

葡萄皮籽提取物中白藜芦醇的含量测定及其凝胶剂的制备工艺

华芳,施伶俐,唐晓敏

(安徽新华学院药学院,安徽合肥 230088)

摘要:为研究葡萄皮籽提取白藜芦醇的最优提取条件,采用比色法,在306 nm处测定葡萄皮籽提取物中白藜芦醇的含量,发现白藜芦醇在2.16~10.8 mg/L时,线性关系良好,方法稳定可行;为研究白藜芦醇凝胶剂的最佳制备工艺,选用卡波姆-940为凝胶剂的基质,经单因素和正交试验,筛选白藜芦醇凝胶剂的最佳制备方法,并测定其含量,发现通过优选工艺制备的白藜芦醇凝胶剂外观呈亮白色,均匀细腻,涂展性好。

关键词:白藜芦醇;含量测定;凝胶剂;制备工艺

中图分类号:TS255

文献标识码:A

文章编号:1671-5322(2017)04-0054-04

白藜芦醇(Resveratrol)是一种非黄酮类多酚化合物,广泛存在于天然植物及其果实中,如葡萄、虎杖等^[1],具有抗炎、抗氧化、抗自由基、延缓衰老、调节血脂、改善胃肠道功能(对胃粘膜有辅助保护作用)和美容的作用^[2-3]。最新研究表明,白藜芦醇还可抑制乳腺癌细胞的增殖^[4-5],延缓糖尿病肾病的恶化^[6-7]。

本文以葡萄皮籽为研究对象,因为研究发现葡萄的果皮、果梗、种籽、叶柄中均含有白藜芦醇,但以葡萄果皮中含量最高^[8];而且在日常葡萄酒及其糕点及饮品制作中均是去皮去籽,并将其丢弃不用,一定程度上造成了资源浪费。因此,对葡萄皮籽中白藜芦醇的提取工艺进行研究,并将所得的白藜芦醇制成凝胶剂,为后期药物制剂、保健品、化妆品的综合利用开发提供方便。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

紫外-可见分光光度计:上海天美科学有限公司UV1000型

电子天平:上海良平仪器仪表有限公司FA2004型

1.2 试剂

葡萄皮籽:安徽省合肥市周谷堆市场的葡萄去肉之后的残余皮籽,晾干

白藜芦醇标准品:上海源叶生物科技有限公司(批号:R02J6S1)

卡波姆-940:广州博峰化工科技有限公司

甲醇:天津市百世化工有限公司

无水乙醇:天津市富宇精细化工有限公司

2 方法与结果

2.1 葡萄皮籽提取物中白藜芦醇的含量测定及提取工艺确定

2.1.1 对照品储备液制备

精确称取白藜芦醇标准品5.4 mg,置于50 mL容量瓶中,加入甲醇,将其溶解并稀释至刻度,摇匀后即得浓度为0.108 g/L的对照品储备液。

2.1.2 样品溶液配制

精密称取5 g葡萄皮籽置于圆底烧瓶中,加入40%乙醇回流提取,弃药渣,抽滤去沉淀,减压蒸馏,提取液用石油醚萃取2~3次,至无色,减压蒸馏除去溶剂,浓缩至干。准确称取5.4 mg白藜芦醇样品于50 mL容量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得白藜芦醇样品溶液^[9]。

收稿日期:2017-09-10

基金项目:安徽高校自然科学研究项目(KJ2017A629);安徽省质量工程项目(2016ckjh100)

作者简介:华芳(1985—),女,安徽潜山人,讲师,硕士,主要研究方向为药剂与药用辅料。

2.1.3 标准曲线建立

精确吸取 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 的对照品储备液分别置于 10 mL 容量瓶中,甲醇稀释至刻度。以甲醇为空白,测定 306 nm 处的吸光度,以吸光度 A 对浓度 C 进行线性回归^[10-11],得线性回归方程: $A = 0.116\ 53C - 0.038\ 7(r = 0.991\ 3)$ 。结果表明,白藜芦醇在 2.16 ~ 10.8 mg/L 内与吸光度呈现良好的线性关系。

2.1.4 方法学考察

取线性范围内的 2.16 mg/L、6.48 mg/L 和 10.8 mg/L 3 种浓度,按 2.1.3 节处理,分别对精密度、稳定性、重复性、加样回收率进行考察。结果显示样品的稳定性良好、 $RSD(\%) < 5\%$ 、加样回收率 $> 95\%$,表明本实验方法稳定可靠。

2.1.5 正交试验

在前期预试验基础上,以料液比 a 、提取次数 b 、提取时间 c 为影响因素,确定正交试验方案。因素与水平见表 1,正交试验结果见表 2,方差分析见表 3。

表 1 正交试验因素水平表

Table 1 The factors and the levels of orthogonal test			
水平	料液比 a	提取次数 b /次	提取时间 c /h
1	1:15	1	1
2	1:20	2	2
3	1:25	3	3

表 2 正交试验结果

Table 2 The results of orthogonal test					
实验号	料液比 a	提取 次数 b /次	提取 时间 c /h	误差 d	提取 率/%
1	1	1	1	1	1.09
2	1	2	2	2	1.73
3	1	3	3	3	3.36
4	2	1	2	3	0.77
5	2	2	3	1	2.04
6	2	3	1	2	4.64
7	3	1	3	2	1.09
8	3	2	1	3	3.00
9	3	3	2	1	4.84
I	6.18	2.95	8.73	7.97	
II	7.45	6.77	7.34	7.46	
III	8.93	12.84	6.49	7.13	
R	2.75	9.89	2.24	0.84	

表 3 方差分析表

Table 3 Analysis of variance					
因素	离差平方和	自由度	均方	F 值	P
料液比 a	1.263	2	0.631	10.577	
提取次数 b	16.583	2	8.292	138.888	< 0.01
提取时间 c	0.852	2	0.426	7.140	
误差 d	0.119	2	0.060		

$F_{0.05}(2,2) = 19.00; F_{0.01}(2,2) = 99.00$

由表 2 和表 3 得出:白藜芦醇提取率影响因素的主次顺序为 $b > a > c$,即提取次数 b 对白藜芦醇的提取效果影响最大,料液比 a 次之,提取时间 c 影响最小;白藜芦醇提取最佳工艺条件为 $a3b3c1$,即料液比为 1:25,提取次数为 3 次,提取时间为 1 h。

2.1.6 验证试验

按最佳工艺条件 $a3b3c1$ 进行验证试验,得平均提取率为 3.69%。

2.2 白藜芦醇凝胶剂处方的确定

2.2.1 单因素考察^[12-13]

称取 0.7 g 卡波姆-940 撒布于适量蒸馏水中,溶胀,静置过夜;将溶胀好的卡波姆-940 中加入按照最佳提取工艺得到的白藜芦醇提取物 0.1 g、PEG-400 20 mL、尼泊金乙酯 0.1 g,混合均匀后,用三乙醇胺调 pH 为 6.5,加蒸馏水至 100 g,搅拌均匀,即得白藜芦醇凝胶剂。

2.2.1.1 卡波姆的用量

其他条件不变,卡波姆用量分别为 0.5%、0.7%、1.0%、1.5%,用上述方法制备 4 份凝胶,按表 4 的评分标准,从光泽性、涂展性、均匀度和离心性 4 个方面进行综合考察。满分 10 分,4 个指标各占 2.5 分。

根据表 4,在卡波姆用量分别为 0.5%、0.7%、1.0%、1.5% 时,白藜芦醇凝胶剂的综合评分分别为 5.1、7.4、7.9、6.5 分。故对白藜芦醇最佳工艺处方考察时,选择卡波姆的用量为 0.7% ~ 1.5%。

2.2.1.2 PEG-400 的用量

其他条件不变,PEG-400 的用量分别为 5、10、15、20、25 mL 时,用上述方法制备 5 份凝胶,按表 4 的评分标准进行综合考察,最终 5 份凝胶的综合评分分别为 6.2、7.4、8.3、8.6、7.2 分。故对白藜芦醇最佳工艺处方考察时,选择 PEG-400 的用量为 10 ~ 20 mL。

表 4 白藜芦醇凝胶剂基质筛选的评分标准

Table 4 Marking standard for matrix screening of resveratrol gel

指标	优(2.0~2.5 分)	良(1.0~1.9 分)	中(0.3~0.9 分)	差(0~0.2 分)
光泽性	表面光滑呈亮白色	表面光滑有光泽	表面呈白色但无光泽	无光泽且表面有可见颗粒
涂展性	易于涂布	可涂布但细腻度较差	可涂开但涂布性差	黏性大不宜涂开
均匀度	细腻	较细腻	较粗糙	粗糙
离心性	均匀外观不变	无分层现象	表面有微小颗粒	分层

2.2.1.3 pH 的影响

其他条件不变,用上述方法制备 5 份凝胶,分别用三乙醇胺调节 pH 值为 4.5、5.5、6.5、7.5、8.5,按表 4 的评分标准进行综合考察,最终 5 份凝胶的综合评分分别为 5.8、6.4、7.8、6.8、6.2 分。故对白藜芦醇最佳工艺处方考察时,选择 pH 为 5.5~7.5 为最佳。

2.2.2 正交试验

在单因素试验基础上,以卡波姆用量 A、PEG-400 用量 B、pH C 为影响因素确定正交试验方案。因素与水平见表 5,正交试验结果见表 6,方差分析见表 7。

表 5 白藜芦醇凝胶剂正交试验因素水平表

Table 5 The factors and the levels of orthogonal test of resveratrol gel

水平	A/%	B/mL	C
1	0.7	10	5.5
2	1.0	15	6.5
3	1.5	20	7.5

表 6 白藜芦醇凝胶剂正交试验结果

Table 6 The results of orthogonal test of resveratrol gel

实验号	A/%	B/mL	C	D	综合评分
1	1	1	1	1	9.3
2	1	2	2	2	8.9
3	1	3	3	3	7.9
4	2	1	2	3	7.0
5	2	2	3	1	3.9
6	2	3	1	2	6.3
7	3	1	3	2	2.4
8	3	2	1	3	5.3
9	3	3	2	1	6.1
I	26.1	18.7	20.9	19.3	
II	17.2	18.1	22.0	17.6	
III	14.0	20.3	14.2	20.2	
R	12.1	2.2	7.8	2.6	

表 7 白藜芦醇凝胶剂方差分析表

Table 7 Analysis of variance of resveratrol gel

因素	离差平方和	自由度	均方	F 值	P
卡波姆用量 A/%	28.749	2	14.374	24.736	<0.05
PEG-400 用量 B/mL	0.862	2	0.431	0.742	
pH	11.882	2	5.941	10.224	
误差 D	1.162	2	0.581		

$F_{0.05}(2,2) = 19.00; F_{0.01}(2,2) = 99.00$

由表 6、表 7 可以看出:对白藜芦醇凝胶剂制备的影响因素主次顺序为 $A > C > B$,即卡波姆用量对凝胶剂的制备影响最大,pH 次之,PEG-400 用量影响最小;白藜芦醇凝胶剂制备的最佳工艺处方为 A1B3C2,即卡波姆用量 0.7%,PEG-400 用量为 20 mL,pH 为 6.5。

综上所述实验,最终确定凝胶剂最佳处方为:

白藜芦醇 0.1 g

卡波姆-940 0.7 g

PEG-400 20 mL

无水乙醇 适量

三乙醇胺 调 pH 至 6.5

尼泊金乙酯 0.1 g

蒸馏水 至 100 g

2.2.3 含量测定

取白藜芦醇凝胶剂样品 0.5 g,用甲醇溶解,过滤,取续滤液至 25 mL 容量瓶,定容,在 306 nm 处测定吸光度,按 2.1.3 节计算每克凝胶剂中白藜芦醇的含量为 0.558 mg

2.2.4 制剂稳定性试验

取凝胶剂 3 批各 10 g 置离心管中,以 3 000 r/min 速度离心 30 min 后取出,凝胶无分层现象。

3 结论

经正交试验得出:在葡萄皮籽的白藜芦醇提取分析中,影响最大的是提取次数,其次为料液

比,最小为提取时间;最优提取条件为料液比为1:25,提取次数为3,提取时间为1 h。将白藜芦醇制成凝胶剂的最佳处方为:白藜芦醇 0.1 g,卡波姆-940 0.7 g,PEG-400 20 mL,三乙醇胺调pH至6.5,尼泊金乙酯 0.1 g,无水乙醇适量,加蒸馏水至100 g,每克凝胶中含白藜芦醇0.558 mg。

参考文献:

[1] 李洁,熊兴耀,曾建国,等. 白藜芦醇的研究进展[J]. 中国现代中药,2013,15(2):100-108.

[2] 李晓东,何卿,郑先波,等. 葡萄白藜芦醇研究进展[J]. 园艺学报,2011,38(1):171-184.

[3] 夏开元,戎卫华. 葡萄中的功效成份:白藜芦醇、白藜芦醇苷和原花青素[J]. 食品科学,2002,23(8):356-359.

[4] Khan A, Aljarbou A N, Aldebasi Y H, et al. Resveratrol suppresses the proliferation of breast cancer cells by inhibiting fatty acid synthase signaling pathway[J]. Cancer Epidemiol, 2014,38(6):765-772.

[5] Lee M F, Pan M H, Chiou Y S, et al. Resveratrol modulates MED28 (Magicin/EG-1) expression and inhibits epidermal growth factor (EGF)-induced migration in MDA-MB-231 human breast cancer cells[J]. J Agric Food Chem, 2011,59(21):11 853-11 861.

[6] Chang C C, Chang C Y, Wu Y T, et al. Resveratrol retards progression of diabetic nephropathy through modulations of oxidative stress, proinflammatory cytokines, and AMP-activated protein kinase[J]. J Biomed Sci. 2011,18(1):47.

[7] Ji H, Wu L, Ma X, et al. The effect of resveratrol on the expression of AdipoR1 in kidneys of diabetic nephropathy[J]. Mol Biol Rep, 2014,41(4):2 151-2 159.

[8] 李婷. 葡萄皮渣中白藜芦醇提取工艺研究及葡萄材料中白藜芦醇含量的差异性分析[D]. 兰州:甘肃农业大学,2008.

[9] 林勇,陈静. 葡萄皮中白藜芦醇提取工艺初步研究[J]. 中药材,2013,36(7):1 177-1 179.

[10] 李善菊,张泉男. 发酵后葡萄皮中白藜芦醇提取工艺的优化[J]. 食品工业,2016,37(11):28-31.

[11] 郑湘娟,余淑娴,徐晓芳,等. 紫外分光光度法测定虎杖中白藜芦醇的含量[J]. 时珍国医国药,2008,19(8):1 881-1 882.

[12] 李娜,买尔丹·马合木提. 新疆紫草提取物凝胶剂的制备及质量考察[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(1):14-17.

[13] 王颖,刘志东,曹晴,等. 地榆四黄散的提取工艺优化及凝胶剂的制备[J]. 天津中医药,2012,29(1):80-82.

Determination of Resveratrol in Grape Skin and Seed
Extract and Preparation of Its Gel Agent

HUA Fang, SHI Lingli, TANG Xiaomin
(College of Pharmacy, Anhui Xinhua College, Hefei Anhui 230088, China)

Abstract: Abstract: In order to study the optimum extraction conditions of resveratrol extracted from grape skin and seeds, the content of resveratrol in grape skin and seed extract was determined by colorimetric method at 306 nm. It was found that resveratrol had a good linear relationship at 2.16 ~ 10.8 mg/L, and the method was stable and feasible. In order to study the best preparation process of resveratrol gel, carbomer-940 was chosen as matrix of gel. Through single factor and orthogonal test, the optimal preparation method of resveratrol gel was screened and its content was determined. It was found that the resveratrol gel prepared by the optimized process was bright white, uniform and delicate, and it had good spreadability.

Keywords: resveratrol; content determination; gel; preparation technology

(责任编辑:李华云)