

很小或几乎没有。因此，有必要在了解药物结构的基础上考察药物的加入对自乳化体系的影响。

参考文献：

[1] 张俊红, 肖军花, 徐 凯, 等. 莲心总碱抗心律失常的实验研究[J]. 医药导报, 2005, 24(9): 759-761.

[2] 许 磊. 莲心碱的药物动力学及生物药剂学研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2001.

[3] 叶珍珍, 张 建, 崔升森. 自乳化释药系统在难溶性中药制剂中的应用[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(7): 1882-1885.

[4] 程玉钊, 周建平, 吕慧侠, 等. 固体自乳化药物传递系统的研究概况[J]. 药学进展, 2008, 32(2): 68-75.

[5] 彭晓霞, 路莎莎. 响应面优化法在中药研究中的应用和发展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(19): 296-299.

[6] 王跃生, 欧阳旭, 王丹辉, 等. 数学模式试验设计方法的优缺点比较及其在中药研究应用中的适宜性分析[J]. 中药

新药与临床药理, 2010, 21(2): 207-210.

[7] 张建媛. QH917 自微乳化释药系统的研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2007.

[8] 朱双燕. 穿心莲内酯固体自乳化颗粒剂的研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2013.

[9] 康虞玲. 葛根黄豆苷元自微乳化给药系统的研究[D]. 保定: 河北大学, 2010.

[10] 江兴龙. 葛根素自微乳化释药系统及其固体化研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2013.

[11] 崔 晶. 姜黄素固体自微乳化制剂的研究[D]. 济南: 山东大学, 2006.

[12] 张 建. 山楂叶总黄酮固体自乳化颗粒的研究[D]. 广州: 广东药学院, 2012.

[13] 孙明辉. 西罗莫司自微乳化释药系统的研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2011.

[14] 李兆明. β -榄香烯固体自微乳制剂的研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2009.

响应面法优化超声辅助碱提大花红景天多糖

胡 颖¹, 唐博安¹, 周凌云^{1,2 *}

(1. 皖南医学院, 安徽 芜湖 241002; 2. 西南林业大学, 云南 昆明 650224)

摘要：目的 采用响应面法优化超声辅助碱提大花红景天多糖。方法 以大花红景天多糖得率为指标，以 NaOH 溶液浓度、超声时间和超声温度为因素，按照 Box-Behnken 组合试验设计来优化提取工艺。**结果** 最佳条件为 NaOH 溶液浓度 0.25 mol/L，超声温度 47.15 ℃，超声时间 27.28 min，得率达 29.41%，较水提法和超声波辅助水提法分别增加了 1.50 倍和 0.73 倍。**结论** 该方法可提高大花红景天多糖的得率。

关键词：大花红景天；多糖；超声波；碱提；响应面法

中图分类号：R284.2 文献标志码：A 文章编号：1001-1528(2016)07-1495-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.07.012

Optimization of the ultrasonic-assisted alkaline extraction of polysaccharides from *Rhodiola crenulata* by response surface method

HU Ying¹, TANG Bo-an¹, ZHOU Ling-yun^{1,2 *}

(1. Wannan Medical College, Wuhu 241002, China; 2. Southwest Forestry University, Kunming 650224, China)

ABSTRACT: **AIM** To optimize the ultrasonic-assisted alkaline extraction of polysaccharides from *Rhodiola crenulata* by response surface method. **METHODS** With the yield of polysaccharides from *Rhodiola crenulata* as an index, together with NaOH solution concentration, ultrasonic time and ultrasonic temperature as factors, the extraction technology was optimized by response surface method. **RESULTS** The best conditions were 0.25 mol/L for

收稿日期：2015-12-11

基金项目：安徽省大学生创新创业训练计划（AH201410368124）；皖南医学院大学生科研资助（WK2014S23）

作者简介：胡 颖（1995—），女，研究方向为天然药物化学。E-mail: 294074837@qq.com

* 通信作者：周凌云（1980—），男，讲师，研究方向为天然药物化学。E-mail: zly4321@sina.com

NaOH solution concentraion, 27.28 min for ultrasonic time and 47.15 °C for ultrasonic temperature, the yield reached 29.41% , which was 1.50 times and 0.73 times higher than that obtained by water extraction and ultrasonic wave-assisted water extraction, respectively. **CONCLUSION** This method can increase the yield of polysaccharides from *Rhodiola crenulata*.

KEY WORDS: *Rhodiola crenulata*; polysaccharides; ultrasonic wave; alkaline extraction; response surface method

大花红景天 *Rhodiola crenulata* 为药用多年生草本植物,在我国主要分布于西藏、云南西北部、四川西部^[1],含有多糖、黄酮、红景天苷等化学成分^[2-3],而红景天多糖作为其中一个重要组成部分,具有耐缺氧、缓解疲劳、抗癌、抗辐射等作用^[4-6]。对其提取方法主要是通过优化水提工艺和超声辅助水提工艺^[7-8]。其中,碱液提取法能够使植物细胞中可溶酸性多糖的溶出增加。从而提高得率。前期通过分离纯化,已经得到大花红景天多糖近纯品(含有量占总多糖的80%以上),红外光谱显示其结构中可能含糖醛酸基团(1 740 cm⁻¹有特征吸收峰),而且硫酸-卡唑法呈阳性。以上实验结果均提示,大花红景天中主要的多糖为酸性,根据其自身化学性质可知,用碱溶液提取可以增加该成分的溶出,提高得率。同时,考虑到碱液提取对多糖结构有破坏作用,故排除了常规碱水提取(耗时较长)和微波辅助(瞬时温度较高)碱水提取,而采用超声(利用空化效应)辅助碱提。通过研究 NaOH 浓度、超声时间、超声温度 3 个因素对多糖得率的影响,选取合适的数值,采用响应面法设计,最终确定最佳工艺条件,为开发利用大花红景天多糖提供一定理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

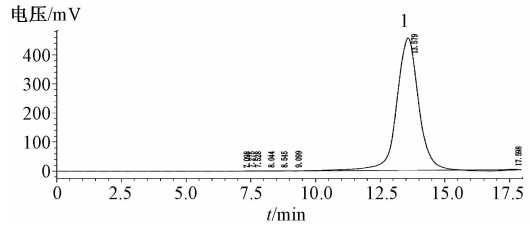
1.1.1 药材与试剂 大花红景天根茎(青海西宁唐古风商贸有限公司,编号 RC01),保存于皖南医学院药化教研室,经皖南医学院生药学教研室包淑云副教授鉴定为大花红景天 *Rhodiola crenulata*。所用试剂均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司)。

1.1.2 仪器与设备 KH-400DB 型超声清洗仪(昆山禾创科技有限公司);UV-5100 型紫外可见分光光度计(上海元析有限公司);Waters 201 型凝胶色谱仪,配备 2410 型示差检测器(美国 Waters 公司)。Design-Exper t8.0.5 软件。

1.2 方法

1.2.1 大花红景天多糖得率的计算

1.2.1.1 标准品的制备 选用 S-8(吸附率最高,为 41.37%)进行初步脱色,然后经多种方法进一步纯化,所得样品上凝胶高效渗透色谱(流动相为水,体积流量 1 mL/min),示差检测分析,其主峰含有量达 99.57%,可作为标准品使用,见图 1。文献报道,多糖的检测均以葡萄糖为标准,忽略了其水解后单糖组分比例以及对硫酸-苯酚反应性的差异。以分离得到的大花红景天多糖样品作为标准品,制定标准曲线时,发现结果更加精确。



1. 大花红景天多糖
1. polysaccharides from *Rhodiola crenulata*

图 1 凝胶渗透色谱图

Fig.1 Gel permeation chromatogram

1.2.1.2 标准曲线的绘制^[9-10] 将大花红景天多糖标准品干燥后精密称取 2.0 g,蒸馏水溶解,置于 100 mL 量瓶定容,即得多糖溶液。分别移取 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 置于试管中,补充蒸馏水至 2.0 mL。向每支试管中分别加入 1.0 mL 5% 苯酚溶液,混匀,再分别加入浓硫酸 5.0 mL,静置 40 min,冷却至室温。选择 490 nm 波长,根据成分质量浓度(C)和对应的吸光度(A)绘制标准曲线,得方程 $A = 0.020\ 6C + 0.034\ 8$ ($r = 0.999\ 7$)。

1.2.1.3 精密度试验 精密吸取 6 份多糖标准品溶液,每份 1 mL,按“1.2.1.2”项下方法操作,测得吸光度 RSD 为 0.65%,表明仪器精密度良好。

1.2.1.4 稳定性试验 精密吸取 6 份多糖标准品溶液,每份 1 mL,分别放置 15、30、45、60、75 和 90 min。按“1.2.1.2”项下方法操作,测得吸光度 RSD 为 0.75%,表明在溶液在 90 min 内稳定性良好。

1.2.1.5 计算方法 精密称取大花红景天粉末 2.0 g，加入 NaOH 溶液提取，超声，抽滤，滤液滴加 HCl 中和，75% 乙醇醇沉，过滤，得到沉淀，干燥后称定质量，蒸馏水定容，按“1.2.1.2”项下法测定其吸光度，计算多糖得率，公式为多糖得率 = $(W_2 \times A_1 / A_2) / W_1 \times 100\%$ 。其中， W_1 为样品粉末质量 (g)， W_2 为 75% 乙醇醇沉后所得沉淀 (粗多糖) 质量 (g)， A_1 为所测吸光度， A_2 为不同质量浓度粗多糖溶液对应标准曲线上的吸光度。

1.2.2 响应面法设计 根据 Box-Benhnken 中心组合方案^[11]，参照单因素试验选择合适数值，优化大花红景天多糖提取工艺，并对结果进行验证。

2 实验过程及结果

2.1 单因素试验^[12-16]

2.1.1 NaOH 溶液浓度对得率的影响 称取大花红景天粉末 2.0 g，料液比 1 : 15，超声温度选择 45 ℃，超声时间选择 10 min，以 0.10、0.25、0.50、1.00、1.50 mol/L NaOH 溶液进行超声提取，结果见图 2。由图可知，随着 NaOH 溶液浓度增加，多糖得率也相应上升；当浓度过高时，多糖得率可能因其降解而下降。因此，用 0.5 mol/L NaOH 溶液进行提取。

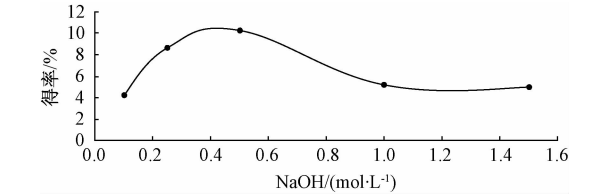


图 2 NaOH 溶液浓度对得率的影响
Fig. 2 Effect of NaOH solution concentration on yield

2.1.2 超声温度对得率的影响 称取大花红景天粉末 2.0 g，料液比 1 : 15，NaOH 溶液浓度 0.5 mol/L，超声时间 10 min，在 35、45、55、65、75 ℃ 温度下进行超声提取，结果见图 3。由图可知，温度升高有利于溶剂穿透植物细胞膜，使多糖溶出率增加。开始阶段，多糖得率不断增加，但当温度升高至 55 ℃ 左右后反而开始下降，可能是温度较高时，超声提取在一定程度上破坏了多糖结构，使其降解，导致提取率下降。因此，超声温度控制在 55 ℃。

2.1.3 超声时间对得率的影响 称取大花红景天粉末 2.0 g，料液比 1 : 15，NaOH 溶液浓度 0.5 mol/L，超声温度 55 ℃，分别提取 10、20、

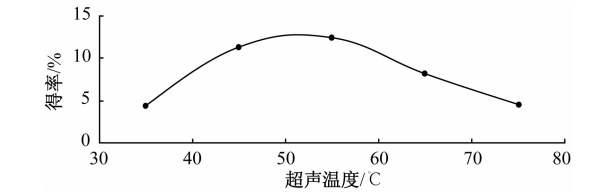


图 3 超声温度对得率的影响
Fig. 3 Effect of ultrasonic temperature on yield

30、40、50 min，结果见图 4。由图可知，时间延长有助于碱液渗透进细胞，使化学成分更容易溶出，从而增加多糖得率，但时间过长可能会促使其降解，导致得率反而下降。因此，选择超声时间为 20 min。

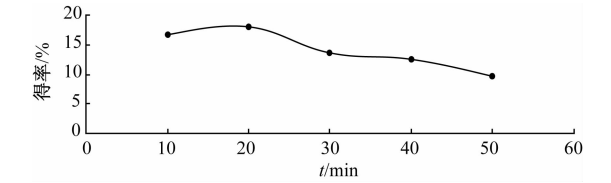


图 4 超声时间对得率的影响
Fig. 4 Effect of ultrasonic time on yield

2.2 响应面法设计

2.2.1 因素和水平的选择 根据 Box-Behnken 试验设计原理^[11]，选择 NaOH 溶液浓度 (A)、超声时间 (B)、超声温度 (C) 作为考察因素，结合单因素试验，进行 3 因素 3 水平工艺优化。因素水平见表 1。

表 1 因素水平			
Tab. 1 Factors and levels			
因素	水平		
	-1	0	1
A NaOH/(mol·L ⁻¹)	0.25	0.5	1.0
B 超声时间/min	10	20	30
C 超声温度/℃	45	55	65

2.2.2 试验设计和结果 以“2.2.1”项下 3 个因素为自变量，多糖得率 (Y) 为响应值进行优化。试验设计和结果见表 2。

利用 Design-Expert 软件对表 2 数据进行回归分析，得到回归方程 $Y = 15.25 - 7.94A + 1.30B - 2.62C - 3.03AB + 3.77 AC + 0.28BC + 2.24A^2 - 2.82B^2 - 3.93C^2$ 。方差分析 (表 3) 显示，A、C、AB、AC、B²、C² 均有显著性差异 ($P < 0.01$)，表明这 3 个因素对于多糖得率的影响并不是简单的线性关系。同时，失拟项不显著 ($P > 0.05$)，表明该模型拟合度较好，可以用于分析和预测得率。

表 2 试验设计和结果
Tab. 2 Design and results of tests

试验号	A	B	C	多糖得率/%
1	0	1	1	7.24
2	0	0	0	16.72
3	0	0	0	16.89
4	1	-1	0	6.86
5	0	0	0	14.19
6	0	0	0	14.19
7	1	0	1	5.75
8	0	0	0	14.28
9	0	1	-1	9.54
10	-1	-1	0	17.04
11	-1	0	1	13.75
12	-1	1	0	28.54
13	1	0	-1	5.83
14	-1	0	-1	28.90
15	0	-1	-1	10.32
16	1	1	0	6.24
17	0	-1	1	6.91

表 3 方差分析
Tab. 3 Analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	785.47	9	87.27	17.13	0.000 6
A	504.83	1	504.83	99.09	<0.000 1
B	13.60	1	13.60	2.67	0.146 3
C	54.81	1	54.81	10.76	0.013 5
AB	36.72	1	36.72	7.21	0.031 3
AC	56.78	1	56.78	11.14	0.012 4
BC	0.31	1	0.31	0.06	0.812 8
A ²	21.04	1	21.04	4.13	0.081 6
B ²	33.47	1	33.47	6.57	0.037 4
C ²	65.10	1	65.10	12.78	0.009 0
残差	35.66	7	5.09	—	—
失拟项	27.62	3	9.21	4.58	0.087 8
纯误差	8.04	4	2.01	—	—
总和	821.13	16	—	—	—

2.2.3 因素间的交互作用 图 5~7 为 3 个因素的响应面分析图及等高线图。由图可知，NaOH 溶液浓度的影响程度最大，但当其大于 0.25 mol/L 时，得率反而减少；超声温度在 45~50℃ 时，得率随着温度的增加而增加，但超过 50℃ 时反而降低；当超声提取 10~25 min 时，得率随着时间的延长而增加，但 25 min 后变化不明显，反而略呈下降趋势。

综上所述，最佳条件为 NaOH 溶液浓度 0.25 mol/L，超声温度 47.15℃，超声时间 27.28 min，多糖得率达 29.52%。

2.2.4 验证实验 根据响应面法优化所得的工艺条件，进行 3 次验证试验。测得多糖得率分别为 29.13%、29.45%、29.65%，平均值为 29.41%

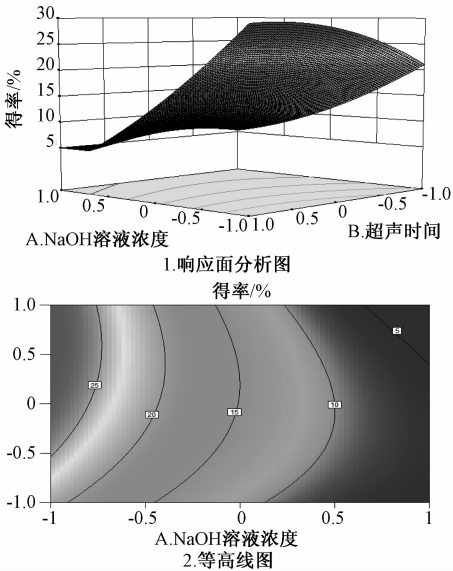


图 5 NaOH 溶液浓度和超声时间对得率的影响
Fig. 5 Effects of NaOH solution concentration and ultrasonic time on yield

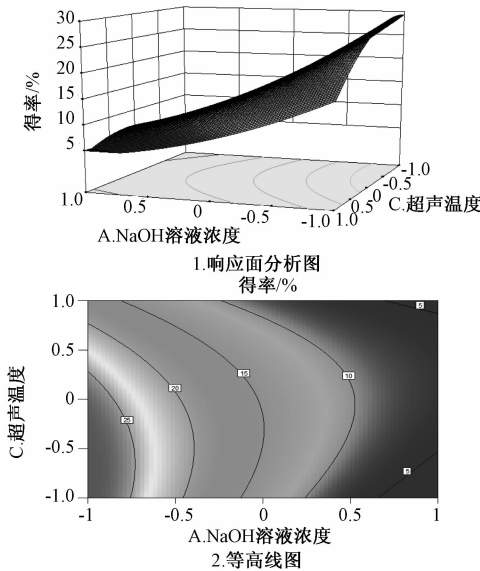


图 6 NaOH 溶液浓度和超声温度对得率的影响
Fig. 6 Effects of NaOH solution concentration and ultrasonic temperature on yield

(RSD = 0.89%)，与理论预测值 (29.52%) 接近，说明该模型可靠。

2.2.5 工艺对比实验 对水提法^[7]和超声辅助水提法^[8]的最优条件进行考察，测得平均得率分别为 11.75% (RSD = 0.54%) 和 16.98% (RSD = 0.82%)。由此可知，本实验多糖得率 (29.41%) 较以上 2 种传统方法分别提高了 1.50 倍和 0.73 倍。

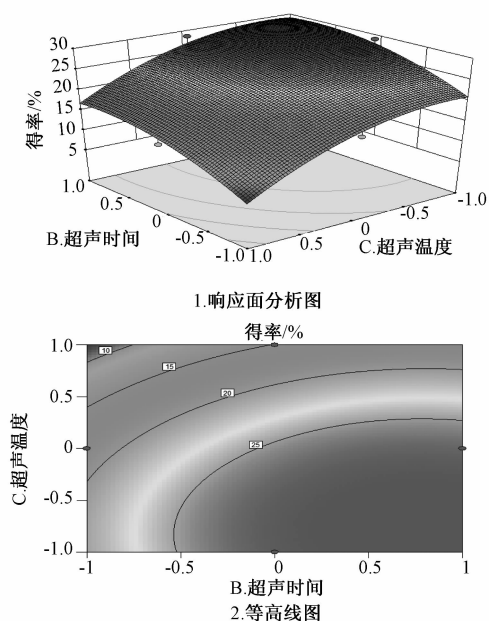


图7 超声时间和超声温度对得率的影响

Fig.7 Effects of ultrasonic time and ultrasonic temperature on yield

3 结论

通过响应面法优化设计,结合 Design-Expert 软件进行分析和处理,得到大花红景天多糖超声辅助碱提的最佳工艺条件为以 0.25 mol/L NaOH 溶液为溶剂,提取温度控制在 47.15℃,超声提取 27.28 min,而且该方法得率明显优于传统的水提法以及超声辅助水提法。究其原因,可能与该植物中主要的多糖结构包含酸性基团有关。

4 讨论

选择制得的大花红景天多糖作为标准品进行检测时发现,其含有量测定结果比以往用葡萄糖检测时稍高。因此,大花红景天自身所含多糖较单一葡萄糖更能准确反映该植物的真实情况,更适合用于质量控制。

从得率上来看,超声碱提法有着明显优势,但考虑到超声会不可避免地破坏多糖结构,从而影响其药效,故工艺结合药效的研究必不可少。今后,本实验将会对多种提取工艺得到的提取物进行相关

活性检测,以确定其对药效的影响。

参考文献:

- [1] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志: 第 34 卷第 1 分册[M]. 北京: 科学出版社, 1986: 161-220.
- [2] 季宇彬, 耿欣, 汲晨锋, 等. 红景天研究进展[J]. 天津中医药, 2007, 24(1): 81-85.
- [3] 许建峰, 应佩青, 苏志国, 等. 高山红景天资源应用与开发研究进展[J]. 中草药, 1998, 29(3): 202-205.
- [4] 宋月英, 马玉珍, 韩慧文, 等. 红景天属植物化学成分及药理作用的研究进展[J]. 中草药, 2004, 35(2): 235-237.
- [5] 宋学伟, 韩泳平, 唐晓丽, 等. 大花红景天挥发油的优化提取条件及过程动力学研究[J]. 华西药科学杂志, 2005, 20(5): 383-384.
- [6] 佟力, 席军. 红景天苷的药理作用研究进展[J]. 中外医疗, 2008(27): 137-139.
- [7] 黄家锐, 宋学伟, 韩泳平, 等. 正交设计法优化大花红景天多糖的提取工艺[J]. 华西药科学杂志, 2007, 22(6): 650-651.
- [8] 周凌云, 周建, 阮文懿, 等. 正交试验优化超声辅助提取大花红景天多糖工艺[J]. 通化师范学院学报, 2014, 35(5): 65-67.
- [9] 陈金娥, 黄立, 张海容, 等. 响应面法优化一微波萃取沙棘叶多糖工艺[J]. 计算机与应用化学, 2014, 31(7): 848-852.
- [10] 嵇文亚. 碱法提取鱼腥草多糖的工艺研究[J]. 现代中医药, 2008, 28(2): 61-62.
- [11] 贺莹莹, 徐小琳, 王思雨, 等. 响应面法优化碱提斜生栅藻多糖的提取工艺[J]. 石河子大学学报: 自然科学版, 2013, 31(3): 371-376.
- [12] 贝鑫临, 张欣, 曹君迈, 等. 响应面分析法对大火草多糖提取工艺的优化[J]. 湖北农业科学, 2014, 53(11): 2616-2619.
- [13] 薛芳, 颜瑞, 王承明, 等. 超声辅助碱提取花生多糖的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(8): 158-163.
- [14] 李丹丹, 吴茂玉, 宋辉, 等. 响应面分析法优化枸杞多糖的提取工艺[J]. 中国果菜, 2014, 34(6): 19-23.
- [15] 朱建飞, 杨嘹啦, 陈岗, 等. 碱提紫苏饼粕多糖的工艺优化[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(2): 69-71.
- [16] 柴丽, 侯红漫, 张公亮, 等. 响应面法优化提取灰树花碱溶性多糖[J]. 大连工业大学学报, 2013, 32(2): 94-97.