

响应面法优化葡萄叶中白藜芦醇的提取条件

毛俊霞, 张文君, 李曦默, 孙雅茹, 杨建雄*

陕西师范大学生命科学院, 西安 710062

摘要: 采用响应面分析法优化葡萄叶中白藜芦醇的提取条件, 在单因素实验基础上, 采用 Box-Behnken 中心组合设计原理研究乙醇体积分数、液固比和浸提温度 3 个因素对白藜芦醇提取量的影响, 得出白藜芦醇的最佳提取条件为: 乙醇体积分数为 46%, 液固比为 23 mL/g, 提取温度为 62 °C。在此条件下白藜芦醇提取量的预测值为 47.55 $\mu\text{g/g}$, 实测值为 47.96 $\mu\text{g/g}$ 。

关键词: 葡萄叶; 白藜芦醇; 响应面法; 提取条件; HPLC

中图分类号: Q599

文献标识码: A

Optimization of Extraction Conditions of Resveratrol from Grape Leave by Response Surface Methodology

MAO Jun-xia, ZHANG Wen-jun, LI Xi-mo, SUN Ya-ru, YANG Jian-xiong*

College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China

Abstract: Response surface methodology (RSM) was applied to optimize the extraction conditions of resveratrol from grape leaves. On the basis of single factor experiments, the influence of ethanol concentration, ratio of liquid to solid and extraction temperature on the extraction yield of resveratrol were investigated based on Box-Behnken central composite design. The results showed that the optimal extraction conditions were as follows: ethanol concentration of 46%, liquid to solid ratio of 23 mL/g and extraction temperature of 62 °C. Under the optimized conditions, the predicted value of concentration of resveratrol was 47.55 $\mu\text{g/g}$ and the measured value was 47.96 $\mu\text{g/g}$.

Key words: grape leaves; resveratrol; response surface methodology; extraction conditions; HPLC

白藜芦醇(resveratrol)最初作为植物抗菌素而被发现的,是植物产生的一种次生代谢产物。其分子式为 $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_3$, 相对分子质量为 228.25, 难溶于水, 易溶于有机溶剂, 广泛存在于 21 个科、31 个属的 72 种植物中^[1], 如蓼科的蓼属、大黄属, 葡萄科的葡萄属和爬山虎属, 百合科的藜芦属, 莎草科的苔属, 桑科的桑属, 豆科的落花生属、羊蹄甲属和决明属等多种植物^[2]。常见的含白藜芦醇的植物有决明子、何首乌和虎杖等传统药用植物, 近来报道在葡萄、花生和桑树等中也含有一定量的白藜芦醇。白藜芦醇具有多种药理活性, 如抗菌消炎抗病毒抗氧化、保护心血管系统、肝脏和神经元、调节免疫和骨代谢, 并对癌症具有预防和治疗作用, 被认为是继紫杉醇之后的又一抗癌成份^[1-3]。

在葡萄的不同组织部位, 如葡萄皮、葡萄籽、葡

萄果穗轴和葡萄叶中均含有白藜芦醇^[4]。而我国葡萄产业发达, 每年秋季丢弃的葡萄叶数量可观, 充分利用葡萄叶资源提取白藜芦醇, 优选出低成本的提取方法, 便可以变废为宝, 为葡萄资源的合理利用开辟新途径, 但尚未见到以葡萄叶为原料提取白藜芦醇工艺条件的研究报道。响应面法(RSM)是评价指标和因素间的非线性关系的一种试验设计方法, 通过合理的试验设计得到的一定数据, 建立影响因素与响应值之间的多元二次回归模型, 通过对回归方程的分析来优化工艺参数^[5,6]。本文以乙醇为浸提剂, 以葡萄叶为原料, 白藜芦醇提取量为考察目标, 在单因素实验的基础上, 利用响应面分析法优化提取条件, 为利用葡萄叶提取白藜芦醇提供实验数据, 以促进葡萄叶资源的更好开发利用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

户太八号葡萄叶, 采自西安市长安区滦镇葡萄

园(阴干,粉碎,备用);白藜芦醇对照品,购自中国生物制品检定所(批号:100080-200707);乙酸乙酯和无水乙醇为分析纯,甲醇和乙腈为色谱纯。

1.2 仪器与设备

LC-2010 AHT 型高效液相色谱仪(日本岛津);BP221S 电子天平(Sartorius 公司);KQ-300DE 型数控超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司);数显电热恒温水浴锅(常州国华电器有限公司);旋转蒸发器 RE-52AA(上海亚荣生化仪器厂);Milli-Q Century 超纯水系统(美国 Millipore 公司)。

1.3 方法

1.3.1 白藜芦醇的提取方法

称取一定量粉碎的葡萄叶片,按所设定的单因素条件浸提,提取液过滤,滤液回收溶剂并浓缩至一定体积。将该浓缩液转移至分液漏斗中,萃取3次,每次乙酸乙酯液的使用量以1:1计,将上层的有机相收集并合并。用旋转蒸发器回收乙酸乙酯,残留物用甲醇溶解并定容至5 mL,用微孔滤膜($\varphi=0.45\ \mu\text{m}$)过滤,得样品溶液。因白藜芦醇对光敏感,该过程需避光。

1.3.2 白藜芦醇的含量测定方法

采用高效液相色谱法(HPLC)测定样品中白藜芦醇的含量,色谱柱为 Hypersil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相为水(A)和乙腈(B);洗脱程序:0~5 min, 15%~24% (B);

5~33 min, 24%~40% (B);流速为 1.0 mL/min;柱温为 30 °C;检测波长为 306 nm。

1.3.3 标准曲线的绘制

准确称取白藜芦醇对照品 5.1 mg,用甲醇溶解并定容至 25 mL,配成质量浓度为 0.204 mg/mL 的对照品储备液。准确吸取上述白藜芦醇对照品储备液 1 mL,稀释成 20.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对照品溶液。准确吸取上述对照品溶液,分别以 5、10、15、20、25 和 30 μL 的不同体积进样。在上述色谱条件下进行分析,以峰面积 Y 为纵坐标,进样量 X (μg) 为横坐标,绘

制标准曲线,得回归方程为: $Y = 7 \times 10^6 X - 19421$ ($r^2 = 0.9996$),表明进样量在 0.1~0.6 μg 范围内,白藜芦醇含量与峰面积具有良好的线性关系。

1.3.4 方法学考察

在相同的色谱条件下,考察精密性、重复性、稳定性和加样回收率等指标,计算相对标准偏差(RSD)。

1.4 实验设计与数据分析

1.4.1 单因素实验

在进行响应面分析之前,先通过单因素实验选出对白藜芦醇提取量具有明显影响的因素并确定其试验水平。称取 5.0 g 葡萄叶,考查了不同的乙醇体积分数、液固比、浸提时间、浸提温度和提取次数等对白藜芦醇提取量的影响。

1.4.2 响应面分析法优化提取条件

在单因素实验的基础上,通过分析软件 Design Expert V 8.05 b 设计响应面分析法的实验方案,对葡萄叶中白藜芦醇的提取工艺作进一步的优化。

2 结果与分析

2.1 含量测定方法学考察结果

按 1.3.2 的含量测定方法得到对照品和样品的色谱图,如图 1 所示。

精密性试验:取 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的白藜芦醇对照品溶液重复进样 5 次,记录峰面积,计算得 RSD 为 0.7% ($n=5$),说明该方法精密性良好。

稳定性试验:同一待测样品,在 HPLC 中每隔 2 h 测定 1 次,共 5 次,记录白藜芦醇的峰面积,计算得 RSD 为 3.17% ($n=6$),说明供试品溶液在 10 h 内稳定。

重复性试验:在相同的条件下,以同一葡萄叶制备 5 份样品,在相同的 HPLC 条件下检测白藜芦醇,由峰面积计算出 RSD 为 2.48% ($n=5$) 说明该方法重复性好。

加样回收率实验:准确称取干燥的葡萄叶 5 份,

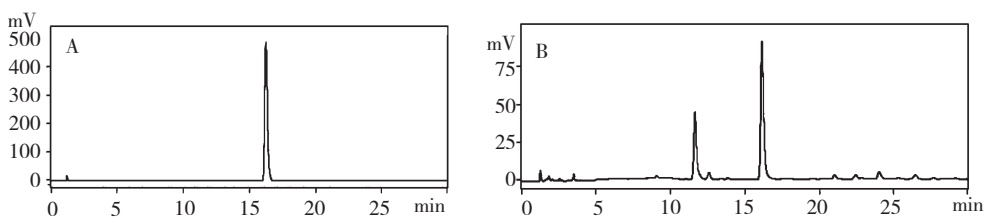


图 1 白藜芦醇对照品(A)和葡萄叶提取物(B)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of resveratrol standard(A) and grape leaves extract(B)

每份以 1:1 的比例加入白藜芦醇对照品,按 1.3.1 的方法制备样品,在相同的 HPLC 条件下检测,计算得平均回收率为 102.09%,RSD 为 3.27% ($n=5$),说明该方法的准确度好。

2.2 单因素实验结果

2.2.1 乙醇体积分数

称取 4 份葡萄叶,按照 20 倍体积分别加入 30%、40%、50% 和 60% 的乙醇溶液,于室温在 300 W 的功率下超声处理 30 min 后,于 60 °C 水浴浸提 60 min。所得提取液按 1.3.1 方法操作后,用 HPLC 测定白藜芦醇的含量,结果如图 2。由图可知:白藜芦醇含量随乙醇体积分数的升高而增大,当乙醇体积分数为 40% 和 50% 时,白藜芦醇含量较高;当乙醇体积分继续升高时,白藜芦醇含量反而减小。原因可能是:随乙醇体积分数增加,醇溶性杂质和亲脂性成分的溶出量增加,影响了白藜芦醇与溶剂分子的结合,导致白藜芦醇提取量下降。综合考虑,选择体积分数为 40% 的乙醇作为提取剂。

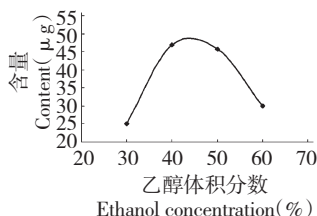


图 2 乙醇体积分数对白藜芦醇含量的影响

Fig. 2 Effect of ethanol concentration on extraction yield of resveratrol

2.2.2 液固比

称取 3 份葡萄叶,分别按照 15、20 和 25 倍的体积加入 60% 的乙醇溶液,于室温在 300 W 的功率下超声处理 30 min 后,于 60 °C 水浴浸提 60 min。所得提取液按 1.3.1 方法操作后,用 HPLC 测定白藜芦醇的含量,结果如图 3。由图可知:随液固比的增加,白藜芦醇含量在增加,但液固比大于 20 mL/g 时,白藜芦醇含量增加缓慢。因此,选择 20 mL/g 为

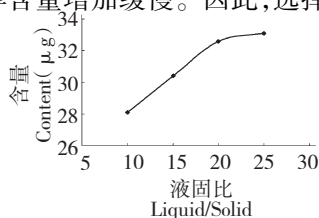


图 3 液固比对白藜芦醇含量的影响

Fig. 3 Effect of ratio of liquid to solid on extraction yield of resveratrol

最佳液固比。

2.2.3 浸提时间

称取 3 份葡萄叶,按照 20 倍的体积加入 60% 的乙醇溶液,于室温在 300 W 的功率下超声处理 30 min 后,于 60 °C 水浴分别浸提 30、60 和 90 min。所得提取液按 1.3.1 方法操作后,用 HPLC 测定白藜芦醇的含量,结果如图 4。由图可知:随着时间的增加,白藜芦醇含量也增加,在 60 min 时达到最大,时间继续增加,白藜芦醇含量却下降。这可能是由于提取时间为 60 min 时,白藜芦醇已经较完全地溶出。由于白藜芦醇的热敏性较强,浸提时间延长后其分解速率超过溶出速率,从而导致白藜芦醇含量下降。因此,选择 60 min 为最佳提取时间。

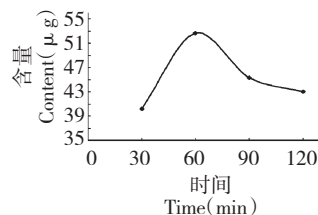


图 4 提取时间对白藜芦醇含量的影响

Fig. 4 Effect of extraction time on extraction yield of resveratrol

2.2.4 浸提温度

称取 3 份葡萄叶,按照 20 倍的体积加入 60% 的乙醇溶液,于室温在 300 W 的功率下超声处理 30 min 后,分别于 50、60 和 70 °C 水浴浸提 60 min。所得提取液按 1.3.1 方法操作后,用 HPLC 测定白藜芦醇的含量,结果如图 5。由图可知:在 40 ~ 60 °C 之间,随着温度的升高,白藜芦醇含量增加,60 °C 时效果最佳,温度继续升高时,白藜芦醇含量又会下降。这可能是由于白藜芦醇对热敏感,温度过高会导致其分解。因此,选择 60 °C 为最佳提取温度。

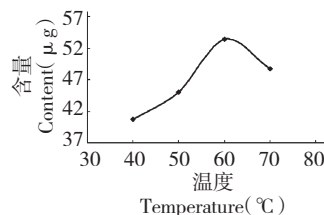


图 5 浸提温度对白藜芦醇含量的影响

Fig. 5 Effect of extraction temperature on extraction yield of resveratrol

2.2.5 提取次数

称取 4 份葡萄叶,按照 20 倍的体积加入 60% 的乙醇溶液,于室温在 300 W 的功率下超声处理 30

min 后,于 60 ℃ 水浴浸提 60 min,分别提取 1、2、3 和 4 次。所得提取液合并后按 1.3.1 方法操作后,用 HPLC 测定白藜芦醇的含量,结果如图 6。由图可知:随提取次数的增加,白藜芦醇的提取量逐渐增加,当提取 3 次后,白藜芦醇含量增加不明显。综合考虑后,确定提取次数为 3 次。

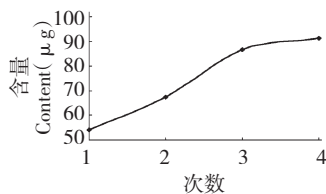


图 6 提取次数对白藜芦醇含量的影响

Fig. 6 Effect of times of extraction on yield of resveratrol

2.3 响应面分析实验结果

在上述的单因素试验中,提取时间对白藜芦醇含量的影响较明显,且大部分文献报道的提取时间也在 60 min;通常,目标物质的提取量会随提取次数增加而增加,故在运用响应面方法优化时,未考虑提

取时间和提取次数这 2 个因素。响应面法的实验设计如表 1,选取的自变量为乙醇体积分数(A)、液固比(B)和浸提温度(C),提取得到的白藜芦醇含量为响应值(Y),响应面试验的方案及结果如表 2。

表 1 响应面法的因素与水平

Table 1 Factors and levels of RSM

因素 Factors	水平 Levels		
	-1	0	+1
A 乙醇体积分数 Ethanol concentration(v/v,%)	30	40	50
B 液固比 Liquid to solid ratio(mL/g)	15	20	25
C 浸提温度 Extraction temperature(℃)	50	60	70

对表 2 的数据用分析软件 Design Expert V 8.05 b 处理,得到如下的多元二次方程: $Y = 45.88 + 4.10A + 1.70B + 0.49C + 0.63AB - 0.13AC + 1.62BC - 4.06A^2 - 2.01B^2 - 3.61C^2$ 。

式中:各项系数的绝对值大小反应各因素对响应值(Y)的影响程度,系数的正负则反映了影响的方向^[7,8]。

表 2 Box-Behnken 试验设计与结果

Table 2 Results of response surface experiments

实验号 No.	A (%)	B (mL/g)	C (℃)	白藜芦醇含量 Y Concentration of resveratrol (μg/g)
1	-1	-1	0	35.18
2	+1	-1	0	41.98
3	-1	+1	0	36.4
4	+1	+1	0	45.72
5	-1	0	-1	33.26
6	+1	0	-1	41.85
7	-1	0	+1	34.84
8	+1	0	+1	42.92
9	0	-1	-1	39.41
10	0	+1	-1	40.51
11	0	-1	+1	36.79
12	0	+1	+1	44.37
13	0	0	0	45.65
14	0	0	0	46.86
15	0	0	0	44.92
16	0	0	0	46.1
17	0	0	0	45.89

表 3 为响应面法试验数据的方差分析。统计显示:所建模型的 F 值为 63.74,反映显著性的 P 值小

于 0.0001,即该模型极显著($P < 0.01$),对实验因素的拟合情况较好,可很好地描述实验结果;失拟性分

析的 F 值为 1.36, P 值为 0.3759 ($P > 0.05$), 即失拟不显著, 这表明未知因素对试验结果的干扰很小。模型的变异系数 CV 值较小, 仅 1.83, 说明该模型的可信度高, 稳定性好, 调整决定系数 $R^2_{adj} = 0.9724$, 表示 97.24% 的响应值差异可由该模型解释, 即该模型的相关性很好, 可用该模型对白藜芦醇的提取过程进行分析和预测^[6]。

各变量对响应值的影响大小, 是由 F 检验来判定的。概率 P 值 $> F$ 的值越小, 则相应变量对响应值影响的显著程度越高。由表 3 可以看出: 一次项

中, 液固比和乙醇体积分数对响应值的作用达到极显著的水平 ($P < 0.01$), 浸提温度的作用不显著 ($P > 0.05$); 二次项中, 浸提温度、液固比和乙醇体积分数对响应值的作用均达到极显著水平 ($P < 0.01$); 在交互项中, 液固比和浸提温度的交互作用极显著 ($P < 0.01$), 其余因素间的交互作用不显著 ($P > 0.05$), 故不能用简单的线性关系表示所选实验因素对响应值的影响。在实验范围内, 各因素对响应值的影响大小为: 乙醇体积分数 $>$ 液固比 $>$ 浸提温度。

表 3 回归模型的方差分析

Table 3 Variance analysis of regression model

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	$P > F$ p-value	显著性 Significance
模型 Model	327.76	9	36.42	63.74	<0.0001	* *
A	134.40	1	134.40	235.23	<0.0001	* *
B	23.26	1	23.26	40.70	0.0004	* *
C	1.89	1	1.89	3.31	0.1116	
AB	1.59	1	1.59	2.78	0.1395	
AC	0.065	1	0.065	0.11	0.7457	
BC	10.50	1	10.50	18.37	0.0036	* *
A ²	69.34	1	69.34	121.37	<0.0001	* *
B ²	16.94	1	16.94	29.65	0.0010	* *
C ²	54.82	1	54.82	95.95	<0.0001	* *
残差 Residual	4.00	7	0.57			
失拟 Lack of Fit	2.02	3	0.67	1.36	0.3759	不显著
纯差 Pure Error	1.98	4	0.50			
总差 Total Error	331.76	16				

$R^2_{adj} = 0.9724$ $CV = 1.83$

各因素交互作用对响应值的影响, 如图 7 所示。响应面图为三维空间曲面, 是根据回归方程绘制的。

分析发现: 所有三维曲面的开口均向下, 向上形成凸面, 在一定的范围内, 因素值增大引起响应值升高,

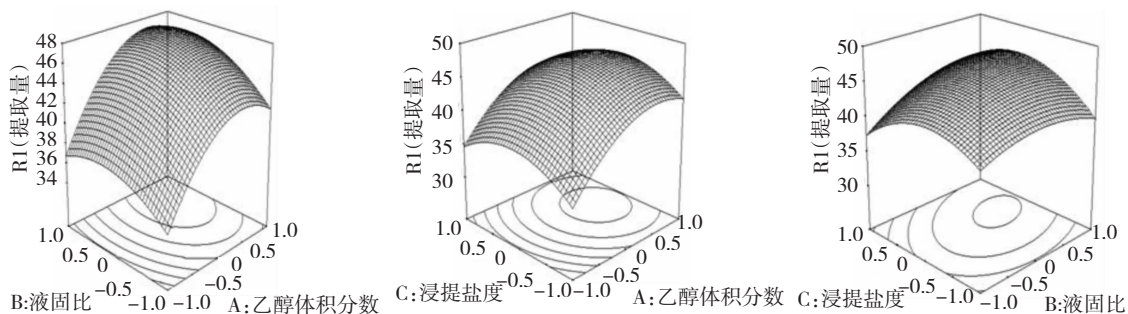


图 7 各因素交互作用对白藜芦醇提取量影响的响应图

Fig. 7 Response surface plots showing interactive effects of different factors on extraction yield of resveratrol

响应值增加至最大值后,因素值的增大又导致响应值逐渐降低,故响应值的最高点即为所建模型的稳定点^[9]。

在底面上,响应值相同的点对应的因素值可形成等高线。交互作用的强弱可由其形状反映出来。当所考察因素的交互作用弱时,等高线接近圆形;当两作用因素的交互作用强时,等高线呈现为椭圆形^[10]。观察各等高线,可发现液固比和浸提温度的交互作用强,为极显著;其余各因素的交互作用均不显著。

用分析软件 Design Expert V 8.05 b 分析实验数据后,得出白藜芦醇的优化提取条件为:在 61.9 °C 时,选择 45.5% 的乙醇,以 22.95 mL/g 的液固比加入溶剂。选用上述优化的提取工艺,分析软件预测白藜芦醇提取量为 47.55 μg/g。在实际提取过程中,将优化的提取方法近似为:乙醇体积分数为 46%,液固比为 23 mL/g,温度为 62 °C。

2.4 响应面法工艺验证实验结果

运用优化的提取方法平行制取 3 份样品,以验证响应面法所建立的模型。HPLC 测得的白藜芦醇提取量为 47.96 μg/g (RSD = 2.55%)。与回归模型的预期相比,其相对误差只有 0.86%,说明该模型可靠性好,所预测的结果准确,可用于分析和预测各因素对白藜芦醇提取量的影响。

3 结论

本文在单因素试验的基础上,采用响应面法对葡萄叶中白藜芦醇提取条件进行优化。该方法优化的白藜芦醇最佳提取条件为:在 62 °C 的温度下,选择 46% 的乙醇,以 23 mL/g 的液固比加入溶剂。回归分析和验证实验表明:该工艺条件提取率高,稳定性好,操作简便。

参考文献

1 Chen XX(陈秀霞), Chen YQ(陈由强), Chen RK(陈如

凯). Advances in the research of resveratrol. *J Fujian For Sci Tech*(福建林业科技), 2003, 30(14): 84-88.

2 Wu CF, Yang JY, Wang F, et al. Resveratrol: botanical origin, pharmacological activity and applications. *Chin J Nat Med*, 2013, 11: 1-15.

3 Fremont L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci*, 2000, 66: 663-673.

4 Li T(李婷), Li S(李胜), Zhang QS(张青松), et al. Comparison of the resveratrol contents in different grape tissues. *J Gansu Agric Univ*(甘肃农业大学学报), 2009, 44(2): 64-67.

5 Cai LL(蔡亮亮), Yu FR(余方荣), Li XH(李西海), et al. Optimization of extraction conditions of *Bauhinia championii* benth polysaccharide based on response surface methodology. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2012, 24: 1837-1843.

6 Huang XB(黄晓兵), Lin LJ(林丽静), Zhou YM(周瑶敏), et al. Optimization of ultrasonic extraction technology of flavonoids from longan. *Acta Agric Jiangxi*(江西农业学报), 2012, 24: 116-119.

7 Wang TY(王桃云), Wang JH(王金虎), Hu CY(胡翠英), et al. Response surface methodology for optimization of extraction flavonoids from *Spirodela polyrrhiza* (L.) schleid and antioxidant evaluation. *Chin J Biol Eng*(生物加工过程), 2012, 10: 1-6.

8 Rabesiaka M, Rabesiaka LR, Mabilie I, et al. Extraction of trans-resveratrol from red wine and optimization by response surface methodology. *Sep Pur Tech*, 2011, 81: 56-61.

9 Liu WX(刘伟霞), Yang JX(杨建雄). Optimization of extraction technology of forsythiaside and phillyrin in forsythia suspense leaves based on response surface methodology. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2012, 24: 1098-1104.

10 Zhou XM(周晓明), Yan P(闫鹏), Ma K(马凯), et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from maca by response surface methodology. *Xinjiang Agric Sci*(新疆农业科学), 2012, 49: 1414-1420.

(上接第 1929 页)

15 Li CR(李春荣), Meng TH(孟铁宏), Liu SY(刘仕云). Assaying on trace elements in *Peony* Tea. *Food Res Dev*(食品研究与开发), 2012, 33: 157-159.

16 Fang YL(方艳玲). Determination of seven trace elements in tea samples by extracting digestion pretreatment. *Chin J Pub-*

lic Health(中国公共卫生), 2002, 18: 859-860.

17 Shi YZ(石元值), Ma LF(马立峰), Han WY(韩文彦), et al. Study on simultaneous determination of phosphorus, potassium, lead, zinc etc. altogether 17 elements in tea. *Food Sci*(食品科学), 2006, 27: 193-196.