 Parameter	平方和 SS	自由度 v	均方 MS	F 值 F value	P 值(Pr > F) P value
A	6.41	1	6.41	40.98	0.0004
B	67.69	1	67.69	432.86	< 0.0001
C	14.82	1	14.82	94.80	< 0.0001
AB	5.18	1	5.18	33.10	0.0007
AC	1.33	1	1.33	8.53	0.0223
BC	2.86	1	2.86	18.26	0.0037
A ²	241.79	1	241.79	1546.29	< 0.0001
B ²	105.71	1	105.71	675.99	< 0.0001
C ²	238.77	1	238.77	1526.96	< 0.0001
模型 Model	750.48	9	83.39	533.27	< 0.0001
残差 Residual	1.09	7	0.16		
失拟项 Lack of fit	0.06	3	0.02	0.08	0.9695
纯误差 Pure error	1.04	4	0.26		
总离差 Cor total	751.58	16			

2.5.2 响应面分析

乙醇浓度(A)、提取温度(B)和提取时间(C)3个因素之间的交互作用对白藜芦醇和白藜芦醇苷的

综合考虑单因素试验结果,利用 Design-expert 7.0.0 统计软件对响应面试验数据进行回归拟合,得到多元二次回归方程模型:

$$E = +40.13 + 0.90A + 2.91B + 1.36C - 1.14AB - 0.58AC - 0.84BC - 7.58A^2 - 5.01B^2 - 7.53C^2$$

式中 E 为白藜芦醇和白藜芦醇苷的总提取率(mg/g); A 为乙醇浓度(%); B 为提取温度(°C); C 为提取时间(min)。

对该回归方程进行方差分析见表3,可以看出,回归模型($P < 0.0001$)极显著,相关系数 $R^2 = 0.998$,失拟项($P = 0.9695 > 0.05$),表明失拟项相对于绝对误差不显著,因此,该模型对试验的拟合程度良好,能较好的反映各因素与响应值之间的真实关系,可以利用该模型对实验参数进行分析。由 F 值的大小可以推断,在所选择的试验范围内,3个因素对白藜芦醇和白藜芦醇苷总提取得率影响的顺序为提取温度(B) > 提取时间(C) > 乙醇浓度(A)。二次项 A^2 、 B^2 和 C^2 影响极显著,交互项 AB、BC 达到极显著水平,AC 显著,表明各因素对白藜芦醇和白藜芦醇苷总提取率的影响不是简单线性关系。

总提取得率的影响如图2~4所示。

分析图2a~4a可知,当乙醇浓度(A)、提取温度(B)和提取时间(C)取值较小时,效应面曲线较

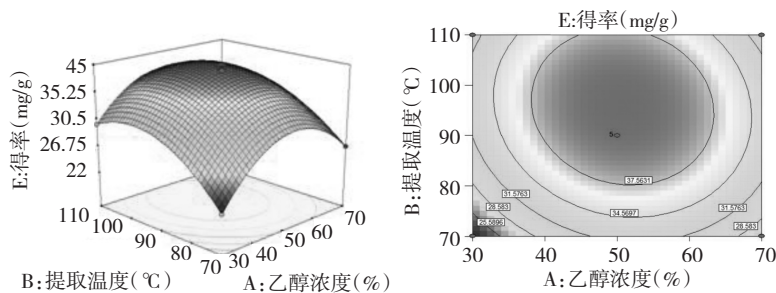


图2 $E = f(A, B)$ 的响应面 (a) 及等高线图 (b)

Fig. 2 Response surface plot (a) and contour plot (b) of $E = f(A, B)$

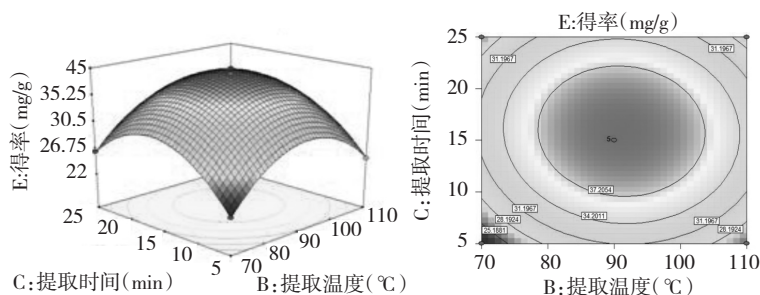


图3 $E = f(A, C)$ 的响应面 (a) 及等高线图 (b)

Fig. 3 Response surface plot (a) and contour plot (b) of $E = f(A, C)$

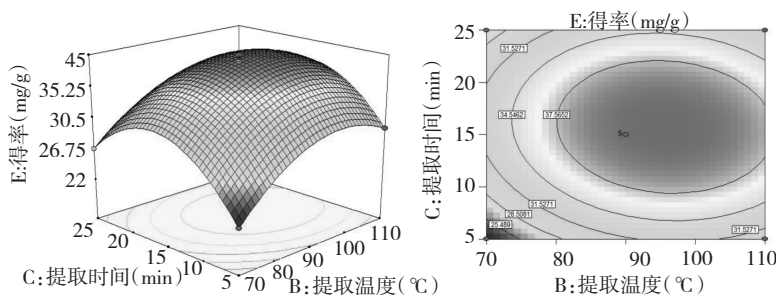


图4 $E = f(B, C)$ 的响应面 (a) 及等高线图 (b)

Fig. 4 Response surface plot (a) and contour plot (b) of $E = f(B, C)$

陡,说明此时 A、B、C 对白藜芦醇和白藜芦醇苷的总提取得率影响较为显著,但当 A、B、C 取值较大时,效应面曲线较平缓,此时 A、B、C 对 E 影响较小。

分析图 2b~4b 可知,当 A、B、C 取值较小时,等高线密度大;当 A、B、C 取值较大时,等高线密度较小,说明 A、B、C 取值小时,对白藜芦醇和白藜芦醇苷的总提取得率影响较为显著,与响应面规律相同。同时,三个等高线图均呈明显的椭圆形,说明乙醇浓度(A)、提取温度(B)和提取时间(C)三因素之间的交互作用均显著,与方差分析结果一致。

经过 Box-Behnken 设计优化提取条件,得到最佳的提取工艺参数为:乙醇浓度 51%,提取温度 96°C,提取时间 16 min,此时白藜芦醇和白藜芦醇苷总

提取率理论值可达到 40.60 mg/g。

2.5.3 验证实验

在此最佳工艺条件下,进行 3 次平行提取,测得白藜芦醇和白藜芦醇苷平均总提取率为 40.43 mg/g。表明预测值与实际值之间具有很好的拟合性,从而进一步证明响应面结果的可靠性。

3 结论

本研究采用 3 种提取方法提取青海栽培何首乌中的白藜芦醇和白藜芦醇苷,结果 ASE 的提取效果最佳。利用响应面法优化了 ASE 的提取工艺条件,优化的最佳组合条件为:乙醇浓度 51%,提取温度 96°C、提取时间 16 min。实验结果表明:响应面模型拟合

程度高 实验误差小 具有实际应用价值 为白藜芦醇和白藜芦醇苷的提取开发利用提供了技术支撑。

参考文献

- Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010. Vol I, 164.
- Jang M, Cai L, Udeani GO *et al.* Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a nature product derived from grapes. *Science*, 1997, 275: 218-220.
- Wang Z(王征), Luo ZM(罗泽民), Deng LW(邓林伟). The pharmacologic mechanism and synthesis of resveratrol. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发) 2003, 15: 178-181.
- Zhang JC(张建超), Gao XZ(高新周), Yi DL(易德亮). Study on extraction process of polydatin in *Polygonum cuspidatum*. *Chin Tradit Pat Med*(中成药) 2003, 14(4): 3-4.
- Chen YB(陈易彬), Chen K(陈奎). Study on extraction of resveratrol. *Food Sci*(食品科学) 2007, 28: 197-199.
- Richter BE, Jones BA, Ezzell JL, *et al.* Accelerated solvent extraction: a technique for sample preparation. *Anal Chem*, 1996, 68: 1033-1039.
- Mou SF(牟世芬), Liu YJ(刘勇建). The principle and application of accelerated solvent extraction. *Mod Sci Inst*(现代科学仪器) 2001, 3: 18-20.
- Dhanabal SP *et al.* Hypoglycemic activity of *Nymphaea stellata* leaves ethanolic extract in alloxan induced diabetic rats. *Fitoterapia* 2007, 78: 288-291.
- Bhandarkar M, Khan A. Antihepatotoxic effect of *Nymphaea stellata* Willd. against carbon tetrachloride-induced hepatic damage in albino rats. *J Ethnopharmacol* 2004, 91: 61-64.
- Khan N, Sultana S. Anticarcinogenic effect of *Nymphaea alba* against oxidative damage, hyperproliferative response and renal carcinogenesis in Wistar rats. *Mol Cell Biochem* 2005, 271: 1-11.
- Rajagopal K, Sasikala K. Antidiabetic activity of hydro-ethanolic extracts of *Nymphaea Stellata* flowers in normal and alloxan induced diabetic rats. *Afr J Pharm Pharmacol* 2008, 2: 173-178.
- Odintsova, NVSM, Kirov MI. Gorki, Hypotensive effects of white water lily. *Farmakologiya i Toksikologiya* (Moscow). 1960, 23: 132-135. Bing SJ, *et al.* Geraniin down regulates gamma radiation-induced apoptosis by suppressing DNA damage. *Food Chem Toxicol* 2013, 57: 147-153.
- Kang KA *et al.* Radioprotective effect of geraniin via the inhibition of apoptosis triggered by gamma-radiation-induced oxidative stress. *Cell Biol Toxicol* 2011, 27: 83-94.
- Bing SJ, *et al.* 1, 2, 3, 4, 6-penta-O-galloyl-beta-D-glucose protects splenocytes against radiation-induced apoptosis in murine splenocytes. *Biol Pharm Bull* 2010, 33: 1122-1127.
- Saleem A *et al.* Pihlaja K. Total phenolics concentration and antioxidant potential of extracts of medicinal plants of Pakistan. *Z Naturforsch* 2001, 56: 973-978.
- Behera SK *et al.* Anthelmintic activity of rhizomes of *Nymphaea rubra* Linn. *Anc Sci Life* 2010, 29: 33-36.

(上接第 147 页)