

响应曲面法优化超声辅助提取虎杖中白藜芦醇的 工艺研究

曹艳蓉, 赵俊平, 毛彩云, 杨永红, 李满秀*

(忻州师范学院化学系, 忻州 034000)

摘要: **目的** 优化虎杖中白藜芦醇的提取工艺。**方法** 以虎杖为原料, 运用超声辅助提取技术对虎杖中的白藜芦醇进行提取, 以乙醇溶液为溶剂, 考察溶剂浓度、时间、温度、功率、料液比等因素对提取效果的影响, 在单因素实验的基础上, 通过响应曲面法优化提取工艺。**结果** 最佳工艺参数为: 乙醇浓度 62.85%, 超声时间 37.92 min, 温度 60 °C, 料液比 1:19.45 (g/mL), 超声功率 240 W, 此条件下白藜芦醇的提取得率为 4.65%。**结论** 本研究改进白藜芦醇的提取工艺, 缩短提取时间, 提高提取得率, 可为白藜芦醇的提取和开发应用提供参考。

关键词: 超声辅助提取; 响应曲面法; 白藜芦醇

Optimization of ultrasonic-assisted extraction technology of resveratrol from *Polygonum Cuspidatum* by response surface methodology

CAO Yan-Rong, ZHAO Jun-Ping, MAO Cai-Yun, YANG Yong-Hong, LI Man-Xiu*

(Department of Chemistry, Xinzhou Teachers' University, Xinzhou 034000, China)

ABSTRACT: Objective To optimize the extraction process of resveratrol from *Polygonum Cuspidatum*. **Methods** The extraction of resveratrol from *Polygonum Cuspidatum* was achieved by ultrasound assistance. The effects of solvent concentration, ultrasound treatment time, extraction temperature, ultrasound power and material/liquid ratio on extraction efficiency were investigated using ethanol solution as solvent. On the basis of single-factor experiments, the extraction process was optimized by response surface methodology. **Results** The optimum conditions for extracting resveratrol from *Polygonum Cuspidatum* were as follows: ethanol concentration was 62.85%, ultrasonic time was 37.92 min, extraction temperature was 60 °C, material/liquid ratio was 1:19.45 (g/mL), and ultrasound power was 240 W. Under these optimum conditions, the yield of resveratrol was 4.65%. **Conclusion** This study improves the extraction process of resveratrol, shortens the extraction time and improves the extraction yield, which can provide references for the extraction and development of resveratrol.

KEY WORDS: ultrasonic-assisted extraction; response surface methodology; resveratrol

基金项目: 山西省大学生创新创业训练项目(2015381)、忻州师范学院大学生科技创新项目(2015)、忻州师范学院化学化工实践创新基地基金

Fund: Shanxi University Student Innovation and Entrepreneurship Training Program (2015381), Xinzhou Normal College Students' Science and Technology Innovation Project (2015) and Xinzhou Normal College Chemical Industry Practice Innovation Base Fund

*通讯作者: 李满秀, 教授, 主要研究方向为天然产物提取及测定。E-mail: Lmxxz@sohu.com

*Corresponding author: LI Man-Xiu, Professor, Department of Chemistry, Xinzhou Teachers' University, No.10, Peace West Street, Xinzhou 034000, China. E-mail: Lmxxz@sohu.com

1 引言

白藜芦醇是多酚类化合物,主要存在于葡萄、虎杖、花生等植物中,具有抗肿瘤,降低血小板聚集,预防和治疗动脉粥样硬化、心脑血管疾病的功效^[1,2]。因此,人们十分关注白藜芦醇提取及相关研究。目前,提取白藜芦醇主要采用溶剂浸提法^[3,4],但此法所需提取时间较长,对浸提温度有一定要求。超声辐射能产生强烈振动而具有空化效应及粉碎作用,可加速提取物质中有效成分向溶剂中转移,故有助于热敏性物质的提取^[5]。表面活性剂有很好的增溶作用,能降低表面张力,增加溶剂对提取物料的渗透性和润湿性,从而提高浸出效能和提取得率,在天然产物的提取中得到较好应用^[6,7]。本研究利用超声波和表面活性剂的协同作用,提高虎杖中白藜芦醇萃取效率,且采用 Desin Expert 软件对影响白藜芦醇提取得率几个因素的参数作响应曲面优化,改进白藜芦醇的提取工艺,缩短提取时间,提高提取得率,可为白藜芦醇的提取和开发应用提供参考。

2 材料与方 法

2.1 材料与仪器

虎杖:市售;白藜芦醇标准品($\geq 98\%$,西安沃森生物科技有限公司);无水乙醇(天津风船化学试剂科技有限公司); β -环糊精(北京奥博星生物技术责任有限公司)。

752N 紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);KQ-400KD 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);SHZ-D(III)循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司);AL204 电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司);FZ120 型植物粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 白藜芦醇标准曲线的绘制

准确称取白藜芦醇标准品 10.0 mg,用无水乙醇溶解并定容到 50 mL 容量瓶中,得到 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准溶液。吸取 2 mL 标准溶液置于 50 mL 容量瓶中,用无水乙醇稀释到刻度,得到 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准溶液。分别移取 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准溶液 0、1、2、3、4、5 mL 各置于 10 mL 比色管中,用无水乙醇稀释到刻度,摇匀,在最大吸收波长 306 nm 处^[2],以试剂空白作参比,测定其吸光度,绘制标准曲线。标准曲线的回归方程为: $A=0.0771C+0.012$, 相关系数 $r=0.9977$ 。表明白藜芦醇浓度与吸光度具有良好的线性关系。

2.2.2 白藜芦醇的提取

虎杖粉碎后过 40 目筛,准确称取 0.5000 g,加入一定浓度的乙醇溶液和 0.01 mol/L 的 β -环糊精,然后在一定的

超声功率、温度和时间超声提取,抽滤得到的滤液用于测定。取一定量的白藜芦醇滤液,进行梯度浓度稀释,测定 306 nm 波长下的吸光度值,根据白藜芦醇标准曲线方程计算白藜芦醇的含量^[8]。

白藜芦醇提取得率($\%$)=白藜芦醇质量浓度 \times 提取液体积 \times 稀释倍数/虎杖用量 $\times 100$

2.2.3 白藜芦醇提取单因素实验

影响白藜芦醇得率的因素有乙醇浓度、料液比、超声功率、提取时间、提取温度、 β -环糊精用量。本试验乙醇浓度定为 40%、50%、60%、70%、80%、90%;料液比(g/mL)定为 1:5、1:10、1:15、1:20、1:25;超声功率定为 160、200、240、280、320 W;提取时间定为 30、35、40、45、50 min;提取温度定为 40、50、60、70、80 $^{\circ}\text{C}$; β -环糊精用量定为 0、0.5、1.0、1.5、2.0 mL,分别进行单因素实验。

2.2.4 响应曲面优化设计实验

结合单因素实验结果,应用 Design Expert 7 Document 软件设计 3 因素 3 水平的试验,选取提取时间、料液比和乙醇浓度为主要因素对白藜芦醇提取效果进行响应曲面分析^[9-11],试验因素与水平设计见表 1。利用响应曲面法对虎杖中白藜芦醇的提取条件进行优化。

表 1 Box-Behnken 设计因素及水平表
Table 1 Factor and level table of Box-Behnken design

编码值	料液比 X_1 (g/mL)	乙醇浓度 X_2 (%)	提取时间 X_3 (min)
-1	1:15	50	35
0	1:20	60	40
1	1:25	70	45

3 结果与讨论

3.1 单因素实验结果分析

3.1.1 乙醇浓度的影响

由图 1 可知,乙醇浓度为 40%~60% 时,随乙醇浓度的增大,溶剂对白藜芦醇的亲合力逐渐增强,白藜芦醇的提取得率逐步提高,乙醇浓度为 60% 时,提取效果最佳。乙醇浓度超过 60% 时,白藜芦醇的提取得率开始下降,所以选用乙醇浓度为 60%。

3.1.2 料液比的影响

由图 2 可知,随着料液比的增加,白藜芦醇的提取得率缓慢提高,料液比为 1:20 时提取得率最高。其原因可能是增加浸提液用量,能增加传质推动力,有利于提取;但用量过大时会增大后续工艺的难度,增大能耗,也使白藜芦醇的损失增加。因此选取料液比为 1:20。

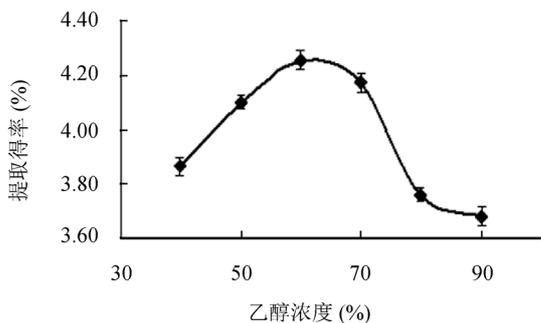


图 1 乙醇浓度对白藜芦醇提取得率的影响($n=3$)

Fig. 1 Effect of ethanol concentration on resveratrol yield ($n=3$)

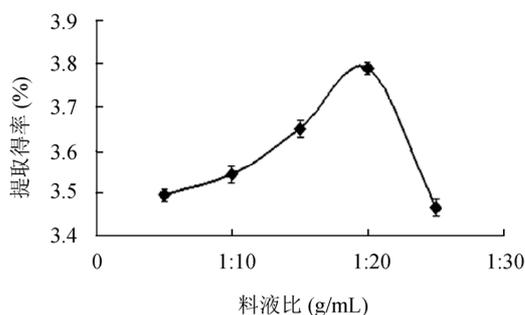


图 2 料液比对白藜芦醇提取得率的影响($n=3$)

Fig. 2 Effect of material/liquid ratio on resveratrol yield ($n=3$)

3.1.3 超声功率的影响

由图 3 可知, 随着超声波功率的不断增大, 白藜芦醇提取得率呈现出先升后降的趋势, 这是由于功率由弱到强导致空化作用和机械作用逐步加强, 促使白藜芦醇溶出率增加, 超声功率为 240 W 时, 白藜芦醇的提取得率最高。

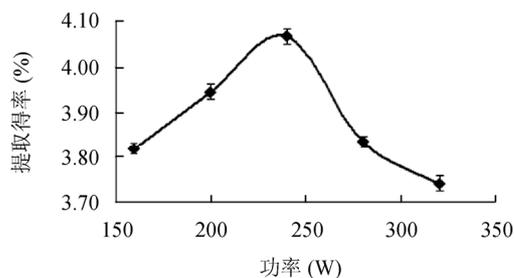


图 3 功率对白藜芦醇提取得率的影响($n=3$)

Fig. 3 Effect of ultrasound power on resveratrol yield ($n=3$)

3.1.4 提取时间的影响

由图 4 可知, 提取时间小于 40 min 时, 白藜芦醇的提取得率随时间增加先缓慢降低后快速升高, 而超过 40 min 时, 白藜芦醇的提取得率迅速下降。因此提取时间 40 min 最好。

3.1.5 提取温度的影响

由图 5 可知, 在温度低于 60 °C 时, 随温度升高, 提取

得率增加, 温度继续升高时, 由于白藜芦醇是热敏性物质, 提取得率反而降低, 因此 60 °C 提取效果最佳, 故提取温度选取 60 °C。

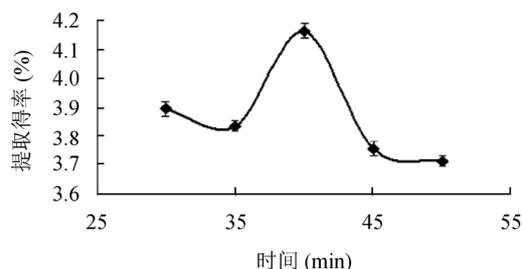


图 4 提取时间对白藜芦醇提取得率的影响($n=3$)

Fig. 4 Effect of ultrasound treatment time on resveratrol yield ($n=3$)

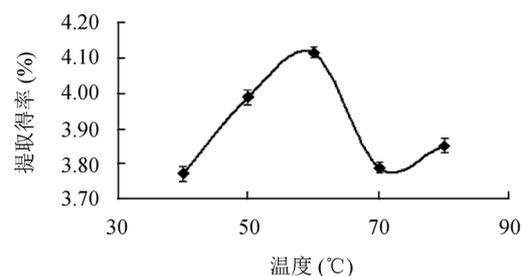


图 5 温度对白藜芦醇提取得率的影响($n=3$)

Fig. 5 Effect of extraction temperature on resveratrol yield ($n=3$)

3.1.6 β -环糊精的影响

由图 6 可知, β -环糊精溶液的加入量会影响提取得率, 其原因可能与白藜芦醇溶出后被 β -环糊精包合的程度有关。在一定范围内随 β -环糊精溶液体积增大, 白藜芦醇提取得率增加, 体积为 1 mL 时, 提取效果最佳; 但体积继续增加时, 提取得率反而降低。故选取 β -环糊精用量为 1 mL。

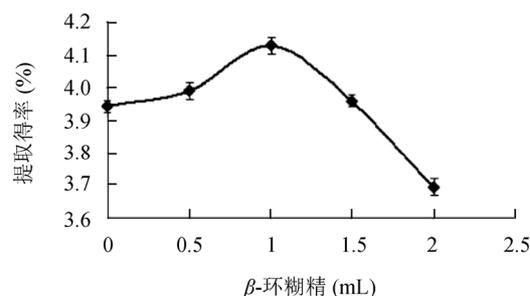


图 6 β -环糊精对白藜芦醇提取得率的影响($n=3$)

Fig. 6 Effect of β -cyclodextrin on resveratrol yield ($n=3$)

3.2 响应曲面法对超声波提取条件的优化

3.2.1 实验设计与结果

响应曲面法设计与试验结果见表 2。

表2 Box-Behnken 试验设计与结果
Table 2 Test design and results of Box-Behnken

试验号	因素			白藜芦醇 Y 提取得 率(%)
	X ₁ 料液 比(g/mL)	X ₂ 乙醇浓 度(%)	X ₃ 提取时 间 min	
1	-1	-1	0	3.34
2	1	-1	0	3.49
3	-1	1	0	3.92
4	1	1	0	3.57
5	-1	0	-1	4.15
6	1	0	-1	4.00
7	-1	0	1	3.29
8	1	0	1	3.65
9	0	-1	-1	3.15
10	0	1	-1	4.26
11	0	-1	1	3.63
12	0	1	1	3.25
13	0	0	0	4.56
14	0	0	0	4.56
15	0	0	0	4.60
16	0	0	0	4.52
17	0	0	0	4.64

3.2.2 建立模型方程与显著性检验

以 X_1 、 X_2 、 X_3 为自变量, 以白藜芦醇提取得率为响应值分析实验, 采用 Design Expert 软件对实验结果进行多元回归拟合^[12-15]。进行显著性检验, 结果见表 3。

表3 回归模型方差分析表
Table 3 Variance analysis of the regression equation

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	Pr>F
模型	4.493767	9	0.4999307	40.52585	<0.0001
X ₁	1.25E-05	1	1.25E-05	0.001015	0.9755
X ₂	0.245	1	0.245	19.88521	0.0029
X ₃	0.382813	1	0.382813	31.07004	0.0008
X ₁ X ₂	0.0625	1	0.0625	5.072758	0.0590
X ₁ X ₃	0.065025	1	0.065025	5.277697	0.0552
X ₂ X ₃	0.5476	1	0.5476	44.44548	0.0003
X ₁ ²	0.662781	1	0.662781	53.79407	0.0002
X ₂ ²	0.512002	1	1.512002	122.7203	<0.0001
X ₃ ²	0.696613	1	0.696613	56.53998	0.0001
失拟项	0.077925	3	0.25975	12.48798	0.0169
净误差	0.00832	4	0.00208	-	-
总计	4.580012	16	-	-	-

白藜芦醇提取得率预测值(Y)与编码自变量的 X_1 、 X_2 、 X_3 二次多项回归方程:

$$Y = -65.362 + 0.58105X_1 + 1.0826X_2 + 1.59985X_3 - 0.0025X_1X_2 + 0.0051X_1X_3 - 0.0074X_2X_3 - 0.01587X_1^2 - 0.00599X_2^2 - 0.01627X_3^2$$

由表 3 可以看出, 该回归模型具有高度的显著性 ($P < 0.0001$), 其复相关系数为 0.9569, 表明该模型拟合程度较好, 响应值变化中 95.69% 与所选变量有关, 即来源于乙醇浓度、料液比和提取时间。因此, 回归模型能较好地描述各因素与相应值之间的关系, 但各实验因子对响应值的影响不是简单的线性关系, 通过表 3 中 F 值的大小能判断各因素对提取白藜芦醇得率的影响程度, F 值越大, 影响作用越强。由此可得各因素对白藜芦醇得率的影响程度为: 提取时间 > 乙醇浓度 > 料液比, 其中提取时间的影响达到极显著水平 ($P = 0.0008$)。

利用 Design Expert 软件对表 2 中的数据进行二次多元回归拟合, 所得到的二次回归方程的响应曲面见图 7~图 9。

由图 7~图 9 可直观的看出, 提取时间、乙醇浓度的交互作用较显著。等高线的形状可反映出交互效应的强弱大小, 椭圆形表示两因素交互作用显著, 而圆形则与之相反。对回归方程求导, 并令其等于零, 可以得到曲面的最大点, 即 3 个主要因素的最佳水平值, 分别为: $X_1 = 19.45$, $X_2 = 62.85$, $X_3 = 37.92$, 即得到白藜芦醇提取的最佳条件为: 料液比 1:19.45、乙醇浓度 62.85%、提取时间 37.92 min。在此条件下进行提取实验, 白藜芦醇提取得率为 4.65%, 与预测值偏差较小, 说明回归方程与实际情况拟合较好, 充分验证了所建模型的正确性, 说明响应面法适用于对超声辅助提取白藜芦醇的工艺进行回归分析和参数优化。

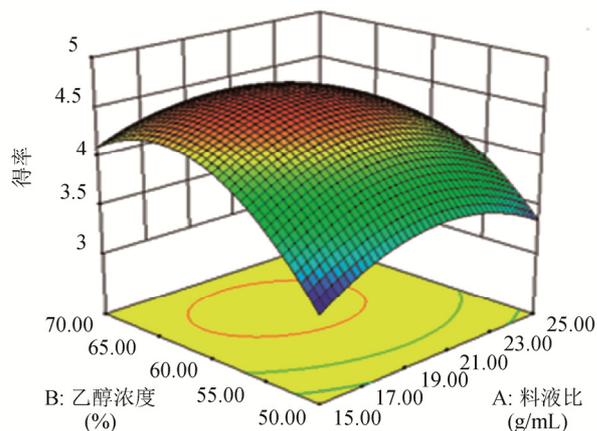


图7 乙醇浓度和料液比对提取得率影响的响应曲面

Fig. 7 Response surface of the effects of ethanol concentration and material/liquid ratio

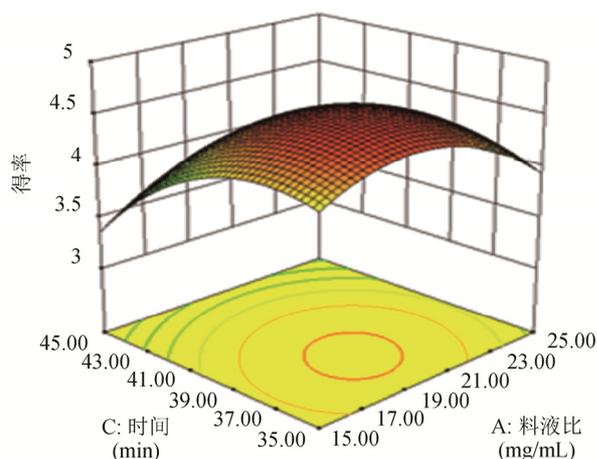


图8 提取时间和料液比对提取得率影响的响应曲面

Fig. 8 Response surface of the effects of ultrasonic extraction time and material/liquid ratio

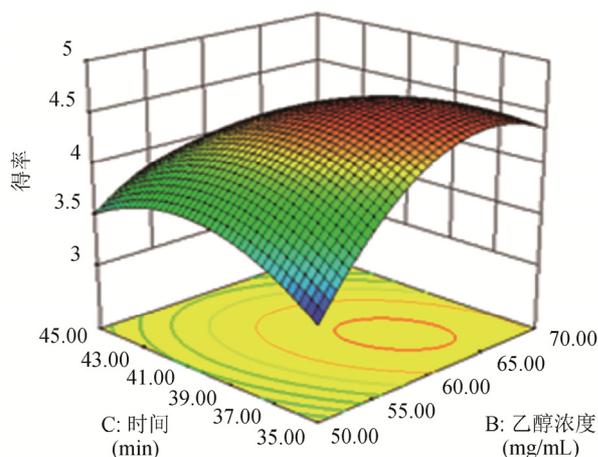


图9 提取时间和乙醇浓度对提取得率影响的响应曲面

Fig. 9 Response surface of the effects of extraction time and ethanol concentration

4 结论

与其它提取方法相比,在白藜芦醇超声提取过程中,加入适量一定浓度的表面活性剂 β -环糊精可以有效地提高白藜芦醇提取得率。

在单因素试验的基础上应用 Design Expert 7 Document 软件 3 因素 3 水平的试验,确定了虎杖中白藜芦醇超声提取的优化工艺条件为:乙醇浓度: 62.85%、提取时间: 37.92 min、液料比: 1:19.45、超声功率: 240 W、提取温度: 60 °C、白藜芦醇的提取得率达 4.65%。由此证明,响应曲面法对虎杖中白藜芦醇超声提取工艺进行优化可获得最优的工艺参数,从而为进一步的开发研究奠定基础。

参考文献

- [1] 李先宽, 李赫宇, 李帅, 等. 白藜芦醇研究进展[J]. 中草药, 2016, 47(14): 2568-2578.
Li XK, Li HY, Li S, *et al.* Advances in study on resveratrol [J]. Chin Tradit Herb Drug, 2016, 47(14): 2568-2578.
- [2] 刘连新, 刘郁, 岑朝健. 液相色谱测定葡萄酒中白藜芦醇含量的方法研究[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(21): 103-105.
Liu LX, Liu Y, Cen CJ. Study on the method of determination of content of resveratrol in wine by HPLC [J]. Food Res Dev, 2014, 35(21): 103-105.
- [3] 董爱文, 姚姝凤, 许新军, 等. 虎杖果实中白藜芦醇与大黄素提取工艺优化及其与 3 类根茎含量比较[J]. 食品科学, 2016, 37(10): 12-16.
Dong AW, Yao SF, Xu XJ, *et al.* Optimization of simultaneous extraction of resveratrol and emodin from fruits of *Polygonum cuspidatum* and comparison of their contents with those of rhizomes of male and female plants [J]. Food Sci, 2016, 37(10): 12-16.
- [4] 葛维娟, 白换换, 常娇, 等. 不同提取方法对葡萄皮中白藜芦醇含量的影响[J]. 现代食品, 2016, 3(5): 90-91.
Ge WJ, Bai HH, Chang J, *et al.* Effect of different extraction methods on the content of resveratrol from grape skins [J]. Mod Food, 2016, 3(5): 90-91.
- [5] 毛俊霞, 张文君, 李曦默, 等. 响应面法优化葡萄叶中白藜芦醇的提取条件[J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(12): 2027-2032.
Mao JX, Zhang WJ, Li XM, *et al.* Optimization of extraction conditions of resveratrol from grape leaf by response surface methodology [J]. Nat Prod Res Dev, 2014, 26(12): 2027-2032.
- [6] 王周利, 袁亚宏, 刘宇璇, 等. 响应面法优化 β -环糊精提取葡萄叶白藜芦醇工艺[J]. 食品科学, 2016, 37(22): 13-19.
Wang ZL, Yuan YH, Liu YX, *et al.* Response surface optimization of extraction of resveratrol from grape vine leaves using β -cyclodextrin [J]. Food Sci, 2016, 37(22): 13-19.
- [7] 陈帅, 王慧竹, 钟方丽, 等. 响应面法优化白藜芦醇 β -环糊精包合物的制备工艺[J]. 食品工业科技, 2015, 36(9): 255-260.
Chen S, Wang HZ, Zhong FL, *et al.* Optimization of the preparation process of resveratrol β -cyclodextrin inclusion compound by response surface methodology [J]. Sci Technol Food Ind, 2015, 36(9): 255-260.
- [8] 黎继烈, 励建荣, 李忠海, 等. 超声波辅助提取花生白藜芦醇工艺研究[J]. 中国粮油学报, 2009, 24(6): 118-122.

- Li JL, Li JR, Li ZH, *et al.* Ultrasonic extraction of resveratrol from peanut [J]. *J Chin Cere Oils Ass*, 2009, 24(6): 118–122.
- [9] 刘树兴, 王轶钦. 响应面法优化虎杖中白藜芦醇提取工艺的研究[J]. *陕西科技大学学报*, 2010, 28(1): 70–74.
- Liu SX, Wang YQ. Optimization of extraction of technique resveratrol from giant knotweed via response surface methodology [J]. *J Shaanxi Univ Sci Technol*, 2010, 28(1): 70–74.
- [10] 李子江, 唐琳, 刘萍, 等. 响应面法优化玫瑰花花色苷提取工艺的研究[J]. *食品科技*, 2009, 34(11): 221–224.
- Li ZJ, Tang L, Liu P, *et al.* Optimization of anthocyanin extraction from roses by using response surface methodology [J]. *Food Sci Technol*, 2009, 34(11): 221–224.
- [11] 陈琼玲, 薛霖莉, 樊迎, 等. 响应面法优化桑葚果渣中白藜芦醇的提取工艺[J]. *山西农业科学*, 2016, 44(6): 836–839.
- Chen QL, Xue LL, Fan Y, *et al.* Mingcheng study on optimization of extraction process of resveratrol from mulberry pomace by response surface methodology [J]. *J Shanxi Agric Sci*, 2016, 44(6): 836–839.
- [12] 董树国, 陆钊, 曹红梅. 表面活性剂辅助提取桑叶总黄酮的工艺研究[J]. *安徽农业科学学报*, 2011, 39(32): 19778–19780.
- Dong SG, Lu Z, Cao HM. Process research of the surfactant-assisted extraction of total flavonoids extraction from mulberry leaves [J]. *J Anhui Agric*, 2011, 39(32): 19778–19780.
- [13] 刘婷, 王燕, 李韵, 等. 响应面法优化超临界 CO₂ 萃取刺葡萄渣中白藜芦醇工艺[J]. *食品工业科技*, 2015, 36(4): 193–198.
- Liu T, Wang Y, Li Y, *et al.* Optimization of supercritical CO₂ extraction of resveratrol from *Vitis davidii* Foex fruit wine residues by response surface methodology [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2015, 36(4): 193–198.
- [14] 王晓阳, 唐琳, 赵奎. 响应面法优化刺槐花多酚的超声提取工艺[J]. *食品科学*, 2011, 32(2): 66–70.
- Wang XY, Tang L, Zhao L. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Robinia pseudoacacia* L. flowers by response surface methodology [J]. *Food Sci*, 2011, 32(2): 66–70.
- [15] 孙磊磊, 康健, 邹积赞. 响应面优化酶法辅助提取葡萄叶白藜芦醇工艺[J]. *食品科技*, 2015, 40(2): 276–281.
- Sun LL, Kang J, Zou JZ. Optimization of extraction process of resveratrol from grape leaves by enzyme assistant method of response surface experiments [J]. *Food Sci Technol*, 2015, 40(2): 276–281.

(责任编辑: 武英华)

作者简介



曹艳蓉, 本科生, 主要研究方向为天然产物提取及测定。

E-mail: 389258163@qq.com



李满秀, 教授, 主要研究方向为天然产物提取及测定。

E-mail: Lmxxz@sohu.com