

• 制剂工艺 •

中药枳实提取工艺研究

王 淳, 刘振丽*, 宋志前, 李林福, 吕署一, 郝兴辉
(中国中医科学院中医基础理论研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 探讨枳实中主要有效成分提取的最佳工艺条件。方法: 以橙皮苷、柚皮苷和辛弗林的含量为指标, 研究枳实提取挥发油后其它有效成分的提取溶剂。在此基础上, 采用正交设计 $L_9(3)^4$ 表, 确定最佳提取工艺。结果: 采用乙醇提取橙皮苷含量明显高于水提取, 柚皮苷和辛弗林含量无明显差异。结论: 乙醇提取的最佳工艺条件为 10 倍量 60% 乙醇提取 2 次, 每次 1.0 h。

[关键词] 枳实; 提取工艺; 橙皮苷; 柚皮苷; 辛弗林

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)09-0023-03

Study on the Extracting Technology of Fructus Aurantii Immaturus

WANG Chun, LIU Zhen-li*, SONG Zhi-qian, LI Linfu, LV Shu-yi, HAO Xing-hui
(The Institute of Basic Theory, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the optimum conditions for extracting the major active components in Fructus Aurantii Immaturus. **Method:** According to the contents of Hesperidin, Naringin and Synephrine, the use of extraction solvent of the other active components of Fructus Aurantii Immaturus in which the volatile oil were distilled was studied. And $L_9(3)^4$ orthogonal design was used to determine the optimum extraction conditions. **Result:** The content of hesperidin in the EtOH extraction was obviously higher than that in the water extraction, and the contents of naringin and synephrine had no significant difference. **Conclusions:** The optimum ethanol extraction conditions was 10 times amount of 60% alcohol, refluxed two times, 1.0 hour each time.

[Key words] Fructus Aurantii Immaturus; extracting technology; hesperidin; naringin; synephrine

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。有破气消积, 化痰除痞的功效^[1]。主要含有黄酮、生物碱和挥发油三大类有效成分。黄酮类成分主要有橙皮苷、柚皮苷等, 生物碱类成分包括辛弗林等^[2]。在制剂工艺中, 常采用水蒸气蒸馏提取挥发油后, 药渣继续用水煎煮提取黄酮类和生物碱类成分。我们

在进行枳实配方颗粒质量标准规范化示范研究课题的研究中发现, 通过对提取工艺条件的优化, 生物碱类成分辛弗林的转移率可以达到 90% 以上, 但黄酮类成分橙皮苷的转移率低于 30%, 这是否与提取溶剂的选择有关? 本文以其中的橙皮苷、柚皮苷和辛弗林含量为指标, 比较枳实提取挥发油后的药渣采用乙醇和水提取的提取效果, 在此基础上, 探讨枳实中有效成分提取的最佳工艺条件。

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)、

[收稿日期] 2008-03-04

[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

TCQ-250 型超声波清洗器(北京医疗设备二厂)。枳实(购自北京燕京医药有限公司,产地:江西,批号:0612064)。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)和辛弗林对照品(批号:0727-200105,含量测定用)购自中国药品生物制品检定所。甲醇、乙腈为色谱纯,水为重蒸水,其它试剂为分析纯。

2 方法及结果

2.1 色谱条件 橙皮苷、柚皮苷 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.2% 醋酸(30:70); 检测波长: 283 nm; 流速: 1 mL · min⁻¹; 柱温: 30 °C。辛弗林 色谱柱为 Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm)。流动相为乙腈-水-磷酸-十二烷基硫酸钠(24:76:0.1:0.2); 检测波长: 275 nm; 流速: 1.2 mL · min⁻¹; 柱温: 30 °C。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取橙皮苷对照品、柚皮苷对照品适量,加甲醇分别制成每 1 mL 含橙皮苷 428 μg,柚皮苷 183.6 μg 的溶液;分别精密量取上述对照品溶液各 2 mL,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,制成每 1 mL 含橙皮苷 85.6 μg,柚皮苷 36.72 μg 的混合对照品溶液。

精密称取以五氧化二磷为干燥剂减压干燥 4 h 的辛弗林对照品适量,加水制成每 1 mL 含 20.98 μg 的溶液。

2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 橙皮苷、柚皮苷 按参考文献^[3],取枳实药材粉末 0.1 g,精密称定,精密加入水饱和正丁醇溶液 25 mL,称定重量,加热回流 1 h,放冷,再称定重量,用水饱和正丁醇补足减失的重量,摇匀,滤过。精密量取续滤液 5 mL,回收溶剂至干,残渣加甲醇使溶解,并定容于 5 mL 量瓶中,即得。

分别精密吸取各提取液 1.0 mL(相当于枳实药材 0.1 g),置锥形瓶中,加入 4 mL 正丁醇饱和的水,摇匀,于分液漏斗中,用水饱和的正丁醇萃取 4 次,每次 10 mL,合并正丁醇液,蒸干,残渣加甲醇溶解并定容于 25 mL 量瓶中,0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.3.2 辛弗林 依已经建立的方法进行^[3]。取枳实粉末 0.5 g,精密称定,置锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,称定重量,加热回流 1.5 h,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 10 mL,蒸干,残渣加水 10 mL 使溶解,通过聚酰

胺柱(60~90 目,2.5 g,内径 1.5 cm,干法装柱),用水 25 mL 洗脱,收集洗脱液,转移至 25 mL 量瓶中,加水至刻度,摇匀,即得。

分别精密吸取各提取液 5 mL(相当于枳实药材 0.5 g),通过聚酰胺柱(60~90 目,2.5 g,内径 1.5 cm,干法装柱),用水 30 mL 洗脱,收集洗脱液,转移至 25 mL 量瓶中,加水至刻度,摇匀,即得。

2.4 测定方法 分别精密吸取各对照品溶液、供试品溶液(2~10) μL,注入高效液相色谱仪,测定峰面积,计算含量。

2.5 最佳提取工艺的确定

2.5.1 挥发油的提取 挥发油的提取按实验室已确定的最佳工艺条件进行。即称取枳实药材 100 g,加 6 倍量水,浸泡 2 h,用水蒸汽蒸馏法提取挥发油 8 h,放冷,滤过,药液和药渣均分为两份,留用。

2.5.2 提取溶剂的比较 上述提取挥发油后的药渣分别加水和 60% 乙醇回流提取两次,第 1 次 8 倍量,第 2 次 6 倍量,每次 1 h,滤过,药液与提取挥发油的药液 1 份合并,分别定容至 500 mL,摇匀,得每 1 mL 相当于 0.1 g 生药的药液。重复两次。按上述含量测定方法测定,计算,结果见表 1。

表 1 水提取与醇提取液中各有效成分含量测定结果

指标	提取方法	平均值		
		生药 g · (100 g) ⁻¹	RSD(%)	转移率(%)
橙皮苷	水提	0.689	0.55	27.4
	醇提	0.880	2.1	35.0
	药材	2.510	2.3	—
柚皮苷	水提	13.5	2.3	96.2
	醇提	13.7	2.2	97.7
	药材	14.1	1.5	—
辛弗林	水提	0.244	2.9	90.1
	醇提	0.249	2.5	91.9
	药材	0.271	1.1	—

表 1 结果显示,60% 乙醇提取优于水提取,因此对乙醇提取的最佳工艺条件进行了研究。

2.5.3 乙醇提取最佳工艺条件的筛选 取枳实饮片 500 g,加入 6 倍水,浸泡 2 h,水蒸汽蒸馏法提取挥发油 8 h,滤过,滤液均分为 10 等份。药渣称重后,均分为 10 等份。以橙皮苷、柚皮苷和辛弗林含量为指标,考察乙醇用量、乙醇浓度和提取时间的影响,因素水平表见表 2,取 9 份按正交 L₉(3)⁴ 表进行实验,提取 2 次。各药液合并后,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。按上述含量测定方法制备各供试品溶液,测定,计算,结果见表 3。方差分析结果见表 4。

表 2 乙醇提取正交工艺优选因素水平表

水平	因素		
	A 乙醇用量(倍)	B 乙醇浓度(%)	C 煎煮时间(h)
1	6	50	0.5
2	8	60	1.0
3	10	70	1.5

表 3 乙醇提取正交工艺橙皮苷、柚皮苷和辛弗林含量测定结果(生药 $g \cdot 100 g^{-1}$)

试验号	A	B	C	空白	橙皮苷	柚皮苷	辛弗林
1	1	1	1	1	0.682	10.2	0.182
2	1	2	2	2	0.697	11.0	0.224
3	1	3	3	3	0.719	10.1	0.195
4	2	1	2	3	0.883	11.2	0.248
5	2	2	3	1	0.833	12.9	0.232
6	2	3	1	2	0.712	10.7	0.198
7	3	1	3	2	0.853	13.7	0.238
8	3	2	1	3	0.802	11.0	0.214
9	3	3	2	1	0.853	13.7	0.251
橙皮苷	K_1	2.098 1	2.417 9	2.196 2	2.368 6		
	K_2	2.428 2	2.332 8	2.433 1	2.262 3		
	K_3	2.507 9	2.283 5	2.404 9	2.403 3		
	R	0.409 7	0.134 4	0.236 8	0.140 9		
柚皮苷	K_1	31.189 5	35.081 7	31.900 0	36.785 4		
	K_2	34.813 4	34.885 9	35.851 3	35.400 7		
	K_3	38.460 2	34.495 5	36.711 9	32.277 0		
	R	7.270 7	0.586 2	3.951 3	4.508 4		
辛弗林	K_1	0.601 0	0.668 0	0.594 0	0.665 0		
	K_2	0.678 0	0.670 0	0.723 0	0.660 0		
	K_3	0.703 0	0.644 0	0.665 0	0.657 0		
	R	0.102 0	0.026 0	0.129 0	0.008 0		

3 结果与讨论

表 1 结果显示,采用乙醇提取橙皮苷转移率为 35.0%,明显高于水提取的 27.4%,柚皮苷和辛弗林转移率两种溶剂无明显差异。即使采用乙醇提取,

橙皮苷转移率也比较低为 35.0%,而柚皮苷的转移率达到 97.7%,在枳实提取过程中是否存在化学成分结构间的转化,值得进一步研究。

表 4 方差分析表

考察指标	变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
橙皮苷	A	0.031 46	2	0.015 73	9.433	< 0.05
	C	0.011 16	2	0.005 58	3.346	> 0.1
	误差	0.006 67	4	0.001 667 5	—	—
柚皮苷	A	8.810 6	2	4.405 3	4.874	> 0.1
	C	4.389 7	2	2.194 85	2.429	> 0.1
	误差	3.614 98	4	0.903 745	—	—
辛弗林	A	0.001 88	2	0.000 94	170.909	< 0.01
	B	0.000 14	2	0.000 07	12.727	< 0.1
	C	0.002 78	2	0.001 39	252.727	< 0.01
	误差	0.000 011	2	0.000 005 5	—	—

$F_{0.01}(2, 2) = 99.0$; $F_{0.05}(2, 2) = 19.0$; $F_{0.1}(2, 2) = 9.0$; $F_{0.01}(2, 4) = 18.0$; $F_{0.05}(2, 4) = 6.94$; $F_{0.1}(2, 4) = 4.32$ 。

乙醇提取的最佳工艺条件筛选方差分析中,由于因素 B 对橙皮苷和柚皮苷影响的平方和小于误差项,故合并计算。表 4 结果显示,对于橙皮苷含量:因素 A 即乙醇用量有显著的影响($P < 0.05$), $A_3 > A_2 > A_1$, 选择 A_3 , 因素 B 即乙醇浓度和因素 C 即提取时间皆无显著影响($P > 0.1$)。对于柚皮苷含量:3 个因素皆无显著影响($P > 0.1$)。对于辛弗林含量:因素 A 和因素 C 有极显著的影响($P < 0.01$), 因素 B 无明显影响($P < 0.1$)。 $A_3 > A_2 > A_1$, 选择 A_3 ; $B_2 > B_1 > B_3$, 选择 B_2 ; $C_2 > C_3 > C_1$, 选择 C_2 , 确定最佳工艺为 $A_3B_2C_2$ 。综合 3 个成分含量测定的结果,确定黄酮类成分和生物碱类成分最佳提取工艺为分别加 10 倍量 60% 乙醇回流提取 2 次,每次 1.0 h。

[参考文献]

- [1] 国家中医药管理局编委会. 中华本草[M]. (12), 上海: 上海科学技术出版社, 1999. 874.
- [2] 王幕邹. 常用中草药高效液相色谱分析[M]. 北京: 科学出版社, 1999. 230.
- [3] 刘振丽, 宋志前, 张玲, 等. 枳实饮片中 3 类化学成分含量测定[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(17): 1425.