

# 枳陈胃力片中黄酮类成分提取工艺优选

文萍<sup>1</sup>, 郭琦丽<sup>2</sup>, 吕武清<sup>1\*</sup>

(1. 江西省中医药研究院, 南昌 330046; 2. 江西护理职业技术学院, 南昌 330029)

**[摘要]** 目的: 优化枳陈胃力片中总黄酮提取工艺。方法: 以总黄酮含量及其药效作用为指标, 单因素试验确定提取溶剂; 以柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的含量为综合评分指标, 选取乙醇用量、乙醇体积分数、提取时间和提取次数为考察因素, 采用正交试验优化枳陈胃力片中总黄酮的醇提取工艺条件。结果: 优化的醇提取条件为加 7, 6, 6 倍量 70% 乙醇回流提取 3 次, 每次提取 2 h。结论: 该提取工艺合理, 方法简便, 可为枳陈胃力片中总黄酮乙醇提取工艺提供参考。

**[关键词]** 枳陈胃力片; 总黄酮; 正交设计; 提取工艺

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)20-0020-04

## Optimization of Extraction Technology for Total Flavonoids from Zhichen Weili Tablet

WEN Ping<sup>1</sup>, GUO Qi-li<sup>2</sup>, LV Wu-qing<sup>1\*</sup>

(1. Jiangxi Provincial Institute of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330046, China;  
2. Jiangxi Nursing Vocational and Technical College, Nanchang 330029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize alcohol extraction technology of total flavonoids from Zhichen Weili tablet. **Method:** With content and pharmacodynamic effect of total flavonoid as indexes, extraction solvent was determined by single factor test; With the content of naringin, hesperidin and neohesperidin as comprehensive scoring index, the concentration and amount of ethanol, extraction time and extraction times were chosen as factors, alcohol extraction technology of total flavonoids from Zhichen Weili tablet was optimized by orthogonal test. **Result:** Optimized alcohol extraction conditions were: reflux extracted 3 times with 7, 6, 6 times the amount of 70% ethanol, extracted 2 h per time. **Conclusion:** This extraction process was reasonable and simple, it could provide a reference for production process of total flavonoids from Zhichen Weili tablet.

**[Key words]** Zhichen Weili tablet; total flavonoids; orthogonal design; extraction process

功能性消化不良(FD)系指不能以器质性疾病解释而有持续性或反复发作性上腹部疼痛和餐后饱胀、腹部胀气、嗝气、早饱、恶心等上腹部不适症状的一组症候群<sup>[1]</sup>。中医药以辨证论治为切入点, 从整体调控入手, 治疗 FD 取得了良好的临床治疗效果。

枳陈胃力片源于《普济方》中的陈皮散, 由陈皮、枳壳组成, 功能为行气导滞、和胃化湿。用于湿阻气机所致食积停滞、脘腹胀满、噯腐吞酸、不欲饮食。陈皮、枳壳均为江西特色和道地药材, 资源丰富, 采用现代中药制药技术, 将其开发成高效中药新药, 既可满足临床 FD 患者用药需求, 又合理利用天然药物资源<sup>[2-3]</sup>。古方陈皮散以汤剂入药, 研制成新药后可适用的主要剂型有口服液、胶囊、颗粒剂、片剂等。处方中两味药采用乙醇提取, 而乙醇提取物不适宜制成口服液或颗粒剂。由于片剂服用顺应性强, 薄膜衣片稳定性好, 因此, 本试验拟将其制成片剂, 命名为枳陈胃力片。本文将对枳陈胃力片中黄酮类成分的提取工艺进行优选。

**[收稿日期]** 20120607(012)

**[基金项目]** 国家“十一五”支撑计划(2006BAI06A18-09); 江西省科技支撑计划项目(2010BSA18600)

**[第一作者]** 文萍, 助理研究员, 从事中药分析研究, Tel: 0791-88501906, E-mail: wenp818@yahoo.cn

**[通讯作者]** \* 吕武清, 研究员, 从事中药新药及质量控制技术研究, E-mail: jxzyys@163.com

## 1 材料

1525 型高效液相色谱仪(美国 Waters),MDRP5 型离心喷雾干燥机(江苏锡山市现代喷雾干燥机厂),Simplicity™ 型超纯水系统(Millipore 公司),101-1 型干燥箱(上海市实验仪器厂),D260-0722 型电热恒温真空干燥箱(上海医疗器械七厂)。

陈皮药材经江西中医学院诸小兰教授鉴定为芸香科植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 的干燥成熟果皮;枳壳为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 的干燥未成熟果实。柚皮苷、橙皮苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号分别为 110722-200610,110721-200508),新橙皮苷对照品(中国药科大学,批号 111857-200506),乙腈、甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯,昆明小鼠,由江西中医学院实验动物部提供,合格证号 SCXK(赣)2005-0001。

## 2 方法与结果

**2.1 黄酮类成分的含量测定** 2010 年版《中国药典》陈皮项下测定橙皮苷含量,枳壳项下测定了柚皮苷含量<sup>[4-5]</sup>。故本试验增加了对新橙皮苷的含量测定。文献报道 HPLC 测定橙皮苷大都采用乙腈-水为流动相<sup>[4-8]</sup>;本试验以乙腈-0.1% 磷酸(24:76)分离柚皮苷和新橙皮苷,对照品、供试品色谱峰均在约 20 min 内完全出峰,但柚皮苷和橙皮苷分离效果不是很好。据报道<sup>[9-10]</sup>柱温对分离有一定的影响,因此本试验设定柱温 40 ℃。

**2.1.1 对照品溶液的制备** 精密称取柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷对照品适量,加甲醇分别制成含柚皮苷 24 mg·L<sup>-1</sup>,橙皮苷 17 mg·L<sup>-1</sup>,新橙皮苷 28 mg·L<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液。

**2.1.2 供试品溶液的制备** 取相当于药材含量 0.02 g 的溶液,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,即得。

**2.1.3 色谱条件** Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相乙腈-0.1% 磷酸(24:76),检测波长 283 nm,柱温 40 ℃,进样量 10 μL,理论板数按柚皮苷峰计应不低于 3 000。

**2.2 提取溶剂的选择** 陈皮散临床以煎汤入药,《普济方》载:“陈皮二两、枳壳二两为散,每服三钱,以水一中盏,同煎至六分,去渣,温频服”。现代化学分析表明,陈皮、枳壳中主要含有黄酮、挥发油及少量生物碱,其中最主要为柚皮苷、新橙皮苷和橙皮苷等黄酮类成分,因此,分别选择水和 70% 乙醇提取,参照文献[11]测定 2 种溶剂提取柚皮苷、新橙皮苷、橙皮苷含量,并结合药效试验确定最佳提取

溶剂。

### 2.2.1 总黄酮比较

**2.2.1.1 水煎煮提取** 取陈皮与枳壳各 100 g,加 8 倍量水煎煮提取 2 次,每次 2 h,滤过,合并滤液,浓缩至约 150 mL,转移至 200 mL 量瓶中,加水至刻度,摇匀,测定。结果柚皮苷质量分数 0.92%,橙皮苷 0.36%,新橙皮苷 0.71%。

**2.2.1.2 乙醇回流提取** 取陈皮与枳壳各 100 g,加 60% 乙醇 6 倍量加热回流 2 次,每次 2 h,滤过,合并滤液,浓缩至约 150 mL,转移至 200 mL 量瓶中,加水至刻度,摇匀,测定。结果柚皮苷质量分数 1.69%,橙皮苷 0.95%,新橙皮苷 1.46%。

说明醇提液对柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的提取效果优于水提液。

### 2.2.2 药理作用比较

**2.2.2.1 对多巴胺致肠功能低下小鼠的影响** 小鼠 80 只,体重(19~22) g,随机分为 8 组[对照组、模型组、醇回流和水煎煮(25,50,100 mg·kg<sup>-1</sup>)各 3 个剂量组],每组 10 只,雌雄各半。各组小鼠禁食不禁水 16 h,次日 1 次给药,对照组灌胃蒸馏水,其他组灌胃给予相应药物。除对照组外,各小鼠灌胃 30 min 后给予 1.7 mg·kg<sup>-1</sup> 盐酸多巴胺注射液皮下注射造模,20 min 后 80 只小鼠分别灌服 2% 羧甲基纤维素钠碳末混悬液 0.02 mL·g<sup>-1</sup>,20 min 后小鼠脱颈处死,立即取出胃肠,平铺,测定碳末前端至幽门的距离和小肠全长,以两者之比计算推进率。试验结果显示,皮下注射 1.7 mg·kg<sup>-1</sup> 的多巴胺可明显抑制小鼠的肠推进,水提、醇提取物能提高由多巴胺抑制的小鼠肠推进活动,醇提取作用强于水煎煮提取,但两组间无显著性差异,见表 1。

表 1 枳陈胃力片水提、醇提取物对多巴胺致小鼠肠推进的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	推进距离 /cm	小肠全长 /cm	推进率 /%
对照	-	34.3 ± 5.36	50.7 ± 2.09	67.7 ± 11.0
模型	-	27.5 ± 6.28	50.0 ± 2.77	54.8 ± 11.2 <sup>1)</sup>
醇提	25	34.4 ± 6.47	52.2 ± 4.23	65.6 ± 9.36 <sup>2)</sup>
	50	36.7 ± 6.81	50.8 ± 4.79	72.0 ± 10.3 <sup>3)</sup>
	100	33.9 ± 6.81	51.5 ± 2.33	65.7 ± 11.8 <sup>2)</sup>
水提	25	33.7 ± 6.81	52.4 ± 2.33	64.3 ± 10.80
	50	35.2 ± 5.40	51.0 ± 2.51	69.1 ± 12.3 <sup>2)</sup>
	100	33.1 ± 8.53	52.4 ± 4.89	63.2 ± 10.36

注:与对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ (表 2 同)。

**2.2.2.2 对阿托品致肠功能低下小鼠的影响** 小鼠 80 只,同 2.2.2.1 项下方法分组给药,除对照组外各小鼠灌胃 30 min 后给予 2.5 mg·kg<sup>-1</sup>阿托品皮下注射造模,20 min 后 80 只小鼠分别灌服 2% 羧甲基纤维素钠碳末混悬液 0.02 mL·g<sup>-1</sup>,20 min 后小鼠脱颈处死,立即取出胃肠,平铺,测定碳末前端至幽门的距离和小肠全长,以两者之比计算推进率。结果显示,皮下注射 2.5 mg·kg<sup>-1</sup>的阿托品可明显抑制小鼠肠推进,水提、醇提取物均能提高阿托品抑制的小鼠肠推进活动,醇提取作用强于水煎煮提取,但两组间无显著性差异,见表 2。

**表 2 水提、醇提取物对阿托品致小鼠肠推进的影响**( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	推进距离 /cm	小肠全长 /cm	推进率 /%
对照	-	33.0 ± 4.70	51.6 ± 3.53	64.2 ± 10.2
模型	-	25.2 ± 9.13	50.5 ± 5.84	49.7 ± 15.8 <sup>1)</sup>
醇提	25	25.2 ± 5.89	49.2 ± 4.62	50.9 ± 9.06
	50	32.0 ± 6.90	50.5 ± 3.72	63.3 ± 12.7 <sup>2)</sup>
	100	28.7 ± 6.74	48.1 ± 5.83	59.6 ± 11.0
水提	25	26.0 ± 5.77	50.7 ± 4.62	51.2 ± 9.22
	50	29.2 ± 6.36	49.9 ± 4.68	58.5 ± 9.32
	100	27.9 ± 5.96	49.9 ± 4.37	55.9 ± 8.22

由以上结果可知,陈皮、枳壳水提和醇提液对小鼠胃排空均有促进作用,醇提液效果优于陈皮、枳壳水提液。结合化学试验含量测定结果,醇提液中有效成分柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的含量均明显高于水提液。故确定以乙醇为提取溶剂。

**2.3 提取工艺优化** 将乙醇体积分数、乙醇用量、提取时间、提取次数作为考察因素。分别取陈皮和枳壳各 100 g,共 9 份,按 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交表安排试验,提取液滤过,定容至一定体积,分别吸取各样号的提取液适量,加甲醇制成约 0.02 g·mL<sup>-1</sup>的溶液,测定柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的含量,采用综合评分法优选提取工艺,其中橙皮苷含量权重系数 0.4,柚皮苷、新橙皮苷的权重系数均为 0.3。综合评分 = (100/2.75 × E<sub>n</sub> × 0.3 + 100/2.40 × F<sub>n</sub> × 0.4 + 100/2.18 × G<sub>n</sub> × 0.3) × 100%。因素水平见表 3,试验安排及结果见表 4,方差分析见表 5。

结果可知,A 因素的影响最小,以 A 因素为误差项进行方差分析,因素 B、C 对柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的含量无明显影响;因素 D 对柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷的含量有显著性影响,最佳提取工艺

**表 3 枳陈胃力片提取工艺优选正交试验因素水平**

水平	A 乙醇体积 分数/%	B 乙醇用量/倍	C 提取时间/h	D 提取数/次
1	50	4	1	1
2	60	6	1.5	2
3	70	8	2	3

**表 4 枳陈胃力片提取工艺优选正交试验安排** %

No.	A	B	C	D	柚皮苷 E	橙皮苷 F	新橙皮 苷 G	综合 评分
1	1	1	1	1	0.63	0.38	0.49	19.95
2	1	2	2	2	1.55	1.05	1.20	50.92
3	1	3	3	3	2.75	2.40	2.18	100.00
4	2	1	2	3	2.17	1.45	1.86	73.44
5	2	2	3	1	0.96	0.63	0.79	31.84
6	2	3	1	2	1.53	1.24	1.21	54.01
7	3	1	3	2	1.95	1.21	1.54	62.63
8	3	2	1	3	2.04	1.53	1.74	71.70
9	3	3	2	1	1.26	0.95	1.00	43.34
K <sub>1</sub>	170.87	156.02	145.66	95.13				
K <sub>2</sub>	159.29	154.46	167.7	167.56				
K <sub>3</sub>	177.67	197.35	194.47	245.14				
R	18.38	42.89	48.81	150.01				

**表 5 综合评分方差分析**

方差来源	SS	f	S	F	P
A(误差)	57.57	2	28.79	1.00	
B	394.46	2	197.23	6.85	>0.05
C	398.31	2	199.16	6.92	>0.05
D	3 751.97	2	1 875.99	65.16	<0.05

注: F<sub>0.05</sub>(2,2) = 19.00; F<sub>0.01</sub>(2,2) = 99.00。

为 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>D<sub>3</sub>。

试验中发现,用 50% 乙醇提取时,果胶提出量大,放冷后沉淀大量果胶,而用 60% 乙醇第 1 次提取,放冷后只有少许果胶沉淀,由于陈皮、枳壳经第 1 次提取后药材溶胀与糊化,第 2,3 次再采用 60% 乙醇提取时果皮糊化,提取液放冷后有大量糊化果胶,而采用 70% 乙醇提取,提取液放冷后仅有少量果胶沉淀。因此,乙醇提取宜第 1 次用 60% 乙醇,第 2,3 次用 70% 乙醇。故提取方案初步定为 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>D<sub>3</sub>,即药材第 1 次用 60% 乙醇回流提取 2 h,第 2,3 次用 70% 乙醇回流提取 2 h。乙醇用量 4,6,8 倍均无显著影响,但直观分析表明乙醇用 8 倍量

更好,故验证试验中将对溶剂用量进行再考察。

**2.4 验证试验** 按上述初步优选的提取工艺进行3次验证试验,按处方量分别取陈皮、枳壳药材各100 g,共3份。各组提取液定容后,精密吸取提取液适量,加甲醇制成 $0.02\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 溶液,测得柚皮苷质量分数依次为2.28%、2.59%、2.66%;橙皮苷依次为1.59%、1.80%、2.22%;新橙皮苷分别为2.20%、2.40%、2.55%。说明正交试验所确定的提取工艺合理。试验结果表明,用6,8倍量溶剂的提取效果较4倍量溶剂好,且用6,8倍量溶剂的提取效果对柚皮苷、新橙皮苷无显著性差异,但对橙皮苷有明显差异。考虑到节约生产中的溶剂用量,故本试验选用6倍量提取溶剂。因此,最佳提取工艺确定为第1次用7倍量60%乙醇回流提取2 h,第2,3次用6倍量70%乙醇回流提取2 h。

### 3 讨论

枳壳中主要含有黄酮、挥发油及少量生物碱类成分,陈皮中橙皮苷是一种黄烷酮类糖苷,难溶于水。天然黄酮类化合物的提取通常工业生产使用乙醇,其中最能体现枳壳特征的成分是黄酮类成分,黄酮类成分中又以柚皮苷和新橙皮苷含量较高。通过对陈皮、枳壳醇提液和水提液中总黄酮含量比较,同时结合药理试验结果,醇提液中有效成分柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的含量均明显高于水提液,故本试验确定以乙醇为提取溶剂。利用有效成分含量和药理试验的结合来指导提取工艺,为完善现代中药制药工艺提供参考。

### [参考文献]

- [1] 中国中西医结合医学会消化系统疾病专业委员会. 功能性消化不良的中西医结合诊疗方案(草案)[J]. 中国中西医结合杂志,2005,25(6):539.
- [2] Talley N J, Weaver A L, Zinsmeister A R. Impact of functional dyspepsia on quality of life [J]. Dig Dis Sci, 1995(40):584.
- [3] 马晓橙,樊雪萍. 白术对动物胃肠运动的作用及其机制的探讨[J]. 中华消化杂志,1996,(5):261.
- [4] Haug T T, Wilhdmsen I, Ursin H, et al. What are the real problems for patients with junctional dyspepsia [J]. Scand J Gastroenterol, 1995,30(2):9.
- [5] 张石革,宋菲,沈素. 胃动力与促进胃动力药[J]. 中国药房,2001,12(9):129.
- [6] 刘思纯. 功能性胃肠病和促胃动力药[J]. 新医学,2000,31(11):64.
- [7] 全小林,崔新育. 胃动力中药的临床应用体会[J]. 中医杂志,1995,36(8):463.
- [8] 张晓光,胡品津,林金坤,等. 功能性消化不良患者胃感觉运动功能的研究[J]. 中华消化杂志,2003,23(4):227.
- [9] 吴叔明,高琴琰,潘燕,等. 根除幽门螺杆菌对功能性消化不良的影响[J]. 中华消化杂志,2001,25(11):684.
- [10] 中国药典. 一部[S]. 2005:171.
- [11] 李秀玲,李龙,肖红斌,等. 反向高效液相色谱法测定枳实枳壳中橙皮苷和柚皮苷的含量[J]. 色谱,2002,20(6):585.

[责任编辑 全燕]