

正交设计-多元回归法优选红景天中红景天苷超声波提取工艺^Δ

黄钰芳^{1*}, 李越峰², 袁菊丽¹, 邵晶², 夏鹏飞³, 石晓峰^{4#}[1.甘肃中医药大学教学实验中心,兰州 730000;2.甘肃中医药大学药学院,兰州 730000;3.甘肃省高校中(藏)药化学与质量研究省级重点实验室,兰州 730000;4.甘肃省医学科学研究院,兰州 730050]

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)22-3128-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.22.32

摘要 目的:优选红景天中红景天苷的超声波提取工艺。方法:以红景天苷含量为指标,设计 $L_{16}(4^5)$ 正交试验考察乙醇质量分数、料液比、提取时间、超声功率4个因素对红景天提取液中红景天苷含量的影响;采用Matlab 6.5软件,对红景天苷的超声波提取的正交试验数据进行数学模拟,通过多元回归法优选红景天苷的超声波提取工艺,并将优选的工艺与传统的加热回流工艺提取效果进行比较。结果:所得红景天苷最优提取工艺为乙醇质量分数77%、料液比1:34(g:ml)、提取时间34 min、超声功率237 W(超声频率40 kHz)。此条件下提取所得红景天苷含量可达0.982 4%,与预测值0.989 4%相近。与加热回流法相比,两种方法提取所得红景天苷含量相近,但超声波法提取时间缩短了62.2%。结论:超声波提取法提取红景天中红景天苷操作简单、用时较短、提取率较高。

关键词 红景天苷;超声波提取;正交设计;多元回归;数学模拟

Optimization of Ultrasonic Extraction Technology of Salidroside in *Rhodiola rosea* by Orthogonal Design-Multiple Regression Method

HUANG Yu-fang¹, LI Yue-feng², YUAN Ju-li¹, SHAO Jing², XIA Peng-fei³, SHI Xiao-feng⁴(1.The Experimental Teaching Center of Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2.School of Pharmacy, Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 3.Key Laboratory of Chemistry and Quality for Traditional Chinese Medicines of the College of Gansu Province, Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 4.Gansu Provincial Academic Institute for Medical Research, Lanzhou 730050, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the ultrasonic extraction technology of salidroside in *Rhodiola rosea*. METHODS: With the content of salidroside as the index, $L_{16}(4^5)$ orthogonal test was designed to observe the effects of 4 factors including the mass fraction of ethanol, solid-liquid ratio, extraction time and ultrasonic power on the content of salidroside in *R. rosea* extraction solution. By using Matlab 6.5 software, mathematical simulation of ultrasonic extraction process of salidroside was made with the data of orthogonal test. Multiple regression analysis method was adopted to optimize the ultrasonic extraction technology of salidroside, and then the extraction result of optimal technology and that of traditional heating reflux technology were compared. RESULTS: The optimal extraction technology of salidroside was as follows as ethanol mass fraction of 77%, solid-liquid ratio of 1:34 (g:ml), extraction time of 34 min, ultrasonic power of 237 W (ultrasonic frequency of 40 kHz). Under the above-mentioned conditions, the content of salidroside was up to 0.982 4%, close to the predicted value of 0.989 4%. Compared to heating reflux method, the ultrasonic method has similar content of salidroside but extraction time was shortened by 62.2%. CONCLUSIONS: The ultrasonic extraction method for extracting the salidroside in *R. rosea* is simple, requires shorter time, and giving rise to higher extraction rate.

KEYWORDS *Rhodiola rosea*; Ultrasonic extraction; Orthogonal design; Multiple regression; Mathematical simulation

红景天为景天科红景天属 *Rhodiola* L.植物的根及根茎,主要分布于亚洲北部、欧洲北部和美国阿拉斯加地区^[1]。该属植物在全世界共约90种,在我国分布70多种,主产于华北、东

北、西南、西北和华中地区^[2]。现代药理学研究表明,红景天具有抗心律失常、调节免疫功能、镇静、抗疲劳、抗缺氧、抗衰老、抗癌等作用^[3]。其化学成分主要有红景天苷(Salidroside)、酪醇(Tyrosol)、黄酮类(Flavonoid)、甾醇(Sitosterol)、有机酸(Organic acids)、挥发油(Volatile oil)、多糖(Polysaccharide)等。其中,红景天苷是红景天中的主要有效成分之一,也是评价红景天及其提取物质量的重要指标^[4]。本试验将正交设计与多元回归方法相结合,研究超声波提取红景天苷的工艺条件,为改进红景天苷的提取工艺提供有价值的参考。

1 材料

^Δ 基金项目:2012年甘肃省高校中(藏)药化学与质量研究省级重点实验室开放基金项目(No.zzy-2012-04);兰州市科技计划项目(No.2008-1-177)

* 讲师,硕士。研究方向:中药化学成分及中药新药。电话:0931-8765392。E-mail:niuqing2000@sohu.com

通信作者:主任药师,硕士。研究方向:天然药物化学及中药制剂。电话:0931-2302644。E-mail:shixiaofeng2005@sina.com

1.1 仪器

1260型高效液相色谱仪(美国Agilent公司);AE240型十万分之一电子天平(德国赛多利斯公司);SK250H型超声波清洗机(上海科岛超声仪器有限公司);数显恒温水浴锅(金坛市荣华仪器制造有限公司)。

1.2 药材、药品与试剂

红景天(甘肃省兰州市安泰堂中药饮片有限公司,批号:1307108),经甘肃中医药大学杨扶德教授鉴定为高山红景天*Rhodiola sachalinensis*的干燥块根;红景天苷对照品(中国科学院成都生物研究所,批号: MUST-13121311,供含量测定用);甲醇为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 红景天苷的含量测定^[9]

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Agilent SB-C₁₈(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-水(17:83),流速:1.0 ml/min;检测波长:275 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μl。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取红景天苷对照品适量,置于10 ml量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,制备成质量浓度为0.51 mg/ml的对照品贮备液。精密吸取贮备液5 ml,置于10 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,制成质量浓度为0.255 mg/ml的对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取红景天药材粉末(14目)0.7 g,置于具塞锥形瓶中,浸润10 min后,加入20倍80%乙醇溶液,超声30 min(超声功率:300 W,频率:40 kHz),滤过,浓缩,甲醇溶解并定容至25 ml,摇匀,即得。

2.1.4 线性关系的考察 分别精密吸取对照品溶液1、2.5、5、10、12、15 μl进样测定,以峰面积(y)为纵坐标、对照品质量浓度(x)为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程为 $y=281.7x+28.86$ ($r=0.999 1, n=6$)。结果表明,红景天苷检测质量浓度线性范围为0.255~3.825 μg/ml。

2.1.5 精密度试验 分别精密吸取红景天苷对照品溶液,连续进样6次,测定峰面积。结果,红景天苷峰面积的RSD为0.34%($n=6$),表明仪器精密良好。

2.1.6 稳定性试验 取供试品溶液,分别于放置0、2、4、8、12、24 h后进样测定。结果,红景天苷峰面积的RSD为1.52%($n=6$),表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.1.7 重复性试验 取同一批样品制备6份供试品溶液,进样测定。结果,红景天苷平均含量的RSD为1.74%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 精密称取同一批红景天药材粉末(14目)6份,每份0.35 g,分为3组,每组分别精密加入一定质量浓度的红景天苷对照品溶液1.5、1.2、1.0 ml,置于具塞锥形瓶中,按照“2.1.3”项下条件超声提取,得供试品溶液6份,进样测定并计算。结果,平均加样回收率为96.24%(RSD=1.11%, $n=6$)。

2.2 超声波提取工艺的正交试验设计

在单因素试验的基础上,选择乙醇质量分数(A)、料液比(B)、提取时间(C)、超声功率(D)为影响因素,以红景天苷含量为指标,设计L₁₆(4⁵)正交试验确定最优提取条件。因素与

水平见表1。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素			
	A, %	B, g:ml	C, min	D, W
1	50	1:20	10	120
2	60	1:25	20	180
3	70	1:30	30	240
4	80	1:35	40	300

2.3 正交试验结果分析

精密称取红景天药材粉末(14目)0.7 g,置于具塞锥形瓶中,浸润10 min后,按照不同的工艺条件超声提取(超声频率:40 kHz),滤过,浓缩,以甲醇溶解并定容至25 ml,测定并计算各提取液中的红景天苷含量。正交试验结果、L₁₆(4⁵)方差分析结果分别见表2、表3。

表2 L₁₆(4⁵)正交试验结果

Tab 2 Results of L₁₆(4⁵) orthogonal test

试验号	因素					红景天苷含量, %
	A	B	C	D	E(空白列)	
1	1	1	1	1	1	0.929 5
2	1	2	2	2	2	0.943 8
3	1	3	3	3	3	0.959 7
4	1	4	4	4	4	0.952 8
5	2	1	2	3	4	0.963 2
6	2	2	1	4	3	0.961 5
7	2	3	4	1	2	0.976 1
8	2	4	3	2	1	0.975 9
9	3	1	3	4	2	0.975 8
10	3	2	4	3	1	0.976 5
11	3	3	1	2	4	0.975 1
12	3	4	2	1	3	0.976 3
13	4	1	4	2	3	0.976 0
14	4	2	3	1	4	0.979 6
15	4	3	2	4	1	0.981 8
16	4	4	1	3	2	0.981 3
\bar{K}_1	0.946 5	0.961 1	0.961 9	0.965 4	0.965 9	
\bar{K}_2	0.969 2	0.965 4	0.966 3	0.967 7	0.969 3	
\bar{K}_3	0.975 9	0.973 2	0.972 8	0.970 2	0.968 4	
\bar{K}_4	0.979 7	0.971 6	0.970 4	0.968 0	0.967 7	
R_i	0.033 2	0.012 1	0.010 9	0.004 8		

表3 方差分析结果

Tab 3 Result of variance analysis

变异来源	离差平方和	自由度	均方	F	P
A	0.002 658 98	3	0.000 886 33	111.455 4	<0.01
B	0.000 374 80	3	0.000 124 93	15.710 2	<0.05
C	0.000 274 93	3	0.000 091 64	11.524 2	<0.05
D	0.000 046 25	3	0.000 015 42	1.948 5	>0.05
E(误差)	0.000 023 86	3	0.000 007 95		

注: $F_{0.01}(3, 3)=29.457; F_{0.05}(3, 3)=9.277$

Note: $F_{0.01}(3, 3)=29.457; F_{0.05}(3, 3)=9.277$

由表2的极差和表3的方差分析结果可以看出:4种因素对超声波提取结果的影响大小依次为A>B>C>D。在试验设计范围内,最优试验方案为A₄B₃C₃D₃,即提取溶剂乙醇质量分数为80%,料液比为1:30(g:ml),提取时间为30 min,超声功率为240 W(超声频率为40 kHz)。

2.4 红景天苷超声波提取条件的多元回归分析

利用Matlab 6.5软件对超声波提取的正交试验结果进行完全二次型回归分析,得到回归方程: $Y=0.6078-4.7438\times 10^{-5}X_1^2+0.0072X_1-5.8250\times 10^{-5}X_2^2+0.0040X_2-1.7062\times 10^{-5}X_3^2+0.0012X_3-3.1424\times 10^{-7}X_4^2+1.4910\times 10^{-4}X_4$ 。式中: X_1 为乙醇质量分数; X_2 为料液比; X_3 为提取时间; X_4 为超声功率; Y 为红景天苷含量。结果,最大误差率为0.5739%,可知模拟值与试验值拟合良好,表明数学模拟是成功的。根据方程对最优提取条件进行预测,结果见表4。

表4 最优解预测结果

Tab 4 Predicted results of the optimal solution

项目	$X_1, \%$	$X_2, \text{g:ml}$	X_3, min	X_4, W	$Y, \%$
正交优化解	80	1:30	30	240	
数模最优解	77	1:34	34	237	0.9894

从表4可知,拟合方程预测的最优解与正交试验极差和方差的分析结果基本一致。确定最优工艺条件:77%乙醇为提取溶剂,料液比为1:34(g:ml),提取时间为34 min,超声功率为237 W,超声频率为40 kHz。为了确认拟合方程预测的最优组合的重现性,进行了优化组合后的验证试验,测得3次红景天苷的平均含量为0.9824%,与方程的预测值(0.9894%)接近,重复试验相对偏差为2.04%($n=3$),表明超声波提取优化条件重现性良好。

2.5 不同提取方法对红景天苷提取效率的影响

应用超声波提取和加热回流两种方法按照表5中的工艺条件,分别对红景天苷进行提取及测定,结果见表5。

表5 不同提取方法对红景天苷含量的影响($n=3$)

Tab 5 Effects of different extraction methods on the content of salidroside($n=3$)

提取方法	乙醇质量分数, %	料液比, g:ml	提取时间, min	超声功率, W	提取温度, °C	红景天苷含量, %	RSD, %
超声波法	77	1:34	34	237		0.9807	1.75
加热回流法	77	1:34	90		90	0.9782	1.68

从表5可知,在提取溶剂和料液比相同的条件下,应用超声波法对红景天苷的提取效率与加热回流法相比差异较小,但超声波提取所用时间较短(缩短了62.2%),因此应用超声波法提取红景天苷比常规的加热回流法具有一定的优势。

3 讨论

超声波提取的原理是利用超声空化效应。超声空化产生的声冲流以及冲击波引起的热效应和机械作用是超声技术应用于中药提取的理论依据。现已发现应用超声波能显著强化和改善提取过程^[6],该技术已被广泛应用于天然产物活性成分的提取与分离^[7-9]。目前,有关加热回流法提取红景天的工艺报道较多,应用超声波法提取的相关研究报道较少。因

此,笔者采用正交设计与多元回归法,研究了超声波提取红景天苷的工艺条件。

2010年版《中国药典》中规定红景天苷含量测定所用的流动相为甲醇-水(15:85)。在本试验色谱条件下,用该流动相时发现红景天苷与苷元酪醇的保留时间相差较小,为更好地使二者分离,经试验确定将流动相调整为甲醇-水(17:83)。

在前期单因素设计筛选提取溶剂时,分别用水、乙醇、甲醇进行了超声提取,发现以上3种溶剂对红景天苷的提取率依次为甲醇>乙醇>水。考虑到在实际生产中减少毒性和成本,最终选择乙醇作为提取溶剂。

单因素试验筛选药筛时发现,药筛目数越大,红景天苷提取的含量更高,但提取液过滤较慢,给精制过程带来一定困难,故最终选择了14目的药筛。

通过多元回归对红景天苷超声波提取过程进行了数学模拟,结果表明其回归方程能很好地模拟实际提取过程,可以对未知提取过程进行预测。

参考文献

- [1] Petsalo A, Jalonen J, Tolonen A. Identification of flavonoids of *Rhodiola rosea* by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1112(1/2):224.
- [2] 徐宝军,郑毅男,李向高.红景天属植物研究新进展[J]. *中药材*, 2006, 23(9):580.
- [3] 崔艳梅,娄安如,赵长琦.红景天属植物化学成分及药理作用研究进展[J]. *北京师范大学学报:自然科学版*, 2008, 44(3):328.
- [4] Han X, Zhang T, Wei Y, et al. Separation of salidroside from *Rhodiola crenulata* by high-speed counter-current chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 2002, 971(1/2):237.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:144.
- [6] 吴文博,董占军.中药制剂中细胞破壁技术探讨[J]. *中国药房*, 2011, 22(3):285.
- [7] 严优芍,钟伟健,孙悦.响应面法优选浙贝母中总生物碱的超声波提取工艺[J]. *中国药房*, 2012, 23(23):2132.
- [8] 陈丽,韦敏.均匀设计法优选柿叶总黄酮的提取工艺[J]. *中国药房*, 2012, 23(7):606.
- [9] 刘婷,金瑞.超声波法提取西洋参多糖的工艺研究[J]. *西北林学院学报*, 2014, 29(3):174.

(收稿日期:2014-10-20 修回日期:2015-01-06)

(编辑:刘萍)

《中国药房》杂志——RCCSE 中国核心学术期刊,欢迎投稿、订阅