

文章编号:1001-6880(2016)6-0910-06

栀子中栀子苷和绿原酸的提取工艺研究

吴亚超¹,赵万顺²,张文生²,叶正良^{3*}¹天津中医药大学,天津 300193; ²天士力制药集团股份有限公司; ³天士力控股集团有限公司,天津 300402

摘要:本实验以绿原酸含量和栀子苷含量为响应值,在单因素实验基础上选取试验因素与水平,根据中心组合(Box-Behnken)试验设计原理,采用3因素3水平的响应面分析法,拟合实验因素与响应值的多元二次方程,并对各个因素的显著性及交互作用进行分析。运用Design-Expert 8.0.6软件优化得到栀子超声提取工艺的最佳条件,液料比42.67 mL/g、甲醇浓度56.89%、超声时间15.67 min,在此条件下,绿原酸含量为27.38 mg/g,栀子苷含量为48.47 mg/g,与模型预测值相近,相对偏差分别为0.60%和1.16%,说明响应面优化所得的栀子提取工艺可靠、可行,提取更为完全、充分,更有利于实现栀子质量的综合评价与利用。

关键词:栀子;栀子苷;绿原酸;响应曲面;提取工艺

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.6.016

Optimization of Extraction of Gardenoside and Chlorogenic Acid from *Gardenia jasminoides* Ellis

WU Ya-chao¹, ZHAO Wan-shun², ZHANG Wen-sheng², YE Zheng-liang^{3*}¹Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China; ²Tasly Pharmaceutical Group Company Limited; ³Tasly Holding Group Company Limited, Tianjin 300402, China

Abstract: To determine gardenoside and chlorogenic acid in *Gardenia jasminoides* Ellis, response surface methodology (RSM) was designed to optimize the extraction method based on the single-factor experiments. A second order quadratic mathematical model for the extraction of gardenoside and chlorogenic acid from *Gardenia jasminoides* Ellis was established. Its validity was verified, and the effects of solid-liquid ratio, ethanol concentration, ultrasonic time on the extraction yield were investigated. The optimal extraction conditions were determined as follows: liquid/solid ratio of 42.67 mL/g, methanol concentration of 56.89%, ultrasonic time of 15.67 min. Under thesee conditions, the yield of chlorogenic acid and gardenoside was 27.38 mg/g, 48.47 mg/g, with only 0.60%, 1.16% differences from the predictive values of RSM. The optimized extraction process was suitable and feasible.

Key words: *Gardenia jasminoides* Ellis; gardenoside; chlorogenic acid; response surface methodology; extraction

栀子来源于茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实,9~11月果实呈红黄色时采收^[1]。栀子属植物化学成分的研究始于20世纪20年代,栀子中主要含环烯醚萜苷类、有机酸酯类、色素类等成分^[2]。栀子具有保肝、降血脂、降血糖、抗炎、抗氧化、抗肿瘤、抗病原体等^[3,4]多种药理活性。目前有关栀子化学成分的提取研究已多有报道^[5,6],但多为针对栀子苷等单一指标成分,多采用单因素、正交等实验设计方法,在设计及结果的评价上存在一定的局限性。

响应面设计是一种有效的统计和优化方法,自20世纪50年代应用以来,现已广泛应用于化工、生

物、食品、制药、生态等领域。较传统的均匀设计与正交设计,响应面法具有试验精度高、试验次数少、数学模型预测性较好的优点,且能考察多个因素对结果的影响^[7]。近年来响应曲面法在优化单味中药提取工艺,优化复方中药提取工艺和中药制剂及其他过程中得到广泛应用。

环烯醚萜苷类成分和有机酸酯类成分的代表物质分别为栀子苷和绿原酸。近年来研究发现栀子苷有抗氧化、促进黑色素生成、抑制NF-κB/IκB通路和细胞黏附分子产生等药理活性。绿原酸具有降糖、降脂抗癌、抗白血病以及心血管保护的作用^[8,9],本文首次以栀子苷和绿原酸含量为响应值,运用Design-Expert软件进行Box-Behnken响应面实验设计,为综合评价栀子质量提供可靠的方法。

1 材料与仪器

1.1 材料

梔子饮片购于河北金木集团药业有限公司,乙腈、甲醇为色谱纯(德国 Merck 公司);磷酸为分析纯(天津市光复精细化工研究所);无水甲醇(天津威晨化学试剂有限公司)。绿原酸(纯度 96.6%,批号 110753-201314)、梔子苷(纯度 97.5%,批号 110749-201316)对照品购自中国食品药品检定研究院。

1.2 仪器

美国 Waters ACQUITY UPLCTM 液相色谱仪,包括二元溶剂管理系统、进样管理系统、柱管理系统、可调谐紫外检测器和 Empower 3.0 色谱工作站;KQ3200E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);XS204 型分析天平(美国 Mettler Toledo 公司);JJ1000 型电子天平(常熟市双杰测试仪器厂);Milli-Q[®]型纯水仪(美国 Millipore 公司)。

2 实验方法

2.1 UPLC 分析条件

色谱柱:ACQUITY UPLC[®] HSS T3 (2.1 × 100 mm, 1.8 μm);流动相为乙腈(A)-0.05% 磷酸水溶液(B),洗脱梯度:0 ~ 0.5 min, 5% A;0.5 ~ 1 min, 5% ~ 10% A;1 ~ 4 min, 10% ~ 11% A;4 ~ 6 min, 11% ~ 12.5% A;6 ~ 7 min, 12.5% ~ 15% A;7 ~ 8 min, 15% ~ 30% A;8 ~ 10 min, 30% ~ 40% A 检测波长:238 nm;柱温:30 °C;流速:0.2 mL/min。在上述色谱条件下,对照品与样品色谱图见图 1。

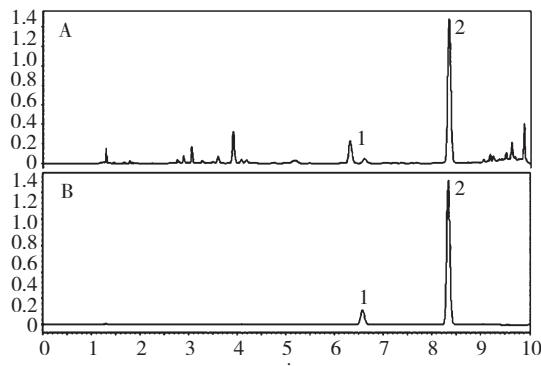


图 1 梔子样品(A)与混合对照品(B)与的 UPLC 图

Fig. 1 UPLC chromatograms of *G. jasminoides* sample (A) and mixed reference standard (B)

1. 绿原酸 chlorogenic acid;2. 梔子苷 gardenoside

2.2 标准曲线的绘制

精密称取绿原酸对照品 15.531 mg、梔子苷对照品 18.303 mg, 定容到 25 mL 容量瓶中, 加适量甲醇超声使其完全溶解, 定容, 摆匀, 分别吸取 0.5、1、2、3、4 mL 定容到 10 mL 容量瓶, 按照 2.1 的色谱条件进样以对照品色谱峰面积(Y)对对照品浓度(X)分别进行回归分析, 梔子苷回归方程: $Y = 2000000X + 362.59, r = 0.9997$, 表明在 0.0366 ~ 0.2928 mg/mL 线性关系良好; 绿原酸回归方程: $Y = 1000000X - 1431.9, r = 0.9995$, 表明在 0.0331 ~ 0.2645 mg/mL 线性关系良好, 且在 2.1 色谱条件下, 绿原酸和梔子苷精密度, 稳定性, 重复性, 加样回收率, 均符合要求。

2.3 供试品溶液的制备

取梔子干燥果实粉碎, 过筛 4 号筛(药典筛), 精密称取梔子粉末 1.0000 g, 置于平底烧瓶中, 加入相应浓度的甲醇适量, 称定重量, 超声一定时间提取(超声频率:40 KHz; 超声电功率:150 W), 取出静置至室温, 称定补足重量, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 作为供试品溶液。

2.4 单因素试验

分别固定甲醇浓度为 50%, 液料比为 50:1 mL/g 考察不同的超声提取时间(5、10、15、25、35 min); 固定超声时间 20 min, 液料比 50:1 mL/g 甲醇浓度(20%、30%、40%、50%、60%、80%); 和固定超声时间 20 min, 甲醇浓度 50% 考察不同液料比(10:1、20:1、40:1、60:1、80:1 mL/g)对梔子中梔子苷和绿原酸峰面积的影响, 见图 2~3。

根据单因素实验基础上, 确定液料比、甲醇浓度和超声时间三个因素及水平值, 运用 Design-Expert (Version 8.0.6) 软件进行 Box-Behnken 响应面设计和数据分析。实验因素分别以 A、B、C 表示, 每个因素的高中低水平分别以 1、0、-1 进行编码, 具体实验因素与各水平值见表 1。

3 实验结果

3.1 响应面分析实验设计及结果

运用 Design-Expert 8.0.6 软件中 Box-Behnken 实验设计方案, 共得 15 个实验: 其中 12 个为析因试验, 3 个为中心点重复试验; 以梔子药材中绿原酸和梔子苷的含量为响应值(R1, R2), 具体实验设计方案与结果见表 2。

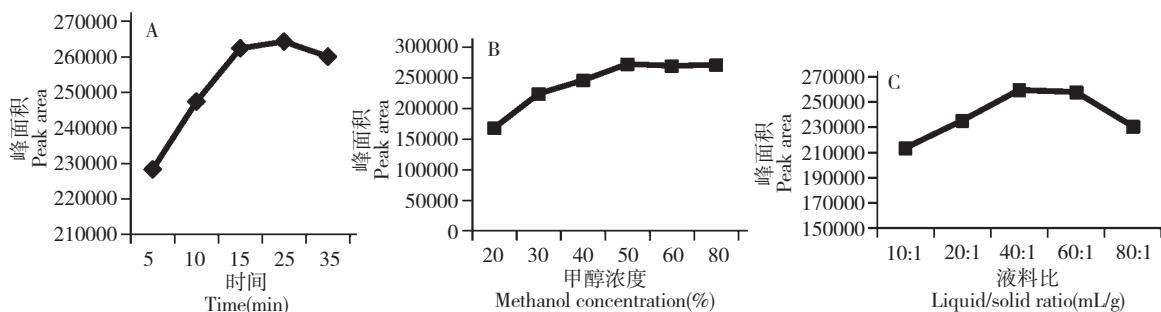


图2 超声时间(A)、甲醇浓度(B)和液料比(C)对绿原酸峰面积的影响

Fig. 2 Effects of ultrasonic time (A), methanol concentration (B) and liquid/solid ratio (C) on the yield of chlorogenic acid

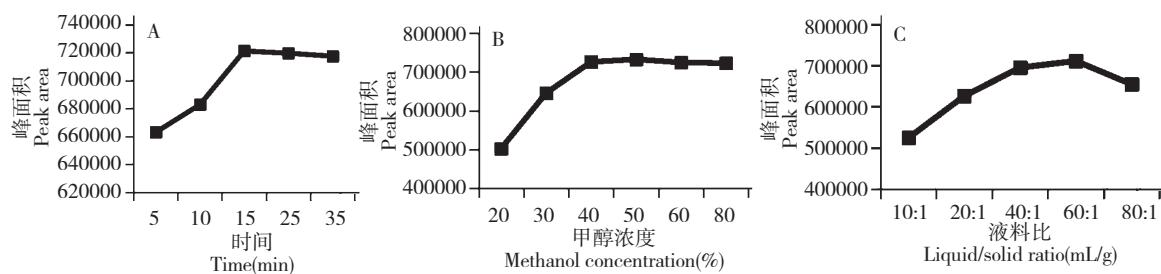


图3 超声时间(A)、甲醇浓度(B)和液料比(C)对栀子苷峰面积的影响

Fig. 3 Effects of ultrasonic time (A), methanol concentration (B) and liquid/solid ratio (C) on the yield of gardenoside

表1 响应面试验因素及水平

Table 1 Factors levels and coding of Box-Behnken Design

因素 Factors	水平 Level		
	-1	0	1
A:超声时间 Ultrasonic time(min)	5	15	25
B:液料比 Liquid/solid ratio(mL/g)	10	40	70
C:甲醇浓度 Methanol concentration (%)	20	40	60

表2 响应面实验设计方案与结果(mg/g)

Table 2 Matrix of Box-Behnken design and results (mg/g)

实验编号 No.	时间 Time	液料比 Liquid/solid ratio	浓度 Concentration	绿原酸含量 Chlorogenic acid(R1)	栀子苷含量 Gardenoside(R2)
1	0	0	0	25.47	46.3
2	1	1	0	25.07	43.25
3	-1	0	1	24.33	44.26
4	-1	0	-1	13	30.4
5	1	-1	0	21.39	37.82
6	0	-1	1	21.23	44.16
7	-1	-1	0	17.65	31.48
8	0	1	-1	15.33	36.15
9	0	1	1	25.1	47.79
10	0	0	0	25.55	44.68

11	0	0	0	26.09	46.94
12	0	-1	-1	13.28	16.33
13	1	0	1	27.05	48.47
14	-1	1	0	21.55	43.39
15	1	0	-1	16.42	36.69

3.2 响应面回归模型的建立与分析

利用 Design-Expert 8.0.6 软件对绿原酸和栀子苷含量进行方差分析及二次多项式回归拟合, 绿原酸: 回归模型 P 值 < 0.0001 , 说明模型极显著; 失拟项 P 值为 0.1634, 不显著, 说明模型可靠度高; 决定系数为 0.9883, 说明该模型拟合程度良好; A、B、C、 A^2 、 B^2 、 C^2 为显著影响因素, 对绿原酸提取效果影响较大。为简化方程, 对模型进行手动优化, 在原有拟合方程基础上, 去除不显著项 AB、AC、BC 后, 方差分析结果见表 3, 优化所得的实际值方程为:

A^2 、 B^2 、 C^2 为显著影响因素, 对绿原酸提取效果影响较大。为简化方程, 对模型进行手动优化, 在原有拟合方程基础上, 去除不显著项 AB、AC、BC 后, 方差分析结果见表 3, 优化所得的实际值方程为:

$$R1 = -13.63616 + 0.59100A + 0.31195B + 1.06633C - 0.014117A^2 - 3.19630 \times 10^{-3}B^2 - 0.010229C^2$$

表 3 优化后绿原酸含量方差分析表

Table 3 Analysis of variance for quadratic polynomial model of ultrasonic extraction of chlorogenic acid

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 DF	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value
模型 Model	331.3515	6	55.22526	112.1719	< 0.0001 **
A	22.445	1	22.445	45.58961	0.0001 *
B	22.78125	1	22.78125	46.27259	0.0001 *
C	196.8128	1	196.8128	399.7603	< 0.0001 **
A^2	7.358041	1	7.358041	14.94543	0.0048 *
B^2	30.55463	1	30.55463	62.06164	< 0.0001 **
C^2	61.81564	1	61.81564	125.5581	< 0.0001 **
残差 Residual	3.938617	8	0.492327	-	-
失拟项 Lack of fit	3.71115	6	0.618525	5.438379	0.1634
纯误差 Pure error	0.227467	2	0.113733	-	-
总和 Total	335.2902	14	-	-	-

注: * 表示显著 ($P < 0.05$); ** 表示极显著 ($P < 0.01$)。

Note: * indicated significant difference ($P < 0.05$); ** indicated extremely significant difference ($P < 0.01$).

栀子苷: 回归模型 P 值 < 0.0001 , 说明模型极显著; 失拟项 P 值为 0.1426, 不显著, 说明模型可靠度高; 决定系数为 0.9485, 说明该模型拟合程度良好; B、C、BC、 B^2 、 C^2 为显著影响因素, 对绿原酸提取效果影响较大。为简化方程, 对模型进行手动优化, 在原有拟合方程基础上, 去除不显著项 AB、AC、 A^2

后, 方差分析结果见表 4, 优化所得的实际值方程为:

$$R^2 = -18.71905 + 0.20875A + 0.91065B + 1.54219C - 6.74583 \times 10^{-3}BC - 5.88568 \times 10^{-3}B^2 - 0.010818C^2$$

表 4 优化后栀子苷含量方差分析表

Table 4 Analysis of variance for quadratic polynomial model of ultrasonic extraction of gardenoside

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 DF	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value
模型 Model	1000.716	6	166.7859	24.5791	< 0.0001 **
A	34.86125	1	34.86125	5.137473	0.0532
B	207.978	1	207.978	30.64954	0.0005 *

C	529.914	1	529.914	78.09298	< 0.0001 **
BC	65.52903	1	65.52903	9.656957	0.0145 *
B ²	104.2207	1	104.2207	15.35892	0.0044 *
C ²	69.54602	1	69.54602	10.24894	0.0126 *
残差 Residual	54.28544	8	6.78568	-	-
失拟项 Lack of fit	51.57158	6	8.595263	6.334329	0.1426
纯误差 Pure error	2.713867	2	1.356933	-	-
总和 total	1055.001	14	-	-	-

注: * 表示显著 ($P < 0.05$) ; ** 表示极显著 ($P < 0.01$)。

Note: * indicated significant difference ($P < 0.05$) ; ** indicated extremely significant difference ($P < 0.01$)。

响应面曲面可较直观地反映各因素及两两因素的交互作用对响应值的影响。时间、液料比和浓度

对栀子苷和绿原酸提取影响的 3D 响应面图见图 4。

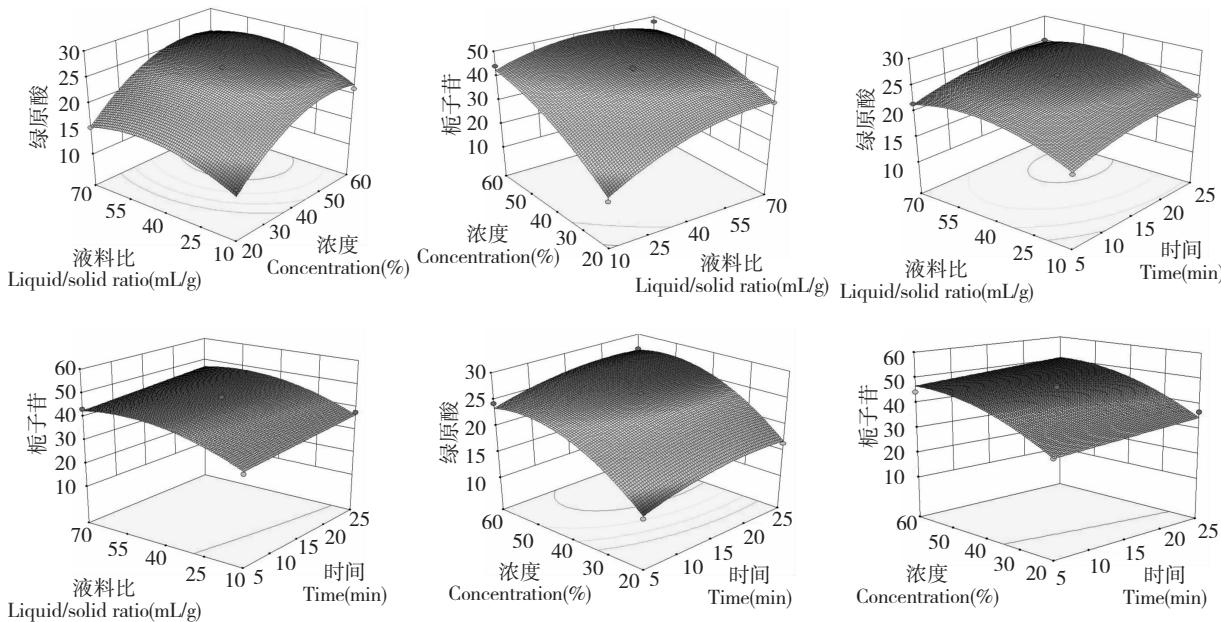


图 4 时间、液料比和浓度对绿原酸和栀子苷提取影响的 3D 响应面图

Fig. 4 Response surface plots showing the interactive effects of ultrasonic time, liquid/solid ratio and concentration on yield of chlorogenic acid and gardenoside

结合方差分析结果与响应面图例可见:甲醇浓度 (C) 对绿原酸和栀子苷提取效果影响最大, 液料比 (B) 与甲醇浓度 (C) 的交互作用对栀子苷的提取效果影响显著, 曲面效应显著。

运用 Design-Expert 8.0.6 软件优化所得的栀子超声提取最佳工艺为: 液料比 42.67 mL/g、甲醇浓度 56.89%、超声时间 15.67 min, 在此条件下绿原酸含量的预测值为 27.20 mg/g, 栀子苷含量预测值为 49.04 mg/g。

3.3 模型的验证性实验

为验证响应面法所得结果的可靠性, 对模型优化的工艺条件进行验证。考虑到实验的可行性与便

捷性, 选择工艺参数: 料液比 43 mL/g、甲醇浓度 57%、超声时间 16 min 进行实验 3 次, 所得结果见表 5, 相对误差小于 2% 说明方程与真实实验情况拟合较好, 优化的工艺可靠、可行 Validation batch。

4 讨论与结论

本研究先通过单因素实验选取合适的参数水平, 并运用三因素三水平的响应面分析法对栀子超声提取工艺的提取时间、甲醇浓度、液料比进行考察, 获得最佳提取工艺条件为液料比 42.67 mL/g、甲醇浓度 56.89%、超声时间 15.67 min, 结合实际将提取条件优化为料液比 43 mL/g、甲醇浓度 57%、

表 5 验证试验结果

Table 5 Results of verification test

验证批次 Batch	绿原酸含量 Chlorogenic acid (mg/g)	相对误差 Relative error	栀子苷含量 Gardenoside (mg/g)	相对误差 Relative error
1	26.71	1.84%	48.13	1.86%
2	27.65	1.64%	48.70	0.70%
3	27.75	2.01%	48.58	0.93%
平均值 AVE	27.38	0.60%	48.47	1.16%

注:相对误差 = |预测值-实验值|/预测值 × 100%。

Note: Relative error = |Predictive value-Experimental value|/Predictive value × 100%.

超声时间 16 min 并通过验证实验证明了工艺的可行性。

比较《中国药典》(2010 年版)中栀子各论所载含量测定方法与优化提取工艺的提取效果。按药典法(液料比 250 mL/g、甲醇、超声时间 20 min)制备供试品溶液 3 份,进样检测,记录色谱图,与验证实验结果进行比较。结果发现:响应面法优化工艺所得的绿原酸含量较药典法高 20.34%,栀子苷含量较药典法高 3.98%,本文旨在为栀子选择一种能较全面评价栀子质量且省时省力的提取方法,响应面优化的栀子提取较药典法中的提取效果好,且药典中溶媒使用纯甲醇提取加大提取成本,药典法中液料比也较大。栀子苷和绿原酸在环烯醚萜和有机酸酯这两类栀子中的主要成分中占据了较大的比重,且为栀子临床用药的主要有效成份,以这两种物质含量综合评价栀子提取方法较为可靠、全面。不论从栀子质量全面评价的角度看,还是从节约成本与实际使用上响应面法优化所得的栀子超声提取工艺较药典提取法栀子的提取效果更为全面、充分,该方法可用于栀子质量的综合评价,并为栀子的综合利用、开发提供依据。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010. Vol I,231.
- 2 Zhou M (周妹), Tang LY (汤丽云), Wang S (王莎), et al. Comparison of qualities of *Gardenia jasminoides* fruits from different production areas. *Nat Prod Res* (天然产物研究与开发), 2013, 25:1731-1735.
- 3 Quan CC, Wei YZ, Hong JK. Effects of *Gardeniae Fructus* extract and geniposide on promoting ligament cell proliferation and collagen synthesis. *Phytother Res*, 2010, 24:1-5.
- 4 Debnath T, Park PJ, Nath NCD, et al. Antioxidant activity of *Gardenia jasminoides* Ellis fruit extracts. *Food Chem*, 2011, 128:697-703.
- 5 Liu G (刘钢), Zhang P (张平), Xia Q (夏泉), et al. Studies on different extraction process of jasminoidin in *Gardenia jasminoides* Ellis with orthogonal design. *Strait Pharm J* (海峡药学), 2013, 25(17):21-23.
- 6 Tu SH (涂盛辉), Qiu ZM (邱祖民), Liu YY (刘燕燕), et al. Traditional Chinese medicine extraction process of *Gardenia jasminoides* Ellis. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2006, 28:1519-1521.
- 7 Zhao LC, He Y, Deng X, et al. Ultrasound-assisted extraction of syringin from the bark of *Ilex rotunda* Thunb using response surface methodology. *Int J Mol Sci*, 2012, 13:7607-7616.
- 8 You WL (游伟良), Ping QN (平其能), Sun MJ (孙敏捷), et al. Recent progress in pharmacology of geniposide. *Prog Pharm Sci* (药学进展), 2012, 36:158-162.
- 9 Wu W (吴卫华), Kang Z (康桢), Ouyang DS (欧阳冬生), et al. Progresses in the pharmacology of chlorogenic acid. *Nat Prod Res* (天然产物研究与开发), 2006, 18:691-694.
- 10 Cui G, Florholmen J. Polarization of cytokine profile from Th1 into Th2 along colorectal adenoma-carcinoma sequence: implications for the biotherapeutic target? *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2008, 7(2):94-97.
- 11 Saxena R, Kaur J. Th1/Th2 cytokines and their genotypes as predictors of hepatitis B virus related hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol*, 2015, 7:1572-1580.

(上接第 851 页)

17 Cui G, Florholmen J. Polarization of cytokine profile from Th1 into Th2 along colorectal adenoma-carcinoma sequence: implications for the biotherapeutic target? *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2008, 7(2):94-97.