

中低压制备色谱从枳实中制备柚皮苷与新橙皮苷对照品的研究

廖茂梁^{1,2}, 尚海花², 王 阳^{2*}, 张铁军^{1*}

1. 天津药物研究院, 天津 300193

2. 天津中医药大学, 天津 300193

摘要: 目的 建立从枳实中分离制备柚皮苷和新橙皮苷对照品的方法。方法 结合大孔树脂、中低压制备色谱分离制备枳实中柚皮苷和新橙皮苷单体。结果 分离制备的柚皮苷的质量分数达 98.76%, 新橙皮苷的质量分数达 99.50%。结论 该方法可有效制备高纯度的柚皮苷和新橙皮苷, 可用于制备中药定性、定量分析使用的对照品。

关键词: 柚皮苷; 新橙皮苷; 枳实; 对照品; 中低压制备色谱

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)10-1271-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.10.012

Preparation of naringin and neohesperidin reference substances from *Citrus aurantium* by medium-low-pressure preparative chromatography

LIAO Mao-liang^{1,2}, SHANG Hai-hua², WANG Yang², ZHANG Tie-jun¹

1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: **Objective** To establish a separation method for naringin and neohesperidin reference substances from *Citrus aurantium*. **Methods** Naringin and neohesperidin monomers in *C. aurantium* were isolated and purified by macroporous resin and medium-low-pressure preparative chromatography. **Results** The contents of the prepared naringin and neohesperidin reached to 98.76% and 99.50%, respectively. **Conclusion** This method is effective for the preparation of naringin and neohesperidin with high purity. It could be used to prepare the reference substances for the qualitative and quantitative analyses of Chinese materia medica.

Key words: naringin; neohesperidin; *Citrus aurantium* L.; reference substance; medium-low-pressure preparative chromatography

枳实为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种或甜橙 *C. sinensis* Osbeck 的干燥幼果, 性味苦、辛、酸, 微寒, 具有破气消积, 化痰散痞的功效, 用于积滞内停、痞满胀痛、泻痢后重、大便不通、痰滞气阻等征^[1]。枳实中主要含有黄酮类、生物碱类、挥发油等成分^[2]。柚皮苷和新橙皮苷是枳实中主要的黄酮类成分, 具有抗氧化、抗过敏、抗突变、抗肿瘤、抑菌、改善微循环、降血糖等药理作用, 在医药、食品及化妆品等领域具有广泛的应用^[3-4]。

中低压制备色谱也被称之为闪式制备色谱技

术, 其最大特点就是分离速度非常快, 其分离样品从毫克级到数十或者数百克。最初仅应用于正相色谱, 反相填料的开发使用, 给该技术带来了广阔的应用空间。与常压柱色谱相比, 其分离速度快、分辨率高; 相比于高效液相制备色谱, 其制备量大, 试验时间缩短, 提高了劳动效率, 同时分离柱填料能够自主填充, 增加了分离选择性, 有效地节约了实验生产成本。使其在天然产物的分离纯化研究工作中发挥重大作用, 现在正成为一个受欢迎的分离和纯化方法^[5-6]。

鉴于柚皮苷和新橙皮苷的广泛用途, 有必要寻

收稿日期: 2012-12-28

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2007BAI37B07)

作者简介: 廖茂梁 (1981—), 男, 江西南康人, 硕士研究生, 主要从事中药药剂及新药开发研究。

Tel: 13072008557 E-mail: liaomaoliang@163.com

*通信作者 王 阳 E-mail: wangysjw@yahoo.com.cn

张铁军 E-mail: tiezheng4@sina.com

网络出版时间: 2013-03-28 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130328.2011.013.html>

找一种简便快速的制备方法,以便于能够更好地开发利用柚皮苷和新橙皮苷。由于枳实中柚皮苷、新橙皮苷等物质的理化性质非常接近,这使得从枳实中分离柚皮苷、新橙皮苷等黄酮类成分非常困难。目前柚皮苷及新橙皮苷的常规分离方法采用硅胶柱色谱和多次重结晶进行分离,由于其他同系物的存在,单纯采用重结晶法难以得到高纯度的单体化合物^[7-9]。

本实验采用中低压制备色谱研究枳实中同时制备柚皮苷、新橙皮苷这两种黄酮类成分的工艺,同时对其进行结构鉴定和纯度检查,其质量分数大于98%,达到了定性和定量用对照品的要求,为制备克级高纯度的柚皮苷和新橙皮苷提供了一种新的思路和方法。

1 仪器与材料

LC6A 岛津高效液相色谱仪(HP1100 检测器), Anstar 色谱工作站, Bruker AV400 核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司); Edwards 冻干机; 瑞士 Mettler Toledo AB204—N、PB303—N 电子分析天平。HPD-300 大孔吸附树脂(沧州宝恩化工有限公司), 甲醇、乙腈均为分析纯(天津康科德科技有限公司), 甲酸为分析纯, 水为纯净水。

枳实, 购于天津市中药饮片厂, 经天津药物研究院张铁军研究员鉴定为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 的干燥幼果。

2 方法和结果

2.1 提取液的制备

以柚皮苷与新橙皮苷提取率为指标, 对影响提取的主要因素, 采用正交试验进行优化, 确定最佳提取条件: 取枳实药材 1 kg, 用 70%乙醇回流提取 2 次, 第 1 次加 10 倍量 70%乙醇回流提取 2 h, 第 2 次加 8 倍量 50%乙醇回流提取 1 h, 滤过, 合并滤液, 减压回收乙醇至无醇味, 加水稀释至 4 L, 即得枳实提取液。柚皮苷与新橙皮苷的转移率分别为 87%和 92%。

2.2 原料制备

本实验参考相关文献方法^[10], 比较了 D-101、HPD-450、HPD-100、HPD-300 等大孔吸附树脂对柚皮苷及新橙皮苷吸附性能, 结果表明 HPD-300 的吸附量较大、解析率较高。HPD-300 大孔吸附树脂 2.5 kg, 湿法装柱(内径为 15 cm), 取枳实提取液通过大孔吸附树脂柱(柱体积为 3 L)吸附, 依次用 12 L 蒸馏水及 10%、40%乙醇洗脱。收集 40%乙

醇洗脱液, 减压浓缩得干粉 135 g, 备用。

2.3 中低压制备色谱的优化

2.3.1 检测波长的选择 取大孔树脂纯化后干粉适量, 用甲醇溶解, 在紫外分光光度计 200~700 nm 下进行全波长扫描, 结果显示在 254、282、320 nm 处有最大吸收波长, 而在 282 nm 处的吸光度值较大, 以 282 nm 为对照品分离的检测波长时, 当大量样品溶液进入色谱柱后, 所分离的目标成分绝对量较大, 已远超出检测器的检测线性范围, 无法监控组分分离情况; 因此在本实验中采用响应灵敏度较低的 254 nm 进行分离检测, 有效解决检测灵敏度与制备分离量不相匹配的问题。

2.3.2 柱填料的选择 实验以十八烷基硅烷键合硅胶(YWG-C₁₈ 40~60 μm)和硅胶为填料, 进行色谱分离, 结果表明以硅胶为填料柱压力较大, 难于将柚皮苷与新橙皮苷有效分离, 死吸附较大, 样品损耗较多; 而以十八烷基硅烷键合硅胶为填料时柚皮苷和新橙皮苷分离度较好, 分离时间较短。确定以十八烷基硅烷键合硅胶为分离填料。

2.3.3 洗脱剂的考察 分别选用甲醇-水、甲醇-1%醋酸溶液、乙腈-水、乙腈-1%甲酸溶液等系统及相同系统下不同配比为洗脱剂, 最终确定乙腈-1%甲酸溶液(15:85)为洗脱剂, 此系统下各色谱峰分离度较好, 能够使柚皮苷和新橙皮苷得到有效分离。由于原料中含有橙皮苷、柚皮芸香苷、柚皮素等结构类似黄酮类成分, 在中低压制备流动相条件下无法完全被洗脱。因此, 在每次分离纯化后用约 500 mL 分析纯乙腈冲洗制备柱, 然后再用乙腈-酸水溶液平衡色谱柱, 即可进行下一次的分离纯化。

2.3.4 上样方式考察 由于大孔树脂纯化物水溶性较差, 最大溶解度为 25 mg/mL, 限制了分离上样量, 若加大上样体积, 则影响柚皮苷与新橙皮苷的分离效果, 若提取物用甲醇进行处理, 能提取 98%的柚皮苷和新橙皮苷, 但将该甲醇水溶液进制备色谱, 不能将新橙皮苷分离出来。本实验比较了直接溶液上样与硅胶干法拌样两种上样方式, 结果表明, 硅胶干法拌样能够大大提高分离上样量, 同时各色谱峰分离度较佳, 确定大孔树脂纯化干粉与硅胶比为 1:2 拌样。

2.4 对照品的制备

根据上述实验结果, 最终确定制备条件: 自制 C₁₈ 填料分离柱(450 mm×50 mm, 5 μm), 柱温为室温, 流动相为乙腈-1%甲酸水溶液(15:85), 体

积流量 10 mL/min, 检测波长 254 nm。

取大孔树脂纯化物 10 g (柚皮苷质量分数为 32.1%, 新橙皮苷质量分数为 48.4%), 用适量甲醇溶解, 采用硅胶 20 g 拌匀, 晾干, 装入上述色谱柱中。按上述色谱条件洗脱, 并收集保留时间为 75~95、100~130 min 的组分, 减压浓缩收集液, 冷冻干燥, 得柚皮苷 2.4 g 和新橙皮苷 3.6 g, 柚皮苷和新橙皮苷收率分别为 75% 和 78%。色谱图见图 1。

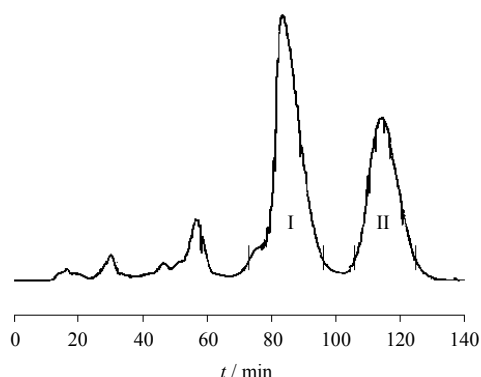


图1 柚皮苷 (I) 和新橙皮苷 (II) 的分离制备色谱图

Fig. 1 Preparative chromatograms of naringin (I) and neohesperidin (II)

2.5 对照品的结构鉴定

2.5.1 柚皮苷 淡黄色粉末, 易溶于甲醇, 微溶于水, $C_{27}H_{32}O_{14}$ 。 1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 1.14 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, Rha-CH₃), 2.73, 3.18 (2H, H-3), 3.2~3.8 (10H, rhamnosylglucose), 5.10 (d, $J = 5.8$ Hz, Rha H-1), 5.14 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, Glu H-1), 5.28 (1H, $J = 4.8$ Hz, OH), 5.52 (1H, dd, $J = 12.0, 1.8$ Hz, H-2), 6.07 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.11 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 6.80 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-3', 5'), 7.32 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-2', 6'), 9.58 (1H, s, OH-4'), 12.03 (1H, s, OH-5); ^{13}C -NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 78.77 (C-2), 41.99 (C-3), 197.29 (C-4), 164.84 (C-5), 96.27 (C-6), 162.84 (C-7), 97.40 (C-8), 162.89 (C-9), 103.27 (C-10), 128.61 (C-1'), 115.17 (C-3', 5'), 128.39 (C-2', 6'), 157.82 (C-4'), 97.40 (C-1''), 78.58 (C-3''), 77.10 (C-5''), 76.86 (C-2''), 69.56 (C-4''), 60.41 (C-6''), 100.35 (C-1'''), 71.79 (C-4'''), 70.44 (C-3'''), 70.35 (C-2'''), 68.24 (C-5'''), 17.99 (C-6''')。以上数据与文献报道一致^[11], 确定其为柚皮苷。

2.5.2 新橙皮苷 白色结晶, 易溶于甲醇, 难溶于水, $C_{28}H_{34}O_{15}$ 。 1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 1.15 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, Rha-CH₃), 2.76, 3.18 (2H,

H-3), 3.2~3.8 (10H, rhamnosylglucose), 3.76 (OCH₃), 5.08 (d, $J = 2.0$ Hz, Rha H-1), 5.12 (1H, d, $J = 5.5$ Hz, Glu H-1), 5.28 (1H, $J = 4.8$ Hz, OH), 5.51 (1H, dd, $J = 12.0, 1.8$ Hz, H-2), 6.08 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-8), 6.10 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-6), 6.87 (1H, dd, $J = 8.0, 2.7$ Hz, H-6'), 6.92 (1H, d, $J = 2.7$ Hz, H-2'), 6.94 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 9.08 (1H, s, OH-3'), 12.02 (1H, s, OH-5); ^{13}C -NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 78.39 (C-2), 42.14 (C-3), 196.97 (C-4), 164.84 (C-5), 95.15 (C-6), 162.90 (C-7), 96.26 (C-8), 162.56 (C-9), 103.32 (C-10), 130.89 (C-1'), 114.118 (C-2'), 146.48 (C-3'), 147.97 (C-4'), 112.03 (C-5'), 117.78 (C-6'), 97.42 (C-1''), 77.12 (C-3''), 76.88 (C-5''), 76.06 (C-2''), 69.58 (C-4''), 60.42 (C-6''), 100.36 (C-1'''), 71.75 (C-4'''), 70.45 (C-3'''), 70.36 (C-2'''), 68.25 (C-5'''), 18.00 (C-6''')。以上数据与文献报道一致^[12], 确定其为新橙皮苷。

2.6 对照品质量分数的测定

采用 HPLC 法测定对照品质量分数。色谱柱为 Ultimate[®]XB-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 以乙腈-水 (20:80, 用磷酸调节 pH 值至 3) 为流动相; 检测波长为 283 nm。在不同的色谱条件下, 柚皮苷和新橙皮苷均为一个主峰, 改变流动相组成 (乙腈-水 10:90~30:70), 未见异常峰。用面积归一化法计算, 确定柚皮苷和新橙皮苷的质量分数分别为 98.76%、99.50%。

3 讨论

由于枳实中含有大量黄酮, 故先采用大孔树脂分离出总黄酮, 再作进一步分离。由于主要含有黄酮类等结构极为相似的杂质成分, 其分离难度很大。而采用中低压制备色谱对其色谱条件进行优化, 柱填料的选择及上样方式等考察, 最终优选出乙腈-1%甲酸水溶液为流动相, C₁₈ 为填料, 在此系统下各色谱峰分离度较好, 能够使柚皮苷和新橙皮苷得到有效分离, 用上述制备方法进行提取、分离、纯化, 操作简单, 重现性好。本方法为柚皮苷和新橙皮苷纯品制备提供了一种新的思路。

柚皮苷和新橙皮苷均为枳实中的活性成分, 二者在植物中量较高, 性质稳定, 分离制备的柚皮苷和新橙皮苷纯品质量分数大于 98%, 符合对照品的质量分数要求, 为常规分析检测、新药研究以及进一步综合全面控制枳实药材及其复方制剂的质量标准提供高质量分数的对照品。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 廖茂梁, 尚海花, 胡 静, 等. 树脂分离纯化枳实中辛弗林的工艺研究 [J]. 现代药物与临床, 2011, 26(2): 129-133.
- [3] 张 红, 孙明江, 王 凌. 枳实的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中药材, 2009, 32(11): 1787-1789.
- [4] 杨宏亮, 田 衍, 李沛波, 等. 柚皮苷及柚皮素的生物活性研究 [J]. 中药材, 2007, 30(6): 752-754.
- [5] Still W C, Kahn M, Mitra A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution [J]. *J Org Chem*, 1978, 43(14): 2923-2925.
- [6] Raman G, Cho M, Brodbelt J S, *et al*. Isolation and purification of closely related Citrus limonoid glucosides by flash chromatography [J]. *Phytochem Anal*, 2005, 16(3): 155-160.
- [7] EL-Nawawi S A. Extraction of citrus glucosides [J]. *Carbohydr Polym*, 1995, 27(1): 1-4.
- [8] 许永兴, 瞿海斌, 程翼宇. 从枳壳中分离纯化新橙皮苷对照品 [J]. 中草药, 2005, 36(4): 525-527.
- [9] 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): 801-802.
- [10] 韦 敏, 杨中林, 吴建民. 大孔吸附树脂法分离纯化化橘红中柚皮苷的研究 [J]. 中成药, 2007, 29(3): 352-354.
- [11] 岳春华, 李顺祥. 从骨碎补中制备新北美圣草苷和柚皮苷对照品的研究 [J]. 中草药, 2008, 39(4): 529-531.
- [12] 黄胜阳, 胡世林, 石建功, 等. 酸橙花化学成分研究 [J]. 中药材, 2001, 24(12): 865-866.