

# 响应面分析法优化怀地黄中梓醇提取工艺

徐定华, 朱文学\*

(河南科技大学食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471003)

**摘 要:** 目的: 优化回流辅助提取怀地黄中的梓醇工艺。方法: 在单因素试验基础上, 采用响应面法, 以梓醇的提取得率为响应值, 通过回归分析各工艺参数与响应值之间的关系, 并由此预测最佳的工艺条件。结果: 回流提取的最佳条件为甲醇体积分数 72.94%、提取温度 54.8℃、料液比(g/mL)1:18.7、提取时间 3.0h。该条件下提取 2 次, 梓醇的提取得率达到 3.513%。结论: 响应面法优化回流辅助提取怀地黄中梓醇的预测准确、方便, 所得的最佳提取工艺条件高效、可行。

## Response Surface Methodology as an Approach to Optimize Catalpol Extraction from *Radix Rehmannia glutinosa*

XU Ding-hua, ZHU Wen-xue\*

(College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

**Abstract:** Objective: To optimize the process parameters of solvent reflux extraction of catalpol from *Radix Rehmannia glutinosa*. Methods: On the basis of one-factor-at-a-time experiments, response surface methodology (RSM) was used for process parameter optimization. A regression model was established describing catalpol extraction yield as a response to various process parameters. Results: The optimal extraction conditions were 72.94% methanol aqueous solution as the extraction solvent, extraction temperature 54.8 °C, extraction time 3.0 h and number of repeated extractions 2. Under these conditions, the catalpol extraction yield was 3.513%. Conclusion: The established regression model can accurately and conveniently predict catalpol extraction yield. The optimal extraction process obtained is efficient and feasible.

**Key words:** *Rehmannia glutinosa* Libosch; catalpol; extraction; response surface methodology

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)16-0062-05

怀地黄(*Rehmannia glutinosa* Libosch)为玄参科植物地黄的新鲜或干燥块根, 始见于《神农本草经》, 是我国著名的“四大怀药”之一。据统计它在中药处方中的使用频率排名处于前 10 位<sup>[1-2]</sup>。根据入药形式及药效的差异, 可将地黄分为鲜地黄、生地黄、熟地黄。

梓醇是一种环烯醚萜苷类物质, 是鲜地黄及生地黄的主要有效成分之一, 具有利尿、缓泻、降血糖、保肝、保护神经、抗肝炎病毒以及抗癌及抗衰老等多种药理活性<sup>[3-6]</sup>。目前, 梓醇多是从天然植物中提取经高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)纯化而制得<sup>[7]</sup>, 生产成本较高, 还没有规模生产的相关报道。由于梓醇化学性质不稳定<sup>[8]</sup>, 易受酸碱<sup>[9-10]</sup>等条件影响, 提取比较困难。在怀地黄产地, 通常是选取比较粗大的块根经烘焙制成生地黄及炮制成熟地黄作为药用<sup>[11]</sup>, 而细小和破碎部分由于没有烘焙价值, 大部分都

弃掉, 造成了资源的巨大浪费。因此本实验拟在单因素试验基础上, 利用响应面分析法(response surface methodology, RSM)对怀地黄梓醇提取工艺条件进行优化。以期对地黄的综合开发提供一定参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

怀地黄 河南省温县赵堡乡军地滩村怀地黄种植基地。

梓醇标准品(批号: 20085118) 中国药品生物制品检定所; 甲醇、磷酸(均为分析纯) 天津市科密欧化学试剂有限公司; 乙腈(色谱纯) 天津市四友精细化学品有限公司。

### 1.2 仪器与设备

Agilent 1100 型高效液相色谱仪、Agilent 1100 型紫外检测器、DAD 检测器、Agilent 色谱工作站 美国

收稿日期: 2010-10-21

作者简介: 徐定华(1978—), 女, 硕士研究生, 主要从事天然产物开发与利用研究。E-mail: xudinghua2008@126.com

\* 通信作者: 朱文学(1967—), 男, 教授, 博士, 主要从事农产品与中草药加工研究。E-mail: zwx@mail.haust.edu.cn

Agilent 公司; FA1004 型分析天平(万分之一) 上海市上平仪器公司; RE-52A 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; SHZ-D(III)循环水式真空泵 巩义市英峡予华仪器厂; FW177 型中草药粉碎机 天津市泰斯特仪器有限公司; 平行蒸发器 广州尚准仪器有限公司; 漩涡式样品混合器 美国 ABSON 公司; 101A-2 型数显电热鼓风干燥箱 上海浦东东荣科学仪器有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 梓醇 HPLC 法检测

##### 1.3.1.1 色谱条件

色谱柱: C<sub>18</sub> 柱(Hypersil, 250mm × 4.6mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1% 磷酸(1:99); 流速: 0.8mL/min; 柱温: 30℃; 检测波长: 210nm; 进样量: 10 μL。

##### 1.3.1.2 梓醇标准曲线的绘制

准确称取 0.0041g 梓醇标准品, 用甲醇溶解并定容于 10mL 容量瓶中, 摇匀, 得 0.41mg/mL 标准储备液。再从此储备液中取 5mL, 在平行蒸发器上浓缩至干, 用流动相复溶。准确吸取该对照品液 0.05、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mL, 用流动相定容于 1mL 样品瓶中。

上述配制好的标准溶液系列, 以 1.3.1.1 节色谱条件进行测定, 以梓醇含量为横坐标, 以峰面积为纵坐标绘制标准曲线。回归方程为:  $Y = 3.3696X + 0.1088$ ,  $R^2 = 0.9995$ 。

#### 1.3.2 样品处理及含量测定

将鲜怀地黄切成 2~3mm 小块, 磨碎, 过 100 目筛, 精密称定筛下物 2.00g 于平底烧瓶中, 加 80% 甲醇 40mL, 于 50℃ 水浴回流提取 2h, 过滤; 将滤渣转移至平底烧瓶中, 加 80% 甲醇 40mL, 同上法操作, 合并续滤液, 定容到 100mL 容量瓶中。精密吸取上液 20mL, 减压浓缩, 挥去溶剂, 用流动相复溶, 定容至 5mL; 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 供高效液相色谱测定含量。根据测得的峰面积, 利用标准曲线计算样品中梓醇含量, 用下式可得到怀地黄梓醇的提取率。此鲜怀地黄的湿基含水率为 72.39%。

$$W/\% = \frac{m \times F}{G} \times 100$$

式中:  $W$  为地黄梓醇提取率/%;  $m$  为样品中梓醇含量;  $F$  为稀释因子;  $G$  为怀地黄干粉的质量。

### 1.4 试验设计

#### 1.4.1 单因素试验

回流提取过程中主要影响因素有溶剂体积分数、提取温度、液料比和提取时间等。为了考察各因素对提取效果的影响, 以溶剂体积分数(20%、40%、60%、80%、100%)、提取温度(30、40、50、60、70℃)、

料液比(g/mL)(1:5、1:10、1:15、1:20、1:25)和提取时间(1.0、1.5、2.0、2.5、3.0h)作为考察因素, 以  $W$  作为试验指标, 进行单因素试验。

#### 1.4.2 怀地黄梓醇提取工艺的优化

在单因素试验基础上, 根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理, 以溶剂体积分数、提取温度、料液比和提取时间为考察变量, 分别用  $A$ 、 $B$ 、 $C$ 、 $D$  表示, 以  $W$  为响应值, 采用 4 因素 5 水平响应面分析方法求取优化的工艺参数。

## 2 结果与分析

### 2.1 提取溶剂和提取次数的确定

根据梓醇的性质, 选择提取梓醇最常用的乙醇、甲醇、水 3 种溶剂, 在 60℃ 水浴上回流提取 2 次, 每次 2h 的条件下, 分别测定梓醇的提取率。试验结果表明, 甲醇体系的提取率远高于乙醇和水体系的提取, 故选用甲醇做提取溶剂。

用甲醇做提取溶剂, 在 60℃ 水浴上分别对同一怀地黄样品提取 1、2、3 次, 结果表明, 提取 2 次的得率远高于提取 1 次的, 而和提取 3 次的差别不大, 综合考虑成本等因素, 本试验确定提取次数为 2 次。

### 2.2 单因素试验

#### 2.2.1 溶剂体积分数

称取 2.00g 磨碎的鲜怀地黄样品, 调节料液比为 1:20, 分别用 20%、40%、60%、80%、100% 甲醇在 50℃ 水浴回流提取 2h, 同法提取 2 次, 结果如图 1 所示。

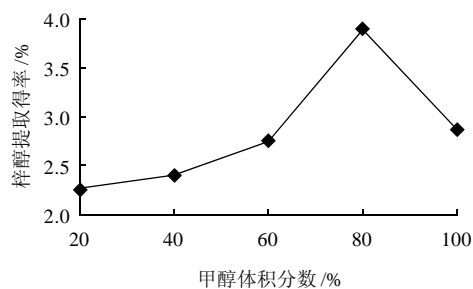


图 1 溶剂体积分数对梓醇提取率的影响

Fig.1 Effect of methanol concentration on catalpol extraction yield

由图 1 可知, 随着溶剂体积分数的增大,  $W$  增大, 当溶剂体积分数达到 80% 时,  $W$  达到最大; 主要是因为甲醇体积分数不同, 极性不同, 故梓醇的溶出率不同; 溶剂体积分数继续增大,  $W$  开始减小, 因此选定在 60%~100% 区间内作响应面优化。

#### 2.2.2 提取温度

称取 2.00g 磨碎的鲜怀地黄样品, 调节料液比为 1:20, 用 80% 的甲醇分别在 30、40、50、60、70℃

水浴上回流提取 2h, 同法提取 2 次, 结果如图 2 所示。

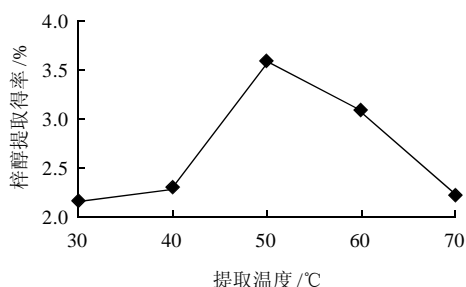


图 2 提取温度对梓醇提取得率的影响

Fig.2 Effect of temperature on catalpol extraction yield

由图 2 可以看出, 随着温度的升高,  $W$  增大, 温度从 40℃ 升到 50℃ 时,  $W$  明显增大; 随着温度的进一步升高,  $W$  下降, 说明梓醇是一种热敏性物质, 在高温下不稳定。因此选定在 40~60℃ 区间内作响应面优化。

### 2.2.3 料液比

称取 2.00g 磨碎的鲜怀地黄样品, 调节料液比为 1:5、1:10、1:15、1:20、1:25, 用 80% 甲醇分别在 50℃ 水浴上回流提取 2h, 同法提取 2 次, 结果如图 3 所示。

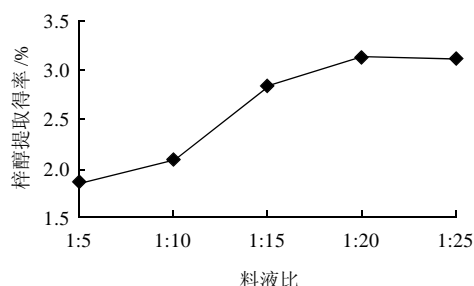


图 3 料液比对梓醇提取得率的影响

Fig.3 Effect of solid-to-liquid ratio on catalpol extraction yield

由图 3 可以看出, 随着提取溶剂用量的增大,  $W$  增大, 料液比从 1:15 到 1:20 时,  $W$  明显增大; 提取溶剂用量继续增大时,  $W$  升高不明显, 综合考虑提取成本等因素, 选定在 1:10~1:30 区间内作响应面优化。

### 2.2.4 提取时间

称取 2.00g 磨碎的鲜怀地黄样品, 调节料液比为 1:20, 用 80% 甲醇分别在 50℃ 水浴上分别回流提取 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0h, 结果如图 4 所示。

由图 4 可以看出, 随着提取时间的增长,  $W$  增大, 提取时间从 2.0h 增长到 3.0h 时, 梓醇提取得率明显增大; 可能是因为时间过短, 梓醇还未充分溶出; 提取时间继续增长时,  $W$  升高不明显, 因此选定在 1.5~3.5h 区间内作响应面优化。

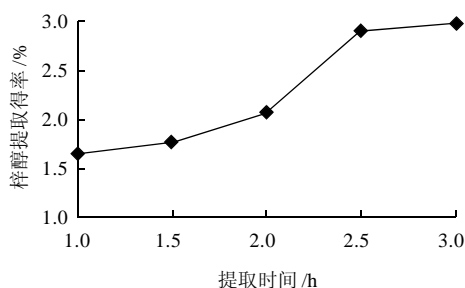


图 4 提取时间对梓醇提取得率的影响

Fig.4 Effect of extraction time on catalpol extraction yield

## 2.3 响应面优化试验

### 2.3.1 Box-Behnken 响应面试验

根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理, 结合上述单因素分析结果, 以上面 4 个因素为自变量, 以梓醇提取得率( $Y$ )为响应值, 具体试验设计方案<sup>[12]</sup>和结果见表 1、2。

表 1 怀地黄梓醇提取工艺响应面试验因素水平编码值

Table 1 Factors and their coded levels in Box-Behnken experimental design

水平	A 溶剂体积分数 / %	B 提取温度 / °C	C 料液比	D 提取时间 / h
2	100	60	1:30	3.5
1	90	55	1:25	3.0
0	80	50	1:20	2.5
-1	70	45	1:15	2.0
-2	60	40	1:10	1.5

### 2.3.2 模型的建立与显著性检验

采用 SAS9.2 软件<sup>[13]</sup>对试验结果进行二次多元回归分析, 得到怀地黄中梓醇的提取得率与回流提取各因素变量间的函数关系为:  $Y=3.493571-0.034625A+0.108125B+0.018708C+0.040458D-0.006813AB+0.000812AC-0.024812AD-0.015813BC+0.023312BD+0.009687CD-0.047632A^2-0.058882B^2-0.090132C^2-0.042632D^2$ 。

对表 2 试验结果进行统计分析, 得到的方差分析结果如表 3 所示。

由表 3 可知, 4 个一次项均达到极显著水平。由  $F$  值可知, 各因素对  $W$  的影响次序为:  $B > D > A > C$ 。从表 3 的分析结果来看, 整体模型的  $P$  值小于 0.0001, 表明该二次方程模型达到极显著水平。二次项及交互项中的  $AD$ 、 $BC$ 、 $BD$  均表现出显著水平。回归方差分析显著性检验结果表明, 该模型回归极显著, 并且失拟项不显著, 说明该方程对试验拟合较好<sup>[14-16]</sup>。

表2 怀地黄梓醇提取工艺响应面试验设计及结果

Table 2 Box-Behnken experimental design and corresponding experimental results

试验号	A 溶剂 体积分数	B 提取 温度	C 料液 比	D 提取 时间	Y 提取 得率/%
1	-1	-1	-1	-1	3.116
2	-1	-1	-1	1	3.157
3	-1	-1	1	-1	3.131
4	-1	-1	1	1	3.261
5	-1	1	-1	-1	3.325
6	-1	1	-1	1	3.495
7	-1	1	1	-1	3.299
8	-1	1	1	1	3.489
9	1	-1	-1	-1	3.097
10	1	-1	-1	1	3.064
11	1	-1	1	-1	3.127
12	1	-1	1	1	3.135
13	1	1	-1	-1	3.276
14	1	1	-1	1	3.353
15	1	1	1	-1	3.273
16	1	1	1	1	3.355
17	-2	0	0	0	3.377
18	2	0	0	0	3.258
19	0	-2	0	0	3.068
20	0	2	0	0	3.477
21	0	0	-2	0	3.082
22	0	0	2	0	3.213
23	0	0	0	-2	3.261
24	0	0	0	2	3.414
25	0	0	0	0	3.506
26	0	0	0	0	3.491
27	0	0	0	0	3.504
28	0	0	0	0	3.485
29	0	0	0	0	3.484
30	0	0	0	0	3.495
31	0	0	0	0	3.490

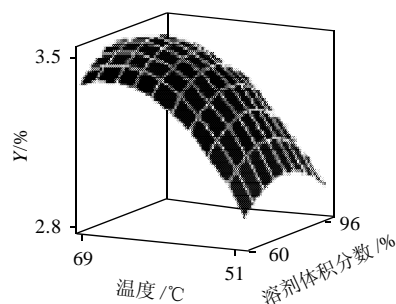
表3 回归方程方差分析表

Table 3 Variance analysis of the established regression equation

方差来源	平方和	自由度	均方和	F 值	P 值
A	0.028773	1	0.028773	63.59667	0.0001**
B	0.280584	1	0.280584	620.1647	0.0001**
C	0.0084	1	0.0084	18.56628	0.000541**
D	0.039285	1	0.039285	86.83019	0.0001**
A <sup>2</sup>	0.064879	1	0.064879	143.4005	0.0001**
B <sup>2</sup>	0.099146	1	0.099146	219.1374	0.0001**
C <sup>2</sup>	0.232308	1	0.232308	513.4607	0.0001**
D <sup>2</sup>	0.051973	1	0.051973	114.875	0.0001**
AB	0.000743	1	0.000743	1.641257	0.218411
AC	0.000011	1	0.000011	0.023346	0.880471
AD	0.009851	1	0.009851	21.77231	0.000258**
BC	0.004001	1	0.004001	8.842287	0.008959**
BD	0.008696	1	0.008696	19.21946	0.000462**
CD	0.001502	1	0.001502	3.318845	0.087238
模型	0.735766	14	0.052555	116.1596	< 0.0001
残差	0.007239	16	0.000452		
失拟项	0.06789	10	0.006789	90.58084	0.069
误差项	0.00045	6	0.000075		
总离差	0.743005	30			

注: \*.P &lt; 0.05, 差异显著; \*\*.P &lt; 0.01, 差异极显著。

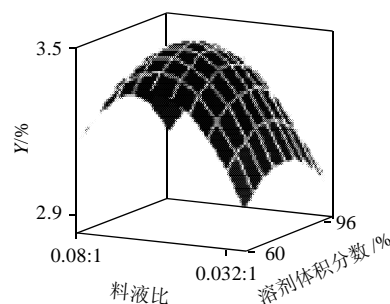
## 2.3.3 响应面分析



固定水平: 料液比 1:20; 提取时间 2.5 h。

图5 溶剂体积分数与提取温度对梓醇提取得率的影响

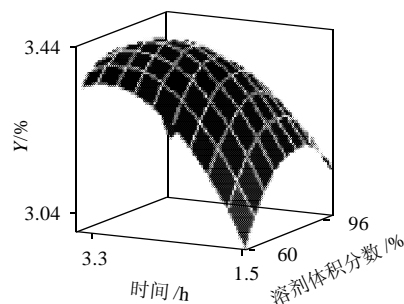
Fig.5 Response surface plot slowing the effects of methanol concentration and temperature on catalpol extraction yield



固定水平: 提取温度 50 °C; 提取时间 2.5 h。

图6 溶剂体积分数与料液比对梓醇提取得率的影响

Fig.6 Response surface plot slowing the effects of methanol concentration and solid-to-liquid ratio on liquid on catalpol extraction yield



固定水平: 提取温度 50 °C; 料液比 1:20。

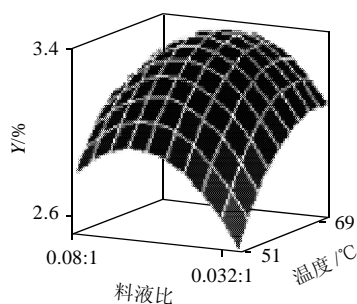
图7 溶剂体积分数与提取时间对梓醇提取得率的影响

Fig.7 Response surface plot slowing the effects of methanol concentration and extraction time on catalpol extraction yield

为了考察交互项对梓醇提取得率的影响,在其他因素条件固定不变的情况下,考察交互项对提取得率的影响,对模型进行降维分析。经 SAS 9.2 软件分析,所得的响应面分析图见图 5~10。响应面分析图直观地反映出各因素交互作用对响应值的影响。

由图 5~10 可知,随着各因素量的增大,响应值增大;当响应值增大到极值后,随着因素量的增大,

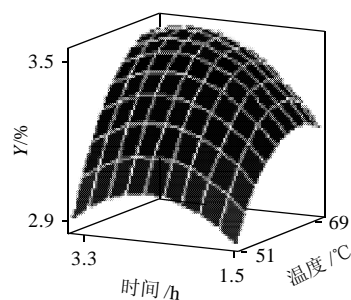
响应值逐渐减小;在交互项对提取率的影响中,溶剂体积分数与提取时间、提取温度与料液比、提取温度与提取时间对  $W$  的影响较显著。另外,由图 5~10 可知该模型在实验范围内存在稳定点,且稳定点是最大值。



固定水平: 溶剂体积分数 80%; 提取时间 2.5h。

图 8 提取温度与料液比对梓醇提取率的影响

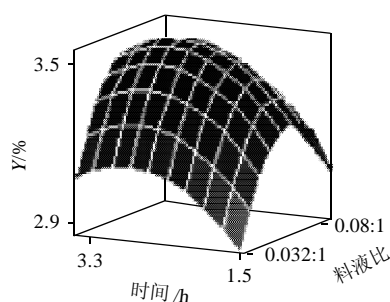
Fig.8 Response surface plot showing the effects of temperature and solid-to-liquid ratio on catalpol extraction yield



固定水平: 溶剂体积分数 80%; 料液比 1:20。

图 9 提取温度与提取时间对梓醇提取率的影响

Fig.9 Response surface plot showing the effects of extraction temperature and time on catalpol extraction yield



固定水平: 溶剂体积分数 80%; 提取温度 50℃。

图 10 料液比与提取时间对梓醇提取率的影响

Fig.10 Response surface plot showing the effects of solid-to-liquid ratio and extraction time on catalpol extraction yield

### 2.3.4 响应面分析

为进一步确定提取工艺最佳点,对拟合的回归方程分别求 4 个变量的一阶偏导,联立方程组。对上方程组求解,并结合响应面图中的评价,可得到怀地黄中梓醇

最佳提取工艺参数为: 甲醇体积分数 72.94%、提取温度 54.8℃、料液比 1:18.7、提取时间 3.0h,在此最佳工艺条件下怀地黄梓醇理论提取得率为 3.513%。考虑到可操作性,在提取条件为甲醇体积分数 73%、提取温度 55℃、料液比 1:19、提取时间 3.0h 时,进行验证实验,得到怀地黄梓醇的提取得率为 3.509%,与理论值较为接近,表明数学模型对优化怀地黄梓醇的提取工艺可行。

## 3 结 论

在怀地黄梓醇的提取体系中,选择甲醇为提取溶剂,通过单因素试验和 Box-Behnken 试验设计以及响应面分析对回流提取工艺进行优化,得出较优工艺条件: 甲醇体积分数 72.94%、提取温度 54.8℃、料液比 1:18.7、提取时间 3.0h。在较优的提取条件下,怀地黄梓醇的提取得率可达到 3.509%。并得到回流提取工艺中各因素变量的二次方程模型,该模型回归极显著,对试验拟合较好,有一定应用价值。

## 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [2] 卢鹏伟. 地黄的化学成分和炮制的比较研究[D]. 开封: 河南大学, 2008.
- [3] 赵宇, 温学森, 武卫红. 地黄不同炮制品中梓醇含量分析现状[J]. 中国药学杂志, 2007, 42(7): 486-488.
- [4] 李杨, 李丹清, 包永明, 等. 梓醇对缺血再灌注损伤神经元保护作用的研究[J]. 中国现代医学杂志, 2005, 15(10): 1454-1456.
- [5] PUNGITORE C R, AYUB M J, BORKOWSKI E J, et al. Inhibition of Taq DNA polymerase by catalpol[J]. Cell Mol Biol, 2004, 50(6): 767-772.
- [6] 刘彦飞, 赵宇, 温学森, 等. 梓醇的药效学及化学转化研究现状[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(12): 1128-1130.
- [7] 樊海燕, 杨坤, 张晨晓, 等. 地黄中梓醇的超声提取-树脂分离纯化工艺[J]. 化工学报, 2008, 59(9): 2283-2288.
- [8] 凌庆枝, 敖宗华, 尹宗耀, 等. 地黄的研究概况[J]. 淮南师范学院学报, 2005, 5(19): 21-23.
- [9] 姚新生. 天然药物化学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 220-221.
- [10] 王宏洁, 边宝林, 杨健. 地黄中梓醇变化条件的探讨[J]. 中国中药杂志, 1997, 22(7): 24-25.
- [11] 张振凌, 张庆岭, 李琪玲. 鲜地黄色素的稳定性研究[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(1): 40-42.
- [12] 任露泉. 实验优化设计与分析[M]. 2版. 北京: 高等教育出版社, 2003.
- [13] 吴有炜. SAS 操作入门[M]. 无锡: 江南大学, 2003.
- [14] 于连松, 周梅村, 郑华, 等. 响应曲面法漂白紫胶真空干燥条件的优化[J]. 食品科学, 2009, 30(18): 121-125.
- [15] 郭秉印, 张仲欣. 响应面法优化冬枣冻干工艺参数[J]. 食品科学, 2011, 32(4): 135-138.
- [16] 王晓阳, 唐琳, 赵垒. 响应面法优化刺槐花多酚的超声提取工艺[J]. 食品科学, 2011, 32(2): 66-70.