

文章编号:1673-1689(2008)06-0014-04

个青皮中辛弗林两种提取分离方法的比较研究

沈莲清, 张超

(浙江工商大学食品与生物工程学院, 浙江 杭州 310035)

摘要:建立了一种从个青皮中提取纯化辛弗林的优化方法。对同一批个青皮细粉,分别采用乙醇回流提取, D101型大孔吸附树脂柱吸附,不同体积分数的乙醇溶液洗脱;以及应用稀盐酸提取, 001x8型强酸性阳离子树脂柱分离,不同质量分数的氨水溶液洗脱。然后对各洗脱液进行TLC显色和HPLC检测,计算得辛弗林的纯度。结果表明,质量分数4%的氨水洗脱和001x8型强酸性阳离子树脂柱效果最好,辛弗林纯度达到45.34%。

关键词:个青皮;辛弗林;提取;分离

中图分类号:TS 201.1; Q 946.88

文献标识码:A

Study on Comparision of Two Methods for the Extraction and Speration of Synephrine from *Fructus Citri Immaturus*

SHEN Lian-qing, ZHANG Chao

(College of Food and Biotechnology Engineering, Zhengjiang Gongshang University, Hangzhou 310035, China)

Abstract: This manuscript was to establish a suitable/optimum method for the extraction and purification of synephrine from *Fructus Citri Immaturus*. The powder of *Citrus aurantii* was seperately extrated by ethanol and purified by D101 type B. H adsorptive resine, and extrated by hydrochloric acid and then purified by Cation-exchange resine 001x8. All the obtained washing liquor were determined by TLC(thin layer chromatograghy) and RP-HPLC(reversed-phase high performance liquid chromatograghy), the content of syneghrine in the product can be worked out finally. The highest content of syneghrine were obtained seperately with 15% alcohol content by D101 type B. H adsorptive resine and 4% ammonia content by Cation-exchange resine 001 8. Moreover, the content of syneghrine in the latter is increase to 45.34%, much higher than that of the former.

Key words: *Fructus Citri Immaturus*; synephrine; extraction; separation

青皮为芸香科植物橘(*Citrus reticulata* Blanco)及其栽培变种的干燥幼果或未成熟果实果皮。一般为每年5-6月收集自落的橘的幼果,晒干,习称“个青皮”(*Fructus Citri Immaturus*),主产于福

建、江西、四川、湖南、浙江、广西、广东。个青皮是一种临床应用广泛、安全有效的药物,有疏肝破气,散结消痰的功效,主治胸肋胃脘疼痛、疝气、食积、乳肿、乳核、久疔癰块等病症,可煎汤或入丸、散^[1]。

收稿日期:2008-05-23.

基金项目:浙江省科技计划项目(2006C1204Q).

作者简介:沈莲清(1946-),女,江苏苏州人,教授,博士生导师,主要从事食品科学的研究. Email:chaos2008@163.com

辛弗林是个青皮中起药理作用的主要有效成分。它能有效收缩血管,升高血压,临床上已经用作抗休克药物;辛弗林为肾上腺素-受体兴奋剂,在麻黄被禁用后,其倍加引起人们的关注;辛弗林还具有提高新陈代谢、增加热量消耗的作用,已用于减肥等保健品中^[2-4]。目前辛弗林多从枳实中提取得到,以个青皮为原料提取分离辛弗林的报道极少。为了得到辛弗林含量较高的个青皮提取物,笔者采取两种方法对个青皮中的辛弗林进行了提取分离,并比较了二者的效果。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

岛津公司高效液相色谱仪(由 LC-20AT 泵, SPD-20A 紫外检测器,岛津 ODS 柱(RP-18,5 μm , 250 mm \times 4.6、柱温箱组成));上海精科天平制造厂 FA1004 型电子分析天平;上海申胜仪器厂 LOOYE ZX98-1 型旋转蒸发器;上海豫康科教仪器设备有限公司低温冷却液循环泵;青岛海洋化工厂硅胶 GF-254TLC 板(10 cm \times 20 cm,厚 0.20~0.25 mm);玻璃柱(50 \times 1 cm)。

个青皮由中日合资浙江惠松制药有限公司提供(批号:010703;产地:湖南);辛弗林对照品购自 SIGMA 公司;D101 型大孔吸附树脂,001x8 型强酸性阳离子树脂,均由上海华羚树脂有限公司生产;色谱级甲醇;其余试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 D101 型大孔吸附树脂的预处理 体积分数 95%乙醇浸泡过夜,湿法装柱,蒸馏水冲洗至流出液无醇味。用 3 倍体积的体积分数 3%盐酸冲洗,蒸馏水冲洗至 pH 值为中性,再用 3 倍体积的质量分数 4%氢氧化钠溶液冲洗,蒸馏水冲至 pH 值为中性,备用^[5-6]。

1.2.2 001x8 型强酸性阳离子树脂的预处理 先用质量分数 10%氯化钠溶液浸泡 2 h,装柱,蒸馏水反洗至流出的水澄清为止,然后用 2 倍柱体积的 50 g/L 氢氧化钠溶液冲洗,用蒸馏水洗至 pH 值为中性,再用 4 倍体积的体积分数 5%盐酸溶液冲洗,最后再用蒸馏水洗至 pH 值为中性,备用^[7]。

1.2.3 辛弗林的提取分离 将个青皮粉碎,过 60 目筛。取 10 g 细粉,用体积分数 90%的乙醇于 90 $^{\circ}\text{C}$ 下按料液质量比 1:15 和 1:10 各提取一次,每次 2 h。旋转蒸发浓缩至约 10 mL,加 70 mL 水溶解。取 27 mL 溶液上样于等体积的 D101 型大孔树脂柱,分别用 3 倍体积的水,体积分数 15%、

30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%的乙醇洗脱,分别收集,进行 TLC 检测。对含有辛弗林的洗脱液蒸干,加 5 mL 甲醇溶解,取 1.5 mL 于离心管中,4 000 r/min 离心 10 min,取上清液,HPLC 法测含量。

取个青皮细粉 10 g 于 25 mL 蒸馏水中浸润 12 h,用 50 mL 0.2 mol/L 的盐酸溶液于 95 $^{\circ}\text{C}$ 下提取 2 次,每次 1 h。抽滤,合并滤液。将上述滤液均分为 3 份,浓缩,分别进样于 30 mL 001x8 型阳离子树脂柱,分别用质量分数 3%、4%、5%的氨水洗脱,分别收集,进行 TLC 显色。将含有辛弗林的洗脱液蒸干,加 5 mL 甲醇溶解,取 1.5 mL 于离心管中,4 000 r/min 离心 10 min,取上清液,HPLC 法测含量^[8]。

1.3 分析方法

1.3.1 定性检测——TLC 法 将辛弗林对照品溶液及各洗脱液用毛细管点样于硅胶板上,展开剂为丁醇-乙酸-水(体积比 7:3:3),上行展开,待硅胶板干燥后,喷涂质量分数 1%茛三酮酒精溶液,于 105 $^{\circ}\text{C}$ 高温显色。以辛弗林的展开特征点为标准,对比各洗脱液中是否含有辛弗林。

1.3.2 定量检测——RP-HPLC 法 HPLC 条件:流动相为甲醇-水(体积比 75:25,内含质量分数 0.1% 十二烷基硫酸钠、体积分数 0.1%磷酸),体积流量 0.8 mL/min,检测波长 224 nm,室温^[9-10]。此条件下辛弗林的谱图如图 1 所示。

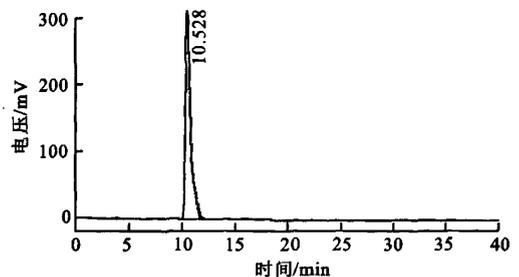


图 1 辛弗林对照品 RP-HPLC 图谱

Fig. 1 RP-HPLC chromatogram of synephrine standard

精确称量 10 mg 辛弗林于 10 mL 容量瓶中,加甲醇定容,得 1.0 mg/mL 的辛弗林对照品溶液。精密移取上述 1.0 mg/mL 的辛弗林对照品溶液 1.0 mL 于 10 mL 容量瓶中,加甲醇定容,得 0.2 mg/mL 的辛弗林对照品溶液。分别吸取 0.2 mg/mL 的辛弗林标准溶液 2、4、6、8、10 μL 以及 1.0 mg/mL 的辛弗林标准品溶液 4、8、12、16、20 μL ,按 1.3.2 项下方法进行 HPLC 测定,记录峰面积积分值。以辛弗林进样量为横坐标,峰面积积分值为纵坐标作图,见图 2。

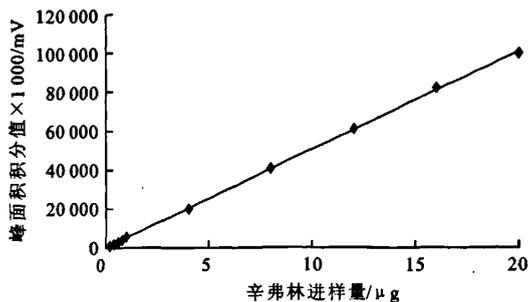


图2 辛弗林标准曲线

Fig. 2 Calibration curve of synephrine

得标准曲线的线性方程为 $y = 5.0 \times 10^6 x + 103\ 624$, $R^2 = 0.999\ 7$ 。

1.4 原料液的制备

准确称取个青皮细粉 1.0 g 于 25 mL 容量瓶中,加入甲醇约 20 mL,超声 30 min,冷却静置,用甲醇定容至刻度,摇匀,即得原料液。

1.5 辛弗林纯度的计算

将各洗脱液进行 HPLC 检测得到的峰面积积分值代入上面的标准曲线,即得 15 μ L 进样液中辛弗林的质量 M_H ,计算得到各洗脱液蒸干产品中辛弗林的纯度。

$$\text{辛弗林纯度} = \frac{M_H \times \frac{V_s}{V_H}}{M_s} \times 100\%$$

式中: M_H 为进样液中辛弗林的质量, V_H 为进样液的体积, V_s 所测洗脱液的体积, M_s 为蒸干所得样品的质量。

1.6 辛弗林提取率的计算

$$\text{辛弗林提取率} = \frac{M_1}{M} \times 100\%$$

式中: M_1 为所得样品中辛弗林的质量, M 为原料中辛弗林的质量。

2 结果与分析

2.1 D101 型大孔树脂乙醇洗脱液体积分数的选择

按 1.3.1 项下方法对各乙醇洗脱液进行 TLC 显色,发现体积分数 15%、30% 的乙醇洗脱液中辛弗林浓度较高,而其余的洗脱液的薄板上几乎看不到辛弗林的特征点,因此只将体积分数 15%、30% 的乙醇洗脱液按 1.3.2 项下方法进行 HPLC 检测,并计算得到样品中辛弗林纯度,结果见表 1。

已有报道的天然植物中总生物碱都是在较高体积分数(50%~80%)的乙醇洗脱液中解吸下来,而辛弗林也是一种生物碱,但本实验却发现体积分数 15% 的乙醇对其具有最好的解吸效果。这是因

为辛弗林的相对分子质量小,并且极性较大,所以易溶解在极性较大的低体积分数的乙醇洗脱液中。也有报道中讲到水洗脱液中含有辛弗林,但本实验中研究发现,水洗脱浓缩液的 TLC 检测并无辛弗林的特征点出现,证明水并不能将提取液中的辛弗林解吸下来。

表 1 D101 型大孔树脂洗脱结果

Tab. 1 Results of D101 type B. H adsorptive resine

乙醇洗脱液体积分数/%	15 μ L 进样液中辛弗林含量/ μ g	全部洗脱液中辛弗林含量/mg	旋干洗脱液后干物质的质量/mg	辛弗林纯度/%
15	1.402	7.581	25.474	29.75
30	0.239	1.265	27.301	4.67

2.2 001x8 型阳离子树脂柱氨水洗脱液质量分数的选择

按 1.3.1 项下方法对各氨水洗脱液进行 TLC 检测,发现各洗脱液中辛弗林的特征点都很明显。于是将各洗脱液按 1.3.2 项下方法进入 HPLC 检测,结果见表 2。

表 2 001x8 型阳离子树脂柱洗脱结果

Tab. 2 Results of Cation-exchange resine 001X8

氨水洗脱液质量分数/%	15 μ L 进样液中辛弗林含量/ μ g	全部洗脱液中辛弗林含量/mg	旋干洗脱液后干物质的质量/mg	辛弗林纯度/%
3	9.164	10.178	31.150	32.69
4	14.817	16.422	35.704	46.14
5	10.536	11.714	33.048	35.43

酸水提取液中的杂质较多,蒸干后用甲醇溶解时有油状物极难溶解,可能为果胶等物质。经阳离子树脂柱交换洗脱后,杂质明显减少,且辛弗林含量较高。由表 2 可看出,质量分数 4% 的氨水洗脱效果最好,并且明显优于大孔树脂的分离效果。这主要是由于酸水提取时将个青皮中的辛弗林转化成了盐,从而大大提高了在酸水中的溶解度,并且阳离子树脂对辛弗林有很好的选择交换性。

2.3 辛弗林回收率的比较

将原料液按 1.3.2 项下方法进行含量测定,计算得原料中辛弗林质量分数为 0.581%,即 5.81 mg/g。

由表 3 可看出,质量分数 4% 的氨水溶液洗脱 001x8 型阳离子树脂柱得到的辛弗林的回收率最高,达到 84.78%。因此,不管从干粉中辛弗林的纯度,还是从辛弗林的回收率考虑,都应该以酸水提取个青皮粉,通过 001x8 型阳离子树脂柱交换,质

量分数4%的氨水溶液洗脱作为以下实验的提取分离条件。

表3 辛弗林回收率的比较

Tab. 3 Comparison of recovery of synephrine

洗脱溶剂	辛弗林含量/(mg/g)	辛弗林回收率/%
体积分数15%乙醇溶液	0.9825	33.82
体积分数30%乙醇溶液	0.1645	5.67
质量分数3%氨水溶液	1.527	52.56
质量分数4%氨水溶液	2.4635	84.78
质量分数5%氨水溶液	1.7565	60.46

2.4 实验结果验证

取个青皮细粉20g于25mL蒸馏水中浸润12h,0.2mol/L的盐酸溶液于95℃下提取2次,每次50mL,各1h。抽滤,合并滤液,浓缩,上样于50

mL的001x8型阳离子树脂柱,用质量分数4%氨水洗脱。将洗脱液蒸干,得干样品219mg,用甲醇溶解干样品,定容至100mL容量瓶中,取1.5mL于离心管中,4000r/min离心10min,取上清液,HPLC法测含量,计算所得样品中辛弗林的纯度为45.34%,回收率为84.12%。

3 结 语

1)比较了大孔树脂和阳离子树脂对辛弗林提取分离的效果,结果表明阳离子树脂对辛弗林的分离效果较好。

2)对不同质量分数的氨水溶液的洗脱效果进行比较,确定质量分数4%的氨水溶液对001x8型阳离子树脂柱进行洗脱,得到的辛弗林的回收率达到85.03%,干粉中辛弗林的纯度达到45.34%。

3)此法简单、有效,具有潜在的工业应用价值。

参考文献(References):

- [1] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 2005年版. 北京:化学工业出版社,2005:200,附录24.
- [2] 王天山,潘杨,殷飞,等. 马钱素与辛弗林对家兔重症失血性休克模型的作用[J]. 南京中医药大学学报,1999,15(6):345-347.
WANG Tian-shan, PAN Yang, YIN Fei, et al. Effect of loganin and synephrine on rabbit model with severe hemorrhagic shock[J]. *Journal of Nanjing University of TCM*, 1999, 15(6):345-347. (in Chinese)
- [3] 宿树兰. 枳壳的研究进展[J]. 中药材,2001,24(3):223-225.
SU Shu-lan. Study on fructus aurantii[J]. *Chinese Medicinal Materials*, 2001, 24(3):223-225. (in Chinese)
- [4] Fugh-Berman A, Myers A. Citrus aurantium, an ingredient of dietary supplements marketed for weight loss: Current status of clinical and basic research[J]. *Experimental Biology and Medicine*, 2004, 229:698-704.
- [5] 黄永林,阮俊,沈晓琳,等. 大孔吸附树脂分离提取大叶钩藤总生物碱[J]. 广西科学,2006,13(2):127-129.
HUANG Yong-lin, RUAN Jun, SHEN Xiao-lin, et al. Separation of total alkaloidal from extracting linquid of uncaria macrophylla by macroporous adsorption resin[J]. *Guangxi Sciences*, 2006, 13(2):127-129. (in Chinese)
- [6] 周光皎,周亚球. 浅析大孔吸附树脂[J]. 时珍国医国药,2006,17(4):589-590.
ZHOU Guang-jiao, ZHOU Ya-qiu. Analysis of macroporous adsorption resin[J]. *Li Shi-zhen Medicine and Research*, 2006, 17(4):589-590. (in Chinese)
- [7] 李俊,余丽娟,李建. 阳离子树脂交换法提取辛弗林的工艺研究[J]. 现代化工,1998(2):25-26.
LI Jun, YU Li-juan, LI Jian. Study on process of extraction of synephrine by cation exchange resin[J]. *Modern Chemical Industry*, 1998(2):25-26. (in Chinese)
- [8] 徐锡莲,董微星,雷引林,等. 盐藻胞外多糖分离纯化方法研究[J]. 食品与生物技术学报,2007,26(4):28-33.
XU Xi-lian, TONG Wei-xing, LEI Yin-lin, et al. Separation and purification of extracellular polysaccharides from *Dunaliella salina*[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2007, 26(4):28-33. (in Chinese)
- [9] 李先端,马志静,林生,等. 高效液相色谱法测定青皮中辛弗林和N-甲基酪胺的含量[J]. 中国中药杂志,2004,29(6):53.
LI Xian-duan, MA Zhi-jing, LIN Sheng, et al. Determination of synephrine and N-methyltyramine in green tangerine peel by HPLC[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2004, 29(6):53. (in Chinese)
- [10] Jose Santana, Katherine E Sharpless, Bryant C Nelson. Determination of para-synephrine and meta-synephrine positional isomers in bitter orange-containing dietary supplements by LC/UV and LC/MS/MS[J]. *Food Chemistry*, 2008, 109:675-682.

(责任编辑:秦和平,朱明)