

# 星点设计-效应面法优化超高压提取红景天中红景天苷

陈健, 廖国平, 张忠义\*

(南方医科大学珠江医院药学部, 广州 510282)

**[摘要]** 目的: 优选超高压提取法提取红景天中红景天苷的最佳工艺。方法: 采用星点设计结合效应面法对红景天中红景天苷的超高压提取的工艺参数进行优选, 并与回流提取、超声提取和微波提取进行比较。结果: 超高压提取红景天中红景天苷的最佳工艺条件为 73.3% 乙醇, 压力 255.5 MPa, 液固比 29.5 (mL: g), 提取时间 2 min, 提取 1 次; 此提取条件下红景天苷的提取率为 9.29 mg·g<sup>-1</sup>, 分别高出回流提取 31.6%、超声提取 20.3% 和微波提取 9.7%。结论: 超高压提取作为一种新兴的中药提取技术, 具有提取率高、提取温度低、耗时短、能耗少等优点, 为红景天苷提取提供一个全新的方法。

**[关键词]** 超高压提取; 红景天; 星点设计-效应面法

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)01-0019-05

## Optimization of Ultrahigh Pressure Extraction for Salidroside From *Rhodiola crenulata* by Central Composite Design/Response Surface Methodology

CHEN Jian, LIAO Guo-ping, ZHANG Zhong-yi\*

(Department of Pharmacy, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize ultrahigh pressure extraction (UPE) technology of salidroside from *Rhodiola crenulata* by central composite design/response surface methodology. **Method:** Central composite design was adopted for getting optimal ultrahigh pressure technique parameters, and compared with conventional extraction's (reflux extraction, ultrasonic extraction, microwave extraction). **Result:** Optimal technology conditions of UPE for salidroside from *R. crenulata* were: solvent was 73.3% ethanol, ratio of solvent to material (mL: g) was 29.5, extraction pressure was 255.5 mPa, extracted 1 time with 2 min. Using this extracting process, extraction yield of salidroside was 9.29 mg·g<sup>-1</sup>. It was 31.6% higher than reflux extraction, 20.3% to ultrasonic extraction and 9.7% to microwave extraction. **Conclusion:** As a novel extraction technology of Chinese herbal medicine, UPE procedure had higher extraction yield, lower extracting temperature, required a shorter time and was less power

**[收稿日期]** 20110808(002)

**[基金项目]** 广东省自然科学基金项目(8151051501000054)

**[第一作者]** 陈健, 在读硕士研究生, 从事中药新制剂与新技术研究, Tel: 15521281227, E-mail: 645230065@qq.com

**[通讯作者]** \* 张忠义, 主任药师, 从事中药有效成分提取和中药新剂型研究, Tel: 020-61643499, E-mail: zhang43499@sohu.com

### [参考文献]

- [1] 中国科学院华南植物研究所. 广东植物志. 第2卷 [M]. 广州: 广东科技出版社, 1980: 387.
- [2] 刘华亮, 袁珂, 朱建鑫, 等. 枸杞子滴丸成型工艺的研究 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(3): 601.
- [3] 柳伟, 王宏洁, 司南, 等. 莲子心总生物碱滴丸的制备工艺及含量测定 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32

(7): 581.

- [4] 胡立志, 文雅萍, 桂卉. 吴藿降压滴丸的成型工艺研究 [J]. 中成药, 2011, 33(3): 527.
- [5] 邓家刚, 王志萍, 李学坚, 等. 芒果苷滴丸成型工艺的研究 [J]. 中成药, 2008, 30(7): 1071.
- [6] 符立梧, 杨安奎. 番荔枝内酯克服肿瘤多药抗药性作用及机理 [J]. 中国新药杂志, 1999, 8(5): 311.

[责任编辑 仝燕]

consumption. It had provided a brand-novel method for extraction of salidoside from *R. crenulata*.

[Key words] ultrahigh pressure extraction; *Rhodiola crenulata*; central composite design/response surface methodology

红景天为景天科大花红景天的根及根茎,具有益气活血、通脉平喘功能<sup>[1]</sup>。现代药理研究表明,红景天具有抗衰老、抗缺氧、抗病毒、抗肿瘤、抗疲劳、抗不良刺激及提高学习记忆力等作用,对机体起双向调节作用<sup>[2]</sup>。其有效成分红景天苷,具有耐缺氧、抗衰老、降血脂、降血糖、增强免疫功能等作用,目前主要用于治疗糖尿病、肺心病、风湿、冠心病、高血压等慢性疾病<sup>[3]</sup>。红景天苷的提取方法有乙醇回流提取<sup>[4]</sup>、超声提取<sup>[5]</sup>、微波提取<sup>[6]</sup>等。这些方法一定程度上满足了红景天提取要求,但存在损失大、周期长、工序多、提取率不高等缺点。超高压提取技术<sup>[7]</sup>与传统的提取方法相比,其提取时间短、提取率高、能耗低,且提取液中杂质含量少<sup>[8-9]</sup>。同时超高压提取可以在常温条件下进行,能够有效避免活性成分的受热分解<sup>[10-11]</sup>。本文采用该技术同时结合星点设计试验对红景天中红景天苷的提取工艺进行优化,并与回流提取、超声提取和微波提取进行了比较,为红景天中有效成分的提取寻找了一种较为有效的提取方法。

## 1 材料

1DJ-300S 型超高压提取装置(上海顺优超高压机械设备有限公司),DFT-100 型高速中药粉碎(温岭林大机械有限公司),MA1 10 型电子天平(上海天平仪器厂),Agilent 1100 型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司)。

红景天药材(产地西藏)经珠江医院药剂科周本杰教授鉴定为景天科植物大花红景天 *Rhodiola crenulata*(Hook. f. et oms)H. ohba 的干燥根茎,红景天苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110818-201005),甲醇、乙腈为色谱纯,乙醇及其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 超高压提取原理

在室温条件下,将药材粉碎与提取介质混合放入密闭容器中,迅速升高压力(100 MPa 以上),保持一段时间,使料液在细胞内外达到压力平衡,药物有效成分与有机溶剂充分接触达到溶解平衡,然后迅速卸压(一般为 6 s),细胞内外两侧瞬间产生的强大的压力差造成细胞壁破碎、细胞膜渗透性大大增强,有利于细胞内有效成分与提取溶剂的充分接触以及有效成分的溢出,达到高

效、快速的提取目的。

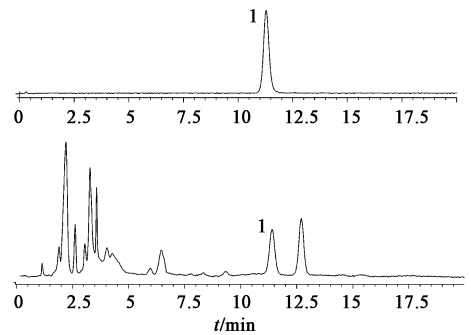
### 2.2 红景天苷的超高压提取

将红景天药材粉碎后,过 2 号筛,精密称取红景天药材粉末 2.0 g,置密封袋中,按比例加入提取溶剂,排尽气泡,封口,将压力升高至所需压力,保压一定时间后,快速卸压,得提取液,高速离心 15 min,取上清液经 0.22 μm 微孔滤膜抽滤,备用。

### 2.3 红景天苷的含量测定

#### 2.3.1 色谱条件

Hypersil ODS C<sub>18</sub> 色谱柱(4.0 mm × 150 mm, 5 μm),流动相甲醇-水 15: 85,检测波长 275 nm,柱温 30 °C。在此色谱条件下,对照品和红景天超高压提取液样品的色谱图见图 1。



A. 对照品; B. 样品; 1. 红景天苷  
图 1 红景天超高压提取液 HPLC

#### 2.3.2 对照品溶液的配制

精密称取红景天苷对照品 13.0 mg 至 25 mL 量瓶中,加适量流动相溶解后,再稀释至满刻度,摇匀,即得红景天苷对照品母液。

#### 2.3.3 供试品溶液的配制

将红景天药材按照不同提取方法进行提取,得提取液,高速离心 15 min,取上清液经 0.22 μm 微孔滤膜抽滤,即得供试品溶液。

#### 2.3.4 标准曲线的制备

精密量取 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0 mL 对照品溶液,分别置于 10 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,取 10 μL 进样测定,每个样品进样 3 次。分别以质量浓度(C)横坐标,平均峰面积(A)为纵坐标作线性回归,得红景天苷回归方程  $A = 2.8434C + 6.0472$  ( $r = 0.9999$ ),结果表明,红景天苷在 10.4 ~ 520 mg · L<sup>-1</sup> 具有良好的线性关系。

### 2.3.5 方法学考察

**2.3.5.1 精密性** 精密吸取对照品溶液 10  $\mu\text{L}$ ,在同一条件下重复进样 6 次,按 2.3.4 项下色谱条件进行测定,红景天苷峰面积的 RSD 1.84%,表明仪器精密性良好。

**2.3.5.2 重复性** 取同一批供试品 6 份,按 2.3.4 项下色谱条件测定,红景天苷峰面积 RSD 1.11%,表明该方法的重复性良好。

**2.3.5.3 稳定性** 取同一供试品溶液,按 2.3.4 项下色谱条件进行测定,分别在 0,1,2,4,6,12 h 进样,结果红景天苷峰面积的 RSD 0.45%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

**2.3.5.4 加样回收率** 精密量取已知红景天苷含量的红景天提取液 9 份,分别准确加入红景天苷对照品溶液,摇匀,按 2.3.4 项下色谱条件测定,计算回收率,结果见表 1。

表 1 红景天苷加样回收率试验

样品含量 / $\mu\text{g}$	加入量 / $\mu\text{g}$	测得量 / $\mu\text{g}$	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
112.58	52	163.93	98.76		
112.58	52	164.83	100.48		
112.58	52	164.46	99.77		
112.58	104	216.16	99.59		
112.58	104	216.60	100.02	99.50	0.65
112.58	104	215.72	99.17		
112.58	156	266.80	98.86		
112.58	156	266.68	98.78		
112.58	156	269.27	100.44		

**2.3.6 样品含量的测定** 精密吸取抽滤后的提取液 10  $\mu\text{L}$ ,按拟定色谱条件进行测定,每个样品进样 3 次。得红景天苷平均峰面积( $A$ ),根据标准曲线计算红景天苷提取率( $Y$ ) ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ),即  $Y = \frac{A - 6.0472}{2.8434} \times \frac{VX}{m}$ , (公式中  $V$  为提取液总体积、 $X$  为提取液稀释倍数、 $m$  为红景天药材总质量)。

### 2.4 星点设计试验<sup>[12]</sup>

**2.4.1 试验设计与结果** 提取因素为乙醇体积分数、液固比、提取压力、提取时间和提取次数,因提取次数为非连续变量,不能进行回归处理,结合预实验结果和工业生产的实际,暂固定为 1 次;结合预实验发现提取时间长短影响不大,暂固定为 2 min,对乙醇体积分数、料液比、提取压力作如下变化:  $X_1 = (x_1 - 60)/17.3$ ,  $X_2 = (x_2 - 27.5)/13$ ,  $X_3 = (x_3 - 200)/57.7$ , (其中  $X_1, X_2, X_3$  为各因素水平值,  $x_1,$

$x_2, x_3$  为各因素实际值,因素水平见表 2。按照试验设计的统计学要求,各组试验的安排见表 3。

表 2 红景天苷超高压提取响应面因素水平编码

编码水平	$X_1$ 乙醇体积分数 /%	$X_2$ 料液比 / $\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$	$X_3$ 提取压力 / $\text{MPa}$
-1.732	30	5	100
-1	42.7	14.5	142.3
0	60	27.5	200
1	77.3	40.5	257.7
1.732	90	50	300

表 3 红景天苷超高压提取星点试验设计

No.	$X_1$ /%	$X_2$ / $\text{mL} : \text{g}$	$X_3$ / $\text{MPa}$	红景天苷 提取率 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
1	42.7(-1)	14.5(-1)	142.3(-1)	8.2
2	77.3(+1)	14.5(-1)	142.3(-1)	8.556
3	42.7(-1)	40.5(+1)	142.3(-1)	8.76
4	77.3(+1)	40.5(+1)	142.3(-1)	8.96
5	42.7(-1)	14.5(-1)	257.7(+1)	8.28
6	77.3(+1)	14.5(-1)	257.7(+1)	9.05
7	42.7(-1)	40.5(+1)	257.7(+1)	8.9
8	77.3(+1)	40.5(+1)	257.7(+1)	9.19
9	30(-1.732)	27.5(0)	200(0)	7.76
10	90(1.732)	27.5(0)	200(0)	9.25
11	60(0)	5(-1.732)	200(0)	7.725
12	60(0)	50(1.732)	200(0)	8.16
13	60(0)	27.5(0)	100(-1.732)	9.03
14	60(0)	27.5(0)	300(1.732)	8.96
15~20	60(0)	27.5(0)	200(0)	9.30

**2.4.2 建立模型方程与显著性检验** 应用 Design-Expert 8.0.0 软件对表 3 中的数据进行二次多元回归拟合,得到乙醇体积分数( $X_1$ )、液固比( $X_2$ )、提取压力( $X_3$ )与红景天中红景天苷提取率之间的二次多项回归方程:  $Y = 9.31 - 0.30 X_1 + 0.18 X_2 + 0.058 X_3 - 0.079 X_1 X_2 + 0.066 X_1 X_3 - 0.026 X_2 X_3 - 0.22 X_1^2 - 0.41 X_2^2 - 0.055 X_3^2$ , 对上述回归模型进行显著性检验,结果见表 4。

由表 4 回归方差显著性检验表明,一次项乙醇体积分数、液固比对红景天苷提取率的线性效应显著,提取压力对红景天苷提取率线性效应不显著;二次项中各因素除提取压力外均对红景天苷提取率的曲面效应显著;比较各因子间交互作用均不显著。

表 4 回归模型方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
$X_1$	1.254 29	1	1.254 29	20.223 87	0.001 1 <sup>2)</sup>
$X_2$	0.441 879	1	0.441 879	7.124 756	0.023 5 <sup>1)</sup>
$X_3$	0.047 873	1	0.047 873	0.771 891	0.400 3
$X_1X_2$	0.050 424	1	0.050 424	0.813 024	0.388 4
$X_1X_3$	0.035 015	1	0.035 015	0.564 568	0.469 7
$X_2X_3$	0.005 376	1	0.005 376	0.086 686	0.774 5
$X_1^2$	0.753 969	1	0.753 969	12.156 82	0.005 9 <sup>1)</sup>
$X_2^2$	2.615 707	1	2.615 707	42.175 03	<0.000 1 <sup>3)</sup>
$X_3^2$	0.047 357	1	0.047 357	0.763 57	0.402 7
残差	0.620 203	10	0.062 02		
失拟项	0.507 108	5	0.101 422	4.483 918	0.062 6
误差	0.113 095	5	0.022 619		
总离差	5.525 094	19			
模型	4.904 892	9	0.544 988	8.787 254	0.001 1 <sup>2)</sup>

注: <sup>3)</sup>  $P < 0.001$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ , <sup>1)</sup>  $P < 0.05$ 。

在本实验设计范围内,回归方程显著性检测,差异高度显著说明模型与实际实验拟合良好,试验误差小,证明应用响应面法优化的提取工艺提取红景天中红景天苷是可行的。

### 2.4.3 响应面分析及最优提取条件的确定

Design-Expert 8.0.0 软件依据回归方程来绘制响应面立体分析图及等高线,考察所拟合的响应面曲线的形状,响应面立体图如图 2~4 所示,利用该图可以对影响红景天苷提取得率的条件下任何 2 种因素的交互效应进行分析和评价,并确定最佳工艺。等高线的形状可反映交互效应的强弱,椭圆形表示二因素交互作用显著,而圆形则与之相反。从图中可以看出,各因素间的交互作用不显著。从等高线图可以看出极值条件应在圆心处,三因素中除提取压力外均对红景天苷的提取有显著的影响,表现为等高线较为陡峭。同时,还可得出回归模型存在最大值点, $X_1, X_2, X_3$  的代码值为 0.77, 0.15, 0.97。与之对应的实测值为乙醇体积分数( $X_1$ ) = 73.3%, 液固比( $X_2$ ) = 29.5, 提取压力( $X_3$ ) = 255.5 MPa, 此时红景天苷提取率最大估计值  $Y$  9.46  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。因此确定最佳提取工艺为乙醇体积分数 77.3%、液固比 29.5、提取压力 255.5 MPa。

**2.4.4 验证试验** 精确称取红景天药材粉末 2.0 g 3 份,分别准确加入 73.3% 乙醇 59 mL,密封后,加压至 255.5 MPa,保压 2 min,各提取 1 次,提取液经离心后,再经 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤,测定红景天

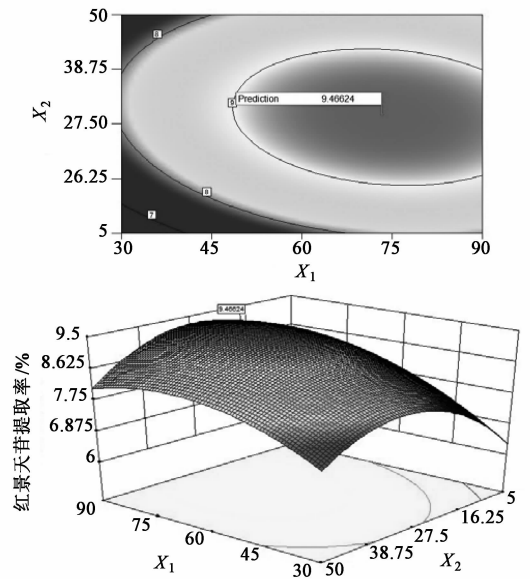


图 2 乙醇体积分数、液固比对红景天苷得率影响的响应等高线和立体分析

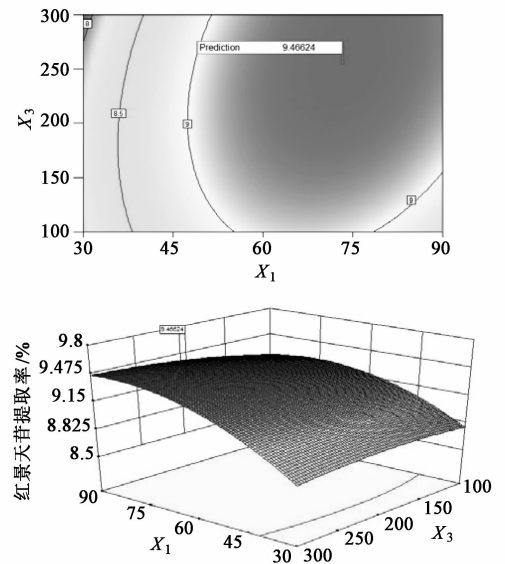


图 3 乙醇体积分数、提取压力对红景天苷得率影响的响应等高线和立体分析

苷提取率为 9.29, 9.26, 9.31  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 验证结果与预测结果较接近。

**2.5 不同提取方法的比较** 精确称取 2.0 g 红景天药材粉末 12 份,分别准确加入 73.3% 的乙醇 59 mL,进行回流提取、超声提取、微波提取和超高压提取,每种提取方法提取 3 次,提取条件及结果如表 5 所示。结果表明,超高压提取的红景天苷平均提取率最高,红景天苷平均提取率分别高出回流提取 31.6%、超声提取 20.3% 和微波提取 9.7%,而且提取时间短只需 2 min。

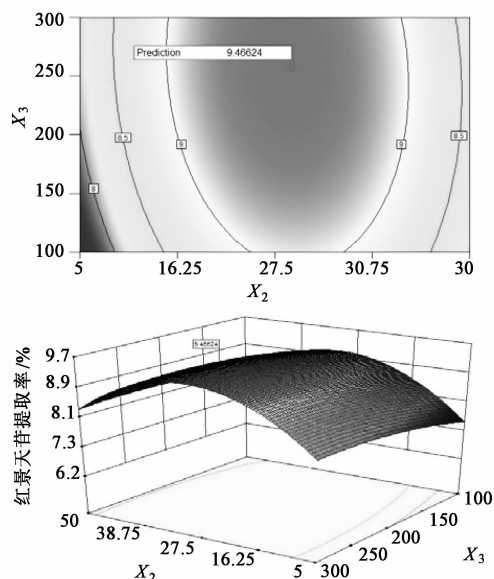


图4 液固比、提取压力对红景天苷得率影响的响应等高线和立体分析

表5 红景天苷不同提取方法的比较( $n=3$ )

提取方法	提取条件	红景天苷平均提取率/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
回流	70 ℃, 回流 2 h	7.06
超声	频率 40 kHz, 超声 60 min	7.72
微波	频率 2 450 MHz, 提取 3 min	8.47
超高压	170 MPa, 室温提取 2 min	9.29

### 3 讨论

与常规方法相比,超高压提取时间短,仅需 2 min,远小于常规方法;提取率高于各种常规提取方法;操作简单;能耗低。常温提取能使红景天苷避免因热效应损失和药理活性降低,作者将在下一步工作中通过对红景天不同提取方法提取物进行体内药效学比较验证。

超临界萃取<sup>[13]</sup>比较适用于脂溶性成分的提取,超临界微乳萃取<sup>[14]</sup>则比较适用于水溶性成分的提取,而超高压提取则适用于水溶性、脂溶性成分的同时提取,这使得超高压在复方中药方剂的提取方向具有巨大的前景。本课题组拟在下一步工作中研究单味中药和复方中药方剂同时提取水、脂溶性成分的最佳工艺。虽然超高压提取具有多方面独特的优势,但其应用研究还处于刚刚起步阶段,在实际工业生产中的推广与应用还有很多工作要做,如超高压提取机制及工业生产规模超高压仪器尚需做进一步深入研究。

### [参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S]. 2010: 106.
- [2] 王强.珍稀药用植物红景天[M]. 北京:科学出版社, 2007:56.
- [3] 杜保生,颜天华,马莹,等.红景天苷对大鼠和小鼠血液系统的影响[J].中国实验方剂学杂志,2009, 15(2):51.
- [4] 陈小明,徐超群.红景天中红景天苷的提取工艺研究[J].华西药学杂志,2010, 25(3): 329.
- [5] 吴少雄,郭祀远,李琳,等.超声波法提取大花红景天有效成分的工艺研究[J].食品科技,2006(1): 46.
- [6] MAO Y, LI Y, YAO N. Simultaneous determination of salidroside and tyrosol in extracts of *Rhodiola* L. by microwave assisted extraction and high-performance liquid chromatography[J]. J Pharmaceut Biomed Anal, 2007, 45: 510.
- [7] ZHANG S Q, ZHU J J, WANG C C. Novel high pressure extraction technology[J]. Int J Pharmaceut, 2004, 278:472.
- [8] XI J, SHEN D J, ZHANG R, et al. Characterization of polyphenols from green tea leaves using a high hydrostatic pressure extraction[J]. Int J Pharmaceut, 2009, 382: 139.
- [9] ZHANG S Q, LIU C J, WU H, et al. Non-thermal extraction of effective ingredients from *Schisandra chinensis* Baill and the antioxidant activity of its extract[J]. Nat Prod Res, 2009, 23(15): 1390.
- [10] 贺帅,姚育发,张忠义,等.应用超高压技术提取元胡中延胡索乙素的研究[J].中药材,2010, 33(1): 137.
- [11] 廖国平,贺帅,张忠义,等.均匀设计法优化超高压提取虎杖中虎杖苷和白藜芦醇[J].中国中药杂志, 2010, 24(3): 3282.
- [12] 黄元红,卫天喜,张发生,等.星点设计-效应面法优选丹参提取工艺[J].中国实验方剂学杂志,2010, 16(17): 28.
- [13] 王志安,梁卫文,吴惠勤.超临界 CO<sub>2</sub> 萃取知母总皂苷的气相-质谱分析[J].中国实验方剂学杂志, 2001, 7(6): 1.
- [14] 罗登林,聂英,郭金英,等.超临界 CO<sub>2</sub> 反相微乳萃取人参中人参皂苷的研究[J].中草药,2007, 38(7): 1003.

[责任编辑 全燕]