

## 枳壳总黄酮提取工艺与含量测定研究

傅善权<sup>1</sup>,郑一敏<sup>1</sup>,胥秀英<sup>1</sup>,马晓辉<sup>2</sup> (1.重庆工学院生物工程学院,重庆 400050; 2.重庆工学院生物工程学院 2002级本科,重庆 400050)

**摘要** 目的:研究枳壳总黄酮提取工艺与含量测定方法。方法:采用正交实验,筛选枳壳总黄酮最佳提取工艺条件,用紫外分光光度法测定总黄酮的含量。结果:枳壳总黄酮的最佳提取条件为:在温度 70 ℃,pH3.0 条件下,加 15 倍的 Ca(OH)<sub>2</sub> 饱和溶液,浸提 2 h/次,提取 3 次,以柚皮苷为对照测定总黄酮含量,柚皮苷线性范围为 2.592~41.472 μg/mL,  $r=0.9999$ 。结论:所建方法快速、简便,可用于枳壳药材质量控制。

**关键词** 枳壳;总黄酮;提取工艺

中图分类号:R931.71 文献标识码:A 文章编号:1006-0111(2008)02-0115-03

### Extraction and content determination of total flavonoid from *Fructus Aurantii*

FU Shan-quan<sup>1</sup>, ZHENG Yi-min<sup>1</sup>, XU Xiu-ying<sup>1</sup>, MA Xiao-hui<sup>2</sup> (1. College of Bioengineer, Chongqing Institute of technology, Chongqing 400050, China; 2. Undergraduate of Grade 2002, College of Bioengineer, Chongqing Institute of technology, Chongqing 400050, China)

**ABSTRACT Objective:** To study the extraction process and content determination of total flavonoids from *Fructus Aurantii*. **Methods:** The optimum extraction conditions of total flavonoids from *Fructus Aurantii* were screened with orthogonal test and the content of total flavonoid with standard hesperidin was determined by UV spectrophotometry. **Results:** The best extraction conditions were as follow: adding 15 times amount of Ca(OH)<sub>2</sub>, pH 3.0 and at 70 ℃ for 3 times in all, 2 hours each time. The linear range of naringin was 2.592~41.472 μg/mL  $r=0.9999$ . **Conclusion:** The methods are simple, fast and can be used to control the quality of *Fructus Aurantii*.

**KEY WORDS** *Fructus Aurantii*; total flavonoid; extraction

枳壳为芸香科 (*Rutaceae*) 植物酸橙 (*Citrus aurantium* L.) 及其栽培变种的干燥未成熟果实<sup>[1]</sup>。枳壳是临床上常用的理气药之一,具有理气开胸、行滞消胀的功效,主治胸胁气滞,胀满疼痛,食积不化,痰饮内停,胃下垂,脱肛,子宫脱垂等症。枳壳中主要含有黄酮、挥发油和少量生物碱三大类成分,其中黄酮类成分又以柚皮苷、新橙皮苷和橙皮苷含量较高<sup>[2-5]</sup>,有关枳壳含量测定的文献报道较多。迄今为止,尚无枳壳总黄酮提取工艺的报道。本文对此进行了研究,现报道如下。

### 1 仪器与试剂

**1.1 仪器** 紫外分光光度仪 7530 G(上海),METTLER AE240电子天平。

**1.2 试剂** 枳壳购于重庆市中药材市场,经鉴定为枳壳 *Fructus Aurantii*;试剂除乙醇为药用外,其他均为分析纯;柚皮苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110722-200309)。

### 2 方法与结果

**2.1 照品溶液的制备** 精密称取柚皮苷对照品 0.003 24 g于 25 mL洗净烘干的容量瓶中,用 95%的乙醇溶解定容,然后依次取该溶液 0.5 mL, 1.0 mL, 2.0 mL, 4.0 mL, 6.0 mL, 8.0 mL 分别置于 25 mL洗净烘干的容量瓶中,用 95%的乙醇定容,配成一定浓度梯度的溶液,备用。

**2.2 样品溶液的制备** 称取各组样品 0.001 g分别置于 25 mL洗净烘干的容量瓶中,用 95%的乙醇溶解定容。

**2.3 测定波长的选择** 将对照品及样品溶液在 190~400 nm 进行扫描,均在 285 nm 处有最大吸收峰,故选择 285 nm 作为检测波长。

**2.4 标准曲线的确定** 将上述对照品溶液在波长 285 nm 处测定吸收值,以柚皮苷对照品浓度  $C$  为横坐标,吸光度  $A$  为纵坐标进行线性回归,得线性方程为:  $Abs = 0.02991 \times C + 0.06486$   $r=0.9999$ , 线性范围 0.002 64~0.042 24 μg/L。

### 2.5 总黄酮含量测定方法学考察

**2.5.1 稳定性试验** 取 2.2 样品溶液,分别在 0、

基金项目:重庆市教委资助项目 KJ060604。

作者简介:傅善权(1952-),男,副主任技师。Tel: (023) 68662335, E-mail: fsq@cqit.edu.com。

5、10、15、30、45、60 min测定吸光度,其吸收值分别为:0.782、0.783、0.790、0.794、0.795,计算吸光度相对标准偏差  $RSD = 0.78\%$ ,表明样品在室温下 60 min内稳定。

**2.5.2 精密度试验** 任取 2.1对照品溶液,连续测量 5次,其吸收值分别为:0.593、0.592、0.590、0.594,计算吸光度相对标准偏差  $RSD = 0.24\%$ ,表明仪器精密度好。

**2.5.3 重现性试验** 取同一批样品,按 2.2样品溶液制备方法制备 5份,经含量(%)测定分别为:8.49、8.57、8.43、8.70、8.39,计算平均含量  $RSD = 1.45\%$ ,表明该方法重现性好。

**2.5.4 加样回收率试验** 称取枳壳细粉一定量,按对照品与样品量为 1:1量加入对照品,按 2.2样品溶液制备方法制备 5份供试液,测定,计算回收率为 98.8%, ( $n=5$ ),  $RSD$  为 0.46%见表 1。

表 1 回收率实验测定结果

编号	样品量 ( $\mu\text{g}$ )	加入量 ( $\mu\text{g}$ )	测定量 ( $\mu\text{g}$ )	回收率 (%)	平均回收率 (%)	$RSD$ (%)
1	9.36	9.69	19.236	99.13		
2	9.72	9.69	19.232	98.16		
3	9.80	9.69	19.366	98.72	98.8	0.46
4	9.84	9.69	19.461	99.29		
5	9.92	9.69	19.512	98.99		

## 2.6 枳壳总黄酮提取工艺研究

**2.6.1 正交试验设计<sup>[6]</sup>** 取枳壳药材 10 g 27份,以料液比、浸提温度、浸提时间及 pH 作为影响因素,采用  $L_9(3^4)$  正交表(表 2)进行实验,加入不同体积的饱和氢氧化钙溶液浸提 3次(平行实验 3次),将 3次提取液合并滤过后,将滤液通过预先处理好的大孔吸附树脂柱,吸附完毕后,用 85%的乙醇溶液 40 mL 洗脱,洗脱液减压干燥得提取物,称重,测定含量,结果见表 3。

表 2 正交试验表

编号	料液比(A)	温度(B)	时间 h(C)	pH(D)
1	1 8	50	1	3.0
2	1 10	60	2	4.0
3	1 15	70	3	5.0

**2.6.2 结果分析** 对上述结果进行方差分析  $F_B$ ,  $F_C$ ,  $F_D$  均小于  $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$ (见表 4),所以在水平 0.05下,温度、时间、pH 值对提取效果没有显著影响,再结合表 2的极差值 R 可以得出,4种因素的优化组合为,即 15倍料液比、70、2 h和 pH = 3

时用饱和氢氧化钙提取枳壳黄酮的效果最好。

表 3 正交试验结果

编号	料液比 (A)	温度 (B)	时间 h (C)	pH (D)	含量 (%)
1	1	1	1	1	6.04
2	1	2	2	2	5.95
3	1	3	3	3	7.65
4	2	1	2	3	8.12
5	2	2	3	1	7.21
6	2	3	1	2	6.65
7	3	1	3	2	6.14
8	3	2	1	3	6.83
9	3	3	2	1	9.69
K1	6.55	6.77	6.51	7.65	
K2	7.33	6.66	7.92	6.25	
K3	7.55	8.00	7.00	7.53	
R	1.00	1.34	1.41	1.40	

表 4 方差分析

方差来源	平方和 S	自由度 f	均方 S/f	F
B	3.30136	2	1.65068	1.97313
C	3.08729	2	1.54365	1.84519
D	3.62836	2	1.81418	2.16857
误差	1.67316	2	0.83658	

**2.6.3 方法验证实验** 称取 3份不同批号枳壳 100 g,按照所优化的最佳提取条件浸提 3次,对该方法进行验证,结果(表 5)与表 2中结果接近,说明该制备工艺稳定可行。

表 5 样品含量测定结果

批号	含量 (%)
060509	8.04
060525	7.72
060529	8.41

## 3 讨论

目前对黄酮类化合物的提取,仍以溶剂提取、热水提取等传统方法占主导地位,但上述方法能量消耗大,提取温度高,时间长,不利于黄酮类化合物母核活性的保护,产品中黄酮类化合物得率和含量低,尤其是存在溶剂残留等<sup>[5]</sup>。

本文采用饱和氢氧化钙提取枳壳总黄酮,比传统的乙醇提取成本低,操作简便,适用于工业化生产,得到的总黄酮含量高。

(下转第 119页)

表 3 克糖特 号对链脲霉素致糖尿病小鼠 UA、Cr和 Alb的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量	UA ( $\mu\text{mol/L}$ )	Cr( $\mu\text{mol/L}$ )	Alb (g/L)
正常对照组	-	108.95 $\pm$ 23.77 <sup>4)</sup>	163.53 $\pm$ 38.92 <sup>4)</sup>	29.81 $\pm$ 4.37 <sup>4)</sup>
模型组	-	228.09 $\pm$ 37.75	287.06 $\pm$ 39.83 <sup>2)</sup>	24.21 $\pm$ 3.03 <sup>2)</sup>
格列本脲组	50 mg/kg	108.72 $\pm$ 23.17 <sup>4)</sup>	200.05 $\pm$ 29.52 <sup>1) 4)</sup>	27.81 $\pm$ 3.37 <sup>3)</sup>
克糖特 号高组	25 g/kg	150.07 $\pm$ 22.98 <sup>2) 4)</sup>	224.66 $\pm$ 46.08 <sup>2) 4)</sup>	28.93 $\pm$ 4.67 <sup>3)</sup>
克糖特 号中组	12.5 g/kg	118.62 $\pm$ 39.12 <sup>4)</sup>	225.24 $\pm$ 42.42 <sup>2) 4)</sup>	27.67 $\pm$ 3.40 <sup>3)</sup>
克糖特 号低组	6.25 g/kg	110.16 $\pm$ 13.59 <sup>4)</sup>	207.00 $\pm$ 22.69 <sup>1) 4)</sup>	27.51 $\pm$ 3.62 <sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 与正常对照组比较; <sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ ,与模型组比较。

### 3 讨论

目前所知,糖尿病的发生与胰岛组织细胞功能障碍,尤其是胰岛  $\beta$  细胞的功能不足有很大关系<sup>[6]</sup>。胰岛素是胰岛  $\beta$  细胞分泌的体内唯一负性调整的激素,是维持血糖稳态最重要的因素。实验结果表明,STZ对小鼠的胰岛  $\beta$  细胞高选择性的破坏后,给药 15天后克糖特 号对 STZ所致的小鼠高血糖有明显的抑制作用,其作用有一定时效性,同时血清胰岛素水平与模型组相比明显升高,且有量效依赖关系,从而提示克糖特 号能够促进胰岛素的生成、分泌和释放,说明调节性地促进胰岛素分泌是克糖特 号主要的降糖机理之一。

Cr是由肾脏排泄的代谢产物,如果代谢旺盛或肾功能受损均会导致 Cr排出减少,血中浓度增高。糖尿病由于胰岛素缺乏导致糖、脂代谢紊乱,受高血糖、高血脂等因素的影响,可致尿蛋白排出量增加<sup>[7]</sup>,使血浆白蛋白减少。据葛惠男等<sup>[8]</sup>的回顾性调查,提示血清白蛋白 (Alb)可能作为一个条件因素或合并因素与高血糖呈等级负相关,Alb的下降可能是糖尿病及其并发症发生和发展相关的危险因素之一。英国前瞻性糖尿病研究显示严格控制血糖可显著降低发生糖尿病肾病的危险性<sup>[9]</sup>。克糖特 号在抑制血糖升高同时降低 DM小鼠血清 Cr,并减少血清白蛋白的丢失,提示克糖特 号对 STZ诱导的糖尿病小鼠肾脏有一定保护作用,对 DN的治疗有一定参考价值,其作用机制有待进一步研究。

尿酸是嘌呤代谢的终末产物,因此尿酸测定可反映嘌呤代谢情况。糖尿病分解代谢较强,嘌呤代谢旺盛,导致血尿酸增加;而尿酸血症是冠心病和脑梗塞的相关危险因素,因此,克糖特 号能显著降低血尿酸水平,对预防糖尿病并发心脑血管疾病有重要意义。

### 参考文献:

- [1] 林善琰. 糖尿病肾病研究的几个关键 [J]. 中华肾脏病杂志, 2000, 16(2): 69.
- [2] 苏俊,田慧. 老年糖尿病患者死亡分析 [J]. 中国慢性病预防与控制. 2005, 01: 45.
- [3] 赵爱农,罗红. 魔芋葡甘聚糖降血糖作用的实验研究 [J]. 中华实用中西医杂志 2005, 18(13): 241.
- [4] 王庭欣,赵文,秦淑贞,等. 糖可舒片对糖尿病小鼠血糖的调节作用 [J]. 毒理学杂志, 2003(19): 78.
- [5] 张均田. 药理实验方法 (上) [M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 2000: 981.
- [6] 杨钢. 内分泌生理与病理生理学 [M]. 天津:天津科学技术出版社, 1996: 416.
- [7] 夏雪培,欧小红,陈芳. 2型糖尿病不同水平白蛋白尿与血脂并发症关系的研究 [J]. 辽宁实用糖尿病杂志. 2004, 12(3): 33.
- [8] 葛惠男,江国荣,徐德颐. 血清白蛋白水平与高血糖的相关性研究 [J]. 苏州大学学报 (医学版), 2003, 23(6): 699.
- [9] U K Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33) [J]. Lancet, 1998, 352.

收稿日期: 2007-03-06

(上接第 116页)

该文中采用柚皮苷为指标成分测定总黄酮的含量,方法稳定重复性好,可作为枳壳药材的质控方法。

### 参考文献:

- [1] 肖培根主编. 新编中药志第 2卷 [M]. 化学工业出版社,北京, 2001, 443~447.
- [2] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典 [M]. 化学工业出版社, 2005, 171.
- [3] 林启寿. 中草药成分化学. 科学出版社 [M], 1977: 311.
- [4] 杨书斌,王琦,张典瑞,等. 薄层层析-分光光度法测定枳壳中的橙皮苷和柚苷 [J]. 中国中药杂志 1994, 19(6): 359.
- [5] 陈磊,康鲁平,秦路平等. 中药枳壳的质量标准研究概况 [J]. 时珍国医国药, 2005, 16(2): 106.
- [6] 贾东英,姚开,谭敏,等. 柚皮中柚皮苷的乙醇提取工艺研究. 中草药, 2002, 33(9): 801.
- [7] 盛骤,谢式千,潘承毅. 概率论与数理统计 [M]. 高等教育出版社, 2001.
- [8] 梁宝英. 紫外分光光度法测定枳壳中柚皮苷含量 [J]. 中华综合临床医学杂志, 2004, 6(3): 63.

收稿日期: 2007-04-02