

红芪多糖超声提取工艺优化及抗氧化、 美白和吸湿保湿活性

原梦瑶^{1,2,3,4}, 康淑荷^{1,2,3,4*}, 崔璐娟^{1,2,3,4},
朱青青^{1,2,3,4}, 李胜硕^{1,2,3,4}, 郭金旺^{1,2,3,4}

(1. 环境友好复合材料国家民委重点实验室, 甘肃 兰州 730106; 2. 甘肃省生物质功能复合材料工程研究中心, 甘肃 兰州 730106; 3. 甘肃省高校环境友好复合材料及生物质利用省级重点实验室, 甘肃 兰州 730106; 4. 西北民族大学 化工学院, 甘肃 兰州 730106)

摘要: 基于单因素〔超声时间、超声温度、料液比(g:mL, 下同)、提取次数、粒度〕超声辅助水提取法提取红芪多糖的实验结果, 选取超声时间、超声温度、料液比采用响应面法优化了红芪多糖的提取工艺, 考察了红芪多糖对 2,2'-联氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐自由基(ABTS⁺·)、1,1-二苯基-2-苦基肼自由基(DPPH·)、超氧阴离子自由基(·O₂⁻)和·OH 的清除能力、对酪氨酸酶单酚酶的抑制作用及吸湿保湿性能。结果表明, 超声辅助水对粒度 45 目的红芪粉末提取红芪多糖, 在超声功率 99 W、超声时间 43 min、超声温度 70 °C、料液比 1:21、提取 3 次的最佳工艺条件下, 多糖提取率为 23.90%; 质量浓度 1.00 g/L 红芪多糖对 ABTS⁺·清除率 89.67%, 半数抑制浓度(IC₅₀)为 0.40 g/L; 质量浓度 10.00 g/L 红芪多糖对酪氨酸酶单酚酶的抑制率为 54.14%, IC₅₀为 8.06 g/L; 12 h 内, 在相对湿度 43% 的环境中, 红芪多糖的吸湿率(红芪多糖吸水后的总质量占吸水前红芪多糖质量的百分数)为 101.01%, 质量浓度 10 g/L 红芪多糖溶液保湿率达 99.87%。

关键词: 红芪; 多糖; 提取; 响应面法; 抗氧化; 美白; 吸湿保湿; 中药现代化技术

中图分类号: R284.2; TQ658 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214(2025)03-0577-10

Optimization of ultrasonic extraction process for polysaccharides from *Radix Hedysari* and their antioxidant, whitening, moisture absorption and moisturizing activities

YUAN Mengyao^{1,2,3,4}, KANG Shuhe^{1,2,3,4*}, CUI Lujuan^{1,2,3,4},
ZHU Qingqing^{1,2,3,4}, LI Shengshuo^{1,2,3,4}, GUO Jinwang^{1,2,3,4}

(1. Key Laboratory of Environment-Friendly Composites of the State Ethnic Affairs Commission, Lanzhou 730106, Gansu, China; 2. Gansu Provincial Biomass Function Composites Engineering Research Center, Lanzhou 730106, Gansu, China; 3. Key Laboratory for Utility of Environment-Friendly Composite Materials and Biomass in University of Gansu Province, Lanzhou 730106, Gansu, China; 4. School of Chemical Engineering, Northwest Minzu University, Lanzhou 730106, Gansu, China)

Abstract: Based on the experimental results of single factors [ultrasonic time, ultrasonic temperature, solid-liquid ratio (g:mL, the same below), extraction times, particle size] in ultrasonic assisted water extraction of polysaccharides from *Radix Hedysari*, response surface method was used to optimize the extraction process of *Radix Hedysari* polysaccharides using ultrasonic time, ultrasonic temperature and solid-liquid ratio as variables. The scavenging capabilities of *Radix Hedysari* polysaccharides on 2,2'-diazo-di(3-ethylbenzothiazole-6-sulfonic acid)diamine salts free radicals (ABTS⁺·), 1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine radicals (DPPH·), superoxide anion free radicals (·O₂⁻) and ·OH, as well as the

收稿日期: 2024-02-05; 定用日期: 2024-04-07; DOI: 10.13550/j.jxhg.20240132

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金项目(31920230144); 国家自然科学基金项目(21968032、22165025)

作者简介: 原梦瑶(1999—), 女, 硕士生, E-mail: 1426640152@qq.com。联系人: 康淑荷(1972—), 女, 副教授, E-mail: 523429214@qq.com。

inhibition on tyrosinase monophenolase and hygroscopic as well as moisturizing properties were investigated. The results showed that under the optimal conditions of ultrasonic power 99 W, ultrasonic time 43 min, ultrasonic temperature 70 °C, solid-liquid ratio 1 : 21, extraction times 3 times, the extraction yield of polysaccharides was 23.90%. The scavenging rate of ABTS⁺ by *Radix Hedysari* polysaccharides with a mass concentration of 1.00 g/L was 89.67%, and the half inhibitory concentration (IC₅₀) was 0.40 g/L. The inhibitory rate of *Radix Hedysari* polysaccharides with a mass concentration of 10.00 g/L on tyrosinase monophenolase was 54.14%, and the IC₅₀ was 8.06 g/L. Within 12 h, in an environment with a relative humidity of 43%, the moisture absorption rate of *Radix Hedysari* polysaccharides (the percentage of the total mass of *Radix Hedysari* polysaccharides after water absorption to the mass of polysaccharides before water absorption) was 101.01%, and the moisture retention rate of *Radix Hedysari* polysaccharides reached 99.87% at a mass concentration of 10 g/L.

Key words: *Radix Hedysari*; polysaccharides; extraction; response surface methodology; antioxidation; whitening; moisture absorption and moisturizing; modernization technology of Chinese medicines

红芪 (*Radix Hedysari*) 为豆科植物多序岩黄芪 (*Hedysarum polybotrys* Hand.-Mazz) 的干燥根, 是一种药食同源植物, 在医药和食品行业应用前景广阔^[1]。传统用药常以红芪代替黄芪使用, 2020 版《中国药典》已将红芪与黄芪区别开^[2-3]。冯慧敏等^[3]研究发现, 红芪在一些药理活性及临床治疗方面优于黄芪。红芪多糖作为红芪主要活性成分之一, 具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、抗衰老、调节免疫系统、降低血糖、增强骨骼质量、预防心力衰竭、调节肠道菌群、缓解肝损伤等药理活性^[4-9]。目前, 提取红芪多糖的方法有: 水提醇沉法、酶解法、微波-超声波法、复合酶联合超声法。与传统的提取方法相比, 超声波提取法通过超声波强烈的振动以及空化、机械等效应把细胞壁振碎, 其活性成分提取率高且杂质少。但关于使用响应面优化超声辅助水提取法鲜见报道。

体内氧的正常代谢不可避免会产生活性氧, 包括超氧阴离子、过氧化氢以及·OH 等, 过量的自由基会严重破坏细胞、蛋白质以及 DNA 的正常功能, 从而引发衰老、炎症、糖尿病、免疫系统损伤等疾病, 严重影响人体健康及生活质量^[10-11]。因此, 适当清除自由基至关重要。酪氨酸酶是机体形成黑色素的关键酶, 而自由基也参与了酪氨酸酶的催化过程, 如要减少黑色素的生成, 需要通过抑制酪氨酸酶的活性和清除自由基来实现^[12]。多糖类物质中含有的大量羟基等亲水官能团可通过氢键和水结合锁住水分, 同时多糖的分子链还可交织成网状构象, 进一步锁住水分防止流失, 因此具有很好的吸湿保湿效果^[13-14]。植物多糖的活性成分因提取方法不同而有所差异, 以往研究主要集中在提取含量上, 而部分忽略了提取工艺对活性的影响^[15]。

本文拟以甘肃道地药材红芪为原料, 采用响应

面分析法建立实验模型, 分析其显著性与各因素之间的交互作用, 优化超声辅助水提取红芪多糖工艺条件。分别以抗坏血酸 (V_C)、苯乙基间苯二酚、甘油为对照, 探究超声辅助水提取多糖的抗氧化、美白、吸湿保湿性能, 以期对红芪植物资源进一步开发和红芪多糖的应用提供参考。

1 实验部分

1.1 材料、试剂与仪器

药材红芪, 甘肃省陇南武都, 经西北民族大学化工学院师永清教授鉴定为豆科植物多序岩黄芪 (*Hedysarum polybotrys* Hand.-Mazz) 的干燥根, 即为红芪 (*Radix Hedysari*); 葡萄糖标准品, Sigma-Aldrich 试剂公司; 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH), 上海梯希爱化成工业发展有限公司; 2,2'-联氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐 (ABTS⁺)、水杨酸, 上海麦克林生化科技股份有限公司; 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH=6.3)、酪氨酸酶, 上海源叶生物科技有限公司; V_C, 天津市大茂化学试剂厂; 焦性没食子酸, 天津市凯通化学试剂有限公司; FeSO₄、丙三醇, 天津市百世化工有限公司; L-酪氨酸, 北京索莱宝科技有限公司。上述试剂均为市售分析纯。

RS-FS1406 型多功能粉碎机, 合肥荣事达小家电有限公司; DL-720D 型数控超声波清洗器, 上海之信仪器有限公司; L2-6K 型台式低速离心机, 湖南可成仪器设备有限公司; UV-6100 型紫外-可见分光光度计 (UV-Vis), 上海美谱达仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 红芪多糖的提取

将干燥后的红芪粉碎过筛, 用无水乙醇脱脂, 真空干燥得到脱脂后的红芪粉末, 备用。

采用超声辅助水提取法提取红芪多糖^[16]。称取脱脂后的红芪粉末各 3.00 g, 固定超声功率 99 W, 通过单因素与响应面实验优化后, 以超声时间、超声温度、提取次数、料液比、粒度最佳条件提取红芪多糖; 提取液离心 (5000 r/min, 5 min), 取上清液, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 收集液体, 浓缩, 加入无水乙醇至乙醇体积分数 85% 析出沉淀, 抽滤、于 55 °C 下干燥至恒重, 得到红芪多糖。

1.2.2 多糖含量的测定

采用苯酚-硫酸法测定红芪多糖质量浓度^[17]。首先, 配制不同质量浓度 (0、0.01、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10、0.12、0.14、0.16 g/L) 葡萄糖标准溶液 2.00 mL, 分别加入质量分数 5% 的苯酚水溶液 1.00 mL 和浓硫酸 5.00 mL, 冷却至室温后在 490 nm 处测其吸光度; 绘制出葡萄糖质量浓度 (x)-吸光度 (y) 标准曲线, 得到线性回归方程为 $y=14.142x+0.0341$, $R^2=0.9995$ 。然后, 将红芪多糖待测溶液定容于 250 mL 容量瓶中, 量取 20.00 μL 红芪多糖溶液加水稀释至 2.00 mL, 随后加入质量分数 5% 的苯酚水溶液 1.00 mL 和浓硫酸 5.00 mL, 冷却至室温后在 490 nm 处测其吸光度。根据葡萄糖质量浓度-吸光度标准曲线方程计算红芪多糖样品溶液的质量浓度。再根据式 (1) 计算红芪多糖提取率:

$$Y\%=(\rho \times V \times n) / m \times 100 \quad (1)$$

式中: Y 为红芪多糖提取率, %; ρ 为红芪多糖样品溶液质量浓度, g/L; V 为红芪多糖样品溶液定容体积, mL; n 为稀释倍数; m 为红芪粉末质量, mg。

1.3 单因素实验

称取脱脂后的红芪粉末各 3.00 g, 考察超声时间 (20、30、40、50、60 min)、超声温度 (40、50、60、70、80 °C)、提取次数 (1、2、3 次)、料液比 (g : mL, 1 : 5、1 : 10、1 : 15、1 : 20、1 : 25) 以及粒度 (14、20、45、60、80 目) 5 个因素对红芪多糖提取率的影响。考察单一变量时, 其他 4 个因素的影响以超声时间 40 min、超声温度 60 °C、料液比 1 : 15、提取 2 次、粒度 45 目为准。

1.4 响应面实验

根据单因素实验结果, 选取对红芪多糖提取率影响最大的 3 个因素为自变量, 红芪多糖提取率为响应值, 运用 Box-Behnken 设计实验, 进行三因素三水平的响应面实验设计, 优选红芪多糖提取工艺条件, 不同因素根据单因素研究结果中心点取值。

1.5 抗氧化活性实验

1.5.1 DPPH 自由基 (DPPH·) 清除能力的测定

参照文献[18]并稍加修改。将红芪多糖配制成不同质量浓度 (0.20、0.40、0.60、0.80、1.00 g/L)

的溶液。配制 0.20 mmol/L 的 DPPH·溶液, 分别取不同质量浓度红芪多糖溶液 2.00 mL 与 DPPH·溶液 2.00 mL, 混匀后在 37 °C 避光反应 30 min, 然后测定其在 517 nm 处的吸光度。以 V_C 为阳性对照组, 蒸馏水为阴性对照组。采用式 (2) 计算红芪多糖 DPPH·清除率:

$$\text{清除率}/\%=(A_0-A_1)/A_0 \times 100 \quad (2)$$

式中: A_0 和 A_1 分别为阴性对照组和样品溶液的吸光度。

1.5.2 ABTS⁺ 自由基 (ABTS⁺·) 清除能力的测定

参照文献[19]并稍加修改。配制浓度 7.20 和 140.00 mmol/L 的 ABTS⁺和过硫酸钾溶液, 分别取 10.00 mL 和 176.00 μL 混合均匀, 然后在黑暗环境下反应 24 h, 配制成 ABTS⁺·溶液, 随后使用 PBS 将 ABTS⁺·溶液稀释至吸光度为 0.70±0.02 (波长 734 nm 处), 备用。将红芪多糖配制成不同质量浓度 (0.20、0.40、0.60、0.80、1.00 g/L) 的红芪多糖溶液, 然后各量取 1.00 mL 与稀释好的 ABTS⁺·溶液 3.00 mL 避光反应 2 h, 测定其在 734 nm 处的吸光度。以 V_C 为对照组, 蒸馏水为阴性对照组。采用式 (2) 计算红芪多糖 ABTS⁺·清除率。

1.5.3 ·OH 清除能力的测定

参照文献[20]并稍加修改。将红芪多糖配制成不同质量浓度 (0.20、0.40、0.60、0.80、1.00 g/L) 的红芪多糖溶液。随后, 依次在 1.00 mL 不同红芪多糖溶液中加入 1.00 mL FeSO₄溶液 (9.00 mmol/L)、1.00 mL 水杨酸溶液 (9.00 mmol/L); 最后, 加入 1.00 mL 过氧化氢 (9.00 mmol/L) 启动反应, 摇匀后在 37 °C 下反应 30 min, 测定其在 510 nm 处的吸光度。以 V_C 为对照组, 蒸馏水为阴性对照组。采用式 (2) 计算红芪多糖·OH 清除率。

1.5.4 超氧阴离子自由基 (·O₂⁻) 清除能力的测定

参照文献[21]并稍加修改。将红芪多糖配制成不同质量浓度 (0.20、0.40、0.60、0.80、1.00 g/L) 的红芪多糖溶液。随后, 依次在 1.00 mL 不同红芪多糖溶液中加入 2.50 mL PBS (50.00 mmol/L)、0.30 mL 邻苯三酚溶液 (3.00 mmol/L), 摇匀后在 25 °C 反应 20 min; 最后, 加入 0.20 mL 盐酸 (8.00 mmol/L) 终止反应, 测定其在 560 nm 处的吸光度。以 V_C 为对照组, 蒸馏水为阴性对照组。采用式 (2) 计算红芪多糖·O₂⁻清除率。

1.6 美白活性实验

参照文献[22]并稍加修改。将红芪多糖配制成不同质量浓度 (0.50、2.00、4.00、6.00、8.00、10.00 g/L) 的红芪多糖溶液。配制 1.50 mmol/L 的 L-酪氨酸溶液与 50.00 U/mL 的酪氨酸酶溶液。在试管中加入 2.00 mL 红芪多糖溶液、2.00 mL PBS 和

1.00 mL 酪氨酸酶作为实验组;加入 2.00 mL 样品溶液及 3.00 mL PBS 作为实验空白组;加入 4.00 mL PBS 及 1.00 mL 酪氨酸酶作为对照组;加入 5.00 mL PBS 缓冲液作为对照空白组。随后,将 4 组待测液置于 37 °C 下反应 10 min,再分别加入 2.00 mL L-酪氨酸溶液,置于 37 °C 下反应 10 min 后测其在 475 nm 处的吸光度。以苯乙基间苯二酚为对照组。根据式(3)计算 L-酪氨酸(单酚酶)抑制率(%):

$$\text{抑制率}/\% = [1 - (D_1 - D_2) / (C_1 - C_2)] \times 100 \quad (3)$$

式中: D_1 、 D_2 、 C_1 、 C_2 分别为实验组、实验空白组、对照组、对照空白组的吸光度。

1.7 吸湿保湿实验

1.7.1 吸湿性

参照文献[23]并稍加修改。称取干燥后的红芪多糖 0.50 g (m_0 , g) 于锥形瓶中,随后放置在温度为 20 °C 的恒温鼓风干燥箱中。恒温鼓风干燥箱分别加入饱和盐溶液控制不同的相对湿度:含有饱和氯化锌溶液(相对湿度 10%),饱和碳酸钾溶液(相对湿度 43%),饱和氯化钠溶液(相对湿度 75%)。分别称量放置 1、2、4、6、8、10、12、24 h 后红芪多糖的质量,记为 m_t (g)。以甘油为对照组,根据式(4)计算吸湿率(%):

$$\text{吸湿率}/\% = m_t / m_0 \times 100 \quad (4)$$

1.7.2 保湿性

参照文献[23]并稍加修改。配制质量浓度分别为 10、50、250 g/L 红芪多糖溶液,质量浓度 250 g/L 甘油,质量浓度 50 g/L 红芪多糖溶液与质量浓度 50 g/L 甘油混合液。随后,将 5 组溶液放置在温度为 20 °C 的恒温鼓风干燥箱中。恒温鼓风干燥箱分别加入饱和盐溶液控制不同的相对湿度:含有饱和氯化锌溶液(相对湿度 10%)、饱和碳酸钾溶液(相对湿度 43%)、饱和氯化钠溶液(相对湿度 75%)。初始样品质量记为 m'_0 (g);分别称量放置 1、2、4、6、8、10、12、24 h 后红芪多糖的质量,记为 m'_t (g)。根据式(5)计算保湿率(%):

$$\text{保湿率}/\% = m'_t / m'_0 \times 100 \quad (5)$$

1.8 数据处理

所有实验均平行进行 3 组,使用 Origin 2021 对其进行处理,结果均以平均值进行讨论;采用 Design-Expert 12.0 进行响应面方差分析,检验模型显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 单因素实验分析

图 1 为不同因素对红芪多糖提取率的影响。

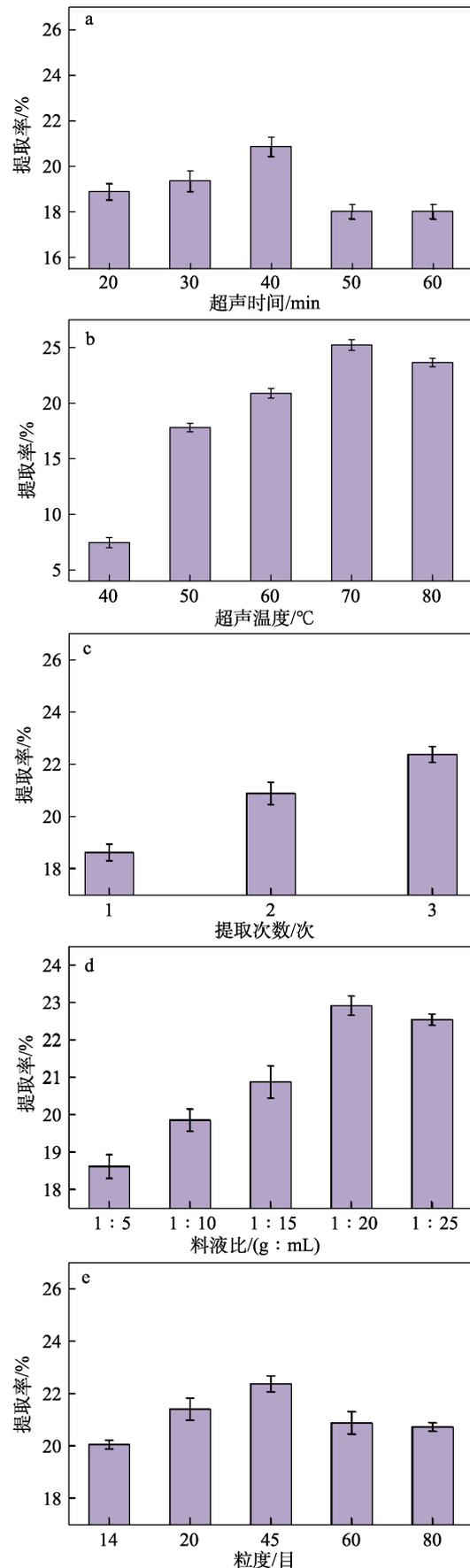


图 1 不同因素对红芪多糖提取率的影响

Fig. 1 Effects of different factors on the extraction rate of *Radix Hedysari* polysaccharides

从图 1a 可以看出, 0~40 min 内, 随着超声时间的增加, 红芪多糖提取率不断增加, 当超声时间为 40 min 时, 红芪多糖提取率最大, 为 20.87%。此后随着超声时间的延长, 红芪多糖提取率呈下降趋势。这是因为, 长时间的超声波空化作用会降解多糖, 破坏植物细胞壁, 导致副产物溶出增加, 从而影响红芪多糖提取率^[17]。

从图 1b 可以看出, 随着超声温度的增加, 红芪多糖提取率呈先升高后下降的趋势, 当超声温度为 70 °C 时, 提取率最大。而温度过高可能会破坏或水解多糖结构, 进而影响到红芪多糖提取率^[18]。

从图 1c 可以看出, 红芪多糖提取率随着提取次数的增加而线性增大, 但第 3 次提取率只比第 2 次增加 1.49%, 增幅较小, 而提取次数增加会增加能耗。

从图 1d 可以看出, 料液比在 1:5~1:20 范围内变化时, 红芪多糖提取率逐渐增加; 当料液比为 1:20 时, 红芪多糖提取率最大, 为 22.91%; 随着料液比的进一步减小, 红芪多糖提取率开始降低。这是因为, 溶剂量增大会降低多糖质量浓度, 导致其他杂质溶出率增大, 影响超声波对红芪的作用效率^[24]。

从图 1e 可以看出, 随着粒度的增加, 红芪多糖提取率先增加后减小; 当粒度为 45 目时, 红芪多糖提取率达最大, 为 22.36%。但当粒度>45 目后, 红芪多糖提取率反而下降。这是因为, 粒度减小, 比表面积增加, 颗粒物表面对多糖的吸附率增加, 减少了红芪多糖进入溶液中的量, 也会导致其他杂质溶出率增大。

综上, 超声辅助水提取法提取红芪多糖的最佳条件为: 超声时间 40 min、超声温度 70 °C、提取次数 3 次、料液比 1:20、粒度 45 目。对红芪多糖提取率影响最大的 3 个因素为: 超声时间、超声温度和料液比。

2.2 响应面实验分析

2.2.1 响应面实验设计与结果

采用 Design-Expert 12.0 软件对表 1 中的数据进行了二项式拟合, 并对模型进行方差分析, 得到二项式拟合方程 $Y=24.2500-0.8151A+0.6261B-0.9747C-0.1964AB-1.0300AC+1.7900BC-0.7420A^2-1.2000B^2-0.8844C^2$ ($P=0.0006$, $R^2=0.9777$)。

2.2.2 模型拟合与方差分析

表 2 为方差分析结果。

从表 2 可以看出, 从二次多项式拟合结果来看, $P<0.01$, 表明差异极显著; 失拟项 $P=0.0704$, 表明差异不显著; 模型相关系数 $R^2=0.9777$, 表明此模型的拟合程度良好, 且可预测的响应值达 94.82%, 可信度较高^[25]。模型中一次项 A 、 C , 交互项 AC 、 BC 以

及二次项 B^2 均表现出差异极显著, 除 AB 不显著外, 其他均显著。由回归模型 F 值可知, 不同因素对红芪多糖提取率的影响因素主次顺序为: C (料液比) $>A$ (超声温度) $>B$ (超声时间)。

表 1 响应面实验设计与结果

Table 1 Response surface experimental design and results

序号	编码值			实际值			Y/%
	A	B	C	超声温度/ °C	超声时间/ min	料液比/ (g : mL)	
1	-1	-1	0	60	30	1 : 20	21.91
2	1	-1	0	80	30	1 : 20	20.80
3	-1	1	0	60	50	1 : 20	24.21
4	1	1	0	80	50	1 : 20	22.31
5	-1	0	-1	60	40	1 : 15	23.76
6	1	0	-1	80	40	1 : 15	24.07
7	-1	0	1	60	40	1 : 25	23.23
8	1	0	1	80	40	1 : 25	19.42
9	0	-1	-1	70	30	1 : 15	24.31
10	0	1	-1	70	50	1 : 15	21.32
11	0	-1	1	70	30	1 : 25	19.42
12	0	1	1	70	50	1 : 25	23.60
13	0	0	0	70	40	1 : 20	23.94
14	0	0	0	70	40	1 : 20	24.06
15	0	0	0	70	40	1 : 20	24.07
16	0	0	0	70	40	1 : 20	24.44
17	0	0	0	70	40	1 : 20	24.72

表 2 方差分析结果

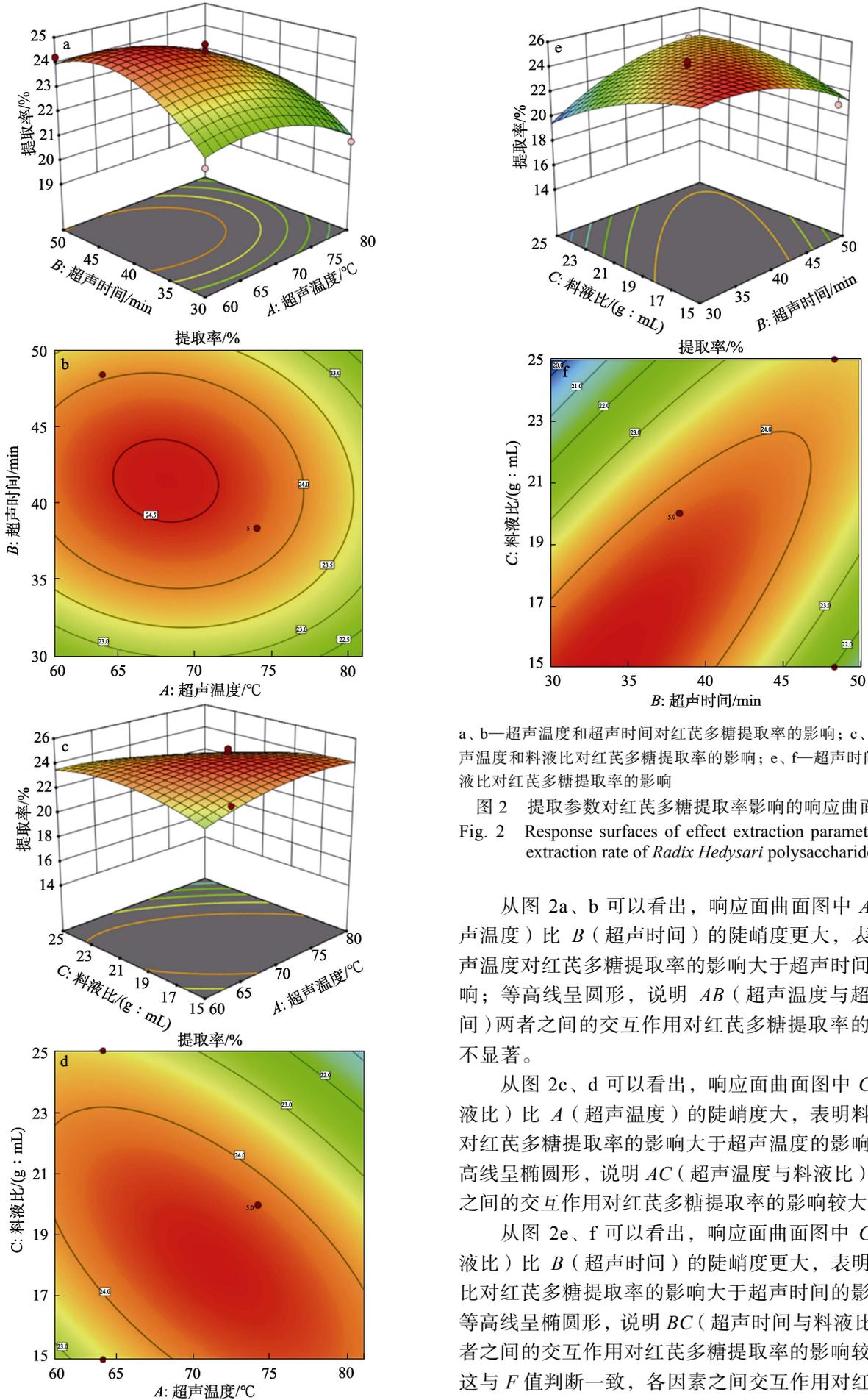
Table 2 Analysis of variance results

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	46.27	9	5.14	16.83	0.0006	***
A	5.32	1	5.32	17.41	0.0042	***
B	3.14	1	3.14	10.27	0.0150	**
C	7.60	1	7.60	24.89	0.0016	***
AB	0.15	1	0.15	0.51	0.5002	*
AC	4.25	1	4.25	13.93	0.0073	***
BC	12.85	1	12.85	42.08	0.0003	***
A ²	2.32	1	2.32	7.59	0.0283	**
B ²	6.05	1	6.05	19.81	0.0030	***
C ²	3.29	1	3.29	10.78	0.0134	**
残差	2.14	7	0.31			
失拟项	1.71	3	0.57	5.31	0.0704	*
纯误差	0.43	4	0.11			
总变量	48.40	16				

注: ***表示差异极显著 ($P<0.01$); **表示差异显著 ($0.01<P<0.05$); *表示差异不显著 ($P>0.05$)。

2.2.3 响应面分析

图 2 为采用 Design-Expert 12.0 软件分析绘制得到的不同因素之间响应面曲面图与等高线图。通过观察响应面曲面图的陡峭程度与等高线形状来判断不同因素对红芪多糖提取率的影响^[26]。



a、b—超声温度和超声时间对红芪多糖提取率的影响；c、d—超声温度和料液比对红芪多糖提取率的影响；e、f—超声时间和料液比对红芪多糖提取率的影响

图 2 提取参数对红芪多糖提取率影响的响应曲面图
Fig. 2 Response surfaces of effect extraction parameters on extraction rate of *Radix Hedysari* polysaccharides

从图 2a、b 可以看出，响应面曲面图中 A（超声温度）比 B（超声时间）的陡峭度更大，表明超声温度对红芪多糖提取率的影响大于超声时间的影响；等高线呈圆形，说明 AB（超声温度与超声时间）两者之间的交互作用对红芪多糖提取率的影响不显著。

从图 2c、d 可以看出，响应面曲面图中 C（料液比）比 A（超声温度）的陡峭度大，表明料液比对红芪多糖提取率的影响大于超声温度的影响；等高线呈椭圆形，说明 AC（超声温度与料液比）两者之间的交互作用对红芪多糖提取率的影响较大

从图 2e、f 可以看出，响应面曲面图中 C（料液比）比 B（超声时间）的陡峭度更大，表明料液比对红芪多糖提取率的影响大于超声时间的影响；等高线呈椭圆形，说明 BC（超声时间与料液比）两者之间的交互作用对红芪多糖提取率的影响较大。这与 F 值判断一致，各因素之间交互作用对红芪多

糖提取率的影响依次为: $BC > AC > AB$, 各因素对红芪红芪多糖提取率的影响依次为: $C > A > B$ 。

模型预测其较佳工艺条件为: 超声温度 $70.71\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、超声时间 43.43 min 、料液比 $1:20.87$, 在此条件下红芪多糖提取率为 24.15% 。

2.2.4 工艺验证

为了验证实验的可靠性, 并结合实际操作情况将模型预测的较佳提取工艺调整为: 超声温度为

$70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、超声时间为 43 min 、料液比为 $1:21$ 。进行了3组水平实验验证, 红芪多糖提取率分别为 23.80% 、 23.98% 、 23.92% , 平均值为 23.90% , 相对标准偏差 (RSD) 为 0.38% 。红芪多糖提取率 (23.90%) 与模型预测值 (24.15%) 相差不大, 说明该实验模型可靠, 适用于红芪多糖的提取。

表3对比了文献报道的不同红芪多糖提取工艺的红芪多糖提取率。

表3 红芪多糖提取方法的比较

Table 3 Method comparison of extraction of polysaccharides from *Radix Hedysari*

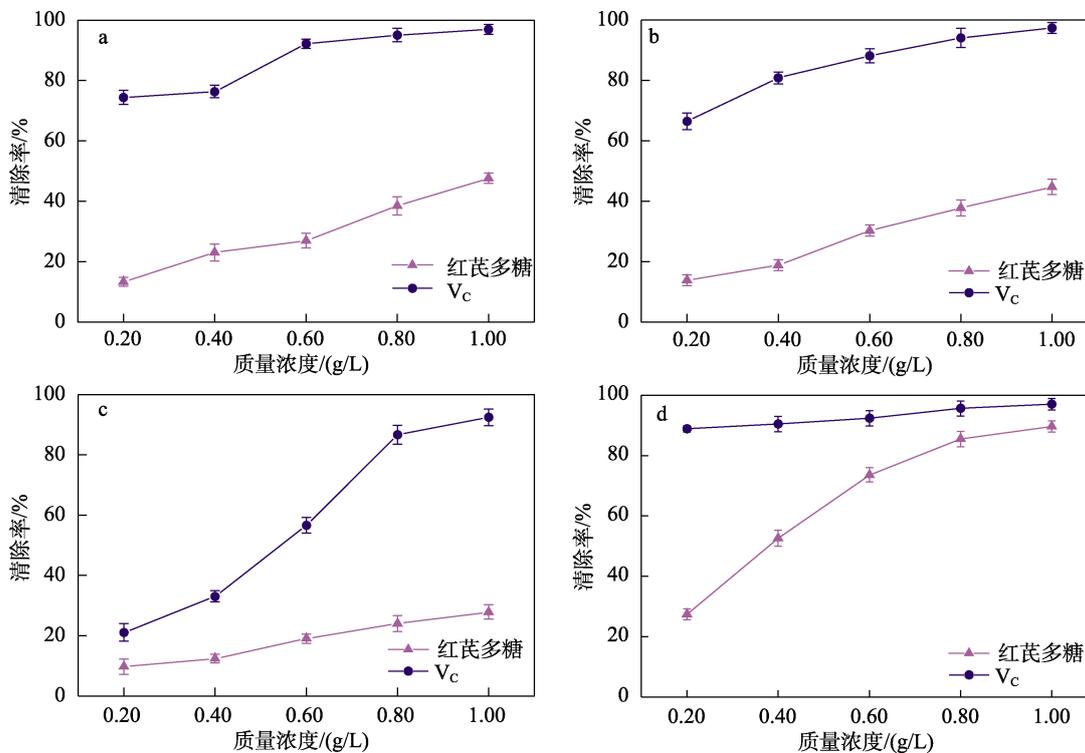
工艺设计方法	提取方法	较佳工艺	提取率/%	参考文献
响应面法	水提醇沉法	提取温度 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、提取时间 180 min 、提取4次、料液比 $1:17$ 、醇沉比 75% (体积分数)	7.70	[27]
二次通用旋转组合设计	酶解法	酶用量 280 mg 、酶解时间 90 min 、料液比 $1:21$ 、提取时间 180 min	9.58	[28]
—	微波超声波法	料液比 $1:250$ 、超声2次、提取时间 20 min	8.98	[29]
—	常规法	料液比 $1:250$ 、提取2次、提取时间 120 min	4.19	[29]
正交实验法	复合酶联合超声法	复合酶配比 $1:1$ 、超声时间 60 min 、酶解 $\text{pH}=5$ 、超声功率 105 W	14.01	[30]
响应面法	超声辅助水提取法	粒度 $45\text{ }\mu\text{m}$ 、超声时间 43 min 、超声温度 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、料液比 $1:21$	23.90	本文

注: “—” 文献未提及。

由表3可以看出, 与文献工艺相比, 本文的工艺条件显著提高了红芪多糖提取率。

2.3 抗氧化活性分析

图3为红芪多糖对4种自由基清除率的影响。



a—DPPH•; b—•O₂; c—•OH; d—ABTS•

图3 红芪多糖对4种自由基的清除率

Fig. 3 Scavenging rates of *Radix Hedysari* polysaccharides on four free radicals

当人体皮肤上的自由基开始大量积累时, 就会导致皮肤过氧化反应, 皮肤开始老化并且出现皱纹等现象。延缓衰老应通过消除自由基实现抗氧

化^[31]。从图3可以看出, 随着红芪多糖质量浓度的增加, 对4种自由基的清除率均不断提高, 呈现出一定的正相关性。

对比红芪多糖对 4 种自由基的清除率, 红芪多糖对 ABTS⁺清除能力最强, 红芪多糖质量浓度在 0.20~1.00 g/L 时对 ABTS⁺清除率迅速升高, 清除率最高达到 89.67%, 与 V_C 对照组 (97.05%) 接近, 半数抑制浓度 (IC₅₀) 为 0.40 g/L; 红芪多糖也表现出对 DPPH[•]与[•]O₂较强的清除能力, 在红芪多糖质量浓度 1.00 g/L 时, 其对 DPPH[•]与[•]O₂清除率分别为 47.58%和 44.77%, IC₅₀ 分别为 1.08、1.12 g/L; 红芪多糖对[•]OH 的清除能力最弱, 当红芪多糖质量浓度为 1.00 g/L 时, 对[•]OH 清除率仅为 27.86%, IC₅₀ 为 1.91 g/L。结果表明, 红芪红芪多糖具有较强的抗氧化能力, 这是因为, 红芪多糖中含有的多羟基与多酚等官能团与自由基反应, 从而中和或减少了自由基的活性, 降低了氧化应激对细胞的损伤^[32]。

2.4 美白活性分析

酪氨酸酶是机体形成黑色素的关键酶, 通过抑制酪氨酸酶防止色素沉着来达到美白效果。图 4 为质量浓度 0.50~10.00 g/L 红芪多糖对酪氨酸酶单酚酶抑制率。

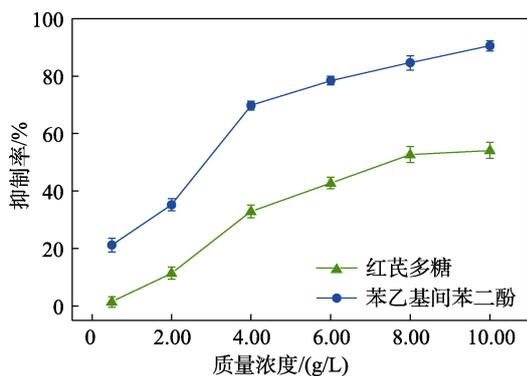


图 4 红芪多糖对酪氨酸酶单酚酶抑制率

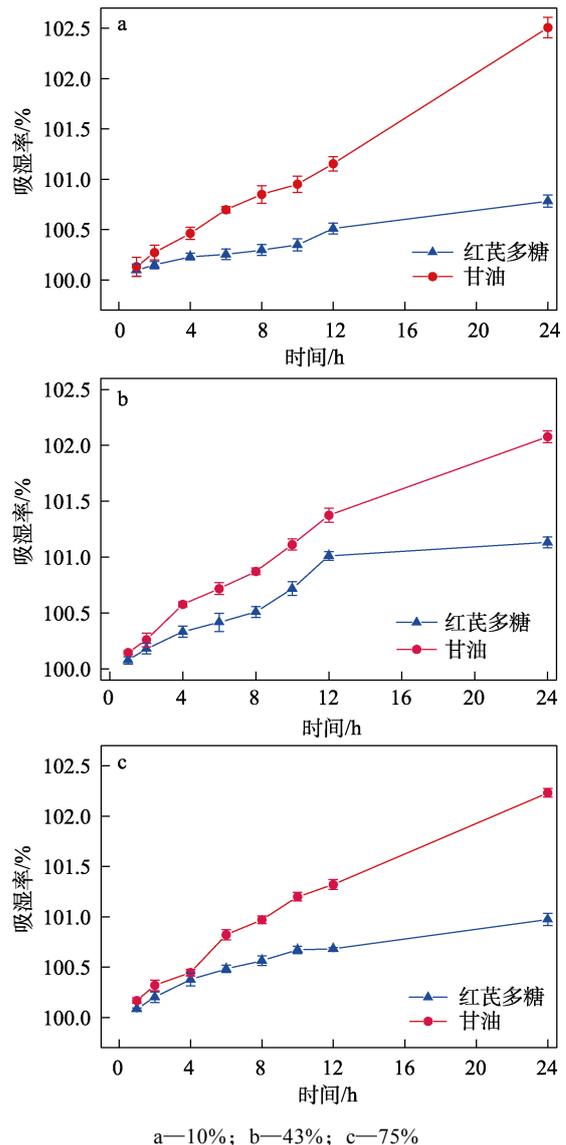
Fig. 4 Inhibition rate of *Radix Hedysari* polysaccharides on tyrosinase monophenolase

从图 4 可以看出, 随着红芪多糖质量浓度的增加, 酪氨酸酶单酚酶抑制率不断增强, 在红芪多糖质量浓度达到 8.00 g/L 后, 抑制率有趋于平稳的趋势。在测试质量浓度 0.50~10.00 g/L 范围内, 酪氨酸酶单酚酶抑制率最高可达 54.14%, IC₅₀=8.06 g/L。对照组 (苯乙基间苯二酚) IC₅₀=3.29 g/L, 表明红芪红芪多糖对酪氨酸酶具有一定的抑制作用, 活性低于美白剂苯乙基间苯二酚。这是因为, 红芪多糖结构复杂、纯度较低, 因此, 除了通过提高红芪多糖质量浓度, 还可经分离纯化得到均一性红芪多糖来提高其美白活性。

2.5 吸湿保湿活性分析

2.5.1 吸湿性分析

图 5 为红芪多糖和甘油在不同相对湿度条件下的吸湿率随时间的变化。



a—10%; b—43%; c—75%

图 5 在不同相对湿度条件下红芪多糖和甘油吸湿率随时间的变化

Fig. 5 Variation of hygroscopicity of *Radix Hedysari* polysaccharides and glycerol at different relative humidity conditions with time

从图 5a~c 看出, 当红芪多糖和甘油在相对湿度 10%、43%与 75%的环境下放置 0~24 h 时, 两者吸湿率都不断升高, 红芪多糖的吸湿效果低于甘油。相比于相对湿度 75%和 10%环境下, 红芪多糖在相对湿度 43%的环境中的吸湿效果最佳, 12 h 吸湿率为 101.01%。这可能是因为, 相对湿度 43%时, 红芪多糖羟基等亲水基团与空气中的水分子相互作用, 实现吸收水分、锁住水分的功能^[33]。成年人体最适相对湿度为 40%~60%^[23], 红芪多糖在此相对湿度范围内可以作为适宜的吸湿剂。

2.5.2 保湿性分析

图 6 为不同保湿剂在不同相对湿度条件下的保湿率随时间的变化。

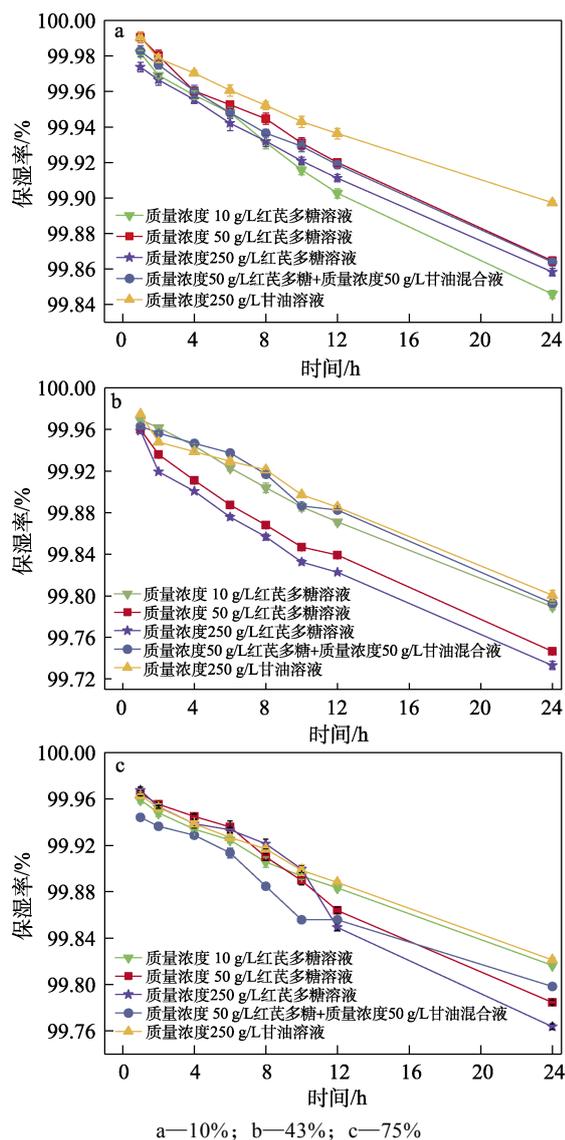


图6 不同保湿剂在不同相对湿度条件下的保湿率随时间的变化

Fig. 6 Variation of humectancy of different humectants at different relative humidity conditions with time

从图6a可以看出,在相对湿度为10%环境中,不同保湿剂的保湿率随时间增加均缓慢降低。24 h时,保湿效果最佳的是质量浓度250 g/L甘油溶液,保湿率达到99.89%;质量浓度50 g/L红芪多糖溶液、质量浓度50 g/L红芪多糖+质量浓度50 g/L甘油混合液的保湿率相差不大,均为99.86%左右。

从图6b可以看出,在相对湿度为43%环境中,不同保湿剂在0~10 h内保湿率下降较快。12 h时,不同质量浓度的红芪多糖溶液均具有较好的保湿效果,其中,质量浓度10 g/L红芪多糖溶液的保湿率为99.87%,质量浓度50、250 g/L红芪多糖溶液的保湿率也均达99.80%以上。

从图6c可以看出,在相对湿度为75%环境中,质量浓度250 g/L甘油与质量浓度10 g/L红芪多糖溶液在24 h内保湿率相差不大。不同质量浓度红芪

多糖在0~12 h内的保湿率均缓慢降低。红芪多糖保湿效果与其水溶液的黏稠性有一定的关系,通过形成一层透明薄膜来减少水分流失,达到保湿效果^[23]。通常化妆品的持妆时间<12 h,因此,在此时间内,红芪多糖可以作为天然绿色、安全可靠、保湿性能优异的保湿剂。

3 结论

(1) 采用响应面法优化超声辅助水提取红芪多糖工艺条件,较佳工艺条件为:提取3次、粒度45目、超声温度70℃、超声时间43 min、料液比1:21,在此条件下红芪多糖提取率为23.90%。

(2) 红芪多糖具有抗自由基氧化功效,对ABTS⁺、DPPH[•]、 $\cdot\text{O}_2^-$ 和 $\cdot\text{OH}$ 均具有一定的清除能力,其对应IC₅₀分别为0.40、1.08、1.12、1.91 g/L。

(3) 红芪多糖具有美白活性,对酪氨酸酶单酚酶具有抑制作用,当红芪多糖质量浓度为10.00 g/L时,酪氨酸酶单酚酶抑制率达54.14%,IC₅₀为8.06 g/L。

(4) 红芪多糖具有极强的吸湿与保湿性能,可作为天然绿色、安全可靠的保湿剂和吸湿剂。

本文为开发集抗衰老、美白、吸湿和保湿等功能于一体的天然美妆产品提供了理论依据,并为扩大红芪在食品工业、临床医学以及日常化妆品等方面的应用提供了数据支持。

参考文献:

- [1] MO X L, GUO D K, JIANG Y G, *et al.* Isolation, structures and bioactivities of the polysaccharides from *Radix Hedysari*: A review[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 199: 212-222.
- [2] WANG R H (王瑞海), YE Y (叶迎), XU J (许京), *et al.* Total polysaccharides content determination of *Hedysari Radix* and *Astragali Radix* from Gansu province[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae (中国实验方剂学杂志), 2017, 23(22): 77-83.
- [3] FENG H M (冯慧敏), LI C Y (李成义), HE J G (何军刚), *et al.* Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Hedysari Radix* and predictive analysis on quality markers[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs (中草药), 2021, 52(9): 2831-2842.
- [4] WEI X C (魏小成), LI C Y (李成义), JIA M T (贾妙婷), *et al.* Research progress on pharmacological action and mechanism of *Hedysarum polybotrys* polysaccharides[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs (中草药), 2023, 54(9): 2953-2961.
- [5] HU F D, LI X D, ZHAO L G, *et al.* Antidiabetic properties of purified polysaccharide from *Hedysarum polybotrys*[J]. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 2010, 88(1): 64-72.
- [6] ZHAO L G (赵良功), FANG Y Y (方瑶瑶), LIU X H (刘小花), *et al.* Effects of *Hedysarum* polysaccharides on osteogenic differentiation of rBMSCs and ROB[s][J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs (中草药), 2021, 52(2): 432-436.
- [7] PANG W J (逢雯珺), XU M H (许梅花). The protective effect and mechanism of *Hedysarum* polysaccharides on ventricular remodeling in rats[J]. Chinese Journal of Gerontology (中国老年学杂志), 2022,

- 42(2): 399-402
- [8] DONG J Q (董嘉琪), ZHANG W D (张旺东), YAO W L (姚万玲), *et al.* Isolation and purification of *Radix Hedysari* polysaccharide-1-1 and analysis of its optimal dosage for regulating intestinal flora imbalance induced by antibiotics in mice[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica* (畜牧兽医学报), 2022, 53(8): 2794-2811.
- [9] SUN W M, WANG Y P, DUAN Y Q, *et al.* *Radix Hedysari* polysaccharide suppresses lipid metabolism dysfunction in a rat model of non-alcoholic fatty liver disease *via* adenosine monophosphate-activated protein kinase pathway activation[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2014, 10(3): 1237-1244.
- [10] ZHONG Q W, WEI B, WANG S J, *et al.* The antioxidant activity of polysaccharides derived from marine organisms: An overview[J]. *Marine Drugs*, 2019, 17(12): 1-34.
- [11] HU W Y (胡文宇), LI S S (李硕硕), CHENG J B (程金波), *et al.* The sensitivity of different neural cells to hypoxia[J]. *China Biotechnology* (中国生物工程杂志), 2022, 42(7): 1-11.
- [12] PEREIRA A F C, IGARASHI M H, MERCURI M, *et al.* Whitening effects of cosmetic formulation in the vascular component of skin pigmentation[J]. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 2020, 19(1): 154-160.
- [13] JIANG X T (姜小天), SUN Z S (孙志双), SHI S Y (施溯筠). Applications and development of traditional Chinese medicine moisturizing ingredients in skin care cosmetics[J]. *Flavour Fragrance Cosmetics* (香料香精化妆品), 2020, 179(2): 66-69.
- [14] ZHANG Z S, WANG X M, HAN Z P, *et al.* Purification, antioxidant and moisture-preserving activities of polysaccharides from papaya[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 87(3): 2332-2337.
- [15] YUAN J L (袁菊丽), WANG Y L (王亚丽), HUANG Y F (黄钰芳). Study on microwave extraction and antioxidant activity of total polysaccharides from *Radix Hedysari*[J]. *Applied Chemical Industry* (应用化工), 2019, 48(2): 373-375, 379.
- [16] ZHU C P, ZHAI X C, LI L Q, *et al.* Response surface optimization of ultrasound-assisted polysaccharides extraction from pomegranate peel[J]. *Food Chemistry*, 2015, 177: 139-146.
- [17] DUBIOUS M, GILLES K A, HAMILTON J K, *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. *Analytical Chemistry*, 1956, 28: 350-366.
- [18] ZHAO Z Y, ZHANG Q, LI Y F, *et al.* Optimization of ultrasound extraction of *Alisma orientalis* polysaccharides by response surface methodology and their antioxidant activities[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 119: 101-109.
- [19] WEI X Y (韦献雅), YIN L Q (殷丽琴), ZHONG C (钟成), *et al.* Advances in the DPPH radical scavenging assay for antioxidant activity evaluation[J]. *Food Science* (食品科学), 2014, 35(9): 317-322.
- [20] HU J W (胡居吾), LUO B (罗斌), WU L (吴磊), *et al.* Physicochemical characterization and antioxidant and immuno-modulatory activity of polysaccharides from *Gynura Procumbens* stem[J]. *Natural Product Research and Development* (天然产物研究与开发), 2019, 31(8): 1299-1306.
- [21] FENG R Z, WANG Q, TONG W Z, *et al.* Extraction and antioxidant activity of flavonoids of *Morus nigra*[J]. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2015, 8(12): 22328-22336.
- [22] WANG Q (王琪), WANG L (王领), HE C F (何聪芬), *et al.* Study on the whitening activity and pathway of *Tricholoma matsutake* TMSP-5 II [J]. *Natural Product Research and Development* (天然产物研究与开发), 2015, 27(1): 134-138.
- [23] ZHAN M R (詹梦茹), WANG Y B (王彦斌), KANG S H (康淑荷), *et al.* Purification of polysaccharides from *Codonopsis pilosula* by macroporous adsorption resin and its whitening, moisture absorption and moisturizing properties[J]. *Chemistry and Industry of Forest Products* (林产化学与工业), 2023, 43(3): 79-88.
- [24] SOROURIAN R, KHAJEHRAHIMI A E, TADAYONI M, *et al.* Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from *Typha domingensis*: Structural characterization and functional properties[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 160: 758-768.
- [25] HU R F (胡润锋), LI J Z (李浚哲), LI P F (李鹏飞), *et al.* Optimization of selenized mulberry leaf polysaccharides preparation by response surface methodology and determination of the antioxidant activity *in vitro*[J]. *Journal of Central South University of Forestry & Technology* (中南林业科技大学学报), 2022, 42(8): 148-157.
- [26] LIU Y, GONG G L, ZHANG J, *et al.* Response surface optimization of ultrasound-assisted enzymatic extraction polysaccharides from *Lycium barbarum*[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 110: 278-284.
- [27] DONG J Q (董嘉琪), ZHANG X S (张晓松), PENG X T (彭晓婷), *et al.* Optimization of extraction process of *Radix hedysari* polysaccharide by response surface methodology[J]. *Progress in Veterinary Medicine* (动物医学进展), 2021, 42(4): 64-71.
- [28] WEI S C (魏舒畅), CHEN F Y (陈方圆), YAN Z P (闫治攀), *et al.* Optimization of technological conditions for enzymatic extraction of total polysaccharide and saponin from *Radix hedysari* by quadratic general rotary unitized design[J]. *Chinese Traditional Patent Medicine* (中成药), 2014, 36(2): 286-290.
- [29] LIU B J (刘宝剑), GUO Y S (郭彦生), DIAO P F (刁鹏飞), *et al.* Comparative study on extracting *Radix hedysari* polysaccharide by microwave-ultrasonic method and conventional method[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences* (安徽农业科学), 2007, 35(30): 9703, 9722.
- [30] YANG X Y (杨秀艳), XUE Z Y (薛志远), YANG Y F (杨亚飞), *et al.* Complex enzyme combined with ultrasound extraction technology, physicochemical properties and antioxidant activity of *Hedysarum* polysaccharides[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica* (中国中药杂志), 2018, 43(11): 2261-2268.
- [31] LIU Y, SUN Y Y, HUANG G L. Preparation and antioxidant activities of important traditional plant polysaccharides[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 111: 780-786.
- [32] FENG Z Y (冯兆园), WANG Y S (王贻森), WANG Z Y (王振宇), *et al.* Research progress on cooperative synergism of plant polysaccharides[J]. *Fine Chemicals* (精细化工), 2024, 41(11): 2358-2369.
- [33] CHEN S F (陈淑芳), LI M X (李明星), MENG W P (蒙文萍), *et al.* Application of seaweed polysaccharides in cosmetics[J]. *Marine Sciences* (海洋科学), 2021, 45(3): 143-151.