

## 响应面法优化栀子中栀子苷的超声-微波协同提取工艺

宋登鹏, 韩安艳

(十堰市太和医院·湖北医药学院附属医院药学部, 湖北十堰 442000)

**摘要:**【目的】优化栀子中栀子苷的超声-微波协同提取工艺。【方法】采用高效液相色谱(HPLC)测定栀子苷含量,以栀子苷提取率为指标,通过单因素和Box-Behnken响应面法试验优化栀子中栀子苷的超声-微波协同提取工艺。【结果】栀子苷的最佳提取工艺:提取时间为13 min,微波功率为287 W,超声功率为309 W,栀子苷的提取率为9.03%。【结论】本研究所建立的栀子苷的超声-微波协同提取工艺具有快速、提取率高、省时、低能耗的特点,可用于栀子中栀子苷提取。

**关键词:** 栀子; Box-Behnken效应面法; 超声-微波协同提取; 栀子苷

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2021)08-1708-06

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2021.08.030

## Optimization of Ultrasonic-Microwave Synergistic Extraction Technology of Geniposide from Fructus Gardeniae

SONG Deng-Peng, HAN An-Yan

(Dept. of Pharmacy, Taihe Hospital · Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine, Shiyan 442000 Hubei, China)

**Abstract:** **Objective** To optimize the ultrasonic-microwave synergistic extraction technology of geniposide from Fructus Gardeniae. **Methods** The content of geniposide was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). With geniposide extraction yield as index, the ultrasonic-microwave synergistic extraction technology of geniposide was optimized by single factor and Box-Behnken response surface methodological test. **Results** The optimum extraction conditions were as follows: the extraction time was 13 min, the microwave power was 287 W, the ultrasonic power was 309 W, and the extraction yield of geniposide from Fructus Gardeniae was 9.03%. **Conclusion** The established method in this study is of rapid, high-extraction yield, timesaving, low-energy characteristics, and it can be used to extraction of Fructus Gardeniae.

**Keywords:** Fructus Gardeniae; Box-Behnken response surface methodology; ultrasonic-microwave synergistic extraction; geniposide

中药栀子为茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实, 别名为黄栀子、山栀、白蟾、黄果子、山黄枝、黄栀、山栀子、水栀子、越桃、木丹等<sup>[1]</sup>。栀子性寒、味苦, 归心、肺、三焦经, 内服具有泻火除烦、清热利湿、凉血止血的功效, 外用具有消肿止痛的功效<sup>[2]</sup>。现代药理学研究发现, 栀子具有保肝利胆<sup>[3]</sup>、降血糖<sup>[4]</sup>、降血脂、抗氧化<sup>[5]</sup>等作用, 主要含有环烯醚萜类<sup>[6]</sup>、二萜类<sup>[7]</sup>、黄酮类<sup>[8]</sup>、挥发油类<sup>[9]</sup>、有机酸类<sup>[10]</sup>等成分。栀子为2002年国家卫生部颁布的第一批药食

两用物质<sup>[11]</sup>, 已被开发成栀子面粉<sup>[12]</sup>、栀子复合饮料<sup>[13]</sup>、栀子酒<sup>[14]</sup>、栀子油<sup>[15]</sup>等。

栀子中分离的环烯醚萜类成分大约30种, 含量最高的是栀子苷, 也是栀子发挥药用价值的主要成分<sup>[16-17]</sup>。研究发现, 栀子苷具有改善睡眠<sup>[18]</sup>、保肝利胆<sup>[19]</sup>、抗炎<sup>[20]</sup>、抗病毒<sup>[21]</sup>等药理活性, 且栀子苷也可制成天然食用着色剂栀子蓝和栀子红等。目前, 栀子中栀子苷的提取方法有加热回流提取法<sup>[22]</sup>、超声提取法<sup>[23]</sup>、减压提取法<sup>[24]</sup>、微波法<sup>[25]</sup>等。至今, 超声微波法<sup>[26-27]</sup>提取栀子中栀子苷

收稿日期: 2020-09-19

作者简介: 宋登鹏(1980-), 男, 硕士; E-mail: songdengpeng@126.com

通讯作者: 韩安艳, 女, 主管护师, Email: hananyan@yeah.net

基金项目: 十堰市太和医院基金资助项目(编号: 2016JJXM013)

的提取工艺还未见报道。本研究拟采用 Box-Behnken 效应面法优化栀子中栀子苷的超声微波法提取工艺, 并选用高效液相色谱(HPLC)法测定提取液中栀子苷的含量, 以提高栀子苷的提取率, 拓展栀子的应用, 现将研究结果报道如下。

## 1 材料

**1.1 药品与试剂** 实验用栀子果实购自湖北省十堰市太和医院药房。栀子苷对照品(上海源叶生物科技有限公司); 乙腈为色谱纯, 购自广州市昱浩贸易有限公司。

**1.2 仪器** GPD-1000C 中药材粉碎机(台州国品乐机机械有限公司); BP211D 型 1/10 万电子分析天平(德国赛多利斯公司); 日本岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪、SPD-20A 紫外检测器、SIL-20A 自动进样器、UV-2550 紫外可见分光光度计(日本岛津公司); SK2510HP 超声清洗机(深圳市歌能清洗设备有限公司); XH-300A 电脑微波超声波足额和催化合成萃取仪(北京祥鹤科技发展有限公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 栀子苷含量测定方法的建立

**2.1.1 色谱条件** Hypersil C<sub>18</sub> 色谱柱(5 μm, 250 mm × 4.6 mm), 以乙腈-水(15:85)为流动相,

流速为 1.0 mL/min, 柱温为 30 °C, 进样量为 10 μL<sup>[28]</sup>。

**2.1.2 对照品溶液的制备** 精密称取栀子苷对照品 5.2 mg, 置于 100 mL 容量瓶中, 用乙醇定容, 制成浓度为 0.052 mg/mL 的对照品储备溶液。将对照品适量稀释 100 倍, 即得对照品溶液。将对照品溶液适量用 0.22 μm 微孔滤膜过滤。

**2.1.3 供试品溶液的制备** 栀子药材粉碎, 过筛, 准确称取栀子药材 1 g, 加入 60% 的乙醇 50 mL, 称质量, 按 Box-Behnken 效应面法优化的工艺条件超声微波协同提取栀子苷, 冷却至室温; 60% 乙醇补足损失的质量, 摇匀, 过滤, 精密量取续滤液 2 mL, 置于 25 mL 量瓶中; 加乙醇至刻度, 摇匀, 0.22 μm 微孔滤膜过滤。按照“2.1.1”项下的色谱条件进样, 测定栀子提取液中栀子苷的含量。

**2.1.4 标准曲线的制备** 将对照品溶液和供试品溶液根据“2.1.1”项下色谱条件进样, HPLC 色谱图见图 1。由图 1 可知, 在此色谱条件下, 栀子苷可以获得较好的基线分离。将对照品溶液按“2.1.1”项下的色谱条件分别进样 1、2、5、10、15、20 μL 测定峰面积。以色谱峰面积为纵坐标, 进样质量(μg)为横坐标进行回归计算, 得回归方程为  $Y = 1\ 454\ 640X - 249\ 227$ ,  $R^2 = 0.999\ 6$ 。结果表明, 栀子苷对照品在 0.52~10.4 μg 范围内线性关系良好。

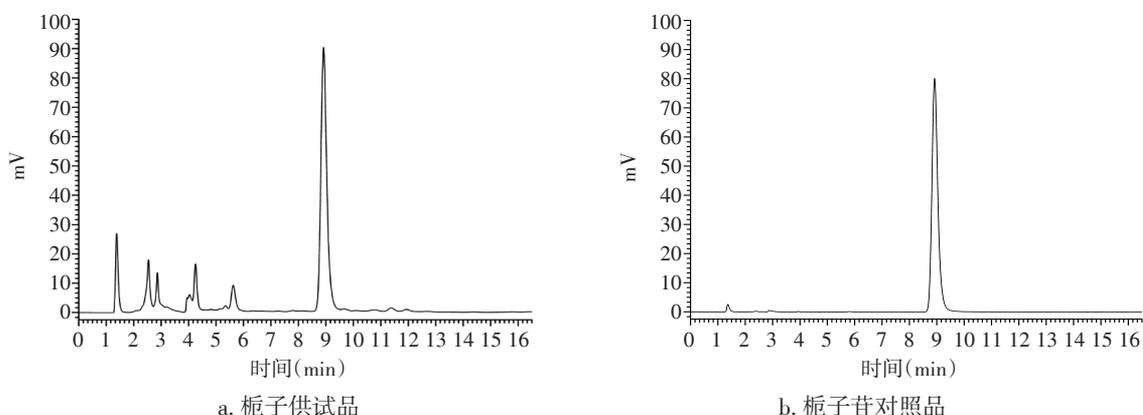


图 1 栀子供试品及对照品高效液相色谱(HPLC)图

Figure 1 HPLC profile of the test substance and reference substance

### 2.1.5 方法学考察

**2.1.5.1 精密度试验** 精密吸取按“2.1.2”项制得的栀子苷对照品溶液 10 μL, 重复进样 5 次, 结果显示, 栀子苷峰面积的相对标准偏差(RSD)为 0.43%, 说明仪器的精密度良好。

**2.1.5.2 重复性试验** 取栀子药材粉碎, 过筛,

准确称取栀子药材 1 g, 5 份, 分别编为供试品提取液 1~5 号。设定微波功率 300 W, 超声功率 300 W, 提取时间 12 min, 按“2.1.3”项下供试品制备的方法制备供试品提取液。将获得的溶液按“2.1.1”项下的色谱条件进样测定, 结果显示, 栀子苷峰面积的 RSD 为 2.71%, 表明该方法重复性良好。

2.1.5.3 稳定性试验 取按“2.1.3”项下的方法制备的1号供试品提取液,按“2.1.1”项下的色谱条件分别于0、2、4、6、12、24 h进样测定,结果显示,栀子苷峰面积的RSD为1.45%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.1.5.4 加样回收率试验 准确称取6份栀子粉末,各0.5 g,精确加入与样品成分含量相等的栀子苷对照品,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,将获得的溶液按“2.1.1”项下的色谱条件进样测定,计算栀子苷的回收率。栀子苷的回收率为98.34%,RSD=2.29%(n=6),表明该方法的回收率良好。

## 2.2 单因素试验

2.2.1 提取时间对栀子中栀子苷提取率的影响 固定微波功率300 W,超声功率300 W,提取时间分别设为3、6、9、12、15、18 min,其余按“2.1.3”项下的方法进行栀子苷的提取,并用“2.1.1”项下的色谱条件测定栀子提取液中栀子苷的含量,并计算栀子苷提取率。

从图2可以看出,栀子苷提取率随着提取时间的延长呈现先上升后平缓下降的趋势,提取时间达到12 min时,栀子苷的提取率最大。这可能是由于随着提取时间的延长,超声微波提取的各种效应也随之增强,有利于栀子苷的溶出。当提取时间达到12 min时,栀子苷溶出完全。提取时间继续延长,杂质溶出逐渐增多,影响栀子苷的溶出,导致栀子苷的提取率下降。因此,选择提取时间12 min作为后续条件优化的参数。

2.2.2 微波功率对栀子中栀子苷提取率的影响 固定超声功率300 W,提取时间12 min,微波功率分

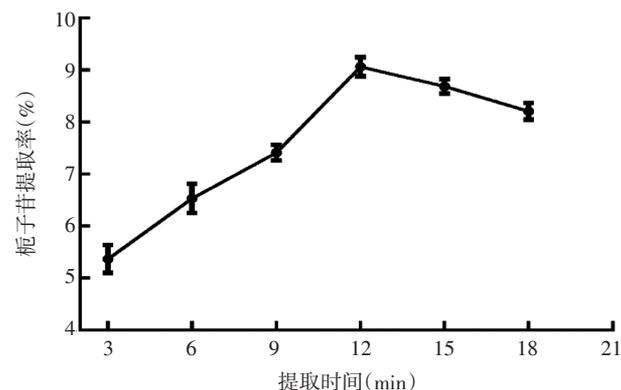


图2 提取时间对栀子苷提取率的影响

Figure 2 The effect of extraction time on the yield rate of geniposide

别设为100、200、300、400、500 W,其余按“2.1.3”项下的方法进行栀子苷的提取,并用“2.1.1”项下的色谱条件测定栀子提取液中栀子苷的含量,并计算栀子苷提取率。

从图3可知,微波功率增大,栀子苷提取率快速增大。当微波功率为300 W时,栀子苷提取率达到最大;微波功率继续增大,栀子苷提取率下降。这是由于微波功率增大,产生的热效应越大,有利于栀子苷的提取。微波功率超过300 W后继续增加,热效应的作用会导致部分栀子苷结构的破坏,从而导致栀子苷提取率下降。因此,选择微波功率300 W作为后续条件优化的参数。

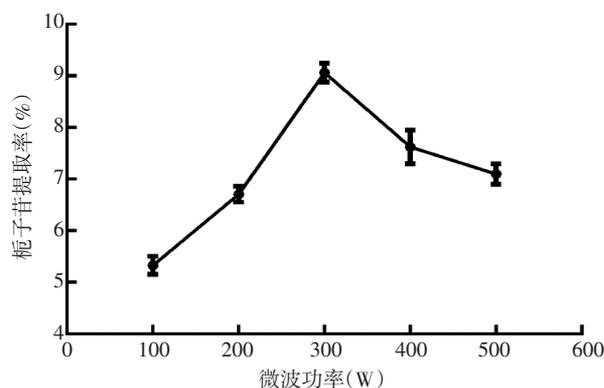


图3 微波功率对栀子苷提取率的影响

Figure 3 The effect of microwave power on the yield rate of geniposide

2.2.3 超声功率对栀子中栀子苷提取率的影响 固定微波功率300 W,提取时间12 min,超声功率分别设定为100、200、300、400、500 W,其余按“2.1.3”项下的方法进行栀子苷的提取,并用“2.1.1”项下的色谱条件测定栀子提取液中栀子苷的含量,并计算栀子苷提取率。

从图4可以看出,超声功率增加,栀子苷提取率增大,当超声功率达到300 W时,栀子苷率达到最大。这可能是由于超声功率达到300 W时,所产生的空化效应及热效应使栀子苷基本溶出完全。超声功率继续增加,空化效应及热效应也随之增加,会破坏栀子苷的结构,增加杂质的溶出。因此,选择超声功率300 W作为后续条件优化的参数。

2.3 Box-Behnken 效应面法优化试验的因素与水平 根据单因素试验的结果,以栀子苷提取率为响应值,微波功率、超声功率、提取时间为自变量,采用Design-Expert 8.0.6软件进行Box-Behnken效应面法试验设计,优化栀子中栀子苷的提取工

艺。优化试验的因素与水平见表 1, 结果见表 2。

2.3.1 模型建立与方差分析 利用软件 Design-Expert 8.0.6 软件对表 2 中的数据进行多元二次回归, 建立回归模型, 得到的二次多项回归方程为:

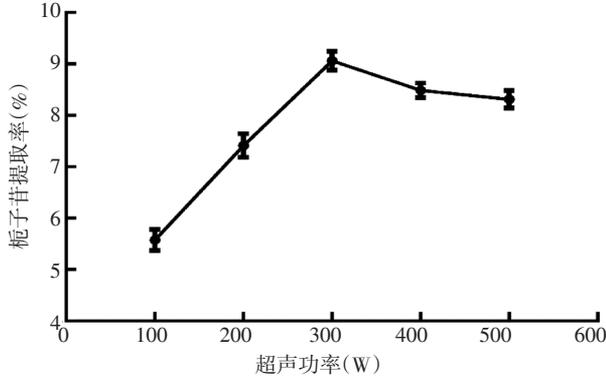


图 4 超声功率对栀子苷提取率的影响

Figure 4 The effect of ultrasonic power on the yield rate of geniposide

表 1 Box-Behnken 响应面法优化试验的因素水平表

Table 1 Levels and factors of Box-Behnken response surface methodology test

水平	因素		
	A: 提取时间 (min)	B: 微波功率 (W)	C: 超声功率 (W)
-1	9	200	200
0	12	300	300
1	15	400	400

$Y=9.058+0.2475A-0.4225B+0.2375C+0.61AB+0.64AC+0.085BC-0.514A^2-1.064B^2-2.129C^2$ 。该模型的判定系数  $R^2=0.9911$ , 调整系数  $R^2_{Adj}=0.9797$ , 说明所建立的模型稳定可靠, 可用于栀子苷提取的优化及栀子苷提取率的预测。对回归方程进行方差分析, 结果见表 3。

表 2 Box-Behnken 响应面法试验设计及结果

Table 2 Design and results of Box-Behnken response surface methodology test

编号	A: 提取时间 (min)	B: 微波功率 (W)	C: 超声功率 (W)	D: 栀子苷提取率 (%)
1	15.00	300.00	400.00	7.55
2	15.00	200.00	300.00	7.72
3	15.00	300.00	200.00	5.62
4	12.00	300.00	300.00	8.85
5	9.00	300.00	200.00	6.56
6	12.00	300.00	300.00	8.93
7	12.00	400.00	400.00	5.78
8	12.00	200.00	200.00	6.12
9	9.00	200.00	300.00	8.29
10	12.00	300.00	300.00	9.15
11	12.00	300.00	300.00	9.17
12	12.00	200.00	400.00	6.25
13	15.00	400.00	300.00	7.89
14	12.00	400.00	200.00	5.31
15	12.00	300.00	300.00	9.19
16	9.00	300.00	400.00	5.93
17	9.00	400.00	300.00	6.02

表 3 回归模型的方差分析

Table 3 Variance analysis results of regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	32.474 160	9	3.608 240	86.668 080	<0.000 1	**
A	0.490 050	1	0.490 050	11.770 750	0.010 973	*
B	1.428 050	1	1.428 050	34.301 030	0.000 626	**
C	0.451 250	1	0.451 250	10.838 790	0.013 262	*
AB	1.488 400	1	1.488 400	35.750 610	0.000 554	**
AC	1.638 400	1	1.638 400	39.353 530	0.000 415	**
BC	0.028 900	1	0.028 900	0.694 163	0.432 257	
A <sup>2</sup>	1.112 404	1	1.112 404	26.719 380	0.001 296	**
B <sup>2</sup>	4.766 720	1	4.766 720	114.494 200	<0.000 1	**
C <sup>2</sup>	19.084 800	1	19.084 800	458.407 300	<0.000 1	**
残差	0.291 430	7	0.041 633			
失拟项	0.193 350	3	0.064 450	2.628 467	0.186 796	
纯误差	0.098 080	4	0.024 520			
总差	32.765 590	16				

\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; C.V. %=2.79%

根据表3数据可知, Box-Behnken 效应面法试验所建立的回归模型  $F = 86.668\ 08$ ,  $P < 0.000\ 1$ , 说明所建立模型非常显著, 具有统计学意义; 失拟项  $P = 0.186\ 796 > 0.05$ , 无失拟项存在, 说明本试验所选择的因素合理。由  $P$  值大小可知, 各因素对栀子苷提取率的影响顺序为: 微波功率 > 提取时间 > 超声功率。其中,  $B$ 、 $AB$ 、 $AC$ 、 $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$  对栀子苷提取率影响较大, 达到非常显著水平 ( $P < 0.01$ ),  $A$ 、 $C$  对栀子苷提取率影响为显著水平 ( $P < 0.05$ ),  $B$ 、 $C$  影响不显著。

2.3.2 效应面分析 交互因素的响应面图和等高线图见图5。从图5可知微波功率与提取时间、超声功率与提取时间的交互作用中等高线呈椭圆形, 曲面较陡峭, 微波功率与超声功率交互作用的等高线呈圆形, 曲面坡度较缓。交互项的响应面和等高线的形状可知微波功率与提取时间、超声功率与提取时间的对栀子苷提取率的影响较大, 呈非常显著, 而微波功率与超声功率对栀子苷的影响不显著, 与回归分析的结果相吻合。

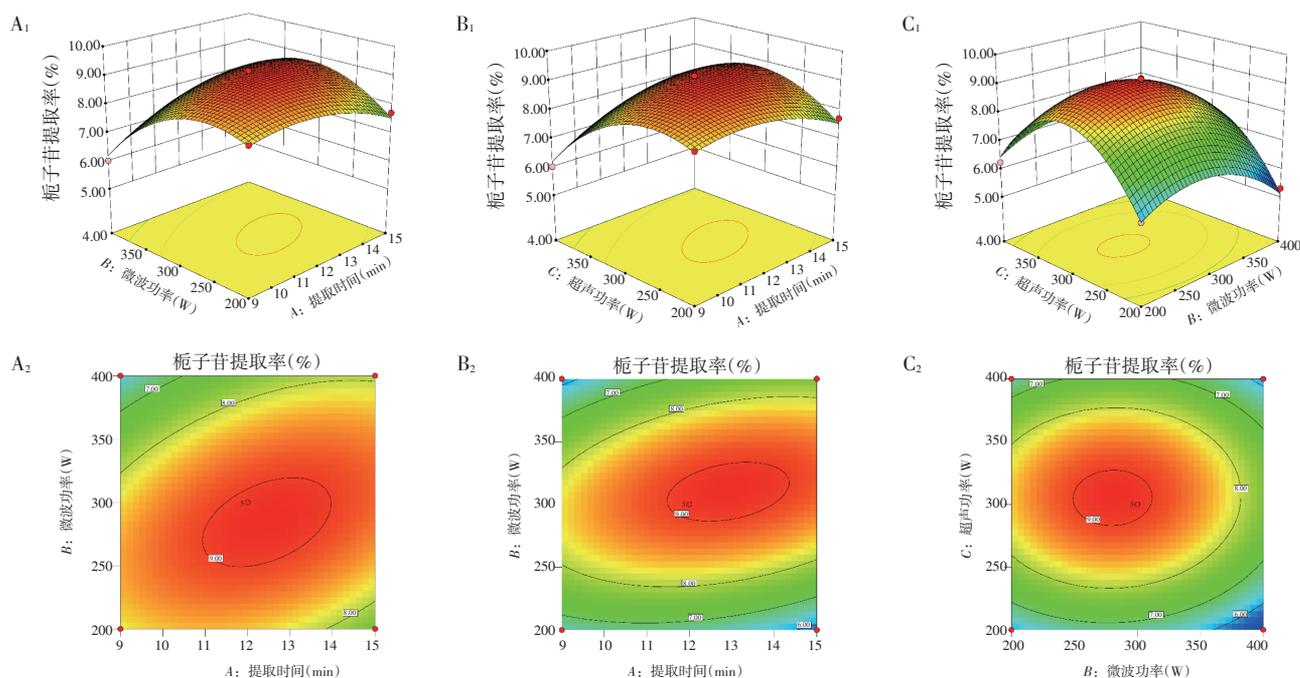


图5 不同因素的交互作用对栀子苷提取率影响的响应面图(A<sub>1</sub>、B<sub>1</sub>、C<sub>1</sub>)及等高线图(A<sub>2</sub>、B<sub>2</sub>、C<sub>2</sub>)

Figure 5 The response surface diagrams(A<sub>1</sub>、B<sub>1</sub>、C<sub>1</sub>) and contour line plots(A<sub>2</sub>、B<sub>2</sub>、C<sub>2</sub>) for the effects of interaction of different factors on the yield rate of geniposide

2.3.3 工艺验证及不同提取方法比较 Box-Behnken 效应面法所拟合的响应面及等高线形状和已建立的回归模型, 得到栀子苷提取的最佳工艺参数为: 提取时间 12.655 min, 微波功率 286.713 W, 超声功率 308.662 W, 此条件下栀子苷的预测提取率为 9.123%。为便于操作, 将最佳提取工艺参数修正为: 提取时间 13 min, 微波功率 287 W, 超声功率 309 W, 栀子苷的提取率为 9.03%, 与预测值相符, 表明所建立的模型预测性良好。

按照最佳工艺参数分别进行微波提取和超声-微波协同提取, 同时根据参考文献报道的超声提取方法<sup>[29]</sup>进行试验, 结果见表4。从表4可知, 在提取时间相同的条件下, 同其他提取方法相比,

超声-微波协同提取法获得的栀子中栀子苷提取率最高, 可用于栀子中栀子苷的提取。

### 3 讨论

前期通过预实验确定了提取溶剂为 60% 乙醇, 液料比为 50:1 (mL/g)。超声微波提取法得到的栀子苷提取率优于文献报道<sup>[30]</sup>, 且耗时较少。这可能是由于微波能节约时间, 超声波能快速穿透细胞, 超声微波相结合的提取方法充分利用了微波的高效能和超声的空化效应, 能够强化传质、导致细胞分裂、提高渗透性, 有利于成分的溶出。

本研究以栀子中栀子苷提取率为响应值, 选用 Box-Behnken 效应面法对栀子苷提取中微波功

表4 不同提取方法所得栀子中栀子苷提取率的比较

Table 4 Comparison of the yield rate of geniposide obtained by different extraction methods

提取方法	提取工艺	栀子苷得率(%)
超声-微波协同提取	提取时间 13 min, 微波功率 287 W, 超声功率 309 W	9.03
微波提取法	提取时间 13 min, 微波功率 287 W	7.83
超声提取法	提取时间 13 min, 超声功率 309 W	8.45

率、超声功率、提取时间的影响因素进行了优化,得到栀子苷的最佳提取工艺为:提取时间 13 min,微波功率 287 W,超声功率 309 W,栀子苷的提取率为 9.03%。该方法提取率高于单独微波提取和超声提取,可以提高栀子苷的提取率,有利于栀子苷的开发利用。

#### 参考文献:

- [1] 徐常珂,张成博,杨金萍,等.中药栀子本草考证[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(16):183-191.
- [2] 杜少严,王意浓,康皓博,等.栀子的药用与保健价值及其应用研究进展[J/OL].中国食物与营养:1-3 [2020-08-07].
- [3] 王荣慧,吴虹,王梦蝶,等.栀子苷保肝利胆和肝毒性双重作用的研究进展[J].安徽中医药大学学报,2020,39(3):88-91.
- [4] 黎砚书,徐丽瑛,周艳艳,等.栀子黄色素类单体对糖尿病小鼠降血糖作用[J].实验动物与比较医学,2018,38(5):387-389.
- [5] 陈萍,李朋,张浩.栀子黄色素与栀子苷降血脂和体内抗氧化作用的比较[J].华西药学杂志,2016,31(3):254-256.
- [6] 蔡财军,张忠立,左月明,等.栀子环烯醚萜类化学成分研究[J].时珍国医国药,2013,24(2):342-343.
- [7] 张村,肖永庆,李丽,等.HPLC测定栀子果实不同部位二萜色素类成分含量[J].中国中药杂志,2009,34(11):1395-1397.
- [8] 刘美琴.超声波协同复合酶法提取栀子中黄酮的研究[J].粮食与油脂,2019,32(7):92-94.
- [9] 刘慧,姚蓝,陈建红,等.栀子不同炮制品中挥发油类成分的GC-MS分析[J].中国中药杂志,2015,40(9):1732-1737.
- [10] 闫光军,范建伟,苏瑞强,等.不同采收期栀子有机酸类成分HPLC指纹图谱[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(11):39-41.
- [11] 邓栩雯.浅谈几种药食两用南药及其产业发展潜力[J].南方农业,2018,12(21):121-122.
- [12] 吴欣怡,沈松杰,摇心宇.药食两用栀子果膳食纤维的制备及其在面制品中的应用[J].现代食品,2018(23):164-169.
- [13] 蔡小双,段李歌,李书艺,等.栀子功能性饮料制备工艺研究[J].中国食物与营养,2015,21(5):50-54.
- [14] 何爱姣.栀子酒外敷治疗产后会阴水肿[J].护理学杂志,2010,25(24):40-41.
- [15] 林福珍,刘琦,谢婷婷.栀子果油制取及精炼工艺研究[J].福建轻纺,2020(2):35-37.
- [16] 史永平,孔浩天,李昊楠,等.栀子的化学成分、药理作用研究进展及质量标志物预测分析[J].中草药,2019,50(2):281-289.
- [17] 何旭辉,闻俊,周婷婷.栀子中环烯醚萜苷类成分的分析方法及药动学研究进展[J].药学服务与研究,2019,19(2):86-92.
- [18] 曹静,汪萌芽.栀子苷对睡眠剥夺大鼠学习记忆的影响[J].安徽医学,2020,41(5):497-500.
- [19] 王荣慧,吴虹,王梦蝶,等.栀子苷保肝利胆和肝毒性双重作用的研究进展[J].安徽中医药大学学报,2020,39(3):88-91.
- [20] 步楠,范彦秋.栀子苷对溃疡性结肠炎模型大鼠的治疗作用及其机制[J].上海医学,2019,42(11):662-668.
- [21] 王永锋,徐庆华,段美玲.基于TLR3/TRIF通路探讨栀子苷抗流感病毒引起的病毒性肺炎的实验研究[J].病毒学报,2020,36(1):35-43.
- [22] 林志坚.栀子苷提取工艺的优化[J].轻工科技,2014,30(5):32,61.
- [23] 欧阳薇,乐龙,王志祥,等.超声波优化栀子苷提取的工艺研究[J].中国药物警戒,2011,8(3):154-157.
- [24] 王唯一,文连奎,董昕.栀子苷减压提取工艺优化[J].农产品加工,2019(21):36-38,41.
- [25] 游剑,邓青云,高丽,等.不同工艺对栀子苷提取效果的比较研究[J].江苏农业科学,2012,40(1):220-222.
- [26] RAN J, LIANG X, DU H, et al. Optimization of DHEA extraction from sweet potato pomace by ultrasonic-microwave synergistic employing response surface methodology[J]. J AOAC Int, 2019, 102(2): 680-682.
- [27] YIN X, YOU Q, JIANG Z, et al. Optimization for ultrasonic-microwave synergistic extraction of polysaccharides from *Cornus officinalis* and characterization of polysaccharides [J]. Int J Biol Macromol, 2016, 83: 226-232.
- [28] 邱婧然,邓雪华,熊辉,等.不同产地栀子中栀子苷含量的比较[J].中国现代中药,2016,18(3):316-317,320.
- [29] 沈玥,丁元贺.超声辅助溶剂法提取珠子参总皂苷工艺的研究[J].食品工业科技,2009,30(8):231-233.
- [30] 王金丹.栀子中栀子苷提取工艺研究进展[J].农业科技与装备,2018(1):62-63.

【责任编辑:侯丽颖】