

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 191.
- [2] 杨秀梅, 王 瑾, 黄勤挽, 等. “一测多评”法测定陈皮中3种黄酮类成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(11): 45-49.
- [3] 罗晓捷, 杨宜婷, 黄寿根, 等. 超声提取法与索氏提取法提取陈皮黄酮类有效成分的分析比较[J]. 中药材, 2016, 39(2): 371-374.
- [4] 李庆耀, 梁生林. 陈皮的药理作用研究进展[J]. 中成药, 2008, 30(2): 246-248.
- [5] 汪建红, 匡 晨. 脐橙皮中黄酮的超声波辅助双水相提取工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(23): 50-55.
- [6] 高云涛, 戴建辉, 贝玉祥, 等. 双水相与超声耦合从灯盏花中提取分离类黄酮研究[J]. 中成药, 2009, 31(5): 700-703.
- [7] 沈美荣, 李云龙, 俞月丽, 等. 超声波辅助双水相体系提取苦荞籽黄酮[J]. 食品工业科技, 2016, 37(15): 243-248.
- [8] 赵凤平, 贾成友, 张传辉, 等. 乙醇-硫酸铵双水相提取三七总皂苷的工艺优化[J]. 中成药, 2016, 38(9): 2059-2062.
- [9] 宋力飞, 刘常青, 李曼莎, 等. 星点设计-响应面法优化黄芪双水相萃取工艺[J]. 中成药, 2017, 39(1): 70-75.
- [10] Desai R K, Streefland M, Wijffels R H, et al. Extraction and stability of selected proteins in ionic liquid based aqueous two phase system[J]. *Green Chem*, 2014, 16(5): 2670-2679.
- [11] Yan J K, Ma H L, Pei J J, et al. Facile and effective separation of polysaccharides and proteins from *Cordyceps sinensis* mycelia by ionic liquid aqueous two-phase system[J]. *Sep Purif Technol*, 2014, 135: 278-284.
- [12] 解红霞, 赵 科, 张 娜, 等. 响应面法优化芹叶铁线莲总皂苷超声提取工艺[J]. 中药材, 2014, 37(7): 1269-1271.
- [13] 郭 涛, 孙 莉, 黄 艳, 等. 超声波辅助双水相体系提取竹叶椒总生物碱的工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(13): 8-11.
- [14] 邱蓉丽, 吴玉兰, 乐 巍. 陈皮、青皮中4种黄酮成分的比较研究[J]. 中成药, 2015, 37(1): 149-153.
- [15] 韦 正, 杨 丽, 李 旻, 等. Box-Behnken 效应面法优化陈皮中橙皮苷及川陈皮素提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(10): 17-20.
- [16] 郑国栋, 蒋 林, 杨得坡, 等. HPLC 法同时测定不同产地广陈皮中5种活性黄酮成分[J]. 中草药, 2010, 41(4): 652-655.
- [17] 刘邦夫. 陈皮总黄酮提取工艺的研究[J]. 广东化工, 2017, 44(14): 117-118.
- [18] 封宇飞, 张宏武, 邹忠梅, 等. HPLC 法同时测定陈皮饮片中5种黄酮类化合物的含量[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(1): 10-15.

## 栀子豉汤回流提取工艺的优化

曲衍衍<sup>1</sup>, 陈晓辉<sup>2</sup>, 张忠东<sup>1\*</sup>

(1. 无锡市精神卫生中心, 南京医科大学附属无锡同仁国际康复医院, 江苏 无锡 214151; 2. 沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110016)

**摘要:** 目的 优化栀子豉汤回流提取工艺。**方法** 以料液比、提取时间、提取次数为影响因素, 京尼平-1-β-龙胆苷、栀子苷、大豆苷、染料木苷含量为评价指标, 响应面法优化提取工艺。**结果** 最佳条件为料液比1:10, 提取时间2 h, 提取次数2次, 京尼平-1-β-龙胆苷、栀子苷、大豆苷、染料木苷含量分别为0.749、3.246、0.055、0.047 mg/g。**结论** 该方法稳定可靠, 可用于回流提取栀子豉汤。

**关键词:** 栀子豉汤; 回流提取; 响应面法

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2018)07-1514-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.07.014

## Reflux extraction optimization for Zhizichi Decoction

QU Kan-kan<sup>1</sup>, CHEN Xiao-hui<sup>2</sup>, ZHANG Zhong-dong<sup>1\*</sup>

收稿日期: 2017-09-11

作者简介: 曲衍衍(1987—), 硕士, 研究方向为临床药学。Tel: (0510) 83219276, E-mail: qkklucky@163.com

\* 通信作者: 张忠东(1968—), 主任药师, 研究方向为临床药学。Tel: (0510) 83219276, E-mail: qukanan87@126.com

(1. Wuxi Tongren International Rehabilitation Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Wuxi Mental Health Center, Wuxi 214151, China;  
2. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

**KEY WORDS:** Zhizichi Decoction; reflux extraction; response surface method

栀子豉汤由栀子和淡豆豉组成,共奏辛开苦降、清宣郁热之功<sup>[1-5]</sup>。其中,栀子为茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实<sup>[6]</sup>,主要化学成分是环烯醚萜类<sup>[7-15]</sup>,包括栀子苷、京尼平-1-β-龙胆二糖苷等,研究表明栀子苷可通过抑制脑出血后血肿周围神经元活化 Caspase-3 表达的上调而阻止神经元凋亡,还可抑制脑缺血损伤后致炎因子 TNF-α、IL-1β、血浆 vWF 的表达,显示出对继发性脑损伤的保护作用,在炎症病理环节中可阻抑脑缺血损伤级联反应<sup>[16]</sup>。淡豆豉为豆科植物大豆 *Glycin max* (L.) Merr 的成熟种子发酵加工品,主要化学成分是异黄酮类,包括大豆苷、染料木苷,能增强低密度脂蛋白 (LDL) 受体活性,抑制毛细血管内皮细胞增殖、血管渗透性因子诱导的冠状动脉舒张、主动脉平滑肌细胞,从而起到降血脂作用。目前,尚无对栀子豉汤中环烯醚萜苷、异黄酮类成分复合提取工艺的研究报道。

响应面法是将统计学、数学优势相结合,用于在众多因素中寻找最优值的一种分析方法,与正交试验相比,该方法借助计算机应用软件绘制三维响应曲面图和等高线图,对结果的表示更直观明了,并充分考虑各因素之间的交互作用,能以最经济的方式、最少的试验次数、最短的时间对影响因素进行全面考察<sup>[17-18]</sup>。因此,本实验通过该方法优化栀子豉汤回流提取工艺,以期为其进一步开发利用提供实验数据。

## 1 仪器与试剂

1.1 仪器 LC-10T 高效液相色谱仪,配置 SPD-10A 紫外检测器、LC-10AD 高效液相输液泵、CLASS-VP 工作站(日本岛津公司); AB135-S 电子天平(万分之一、十万分之一,瑞士 Mettler-Toledo 公司); RE52-05 旋转蒸发器、SHZ-III 循环水真空泵(上海亚荣生化仪器厂); KQ5200B 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); TGL-40B 离心机(上海安亭科学仪器厂); DZTW 调温电热套(北京市永光明医疗仪器厂)。

1.2 试剂 栀子、淡豆豉均购自沈阳同仁堂药品经营有限责任公司,经沈阳药科大学药用植物教研室路金才教授鉴定为正品。栀子苷、京尼平-1-β-龙胆苷、染料木苷、大豆苷对照品均为沈阳药科大

学药学院自制,含有量均在 98% 以上。甲醇为色谱纯(山东禹王实业有限公司);水为超纯水(杭州娃哈哈集团有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 成分含量测定

2.1.1 色谱条件 Kromasil C<sub>18</sub> 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相甲醇(A)-水(B),梯度洗脱(0~5 min, 27%~30% A; 5~10 min, 30%~32% A; 10~20 min, 32%~60% A; 20~23 min, 60%~27% A); 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 238、260 nm; 柱温 30 ℃; 进样量 20 μL。理论塔板数按栀子苷计算,在 5 000 以上。

2.1.2 对照品溶液制备 精密称取各对照品适量,置于 50 mL 量瓶中,甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得(含 3.11 mg/mL 京尼平-1-β-龙胆苷、44.50 mg/mL 栀子苷、800.0 μg/mL 大豆苷、800.0 μg/mL 染料木苷)。

2.1.3 供试品溶液制备 按处方比例称取栀子 36 g、淡豆豉 18 g,加入不同比例水(1:5、1:10、1:15)浸泡 30 min,回流提取一定时间(1、2、3 h)及次数(1、2、3 次),过滤,定容,平行 3 份,即得。

2.1.4 线性关系考察 精密量取各对照品贮备液适量,甲醇稀释成系列质量浓度,在“2.1.1”项色谱条件下进样测定,以质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)进行回归,得回归方程分别为京尼平-1-β-龙胆苷  $Y = 3\,533.9X + 24\,742$  ( $R^2 = 0.999\,8$ ),线性范围 15.63~1 000 μg/mL; 栀子苷  $Y = 4\,879.8X + 42\,052$  ( $R^2 = 1$ ),线性范围 69.53~4 450 μg/mL; 大豆苷  $Y = 12\,429X + 7\,292.5$  ( $R^2 = 0.999\,9$ ),线性范围 1.563~100.0 μg/mL; 染料木苷  $Y = 22\,471X + 3\,695.3$  ( $R^2 = 0.999\,9$ ),线性范围 1.563~100.0 μg/mL。

2.1.5 精密度试验 取同一对照品溶液,在“2.1.1”项色谱条件下进样测定 5 次,测得京尼平-1-β-龙胆苷、栀子苷、大豆苷、染料木苷峰面积 RSD 分别为 0.97%、0.11%、1.34%、1.31%,表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取同一对照品溶液,在 10 h 内每间隔 2 h 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定

1次,测得京尼平-1-β-龙胆苷、栀子苷、大豆苷、染料木苷峰面积RSD分别为1.39%、0.12%、0.13%、1.15%,表明溶液在10h内稳定性良好。

2.1.7 重复性试验 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,在“2.1.1”项色谱条件下进样测定5次,测得京尼平-1-β-龙胆苷、栀子苷、大豆苷、染料木苷含有量RSD分别为0.73%、0.22%、1.29%、1.12%,表明该方法重复性良好。

### 2.2 工艺优化

2.2.1 提取率计算 栀子、淡豆豉粉碎后过滤,按照上述方法测定滤液中京尼平-1-β-龙胆苷、栀子苷、大豆苷、染料木苷含有量,计算提取率,公式为提取率 = 成分含有量/栀子与淡豆豉干重 × 100%。

2.2.2 试验方案 在单因素试验基础上,选择料液比(A)、提取时间(B)、提取次数(C)作为影响因素,京尼平-1-β-龙胆苷(X<sub>1</sub>)、栀子苷(X<sub>2</sub>)、大豆苷(X<sub>3</sub>)、染料木苷(X<sub>4</sub>)含有量作为评价指标,通过响应面法进行优化。因素水平见表1。

表1 因素水平

Tab. 1 Factors and levels

| 因素       | 水平  |      |      |
|----------|-----|------|------|
|          | -1  | 0    | 1    |
| A 料液比    | 1:5 | 1:10 | 1:15 |
| B 提取时间/h | 1   | 2    | 3    |
| C 提取次数/次 | 1   | 2    | 3    |

## 3 结果

3.1 试验设计 见表2。

表2 试验设计及结果

Tab. 2 Design and results of tests

| 试验号 | A 料液比 | B 提取时间/h | C 提取次数/次 | 含有量/(mg·g <sup>-1</sup> )  |                    |                    |                     |
|-----|-------|----------|----------|----------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
|     |       |          |          | Y <sub>1</sub> 京尼平-1-β-龙胆苷 | Y <sub>2</sub> 栀子苷 | Y <sub>3</sub> 大豆苷 | Y <sub>4</sub> 染料木苷 |
| 1   | 1:5   | 3        | 2        | 0.512                      | 2.809              | 0.042              | 0.039               |
| 2   | 1:10  | 1        | 1        | 0.358                      | 3.026              | 0.017              | 0.009               |
| 3   | 1:10  | 3        | 3        | 0.509                      | 3.138              | 0.04               | 0.017               |
| 4   | 1:10  | 2        | 2        | 0.748                      | 3.245              | 0.053              | 0.046               |
| 5   | 1:10  | 2        | 2        | 0.749                      | 3.246              | 0.052              | 0.047               |
| 6   | 1:10  | 2        | 2        | 0.746                      | 3.243              | 0.055              | 0.043               |
| 7   | 1:10  | 1        | 3        | 0.651                      | 3.126              | 0.045              | 0.024               |
| 8   | 1:15  | 3        | 2        | 0.708                      | 3.005              | 0.04               | 0.03                |
| 9   | 1:15  | 2        | 1        | 0.45                       | 3.023              | 0.032              | 0.039               |
| 10  | 1:15  | 2        | 3        | 0.48                       | 2.894              | 0.03               | 0.018               |
| 11  | 1:5   | 2        | 3        | 0.642                      | 3.245              | 0.033              | 0.018               |
| 12  | 1:10  | 3        | 1        | 0.778                      | 2.962              | 0.038              | 0.015               |
| 13  | 1:5   | 2        | 1        | 0.520                      | 2.541              | 0.025              | 0.024               |
| 14  | 1:10  | 2        | 2        | 0.748                      | 3.245              | 0.053              | 0.046               |
| 15  | 1:15  | 1        | 2        | 0.617                      | 2.845              | 0.036              | 0.041               |
| 16  | 1:5   | 1        | 2        | 0.707                      | 2.857              | 0.043              | 0.050               |
| 17  | 1:10  | 2        | 2        | 0.743                      | 3.245              | 0.053              | 0.046               |

3.2 回归方程建立 通过 Design-Expert. V8.0.6 软件对表2 数据进行回归拟合,得到如下多元二次回归方程模型。

$$Y_1 = 0.75 - 0.016A + 0.022B + 0.022C + 0.071AB - 0.023AC - 0.14BC - 0.082A^2 - 0.030B^2 - 0.14C^2, R^2 = 0.8737$$

$$Y_2 = 3.24 + 0.039A + 7.500 \times 10^{-3}B + 0.11C + 0.052AB - 0.21AC + 0.019BC - 0.25A^2 - 0.11B^2 - 0.068C^2, R^2 = 0.9778$$

$$Y_3 = 0.053 - 6.250 \times 10^{-4}A + 2.375 \times 10^{-3}B + 4.500 \times 10^{-3}C + 1.250 \times 10^{-3}AB - 2.500 \times 10^{-3}AC -$$

$$6.500 \times 10^{-3}BC - 8.875 \times 10^{-3}A^2 - 3.875 \times 10^{-3}B^2 - 0.014C^2, R^2 = 0.9388$$

$$Y_4 = 0.046 - 3.750 \times 10^{-4}A - 6.250 \times 10^{-4}B - 1.250 \times 10^{-3}C - 3.750 \times 10^{-3}AC - 3.250 \times 10^{-3}BC - 1.000 \times 10^{-3}A^2 - 9.500 \times 10^{-3}B^2 - 0.020C^2, R^2 = 0.8607$$

由此可知,各模型拟合度均良好,可用于分析和预测。

3.3 响应面分析 见图1。

3.4 最优工艺确定 通过 Design-Expert. V8.0.6 软件,得到各成分最优工艺分别为京尼平-1-β-龙

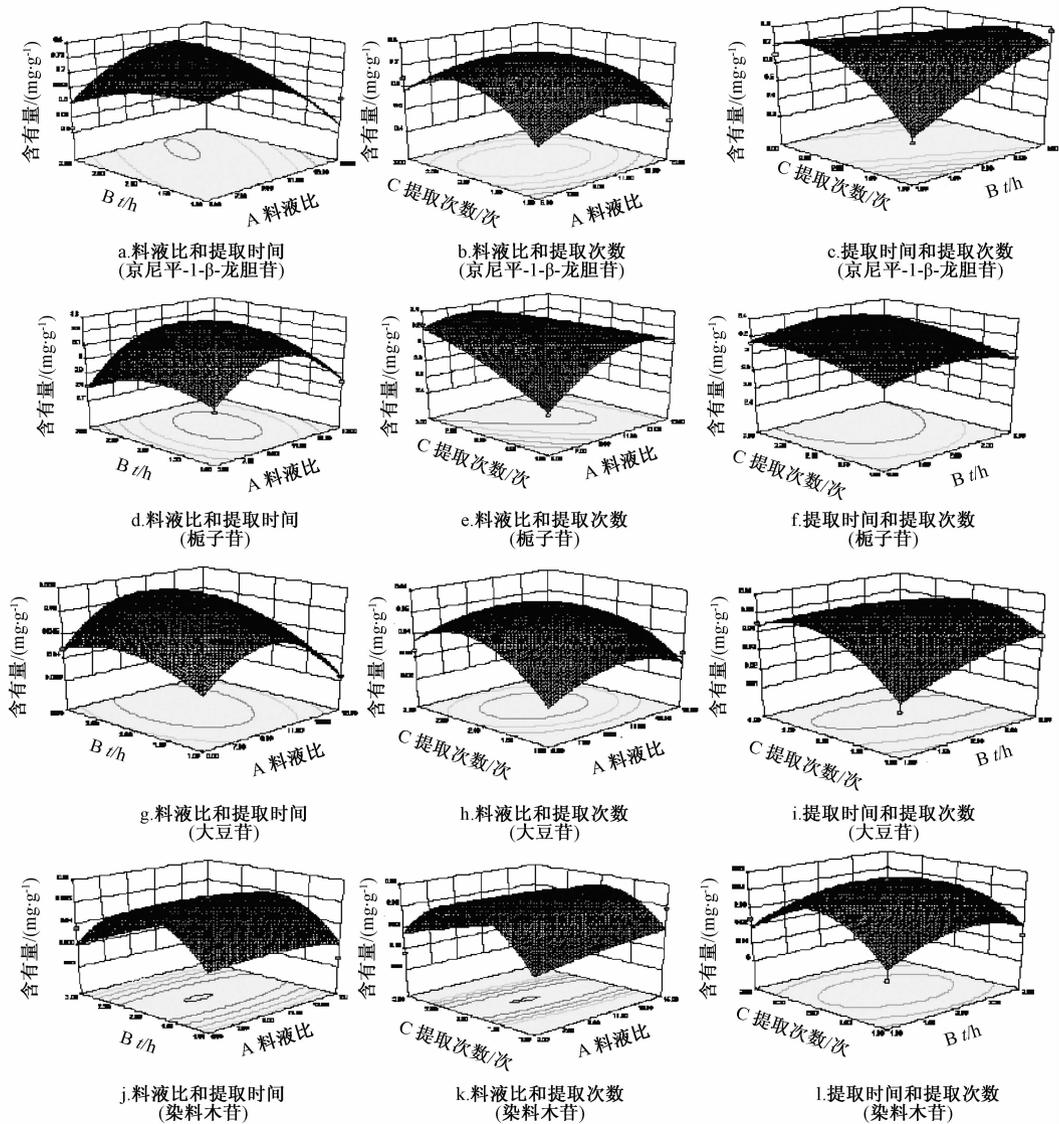


图1 各因素响应面图

Fig. 1 Response surface plots for various factors

胆苷, 料液比 1 : 12.03, 提取时间 3 h, 提取次数 1.55 次; 栀子苷, 料液比 1 : 8.34, 提取时间 2.04 h, 提取次数 3.00 次; 大豆苷, 料液比 1 : 9.82, 提取时间 2.20 h, 提取次数 2.12 次; 染料木苷, 料液比 1 : 9.18, 提取时间 1.97 h, 提取次数 1.99 次。综合考虑, 最终确定为料液比 1 : 10, 提取时间 2 h, 提取次数 2 次, 4 种成分含有量分别为 0.749、3.246、0.055、0.047 mg/g。

#### 4 讨论

环烯醚萜苷、异黄酮是栀子豉汤的重要活性成分, 故本实验选择京尼平-1-β-龙胆苷、栀子苷、大豆苷、染料木苷作为指标成分, 可较全面地反映其品质。由于四者提取条件具有一致性, 故可同时以其提取率为影响因素进行优化。

有文献报道以正交试验优化栀子豉汤提取工艺<sup>[19]</sup>, 但该方法不能在一定试验范围内根据数据样本来确定变量间的相关关系及其相应的回归方程, 故无法找到整个区域上各因素的最佳组合和响应值的最优值。本实验采用响应面法进行优化, 模型稳定可靠, 预测性良好, 具有一定推广价值, 可为该制剂的临床合理应用提供依据。

#### 参考文献:

- [1] 姜元安. 《伤寒论》栀子豉汤证治剖析[J]. 北京中医药大学学报, 1999, 22(1): 15-17.
- [2] 范越, 田明, 王秀海, 等. 栀子豉汤临床和实验研究进展[J]. 中医学报, 2010, 38(1): 118-119.
- [3] 张宇, 艾芳. 栀子豉汤在精神科疾病中的应用[J]. 长春中医药大学学报, 2010, 26(2): 207-208.

- [ 4 ] Bergonzi M C, Righeschi C, Isacchi B, *et al.* Identification and quantification of constituents of *Gardenia jasminoides* Ellis (Zhi-zi) by HPLC-DAD-ESI-MS[J]. *Food Chem*, 2012, 134(2): 1199-1204.
- [ 5 ] 黄 芸, 崔力剑, 窦玉红, 等. 中药淡豆豉异黄酮类化合物的超声循环提取[J]. *精细化工*, 2008, 25(3): 231-233, 242.
- [ 6 ] 王钢力, 赵淑杰, 陈德昌, 等. 大黄栀子果实化学成分的研究[J]. *中国中药杂志*, 1999, 24(1): 38-40.
- [ 7 ] Machida K, Takehara E, Kobayashi H, *et al.* Studies on the constituents of *Gardenia* species. III. New iridoid glycosides from the leaves of *Gardenia jasminoides* cv. *fortuneana* Hara [J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2003, 51(12): 1417-1419.
- [ 8 ] Chai X, Wang Y F, Su Y F, *et al.* A rapid ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the qualitative and quantitative analysis of ten compounds in *Eucommia ulmoides* Oliv. [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 57: 52-61.
- [ 9 ] Zhou T T, Zhao W Q, Fan G R, *et al.* Isolation and purification of iridoid glycosides from *Gardenia jasminoides* Ellis by isocratic reversed-phase two-dimensional preparative high-performance liquid chromatography with column switch technology[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, 858(1-2): 296-301.
- [ 10 ] Hamerski L, Furlan M, Silva D H S, *et al.* Iridoid glucosides from *Randia spinosa* (Rubiaceae) [J]. *Phytochemistry*, 2003, 63(4): 397-400.
- [ 11 ] Zhou T T, Liu H, Wen J, *et al.* Fragmentation study of iridoid glycosides including epimers by liquid chromatography-diode array detection/electrospray ionization mass spectrometry and its application in metabolic fingerprint analysis of *Gardenia jasminoides* Ellis [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2010, 24(17): 2520-2528.
- [ 12 ] Park E H, Joo M H, Kim S H, *et al.* Antiangiogenic activity of *Gardenia jasminoides* fruit[J]. *Phytother Res*, 2003, 17(8): 961-962.
- [ 13 ] Zheng X C, Yang D, Liu X, *et al.* Identification of a new anti-LPS agent, geniposide, from *Gardenia jasminoides* Ellis, and its ability of direct binding and neutralization of lipopolysaccharide *in vitro* and *in vivo*[J]. *Int Immunopharmacol*, 2010, 10(10): 1209-1219.
- [ 14 ] Chen Q C, Zhang W Y, Youn U J, *et al.* Iridoid glycosides from *Gardeniae Fructus* for treatment of ankle sprain[J]. *Phytochemistry*, 2009, 70(6): 779-784.
- [ 15 ] Liaw J, Chao Y C. Effect of *in vitro* and *in vivo* aerosolized treatment with geniposide on tracheal permeability in ovalbumin-induced guinea pigs[J]. *Eur J Pharmacol*, 2001, 433(1): 115-121.
- [ 16 ] 朱晓磊, 张 娜, 李澎涛, 等. 栀子苷抑制脑缺血损伤级联反应的作用环节探讨[J]. *中国中药杂志*, 2004, 29(11): 1065-1068.
- [ 17 ] 刘伟霞, 杨建雄. 基于响应面法从连翘叶中提取连翘酯苷 A 和连翘苷的工艺优化[J]. *天然产物研究与开发*, 2012, 24(8): 1098-1104.
- [ 18 ] 侯秀娟, 沈勇根, 徐明生, 等. 响应曲面法优化微波萃取化橘红多糖[J]. *中国食品学报*, 2013, 13(3): 101-109.
- [ 19 ] 王秀海. 栀子豉汤口服液制备工艺及药效学研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2011.