

星点设计-效应面法优化葡萄枝蔓中白藜芦醇的提取工艺

杨星星¹, 谢红旗¹, 李清明¹, 曾建国^{1,2,3*}, 熊兴耀^{1,2*}

(1.湖南农业大学 园艺园林学院, 湖南 长沙 410128; 2.作物种质创新与资源利用国家重点实验室, 湖南 长沙 410128; 3.湖南省中药提取工程研究中心, 湖南 长沙 410331)

摘要:用乙醇回流法从葡萄枝蔓中提取白藜芦醇,以乙醇体积分数(x_1)、回流时间(x_2)和溶媒比(x_3)为自变量,以白藜芦醇得率(y)为因变量,得二次回归方程 $y = -6.18639 + 0.18178x_1 - 0.012371x_2 + 0.12293x_3 + 0.000273x_1x_2 - 0.000545x_1x_3 - 0.000164x_2x_3 - 0.001178x_1^2 - 0.000042x_2^2 - 0.002998x_3^2$ ($r = 0.9361$, $P < 0.01$)。用星点设计-效应面法优化提取工艺条件,优化后的较佳提取工艺条件为乙醇体积分数 90.2%,提取时间 129.5 min,溶媒比 8.8,共提取 2 次。

关键词:葡萄枝蔓;白藜芦醇;提取工艺;星点设计;效应面优化法

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2012)03-0282-05

Optimization of extraction process of resveratrol from grapevine by central composite design and response surface method

YANG Xing-xing¹, XIE Hong-qi¹, LI Qing-ming¹, ZENG Jian-guo^{1,2,3*}, XIONG Xing-yao^{1,2*}

(1. College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Pre-State Key Laboratory for Germplasm Innovation and Resource Utilization, Changsha 410128, China; 3. Herb Extract Engineering Research Center of Hunan Province, Changsha 410331, China)

Abstract: Resveratrol was extracted from grapevine by ethanol reflux extraction, and the quadratic regression equation $y = -6.18639 + 0.18178x_1 - 0.012371x_2 + 0.12293x_3 + 0.000273x_1x_2 - 0.000545x_1x_3 - 0.000164x_2x_3 - 0.001178x_1^2 - 0.000042x_2^2 - 0.002998x_3^2$ ($r = 0.9361$, $P < 0.01$) was obtained by selecting the ethanol concentration (x_1), time for refluxing extraction (x_2) and ratio of solvent to raw material (x_3) as independent variables and the extraction rate of resveratrol as dependent variables. Then the extraction process was optimized using central composite design and response surface method. The optimal conditions of extraction process were as follows: extracted 2 times, 129.5 min for each extraction, with 90.2% ethanol and solvent to raw material ratio of 8.8 : 1.

Key words: grapevine; resveratrol; extraction process; central composite design; response surface method

葡萄(*Vitis vinifera* L.)的根、茎、叶、果实均可入药,具有补气血、利小便、解毒、消肿等功效^[1]。Sierra等^[2]发现葡萄枝条中含有反式白藜芦醇(trans-resveratrol)和葡萄素。杨敬芝等^[3]从刺葡萄地上部分分离得到白藜芦醇等7个芪化物。白藜芦醇(3,4',5-三羟基二苯乙烯)是含有芪类结构的非黄酮多酚化合物,具有抗氧化、抗癌、预防心血管疾病

等作用^[4]。目前国内多采取正交设计或均匀设计法优化植物中有效成分的提取工艺。这两种方法均采用线性数学模型,精度不高。星点设计(central composite design, CCD)是在析因设计的基础上,采用非线性数学模型拟合,复相关系数较高,于中心点进行的重复性试验可提高试验精度,预测值更接近于真实值,并且具有试验次数较少、可采用直观

收稿日期: 2012-03-02

基金项目: 湖南省科技计划项目(2010SK3005)

作者简介: 杨星星(1987—),男,湖南邵阳市人,硕士研究生,主要从事功能产品开发与评价研究, youngstars@163.com; *通信作者, xiongy@hunau.net, ginkgo@world-way.net

三维效应面进行数据处理与拟合等优点,已在药物提取和处方工艺的优化中应用^[5-10]。本试验中以葡萄栽种过程中废弃的葡萄枝蔓为原料,以白藜芦醇得率为指标,运用星点设计-效应面法优化白藜芦醇的提取工艺条件,旨在为白藜芦醇的工业化生产提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

葡萄枝蔓样品由湖南省中药提取工程研究中心提供。白藜芦醇对照品购自中国药品生物制品检定所(批号为111535-200502,纯度98%)。

1.2 主要试剂及仪器设备

甲醇、乙酸为色谱纯,其他试剂均为分析纯,所有试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

主要仪器:Waters 1525 型高效液相色谱仪,Waters 2998 工作站(美国沃特世公司);Mettler ML204 电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);数显恒温水浴锅(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司);高速中药粉碎机(浙江瑞安市永历机械制造有限公司);KQ-5200DB 台式数控超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.3 样品溶液中白藜芦醇得率的确定

1.3.1 对照品溶液和样品溶液的制备

对照品溶液的制备:精密称取白藜芦醇对照品10.5 mg,置于50 mL量瓶中,用甲醇溶解,稀释到刻度,摇匀。

样品溶液的制备:将葡萄枝蔓粉碎后,过孔径(850±29) μm 筛,精密称取葡萄枝蔓粉碎样5.0 g,用乙醇回流提取法提取,将提取液冷却至室温后5 000 r/min 离心15 min,取上清液,经0.45 μm 微孔滤膜抽滤,得供试品溶液。

1.3.2 标准曲线的制作

分别精密量取对照品溶液0.5、1.0、2.0、5.0、8.0、10.0 mL,置于10 mL容量瓶中,加入甲醇稀释至刻度,摇匀。按色谱条件进样检测。色谱条件为:色谱柱为Hypersil, BDS C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相为甲醇和1%乙酸水,梯度洗脱;流

速0.8 mL/min;柱温35 ℃;进样量5 μL;检测波长310 nm。以对照品质量浓度(μg/mL)为横坐标(x),以白藜芦醇色谱峰面积为纵坐标(y),绘制标准曲线。

1.3.3 精密度试验、稳定性试验和重复性试验

精密度试验:取同一对照品溶液,重复进样6次,按1.3.2中色谱条件进行测定,记录高效液相色谱图中白藜芦醇的峰面积。根据峰面积计算相对标准偏差。

稳定性试验:取同一供试品溶液,在溶液配制后0、2、4、8、12、24 h各进样5 μL,按1.3.2中色谱条件进行测定,记录高效液相色谱图中白藜芦醇的峰面积。根据峰面积计算相对标准偏差。

重复性试验:取同一批供试品6份,按1.3.2中色谱条件进行测定,记录高效液相色谱图中白藜芦醇的峰面积。根据峰面积计算相对标准偏差。

1.3.4 加样回收率测定

精密称取6份葡萄枝蔓粉碎样,每份3.0 g,分别加入白藜芦醇对照品5.0 mg,按样品溶液制备方法制备,按1.3.2中色谱条件进行测定。计算白藜芦醇的回收率及回收率相对标准偏差。

1.3.5 白藜芦醇含量的测定

精密吸取抽滤后的提取液5 μL,按1.3.2中色谱条件进行测定,每个样品进样3次,得样品中白藜芦醇含量。

根据样品溶液中白藜芦醇含量计算白藜芦醇得率。白藜芦醇得率=提取液白藜芦醇质量浓度(mg/mL)×提取液体积(mL)/样品质量(g)。

1.4 提取工艺的优化

采用星点设计-效应面法优化葡萄枝蔓中白藜芦醇的提取工艺。提取因素为乙醇体积分数、提取时间和溶媒比、提取次数。因提取次数为非连续变量,不能进行回归处理,结合预试验结果和工业生产实际,暂固定为2次。预试验中乙醇体积分数(x₁)、提取时间(x₂)和溶媒比(x₃)的值分别为65%~95%、50~150 min、5~15。按试验设计的统计学要求^[5]确定星点设计的因素与水平(表1)。

表1 星点设计的因素与水平

因素	水平				
	-1.732	-1	0	+1	+1.732
乙醇体积分数(x_1)	65	71.3	80	88.7	95
提取时间(x_2)	50	71.1	100	128.9	150
溶媒比(x_3)	5	7.1	10	12.9	15

以白藜芦醇得率(y)对乙醇体积分数(x_1)、提取时间(x_2)和溶媒比(x_3)进行线性回归和二次方程拟合。对拟合出的较适合的模型进行方差分析^[5]。依据模型方程绘制响应面立体分析图及等高线。因变量曲面图是三维图,只能表达含两个自变量的函数,所以,将3个自变量中的一个固定为中值,分别以拟合的目标函数为数学模型,绘制因变量曲面图,利用该图对影响白藜芦醇得率的任意2种条件的交互作用进行分析和评价。通过等高线的形状判断交互作用的强弱:椭圆形表示两因素交互作用显

著;圆形表示两因素交互作用不强^[10]。

1.5 优化结果验证

精确称取5.0 g葡萄枝蔓粉碎样3份,按照试验所得优化提取条件进行提取。将提取液离心15 min后过0.45 μm 微孔滤膜,测定白藜芦醇含量,进而计算出白藜芦醇得率。将结果与拟合方程预测值进行比较,计算实测值与预测值的偏差。

1.6 数据分析

用Design-Expert 8进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 白藜芦醇含量检测方法的评价

以甲醇和1%乙酸水为流动相,高效液相色谱图基线稳定,样品中组分分离度好,在此色谱条件下,葡萄枝蔓提取液中白藜芦醇保留效果较好,基本达到基线分离(图1)。

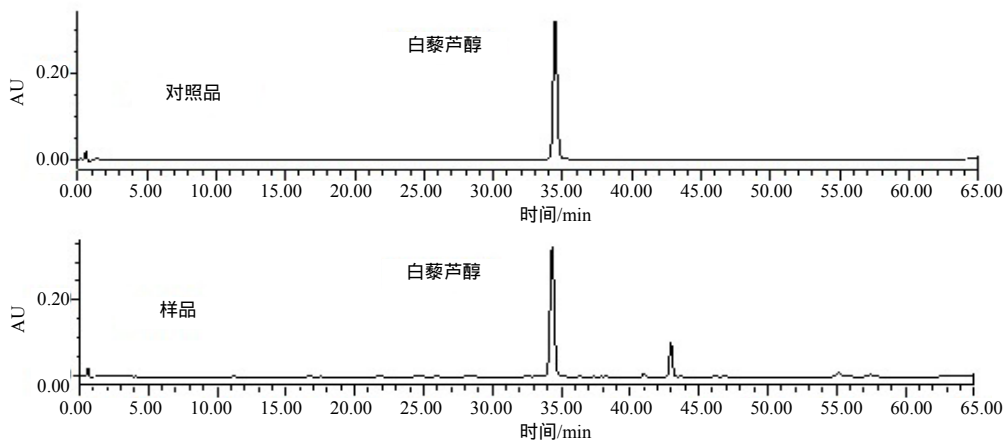


图1 对照品与样品的高效液相色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms of the standard and the sample

白藜芦醇质量浓度的标准曲线方程为 $y=43\ 217x-527$, $r=0.999\ 5$ 。结果表明:白藜芦醇质量浓度与峰面积线性关系良好。

精密度的试验结果:白藜芦醇峰面积的相对标准差为0.4%,表明仪器精密度良好。

稳定性试验结果:白藜芦醇峰面积的相对标准差为0.9%,表明样品溶液在24 h内稳定。

重复性试验结果:白藜芦醇峰面积的相对标准

差为0.7%,表明该方法的重复性良好。

白藜芦醇回收率为100.31%,相对标准差为1.7%。

2.2 提取工艺的优化结果

2.2.1 星点设计试验结果

星点设计的试验结果见表2。

表 2 星点设计试验结果

Table 2 Results of central composite design

试验号	x_1	x_2	x_3	白藜芦醇得率/(mg·g ⁻¹)
1	-1	-1	-1	1.47
2	+1	-1	-1	1.62
3	-1	+1	-1	1.26
4	+1	+1	-1	1.72
5	-1	-1	+1	1.49
6	+1	-1	+1	1.62
7	-1	+1	+1	1.26
8	+1	+1	+1	1.63
9	-1.732	0	0	1.23
10	+1.732	0	0	1.66
11	0	-1.732	0	1.57
12	0	+1.732	0	1.64
13	0	0	-1.732	1.58
14	0	0	+1.732	1.69
15~20	0	0	0	1.68

表 3 拟合二次方程的方差分析结果

Table 3 Results of variance analysis of quadratic model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.430 0	9	0.047 0	16.27	<0.000 1	极显著
x_1	0.250 0	1	0.250 0	84.57	<0.000 1	极显著
x_2	0.003 1	1	0.003 1	1.07	0.324 6	
x_3	0.001 0	1	0.001 0	0.35	0.565 5	
$x_1 x_2$	0.038 0	1	0.038 0	13.01	0.004 8	极显著
$x_1 x_3$	0.001 5	1	0.001 5	0.52	0.487 2	
$x_2 x_3$	0.001 5	1	0.001 5	0.52	0.487 2	
x_1^2	0.120 0	1	0.120 0	42.44	<0.000 1	极显著
x_2^2	0.019 0	1	0.019 0	6.62	0.027 8	显著
x_3^2	0.009 9	1	0.009 9	3.40	0.095 1	
残差	0.002 9	10	0.002 9			
失拟项	0.002 9	5	0.005 8			
纯误差	0.000 0	5	0.000 0			
总误差	0.450 0	19				

2.2.2 模型方程

所得白藜芦醇得率的线性回归方程为：
 $y = 0.377 31 + 0.015 26x_1 - 0.000 517x_2 + 0.002 959x_3$
 ($r = 0.549 7, P < 0.01$)。

尽管模型通过检验，但拟合度不佳，预测性较差，因此线性模型不合适。

所得白藜芦醇得率的非线性二次方程为：
 $y = -6.186 39 + 0.181 78x_1 - 0.012 371x_2 + 0.122 93x_3 + 0.000 273x_1x_2 - 0.000 545x_1x_3 - 0.000 164x_2x_3 - 0.001 178x_1^2 - 0.000 042x_2^2 - 0.002 998x_3^2$
 ($r = 0.936 1, P < 0.01$)。

表3中二次方程的显著性检验结果表明：一次项乙醇体积分数对白藜芦醇得率线性效应的影响显著，料液比对白藜芦醇得率线性效应的影响不显著；二次项中除料液比外的其他两因素对白藜芦醇得率曲面效应的影响均显著；乙醇体积分数与提取时间的交互作用极显著。综上可知，二次方程的 r 值高于线性方程的， $P < 0.01$ ，表明二次方程具有高度显著性，说明模型与试验实际拟合良好，试验误差小，应用效应面法优化葡萄枝蔓中白藜芦醇的提取工艺是可行的。

2.2.3 提取条件优化结果

由图2~4可以看出，乙醇体积分数与提取时间、溶媒比的交互作用均显著；溶媒比与提取时间的交互作用不显著。从图2~4中等高线图可以看出各因素的极值应在圆心处，初步估计乙醇体积分数、提取时间、溶媒比极值的取值范围为80%~95%、115~135 min、8~11。通过Design-Expert 8 软件分析，得出回归模型的最大值点，即乙醇体积分数90.2%，提取时间129.5 min，溶媒比8.8，在此条件下，白藜芦醇得率为1.75 mg/g，因此，将乙醇体积分数90.2%、提取时间129.5 min、溶媒比为8.8，回流提取2次确定为较优提取工艺。

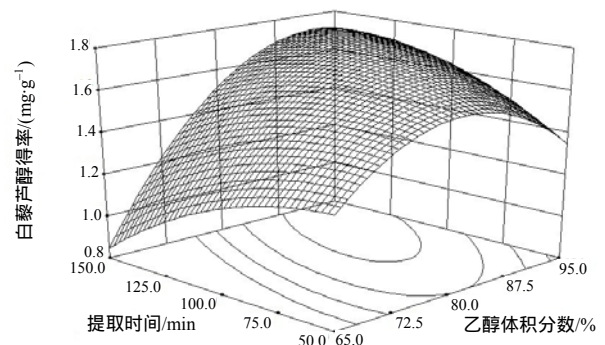


图 2 不同乙醇体积分数与提取时间条件下的白藜芦醇得率
 Fig.2 Resveratrol yield rate under different ethanol concentrations and extraction time

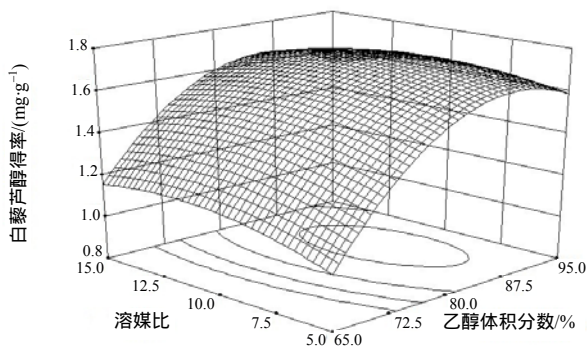


图3 不同乙醇体积分数与溶媒比条件下的白藜芦醇得率

Fig.3 Resveratrol yield rate under different ethanol concentrations and solvent ratios

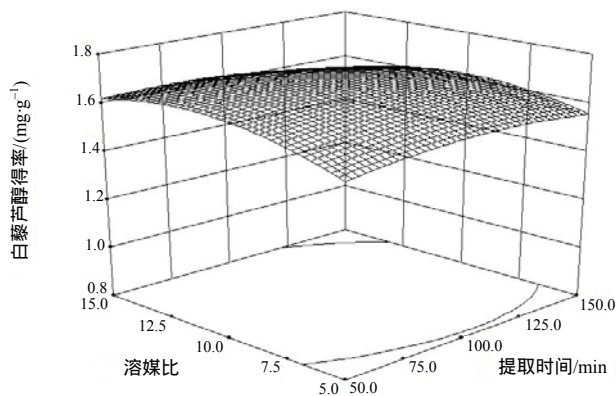


图4 不同溶媒比与提取时间条件下的白藜芦醇得率

Fig.4 Resveratrol yield rate under different solvent ratios and extraction time

2.3 优化结果的验证

验证试验的结果表明：白藜芦醇的平均得率为1.73 mg/g。验证结果与拟合方程预测值的偏差为1.14%。偏差较小，可见，由数学模型所得到的较优条件与设计目标相符，试验设计和数学模型具有可靠性和重现性。

3 结论与讨论

本研究结果表明，用乙醇回流提取法从葡萄枝蔓中提取白藜芦醇，乙醇体积分数、提取时间对白藜芦醇得率的影响显著。通过回归分析和验证试验，得到较优提取条件为乙醇体积分数90.2%，提

取时间129.5 min，溶媒比为8.8，回流提取2次。在此条件下，葡萄枝蔓中白藜芦醇的得率为1.73 mg/g。该得率不仅比预试验中最佳得率1.69 mg/g的提取效果高出2.37%，且提取成本降低。经方差分析，以提取乙醇体积分数(x_1)、回流时间(x_2)和溶媒比(x_3)为自变量，以白藜芦醇得率(y)为因变量拟合的二次方程模型有效，对试验结果拟合较好，有一定应用价值。

在本试验的基础上还可考察不同提取方法对白藜芦醇得率的影响，以优化提取效果。

参考文献:

- [1] 江纪武, 靳朝东. 药用植物辞典[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 2005.
- [2] Sierra R, Erkan K, Mazzaa G. Grape cane waste as a source of trans-resveratrol and trans-viniferin: High-value phytochemicals with medicinal and anti-phytopathogenic applications[J]. Industrial Crops and Products, 2008, 27: 335-340.
- [3] 杨敬芝, 周立新, 丁怡. 刺葡萄化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(8): 553-555.
- [4] 王征, 罗泽民, 邓林伟. 白藜芦醇的药理作用机理和合成途径[J]. 天然产物研究与开发, 2003, 15(2): 178-181.
- [5] 吴伟, 崔光华. 星点设计-效应面优化法及其在药学中的应用[J]. 国外医学药学分册, 2000, 27(5): 292-298.
- [6] 孙磊, 王玉蓉. 星点设计-效应面法优选远志的提取工艺[J]. 中成药, 2006, 28(3): 328-331.
- [7] 邓洁红, 谭兴和, 郭时印, 等. 响应面法优化刺葡萄皮色素提取工艺参数[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2007, 33(6): 694-699.
- [8] 赵艳玲, 肖小河, 山丽梅, 等. 星点设计-效应面法优选干姜提取工艺[J]. 医药导报, 2009, 28(7): 897-900.
- [9] 刘荣华, 陈石生, 任刚, 等. 星点设计-效应面法优化白茅根总酚酸提取工艺[J]. 中成药, 2011, 33(7): 1149-1153.
- [10] 陈健, 廖国平, 张忠义. 星点设计-效应面法优化超高压提取红景天中红景天苷[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(1): 19-23.

责任编辑: 王赛群