

枳壳挥发油提取工艺优选及其化学成分 GC-MS 分析

张金莲^{1,2}, 刘明贵¹, 钟凌云^{1*}, 颜冬梅¹, 龚千锋¹, 谢日健¹, 祝婧¹, 刘艳菊^{2*}, 李娜¹

(1. 江西中医药大学, 南昌 330004; 2. 湖北中医药大学, 武汉 430065)

[摘要] 目的: 优选水蒸气蒸馏法提取枳壳挥发油的工艺, 分析粉碎度对枳壳挥发油化学成分的影响。方法: 采用正交试验确定水蒸气蒸馏法提取枳壳挥发油的工艺条件, 以挥发油提取率为评价指标, 粉碎度、加水量、浸泡时间、提取时间为考察因素。采用 GC-MS 对枳壳粉碎度为 24 目和 50 目所提取的挥发油进行化学成分鉴定。结果: 最佳水蒸气蒸馏法工艺条件为枳壳粉碎度 24 目, 加 11 倍量水浸泡 0.5 h, 提取 7 h。从 24 目枳壳粉末挥发油中鉴定出 45 个组分, 50 目中鉴定出 39 个组分, 分别占其挥发油总量的 99.46% 和 99.53%。结论: 优化的提取工艺重复性好、挥发油提取率较高且成分种类多, 适用于枳壳挥发油的提取。

[关键词] 枳壳; 挥发油; 提取工艺; 水蒸气蒸馏法; 粉碎度; *D*-柠檬烯

[中图分类号] R283.6; R284.1; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)19-0027-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016190027

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160804.1038.006.html>

[网络出版时间] 2016-08-04 10:38

Optimization of Extraction Process of Volatile Oil from Aurantii Fructus and GC-MS Analysis of Its Chemical Constituents

ZHANG Jin-lian^{1,2}, LIU Ming-gui¹, ZHONG Ling-yun^{1*}, YAN Dong-mei¹,
GONG Qian-feng¹, XIE Ri-jian¹, ZHU Jing¹, LIU Yan-ju^{2*}, LI Na¹

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

2. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of volatile oil from Aurantii Fructus, and analyze difference of chemical constituents in volatile oil from Aurantii Fructus with grinding degree of 24 mesh and 50 mesh. **Method:** Volatile oil from Aurantii Fructus was extracted by steam distillation, orthogonal test was adopted to optimize process of volatile oil. GC-MS was employed to compare similarities and differences between volatile oil from Aurantii Fructus with grinding degree of 24 mesh and 50 mesh. **Result:** Optimum extraction conditions of steam distillation were as follows: the comminution degree of 24 mesh, soaked 0.5 h and extracted 7 h with 11 times the amount of water. Forty-five components in volatile oil from Aurantii Fructus with grinding degree of 24 mesh were identified, there were 39 components for 50 mesh, accounting for 99.46% and 99.53% of total content of volatile oil, respectively. **Conclusion:** This optimized process is stable and feasible with high extraction rate of volatile oil.

[Key words] Aurantii Fructus; volatile oil; extraction technology; steam distillation; grinding degree; *D*-limonene

[收稿日期] 20160511(011)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81560651); 国家中医药管理局公益性科研专项(201507002-2)

[第一作者] 张金莲, 教授, 从事中药学教学与研究工作, Tel: 0791-87118995, E-mail: jxjzjl@163.com

[通讯作者] * 钟凌云, 教授, 从事中药炮制学研究, Tel: 0791-87118995, E-mail: ly1638163@163.com;

* 刘艳菊, 教授, 从事中药炮制学研究, Tel: 027-68890231, E-mail: lyj1965954@sohu.com

枳壳具有理气宽中、行滞消胀的作用,为中医临床常用药^[1]。其主要化学成分有挥发油、黄酮类和生物碱类等。挥发油为枳壳的主要药效部位之一,具有理气、行滞、镇咳、祛痰、抑菌等作用^[2]。该有效部位的提取方式有水蒸气蒸馏法、有机溶剂提取法、超临界流体萃取法等^[3],其中水蒸气蒸馏法为常用提取方法,也是 2015 年版《中国药典》收录的挥发油提取方法。目前对枳壳挥发油的化学成分研究较多,但关于粉碎度对枳壳挥发油得率及其化学成分影响的研究尚未见报道^[4-8]。本实验拟对水蒸气蒸馏法提取工艺进行优化,并对不同粉碎度枳壳粉末的挥发油化学成分进行 GC-MS 分析,以阐明粉碎度对枳壳挥发油成分的影响,为该有效部位的研究与开发提供参考。

1 材料

7890A-5975 型气质联用仪(美国安捷伦科技公司),SQP 型电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司],DFY-400 型摇摆式高速中药粉碎机(温岭市大机械有限公司)。枳壳(购自江西省樟树市,经江西中医药大学中药资源学科组赖学文教授鉴定为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* 及其栽培变种的干燥未成熟果实),水为双蒸水,试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 枳壳挥发油提取工艺优选^[8-11] 采用水蒸气蒸馏法。选择枳壳粉碎度、加水量、浸泡时间、提取时间为考察因素,以挥发油提取率为指标,参照《中国药典》2015 年版四部通则 2204 挥发油测定甲法^[1]测定。精密称取不同粉碎度的枳壳粉末各 50 g,置于 1 L 圆底烧瓶中,加入一定量水和数粒玻璃珠,用玻璃棒搅匀,放于电热套中,浸泡一定时间,连接好挥发油测定装置。自冷凝管的上端加入水,使挥发油测定管中有刻度的部分充满水,并溢流入圆底烧瓶为止。缓缓加热至沸,并保持微沸至规定时间,停止加热,放置片刻,开启提取器下端的活塞缓缓将水放出,至油层上端到达“0”刻度线上面 5 mm 处为止。静置 >1 h,开启活塞使油层下降至上端恰与“0”刻度线平齐,读取挥发油体积,计算挥发油得率。试验安排及结果见表 1,方差分析见表 2。

由直观分析可知,各因素对挥发油提取率的影响顺序为 $A > B > D > C$ 。以极差最小的 C 因素为误差项进行方差分析,结果表明 A 因素对挥发油提取率有极显著影响,因素 B, D 则无显著性影响。故确定水蒸气蒸馏法提取枳壳挥发油的最佳提取工艺组合 $A_2B_2C_2D_3$,即粉碎度 24 目,加水量 11 倍,浸泡时

表 1 枳壳挥发油提取工艺正交试验分析

Table 1 Orthogonal test analysis of extraction process of volatile oil from *Aurantii Fructus*

No.	A 粉碎度 /目	B 加水量 /倍	C 浸泡时间/h	D 提取时间/h	挥发油提取率/%
1	10	9	0	3	0.83
2	10	11	0.5	5	1.02
3	10	13	1.0	7	0.96
4	24	9	1.0	5	2.53
5	24	11	0	7	2.95
6	24	13	0.5	3	2.84
7	50	9	0.5	7	1.24
8	50	11	1.0	3	1.37
9	50	13	0	5	1.30

表 2 挥发油提取率方差分析

Table 2 Variance analysis of extracting amount of volatile oil

方差来源	SS	MS	F	P
A	5.669	2.834	479.494	<0.01
B	0.095	0.048	8.038	>0.05
D	0.015	0.008	1.299	>0.05
C(误差)	0.012	0.006		

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19$, $F_{0.01}(2, 2) = 99$ 。

间 0.5 h,提取时间 7 h。

2.2 验证试验 2015 年版《中国药典》中仅规定粉碎度为过二号至三号筛,为保证提取工艺的重复性和可行性,对优选的工艺 $A_2B_2C_2D_3$ 进行验证试验,另对提取工艺 $A_3B_2C_2D_3$ (粉碎度 50 目,加水量 11 倍,浸泡时间 0.5 h,提取时间 7 h)时挥发油的提取率进行考察,结果挥发油提取率分别为 2.96%, 1.36%, RSD 分别为 1.1%, 1.4%。说明优选的工艺稳定可行、重复性良好。

2.3 GC-MS 分析

2.3.1 样品溶液的制备 取枳壳粉碎度为 24 目和 50 目时所得挥发油,用无水硫酸钠干燥,加适量乙醚配成 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 样品溶液,经 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,经 NIST MS Search 2.0 质谱计算机数据库系统检索及 CAS 号查询,结合文献分析,同时采用面积归一化法测定样品中各组分相对质量分数^[12]。

2.3.2 气相色谱条件 HP-5 石英毛细管色谱柱 ($0.32 \text{ mm} \times 30 \text{ m}$, $\phi. 25 \mu\text{m}$),进样口温度 $260 \text{ }^\circ\text{C}$,传输线温度 $250 \text{ }^\circ\text{C}$,载气为氦气,流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,分流比 10:1,进样量 $1 \mu\text{L}$,程序升温(柱温 $70 \text{ }^\circ\text{C}$,以 $2 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升至 $150 \text{ }^\circ\text{C}$,以 $6 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升至 $240 \text{ }^\circ\text{C}$,

保持 1 min,以 25 °C·min⁻¹升至 300 °C^[13]。

2.3.3 质谱条件 电离方式为电子轰击电离源 (EI),电子轰击 70 eV,离子源温度 230 °C,加速电压 34.6 V,分辨率 2 500,倍增器电压 1.388 kV,四极杆温度 150 °C, *m/z* 10 ~ 650,扫描数 4.45 次/s^[13]。粉碎度 24 目和 50 目的枳壳粉末所提挥发油经 GC-MS 分离,并经过检索分析,见图 1 和表 3。

由表 3 可知,粉碎度为 24 目和 50 目枳壳粉末所提取挥发油共鉴定出了 55 个成分,其中粉碎度为 24 目的粉末所提取的挥发油鉴定出 45 个成分,占其挥发油总量的 99.46%,而粉碎度为 50 目的粉末所提挥发油鉴定出了 39 个成分,占挥发油总量的 99.53%。两者共有成分 29 个,其中主要的有 2-甲基-5-(1-甲基乙基)-双环[3.1.0]-2-己烯,α-蒎烯,β-水芹烯,β-蒎烯,辛醛,α-水芹烯,α-蒈品烯,邻异丙基甲苯, *D*-柠檬烯,β-罗勒烯,γ-蒈品烯,异松油

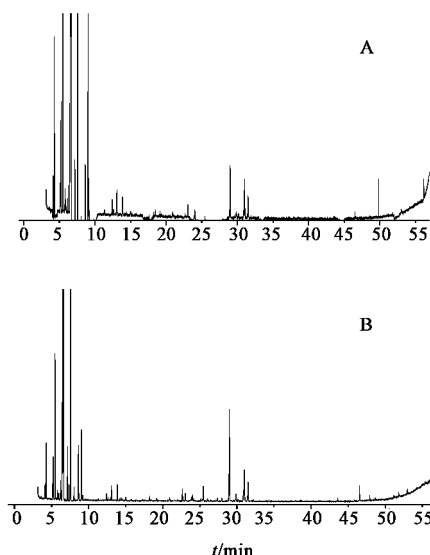


图1 粉碎度 24 目(A)和 50 目(B)枳壳样品中挥发油的总离子流
Fig. 1 Total ion chromatograms of volatile oil from Aurantii Fructus with grinding degree of 24 mesh (A) and 50 mesh (B)

表3 粉碎度对枳壳挥发油化学成分的影响

Table 3 Effect of grinding degree on chemical constituents in volatile oil from Aurantii Fructus

No.	<i>t_R</i> /min	化合物		相对质量分数/%	
		英文名	中文名	24 目	50 目
1	3.154	ethylbenzene	乙苯	0.09	0.07
2	4.148	bicyclo [3.1.0] hex-2-ene, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-	2-甲基-5-(1-甲基乙基)-双环[3.1.0]-2-己烯	0.23	0.17
3	4.303	α-pinene	α-蒎烯	1.05	0.62
4	4.819	carbonic acid, dimethyl ester	碳酸二甲酯	0.07	
5	4.860	heptanedioic acid, dimethyl ester	庚二酸二甲酯	0.06	
6	5.135	β-phellandrene	β-水芹烯	0.32	0.19
7	5.239	β-pinene	β-蒎烯	0.78	0.49
8	5.497	bicyclo [3.1.1] heptane, 6,6-dimethyl-2-methylene-(1S)-	(1S)-6,6-二甲基-2-亚甲基二环[3.1.1]庚烷		1.57
9	5.500	β-myrcene	β-月桂烯	2.11	
10	5.801	octanal	辛醛	0.30	0.12
11	5.915	α-phellandrene	α-水芹烯	0.27	0.10
12	6.250	1,3-cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-	α-蒈品烯	0.40	0.24
13	6.481	o-cymene	邻异丙基甲苯	0.85	1.33
14	6.629	<i>D</i> -limonene	<i>D</i> -柠檬烯	79.64	75.89
15	7.184	β-ocimene	β-罗勒烯	0.38	0.59
16	7.572	γ-terpinene	γ-蒈品烯	7.35	10.89
17	8.049	<i>cis</i> -linaloloxide	顺式氧化芳樟醇		0.16
18	8.059	<i>trans</i> -linalool oxide (furanoid)	反-氧化芳樟醇(呋喃型)	0.07	
19	8.643	cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)-	异松油烯	0.40	0.70
20	9.046	1,6-octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-	3,7-二甲基-1,6-辛二烯-3-醇	2.20	0.85
21	9.225	nonanal	壬醛	0.11	

续表 3

No.	t_R /min	化合物		相对质量分数 /%	
		英文名	中文名	24 目	50 目
22	10.387	1,2-benzisothiazole-3-acetic acid methyl ester	1,2-苯并异噻唑-3-醋酸甲酯	0.04	
23	11.350	cis-aconitic anhydride	顺式乌头酸酐	0.13	
24	12.443	terpinen-4-ol	松油烯-4-醇		0.11
25	12.636	naphthalene	臭樟脑	0.11	
26	13.079	(+)-4-carene	(+)-4-萜烯		0.19
27	13.084	α -terpineol	α -松油醇	0.25	0.19
28	13.879	decanal	癸醛	0.13	0.22
29	18.228	naphthalene 2-methyl-	2-甲基萘	0.09	0.08
30	18.496	thymo	麝香草酚	0.10	
31	19.130	naphthalene 1-methyl-	1-甲基萘	0.08	
32	20.941	cyclohexene 1,5,5-trimethyl-3-methylene-	1,5,5-三甲基-3-亚甲基-环己烯	0.06	
33	22.649	linalyl acetate	乙酸芳樟酯		0.22
34	23.050	α -cubebene	α -葑烯	0.15	0.14
35	24.037	carbonic acid, monoamide, N-(2-ethylphenyl)-, propyl ester	N-(2-苯乙基)-碳酸酰胺丙酯	0.08	
36	25.462	bicyclo[7.2.0]undec-4-ene 4,11,11-trimethyl-8-methylene-, [1R-(1R*, 4S, 9S*)]-	[1R-(1R*, 4S, 9S*)]-4,11,11-三甲基-8-亚甲基-二环[7.2.0]十一烯		0.27
37	28.985	1,6-cyclodecadiene, 1-methyl-5-methylene-8-(1-methylethyl)-, [S-(E, E)]-	[S-(E, E)]-1-甲基-5-亚甲基-8-(1-甲基乙基)-1,6-环癸二烯	0.56	1.58
38	29.855	1H-indole, 5-methyl-2-phenyl-	5-甲基-2-苯基吲哚	0.09	
39	29.859	cyclohexene 6-ethenyl-6-methyl-1-(1-methylethyl)-3-(1-methylethylidene)- (S)-	(S)-6-乙烯基-6-甲基-1-(1-甲基乙基)-3-(1-甲基亚乙基)-环己烯		0.10
40	30.875	cis-muurolo-3,5-diene	顺式-穆罗拉-3,5-二烯		0.20
41	31.012	butylated hydroxytoluene	丁羟甲苯	0.36	0.57
42	31.504	naphthalene 1,2,4a,5,8,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, [1S-(1 α , 4 $\alpha\beta$, 8 $\alpha\alpha$)]-	α -衣兰油烯	0.23	0.34
43	46.530	1,2-benzenedicarboxylic acid diheptyl ester	邻苯二甲酸二庚酯	0.04	0.17
44	47.911	hexadecanoic acid methyl ester	十六烷酸甲酯		0.05
45	49.832	cyclotrisiloxane hexamethyl-	六甲基环三硅氧烷	0.03	
46	51.816	osthole	甲氧基欧芹酚		0.05
47	52.987	2-ethylacridine	2-乙基吖啶	0.02	
48	56.168	phenol, 2,2'-methylenebis[6-(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-	2,2'-亚甲基双(6-叔丁基-4-甲基苯酚)	0.12	0.88
49	56.376	benzo[h]quinoline 2,4-dimethyl-	2,4-二甲基苯喹啉	0.01	0.02
50	56.416	methyltris(trimethylsilyloxy)silane	甲基三(三甲基硅氧烷基)硅烷	0.01	0.06
51	56.660	tetrasiloxane decamethyl-	十甲基四硅氧烷	0.01	0.06
52	56.996	silicic acid diethyl bis(trimethylsilyl) ester	硅酸乙酯二(三甲基硅基)酯	0.01	0.01
53	57.152	3-methoxy-2,4,5-trifluorobenzoic acid eicosyl ester	2,4,5-三氟-3-甲氧基苯甲酸	0.03	
54	57.179	tris(tert-butyl dimethylsilyloxy)arsane	3-叔丁基二甲硅氧基-砷	0.02	0.01
55	57.846	1,4-bis(trimethylsilyl)benzene	1,4-二(三甲基硅烷基)苯	0.02	0.03

烯 3,7-二甲基-4,6-辛二烯-3-醇, α -松油醇, α -萜烯油烯, 癸醛, 丁羟甲苯, α -衣兰油烯, 2,2'-亚甲基双(6-叔丁基-4-甲基苯酚) 等。

3 讨论

正交试验发现粉碎度对挥发油提取率的影响最大,粉末过24目筛时挥发油提取率2.96%远大于50目样品挥发油提取率1.36%。有文献报道枳壳挥发油提取率仅1.0%^[7],而在本文优选的工艺条件下,枳壳挥发油提取率可达2.96%。分别对粉碎度为24目和50目时的枳壳挥发油进行GC-MS分析,结果表明挥发油成分种类及相对质量分数均有差异,两者共有成分29个,粉碎度为24目样品中有16种50目样品未有的成分。不同粉碎度下挥发油的相对质量分数也发生了较大变化。*D*-柠檬烯具有祛痰、溶解胆结石及抗肿瘤等功效,是枳壳挥发油的主要药效物质^[14]; β -蒎烯具有抑菌、抗感染、抗氧化等作用; α -蒎烯具有很强的抑菌性和杀虫活性,对白色念珠菌的生物合成有显著的抑制作用^[15-16]。24目枳壳样品的挥发油提取率大,化学成分种类较多,主要药效成分的含量较高。

枳壳粉碎度对其挥发油质量的影响极显著,然而《中国药典》2015年版仅通则2204中规定挥发油提取时粉末过二号至三号筛,并未明确规定枳壳的粉碎度,为了更好地提取和利用枳壳挥发油,建议提取枳壳挥发油时选用过二号筛的粗粉。在研究过程中发现,将枳壳粉末样品置于自封袋中保存,挥发油提取率可随存放时间的延长而降低,枳壳粉碎即时挥发油提取率最大,而放置5d后,挥发油提取率<0.2%。这可能是由于枳壳挥发油油室主要散布在果皮中^[17],而粉碎后油室直接暴露,挥发油散失所致^[8]。故建议提取挥发油时应粉碎即用。

【参考文献】

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 四部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 203.
[2] 舒尊鹏, 胡书法, 翟亚东, 等. 中药枳壳化学成分及药理作用研究[J]. 科技创新与应用, 2012(13): 8-9.
[3] 施学骄. 酸橙果实不同采收期化学成分动态变化及

枳实、枳壳药材质量评价研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2012.

[4] 彭金年, 程庚金生, 张付远, 等. 炮制后安徽枳壳挥发性成分的GC-MS分析[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(34): 12071-12072.
[5] 陈希华, 张建康, 黄检平, 等. 枳壳研究进展[J]. 今日药学, 2015, 25(3): 229-231.
[6] 邢娜, 舒尊鹏, 徐炳清, 等. 不同产地枳壳挥发油成分的气相色谱-质谱分析及抗肿瘤活性研究[J]. 中医药信息, 2015, 32(5): 1-6.
[7] 廖凤霞, 辛龙涛, 陈华, 等. 中药枳实与枳壳挥发油成分对比分析[J]. 重庆大学学报: 自然科学版, 2004, 27(5): 38-40.
[8] 师白梅, 严建业, 王元清, 等. 当归、枳壳挥发油的提取与包合工艺研究[J]. 中南药学, 2012, 10(6): 401-405.
[9] 李洪, 杨梅. 枳壳的粉碎工艺优选[J]. 湖北中医杂志, 2014, 36(8): 69-70.
[10] 张金莲, 谢一辉, 何敏, 等. 多指标正交法优选樟帮枳壳饮片炮制工艺[J]. 中成药, 2011, 33(2): 287-290.
[11] 宁希鲜, 陈泣, 于欢, 等. 正交试验法优选蜜糠炒枳壳炮制工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(23): 28-31.
[12] 李正红, 夏放高, 陈海芳, 等. 枳壳麸炒前、后主要活性成分的含量变化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(19): 18-21.
[13] 于欢, 宁希鲜, 陈泣, 等. 江枳壳炮制品挥发油的GC-MS分析[J]. 中成药, 2015, 37(3): 592-598.
[14] 陈祥胜, 容艳芬, 刘苗苗, 等. 苍术麸炒前后的专属性HPLC特征指纹图谱[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(19): 23-26.
[15] 王慧, 马玲, 孟庆坤, 等. α -蒎烯对黄粉虫体内3种保护酶活性的影响[J]. 安徽农业科学, 2015, 25(18): 125-127.
[16] 夏忠弟, 余俊龙. α -蒎烯对白色念珠菌生物合成的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2000, 10(1): 44-46.
[17] 康廷国. 中药鉴定学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 327-329.

[责任编辑 刘德文]