

文章编号:1001-6880(2014)7-1004-06

温度诱导双水相提取分离白藜芦醇苷的研究

傅海珍,陶青兰,杨蕾,张艳,戚雪勇*

江苏大学药学院,镇江 212013

摘要:建立一种新的提取分离虎杖中白藜芦醇苷的方法。以具有温敏性的PE6400为提取溶剂,用超声波辅助提取白藜芦醇苷,考察了PE6400浓度、提取时间、提取次数、固液比等对白藜芦醇苷提取率的影响,其最佳工艺为25倍8%PE6400超声提取二次,每次提取30 min,白藜芦醇苷的提取率达到17.74 mg/g;在富集分离时,考察不同pH、料液比对白藜芦醇苷在温度诱导双水相体系中分配行为的影响,在料液比为1:11,pH为12的缓冲溶液,90 ℃水浴下加热45 min,83.3%白藜芦醇苷富集分离于水相中。本实验方法操作方便,提取率较高,对环境和人体毒害低,是一种便捷、高效的提取分离方法。

关键词:白藜芦醇苷;温度诱导;双水相;高效液相色谱法

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

Extraction and Separation of Polydatin by Temperature-Induced Aqueous Two-Phase System

FU Hai-zhen, TAO Qing-lan, YANG Lei, ZHANG Yan, QI Xue-yong*

School of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China

Abstract: A new method for the extraction and separation of polydatin from *Polygonum cuspidatum* was developed. Polydatin was extracted by ultrasonic extraction with temperature-sensitive PE6400 as extraction solvent. The effects of the concentration of PE6400, extraction duration, times of extraction and solid-liquid ratio on the extraction yield of polydatin were investigated. The optimal extraction conditions were 8% PE6400 as extraction solvent, 1: 25 as solid-liquid ratio and ultrasonic extraction for 2 times, each time for 30 min. The extraction yield of polydatin reached 17.74 mg/g under the optimized conditions. In the process of enrichment and separation, the allocation behavior of polydatin in the temperature-induced aqueous two-phase system were also tested under different pHs, different solid-liquid ratios. When the solid-liquid ratio was 1: 11, the pH of buffer solution was 12 and heated at 90 ℃ water bath for 45 min, 83.3% of polydatin was allocated in the aqueous phase. The developed method was convenient, efficient and easy to operate. It had high extraction rate and low toxicity to the environment.

Key words: polydatin; temperature-induced; aqueous two-phase; HPLC

白藜芦醇苷在植物中分布广,含量较高,目前至少已经在70余种植物中发现了白藜芦醇苷。研究表明它在抗氧化,保护血管平滑肌细胞、心肌细胞、改善微循环等方面有着显著作用^[1-3]。白藜芦醇苷为虎杖中有效活性成分之一,因而从虎杖中提取白藜芦醇苷具有一定的实际意义。目前白藜芦醇苷大多数采用回流提取,溶剂萃取,大孔树脂吸附、高速逆流色谱等提取分离得到,该操作相对繁琐,得率较低,提取成本较高^[4-8]。

表面活性剂具有一定的助溶作用,用低浓度的该水溶液代替高浓度的醇或其他有机溶剂进行天然药物的提取,一方面大大降低提取成本,提高提取率,另一方面利于环保。目前已用于一些中药有效成分的提取^[9-12],利用表面活性剂温敏性质对中药有效成分进行富集分离报道还不多。PE6400为环氧乙烷和环氧丙烷嵌段共聚物,具有一定的浊点,当温度超过其浊点时其水溶液会形成两相。天然药物中酸性、碱性及两性有机化合物可以通过改变溶剂系统的pH,来改变其存在的状态,从而改变其在两相溶剂中的分配比。本研究以PE6400为提取溶剂进行超声提取,通过比较不同的提取方法,确定虎杖中提取白藜芦醇苷的最佳工艺,同时探讨了白藜芦

收稿日期:2013-11-12 接受日期:2014-04-30

基金项目:江苏省普通高校研究生科研创新计划项目(CXLX11-0600)

*通讯作者 Tel:86-511-85038170; E-mail:qixyemail@163.com

醇苷在温度诱导双水相体系中的分配行为。结果表明,温度诱导双水相有望成为一种便捷、高效的提取分离方法。

1 仪器与方法

1.1 仪器

日本岛津高效液相色谱仪:SPD-20A 检测器,DAU-20A 四元梯度仪,LC-10AT 泵。PHS-3CpH 计(上海精密科学仪器有限公司)、集热式恒温加热磁力搅拌器(郑州长城科工贸有限公司)、KQ-250B 型超声机(昆山市超声仪器有限公司)、BP221S 电子天平(德国塞博尼斯)、SHZ-C 型循环水式多用真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司)、RE-52 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)

1.2 药品与试剂

白藜芦醇(上海,阿拉丁,批号:36794,纯度99%)及白藜芦醇苷(上海,阿拉丁,批号:32280,纯度97%)、虎杖(安徽亳州睿康药业有限公司,批号:120929)、PE6400(武汉新大地环保材料有限公司)、甲醇(色谱纯,江苏汉邦科技有限公司)、其余试剂均为分析纯、实验用水为双蒸水。

1.3 实验方法

1.3.1 色谱条件

Hypersil C₁₈ 色谱柱(4.6×250 mm,5 μm);流动相:甲醇-水(40:60,V/V);流速:0.8 mL/min;检测

波长:306 nm,进样量:20 μL。

1.3.2 标准曲线的建立及线性范围的考察

取白藜芦醇苷对照品约0.05 g,精密称定。甲醇溶解定容至50 mL,制得1 mg/mL 白藜芦醇储备液,再精密量取一定量的储备液,用流动相稀释,配制成浓度范围在5~40 μg/mL 的溶液,0.45 μm 滤膜过滤后,吸取20 μL 进样,以峰面积积分值为纵坐标,以相应溶液中白藜芦醇苷的量为横坐标绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 6329560X - 91815$ ($R^2 = 0.9993$),结果表明,白藜芦醇苷在5~40 μg/mL 范围内线性关系良好。

1.3.3 白藜芦醇苷的提取

取虎杖干燥粉末约1 g 左右,精密称定。向其中加入一定量的不同溶剂,混合均匀,超声提取一定时间后,抽滤,将滤液定容至50 mL,得白藜芦醇苷粗提液,并测定其中白藜芦醇苷的含量。

1.3.4 白藜芦醇苷的富集分离

精密量取一定量的白藜芦醇苷粗提液置于离心管中,90 °C 恒温水浴一定时间,至溶液清晰地分为两层,读取相体积比,计算出上下相中白藜芦醇苷的含量,然后将 PE6400 相移出,加入一定的缓冲溶液,混合均匀后,90 °C 恒温水浴一定时间,再次分相,计算出上下相中白藜芦醇苷的含量。提取分离过程如图1 所示。

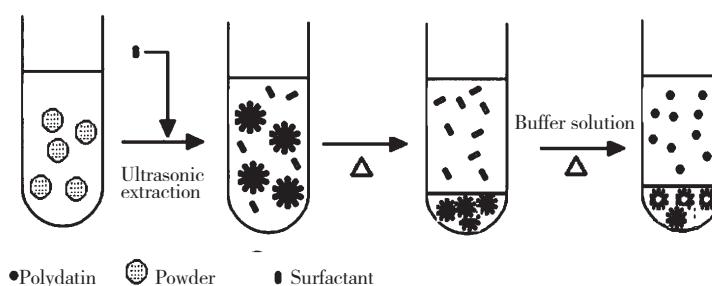


图1 温度诱导双水相提取分离白藜芦醇苷示意图

Fig. 1 Extraction and separation of polydatin by temperature-induced aqueous two-phase

2 结果与分析

2.1 提取工艺的筛选

2.1.1 不用溶剂对白藜芦醇苷提取率的影响

精密称取虎杖粉末5份,每份1 g 左右,置于50 mL 锥形瓶中,分别加入甲醇、80% 乙醇、80% 异丙醇、80% 丙酮、5% PE6200、5% PE6400、5% Tween40、

5% Tween60、5% TritonX-100 等不同溶剂20 mL,超声提取30 min,考察不同溶剂对白藜芦醇苷得率的影响。结果见图2。

白藜芦醇苷是一种酚苷类化合物,酚苷类化合物的极性较强,易溶于极性大的溶剂。实验考察了几种极性强的溶剂及几种表面活性剂对其提取率的影响,由结果可知,丙酮的提取效率最高,但是由于

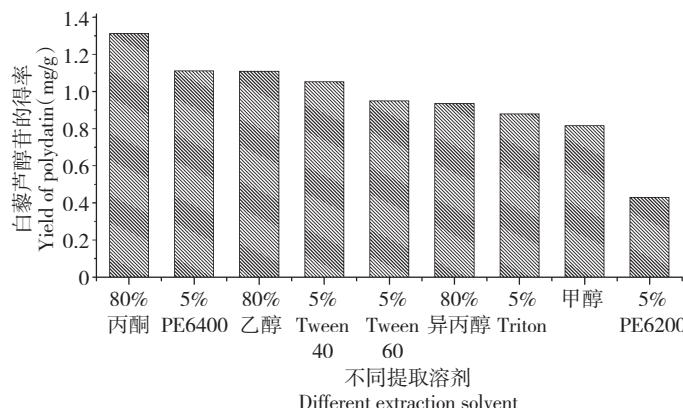


图 2 不同提取溶剂对白藜芦醇苷提取率的影响

Fig. 2 Effect of different extraction solvents on the extraction yield of polydatin

丙酮易挥发,而 5% PE6400 的提取率略大于乙醇,此外 PE6400 价廉易得,对环境友好,所以选用 PE6400 为提取溶剂。

2.1.2 溶剂浓度对白藜芦醇苷提取率的影响

精密称取虎杖粉末 5 份,每份 1 g 左右,置于 50 mL 锥形瓶中,分别加入浓度为 2%、4%、6%、8%、10% PE6400 溶液 20 mL,超声提取 30 min,考察溶剂浓度对白藜芦醇苷得率的影响,结果如图 3 所示。由图可知,8% PE6400 提取率较高。这是由于在低浓度时,随着表面活性剂用量的增大,形成胶束增多,对白藜芦醇苷的起着增溶作用,但当表面活性剂达到一定浓度后,形成胶束数量不会增加,白藜芦醇苷得率也不再增加,反而造成表面活性剂的浪费,此外随着表面活性剂浓度的增加,可能对其他杂质的会产生增溶作用而导致白藜芦醇苷溶出降低,综合这两方面因素,因而选择 8% PE6400 为提取溶剂。

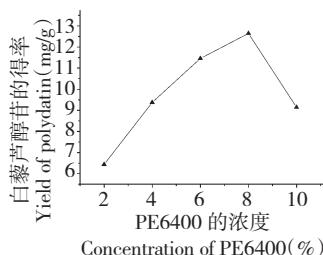


图 3 不同浓度 PE6400 对白藜芦醇苷提取率的影响

Fig. 3 Effect of different concentrations of PE6400 on the extraction yield of polydatin

2.1.3 料液比对白藜芦醇苷提取率的影响

精密称取虎杖粗粉 5 份,每份 1 g 左右,置于 50 mL 锥形瓶中,加入一定量的 8% PE6400 溶液,超声提取 30 min,考察料液比对白藜芦醇得率的影响。

结果如图 4 所示。随着料液比的增加,白藜芦醇的得率先增大,后略有减小,在 1:25 时达到最大,此后随着料液比的增加而呈现减小的趋势,可能在料液比为 1:25 时,虎杖中的白藜芦醇绝大部分已溶出,再增加溶剂体积,其他一些杂质成分溶出导致白藜芦醇得率的降低,因而确定提取料液比为 1:25。

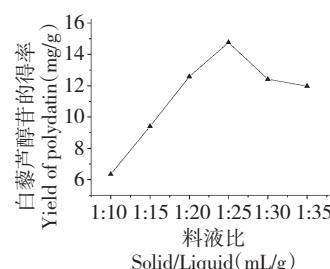


图 4 不同料液比对白藜芦醇苷提取率的影响

Fig. 4 Effect of different solid-liquid ratios on the extraction yield of polydatin

2.1.4 提取时间对白藜芦醇苷提取率的影响

精密称取虎杖粗粉 5 份,每份 1 g 左右,置于 50 mL 锥形瓶中,加入浓度为 8% 的 PE6400 溶液 25

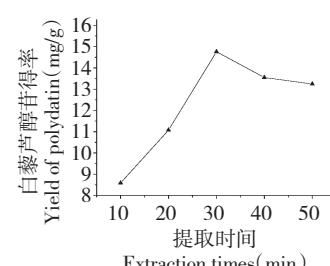


图 5 不同提取时间对白藜芦醇苷提取率的影响

Fig. 5 Effect of different extraction duration on the extraction yield of polydatin

mL,超声提取1次,考察提取时间对白藜芦醇苷得率的影响。结果如图5所示。

随着提取时间的增加,白藜芦醇苷的得率逐渐增大,但是在提取时间30 min后,得率开始降低,可能长时间超声,促使白藜芦醇苷部分水解,因而确定超声提取的时间为30 min。

2.1.5 提取次数对提取率的影响

精密称取虎杖粗粉5份,每份1 g左右,置于50 mL锥形瓶中,每次加入浓度为8%的PE6400溶液25 mL,超声提取30 min,考察提取次数对白藜芦醇苷得率的影响。结果如图6所示。

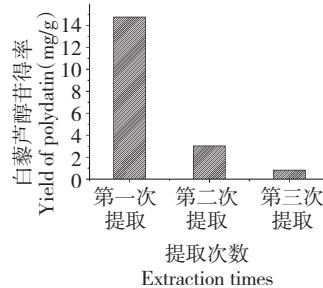


图6 提取次数对白藜芦醇苷提取率的影响

Fig. 6 Effect of different times of extraction on the extraction yield of polydatin

随着提取次数的增加,白藜芦醇苷的得率逐渐升高,但增加幅度较小,经过一次提取后,目标成分得率近80%,二次达到95%以上,因而确定提取次数为两次。

2.1.6 白藜芦醇苷最佳提取工艺

综上所述,白藜芦醇苷最佳提取工艺为:8%的PE6400溶液作为提取剂,料液比为1:25,提取2次,提取30 min;称取虎杖粗粉10 g,按上述最佳条件提取,得粗提取液,测定白藜芦醇苷的得率为17.74 mg/g生药。

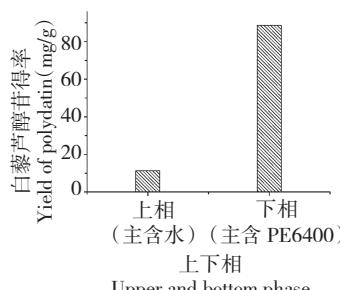


图7 上下相所含白藜芦醇苷的百分比

Fig. 7 The percentage of polydatin contained in upper and bottom phase

2.2 白藜芦醇苷的富集分离

2.2.1 白藜芦醇苷的富集

精密量取10 mL提取液于离心管中,水浴90 °C,加热45 min,分相,读取相体积比,分别取上相和下相,用流动相定容后,计算上下相中白藜芦醇苷的量,结果如图7所示。由图可知,下相PE6400富集了近90%的白藜芦醇苷。

2.2.2 白藜芦醇苷的分离

2.2.2.1 pH对白藜芦醇苷的分离影响

取1 mL经温度诱导分相后的PE6400溶液于离心管中,加不同pH值(pH=7、8、9、10、11、12)的缓冲溶剂至10 mL,90 °C恒温水浴加热分相,45 min后准确读取上下相体积。将上、下相分别用流动相定容后,计算出白藜芦醇苷的量。结果见图8。

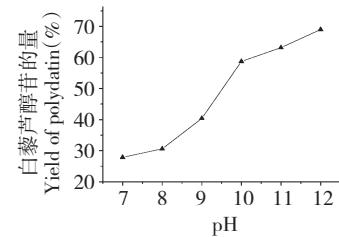


图8 不同pH下白藜芦醇苷的释放率

Fig. 8 The release rate of polydatin under different pHs

结果表明:pH=12时,白藜芦醇苷69.0%被萃取到缓冲液中,主要是因为白藜芦醇苷为酚苷类成分,在中强碱下易形成离子形式而溶于水相中。

2.2.2.2 料液比对白藜芦醇苷的分离影响

取经温度诱导分相后的PE6400溶液1 mL到离心管中,分别加不同体积pH=12的缓冲溶液摇匀(缓冲溶液体积分别为3、5、7、9、11、13 mL),90 °C恒温水浴加热45 min后分相,考察不同料液比对白藜芦醇苷分离的影响,结果见图9,其中,料液比为1:11的释放率最高,一次达到76.3%,因为料液比的多少直接影响到体系中表面活性剂的浓度,当料液比1:3时,表面活性剂的浓度相对较大,浓缩因子减小,导致释放率比料液比1:5高,而当料液比增大到一定时,表面活性剂的浓度较低,难收集,且萃取后的相分离困难,后续检测的准确性和重现性降低。因而选择1:11为最适的料液比。

PE6400的浊点在60 °C左右,而温度诱导双水相平衡温度至少要比其浊点温度高出15~20 °C,此外分相完全还和平衡时间有关,温度相对低时,分相时间较长,兼顾分相时间,因而本试验就没有考察温

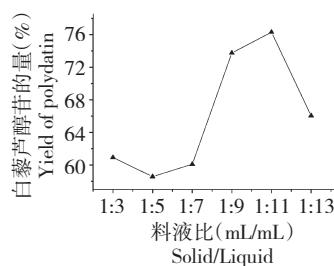
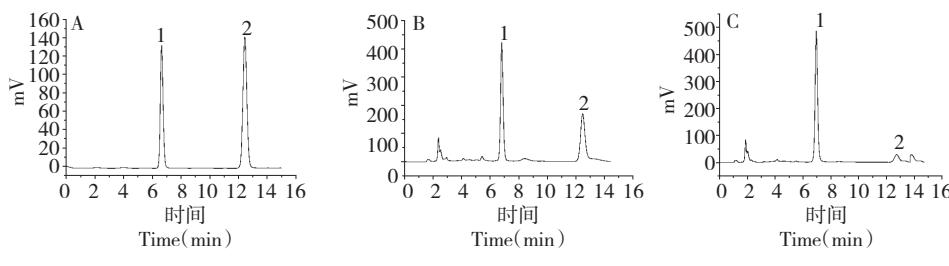


图 9 不同料液比的释放率

Fig. 9 The release rate of polydatin under different solid-liquid ratios



1-白藜芦醇苷;2-白藜芦醇 1- polydatin;2- resveratrol

图 10 白藜芦醇苷及白藜芦醇对照品(A)、虎杖粗提取液(B)及温度诱导后缓冲溶液(C)的高效液相色谱图

Fig. 10 HPLC chromatogram of mixed polydatin and resveratrol standards (A), *P. cuspidatum* extract (B) and buffer solution after temperature-induced aqueous two-phase (C)

3 讨论

对于提取天然产物中极性酸碱性化合物,大多数采用水或亲水性有机溶剂提取,近年来,利用表面活性提取天然产物中活性物质逐年增加,一方面表面活性剂能对天然产物的粉末产生润湿作用,有促进渗透的作用,另一方面表面活性剂结构上带有亲水基团与疏水基团,能分别与水和待提取的活性成分结合,形成疏水基团在内、亲水基团在外的胶束,从而显著提高活性成分水提时的溶解度。但不同的表面活性剂对不同的体系有不同的特性。

本研究选择了 PE6400 作为提取溶剂对白藜芦醇苷进行提取,考察了提取工艺,提取率较常规乙醇提取法较高。在富集分离过程中,利用 PE6400 温敏性,一方面将表面活性溶剂回收,另一方面将白藜芦醇苷富集到 PE6400 层,与一些水溶性杂质分离。借助于白藜芦醇苷为酸性成分,在碱水中易形成离子状态,用缓冲溶液进行温度诱导分相,白藜芦醇苷被萃取到碱水层,与一些不具有酸性的物质分离。该操作简单,提取率高,分离效率高,毒性小,有望成为提取分离天然产物中极性化合物的一种便捷、高

效的提取分离方法。

2.2.2.3 分相次数对白藜芦醇苷的分离影响

考察了分相次数对白藜芦醇苷的分离影响,经两次分相,水相中白藜芦醇苷可达到 83.3%。

2.3 提取液中白藜芦醇苷的分析

对白藜芦醇及白藜芦醇苷标准品及虎杖提取分离富集液进行 HPLC 分析,结果见图 10。

结果表明 PE6400 作为提取溶剂对白藜芦醇苷进行提取分离富集时,经过温度诱导分相后,粗提取液中 83.3% 白藜芦醇苷富集分离于上相缓冲溶液中,而白藜芦醇 88.2% 富集分离于下相 PE6400 中。

有效的提取分离方法。

参考文献

- Zhu LX(朱立贤), Jin ZY(金征宇), Luo X(罗欣). Study on the antioxidant activity of the resveratrol and piceid. *Food Res Dev*(食品研究与开发), 2007, 28(5):22-25.
- Zhang LP(张利萍), Yang CY(杨长瑛), Wang YP(王莹萍), et al. Protective effect of polydatin against ischemia/reperfusion injury in rat heart. *Acta Physiol Sin*(生理学报), 2008, 60:161-168.
- Zhao J(赵娟), Li HY(李海英), Wang ZY(王佐妤), et al. Effect of polydatin on ultrastructure of cardiac myocytes in rats with adriamycin-induced myocardial damage. *Acta Acad Med CPAF*(武警医学院学报), 2010, 19:629-634.
- Chen XQ(陈晓青), Sun J(孙娟), Liu Q(刘茜), et al. Microwave-assisted extraction method for piceid from *Polygonum cuspidatum* Sieb et Zucc. *J Central South Univ, Nat Sci*(中南大学学报, 自科版), 2007, 38:686-690.
- Yang XY(杨晓英), Zhong Y(种阳), Chen JC(陈劲春). Optimization of extraction technique of polydatin from Herb *Polygonum Cuspidatum* via by response surface method. *Food Sci Tech*(食品科技), 2011, 36:205-208.