

# 栀子中效应成分的稳定性考察及减压提取工艺优选

伍振峰<sup>1,2</sup>, 王雅琪<sup>2</sup>, 杨明<sup>1,2\*</sup>, 王芳<sup>1,2</sup>, 黄娟<sup>1</sup>, 韩丽<sup>1\*</sup>

(1. 成都中医药大学, 成都 610075;

2. 江西中医药大学, 现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004)

**[摘要]** **目的:**考察栀子水提液中栀子苷、西红花苷 I 的稳定性并优选栀子的减压提取工艺参数。**方法:**采用经典恒温法考察栀子水提液中栀子苷、西红花苷 I 的稳定性。以栀子苷、西红花苷 I 含量及浸膏得率为因变量, 提取温度、提取时间、料液比为自变量, 利用 Box-Behnken 设计-效应面法优选提取工艺条件。**结果:**最佳提取工艺参数为提取温度 45 ℃, 提取时间 60 min, 料液比 1:14; 栀子苷质量分数 3.51%, 西红花苷 I 质量分数 1.21%, 浸膏得率 28.24%, RSD 分别为 1.44%, 2.21%, 0.96%, 各因变量与预测值偏差较小。**结论:**减压提取法适合药材中热敏性成分的提取, 优选的减压工艺稳定可行, 为栀子的综合利用开发提供实验依据。

**[关键词]** 栀子; 栀子苷; 西红花苷 I; 减压提取工艺; Box-Behnken 设计; 响应面分析

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)06-0010-05

**[doi]** 10.11653/syfy2014060010

## Investigation of Stability and Optimization of Vacuum Extraction Technology for Active Constituents in Gardeniae Fructus

WU Zhen-feng<sup>1,2</sup>, WANG Ya-qi<sup>2</sup>, YANG Ming<sup>1,2\*</sup>, WANG Fang<sup>1,2</sup>, HUANG Juan<sup>1</sup>, HAN Li<sup>1\*</sup>

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengdu 610075, China;

2. Key Laboratory of Modern Preparation of TCM, Ministry of Education, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate stability of geniposide and crocin-I in water extract of Gardeniae Fructus and optimize their vacuum extraction process. **Method:** Stability of geniposide and crocin-I in water extract was studied by classical constant temperature acceleration test. With extract yield, contents of geniposide and crocin-I as dependent variables, solid-liquid ratio, extraction temperature and time as independent variables, Box-Behnken design-response surface methodology was optimize vacuum extraction technology. **Result:** Optimal process parameters was as follows: extraction temperature 45 ℃, extraction time 60 min, ratio of liquid to solid 14:1; Under these conditions, extract yield, contents of geniposide and crocin I were 28.24% (0.96%), 3.51% (1.44%) and 1.21% (2.21%), respectively. **Conclusion:** Vacuum extraction method was suitable for Chinese herbals which contained heat-sensitive components. This optimized process was reasonable and practicable, which could provide useful reference for comprehensive utilization of Gardeniae Fructus.

**[Key words]** Gardeniae Fructus; geniposide; crocin I; vacuum extraction technology; Box-Behnken design; response surface analysis

**[收稿日期]** 20131020(007)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81173565);江西省教育厅项目(GJJ13603)

**[第一作者]** 伍振峰, 博士, 从事中药新剂型与新技术/中药制药装备研究, Tel:0791-87118108, E-mail: zfwu527@163.com

**[通讯作者]** \* 杨明, 教授, 博士生导师, 从事中药制剂研究, Tel/Fax:0791-87118658, E-mail: yangming16@126.com;

\* 韩丽, 教授, 从事中药制剂研究, E-mail: hanliy@163.com

传统的中药提取方法包括回流提取、渗漉、浸渍等,其中回流提取法应用较多,但传统的回流提取法存在提取时间较长、温度较高、提取杂质多等问题。减压回流提取法是在传统回流提取法的基础上增加一套减压装置,通过减力调控来实现低温负压状态提取,防止热敏性成分因高温长时间煎煮而被破坏<sup>[1-2]</sup>,同时降低淀粉、黏液质等杂质成分的提取量,有利于后续制剂工艺研究,还可以减少药物服用量。梔子具有泻火除烦、清热利湿、凉血解毒之功效,临床用于治疗湿热黄疸、目赤肿痛、淋证湿痛等症<sup>[3]</sup>,主要化学成分包括环烯醚萜类(如梔子苷)和西红花苷类(如西红花苷 I)。本实验以梔子为模型药,利用经典恒温法考察梔子提取液的热稳定性,采用 Box-Behnken 设计-效应面法优选梔子的减压提取工艺,为梔子的综合开发利用提供参考。

## 1 材料

1260 型高效液相色谱系统(美国 Agilent 公司),BT224S 型电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),UV2550 型紫外分光光度计(日本岛津),6202 型摇摆式高速中药粉碎机(北京环亚天元机械技术有限公司),GZX-9140MBE 型数显鼓风干燥箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂)。

梔子苷、西红花苷 I 对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110807-200205,10457-201210),梔子(购自江西汇仁集团,经江西中医药大学杨明教授鉴定系茜草科植物梔子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实),甲醇、乙腈为色谱纯,水为双蒸水,其余试剂均为分析纯。

## 2 方法及结果

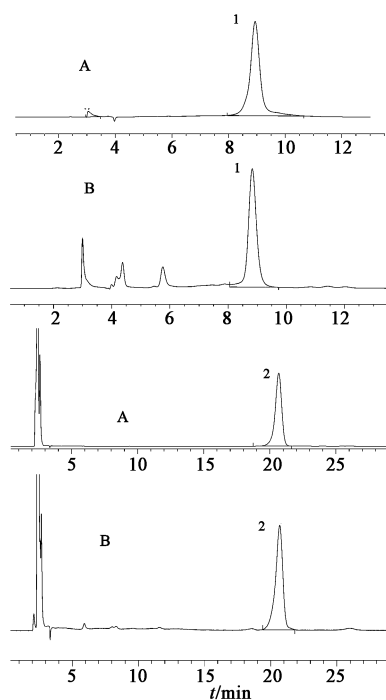
### 2.1 梔子苷的含量测定<sup>[4]</sup>

**2.1.1 色谱条件** Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水(15:85),检测波长 238 nm,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 30 °C,见图 1。

**2.1.2 对照品溶液的制备** 精密称取梔子苷对照品 18.32 mg,置于 100 mL 棕色量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,混匀,即得,作为对照品贮备液。

**2.1.3 供试品溶液的制备** 吸取已定容的提取液 1 置于 10 mL 量瓶中,用甲醇定容,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

**2.1.4 线性关系考察** 精密称取对照品贮备液 1, 2, 3, 4, 5, 10 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇定容,得系列对照品溶液。精密吸取各对照品溶液 20 μL,按 2.1.1 项下色谱条件测定,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程  $Y =$



A. 对照品; B. 供试品; 1. 梔子苷; 2. 西红花苷 I

图 1 梔子减压提取液 HPLC

288 41X - 22.912 ( $r = 0.9997$ ), 线性范围 3.66 ~ 36.6 μg。

### 2.2 西红花苷 I 的含量测定<sup>[5]</sup>

**2.2.1 色谱条件** Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-水(45:55),检测波长 440 nm,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 35 °C,见图 1。

**2.2.2 对照品溶液配制** 精密称取西红花苷 I 对照品 15.08 mg,置于 50 mL 量瓶中,用甲醇溶解并定容,即得,作为对照品储备液。

**2.2.3 供试品溶液的制备** 同 2.1.3 项。

**2.2.4 线性关系考察** 精密量取对照品储备液 0.2, 1, 2, 5, 10, 20 mL, 分别置于 25 mL 量瓶中,加甲醇定容,得系列品溶液。精密吸取各对照品溶液 20 μL,照 2.2.1 项下色谱条件测定,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程  $Y = 46560X - 55.757$  ( $r = 0.9995$ ),线性范围 0.048 26 ~ 4.826 μg。

### 2.3 热稳定性考察

**2.3.1 梔子水提液的制备** 精密称取梔子粗粉 10 g,加 10 倍量水于 45 °C 减压提取 3 次,每次 1 h,滤过,加水定容至 500 mL,摇匀,精密吸取该提取液 1 mL 置于 10 mL 量瓶中,加水定容,摇匀,即得。

**2.3.2 温度与受热时间对梔子苷稳定性的影响** 取梔子水提液 6 份,分别置于 50, 60, 70, 80, 90, 100 °C 恒温水浴锅内,各样品于 0, 1, 3, 5, 7, 9 h

取样,迅速冷却,按 2.1 项下方法测定栀子苷含量,结果见表 1。以栀子苷质量浓度的自然对数( $\ln C$ )为纵坐标, $t$ 为横坐标,得回归方程的斜率(即降解速率常数  $k$ )和相关系数( $r$ ),结果见表 2。

表 1 温度与受热时间对栀子水提液中栀子苷稳定性的影响

| 受热时间<br>/h | 栀子苷质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ |       |       |       |       |        |
|------------|--|-------|-------|-------|-------|--------|
|            | 50 °C                                  | 60 °C | 70 °C | 80 °C | 90 °C | 100 °C |
| 0          | 70.86                                  | 70.86 | 70.86 | 70.86 | 70.86 | 70.86  |
| 1          | 70.77                                  | 70.76 | 70.67 | 70.52 | 70.49 | 60.08  |
| 3          | 70.67                                  | 70.57 | 70.39 | 70.19 | 70.01 | 69.33  |
| 5          | 70.53                                  | 70.31 | 70.08 | 69.79 | 69.39 | 68.27  |
| 7          | 70.39                                  | 70.11 | 69.64 | 69.18 | 68.54 | 67.16  |
| 9          | 70.26                                  | 69.89 | 69.39 | 68.72 | 67.94 | 66.03  |

表 2 栀子水提液中栀子苷和红花苷 I 降解速率常数及相关系数

| $T/^\circ\text{C}$ | 栀子苷     |         | 红花苷 I   |         |
|--------------------|---------|---------|---------|---------|
|                    | $k$     | $r$     | $k$     | $r$     |
| 50                 | 0.000 9 | 0.997 8 | 0.083 7 | 0.992 2 |
| 60                 | 0.001 5 | 0.998 5 | 0.119 7 | 0.997 9 |
| 70                 | 0.002 4 | 0.995 3 | 0.176 5 | 0.998 8 |
| 80                 | 0.003 3 | 0.992 2 | 0.239 6 | 0.999 5 |
| 90                 | 0.004 7 | 0.993 6 | 0.315 9 | 0.995 9 |
| 100                | 0.007 6 | 0.995 7 | 0.797 1 | 0.997 4 |

2.3.3 温度与受热时间对红花苷 I 稳定性的影响 取栀子水提液 6 份,分别置于 50, 60, 70, 80, 90, 100 °C 恒温水浴锅内,各样品于 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 h 取样,迅速冷却,按 2.2 项下方法测定红花苷 I 含量,结果见表 3。以红花苷 I 质量浓度的自然对数( $\ln C$ )为纵坐标, $t$ 为横坐标,计算  $k$  和  $r$ ,结果见表 2。

表 3 温度和受热时间对栀子水提取液中红花苷 I 稳定性的影响

| 受热时间<br>/h | 红花苷 I 质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ |       |       |       |       |        |
|------------|---|-------|-------|-------|-------|--------|
|            | 50 °C                                     | 60 °C | 70 °C | 80 °C | 90 °C | 100 °C |
| 0          | 17.66                                     | 17.66 | 17.66 | 17.66 | 17.66 | 17.66  |
| 1          | 15.82                                     | 15.56 | 15.19 | 14.14 | 13.72 | 8.798  |
| 2          | 14.22                                     | 13.76 | 12.37 | 10.79 | 9.831 | 3.905  |
| 3          | 13.46                                     | 12.38 | 10.65 | 8.781 | 7.306 | 1.624  |
| 4          | 12.54                                     | 10.83 | 8.833 | 6.814 | 5.336 | 0      |
| 5          | 11.49                                     | 9.891 | 7.469 | 5.355 | 4.012 | 0      |
| 6          | 10.44                                     | 8.463 | 6.109 | 4.201 | 2.577 | 0      |

2.3.4 降解规律分析 由表 1~3 可知,栀子水提液中栀子苷和红花苷 I 含量随温度升高和受热时间延长而逐渐降低; $k$  随温度升高而增加,在同一温

度下,栀子水提液中红花苷 I 降解速率大于栀子苷,说明红花苷 I 较栀子苷更不稳定;栀子水提液于 100 °C 放置 >4 h 后,红花苷 I 含量基本检测不到,表明红花苷 I 已大部分降解。根据 Arrhenius 公式可知,以  $\lg k$  对  $1/T$  作图,得阿伦尼乌斯方程  $\lg k = -E/2.303RT + \lg A$ ,其中  $k$  为反应速率常数, $E$  为活化能, $R$  为摩尔气体常数, $T$  为热力学温度, $A$  为指前因子。红花苷 I 在不同热力学温度对应的  $k$  及  $\lg k$  见表 4,得红花苷 I 的直线方程  $Y = -2150.6X + 5.5329 (R^2 = 0.9390)$ ,即  $k_{25^\circ\text{C}} = 0.0207$ ,红花苷 I 降解符合一级反应动力学方程,半衰期( $t_{0.5}$ ) =  $0.693/k$ ,降解 10% 所用时间( $t_{0.9}$ ) =  $0.1054/k$ ,即栀子水提液中红花苷 I 在 25 °C 时  $t_{0.5}, t_{0.9}$  分别为 33.47, 5.092 h。红花苷 I 在栀子水提取液中稳定性较差,由于传统提取过程通常时间较长且温度较高,会导致红花苷 I 损失较大,转移率极低,严重影响其临床应用。

表 4 栀子水提液在不同温度下红花苷 I 的反应速度常数

| $T/\text{K}$ | $1/T$                  | $k/\text{h}^{-1}$ | $\lg k$  |
|--------------|------------------------|-------------------|----------|
| 373          | $2.681 \times 10^{-3}$ | 0.797 1           | -0.098 5 |
| 363          | $2.755 \times 10^{-3}$ | 0.315 9           | -0.500 5 |
| 353          | $2.833 \times 10^{-3}$ | 0.239 6           | -0.620 5 |
| 343          | $2.915 \times 10^{-3}$ | 0.176 5           | -0.753 3 |
| 333          | $3.003 \times 10^{-3}$ | 0.119 7           | -0.921 9 |
| 323          | $3.096 \times 10^{-3}$ | 0.083 7           | -1.077 0 |

2.4 栀子减压提取工艺优选 在预试验基础上,选择提取温度、提取时间、料液比为自变量,栀子苷( $Y_1$ )和红花苷 I( $Y_2$ )含量、浸膏得率( $Y_3$ )为因变量,每个自变量的低、中、高水平分别以 -1, 0, 1 进行编码,因素水平见表 5。精密称取粉碎过 1 号筛的栀子 17 份,每份 10 g,分别置于三口圆底烧瓶中,按 Box-Behnken 设计进行试验,确定提取 3 次,滤过,合并滤液定容至 500 mL,按 2.1 和 2.2 项下方法测定栀子苷和红花苷 I 含量,计算浸膏得率,试验安排及结果见表 6。

表 5 栀子减压提取工艺 Box-Behnken 设计因素水平

| 水平 | $X_1$ 提取温度/ $^\circ\text{C}$ | $X_2$ 提取时间/min | $X_3$ 加液量/倍 |
|----|------------------------------|----------------|-------------|
| -1 | 40                           | 20             | 8           |
| 0  | 60                           | 40             | 11          |
| 1  | 80                           | 60             | 14          |

按照 Box-Behnken 试验设计的统计学要求,试验模型通过最小二乘法拟合二次多项式方程可表达

表6 栀子减压提取工艺 Box-Behnken 试验安排 %

| No. | $X_1$ | $X_2$ | $X_3$ | 栀子苷  | 西红花苷 | 浸膏得率  |
|-----|-------|-------|-------|------|------|-------|
| 1   | 40    | 40    | 8     | 2.86 | 0.81 | 25.92 |
| 2   | 80    | 40    | 14    | 3.17 | 0.71 | 28.93 |
| 3   | 60    | 60    | 14    | 3.35 | 1.12 | 30.52 |
| 4   | 60    | 40    | 11    | 3.08 | 0.91 | 27.77 |
| 5   | 80    | 40    | 8     | 3.11 | 0.68 | 28.57 |
| 6   | 60    | 40    | 11    | 3.17 | 0.87 | 28.16 |
| 7   | 40    | 60    | 11    | 3.07 | 0.96 | 27.84 |
| 8   | 60    | 20    | 8     | 2.79 | 0.72 | 24.14 |
| 9   | 80    | 20    | 11    | 2.82 | 0.51 | 25.22 |
| 10  | 60    | 60    | 8     | 3.24 | 1.03 | 30.13 |
| 11  | 60    | 40    | 11    | 3.08 | 0.84 | 27.91 |
| 12  | 60    | 40    | 11    | 3.07 | 0.92 | 28.15 |
| 13  | 40    | 20    | 11    | 2.71 | 0.59 | 23.64 |
| 14  | 80    | 60    | 11    | 3.34 | 0.79 | 31.17 |
| 15  | 60    | 20    | 14    | 2.81 | 0.76 | 24.65 |
| 16  | 40    | 40    | 14    | 2.96 | 0.72 | 26.33 |
| 17  | 60    | 40    | 11    | 3.09 | 0.89 | 27.62 |

为  $Y = A_0 + A_i \sum A_i X_i + \sum A_{ii} X_i^2 + \sum A_{ij} X_i X_j + K$ , 其中  $Y$  为效应值,  $A_0, A_i, A_{ii}, A_{ij}$  为方程系数,  $X_i, X_j (i=1, 2, 3; i \neq j)$  为自变量真实值。多项式模型方程拟合的性质由相关系数 ( $R^2$ ) 表达, 统计学显著性由  $F$  值检验。采用 Design Expert 7.0 软件分析, 得  $Y_1 = 3.10 + 0.11X_1 + 0.23X_2 + 0.036X_3 + 0.040X_1X_2 + 0.010X_1X_3 + 0.022X_2X_3 - 0.068X_1^2 - 0.045X_2^2 - 0.0053X_3^2 (R^2 = 0.9844, P < 0.01)$ ;  $Y_2 = 0.89 - 0.049X_1 + 0.17X_2 + 0.0088X_3 - 0.022X_1X_2 + 0.030X_1X_3 + 0.013X_2X_3 - 0.18X_1^2 + 0.002X_2^2 + 0.019X_3^2 (R^2 = 0.9735, P < 0.01)$ ;  $Y_3 = 27.92 + 1.27X_1 + 2.75X_2 + 0.21X_3 + 0.44X_1X_2 - 0.012X_1X_3 - 0.030X_2X_3 - 0.44X_1^2 - 0.52X_2^2 - 0.046X_3^2 (R^2 = 0.9922, P < 0.01)$ , 表明 3 个模型方程均拟合较好 ( $R^2 > 0.95$ ) 且方程显著, 同时失拟项不显著, 说明模型预测值与实测值相关性较好。根据二项式拟合方程绘制各自变量对各因变量影响规律的三维效应面图, 结果见图 2~4。

应用 Design Expert 7.0 软件对各因素水平进行优化预测, 确定提取温度 45 °C, 提取时间 60 min, 液料比 14:1, 预测值  $Y_1 = 3.19\%$ ,  $Y_2 = 1.02\%$ ,  $Y_3 = 28.69\%$ 。为验证模型的准确性, 按优选的工艺条件进行 3 次验证试验, 计算各因变量的平均值,  $Y_1 =$

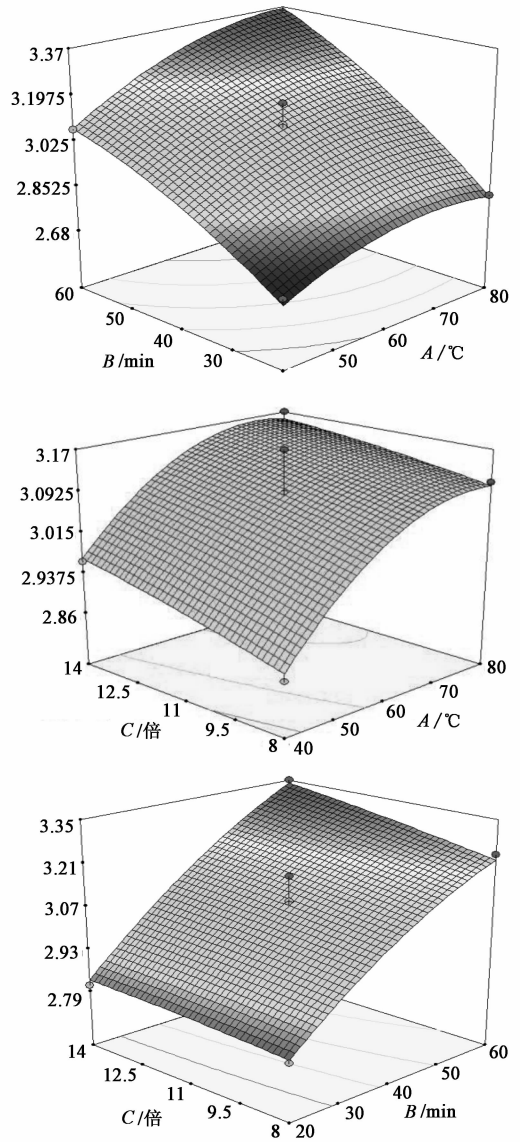


图2 各自变量对栀子苷提取率影响结果的三维效应面  
3.24%,  $Y_2 = 1.06\%$ ,  $Y_3 = 28.18\%$ , RSD 分别为 1.44%, 2.21%, 0.96%, 说明该模型较稳定可信。

### 3 讨论

栀子中主要成分包括栀子苷、西红花苷等, 性质不稳定, 容易受温度、光线及 pH 的影响<sup>[6-7]</sup>。本文稳定性考察结果表明, 栀子中西红花苷 I 热稳定性较差, 特别容易受热变化, 温度约 50 °C 就开始降解, 传统提取过程中提取温度保持在 100 °C 且时间较长, 对其破坏非常大, 导致西红花苷 I 的转移率极低。减压提取工艺在温度较低条件下, 即可实现溶剂沸腾回流, 效应成分破坏小, 同时蛋白、淀粉、黏液质等成分提取量较少, 即浸膏得率较常压提取小, 可为后续的制剂工艺带来便利。

Box-Behnken 设计中提取温度选择了 3 个水平, 因为减压装置中各温度会对应 1 个压力, 即 40 °C 对

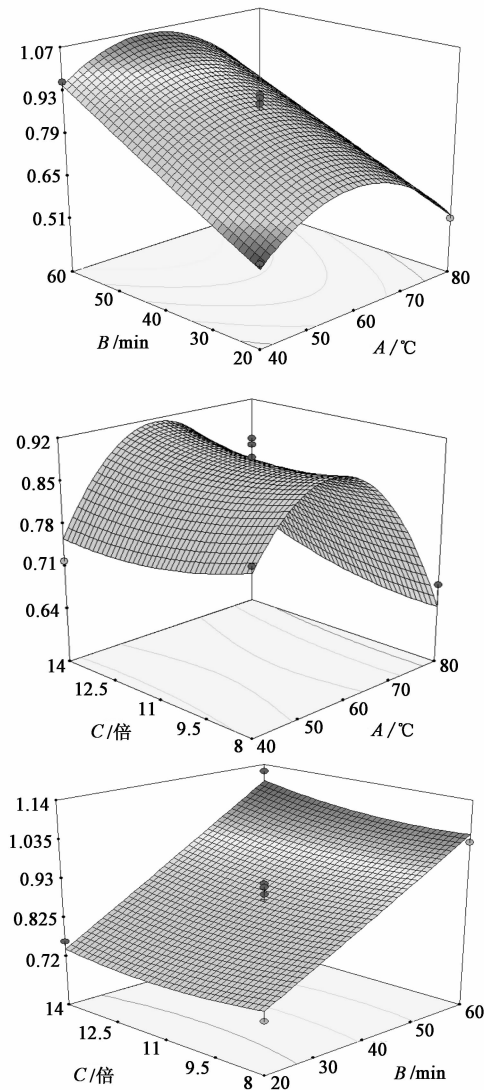


图 3 各自变量对西红花苷 I 提取率影响结果的三维效应面

应 72 mbar, 60 °C 对应 268 mbar, 80 °C 对应 464 mbar。预试验发现提取次数为显著性因素,但由于次数不是连续变量,故本试验将提取数固定为 3 次。

[参考文献]

[1] 马庆宇,孙红岩. 中药减压提取工艺探讨[J]. 黑龙江科技信息, 2009(14):165.  
[2] 陈晓东,肖莹. 中药减压提取的实验方法[J]. 机电信息, 2006(17):29.  
[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:232.

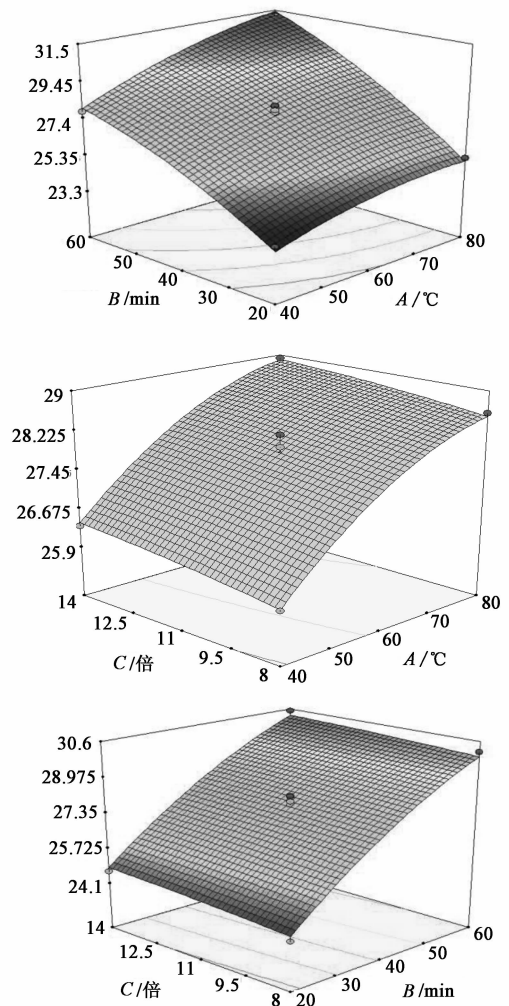


图 4 各自变量对总浸膏得率影响的三维效应面

[4] 唐灿,王子雯,孙嘉婧,等. 多指标综合评价巴中产栀子的品质[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(24):115.  
[5] 孙嘉婧,唐灿,王子雯,等. 多指标综合考察巴中产栀子提取工艺[J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(4):255.  
[6] 付小梅,王峥涛. 西红花苷-1 的稳定性研究[J]. 食品科学, 2012, 33(5):71.  
[7] 杜伟锋,梁小娟,吴晶宇,等. 栀子炮制前后绿原酸、栀子苷和西红花苷-I 的比较[J]. 中草药, 2011, 42(10):2008.

[责任编辑 全燕]