

正交实验法优化碱水解栀子提取物制取京尼平苷酸的工艺

赵帅¹, 刘磊磊^{1,2*}, 王欢¹, 郭婕^{1,2}, 彭密军^{1,2}¹吉首大学林产化工加工工程湖南省重点实验室; ²湖南省植物功能成分利用协同创新中心, 张家界 427000

摘要:以栀子提取物为原料,利用正交实验设计方法优化其碱水解制取京尼平苷酸的工艺。以京尼平苷酸产率为评价指标,考察了水解温度、NaOH 加入量、料液比和水解时间 4 个单因素,采用四因素三水平正交实验设计优选得出最佳水解工艺:水解温度为 70 °C、NaOH 加入量为 14.0 mL、料液比 1:30 g/mL、水解时间为 10 min,京尼平苷酸产率为 11.53%。水解后溶液经过一次活性炭静态吸附和解吸,京尼平苷酸的含量可达 45.33%。

关键词:栀子提取物;京尼平苷;京尼平苷酸;碱水解;活性炭

中图分类号:R284.3

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2017.8.016

Preparation of Geniposidic Acid by Alkaline Hydrolysis of *Gardenia* ExtractZHAO Shuai¹, LIU Lei-lei^{1,2*}, WANG Huan¹, GUO Jie^{1,2}, PENG Mi-jun^{1,2}¹Key Laboratory of Hunan Forest Products and Chemical Industry Engineering, Jishou University;²Hunan Co-Innovation Center for Utilization of Botanical Functional Ingredients, Zhangjiajie 427000, China

Abstract: The conditions for the preparation of geniposidic acid from *Gardenia* extract by alkaline hydrolysis were optimized in this study. The effects of hydrolysis temperature, adding amount of NaOH, solid to liquid ratio, hydrolysis time were investigated and orthogonal experiments of $L_9(3^4)$ were carried out. The optimal conditions were obtained as follow: hydrolysis temperature was 70 °C, adding amount of NaOH was 14.0 mL, solid to liquid ratio was 1:30 g/mL, hydrolysis time was 10 min. Under these conditions, the yield of geniposidic acid was 11.53%. The purity of geniposidic acid was increased to 45.33% after static adsorption by activated carbon.

Key words: *Gardenia* extract; geniposide; geniposidic acid; alkaline hydrolysis; activated carbon

京尼平苷酸(Geniposidic acid, GPA) [结构式见图 1(a)] 属于环戊烷型环烯醚萜类,具有利胆、健胃、降糖、抗菌、消炎等生物活性。自然界中,天然存在的 GPA 属于低含量成分,资源有限比如传统中药杜仲,其叶中 GPA 含量略高于皮,含量在 0.1% ~ 1.7% 之间变化,随产地与采摘季节变化较大^[1,2];京尼平苷(Geniposide, GP) [结构式见图 1(b)] 属于一类高含量成分,资源较为丰富,其在中药栀子中的含量可高达 8%^[3],经过提取分离、纯化、重结晶,可以较为容易地得到高纯单体。从生源上讲,GP 是 GPA 的甲酯化产物,这就为 GP 水解制备 GPA 提供一种潜在的可能。水解 GP 制备 GPA 的实验工艺,在国内外公开报道的资料较少,高峰等^[4]和谢键泓等^[5]曾报道采用 NaOH 水溶液水解 GP 制备 GPA,但都未曾报道系统的水解工艺,其研究重点为 GPA

的大孔树脂吸附解吸过程;由于糖苷键在酸性条件下不稳定,并且对设备腐蚀更为严重,所以基本都选用碱性条件;另外,董悦生等采用哈茨木霉 CGM-CC2979 将中药栀子中 GP 直接转化为京尼平,培养温度为 30 °C, pH 为 6.1, 栀子载量为 80 g/L, 转化时间为 48 h, 在此条件下, GP 转化率达 97.8%^[6]。目前,对于 GPA 的分离纯化主要是采用大极性溶剂提取,然后经过硅胶及大孔树脂等柱层析分离,最终得到 GPA 产品。

本文系统研究了在碱性条件下水解栀子提取物制备 GPA 的工艺条件,考察水解温度、NaOH 加入量、料液比和水解时间四个单因素,并在单因素实验的基础上,依据正交实验设计原理进行优化,并利用活性炭对水解产物进行了处理,为工业制备 GPA 提

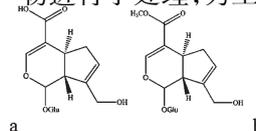


图 1 京尼平苷酸(a)和京尼平苷(b)的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of GPA (a) and GP (b)

收稿日期:2016-04-19 接受日期:2017-02-27

基金项目:湖南省自然科学基金(14JJ6037);湖南省教育厅一般项目(15C1116);吉首大学人才引进专项(jsdxrcyjkxm201301)

*通信作者 Tel:86-744-8231386; E-mail:liull126@126.com

供了一定的理论基础。

1 材料与方 法

1.1 仪器与设备

Agilent 1260 Infinity 高效液相色谱仪(配 G1311C 四元梯度泵, G1315D DAD 检测器, G1316A 柱温箱和 Agilent Chemstation B. 04. 03 工作站), 美国安捷伦科技公司; DF-101C 型集热式恒温加热磁力搅拌器, 河南予华仪器有限公司。

1.2 材料与试剂

梔子提取物(GP 含量为 40. 6%, HPLC 检测), 陕西昊辰生物科技有限公司; 京尼平苷酸对照品(批号: 111828-201001, 纯度 \geq 98%), 日本和光纯药工业株式会社; 京尼平苷对照品(批号: 110749-200613, 纯度 \geq 98%), 中国药品生物制品鉴定所; 甲醇, 色谱纯, 美国 TEDIA Company; 氢氧化钠、盐酸, 均为分析纯。

2 实验方法

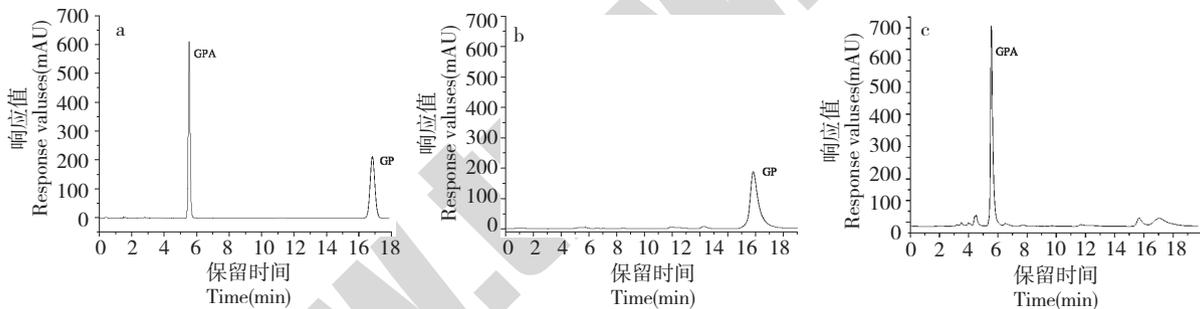


图 2 混合对照品(a)、梔子水解前(b)及水解后(c)的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of mixed reference substance (a), samples before hydrolysis (b) and samples after hydrolysis (c)

2.2 碱水解梔子提取物制备 GPA

准确称取 1.00 g 的梔子提取物置于具塞锥形瓶内, 加入一定体积的去离子水溶解后, 加入一定体积 1.0 mol/L NaOH 溶液, 使初始料液比为 1: 20 g/mL, 水浴加热和磁力搅拌进行水解实验。水解完成后, 用 1.0 mol/L HCl 溶液调节水解液的 pH 值为 4.5 左右, 然后将水解液用 pH 值为 4.5 的 HCl 溶液定容至 100 mL。对定容后的水解液进行 HPLC 检测。

在碱性条件下, 氢氧根离子作为亲核试剂与酯中的羰基碳发生亲核加成反应, 形成一个极其不稳定的四面体中间体, 然后受氢离子作用生成稳定的羧基化合物。

2.1 GP 和 GPA 的 HPLC 检测方法

GP 和 GPA 的 HPLC 检测方法采用本课题组建立的方法^[7]。

色谱条件: Agilent TC C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.1% 磷酸水溶液(25: 75, V/V); 检测波长: 240 nm; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样量: 20 μL。

以质量浓度(X)为横坐标, 峰面积积分值(Y)为纵坐标, 得到 GP 和 GPA 的线性回归方程:

GP 线性回归方程为 $Y_{GP} = 26.661X - 25.017$ ($R^2 = 0.9998$), 在质量浓度为 4.51-440.00 μg/mL 范围内线性关系和精密度良好, 加标回收率为 99.80%, RSD 为 2.26%;

GPA 线性回归方程为 $Y_{GPA} = 24.701X + 39.014$ ($R^2 = 0.9997$) 在质量浓度为 5.12-500.00 μg/mL 范围内线性关系和精密度良好, 加标回收率为 100.20%, RSD 为 2.15%。

水解前后样品的 HPLC 色谱图如图 2 所示。

GPA 产率计算公式如下:

$$Y(\%) = \frac{m_{GPA} \times M_{GP}}{m_{GP} \times M_{GPA}} \times 100$$

其中 Y 为 GPA 产率(%); m_{GPA} 为水解后得到 GPA 的质量(g), 由 GPA 标准曲线计算得出; m_{GP} 为水解前梔子提取物初始质量(g); M_{GPA} 为 GPA 的相对分子质量; M_{GP} 为 GP 的相对分子质量。

2.3 单因素实验

2.3.1 水解温度对 GPA 产率的影响

准确称取 1.00 g 梔子提取物, 加入一定体积去离子水充分溶解后, 再加入 3.0 mL 1 mol/L NaOH 溶液, 料液比为 1: 20 g/mL, 设定水解温度为 40、50、60、70、80、90 °C, 水解 30 min, 结果见图 4。

2.3.2 NaOH 加入量对 GPA 产率的影响

准确称取 1.00 g 栀子提取物,加入一定体积去离子水充分溶解后,料液比为 1:20 g/mL,水解温度为 60 ℃,选取 1 mol/L NaOH 溶液加入量为 4、6、8、10、12、14、16、18 mL,水解 30 min,结果见图 5。

2.3.3 料液比对 GPA 产率的影响

准确称取 1.00 g 栀子提取物,加入一定体积去离子水充分溶解后,再加入 14 mL 1 mol/L NaOH 溶液,水解温度为 60 ℃,选取料液比为 1:20、1:30、1:40、1:50、1:60,水解 30 min,结果见图 6。

2.3.4 水解时间对 GPA 产率的影响

准确称取 1.00 g 栀子提取物,加入一定体积去离子水充分溶解后,再加入 14 mL 1 mol/L NaOH 溶液,水解温度为 60 ℃,水解时间为 10、20、30、40、50、60 min,进行水解实验,结果见图 7。

2.4 正交实验优化实验设计

根据单因素实验结果,采用正交实验设计原理,选择水解温度(A)、NaOH 加入量(B)、料液比(C)和水解时间(D)进行四因素三水平 $L_9(3^4)$ 正交实验,经过 SPSS 19.0 版本进行实验组设计和方差分析,因素水平表见表 1。

表 1 正交实验因素水平表

Table 1 Factors and levels of the orthogonal design

水平 Levels	(A)水解温度 Temperature (°C)	(B)NaOH 加入量 The loading of NaOH (mL)	(C)料液比 Ratio of solid to liquid (g/mL)	(D)水解时间 Time (min)
1	50	10	1:20	10
2	60	14	1:30	20
3	70	18	1:40	30

2.5 京尼平昔酸的分离纯化

GPA 的分离纯化主要分两步,一是吸附:采用活性炭吸附水解后溶液中的 GPA,室温下,静态吸附 24 h,抽滤得吸附有 GPA 的活性炭滤饼,滤液经 HPLC 检测,未发现 GPA。二是解吸:准确称取 5.0 g 低温烘干的吸附有 GPA 的活性炭 4 份于锥形瓶中,分别加一定量的去离子水润湿,然后向 4 个锥形瓶中分别加入 50 mL 20%、40%、70%、100% (v/v) 乙醇-水溶液,在 50 ℃ 水浴条件下进行磁力搅拌,固液比为 1:10 g/mL,解吸时间为 2 h。最后对解吸液进行 HPLC 含量检测,计算不同解吸条件下 GPA 的含量。

3 结果与分析

3.1 单因素实验结果与分析

3.1.1 水解温度

由图 4 可知,当温度在 40~60 ℃ 之间时,GPA 产率随温度升高而升高;温度超过 60 ℃ 后,GPA 产率逐渐下降。这可能是由于酯水解反应是可逆反应,在低温时有利于反应正向进行,即 GP 水解成 GPA;高温时有利于反应逆向进行,即 GPA 在碱溶液中与甲醇反应合成 GP。此外,温度过高对 GP 和 GPA 分子的稳定性影响较大,造成原料和产物同时损

失,从而影响 GPA 的产率,所以水解温度选用 60 ℃。

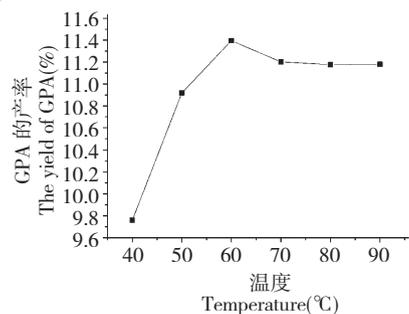


图 4 水解温度对栀子提取物水解产生 GPA 的影响

Fig. 4 Effect of temperature on hydrolysis reaction

3.1.2 NaOH 加入量

由图 5 可知,当 1.0 mol/L NaOH 加入量在 4~14 mL 之间时,GPA 的产率随 1.0 mol/L NaOH 加入量增加而增大;超过 14 mL 后,GPA 的产率略有减小。这是由于 NaOH 在酯水解反应中不仅提供一个碱性环境而且其 OH⁻ 离子更是参与反应,所以当 NaOH 加入量较少时,体系中没有充分的 OH⁻ 离子参与反应;而 NaOH 加入量过多时,又会增加逆向反应过程,同时过多的 NaOH 会破坏 GP 和 GPA 分子结构,使得 GPA 产率下降。所以 1.0 mol/L NaOH 加入量选用 14 mL。

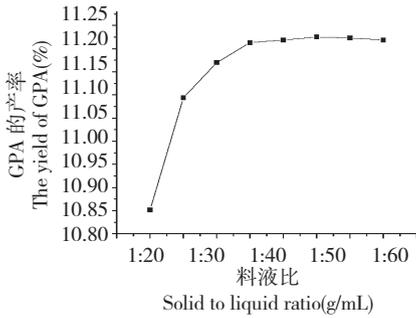


图5 NaOH加入量栀子提取物水解产生GPA的影响

Fig. 5 Effect of the adding amount of NaOH on hydrolysis reaction

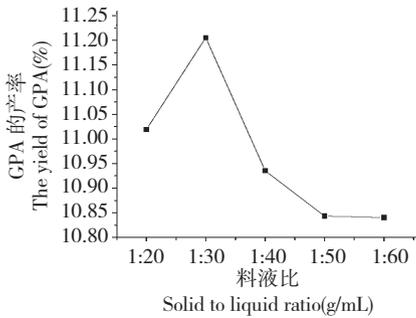


图6 料液比栀子提取物水解产生GPA的影响

Fig. 6 Effect of solid to liquid ratio on hydrolysis reaction

3.1.3 料液比

由图6可知,GPA产率是先增加后减小,当料液比为1:30(g/mL)时,GPA产率最大。这可能是

较大的料液比稀释了反应产物,使得反应正向进行增大,从而使得GPA产率增大。所以选用料液比为1:30(g/mL)。

3.1.4 水解时间

由图7可知,GPA的产率先增高后略有下降,在水解时间为20min时,GPA的率最高。原因是当水解时间较短时,水解不充分;水解时间过长时,水解副产物增多,不利于酯水解反应正向进行,同时在强碱环境下GP和GPA结构可能发生变化,影响水解反应的进行。所以选用水解时间为20min。

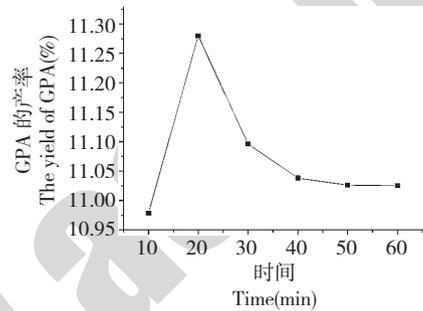


图7 水解时间栀子提取物水解产生GPA的影响

Fig. 7 Effect of time on hydrolysis reaction

3.2 正交实验结果与分析

根据单因素实验结果,选择水解温度(A)、NaOH加入量(B)、料液比(C)和水解时间(D)进行四因素三水平 $L_9(3^4)$ 正交实验。实验结果见表2,方差分析结果见表3。

表2 $L_9(3^4)$ 正交实验设计及结果($n=3$)Table 2 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal tests ($n=3$)

实验号 No.	水解温度 Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	NaOH加入量 Adding amount of NaOH (mL)	料液比 The ratio of solid to liquid (g/mL)	水解时间 Time (min)	产率 Yield (%)
1	2	3	3	1	10.42
2	3	3	1	3	11.49
3	3	2	2	1	11.53
4	1	1	1	1	7.92
5	2	1	2	3	11.00
6	2	2	1	2	11.31
7	3	1	3	2	11.48
8	1	3	2	2	11.31
9	1	2	3	3	10.74
K1	9.99	10.13	10.24	9.96	
K2	10.91	11.19	11.28	11.37	
K3	11.50	11.07	10.88	11.08	
极差	1.51	1.06	1.04	1.41	

依据正交实验设计直观分析法,通过各因素的K值和极差分析可以看出影响GPA产率的主要因素为:水解温度(A) > 水解时间(D) > NaOH加入量(B) > 料液比(C),四个因素都极显著,由K值大小确定最优水平为 $A_3B_2C_2D_2$,即水解温度为70℃、NaOH加入量为14.0 mL、料液比1:30 g/mL、水解时间为20 min。

3.3 验证实验

依据正交实验设计确定的最优水解条件 $A_3B_2C_2D_2$ (水解温度为70℃、NaOH加入量为14.0 mL、料液比1:30 g/mL、水解时间为20 min)进行验证实验,做5次平行实验,结果见表4,GPA产率平

均值为11.22%,RSD为1.06%,表明该最优水解实验条件稳定可行,重复性良好,但其GPA产率低于正交实验设计中选择的试验点 $A_3B_2C_2D_1$ (产率为11.53%,数据见表2)。

3.4 GPA的纯化结果

采用不同浓度的乙醇-水溶液对吸附有GPA的活性炭进行解吸。解吸液经HPLC定量分析,计算得出GPA含量[GPA含量=(GPA质量浓度×单位体积×100)/单位体积解吸液烘干后的质量],结果见表5,其中解吸液为40%(v/v)乙醇-水溶液时,GPA含量最高,达到45.33%。

表3 方差分析表

Table 3 Analysis of variance

变异来源 Source of variance	偏差平方和 Sum of squares of deviations	自由度 Degree of freedom	F值 F value	显著性 Significant
A	6.935	2	621.064	$P < 0.01$
B	4.038	2	361.589	$P < 0.01$
C	3.314	2	296.741	$P < 0.01$
D	6.698	2	599.852	$P < 0.01$
误差	0.050	9		
总误差	21.035	17		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.0$; $F_{0.01}(2,2) = 99.0$ 。

表4 最优条件验证实验结果

Table 4 Predicted and experimental results of the GPA hydrolysis yield under optimal conditions

实验号 No.	产率 Yield (%)	平均值 Mean (%)	RSD
1	11.37		
2	11.20		
3	11.26	11.22	1.06%
4	11.22		
5	11.04		

表5 不同体积浓度的乙醇水溶液的解吸结果

Table 5 The desorption results using different concentrations of ethanol

解吸溶剂 Desorption solvent	乙醇体积浓度 The volume concentration of ethanol-water solvent			
	20%	40%	70%	100%
GPA含量 ^a Concentration of GPA	23.45%	45.33%	25.34%	18.34%

4 结论

本文研究了栀子提取物碱性条件下转化为GPA的工艺条件。首先考察了水解温度、水解时

间、NaOH加入量和料液比对GPA产率的影响;然后依据正交实验设计原理进行四因素三水平 $L_9(3^4)$ 正交实验,经过方差分析得出:水解温度、水解时间、NaOH加入量和料液比四个因素均为极显著

因素,最终确定最优水解工艺为:水解温度为70℃、NaOH加入量为14.0 mL、料液比1:30 g/mL、水解时间为10 min,在此条件下,GPA的产率为11.53%。水解后溶液经过一次活性炭静态吸附和解吸,GPA的含量可达45.33%。该工艺具有操作简单、成本低廉、设备要求低、易放大生产、产品易回收等优点,为大量制备GPA提供一定理论基础。

参考文献

- Liu H(刘慧),Zhang S(张盛),Liu ZH(刘仲华), *et al.* Simultaneous determination of geniposidic acid, chlorogenic acid, geniposide and pinorsinol diglucoside in *Eucommia ulmoides* by HPLC. *Chin Tradit Herb Durgs* (中草药),2012, 43:1547-1549.
- Zhou YL(周云雷),Guo J(郭婕),Wang ZH(王志宏), *et al.* Simultaneous determination of six active ingredients in *Eucommiae folium* in different periods by HPLC. *J Chin Med Mater* (中药材),2015,38:540-543.
- Liu YR(刘育容),Ding KY(丁克毅),Liu J(刘军). Re-

search on extraction and adsorption of geniposide form *Sichuan Gradenia*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发),2014,26:1864-1867.

- Shang F(商锋),Yin S(尹胜),Xiao X(肖潇), *et al.* Purification and preparation of geniposidic acid by macroporous resin. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技),2016,37(1):93-97.
- Xie JH(谢键泓),Zeng YW(曾彦雯),Liang HZ(梁华正), *et al.* Isolation and purification of geniposidic acid made from geniposide by hydrolyzing with alkali. *Food Sci Technol* (食品科技),2011,36:226-229.
- Dong YS(董悦生),Liu LP(刘乐平),Bao YM(包永明), *et al.* Biotransformation of geniposide in *Gardenia jasminoides* to genipin by *Trichoderma harzianum* CGMCC 2979. *Chin J Catal* (催化学报),2014,35:1534-1546.
- Dang HZ(党会章),Liu LL(刘磊磊),Zhao S(赵帅). Determination of geniposidic acid and geniposide in *Eucommiae cortex* by HPLC. *Anti Infect Pharm* (抗感染药理学),2014,4:315-317.

《天然产物研究与开发》青年编委会

青年编委(以姓氏笔划为序)

Members

丁克	王红兵	戈惠明	尹文兵	尹胜	吕兆林
DING Ke	WANG Hongbing	GE Huiming	YIN Wenbing	YIN Sheng	LV Zhaolin
伍婉卿	刘相国	孙昊鹏	孙桂波	孙黔云	李芸霞
WU Wanqing	LIU Xiangguo	SUN Haopeng	SUN Guibo	SUN Qianyun	LI Yunxia
李良成	李国友	邱莉	汪海波	沐万孟	张炳火
LI Liangcheng	LI Guoyou	QIU Li	WANG Haibo	MU Wanmeng	ZHANG Binghuo
陈益华	林茂祥	林昌俊	欧阳杰	易华西	罗应刚
CHEN Yihua	LIN Maoxiang	LIN Changjun	OU Yangjie	YI Huaxi	LUO Yinggang
周文	胡友财	袁涛	夏永刚	高慧敏	唐金山
ZHOU Wen	HU Youcai	YUAN Tao	XIA Yonggang	GAO Huimin	TANG Jinshan
黄胜雄	韩淑燕	蓝蔚青	廖晨钟	潘卫东	薛永波
HUANG Shengxiong	HAN Shuyan	LAN Weiqing	LIAO Chenzhong	PAN Weidong	XUE Yongbo