

· 制剂工艺 ·

甜橙枳实黄酮类成分提取工艺研究

吕署一, 王超, 王淳, 宋志前, 刘振丽*

(中国中医科学院中医基础理论研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 探讨甜橙枳实黄酮类成分的最佳提取工艺。方法: 以甜橙枳实中主要黄酮类成分橙皮苷和柚皮芸香苷含量为指标, 研究甜橙枳实提取挥发油后药渣采用乙醇提取黄酮类成分的最佳提取工艺。结果: 甜橙枳实提取黄酮类成分的最佳工艺条件为: 10 倍量 70% 乙醇回流提取 2 次, 每次 0.5 h, 提取液静置, 上层药液浓缩后与沉降物合并。结论: 甜橙枳实含有在冷水中溶解度小的有效成分, 在制剂工艺提取后, 提取液静置出现的沉降物不应轻易作为杂质弃去。

[关键词] 甜橙枳实; 黄酮类成分; 提取工艺; 沉降物

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)02-0001-03

枳实为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种或甜橙 *Citrus sinensis* Osbeck 的干燥幼果。具有破气消积, 化痰散痞的功效^[1]。黄酮类成分占其组成的 22.45% ~ 33.76%^[2]。枳实中黄酮类成分的种类不同, 有的含有的主要黄酮类成分为新橙皮苷、柚皮苷、橙皮苷和柚皮芸香苷, 而有的则不含有前两种成分^[3]。前期经对不同品种产地的 30 个批次枳实研究结果显示, 这种差异是由于品种的不同造成的。来源于酸橙枳实中的主要黄酮类成分为橙皮苷、柚皮苷、新橙皮苷及柚皮芸香苷, 来源于甜橙枳实黄酮类成分主要为橙皮苷及柚皮芸香苷, 不含有柚皮苷及新橙皮苷^[4]。我们曾对酸橙枳实黄酮成分提取最佳工艺进行了研究^[5]。在甜橙枳实研究中发现, 采用乙醇提取后, 提取液放置过程会有大量沉降物产生。那么, 提取液放置后产生的沉降物中是否含有黄酮类成分, 甜橙枳实究竟该采用何种提取工艺才能够最大限度地提取其中的黄酮类成分, 本文对此进行了研究。

1 仪器、材料与试剂

高效液相色谱仪: HP1100, G1322A 脱气机, G1311A 四元泵, G1316A 恒温箱, G1315B DAD 检测

器, G1313A 自动进样器, HP 化学工作站, 98-1-B 型电子调温电热套(天津市泰斯特仪器有限公司)、TCQ-250 型超声波清洗器(北京医疗设备二厂)。枳实药材采自贵州, 经黔西南晴隆县鸡场镇果园农艺师鉴定为甜橙 *Citrus sinensis* Osbeck 的幼果。枳实饮片为实验室制备。橙皮苷对照品(批号: 0721-200010, 含量测定用)、柚皮苷对照品(批号: 110722-200309, 含量测定用)购自中国药品生物制品检定所。甲醇为色谱纯, 水为重蒸水, 其它试剂为分析纯。

2 含量测定方法

2.1 色谱条件 Agilent Zorbax SB-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相甲醇-2% 醋酸 (30:70); 检测波长 285 nm; 流速 1.0 mL · min⁻¹; 柱温 30 ℃。

2.2 对照品溶液制备及线性关系考察 取橙皮苷、柚皮苷对照品适量, 精密称定, 加甲醇溶解并制成每 1 mL 含橙皮苷 51.6 μg、柚皮苷 43.6 μg 的混合对照品溶液。精密吸取混合对照品溶液 1, 3, 5, 7, 9 mL, 分别定容至 10 mL, 精密吸取各浓度对照品溶液 10 μL 注入液相色谱仪, 按上述色谱条件测定峰面积, 以测得的峰面积积分值为纵坐标, 进样量 (μg) 为横坐标, 绘制标准曲线, 计算回归方程, 橙皮苷 $Y = 1\,612.40X + 5.20$, $r = 0.999\,9$, 表明橙皮苷在 0.052 ~ 0.46 μg 具有良好的线性关系; 柚皮苷 $Y = 977.01X + 35.81$, $r = 0.999\,8$, 表明柚皮苷在 0.044 ~ 0.39 μg 具有良好的线性关系。

[收稿日期] 2008-06-04

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30772726); 北京市自然科学基金资助项目(7072052)

[通讯作者] *刘振丽, Tel: (010) 64014411-2503; E-mail: zhenli_liu@sina.com

2.3 供试品溶液制备

2.3.1 提取液供试品溶液的制备 参考文献方法^[6],分别精密吸取各提取液 1.0 mL(相当于枳实生药 0.1 g),置于 25 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.3.2 沉降物供试品溶液的制备 精密称取沉降物 2 mg,置于 50 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.4 测定方法 柚皮芸香苷与柚皮苷为同分异构体,它们在紫外吸收光谱中的吸收系数相同。因此在缺少柚皮芸香苷对照品的情况下,参考文献方法^[6],根据柚皮苷对照品的峰面积和进样量计算样品中柚皮芸香苷的含量。

精密吸取各供试品溶液与对照品溶液 5 μL 注入液相色谱仪,测定峰面积,计算含量。

3 提取工艺研究

3.1 正交实验设计 取甜橙枳实饮片 500 g,称重,加入 8 倍量水,水蒸汽蒸馏法提取挥发油 6 h,滤过,滤液均分为 10 等份。药渣称重后,均分为 10 等份。以甜橙枳实主要黄酮类成分橙皮苷和柚皮芸香苷含量为指标,考察乙醇用量、乙醇浓度和提取时间的影响,因素、水平见表 1。取 9 份按正交 L₉(3)⁴ 表进行实验,提取 2 次。2 次药液合并后,与 1 份提取挥发油后的滤液合并,适当浓缩,定容于 500 mL 量瓶中,摇匀,得每 1 mL 相当于 0.1 g 生药的药液,放置过夜,离心 10 min(3000 转/min),测定上清液中主要黄酮类成分的含量。

表 1 乙醇提取工艺因素水平表

水平	因素		
	A 乙醇用量(倍)	B 乙醇浓度(%)	C 提取时间(h)
1	6	50	0.5
2	8	70	1.0
3	10	90	1.5

3.2 沉降物得量考察 称取甜橙枳实饮片 50 g,以正交实验确定的最佳工艺提取,得到的提取液放置过夜,离心 10 min(3 000 转/min),沉降物 60 ℃ 真空干燥 8 h,称重。测定提取液和沉降物中主要黄酮类成分含量。重复 3 次。

正交实验主要黄酮类成分含量测定结果见表 2,方差分析见表 3。沉降物中橙皮苷和柚皮芸香苷含量测定结果见表 4,橙皮苷和柚皮芸香苷提取率结果见表 5。

表 2 正交设计主要黄酮类成分含量

试验号	A	B	C	空白	橙皮苷和柚皮芸香苷 (饮片 mg · g ⁻¹)
1	1	1	1	1	21.07
2	1	2	2	2	29.77
3	1	3	3	3	24.79
4	2	1	2	3	22.65
5	2	2	3	1	28.92
6	2	3	1	2	24.97
7	3	1	3	2	24.15
8	3	2	1	3	38.64
9	3	3	2	1	29.17
K1	75.63	67.87	84.68	79.16	
K2	76.54	97.33	81.59	78.89	
K3	91.96	78.93	77.86	86.08	
R	16.33	11.06	3.09	6.92	

表 3 正交设计方差分析表

变异来源	平方和	自由度	F 值	P 值
A	56.1414889	2	5.070	>0.1
B	147.641689	2	13.334	<0.1
C	7.77482222	2	0.702	>0.1
误差	11.0728222	2		

表 4 沉降物中橙皮苷及柚皮芸香苷含量

次数	沉降物 重量(g)	柚皮芸香苷 含量(mg · g ⁻¹)	橙皮苷含量 (mg · g ⁻¹)	柚皮芸香苷和橙皮苷 含量(mg · g ⁻¹)
1	2.5180	44.94	422.60	467.54
2	2.4400	45.76	423.10	468.86
3	2.5550	44.54	422.77	467.31
平均	2.5043	45.08	422.82	467.90

表 5 50 g 生药提取液及沉降物中主要黄酮成分所占比例

样品名称	橙皮苷 含量 (mg · g ⁻¹)	橙皮 苷量 (mg)	柚皮芸 香苷含量 (mg · g ⁻¹)	柚皮芸 香苷量 (mg)	两种成 分总量 (mg)	提取 率(%)
饮片 (mg · g ⁻¹)	81.80	4 090.00	13.50	675.00	4 765.00	100.00
提取液 (饮片 mg · g ⁻¹)	31.58	1 579.00	7.06	353.00	1 932.00	40.6
沉降物 (mg · g ⁻¹)	422.82	1 080.31	45.08	115.18	1 195.18	20.1

4 结果与讨论

方差分析结果显示(表 3),甜橙枳实乙醇提取工艺条件筛选中,因素 A 即乙醇用量对主要黄酮类

黄柏总生物碱提取方法及工艺研究

刘丽梅¹,王瑞海¹,陈琳¹,陈韩英²,杨立新³,刘凤华^{4*},许剑琴⁵

- (1. 中国中医科学院中医基础理论研究所,北京 100700; 2. 石河子大学药学院,新疆 石河子 832000;
3. 中国中医科学院中药所,北京 100700; 4. 北京农学院,北京 102206;
5. 中国农业大学动物医学院,北京 102206)

【摘要】 目的:筛选二类中兽药畜禽抗应激颗粒中黄柏总生物碱提取工艺。方法:采用 $L_9(3^4)$ 正交设计法对黄柏药材提取时所用乙醇浓度、乙醇用量、提取时间、提取次数进行考察;采用单因素考察法对黄柏药材提取粒度进行考察。结果:黄柏提取总生物碱最佳提取工艺为:黄柏细丝2~3 mm,用药材10倍量75%乙醇回流提取3次,每次提取1.5 h。结论:该工艺稳定,质量可控,可用于产业化生产。

【关键词】 黄柏;总生物碱;提取;正交设计

【中图分类号】 R283.6 **【文献标识码】** B **【文章编号】** 1005-9903(2010)02-0003-03

畜禽抗应激颗粒由黄柏、苍术、藿香、石膏以不

同比例组成的二类复方中兽药。在兽医临床研究中发现,该复方可提高猪等畜禽对高热环境的适应能力,黄柏是其中的主药。黄柏为芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid. 的干燥树皮。黄柏含有多种生物碱,主要为小檗碱,其它生物碱有巴马丁、药根碱、黄柏碱、蝙蝠葛任碱、白瓜萎碱、木兰花碱等^[1]。资料表明黄柏总生物碱具有抗溃疡及抗腹泻

【收稿日期】 2008-05-18

【基金项目】 北京市科技计划课题(Y0705003041631;
2008BADB4B07)

【通讯作者】 *刘凤华, Tel: (010) 80799147; E-mail: liulimeihrb@ sina. com