

虎杖中白藜芦醇提取工艺研究

叶秋雄¹, 黄菁²

(1. 广东省生产许可证审查服务中心, 广东广州 510220) (2. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

摘要: 白藜芦醇是一种重要的活性天然产物, 本研究以虎杖为原料, 研究了白藜芦醇的溶剂法和酶解法提取工艺, 考察了料液比、提取时间、提取温度、pH、酶加入量等对提取得率的影响。通过正交实验优化了溶剂法和酶解法的最佳工艺参数。实验结果表明: 溶剂法优化工艺为: pH 5, 料液比 1:65, 提取温度是 60 °C, 提取时间 2h; 酶解法优化工艺为: pH 6, 料液比 1:40, 酶解温度是 60 °C, 酶解时间 2 h, 二者得率分别是: 0.496% 和 0.942%。酶解法的得率大约是溶剂法的 2 倍, 可以作为虎杖中白藜芦醇提取的优选方法。

关键词: 溶剂法; 酶解法; 白藜芦醇; 虎杖

文章编号: 1673-9078(2013)6-1324-1327

Extraction of Resveratrol from *Polygonum cuspidatum*

YE Qiu-xiong¹, HUANG Wei²

(1. Guangdong Province Production License Examination Service Center, Guangzhou 610642, China)

(2. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 610642, China)

Abstract: Resveratrol is an important natural compound with bioactivity. In this experiment, *Polygonum cuspidatum* was used as raw materials for extraction process of resveratrol. Effects of solid-liquid ratio, raw material particle size, ethanol concentration, extraction time, extraction temperature were investigated on the extraction rate. The orthogonal test was used to determine the optimum conditions with solvent and enzymatic extraction of resveratrol in *Polygonum cuspidatum*. The results showed that the best solvent extraction conditions were pH 5, solid-liquid ratio 1:65 (g/mL), temperature 60 °C and extraction time 120 min; The optimum conditions for enzymatic extraction were pH 6.0, solid-liquid ratio 1:40 (g/mL), hydrolysis temperature 60 °C, and hydrolysis time 120 min. The results showed that, the yields of solvent and enzymatic extraction were 0.496% and 0.942%, respectively. Compared with solvent method, extraction yield of resveratrol by using enzymatic method was increased by about 2 times. Enzymatic method can be used as the preferred method of extraction of resveratrol.

Key words: solvent method; enzymolysis; resveratrol; *Polygonum cuspidatum*

虎杖(*Polygonum cuspidatum* sieb)为蓼科蓼属多年生草本植物的干燥根茎, 主要含有蒽醌类、芪类、水溶性多糖和鞣质等成份^[1]。白藜芦醇在植物中分布广, 目前至少已经在 21 个科、31 个属、70 余种植物中发现了白藜芦醇, 是虎杖的主要功效成分。研究表明: 它对心肌细胞、血管平滑肌细胞、对改善微循环等有显著作用; 此外白藜芦醇能减轻多种因素造成的组织器官损伤, 具有保护肝脏、抑制血小板聚集、镇咳平喘、抗菌、抗病毒、降血脂及抗脂质过氧化等作用^[2-4]。生物酶法越来越多的应用于中药有效成分提取, 它具有提取效率高, 不易造成有限资源浪费和污染的特点, 成为现代提取方法的研究热点^[5-10]。

收稿日期: 2012-12-20

基金项目: 高新技术产业化项目(2009B011300004)

作者简介: 叶秋雄(1983-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与质量研究

通讯作者: 黄菁(1967-), 女, 副教授, 研究方向: 食品加工与包装

目前提取白藜芦醇主要以虎杖为原料, 常用的提取方法是溶剂提取法、碱提取法、酶提取法、微波提取以及超声波提取。本实验通过比较酶法提取和溶剂提取两种方法, 选出白藜芦醇制备的最优方法, 提高白藜芦醇的得率, 为白藜芦醇的进一步工业化生产提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

白藜芦醇对照品纯度 99%, 国家药品生物制品鉴定所; 虎杖块茎, 湖南桑植县八大公山, 粉碎后过筛; 纤维素酶, 上海伯奥生物科技有限公司; 乙醇为分析纯, 广州化学试剂厂。

1.1.2 仪器与设备

TU-180 紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; 旋转蒸发器, 上海虹析电子仪器仪表

有限公司; SHZ-III循环水真空泵, 上海锦华层析设备厂; 便携式 pH 计, pHB-5 上海伟业仪器厂; 电热恒温水浴锅, 北京市长风仪器仪表公司; 分析天平, 上海天平仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 原料处理

将虎杖块茎粉碎, 并筛分为一定粒径(60目)的粉末。

1.2.2 溶剂法提取白藜芦醇

准确称取粒径 60 目虎杖粉末 1.00 g, 置于 100 mL 容量瓶中, 按一定的料液比加入 60%乙醇溶液, 调节样品溶液 pH 后密封, 称重。放到一定温度水浴锅中水浴一定时间。放置冷却、补重、过滤, 稀释后, 以提取溶剂为参比, 在紫外分光光度计上测定滤液在波长 331 nm、333 nm 的吸光度, 计算提取得率。

1.2.3 酶解法提取白藜芦醇

准确称取粒径 60 目虎杖粉末 1.00 g, 置于 100 mL 容量瓶中, 按一定的料液比加入 60%乙醇溶液, 加入不同量的纤维素酶, 调节样品溶液 pH 后密封, 称重。放到一定温度水浴锅中酶解一定时间。放置冷却、补重、过滤, 稀释后, 以提取溶剂为参比, 在紫外分光光度计上测定滤液在波长 331 nm、333 nm 的吸光度, 计算提取得率。

1.2.4 白藜芦醇的测定与含量计算

1.2.4.1 白藜芦醇标准曲线的绘制

精确称取白藜芦醇对照品 5.0 mg, 用乙醇溶解于 50 mL 容量瓶中, 稀释刻度、摇匀, 分别吸取此液 0 mL、0.1 mL、0.3 mL、0.5 mL、0.7 mL 于 10 mL 容量瓶中, 加乙醇稀释到刻度、摇匀, 所得浓度为 0.0 μg/mL、1.0 μg/mL、3.0 μg/mL、5.0 μg/mL、7.0 μg/mL 的溶液, 以乙醇为参比, 在紫外分光光度计上测定各溶液在波长 331 nm、333 nm 的吸光度, 以 $\Delta A(A_{331}-A_{333})$ 对浓度作标准曲线及回归方程。

1.2.4.2 提取得率的计算

在波长 331 nm、333 nm 处进行比色测定其吸光度后作差值 $\Delta A(A_{331}-A_{333})$, 由回归方程计算白藜芦醇浓度, 再由稀释倍数计算出提取液中白藜芦醇的含量。白藜芦醇的提取得率计算公式如下:

$$\text{白藜芦醇得率} / \% = \frac{\text{白藜芦醇含量}(g)}{\text{虎杖粉末重量}(g)} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 白藜芦醇标准曲线的绘制

对实验数据进行相关分析, 白藜芦醇浓度和吸光度差值的线性回归方程为: $y=0.0072x+0.0002$ (y 为吸

光度差值, x 为浓度 μg/mL), $R^2=0.9995$, 线性范围: 0~7 μg/mL。如图 1 所示。

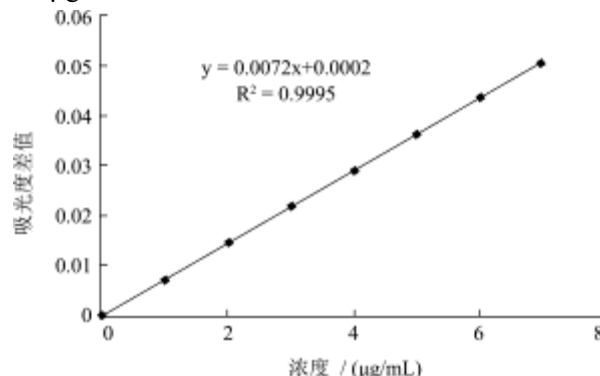


图 1 白藜芦醇的标准曲线

Fig.1 Standard curve of resveratrol

2.2 溶剂法提取工艺的优化

2.2.1 单因素试验

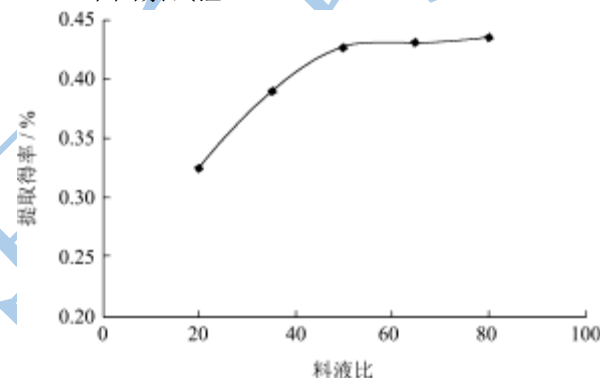


图 2 料液比对白藜芦醇提取得率的影响

Fig.2 Influence of solid-liquid ratio on the extraction yield of resveratrol

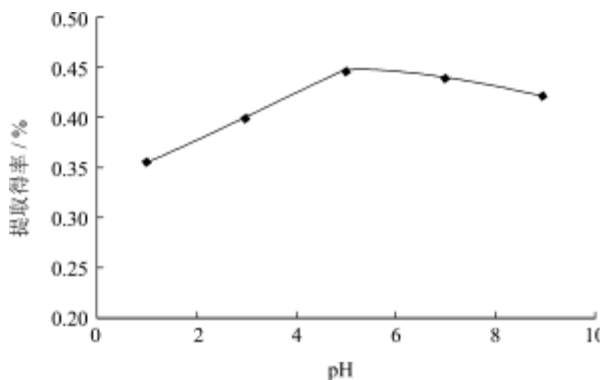


图 3 pH 对白藜芦醇提取得率的影响

Fig.3 Influence of pH on the extraction yield of resveratrol

准确称取粒径 60 目虎杖粉末 1.00 g, 置于 100 mL 容量瓶中, 加入 60%乙醇, 提取温度 50 °C、提取时间 2 h, 确定适宜的料液比(实验设计料液比为 1:20、1:35、1:50、1:65、1:80 进行比较)。由图 2 可确定料液比为 1:50, 然后分别进行 pH、提取温度、提取时间单因素试验(图 3~图 5), 试验结果表明, 料液比、pH、提取温度、提取时间对白藜芦醇提取得率有显著

影响, 所以确定这四个因素进行正交试验。

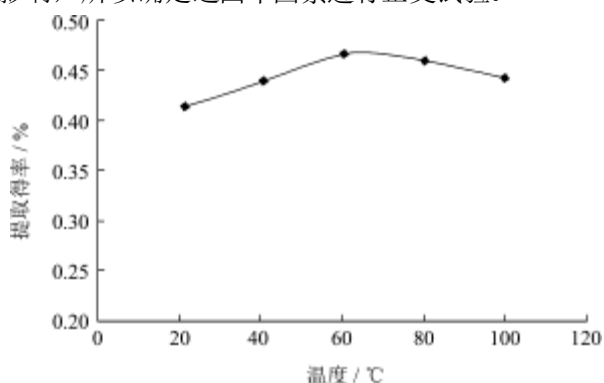


图4 温度对白藜芦醇提取得率的影响

Fig.4 Influence of bath temperature on the extraction yield of

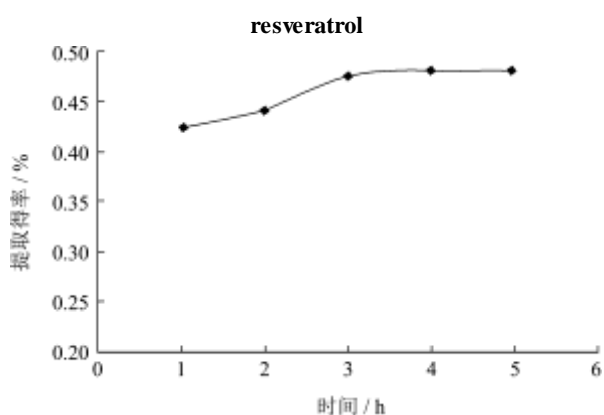


图5 时间对白藜芦醇提取得率的影响

Fig.5 Influence of time on the extraction yield of resveratrol

2.2.2 正交试验

表1 溶剂提取法正交试验结果

Table 1 Results of the orthogonal experiment for solvent extraction optimization

试验号	因素				提取率/%
	A (pH)	B (料液比)	C (提取温度/°C)	D (提取时间/h)	
1	1(3)	1(1:35)	1(40)	1(2)	0.391
2	1	2(1:50)	2(60)	2(3)	0.482
3	1	3(1:65)	3(80)	3(4)	0.455
4	2(5)	1	2	3	0.436
5	2	2	3	1	0.464
6	2	3	1	2	0.468
7	3(7)	1	3	2	0.357
8	3	2	1	3	0.361
9	3	3	2	1	0.462
K ₁	1.328	1.184	1.220	1.317	
K ₂	1.368	1.307	1.380	1.307	
K ₃	1.180	1.385	1.276	1.252	
k ₁	0.443	0.395	0.407	0.439	
k ₂	0.456	0.436	0.460	0.437	
k ₃	0.393	0.461	0.425	0.417	
R	0.063	0.066	0.053	0.022	

结合单因素的试验结果, 在单因素的基础上设计了以 pH、料液比、提取温度、提取时间为因素, 做四因素三水平的正交试验, 正交试验结果如表 1。

由表 1 可知提取虎杖中白藜芦醇的最佳工艺参数为: A₂B₃C₂D₁, 即 pH=5, 料液比 1:65, 提取温度是 60 °C, 提取时间 2 h 是溶剂法提取的最佳工艺条件。四因素中料液比对白藜芦醇提取得率影响最显著, 其次为 pH 值, 然后是提取温度, 提取时间影响最小。

2.3 溶剂提取法优化工艺的验证

准确称取粒径 60 目虎杖粉末 1.00 g, 各五份, 分别置于 100 mL 容量瓶中, 加入 60% 乙醇 65 mL, 调节 pH 为 5, 在 60 °C 水浴中提取 2 h。放置冷却、补重, 稀释后, 以 60% 乙醇为参比, 在紫外分光光度计上测定提取液在波长 331 nm、333 nm 的吸光度, 计算平均提取得率为 0.496%, RSD 为 3.3%。

2.4 酶解法提取工艺的优化

2.4.1 单因素试验

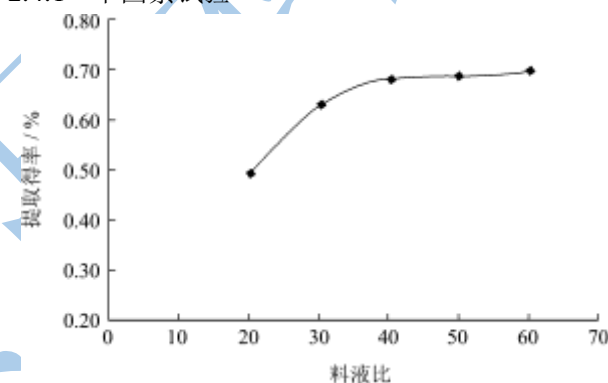


图6 料液比对白藜芦醇提取得率的影响

Fig.6 Influence of solid-liquid ratio on the extraction yield of

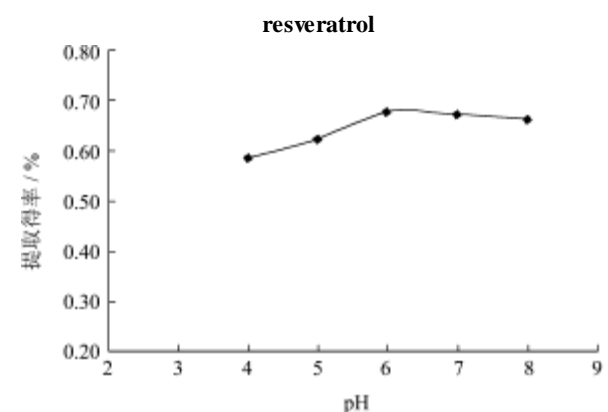


图7 pH 对白藜芦醇提取得率的影响

Fig.7 Influence of pH on the extraction yield of resveratrol

准确称取粒径 60 目虎杖粉末 1.00 g, 置于 100 mL 容量瓶中, 加入 60% 乙醇, 加入 10 mg 的纤维素酶, 提取温度 50 °C、提取时间 2 h, 确定适宜的料液比(实验设计料液比为 1:20、1:30、1:40、1:50、1:60 进行比较)。由图 6 可确定料液比为 1:40, 然后分别进行 pH、

酶解温度、酶解时间单因素试验, 试验结果表明, 料液比、pH、酶解温度、酶解时间对白藜芦醇提取得率有显著影响, 所以确定这四个因素进行正交试验。

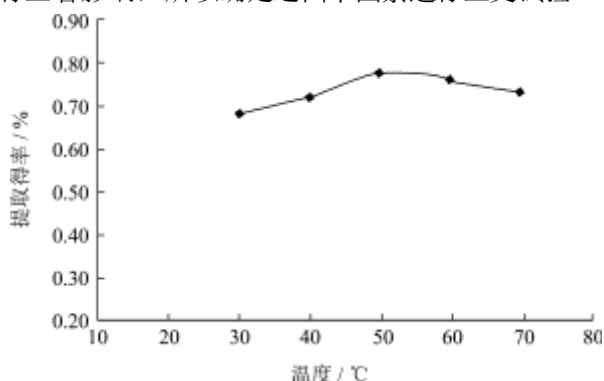


图8 酶解温度对白藜芦醇提取得率的影响

Fig.8 Influence of enzymatic temperature on the extraction yield of resveratrol

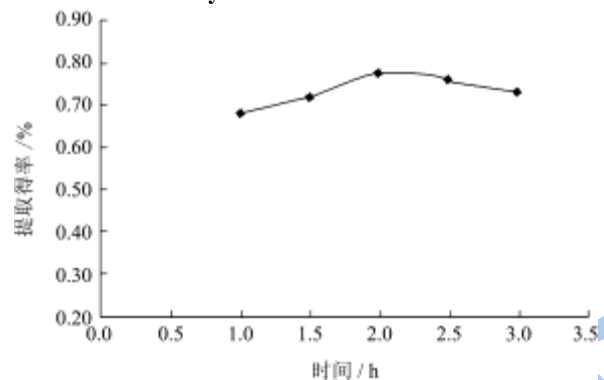


图9 酶解时间对白藜芦醇提取得率的影响

Fig.9 Influence of enzymatic time on the extraction yield of resveratrol

2.4.2 正交试验

结合单因素的试验结果, 在单因素的基础上设计了以 pH、料液比、酶解温度、酶解时间为因素, 做四因素三水平的正交试验, 正交试验结果如表 2。

由表 2 可知提取虎杖中白藜芦醇的最佳工艺参数为: A₂B₃C₃D₂, 即 pH=6, 料液比 1:40, 酶解温度是 60 °C, 酶解时间 2 h 是酶解法提取的最佳工艺条件。四因素中料液比对白藜芦醇提取得率影响最显著, 其次为 pH 值, 然后是酶解温度, 酶解时间影响最小。

2.5 酶解法优化工艺的验证

准确称取粒径 60 目虎杖粉末 1.00 g, 各五份, 分别置于 100 mL 容量瓶中, 加入 50% 乙醇 40 mL, 调节 pH 为 6, 在 60 °C 水浴中酶解 2 h。放置冷却、补重, 稀释后, 以 50% 乙醇为参比, 在紫外分光光度计上测定提取液在波长 331 nm、333 nm 的吸光度, 计算平均提取得率为 0.942%, RSD 为 2.5%。

表 2 酶解法正交试验结果

Table 2 Results of the orthogonal experiment for enzymatic

试验号	extraction 因素				提取率/%
	A (pH)	B (酶解时间/h)	C (酶解温度/°C)	D (料液比)	
1	1(5)	1(1)	1(40)	1(1:30)	0.496
2	1	2(1.5)	2(50)	2(1:40)	0.662
3	1	3(2)	3(60)	3(1:50)	0.619
4	2(6)	1	2	3	0.654
5	2	2	3	1	0.680
6	2	3	1	2	0.773
7	3(7)	1	3	2	0.801
8	3	2	1	3	0.619
9	3	3	2	1	0.676
K ₁	1.777	1.951	1.888	1.852	
K ₂	2.107	1.961	1.992	2.236	
K ₃	2.096	2.068	2.100	1.892	
k ₁	0.592	0.650	0.629	0.617	
k ₂	0.702	0.654	0.664	0.745	
k ₃	0.699	0.689	0.700	0.631	
R	0.110	0.039	0.071	0.128	

3 结论

3.1 在单因素试验的基础上, 通过正交试验, 确定了溶剂法提取白藜芦醇的最佳工艺条件为: pH=5, 料液比 1:65, 提取温度是 60 °C, 提取时间 2 h。酶解法提取白藜芦醇的得率是溶剂法的 2 倍左右, 最佳提取工艺为: pH=6, 料液比 1:40, 酶解温度是 60 °C, 酶解时间 2 h。由此可见, 酶解法比溶剂法提取得率有明显提高, 并且节约成本, 提高效率, 可以作为虎杖中白藜芦醇提取的优选方法。

3.2 经纤维素酶作用后, 虎杖中白藜芦醇得率得以提高归于两方面原因: 是植物细胞壁被破坏, 使内容物溶出率增加; 二是白藜芦醇苷在纤维素酶的作用下被转化成白藜芦醇。

参考文献

[1] 任彦荣, 吴洪斌. 白藜芦醇的检测手段及药理作用[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(2): 788-790

[2] GAO Shou-hong, YANG Shao-Lin, FAN Guo-rong. The research progress of piceid [J]. The Journal of Pharmaceutical Practice, 2005, 23(3): 145-147

[3] LIU Rui-yuan, XIE Yang. Research on extraction piceid from polygonum cuspidatum by absorption and desorption method [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2003, 14(8): 463-464

- [4] HAN Ji-ye, NING Deng-ke. Advancement in research of pharmacological functions of polygonum cuspidate [J]. China Pharmaceuticals, 2001, 10(8): 55-56
- [5] 宋宏新,传娟娟,刘静.虎杖中白藜芦醇的酶法制备[J].西北植物学报,2010,30(12):2550-2554
- [6] 赵鸿宾,陈华国,周欣,等.虎杖中白藜芦醇的提取工艺[J].华西药学杂志,2010,25(1):85-86
- [7] 李亚静,李瑞光.虎杖中白藜芦醇的提取工艺研究[J].洛阳理工学院学报,2009,19(4):8-11
- [8] 王艺璇,吴小强,郑建英.花生壳中提取白藜芦醇的工艺研究[J].华中师范大学学报,2012,46(3):307-310
- [9] 陈蓉蓉,姜华,蒲含林.酶解法制备白藜芦醇的工艺优化[J].农业机械,2011,32(5):63-66
- [10] 李易非,李多伟,许慧,等.酶解法提取虎杖中白藜芦醇的工艺研究[J].中成药,2009,31(9):1449-1451

现代食品科技