

桑叶中白藜芦醇提取工艺的研究

吴旭, 饶力群*, 彭国平, 杨华

湖南农业大学生物科学技术学院, 长沙 410128

摘要: 白藜芦醇因其具有多种保健作用而受到人们广泛关注, 经研究测定在桑叶中有一定的含量。本文采用有机溶剂回流法提取桑叶中的白藜芦醇, 确立了提取的最佳条件: 提取溶剂为乙醇; 回流时间为 105 min; 乙醇浓度为 80%; 物料比为 1:13; 回流温度为 60 °C。原料经回流提取、过滤除渣后旋蒸得到白藜芦醇浓缩液, 再用高效液相色谱法测定白藜芦醇的含量。

关键词: 白藜芦醇; 桑叶; 提取工艺; 高效液相色谱

中图分类号: O69

文献标识码: A

Extraction Technology of Resveratrol from Mulberry Leaf

WU Xu, RAO Li-qun*, PENG Guo-ping, YANG Hua

College of Bioscience and biotechnology, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China

Abstract: The mulberry leaves contain amount of resveratrol which has various health effects. In this experiment, the optimum conditions of extracting resveratrol from the mulberry leaf with the reflux was established as follows: the solvent was alcohol, the temperature was 60 °C, the time was 105 minutes, the concentration of alcohol was 80%, and the material rate was 1:13. And the content of resveratrol was determined by HPLC.

Key words: resveratrol; mulberry leaf; extraction technology; HPLC

白藜芦醇因其良好的生物活性受到了人们的关注, 1940 年首次从毛叶藜 (*Veratrum grandiflorum*) 的根部获得白藜芦醇^[1], 该化合物主要分布在豆科 (13 属)、葡萄科 (4 属)、桑科 (6 属)、蓼科 (2 属) 等植物中。白藜芦醇在癌症的起始、促进和发展三个主要阶段均有化学抗癌活性, 同时具有降血脂、抑制血小板凝聚、调节脂蛋白代谢、保护肝脏、保护缺血器官、抗 HIV、抗氧化及抑菌等作用^[2-5]。由于其临床效果突出, 以白藜芦醇为主要成分的药品或保健品需求量很大, 很受关注。桑科桑属植物桑 (*Morus alba* L.) 是重要经济树种, 桑叶、茎皮纤维、木材、果实均有重要的经济价值, 根皮 (桑白皮)、枝、叶均可入药, 具有不同的性味功能。目前大部分地区将桑作为饲用栽培, 每年除了饲养桑蚕外, 桑树的很多部位都没得到利用。目前, 天然白藜芦醇主要从虎杖 (蓼科)、葡萄皮 (葡萄科) 中进行提取, 但原材料获取有限, 若能从桑树中提取白藜芦醇得到突

破, 定能带来可观的社会和经济效益。因而, 对桑进行深加工意义非凡^[6-9]。探索从桑中提取白藜芦醇, 不但可以解决白藜芦醇生产原料问题, 还可以增加农民收入, 服务地方经济, 意义重大。

1 实验仪器、药品

旋转蒸发器、回流提取仪、高效液相色谱仪 (Agilent 1100)、水浴锅、桑叶、乙醇、乙酸乙酯、丙酮、甲醇、甲醇 (HPLC 级)、白藜芦醇标准品 (Sigma 99%)。

2 实验方法

2.1 白藜芦醇的 HPLC 法测定

2.1.1 标准曲线的制作

高效液相色谱法 (High performance liquid chromatography, HPLC), 色谱柱为 Hypersil ODS 柱 (250 mm × 4.6 mm); 流动相为甲醇和水; 298 nm 下测定; 流速为 1 mL/min。制作标准曲线, 精密称取白藜芦醇标准样品约 0.02 g, 置 50 mL 棕色容量瓶中, 配成 400 mg/L 的储备液, 加甲醇溶解并稀释至刻度摇匀。再分别稀释配成 100、200、300 mg/L 和 400 mg/L

收稿日期: 2009-11-10 接受日期: 2010-04-21

基金项目: 科技部国际合作项目 (2007DFA40680), 湖南省科技计划项目 (06SK3061)。

* 通讯作者 E-mail: raoliqun@163.com

L 标准液,进样 20 μL ,再测定相应的峰面积。以峰面积为纵坐标,白藜芦醇的质量浓度为横坐标绘制标准曲线。

2.1.2 样品中的白藜芦醇含量测定

提取液离心后得上清液,每次取 20 μL ,采用峰面积外标法测定浓度。待测桑叶提取物中白藜芦醇的 HPLC 图谱分析,采用测定标准品相同的条件,其中溶剂浓度为 80% 乙醇、料液比为 1:15、温度为 60 $^{\circ}\text{C}$ 、提取时间为 90 min 的条件下提取的样品如图 3 所示。

2.2 精密性试验

精密吸取上述标样溶液用微孔滤膜(0.25 μm)过滤,取样 20 μL ,注入液相色谱仪,测定峰面积,连续进样 5 次。

2.3 稳定性试验

取同一样品的溶液分别于 0、2、4、6、8 h 进行测定,记录色谱峰面积。

2.4 重复性试验

取同一批号样品,精密称桑叶 10 g,置于圆底烧瓶中,加入 100 mL 80% 浓度的乙醇,在 55 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅中进行回流提取 90 min。提取液过滤后置于冷冻真空旋转蒸发仪中进行浓缩,得到固体白藜芦醇和其他杂质。用 10 mL 甲醇溶液进行溶解,超声处理 10 min,用甲醇补液至刻度后,放于冰箱中静置,两天后取上清液离心 10 min。

2.5 加样回收实验

取同一批号已知含量样品溶液,在样品溶液中加入白藜芦醇标样进行回收率实验,按 2.1 方法测定,结果见表 3。

2.6 不同提取条件对白藜芦醇的影响

2.6.1 不同溶剂对提取白藜芦醇的影响

称取桑叶粉末 10.00 g 4 份,分别放入 1~4 号圆底烧瓶,分别加入 150 mL 乙醇、乙酸乙酯、甲醇、丙酮回流提取,乙醇、甲醇、丙酮浓度为 80%,提取次数为 1 次,水浴锅温度为 60 $^{\circ}\text{C}$,提取时间分别为 90 min。提取液过滤除渣后,用旋转蒸发仪进行减压浓缩,用 10 mL 的甲醇溶解浓缩物,再用离心机离心,取上清液,放入 10 mL 的试管中进行保存。再用高效液相色谱法测定白藜芦醇的含量。

2.6.2 浓度对提取白藜芦醇的影响

称取桑叶粉末 10.00 g 5 份,放入 1~5 号圆底烧瓶,提取时间 90 min,提取温度 60 $^{\circ}\text{C}$,提取次数为 1 次,乙醇浓度分别为:50%、60%、70%、80%、

90%,提取液过滤除渣后减压浓缩,用甲醇溶解至 10 mL,再离心分离,以后操作与上面相同。

2.6.3 料液比对提取白藜芦醇的影响

称取桑叶粉末 10.00 g 5 份,放入 1~5 号圆底烧瓶,提取时间 90 min,提取温度为 60 $^{\circ}\text{C}$,乙醇浓度为 80%,提取次数为 1 次,乙醇用量为:90、110、130、150、170 mL,提取液过滤除渣后减压浓缩,用甲醇溶解至 10 mL,再离心分离,以后操作与上面相同。

2.6.4 提取温度对提取白藜芦醇的影响

称取药桑粉末 10.00 g 5 份,放入 1~5 号圆底烧瓶,分别加入 150 mL 乙醇回流提取,乙醇浓度为 80%,提取时间 90 min,提取温度分别为 40、50、60、70、80 $^{\circ}\text{C}$ 。提取液过滤除渣后减压浓缩,用甲醇溶解至 10 mL,再离心分离,以后操作与上面相同。

2.6.5 提取时间对提取白藜芦醇的影响

称取药桑粉末 10.00 g 5 份,放入 1~5 号圆底烧瓶,提取时间分别为 30、45、60、75、90 min,提取温度为 60 $^{\circ}\text{C}$,乙醇用量为 150 mL,提取液过滤除渣后减压浓缩,用甲醇溶解至 10 mL,再离心分离,以后操作与上面相同。

3 实验结果分析

3.1 白藜芦醇的 HPLC 法测定结果

3.1.1 如图 1 所示,峰面积和浓度呈良好线性关系。白藜芦醇的出峰时间为 3.958 min,其图谱如图 2。

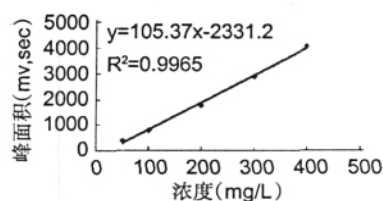


图 1 标准曲线图

Fig. 1 The curve of standard graph

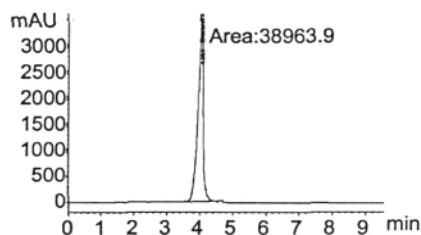


图 2 白藜芦醇标准样品的 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC chromatogram of resveratrol standard simple

3.1.2 样品中的白藜芦醇含量测定

从图3可见,在3.930 min处有一白藜芦醇吸收峰,其峰值很高,峰型完整。其峰面积为21200.6,利用面积外标法得到白藜芦醇的含量为224.324 mg/L,最后求得其百分含量为0.0224%。

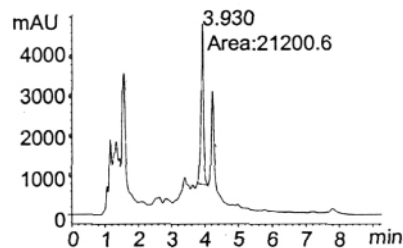


图3 样品提取液的 HPLC

Fig. 3 HPLC chromatogram of μL berry extract

3.2 精密度试验结果

按照2.2所示的方法,实验结果表明样品的精密度良好,RSD为0.51%。见表1。

表1 精密度试验结果

Table 1 The experimental result of the exactness

试验号(Test No.)	1	2	3	4	5	RSD (%) (n = 5)
峰面积(Mv. sec)	38963.91	38852.50	38664.89	38576.46	38402.18	0.51%

3.3 稳定性试验结果

按照2.3所示的方法,结果表明在8 h内峰面

积无明显变化,RSD为0.57%,见表2。

表2 稳定性试验结果

Table 2 The experimental result of the stableness

时间(Time h)	0	2	4	6	8	RSD (%) (n = 5)
峰面积(Mv. sec)	38748.49	38961.04	38698.30	38529.05	38703.65	0.57%

3.4 重复性试验结果

取制得上清液用微孔滤膜(0.25 μm)滤过,按

品溶液20 μL 进样,记录色谱峰面积,计算RSD为0.49%。

2.4方法制备5份供试品溶液,分别精密吸取供试

3.5 加样回收实验

表3 加样回收实验结果

Table 3 The experiment result of sample recovery

样品序号(Sample No.)	1	2	3	4	5
加入量(Dosage μL)	0.4	0.45	0.5	0.55	0.6
峰面积(Mv. sec)	33950	35416	36706	38767	40375
回收率(Recovery)	98.54	97.98	97.09	98.22	98.29

平均回收率 = 98.02% RSD = 0.57%

3.6 不同提取条件对白藜芦醇的影响

3.6.1 不同溶剂对提取白藜芦醇的影响

按照2.5所示的方法,不同的有机提取剂对白藜芦醇提取的影响结果如表4所示。由表4可看

出,不同溶剂对桑叶中的白藜芦醇提取效果不同,白藜芦醇提取效果不同,考虑到丙酮与甲醇的毒性及挥发性均较乙醇强。因此,选择安全、无毒、易回收的乙醇为提取剂。

表4 不同有机提取剂对白藜芦醇提取的影响

Table 4 Effort of different agents on resveratrol extraction

溶剂 Solvents	80% 乙醇 80% Ethanol	80% 甲醇 80% Methanol	80% 丙酮 80% Acetone	乙酸乙酯 Ethyl acetate
峰面积(Mv. Sec)	21200.6	23625.8	25500.4	2567.2
含量(Content %)	0.0224%	0.0247%	0.0265%	0.0048%

3.6.2 浓度对提取白藜芦醇的影响

按照 2.6 所示的方法,不同的乙醇浓度对白藜芦醇提取的影响结果如表 5 所示。由表 5 可知,随着乙醇体积分数的增大,白藜芦醇的提取率增加。

当乙醇的体积分数大于 80% 后,提取效果增加不明显,所以选择 70%、80%、90% 的乙醇浓度为三个水平,进行正交试验。

表 5 不同乙醇浓度对白藜芦醇提取的影响

Table 5 Effort of different concentration of alcohol on resveratrol extraction

溶剂 Solvents	50% 乙醇 50% Ethanol	60% 乙醇 60% Ethanol	70% 乙醇 70% thanol	80% 乙醇 80% Ethanol	90% 乙醇 90% Ethanol
峰面积(Mv. sec)	12145.2	15643.5	18540.4	21200.6	21476.5
含量(Content)	0.0139%	0.0172%	0.0199%	0.0224%	0.0227%

3.6.3 料液比对提取白藜芦醇的影响

按照 2.7 所示的方法,由表 6 可知,随着料液比的增加,白藜芦醇的提取率增加,但增加的效果不明

显,所以选择 1:13、1:15、1:17 为三个水平,进行正交试验。

表 6 不同料液比对白藜芦醇提取的影响

Table 6 Effort of different material fluid ratio on resveratrol extraction

料液比(Solid-liquid ratio)	1:9	1:11	1:13	1:15	1:17
峰面积(Mv. sec)	19796.4	20762.6	21200.6	21293.1	21356.3
含量(Content, %)	0.0211%	0.0220%	0.0224%	0.0225%	0.0226%

3.6.4 提取温度对提取白藜芦醇的影响

按照 2.8 所示的方法,由表 7 可知,随着温度的增大,藜芦醇的提取率增加,当温度大于 70 ℃,增加

的效果不明显,所以选择 50、60、70 ℃ 为三个水平,进行正交试验。

表 7 不同温度对白藜芦醇提取的影响

Table 7 Effort of different temperature on resveratrol extraction

温度(Temperature)	40 ℃	50 ℃	60 ℃	70 ℃	80 ℃
峰面积(Mv. sec)	17985.4	18144.7	19165.4	21200.6	21497.5
含量(Content, %)	0.0194%	0.0196%	0.0205%	0.0224%	0.0227%

3.6.5 提取时间对提取白藜芦醇的影响

按照 2.8 所示的方法,由表 8 可知,随着提取时间的增加,白藜芦醇的提取率增加。当提取时间大

于 90 min 后,提取效果增加不明显,所以选择 75、90、105 min 为三个水平,进行正交试验。

表 8 不同时间对白藜芦醇提取的影响

Table 8 Effort of different time on resveratrol extraction

时间(Time)	45 min	60 min	75 min	90 min	105 min
峰面积(Mv. sec)	14325.9	17036.6	19565.4	21200.6	21297.5
含量(Content)	0.0159%	0.0185%	0.0209%	0.0224%	0.0225%

4 正交实验

确定好四因素三水平后,每次称取 10 g 桑叶,在相应的试验条件下进行回流提取,提取液过滤除渣后,用旋转蒸发仪进行减压浓缩,用 10 mL 的甲醇

溶解浓缩物,再用离心机离心,取上清液,放入 10 mL 的试管中进行保存。再用高效液相色谱法测定白藜芦醇的含量,确定最佳的提取条件。

为了保证实验的准确性和实用性,我们在上述的基础上做了四因素三水平正交因素水平表确定如

下:乙醇浓度(A)分别是70%、80%、90%,物料比(B)分别是1:13、1:15、1:17,温度(C)分别为50、60、70℃,提取时间(D)分别为75、90、105 min,所得结果如表8所示。

表9 白藜芦醇提取的正交试验设计

Table 9 Orthogonal design and res μ Lt of the extraction of resveratrol

序号 Number	A(乙醇浓度%) Ethanol concentration	B(料液比) Solid-liquid ratio	C(提取温度℃) Extract time	D(时间 min) Time	峰面积 (Mv \cdot sec)
1	1	1	1	1	13057.4
2	1	2	2	2	17086.7
3	1	3	3	3	17986.3
4	2	1	2	3	21223.5
5	2	2	3	1	18343.1
6	2	3	1	2	19032.9
7	3	1	3	2	21879.5
8	3	2	1	3	20542.6
9	3	3	2	1	18946.2
R ₁	16043.5	18720	17544.3	16782.2	
R ₂	19533.1	18657.5	19085.4	19333	
R ₃	20456.1	18655.1	19402.9	19917.3	
R	4412.6	64.9	1858.6	3135.1	

由表9可知,回流提取法提取桑叶中的白藜芦醇对含量的影响因素最显著的为乙醇浓度,其次为提取时间和温度,料液比对提取的影响并不显著。最佳提取条件可以设为A₃B₁C₃D₂,但考虑到80%与90%乙醇提取的效果差不多,而且可节约成本,所以选用A₂B₁C₂D₃,即乙醇的浓度为80%,料液比为1:13,提取温度为60℃,提取时间为105 min。此条件下提取白藜芦醇的含量可达到0.0225%。

5 结论

本实验采用HPLC法测定桑叶提取物中白藜芦醇的含量,方法简便,结果可靠。采用有机溶剂乙醇回流提取的方法,通过对桑叶的回流提取过程中影响有效成分的因素进行考察,分别对乙醇浓度、料液比、提取温度以及提取时间做单因素的水平实验,然后采用正交实验对提取工艺条件进行最优化,最后确定提取的条件为:在60℃下,乙醇浓度为80%,以1:13(g/mL)的用量,提取时间为105 min。

参考文献

1 Ferrero ME, Bertelli AA, Pellegatta F, et al. Phytoalexin-resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) modulates granulocyte- and monocyte endothelial adhesion. *Transplant Proc*, 1998,

30: 4191-4193.

- 2 Wang Z(王征), Luo ZM(罗泽民), Deng LW(邓林伟). The pharmacologic mechanism and synthesis of resveratrol. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发) 2003, 15: 178-181.
- 3 Meng ZR(孟昭仁), Xi HM(奚洪民), Liu JB(刘进帮). Recent development of extraction, purification and identification of resveratrol. *Chem World*(化学世界) 2002, 16: 511-513.
- 4 Xu PP(徐培平), He JJ(何家靖), Zhu YT(朱宇同), et al. The potential synergistic activity of resveratrol development in combination therapy of the murine AIDS. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发) 2008, 18: 577-582.
- 5 Chen P(陈鹏), Yang LC(杨丽川), Lei WY(雷伟亚), et al. Effects of polydltin on platelet aggregation and platelet cytosolic calcium. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2005, 17: 21-25.
- 6 Xiang Y(向阳), Zhang T(张彤), Zhang X(张焯). Quantitative analysis of resveratrol from grape seeds and grape skins by high performance liquid chromatography method. *J Hygiene Res*(卫生研究) 2003, 32: 289-294.
- 7 He XM(何雪梅), Liao ST(廖森泰), Liu JP(刘吉平). Research progress on nutrient and functional components and pharmacology of mulberry. *Canye kexue*(蚕业科学) 2004, 30: 390-394.

(下转第448页)

1), 121.62 (C-6), 120.01 (C-6'), 116.63 (C-5'), 115.72 (C-5), 115.40 (C-8), 114.93 (C-2'), 112.81 (C-2), 72.74 (C-8'), 51.92 (OCH₃), 48.55 (C-4'), 36.15 (C-7'). 以上数据与文献^[7]报道的基本吻合, 故化合物被鉴定为迷迭香酸甲酯。

化合物 6 黄色无定型粉末, mp. 203 ~ 205 °C; ESI-MS (neg.) *m/z*: 285 [M-H]⁻; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ: 12.96 (1H, s, 5-OH), 6.65 (1H, s, H-3), 6.17 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-6), 6.43 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-8), 7.41 (1H, dd, *J* = 8.4, 2.0 Hz, H-6'), 7.39 (1H, *J* = 2.0 Hz, H-2'), 6.87 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5'); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ: 181.57 (C-4), 164.07 (C-2), 163.83 (C-7), 161.41 (C-5), 157.23 (C-9), 149.63 (C-4'), 145.67 (C-3'), 121.46 (C-1'), 118.90 (C-6'), 115.95 (C-5'), 113.31 (C-2'), 103.63 (C-10), 102.80 (C-3), 98.76 (C-6), 93.76 (C-8). 以上数据与文献^[8]报道的基本吻合, 故化合物被鉴定为木犀草素。

化合物 7 黄色无定型粉末, mp. 275 ~ 277 °C; ESI-MS (neg.) *m/z*: 285 [M-H]⁻; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ: 12.96 (1H, s, 5-OH), 10.76 (1H, s, 3-OH), 10.09 (1H, s, 7-OH), 9.38 (1H, s, 4'-OH), 8.03 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, H-2', 6'), 6.91 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, H-3', 5'), 6.42 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-8), 6.18 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-6'); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ: 175.88 (C-4), 163.87 (C-7), 160.69 (C-9), 159.17 (C-4'), 156.15 (C-5), 146.80 (C-2), 136.63 (C-3), 129.48 (C-2', C-6'), 121.64 (C-1'), 115.41 (C-3', C-5'), 103.02 (C-10), 98.18 (C-6), 93.45 (C-8). 以上数据与文献^[8]报道的基本吻合,

故化合物被鉴定为山奈酚。

化合物 8 白色粉末, 5% 硫酸乙醇溶液显色呈紫红色, Molish 反应阳性。与胡萝卜苷标准品混合点样, 经 TLC 对照分析, 确定该化合物为胡萝卜苷。

参考文献

- 1 Liu YM (刘勇民). 维吾尔药志(上). Xinjiang: Xinjiang keji weisheng chubanshe, 1999: 405-407.
- 2 Keyvan D, Damien D, et al. Chemical composition and antioxidant activity of Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extracts. LWT 2007, 40: 1655-1663.
- 3 Jose A, Bravo B, et al. Bioactive phenolic glycosides from *Amburana cearensis*. *Phytochemistry*, 1999, 50: 71-74.
- 4 Zheng XK (郑晓珂), Li Q (李钦), Feng WS (冯卫生). Studies on water-soluble chemical constituents of *Rabdosia rubescens*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发) 2004, 16: 300-302.
- 5 Shi SY (施树云), Zhou HH (周宏灏), et al. Chemical constituents from *Neo-Taraxacum siphonathum*. *China J Chin Mat Med* (中国中药杂志) 2009, 34: 1002-1004.
- 6 Yu ZB (于志斌), Wu X (吴霞), Ye YH (叶蕴华), et al. Chemical constituents of *Glechoma longituba*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发) 2008, 20: 262-264.
- 7 Duan LX (段礼新), Yu ZJ (余正江), et al. Chemical constituents in the fraction of calming cough and asthma of *Sanz-iyangqintang*. *Shenyang Yaokexue Xuebao* (沈阳药科大学学报) 2007, 24: 679-681.
- 8 Gu HF (古海锋), Chen RY (陈若芸), et al. Studies on chemical constituents in herbs of *Dracocephalum moldavica*. *China J Chin Mat Med* (中国中药杂志) 2004, 29: 232-234.

(上接第 560 页)

8 Zhang M (张敏), Cao Y (曹庸), Yu HZ (于华忠). Preliminary study on extraction process of resveratrol from *Polygonum guspidatum*. *J Chem Ind Forest Prod* (林产化工通讯) 2004, 38(3): 6-9.

9 Li H (李华), Zhang YL (张予林), Yuan CL (袁春龙), et al. Research status on the analytical methods of Resveratrol in grape and wine. *J Chin Inst Food Sci Technol* (中国食品学报) 2005, 5: 104-108.