

虎杖中白藜芦醇和虎杖苷的提取工艺研究

张玉千, 张 宇, 龚赛男, 许 瑾, 杨阳春

(南京师范大学泰州学院化学与生物工程学院, 江苏 泰州 225300)

[摘要] 研究同时提取虎杖中虎杖苷和白藜芦醇的最佳工艺. 采用正交设计法优选提取分离条件, 借助 HPLC 法测定虎杖苷和白藜芦醇的含量. 以乙醇为提取溶剂, 超声波辅助提取, 最优条件为: 80% 乙醇, 料液比为 1:20, 提取温度为 60 ℃, 提取时间为 40 min, 虎杖苷和白藜芦醇的提取含量分别为 2.42% 和 0.41%. 研究表明, 所选工艺稳定性好, 操作简单.

[关键词] 虎杖苷, 白藜芦醇, 提取, 正交设计

[中图分类号] Q939.97 [文献标志码] A [文章编号] 1672-1292(2020)02-0088-05

Study on Extraction Technology of Resveratrol and Glucoside from Polygonum Cuspidatum

Zhang Yuqian, Zhang Yu, Gong Sainan, Xu Jin, Yang Yangchun

(School of Chemistry and Bioengineering, Nanjing Normal University Taizhou College, Taizhou 225300, China)

Abstract: The optimum technology of simultaneously extracting polygonin and resveratrol from polygonum cuspidatum is studied. Orthogonal design method is used to optimize the extraction and separation conditions, and HPLC method is used to determine their contents. The ethanol as extraction solvent, ultrasonic assisted extraction, the optimum condition is 80% ethanol, and solid-liquid ratio of 1:20, extraction temperature of 60 ℃, extracting time for 40 min, giant knotweed glycosides and the extraction of resveratrol content of 2.42% and 0.41% respectively. A conclusion is conducted that the selected process is good in stability, and simple in operation.

Key words: polydatin, resveratrol, extraction, orthogonal design

虎杖为蓼科多年生草本植物, 中药虎杖取自植物虎杖的干燥根茎, 主要用于关节痹痛、湿热黄疸、经闭、咳嗽痰多、水火烫伤等症状^[1-2]. 虎杖在我国大部分地区如江苏、浙江、山东、江西、福建、河南、陕西、湖北等地都有分布.

白藜芦醇(Resveratrol, Res)和虎杖苷(Polydatin, PD)是虎杖中的主要有效成分, 白藜芦醇是植物体内产生的天然二苯乙烯类多酚物质^[3], 具有抗癌、降血脂、抗氧化等作用^[4-5], 为继紫杉醇之后又一新的绿色抗癌药物, 并且对艾滋病毒有明显的抑制作用^[6-7]. 目前对白藜芦醇的提取工艺研究较多^[8-15], 但虎杖苷的含量较高, 且具有一定的生物活性. 本实验在提取白藜芦醇的同时考虑到对虎杖苷的提取, 采用正交试验法, 以乙醇为提取溶剂, 辅助以超声提取装置, 对白藜芦醇和虎杖苷的提取工艺参数进行优化, 为虎杖的工业化应用提取参考依据.

1 材料与设备

1.1 材料

原料: 虎杖原料采自江苏宝华山

试剂: 乙腈(HPLC级), 甲醇(HPLC级), 乙醇(AR级), 白藜芦醇苷、白藜芦醇对照品: 纯度 98%, 购于西安华翠生物技术有限公司.

收稿日期: 2019-04-15.

基金项目: 江苏省高校自然科学基金项目(16KJB180017)、2019 江苏省大学生实践创新训练项目、特色植物资源天然产物创新产品研发应用项目(NY-011-2015).

通讯作者: 张玉千, 硕士, 讲师, 研究方向: 天然产物的分离纯化及微生物转化研究. E-mail: zqwl2000@163.com

1.2 仪器与设备

KQ-100DE 型数控超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司);FA1004 电子分析天平(上海天平仪器厂);HH-2 数显恒温水浴锅(常州国华实验仪器厂);Eppendorf 离心机(Eppendorf Centrifuge 5415D);安捷伦 1260 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司)。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱:ODS-C18 柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相:甲醇-水(50-50);流速:0.75 mL/min;测定波长:303 nm;柱温:室温。

2.2 对照品的配制

分别称取白藜芦醇对照品 10.003 2 mg 和虎杖苷对照品 10.001 3 mg. 分别将对照品用甲醇定容于 25 mL 容量瓶中. 取适量对照品溶液配成系列浓度,分别进行 HPLC 检测,以峰面积为纵坐标,以浓度为横坐标绘制标准曲线。

2.3 供试样品溶液的测定

将虎杖干燥至恒重,用中药粉碎机制成粉末,过 40 目筛,储存备用,精密称取一定量的虎杖,按一定的料液比加入适量一定浓度的提取溶剂,超声提取,将超声提取的料液,离心,取上清,过滤,HPLC 检测。

2.3.1 乙醇浓度的影响

准确称取 10.0 g 虎杖粉末平均分成 5 份,分别加入到浓度 50%、60%、70%、80%、95%的乙醇溶液,在 50 ℃ 的温度下,pH 值为 6.0,料液比为 1:20 的情况下进行超声提取 40 min。

2.3.2 料液比的影响

准确称取 10.0 g 虎杖粉末平均分成 5 份,加入到 80%乙醇溶液,在 50 ℃ 温度下,pH 值为 6.0,料液比分别为 1:5、1:10、1:15、1:20、1:25 的情况下进行超声提取 40 min。

2.3.3 超声温度的影响

准确称取 10.0 g 虎杖粉末平均分成 5 份,加入到浓度为 80%的乙醇溶液中,分别在 30 ℃、40 ℃、50 ℃、60 ℃、70 ℃ 的温度下,pH 值为 6.0,料液比为 1:20 的情况下进行超声提取 40 min。

2.3.4 超声时间的影响

准确称取 10.0 g 虎杖粉末平均分成 5 份,加入到浓度为 80%的乙醇溶液中,在 50 ℃ 的温度下,pH 值为 6.0,料液比为 1:20 的情况下分别进行超声提取 20 min、30 min、40 min、50 min、60 min、70 min。

2.3.5 正交实验

通过单因素实验考察了影响白藜芦醇和虎杖苷提取含量的各个因素,在此基础上,本实验选取溶剂浓度(%)、料液比、提取时间(min)以及提取温度 4 个因素,每个因素选取 3 个水平进行正交设计实验,考察不同因素水平对提取含量的影响,优选最佳提取水平。

3 结果与讨论

提取溶剂、溶剂浓度、提取温度、提取时间、料液比、pH 值是影响白藜芦醇和虎杖苷提取率的重要因素,不同因素对提取率的影响不同,通过单因素实验考察每个因素的重要性,确定各因素水平的设定范围。

3.1 乙醇浓度的确定

不同的提取溶剂对各种成分的溶解性不同,不同浓度的溶剂得到的提取液的成分也不同. 相对于其他提取溶剂,乙醇提取效果好,价格低廉,不同浓度的乙醇溶液极性不同提取效果不同. 由图 1 可见,乙醇浓度为 50%时,提取液中白藜芦醇的含量较低,随着乙醇浓度的增加,白藜芦醇和虎杖苷的提取含量逐渐增加. 虎杖苷和白藜芦醇分别在 70%乙醇和

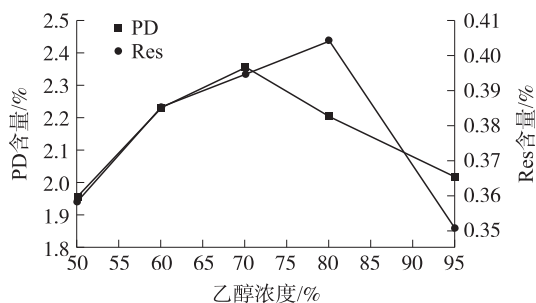


图 1 乙醇浓度对提取含量的影响

Fig. 1 Effect of different concentration of ethanol on the extraction rate

80%乙醇时提取含量达到最高,随后白藜芦醇和虎杖苷的提取含量逐渐降低,可能是虎杖粉末在高浓度的乙醇中不易溶胀,不利于溶剂的扩散,导致提取含量降低. 虽然白藜芦醇和虎杖苷的最大提取含量时乙醇浓度有所不同,但 75%的乙醇对虎杖苷和白藜芦醇提取含量均较高. 因此宜选用 75%乙醇作为提取溶剂.

3.2 料液比的确定

料液比需要根据原材料的质地、成分及在植物体内的存在形式而定,料液比太小,提取率低;料液比太大,造成浪费,且后续浓缩费时,提高生产成本. 由图 2 可见,随料液比的增加,虎杖苷和白藜芦醇的提取含量逐渐增加,在料液比大于 1:15 时,虎杖苷和白藜芦醇的提取含量略有波动,但基本保持不变,综合考虑,料液比以 1:15 为宜.

3.3 提取温度的确定

温度是天然产物提取的一个重要影响因素,适当的提高温度可以提高溶出率,温度过高可能导致热敏性成分降解或异构化. 白藜芦醇分子中存在多个羟基,稳定性差,容易被氧化. 由图 3 可见,随着提取温度不断增高,虎杖苷和白藜芦醇的提取含量逐渐增大. 由于虎杖苷和白藜芦醇在溶液中的热稳定性都很差,提取温度大于 50 ℃,虎杖苷和白藜芦醇的提取含量均呈下降的趋势. 提取温度为 50 ℃时,白藜芦醇的提取含量为 0.48%,虎杖苷提取含量为 2.45%. 综合考虑,提取温度选为 50 ℃较为合适.

3.4 提取时间的确定

从目标产物的生物活性及节约资源方面考虑,若时间过短,则提取不够充分,目标产物产量过低;若超声提取时间过长,则白藜芦醇易分解,生产成本提高. 由图 4 可见,随着提取时间的不断增加,虎杖苷和白藜芦醇的提取含量均呈现先增再降的趋势. 提取时间为 40 min 时,虎杖苷和白藜芦醇的提取含量达到最高,分别达到 2.38%和 0.35%,所以提取时间宜选为 40 min.

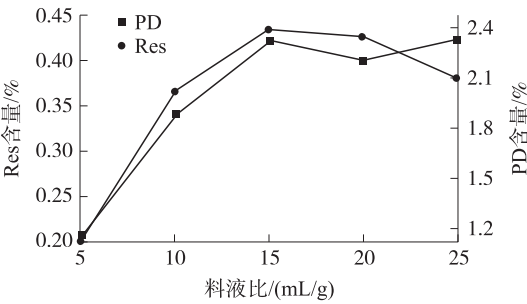


图 2 料液比对提取含量的影响

Fig. 2 Effect of different ratio of solid to liquid on the extraction rate

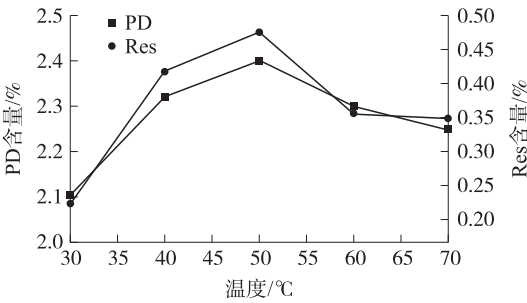


图 3 温度对提取含量的影响

Fig. 3 Effect of different extraction temperature on the extraction rate

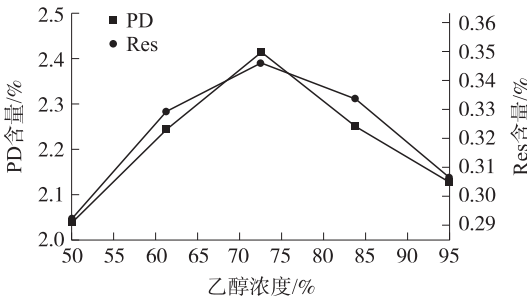


图 4 提取时间对提取含量的影响

Fig. 4 Effect of different distilled time on the extraction rate

3.5 正交试验

记浓度、料液比、温度、时间分别为 A、B、C、D. 因素水平表及正交设计试验安排见表 1、表 2 和表 3. 通过表 2 对比几种因素对虎杖苷提取效果的影响,可见对虎杖苷影响的大小关系为 B>A>D>C. 即影响最大的为料液比,其次为提取溶剂的浓度和提取时间,影响最小的为提取温度,最优水平为 A3、B3、C3、D2. 由表 3 可知,对 Res 影响的大小关系为 B>D>C>A. 即影响最大的为料液比,其次为提取时间和提取温度,提取溶剂的浓度的影响最小,最优水平为 A3、B3、C3、D3.

各因素对 PD 和 Res 提取含量的影响大小不同,但因素 A、B、C 所取的水平相同为 A3、B3、C3,只有 D 不同. 取 D2 时,PD 提取含量较其他两个水平高,但取 D3 时,Res 的提取含量较高,本着经济节能的原则,选取 D2. 综合以上分析,同时提取 PD 和 Res 的最优提取条件为 A3、B3、C3、D2,即提取溶剂为 80%的乙醇,料液比

表 1 因素与水平

Table 1 Factors and levels

水平	因素			
	浓度 A/%	料液比 B/(mL/g)	温度 C/℃	时间 D/min
1	70	10	40	30
2	75	15	50	40
3	80	20	60	50

为 1:20,超声提取温度为 60 ℃,超声提取时间为 40 min.

表 2 L9(34)正交试验设计与虎杖苷提取结果分析

Table 2 L9(34) Orthogonal test design and analysis of extraction results of polydatin

项目	浓度 A/%	料液比 B/(mL/g)	温度 C/℃	时间 D/min	含量/%
1	1	1	1	1	1.73
2	1	2	2	2	2.23
3	1	3	3	3	2.33
4	2	1	2	3	2.07
5	2	2	3	1	2.22
6	2	3	1	2	2.37
7	3	1	3	2	2.20
8	3	2	1	3	2.33
9	3	3	2	1	2.31
K ₁	6.29	6.00	6.43	6.26	
K ₂	6.66	6.78	6.61	6.80	
K ₃	6.84	7.01	6.75	6.73	
k ₁	2.097	2.000	2.143	2.087	
k ₂	2.220	2.260	2.203	2.267	
k ₃	2.280	2.337	2.250	2.243	
R	0.183	0.337	0.107	0.180	

注:K 值表示各因素同一水平的虎杖苷含量之和;k 值表示各因素同一水平的虎杖苷含量平均值;R 值决定因素对试验结果影响的大小.

表 3 L9(34)正交试验设计与白藜芦醇提取结果分析

Table 3 L9(34) Orthogonal test design and resveratrol extraction results analysis

项目	浓度 A/%	料液比 B/(mL/g)	温度 C/℃	时间 D/min	含量/%
1	1	1	1	1	0.26
2	1	2	2	2	0.33
3	1	3	3	3	0.38
4	2	1	2	3	0.30
5	2	2	3	1	0.33
6	2	3	1	2	0.36
7	3	1	3	2	0.32
8	3	2	1	3	0.34
9	3	3	2	1	0.35
K ₁	0.97	0.88	0.96	0.94	
K ₂	0.99	1.00	0.98	1.01	
K ₃	1.01	1.09	1.03	1.02	
k ₁	0.323	0.293	0.320	0.313	
k ₂	0.330	0.333	0.327	0.337	
k ₃	0.337	0.363	0.343	0.340	
R	0.014	0.070	0.023	0.027	

注:K 值表示各因素同一水平的白藜芦醇含量之和;k 值表示各因素同一水平的白藜芦醇含量平均值;R 值决定因素对试验结果影响的大小.

3.6 验证实验

为确定提取工艺的优劣,按方案 A3、B3、C3、D2 进行 3 批重复验证实验,结果表明,虎杖苷的平均含量为 2.42%,白藜芦醇的平均含量为 0.41%,均高于正交实验表中的 9 个实验,从而表明利用 A3、B3、C3、D2 工艺条件从虎杖中同时提取白藜芦醇和虎杖苷具有良好的稳定性.

4 结论

本实验以虎杖为原料同时提取虎杖苷和白藜芦醇,通过正交试验考察了提取溶剂浓度、料液比、提取温度和提取时间对提取的影响. 对白藜芦醇和虎杖苷提取含量影响最大的为料液比,其次为提取溶剂的浓度和超声时间,影响最小的为提取温度,同时确定了其最优水平为 A3、B3、C3、D2,即乙醇浓度为 80%,料液比为 1:20,提取温度 60 ℃,提取时间 40 min. 利用最优工艺进行 3 次重复验证实验,虎杖苷和白藜芦醇的平均含量分别为 2.42%、0.41%,均高于正交实验表中的 9 个实验,提取率高,工艺稳定.

[参考文献](References)

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中国药典[M]. 北京:化学工业出版社,1995.
- [2] 薛岚. 中药虎杖的药理研究进展[J]. 中国中药杂志,2000,25(11):651-653.
- [3] 田天丽. 微生物发酵转化虎杖的研究[D]. 成都:四川大学,2007.
- [4] AZIZ M H, NIHAL M, FU V X. Resveratrol-caused apoptosis of human prostate carcinoma LNCaP cells is mediated via modulation of phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt pathway and Bcl-2 family proteins[J]. Molecular Cancer Therapeutics, 2006, 5(5): 1335-1341.
- [5] HARPER C E, PATE B B. Resveratrol suppresses prostate cancer progression in transgenic mice[J]. Carcinogenesis, 2007, 28(9): 1946-1953.
- [6] 孙景然, 邓炳楠, 姚晨, 等. 白藜芦醇的生理功能及其在高原医学领域的应用前景[J]. 解放军预防医学杂志, 2018, 36(3): 414-416.
- [7] TABESHPOUR J, MEHRI S, SHAEBANI B F, et al. Protective effects of Vitis vinifera (grapes) and one of its biologically active constituents, resveratrol, against natural and chemical toxicities: a comprehensive review[J]. Phytotherapy Research, 2018, 32(11): 2164-2190.
- [8] 周焕霞, 秦杰, 文连奎. 微波辅助提取花生红衣中白藜芦醇工艺的研究[J]. 农产品加工(学刊), 2010, 6(2): 26-29.
- [9] 张青松, 李胜, 方艳, 等. CO₂超临界萃取葡萄皮渣中白藜芦醇的研究[J]. 甘肃农业大学学报, 2009, 44(6): 128-131.
- [10] 郑可利, 郑小林, 李凤兰. 正交法研究虎杖白藜芦醇提取工艺[J]. 三明学院学报, 2008, 25(2): 176-178.
- [11] 李胜华, 伍贤进. 超声波提取虎杖中白藜芦醇的优化工艺研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(7): 162-164.
- [12] 兰天路, 朱宏吉, 李少白. 纤维素酶-微波提取虎杖中白藜芦醇的工艺[J]. 化学工业与工程, 2008, 25(5): 394-398.
- [13] 邓梦茹, 刘韶, 朱周颀. 酶法提取虎杖中的白藜芦醇[J]. 中南药学, 2011, 9(9): 669-671.
- [14] 夏海武, 战克勤, 许娜, 等. 正交设计法优选虎杖中白藜芦醇水提取工艺[J]. 中国医院药学杂志, 2011, 31(2): 123-125.
- [15] OKUDA T, YOKOTSUKA K. Trans-resveratrol concentrations in berry skins and wines from grapes grown in Japan[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 1996, 47(1): 93-99.

[责任编辑:陈 庆]

(上接第43页)

- [7] 田培根, 肖曦, 丁若星, 等. 自治型微电网群多元复合储能系统容量配置方法[J]. 电力系统自动化, 2013, 37(1): 168-173.
- [8] 桑丙玉, 王德顺, 杨波, 等. 平滑新能源输出波动的储能优化配置方法[J]. 中国电机工程学报, 2014, 34(22): 3700-3706.
- [9] 王成山, 于波, 肖峻, 等. 平滑可再生能源发电系统输出波动的储能系统容量优化方法[J]. 中国电机工程学报, 2012, 32(16): 1-8.
- [10] 韩涛, 卢继平, 乔梁, 等. 大型并网风电场储能容量优化方案[J]. 电网技术, 2010, 34(1): 169-173.
- [11] 兑潇玮, 朱桂萍, 刘艳章. 考虑预测误差的风电场储能配置优化方法[J]. 电网技术, 2017, 41(2): 434-439.
- [12] 谢石骁, 杨莉, 李丽娜. 基于机会约束规划的混合储能优化配置方法[J]. 电网技术, 2012, 36(5): 79-84.
- [13] 杨玉青, 牛利勇, 田立亭, 等. 考虑负荷优化控制的区域配电网储能配置[J]. 电网技术, 2015, 39(4): 1019-1025.
- [14] 李建林, 郭斌琪, 牛萌, 等. 风光储系统储能容量优化配置策略[J]. 电工技术学报, 2018, 33(6): 1189-1196.
- [15] 陶琼, 桑丙玉, 叶季蕾, 等. 高光伏渗透率配电网中分布式储能系统的优化配置方法[J]. 高电压技术, 2016, 42(7): 2158-2165.

[责任编辑:陈 庆]