

# 正交试验优选枳实中柚皮苷的提取工艺

高 军\*,刘富春\*(解放军第324医院药剂科,重庆 400020)

中图分类号 R284 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)35-3291-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.35.09

**摘要** 目的:优选枳实中柚皮苷的提取工艺。方法:采用单因素试验考察提取溶剂及溶剂浓度对枳实中柚皮苷转移率的影响。以溶剂用量、提取次数、提取时间为考察因素,以柚皮苷转移率为评价指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验优选提取工艺。结果:最佳提取工艺为6倍量的70%乙醇提取3次,每次30 min。结论:该工艺稳定,提取率高,可供大规模工业化生产参考。

**关键词** 枳实;柚皮苷;正交试验;提取工艺

## Optimization of the Extraction Technology of Naringin from *Aurantii Fructus Immaturus* by Orthogonal Test

GAO Jun, LIU Fu-chun (Dept. of Pharmacy, No. 324 Hospital of PLA, Chongqing 400020, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE:** To optimize the extraction technology of naringin from *Aurantii Fructus Immaturus*. **METHODS:** Single factor test was used to investigate the effects of extraction solvent and solvent concentration on the transfer rate of naringin. The extraction technology was optimized by  $L_9(3^4)$  orthogonal test with the amount of solvent, extraction times and extraction time as factors using transfer rate of naringin as index. **RESULTS:** The optimal extraction technology was as follows: 6-folds 70% ethanol, extracting for 3 times, 30 min each time. **CONCLUSIONS:** The technology is stable and has high extraction rate, and can provide reference for large-scale industrial production.

**KEYWORDS** *Aurantii Fructus Immaturus*; Naringin; Orthogonal test; Extraction technology

枳实(*Aurantii Fructus Immaturus*)为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L.及其栽培变种或甜橙 *C. sinensis* Osbeck 的干燥幼果<sup>[1]</sup>。其味苦、辛、酸,性温,归脾、胃经,具有破气消积、化痰散痞的作用,临床用于积滞内停、痞满胀痛、泻痢后重、大便不通、结胸、痰滞气阻、胸痹、胃下垂等症的治疗<sup>[2]</sup>。枳实中的黄酮类成分含量丰富,约占其质量的5%~28%,其中主要为橙皮苷、新橙皮苷、柚皮苷<sup>[3]</sup>等。现有多个关于枳实中橙皮苷及新橙皮苷提取工艺的报道<sup>[4-6]</sup>,但对柚皮苷的提取工艺研究较少。本研究以柚皮苷为指标,先以单因素优选提取溶剂及溶剂浓度,再以正交试验优选枳实柚皮苷最佳提取工艺,旨在为枳实柚皮苷的工业化生产提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1100型高效液相色谱仪,包括DAD检测器、G1313A型自动进样器、G1322A型脱气机、G1311A型四元泵、G1316A型恒温箱、G1315B型化学工作站(美国惠普公司);9HDM-250B型电子调温电热套(常州冠军仪器制造有限公司);TCQ-250型超声波清洗器(北京医疗设备二厂,功率:250 W,频率:50 kHz);EL300A型电子天平(常州市天之平仪器有限公司)。

### 1.2 药材

枳实药材产地江西,经笔者检定为芸香科植物酸橙 *C. aurantium* L.的干燥幼果。

### 1.3 试剂

柚皮苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110722-201109);甲醇、乙醇为色谱纯,水为重蒸水,其余试剂为分析纯。

## 2 方法与结果

\* 主管药师。研究方向:中药学。电话:023-68762093。E-mail: 562874212@qq.com

# 通信作者:主管药师。研究方向:药学。电话:023-68762093

### 2.1 柚皮苷含量测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱:ZORBAXSB-C<sub>18</sub>(416 mm×150 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.2%醋酸(30:70, V/V);检测波长:283 nm;柱温:35 ℃;流速:1 ml/min;进样量:10 μl。理论板数以柚皮苷峰计算,不得低于2 000。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取柚皮苷对照品适量,加甲醇溶解并制成质量浓度为2.040 mg/ml的对照品贮备液,于4 ℃避光贮藏。精密吸取贮备液适量,将其等比例稀释成质量浓度为0.408~2.040 mg/ml的系列对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取枳实粗粉约0.1 g,精密称定,置具塞三角瓶中,精密加入甲醇40 ml,密塞,称定质量,加热回流1.5 h,密塞放冷,甲醇补足减失质量,摇匀。取上清液过0.45 μm微孔滤膜,弃去初滤液,取续滤液,即得。

2.1.4 标准曲线的制备 精密吸取质量浓度为0.408、0.816、1.224、1.632、2.040 mg/ml的对照品溶液各10 μl,按“2.1.1”项下色谱条件重复进样3次,测定峰面积积分值。以进样量(x, μg)为横坐标,峰面积积分值(y)为纵坐标,进行线性回归,得柚皮苷回归方程为 $y=12\ 146x+185.16$ ( $r=0.999\ 8$ )。结果表明,柚皮苷检测质量浓度在0.408~2.040 mg/ml线性范围内与其峰面积积分值呈良好线性关系。

2.1.5 精密度试验 精密吸取柚皮苷对照品溶液(2.040 mg/ml)适量,按“2.1.1”项下色谱条件重复进样6次,每次10 μl,测定峰面积积分值。结果,柚皮苷平均峰面积积分值为56.47, RSD=1.1%( $n=6$ ),表明本试验精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取供试品溶液适量,按“2.1.1”项下色谱条件于0、1、2、4、8、12、24 h各进样10 μl,测定峰面积积分值。结果,柚皮苷峰面积积分值的RSD=0.8%( $n=7$ ),表明本试验供试品溶液在24 h内稳定。

2.1.7 重复性试验 取同一批次枳实药材粗粉0.1 g,共6份,精密称定,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.1”项下

色谱条件进样,每次 10  $\mu$ l, 测定峰面积积分值,计算柚皮苷平均含量。结果,柚皮苷平均含量为 10.5%, RSD=0.7% ( $n=6$ ),表明本试验重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 精密称取已知质量分数的枳实粗粉末(柚皮苷质量分数为 1.15%)约 0.05 g,精密加入对照品溶液(柚皮苷 2.040 mg/ml)6 ml,按“2.1.3”项下方法制备供试溶液并测定其质量浓度。结果,柚皮苷平均回收率为 99.8%, RSD=1.5% ( $n=6$ )。

## 2.2 单因素试验

2.2.1 提取溶剂的考察 精密称取枳实粗粉约 10.0 g,共 6 份,分别加入水、60% 甲醇、60% 乙醇各 10 ml,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进样,测定柚皮苷转移率。转移率=提取物质量分数 $\times$ 提取物质量/药材质量分数 $\times$ 药材质量 $\times 100\%$ 。结果,60% 乙醇提取优于水、60% 甲醇,因此选择 60% 乙醇进行后续试验。不同溶剂对柚皮苷转移率的影响见表 1。

表 1 不同溶剂对柚皮苷转移率的影响

Tab 1 Effects of different solvents on transfer rate of naringin

溶剂	样品质量,g	柚皮苷转移率,%
水	10.013	45.30
60% 甲醇	10.009	52.72
60% 乙醇	10.011	57.45

2.2.2 提取溶剂体积分数的考察 精密称取枳实粗粉约 1.0 g,共 6 份,分别加入 50%、60%、70%、80%、90% 乙醇各 10 ml,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进样,测定柚皮苷转移率。结果表明,70% 乙醇提取优于其他体积分数的乙醇提取,因此选择 70% 乙醇进行后续试验。不同体积分数溶剂对柚皮苷转移率的影响见表 2。

表 2 不同体积分数溶剂对柚皮苷转移率的影响

Tab 2 Effects of different solvent concentrations on transfer rate of naringin

溶剂体积分数,%	样品质量,g	柚皮苷转移率,%
50	10.007	42.74
60	10.012	57.37
70	10.006	61.25
80	9.970	48.12
90	10.018	47.39

## 2.3 正交试验

根据单因素试验结果,以溶剂用量(A)、提取次数(B)、提取时间(C)为考察因素,每因素选取 3 个水平,以柚皮苷转移率为评价指标,采用  $L_9(3^3)$  正交表进行试验。各因素影响提取工艺的主次顺序为  $B>A>C$ ,A、B 因素对提取工艺的影响具有统计学意义( $P<0.01$ )。最佳提取工艺为  $A_1B_3C_2$ ,即加 6 倍量 70% 乙醇提取 3 次,每次 60 min。考虑到提取时间对提取工艺影响明显,故选择提取 30 min。最后结果为  $A_1B_3C_1$ ,即 70% 乙醇提取 3 次,每次 30 min。因素与水平见表 3;正交试验结果见表 4;方差分析结果见表 5。

## 2.4 工艺验证试验

为验证工艺的合理性,称取 4 批不同来源的枳实适量,按上述优选工艺进行提取,按上述色谱条件进样测定,计算柚皮苷转移率。结果,柚皮苷转移率与正交试验结果最高值相当,因此所选工艺可用于柚皮苷的提取。验证试验结果见表 6。

## 3 讨论

柚皮苷为一种双二氢黄酮类化合物<sup>[6-8]</sup>,其化学性质稳定,

表 3 因素与水平

Tab 3 Factors and levels

水平	因素		
	A,倍	B,次	C,min
1	6	1	30
2	8	2	60
3	10	3	90

表 4 正交试验结果

Tab 4 Results of orthogonal test

序号	A,倍	B,次	C,min	D(误差)	柚皮苷转移率,%
1	1	1	1	1	60.96
2	1	2	2	2	72.45
3	1	3	3	3	86.44
4	2	1	2	3	57.28
5	2	2	3	1	70.06
6	2	3	1	2	82.37
7	3	1	3	2	58.09
8	3	2	1	3	67.48
9	3	3	2	1	80.66
$K_1$	1.219	0.641	0.675	0.804	
$K_2$	1.026	1.095	1.103	1.138	
$K_3$	0.844	1.482	0.940	0.975	
R	6.256	34.318	0.704	4.327	

表 5 方差分析结果

Tab 5 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F	P
A	5.84	2	2.940	4.63	
B	26.89	2	13.845	21.80	<0.05
C	3.41	2	1.705	2.69	
D(误差)	1.27	2	0.635		

注: $F_{0.05}(2,2)=19.00, F_{0.01}(2,2)=99.00$

note: $F_{0.05}(2,2)=19.00, F_{0.01}(2,2)=99.00$

表 6 验证试验结果

Tab 6 Results of validation test

批号	样品质量,g	柚皮苷转移率,%
1	10.007	85.32
2	10.015	86.71
3	9.980	83.26
4	10.004	87.04

具有较好的耐热性和耐酸性。回流法具有提取效率高、速度快的优点,所以选择回流法作为枳实中柚皮苷的提取方法。

通过单因素试验对不同溶剂、不同体积分数乙醇提取进行了考察,结果显示,70% 乙醇提取枳实中柚皮苷成分,其转移率较高。因此,在正交试验中,选择 70% 乙醇提取用量、提取次数及提取时间作为 3 个因素进行考察。正交试验时参考文献<sup>[9]</sup>,每个序号重复 3 次。

本试验结果显示,枳实中柚皮苷的提取工艺最大影响因素为提取次数(B),其次为乙醇用量(A)、提取时间(C)。最佳提取工艺为 6 倍量的 70% 乙醇提取 3 次,每次 30 min。工艺验证试验显示,该工艺稳定,提取率高,可供工业化生产参考。

## 参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:230.
- [2] 陈振峰.枳实及其药用有效成分研究[J].中国野生植物资源,2005,24(4):38.

# HPLC法与UPLC法同时测定黄芩中5种黄酮类成分含量的比较<sup>△</sup>

李化<sup>1\*</sup>, 刘静<sup>1,2</sup>, 董红敬<sup>1</sup>, 刘红亮<sup>1</sup>, 杨滨<sup>1#</sup>(1.中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2.成都中医药大学药学院, 成都 610075)

中图分类号 R284.1; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)35-3293-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.35.10

**摘要** 目的:为黄芩多指标成分同步质量控制提供更加简便、快捷的检测方法。方法:分别采用高效液相色谱(HPLC)法和超高效液相色谱(UPLC)法测定黄芩中黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素和千层纸素A含量,比较两种方法的分离情况、线性关系、精密度、重复性、稳定性和加样回收率。HPLC法色谱柱为Diamonsil C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-水-甲酸(梯度洗脱),柱温为30℃,流速为1.0 ml/min,检测波长为280 nm;UPLC法色谱柱为Acquity BEH C<sub>18</sub>(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm),流动相为0.1%甲酸水溶液-乙腈(梯度洗脱),柱温为40℃,流速为0.4 ml/min,检测波长为280 nm。结果:两种方法在各自对应条件下的分离情况良好;进样量与峰面积积分值均呈良好的线性关系( $r \geq 0.9995$ );精密度、稳定性和重复性试验RSD<4%;平均加样回收率均>96%(RSD<5%,  $n=6$ );样品测定结果差异无统计学意义( $P>0.05$ )。结论:UPLC法较HPLC法具有速度更快、灵敏度更高,且节省溶剂的优势。UPLC法可以成功代替HPLC法,应用于黄芩药材多指标成分的同时质量控制。

**关键词** 黄芩;黄酮类成分;含量测定;高效液相色谱法;超高效液相色谱法

## Comparison of HPLC and UPLC for the Determination of 5 Flavonoids in *Scutellaria baicalensis*

LI Hua<sup>1</sup>, LIU Jing<sup>1,2</sup>, DONG Hong-jing<sup>1</sup>, LIU Hong-liang<sup>1</sup>, YANG Bin<sup>1</sup>(1.Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2.College of Pharmacy, Chengdu University of TCM, Chengdu 610075, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To provide simple and efficient method for the quality control of multiple components in *Scutellaria baicalensis*. METHODS: HPLC and UPLC method were established to determine the contents of baicalin, wogonoside, baicalein, wogonin and oroxylin A in *S. baicalensis*. The separation, linear relationship, precision, reproducibility, stability and recovery were compared between 2 methods. For HPLC system, Diamonsil C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column was applied with mobile phase consisted of acetonitrile-water-formic acid (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. The column temperature was 30℃, and detection wavelength was set at 280 nm. For UPLC system, Acquity BEH C<sub>18</sub>(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm) column was applied with mobile phase consisted of 0.1% formic acid- acetonitrile (gradient elution) at the flow rate of 0.4 ml/min. The column temperature was set at 40℃, and detection wavelength was set 280 nm. RESULTS: Both methods had good linear relationship in sample size and peak area ( $r \geq 0.9995$ ); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 4%; average recovery was higher than 96% (RSD<5%,  $n=6$ ). CONCLUSIONS: Compared with HPLC method, UPLC method is faster and more sensitive and costs less solvents, and can be used for the quality control of various components in *S. baicalensis* simultaneously.

**KEYWORDS** *Scutellaria baicalensis*; Flavonoids; Content determination; HPLC; UPLC

[3] 曾祖平,何薇,崔立山.高效液相法测定枳实中黄酮类成分[J].中国实验方剂学杂志,2006,12(7):9.

[4] 王佳,周家雨,郭军伟,等.枳实中辛弗林和橙皮苷的联合提取工艺研究[J].天然产物研究与开发,2009,21(6):1057.

[5] 黄爱华,曾元儿,迟玉广,等.正交试验优选枳实中新橙皮

苷的提取工艺[J].中药新药与临床药理,2009,20(6):580.

[6] 彭友元,叶建农.毛细管电泳电化学检测法测定中药枳实和枳壳中的辛弗林和3种黄酮[J].分析测试学报,2007,26(5):694.

[7] 贾强,白杨,马燕,等.枳壳和枳实化学成分的HPLC-ESI-MS分析[J].中草药,2005,36(2):169.

[8] 张永勇,倪丽,范春林,等.枳实中一个新的酚苷成分[J].中草药,2006,37(9):1295.

[9] 雷泞菲,桑世华,彭书明.槐花中芦丁的提取工艺研究[J].时珍国医国药,2008,19(4):860.

(收稿日期:2014-04-17 修回日期:2014-05-28)

△基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81202903)

\*助理研究员,博士。研究方向:中药材及其复方制剂的质量评价、元素形态分析。电话:010-64014411-2848。E-mail: lihua621@hotmail.com

#通信作者:研究员,博士研究生导师,博士。研究方向:中药材及其复方制剂质量评价、抗氧化。电话:010-64014411-2848。E-mail: ybinmm@hotmail.com