

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.10.011

正交试验优选枳壳提取工艺*

徐坤勇¹, 颜娟², 韵国萍^{1△}

(1. 河北省张家口市第一医院, 河北 张家口 075000; 2. 河北北方学院附属第一医院, 河北 张家口 075000)
摘要:目的 优选枳壳的提取工艺。方法 以液料比、提取次数和提取时间为考察因素,以柚皮苷、新橙皮苷含量和收膏率为综合评价指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法优选枳壳的提取工艺,并进行验证。结果 枳壳的最佳提取工艺为加8倍量50℃水,每次提取1.5h,提取2次;在此工艺下,枳壳提取液的柚皮苷含量为7.43%,新橙皮苷含量为4.44%,收膏率为27.68%。结论 该提取工艺稳定可行,重复性好,且提取效率较高。

关键词:枳壳;柚皮苷;新橙皮苷;正交试验;提取工艺

中图分类号:R932;TQ460.6

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)10-0044-04

Optimization of the Extraction Process of *Fructus Aurantii* by the Orthogonal Test

XU Kunyong¹, YAN Juan², YUN Guoping¹

(1. The First Hospital of Zhangjiakou City, Zhangjiakou, Hebei, China 075000; 2. The First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei, China 075000)

Abstract: Objective To optimize the extraction process of *Fructus Aurantii*. **Methods** $L_9(3^4)$ orthogonal test was used to optimize the extraction process of *Fructus Aurantii* with the liquid-to-material ratio, extraction times and extraction time as the investigating factors, and with the content and the extract yield of naringin and neohesperidin as the comprehensive evaluation indexes. **Results** The best extraction process for *Fructus Aurantii* was as follows: adding 8 times of 50℃ water, extracting 1.5 h each time, and extracting twice. Under this process, the content of naringin and neohesperidin of *Fructus Aurantii* were 7.43% and 4.44%, respectively, and the extract yield was 27.68%. **Conclusion** The extraction process is stable, feasible and reproducible with high extraction efficiency.

Key words: *Fructus Aurantii*; naringin; neohesperidin; orthogonal test; extraction process

*基金项目:河北省中医药管理局科研计划项目[2019536]。

第一作者:徐坤勇,男,大学本科,主管中药师,研究方向为医院药学,(电子信箱)776387993@qq.com。

△通信作者:韵国萍,女,大学本科,主任药师,研究方向为医院药学,(电子信箱)yunguoping@163.com。

月雪,化学成分多为萜类化合物,难溶于水,其中的齐墩果酸为脂溶性成分,通过多次试验发现,六月雪-葎草药对水提液中含量极低,结合文献[14],未将其纳入评价指标,综合考虑,采用药对中另一味葎草中的木犀草苷的转移率与水煎液浸膏得率的综合评分作为评价指标,结果较合理。

与正交试验法相比,响应面法综合评分更高,更适用于优化六月雪-葎草药对的提取工艺。验证试验表明,六月雪-葎草药对提取液的浸膏得率和木犀草苷的含量稳定、重复性好,本研究为六月雪-葎草药对的进一步研究奠定了技术基础。

参考文献

- [1] 谢维当. 糖尿病肾病患者血清 NGAL 和 APN 的改变及其临床意义[D]. 广州:南方医科大学,2014.
- [2] 朱宜临,钱秋海,张新颖. 糖尿病肾病中西医研究进展[J]. 山东中医杂志,2017,36(1):82-84.
- [3] 宋立人,洪 恂,丁绪亮,等. 现代中药学大辞典[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:1615-1616.
- [4] 倪士峰,辅承新,吴 平,等. 不同季节山地六月雪挥发油成分比较研究[J]. 中国中药杂志,2004,29(1):54-58.
- [5] 冯顺卿,王 冠,岑颖洲,等. 瑶药白马骨的化学成分研究[A]. 中国化学会第四届有机化学学术会议论文集[C]. 昆明:云南人民出版社,2005:34.
- [6] 郭 培,柳 航,朱怀军,等. 六月雪木脂素成分的研究[J]. 中成药,2016,38(10):2192-2197.
- [7] 王少芳,李广义,杨国华,等. 六月雪化学成分的研究[J]. 中国中药杂志,1989,14(9):33-34.
- [8] 王 敏,梁敬钰,刘雪婷,等. 白马骨的化学成分[J]. 中国天然药物,2006,4(3):198-201.
- [9] 马奋刚,张永萍. 中药葎草药理作用与化学成分的研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘,2017,17(14):46-48.
- [10] 李天磊,殷献华,潘卫东,等. 葎草化学成分研究[J]. 中药材,2010,33(1):55-57.
- [11] 李华妮,郑连营,葛文静,等. 正交试验、响应面法优化加味三根汤的提取工艺比较[J]. 中国现代中药,2019,21(8):1089-1093.
- [12] 牟会荣,陈 昆,王晓岚,等. 正交试验法与响应面法在桑叶黄酮提取工艺优化中的应用和比较[J]. 江苏科技大学学报,2016,30(1):88-93.
- [13] GHOSH S, CHAKRABORTY R, CHATTERJEE G, et al. Study on fermentation conditions of palm juice vinegar by response surface methodology and development of a kinetic model[J]. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 2012, 29(3):461-472.
- [14] 陈 坤,余晓玲,陈凌云. 参威骨痹颗粒的提取工艺研究[J]. 西北药学杂志,2018,33(3):323-327.

(收稿日期:2020-11-05)

枳壳为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种的干燥未成熟果实,炮制品为不规则弧状条形薄片。枳壳性微寒,味苦、辛、酸,归脾、胃经,有行滞消胀、理气宽中功效,临床可用于治疗胃下垂、子宫脱垂、食积不化、胀满疼痛、胸肋气滞、痰饮内停等症^[1]。黄酮类化合物为枳壳主要化学成分,新橙皮苷和柚皮苷为黄酮类化合物的主要成分,具有抗过敏、抗肿瘤、抗炎、抗菌、抗微生物、保护受损心肌、诱导甲状腺癌细胞凋亡、抗基因突变等多种药理作用^[2-5]。目前,枳壳的提取工艺主要包括热水煮取法、超声提取法、碱溶酸沉法等^[6-8],存在溶剂消耗大、耗能、产率不高、耗时等问题。为考察各因素对枳壳提取工艺的影响,提高提取效率,节约能源,本研究中以柚皮苷、新橙皮苷含量和收膏率为综合评价指标,采用正交试验法优选枳壳的提取工艺,找出最佳提取条件,为该药材的开发应用提供依据。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);KQ-250DE 型数控超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司);AE240 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司)。

1.2 试剂

柚皮苷对照品(重庆对照品科技有限公司,批号为 110722-201312,含量 $\geq 98\%$);新橙皮苷对照品(西安旭煌技术有限公司,批号为 N-19020,含量 $\geq 97\%$);乙腈、甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水;枳壳样品(张家口市张垣中药饮片有限公司,批号为 20190801)。

2 方法与结果

2.1 柚皮苷及新橙皮苷含量测定

2.1.1 色谱条件

色谱柱:Hypersil C₁₈ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm,5 μ m);

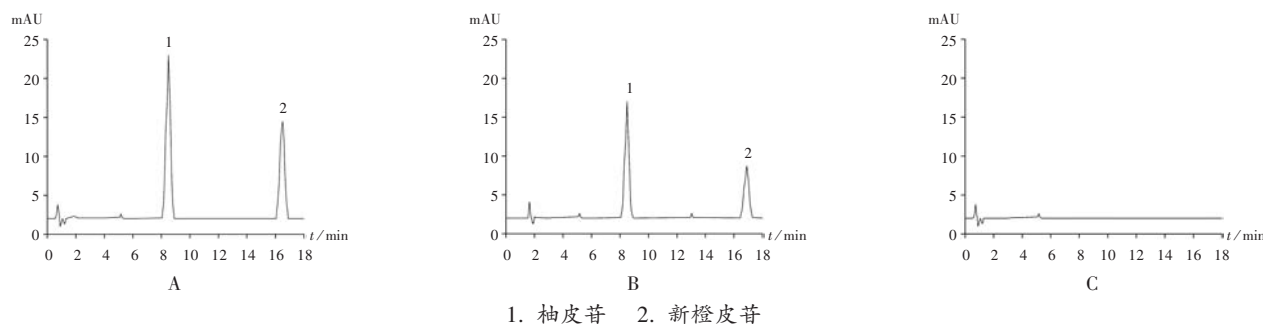
流动相:乙腈-水溶液(20:80, V/V,用磷酸调 pH 至 3);流速:1.0 mL/min;检测波长:283 nm;柱温:室温,进样量:10 μ L。理论板数按柚皮苷峰计应不低于 3 000。在此色谱条件下的色谱图见图 1。

2.1.2 溶液制备

分别称取柚皮苷对照品 40.01 mg、新橙皮苷对照品 40.00 mg,精密称定,置 50 mL 容量瓶中,加甲醇定容,超声使溶解,摇匀,即得单一对照品贮备液。精密量取上述溶液各 2 mL,置 10 mL 容量瓶中,加甲醇定容,制成每 1 mL 分别含柚皮苷和新橙皮苷各 160 μ g 的混合对照品溶液。取枳壳粗粉约 0.2 g,精密称定,提取,放冷,滤过,蒸发皿中蒸干,加甲醇溶解,并洗涤干净后转移至 100 mL 容量瓶中,甲醇定容,超声(功率 250 W,频率 40 kHz),摇匀,即得供试品贮备液。移取 5 mL,0.45 μ m 微孔滤膜滤过,取 1 mL 中间续滤液,即得供试品溶液。按枳壳处方及工艺制备缺柚皮苷、新橙皮苷的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.1.3 方法学考察

线性关系与定量限、检测限考察:分别精密量取 2.1.2 项下混合对照品贮备液适量,加甲醇稀释成质量浓度分别为 12,24,48,96,192,240 μ g/mL 的系列混合对照品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。分别以待测成分峰面积(Y)为纵坐标、质量浓度(X)为横坐标进行线性回归,得回归方程,柚皮苷为 $Y_1 = 5.39 \times 10^3 X_1 + 4.22 \times 10^4$, $r_1 = 0.999\ 6$ ($n = 6$);新橙皮苷为 $Y_2 = 6.12 \times 10^3 X_2 + 5.21 \times 10^4$, $r_2 = 0.999\ 7$ ($n = 6$)。结果表明,柚皮苷、新橙皮苷质量浓度均在 12~240 μ g/mL 范围内与峰面积线性关系良好。同时,以信噪比(S/N)为 10 和 3 的质量浓度进样,测得柚皮苷的定量限和检测限分别为 1.38 μ g/mL 和 0.42 μ g/mL,新橙皮苷定量限和检测限分别为 1.13 μ g/mL 和 0.35 μ g/mL。



1. 柚皮苷 2. 新橙皮苷
A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图 1 高效液相色谱图

1. naringin 2. neohesperidin

A. Mixed reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

精密密度试验:精密量取 2.1.2 项下混合对照品溶液 10 μL ,按 2.1.1 项色谱条件连续进样 6 次,测定。结果柚皮苷、新橙皮苷峰面积的 *RSD* 分别为 0.72% 和 0.85% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:精密量取 2.1.2 项下供试品溶液 10 μL ,室温下分别于 0,1,2,5,10,24 h 时按 2.1.1 项下色谱条件进样测定。结果柚皮苷、新橙皮苷峰面积的 *RSD* 分别为 1.09% 和 0.92% ($n=6$),表明供试品溶液在室温下 24 h 内稳定。

重复性试验:取药材样品粗粉 6 份,按 2.1.2 项下方法平行制备供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件进样测定。结果柚皮苷、新橙皮苷的平均含量分别为 7.37% 和 4.24%,*RSD* 分别为 0.87% 和 1.12% ($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的药材样品(含柚皮苷约为 7.38%、新橙皮苷约为 4.27%)粗粉 6 份,精密称定,每份约 0.2 g,分别加入柚皮苷及新橙皮苷对照品约 14.76 mg 和 8.54 mg,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件进样测定,并计算回收率。结果见表 1。

表 1 加样回收试验结果 ($n=6$)

Tab. 1 Results of the recovery tests ($n=6$)

成分	取样量 (g)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	$\bar{X}$ (%)	<i>RSD</i> (%)
柚皮苷	0.201	14.794	14.731	29.548	100.16	97.50	1.91
	0.212	15.603	14.724	29.942	97.39		
	0.207	15.235	14.729	29.332	95.71		
	0.198	14.573	14.718	29.198	99.37		
	0.224	16.486	14.716	30.616	96.02		
新橙皮苷	0.206	15.162	14.722	29.348	96.36	97.06	1.64
	0.201	8.543	8.502	16.912	98.44		
	0.212	9.010	8.507	17.467	99.41		
	0.207	8.798	8.498	16.948	95.90		
	0.198	8.415	8.501	16.521	95.35		
	0.224	9.520	8.511	17.791	97.18		
	0.206	8.755	8.497	16.917	96.06		

2.2 收膏率测定

精密量取 2.1.2 项下供试品贮备液 20 mL,置已干燥至恒重的蒸发皿中水浴蒸干,105 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 3 h 后取出,置干燥器中冷却,至常温后立即称定质量。收膏率 = (浸膏质量/20 $\times$ 100)/药物总质量 $\times$ 100%。

2.3 正交试验设计

根据预试验结果和实际生产条件,参考文献[9-12],以液料比(A)、提取时间(B)及提取次数(C)为考察因素,以柚皮苷、新橙皮苷的含量和收膏率为综合评价指标^[13-14],采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法优选枳壳的提取工艺。

因素水平见表 2,正交试验设计及结果见表 3,方差分析结果见表 4。由表 3、表 4 可知,以柚皮苷、新橙皮苷含量为考察指标时,3 个因素均为不显著因素;以收膏率为考察指标时,仅因素 A 为显著因素,故因素 A 确定 A_2 为最佳水平。为节约能源,提高提取效率,满足工业化生产需要,确定最优提取工艺条件为 $A_2B_2C_2$,即液料比 8:1,每次提取 1.5 h,提取 2 次。

表 2 正交试验因素水平表

Tab. 2 The factors and levels of the orthogonal test

水平	因素 A(倍)	因素 B(h)	因素 C(次)	因素 D(空白)
1	6	1.0	1	1
2	8	1.5	2	2
3	10	2.0	3	3

表 3 正交试验设计及结果

Tab. 3 Design and results of the orthogonal test

序号	A	B	C	D	柚皮苷含量(%)	新橙皮苷含量(%)	收膏率(%)
1	1	1	1	1	5.53	3.86	24.11
2	1	2	2	2	8.03	4.54	25.34
3	1	3	3	3	6.96	4.23	26.75
4	2	1	2	3	7.76	4.37	28.17
5	2	2	3	1	7.98	4.49	26.21
6	2	3	1	2	7.13	4.31	27.06
7	3	1	3	2	5.73	3.86	25.34
8	3	2	1	3	5.71	3.81	23.22
9	3	3	2	1	5.34	3.66	26.31
柚	K_1	20.52	19.02	18.37	18.85		
皮	K_2	22.87	21.72	21.13	20.89		
苷	K_3	16.78	19.43	20.67	20.43		
	R	2.03	0.90	0.92	0.68		
新	K_1'	12.63	12.09	11.98	12.01		
橙	K_2'	13.17	12.84	12.57	12.71		
皮	K_3'	11.33	12.20	12.58	12.41		
苷	R	0.61	0.25	0.20	0.23		
收	K_1''	76.20	77.62	74.39	76.63		
膏	K_2''	81.44	74.77	79.82	77.74		
率	K_3''	74.87	80.12	78.30	78.14		
	R''	2.19	1.78	1.81	0.50		

2.4 工艺验证试验

称取枳壳 100 g,精密称定,共 3 份,按 $A_2B_2C_2$ 工艺条件进行提取,测定柚皮苷、新橙皮苷的含量和收膏率,对 3 批进行验证试验。结果见表 5。结果表明,该提取工艺重复性好,工艺稳定,合理可行。

3 讨论

水为实际生产中常见的优良溶剂,极性大,适宜提取苷类等极性大的化合物,且环保、安全。柚皮苷即 4,5,7-三羟基-黄酮酮-7-鼠李糖葡萄糖苷,微溶于冷水,在热水中有一定溶解度^[15],预试验结果显示,其

表4 方差分析结果

Tab. 4 Results of ANOVA

指标	方差来源	离差平方和	自由度	均方	F值	P
柚皮苷	A	6.29	2	3.14	8.24	>0.05
	B	1.41	2	0.71	1.85	>0.05
	C	1.46	2	0.73	1.91	>0.05
	D	0.76	2			
新橙皮苷	A	0.60	2	0.30	7.25	>0.05
	B	0.11	2	0.05	1.33	>0.05
	C	0.08	2	0.04	0.96	>0.05
	D	0.08	2			
收膏率	A	8.04	2	4.02	19.71	<0.05
	B	4.78	2	2.39	11.71	>0.05
	C	5.23	2	2.62	12.82	>0.05
	D	0.41	2			

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ 。

Note: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ 。

表5 工艺验证试验结果(%)

Tab. 5 Results of the validation test(%)

指标	1	2	3	$\bar{X}$	RSD(%)
柚皮苷含量	7.45	7.36	7.48	7.43	0.84
新橙皮苷含量	4.45	4.48	4.39	4.44	1.03
收膏率	27.54	27.66	27.85	27.68	0.56

在 50℃ 水中溶解性能良好。乙醇对天然植物细胞的穿透能力较强,来源方便,价格便宜,50%~70%乙醇常用于天然药物中柚皮苷等苷类化合物的提取^[16-17]。故暂定为 50℃ 水和 60% 乙醇进行提取试验。试验中,保持其他条件相同,分别以 50℃ 水和 60% 乙醇为提取溶剂对枳壳药材进行提取,高效液相色谱法对指标成分柚皮苷、新橙皮苷含量进行测定,同时考察收膏率。结果表明,采用 50℃ 水和 60% 乙醇对枳壳提取各项考察指标的影响差异不大,考虑生产成本,故采用 50℃ 水提取。

在中药研制过程中,为保证药材提取质量,故选用多指标评价提取工艺。枳壳药效成分主要为黄酮类化合物,其中柚皮苷含量较高;新橙皮苷为 2015 年版《中国药典(一部)》中药材枳壳含量测定指标成分之一;收膏率作为中药提取工艺的常用评价指标之一,可反映各组分的提取程度^[18]。故本研究以柚皮苷、新橙皮苷含量和收膏率为评价指标,优化枳壳提取工艺,以期工业化生产奠定基础。验证试验结果表明,优选的提取工艺,柚皮苷、新橙皮苷的平均含量均明显高于刘学仁等^[19]采用微波辅助提取法所得结果,提取效率明显提高。

综上所述,该提取工艺稳定可行,重复性好,且提取效率高。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社,2015:246.
- [2] 滕建业,孟宪生,韩凌,等. 枳壳中柚皮苷提取工艺的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(3):34-35.
- [3] ZHOU J, XIA L, ZHANG Y. Naringin inhibits thyroid cancer cell proliferation and induces cell apoptosis through repressing PI3K/AKT pathway[J]. Pathol Res Pract, 2019, 215(12):152707.
- [4] AMINI N, SARKAKI A, DIANAT M, et al. Protective effects of naringin and trimetazidine on remote effect of acute renal injury on oxidative stress and myocardial injury through Nrf-2 regulation[J]. Pharmacol Rep, 2019, 71(6):1059-1066.
- [5] YANG JP, YUAN L, WEN Y, et al. Protective Effects of Naringin in Cerebral Infarction and Its Molecular Mechanism[J]. Med Sci Monit, 2020, 26:e918772.
- [6] 杨稼俊,胡爱军,杨瑶,等. 柚皮中柚皮苷的提取工艺研究[J]. 农产品加工, 2020(8):36-38.
- [7] 陈静,杨天仁. 枳壳超声提取工艺研究[J]. 中医药信息, 2011, 28(3):83-84.
- [8] 赵翠然,张晓倩,李珠,等. 柚皮苷提取工艺研究[J]. 煤炭与化工, 2018, 41(6):131-133.
- [9] 冯倩,郑伟,李蔚群,等. 多指标正交试验法考察蒲公英提取与纯化工艺[J]. 现代中药研究与实践, 2020, 34(3):52-56.
- [10] 王李婷,王向根,李星,等. 正交试验优选木姜叶柯中三叶苷提取工艺[J]. 中国药业, 2020, 29(1):26-28.
- [11] 陈剑平,胡兆流,黄诗莹,等. 正交试验法优选软肝颗粒水提工艺[J]. 中国药业, 2019, 28(7):15-18.
- [12] 刘李梅,杨明,郭志辉,等. 正交试验法优选蒺藜总皂苷和总黄酮的提取工艺[J]. 现代中药研究与实践, 2015, 29(1):44-47.
- [13] 冯子芳,袁晓航,陈晓伟,等. 多指标正交试验优选葆肾合剂最佳提取工艺[J]. 中国药业, 2020, 29(17):43-46.
- [14] 周许,吴明权,朱力阳,等. 多指标正交试验优选都江堰 2 号擦剂的提取工艺[J]. 现代中药研究与实践, 2019, 33(2):58-61.
- [15] 白小鸣,曾小峰,王华,等. 响应面法优化超声波辅助提取梁平柚果皮中柚皮苷工艺研究[J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2016, 41(2):58-65.
- [16] 周石磊,王鸿飞,杜洁雄. 柚皮中柚皮苷乙醇提取工艺研究[J]. 农业工程学报, 2006, 22(7):184-187.
- [17] 贾冬英,姚开,谭敏,等. 柚皮中柚皮苷的乙醇提取工艺研究[J]. 中草药, 2002, 33(9):36-37.
- [18] 郑礼娟,秦昆明,蔡皓,等. 多指标正交试验优选白术芍药散提取工艺[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(10):1504-1509.
- [19] 刘学仁,蔡品品,姜涛,等. 微波辅助提取枳壳中柚皮苷、新橙皮苷的工艺研究[J]. 中成药, 2013, 35(2):420-423.

(收稿日期:2020-09-07;修回日期:2020-11-20)