

标准研讨

高速逆流色谱法分离制备枳壳中水合橘皮内酯等 3 个标准物质的研究^{*}宋玉鹏,董晶,陈海芳,胡源祥,谭舒舒,杨武亮^{**}

(江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室,南昌 330004)

摘要 目的:采用高速逆流色谱法从枳壳中分离制备高纯度的水合橘皮内酯、川陈皮素和橘皮素。方法:枳壳用乙醇回流提取,经三氯甲烷萃取得到萃取物,再应用制备型高速逆流色谱仪,通过优化各分离条件,以石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水(10:9:7:8)四元两相溶剂系统上相为固定相,下相为流动相,高速逆流色谱仪转速 $880\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,流动相流速 $2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,制备分离枳壳三氯甲烷萃取部分粗提物,所得产物的纯度经 HPLC 检测,结构经 EI-MS、 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 鉴定。结果:100 mg 粗提物经 270 min 1 次分离制备得到了 3 个化合物,鉴定为水合橘皮内酯、川陈皮素和橘皮素,称量,水合橘皮内酯 8.8 mg、川陈皮素 7.3 mg 和橘皮素 4.7 mg,采用峰面积归一化法计算其质量分数分别为 96.70%、97.89% 和 98.52%。结论:由该法从枳壳中分离制备水合橘皮内酯、川陈皮素和橘皮素简便、经济,所得化合物纯度高,可作为枳壳药材质量控制的参考物质。

关键词: 枳壳;水合橘皮内酯;川陈皮素;橘皮素;对照品制备;高速逆流色谱(HSCCC);标准物质

中图分类号:R 917

文献标识码:A

文章编号:0254-1793(2017)01-0137-05

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.01.18

Studies on separation and preparation of 3 standard materials such as meranzin hydrate from the Fructus Aurantii by high-speed counter-current chromatography^{*}

SONG Yu-peng, DONG Jing, CHEN Hai-fang, HU Yuan-xiang,
TAN Shu-shu, YANG Wu-liang^{**}

(Key Laboratory of Modern Preparation of TCM of Ministry of Education, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

Abstract Objective: To establish a method for preparative separation of meranzin hydrate, nobiletin and tangeretin with high purity from Fructus Aurantii by high-speed counter-current chromatography (HSCCC). **Methods:** After various parameters of preparative HSCCC were optimized preliminarily, the chloroform crude extract of the Fructus Aurantii was separated with a two-phase solvent system composed of light petroleum-

^{*} 国家自然科学基金资助项目(编号:81460575, 81260612);江西中医药大学校级研究生创新项目(JZYC15S43)

^{**} 通信作者 Tel:(0791)87118659; E-mail: yangwuliang@163.com

第一作者 Tel: 13133826551; E-mail: 1335018757@qq.com

ethyl acetate-methanol-water (10:9:7:8). The flow rate was $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, and the rotation rate was $880 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$. The upper phase was chosen as the stationary phase, while the lower phase was chosen as the mobile phase. The purity of compounds obtained were analyzed by HPLC, and the structures of the compounds were identified by EI-MS, ^1H -NMR and ^{13}C -NMR. **Results:** Three compounds, including 8.8 mg of meranzin hydrate, 7.3 mg of nobiletin and 4.7 mg of tangeretin were obtained from 100 mg crude sample in one-step separation in 270 min. The mass fraction were 96.70%, 97.89% and 98.52% respectively by using the peak area normalization method. **Conclusion:** The established HSCCC method is simple and feasible, which can be used for rapid preparative isolation of the meranzin hydrate, nobiletin and tangeretin from Fructus Aurantii. The compounds obtained in the experiment can be used as reference materials for quality control of Fructus Aurantii.

Keywords: Fructus Aurantii; meranzin hydrate; nobiletin; tangeretin; preparation of reference material; high-speed counter-current chromatography (HSCCC); standard material

枳壳来源于芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种的干燥未成熟果实^[1],具有理气宽中、行滞消胀的功效,主要用于治疗胸胁气滞、胀满疼痛、食积不化、痰饮内停、胃下垂等证^[2],主要含有黄酮类^[3]、挥发油^[4]和少量生物碱等类成分。现代研究表明,枳壳提取物三氯甲烷萃取层中的多甲氧基黄酮成分川陈皮素与橘皮素,均对正常小鼠有胃肠推进作用^[5]。据报道,川陈皮素还具有良好的抗炎、止血、抗癌^[6],改善记忆和影响血管平滑肌等作用,橘皮素具有抗白血病^[7]和抗真菌^[8]作用。另外研究表明,水合橘皮内酯为具有药理活性的成分^[9]。随着对这3个化合物药理作用研究的深入,其分离纯化也越来越受到人们的关注。采用传统的分离方法分离枳壳中的水合橘皮内酯、川陈皮素和橘皮素,不仅费时费力,污染环境,而且所用固定相对样品有不可逆吸附作用。高速逆流色谱(HSCCC)是一种无固相载体的连续液-液分配色谱技术^[10],即利用溶质在2种互不相溶的溶剂系统中分配系数的不同,从而进行分离的方法。该技术可在短时间内实现复杂样品的高效分离分析,因其无固体载体,可避免分离样品与固体载体的不可逆吸附,因而样品回收率高,并且对样品的预处理要求也比较低,同时还具有应用范围广,仪器操作简单等优点,因此被广泛应用于天然产物的分离制备。本研究采用高速逆流色谱法分离制备枳壳中的水合橘皮内酯、川陈皮素和橘皮素,制备快速,制备量大,为这3个化合物对照品的快速制备提供了一种新途径,并为枳壳的质量评价提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 TEB-300C 高速逆流色谱仪(包括 TBP5002

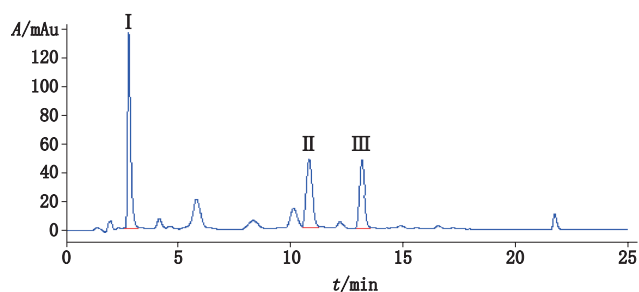
型恒流泵、LC3000 型高效液相色谱仪、CXTH-3000 色谱工作站,上海同田生物技术有限公司); 99601 Dikma Diamonsil C_{18} (2) 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm ; 北京迪科马科技有限公司); Bruker AVANCE AV400 超导核磁共振波谱仪(Bruker); Agilent 6410 LC-MS-MS(Agilent); BT224S 万分之一天平(Sartoris); DC-0506 低温恒温槽(上海舜宇恒平科学仪器有限公司)。Agilent 1260 型高效液相色谱仪,包括四元泵、在线脱气机、DAD 检测器等(Agilent)。

1.2 试剂 乙腈为 HPLC 级,水为双蒸水,其他试剂均为分析纯。枳壳药材经江西中医药大学药用植物教研室赖学文副教授鉴定为 *Citrus aurantium* L. 的干燥未成熟果实。

2 方法与结果

2.1 样品的制备 取枳壳粉末(过2号筛)500 g,用3 000 mL 无水乙醇回流提取3次,趁热过滤,合并滤液,将滤液减压浓缩得浸膏后用1 000 mL 水分散,1 000 mL 三氯甲烷萃取3次,合并萃取液,减压浓缩得浸膏后真空干燥,得粗提物5.0 g,即得样品。

2.2 样品的 HPLC 分析条件 色谱柱: 迪马 Dikma Diamonsil C_{18} (2)(150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 水(A)-乙腈(B),二元梯度洗脱(0~6 min, 40%B; 6~18 min, 40%B → 80%B; 18~20 min, 80%B → 100%B; 20~25 min, 100%B); 流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长: 326 nm; 柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 10 μL 。取“2.1”项下粗品适量,精密称定,置25 mL 量瓶中,加甲醇超声溶解,冷却,过0.45 μm 有机微孔滤膜,取续滤液,在上述色谱条件下进样,色谱图见图1。



I. 化合物 I (compound I) II. 化合物 II (compound II) III. 化合物 III (compound III)

图1 枳壳三氯甲烷萃取部分 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of chloroform crude extract from Fructus Aurantii

2.3 HSCCC 分离用两相溶剂系统的选择 在分液漏斗中按一定比例配制两相溶剂体系,充分振摇,静置分层,备用。取样品适量于玻璃试管中,加入已平衡的两相溶剂体系的下相溶液 5 mL,充分振摇使样品溶解,经 HPLC 法检测其中目标化合物的峰面积 A_1 ,再加入两相溶剂体系的上相溶液 5 mL,充分振摇,静置分层后,再用 HPLC 分析条件检测溶剂体系下相中目标化合物的峰面积 A_2 ,计算分配系数 K ($K = (A_1 - A_2) / A_2$),通过分配系数 K ($0.5 \leq K \leq 2$) 选择合适的两相溶剂体系。结果表明,石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水 (10:9:7:8) 为最佳溶剂系统。 K 值结果见表 1。

表1 枳壳三氯甲烷萃取部分中 3 个化合物在不同两相溶剂系统的 K 值

Tab. 1 The K -values of the three compounds of chloroform crude extract from Fructus Aurantii in different two-phase solvent systems

溶剂系统 (solvent system)	K 值 (K value)		
	化合物 I (compound I)	化合物 II (compound II)	化合物 III (compound III)
乙酸乙酯-水 (ethylacetate-water) (5:5)	2.28	4.39	1.33
乙酸乙酯-甲醇-水 (ethylacetate-methanol-water) (5:1:5)	1.68	2.57	2.71
乙酸乙酯-甲醇-水 (ethylacetate-methanol-water) (5:3:5)	0.95	2.51	2.98
石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水 (petroleum ether-ethylacetate-methanol-water) (5:5:5:5)	—	0.42	1.07
石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水 (petroleum ether-ethylacetate-methanol-water) (10:8:7:7)	1.11	2.42	3.34
石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水 (petroleum ether-ethylacetate-methanol-water) (10:8:7:8)	0.44	1.44	2.70
石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水 (petroleum ether-ethylacetate-methanol-water) (3:2:2:2)	0.81	1.81	3.02
石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水 (petroleum ether-ethylacetate-methanol-water) (10:9:7:8)	0.54	1.59	1.98
石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水 (petroleum ether-ethylacetate-methanol-water) (5:5:7:4)	0.43	1.47	0.91

注 (note): “—” 表示分配系数 K 太大,无法计算 (The symbol “—” means the partition coefficient is too large to be evaluated)

2.4 HSCCC 分离用两相溶剂体系和供试品溶液的制备 在 2 000 mL 分液漏斗中配制石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水 (10:9:7:8) 两相溶剂体系,充分振摇,待静置分层后,上相为固定相,下相为流动相,分别取出超声 (功率 200 W,频率 45 kHz) 20 min,冷却至室温备用。取粗提物 100 mg 于 20 mL 已平衡的两相溶剂体系的下相溶液中,超声使其充分溶解,备用。

2.5 HSCCC 制备分离 打开温控装置,将温度设为 25 °C。以 10 mL·min⁻¹ 流速泵入固定相,待 HSCCC 分离管中充满上相后,即出口端有固定相流出时,以

2 mL·min⁻¹ 泵入流动相,同时开启主机,将转速调为 880 r·min⁻¹。当固定相不再从分离柱中流出时,表明已在分离柱中建立了两相间的动态平衡。此时通过进样阀口将制备好的供试品溶液注入 HSCCC 分离管中,在 326 nm 处进行检测,开始采集数据,并记录色谱图,根据色谱图吸收峰接收流份。色谱图见图 2。

2.6 HPLC 纯度检测 将各组分干燥,称量,化合物 I 8.8 mg,化合物 II 7.3 mg,化合物 III 4.7 mg。取化合物 I~III 适量,精密称定,分别置 25 mL 容量瓶中,加甲醇超声溶解,冷却,过 0.45 μm 有机微孔滤膜,取续

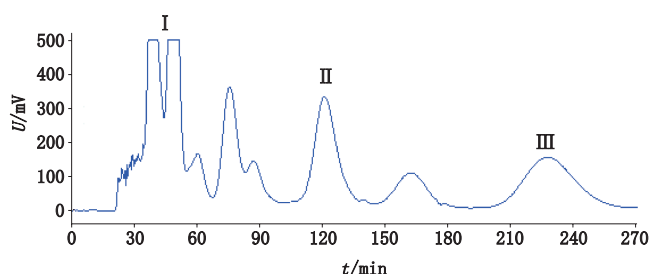


图2 HSCCC制备分离枳壳三氯甲烷萃取部分色谱图

Fig. 2 The HSCCC chromatogram of chloroform crude extract of Fructus Aurantii

滤液,即得,进样。对化合物 I ~ III 进行纯度检测,按峰面积归一化法计算其质量分数。经 HPLC 图谱结果表明,3 个化合物峰均为单一对称尖峰,其质量分数分别为 96.70%、97.89%、98.52%。色谱图见图 3。

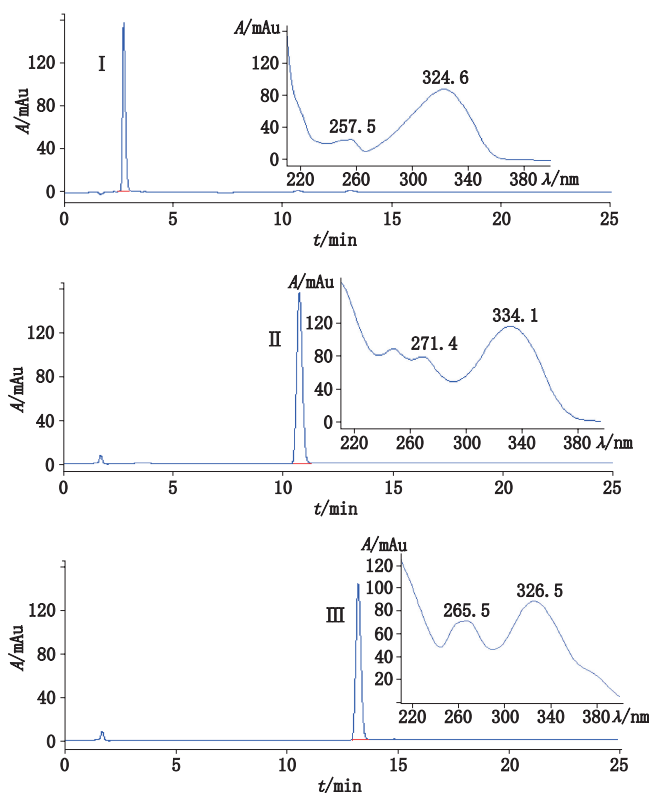


图3 化合物 I ~ III 纯度检测 HPLC 图

Fig. 3 HPLC chromatogram of purity analysis of compounds I ~ III

2.7 化合物结构鉴定 分别吸取“2.6”项中配制的化合物 I ~ III 供试品,用甲醇稀释至约 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $0.22 \mu\text{m}$ 的微孔滤膜滤过后,采用液质联用技术鉴定。质谱条件:电喷雾离子源(ESI),干燥气温度为 350°C ,干燥器流速 $10 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$,毛细管电压为 4 kV ,雾化器压力 275.8 kPa ,金属毛细管温度为 300°C ,正离子扫描模式,扫描范围为 m/z 100~500。分别

取“2.6”项下化合物 I ~ III 粉末适量,溶于 CDCl_3 或 $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ 后进行 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 分析。数据如下。

峰 I : ESI-MS m/z : 301.10 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.66 (d, $J=9.5 \text{ Hz}$, 1 H), 7.34 (d, $J=8.6 \text{ Hz}$, 1 H), 6.87 (d, $J=8.6 \text{ Hz}$, 1 H), 6.24 (d, $J=9.5 \text{ Hz}$, 1 H), 3.95 (s, 3 H), 3.65 (dd, $J=10.1, 2.7 \text{ Hz}$, 1 H), 3.06 (ddd, $J=23.8, 13.7, 6.4 \text{ Hz}$, 2 H), 2.47 (s, 2 H), 1.34 (d, $J=2.1 \text{ Hz}$, 6 H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 161.5 (C-2), 160.5 (C-7), 153.5 (C-9), 144.1 (C-4), 127.0 (C-5), 115.8 (C-8), 113.1 (C-10), 113.0 (C-3), 107.5 (C-6), 78.5 (C-2'), 73.2 (C-3'), 56.4 (OCH₃), 26.1 (C-4'), 25.5 (C-1'), 24.2 (C-5')。以上数据与文献[11-12]一致,故鉴定化合物 I 为水合橘皮内酯(meranzin hydrate)。

峰 II : ESI-MS m/z : 403.19 (+MS), ^1H NMR (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ : 6.626 (1H, s, H-3), 7.591 (1H, d, $J=2.4 \text{ Hz}$, H-2'), 7.157 (1H, d, $J=8.8 \text{ Hz}$, H-5'), 7.687 (1H, dd, $J=8.8 \text{ Hz}$, 2 H-6'), 4.08 (3H, s, OCH₃), 4.045 (3H, s, OCH₃), 3.967 (3H, s, OCH₃), 3.920 (3H, s, OCH₃), 3.896 (3H, s, OCH₃), 3.854 (3H, s, OCH₃); ^{13}C NMR (101 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ : 160.66 (C-2), 106.28 (C-3), 175.77 (C-4), 144.14 (C-5), 149.68 (C-6), 138.24 (C-7), 148.22 (C-8), 147.64 (C-9), 108.91 (C-10), 123.8 (C-1'), 111.62 (C-2'), 152.34 (C-3'), 151.41 (C-4'), 114.9 (C-5'), 119.38 (C-6'), 61.48 (5-C), 61.39 (6-C), 61.08 (7-C), 61.01 (8-C), 55.32 (3' -C), 55.31 (4' -C)。以上数据与文献[13]一致,故鉴定化合物 II 为川陈皮素(nobiletin)。

峰 III : ESI-MS m/z : 373.19 (+MS), ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 6.611 (1H, s, H-3), 7.891 (2H, d, $J=8.8 \text{ Hz}$, H-2', H-6'), 7.038 (2H, d, $J=8.8 \text{ Hz}$, H-3', H-5'), 4.104 (3H, s, OCH₃), 4.024 (3H, s, OCH₃), 3.953 (6H, s, OCH₃), 3.891 (3H, s, OCH₃); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 162.31 (C-2), 106.70 (C-3), 177.33 (C-4), 144.09 (C-5), 151.39 (C-6), 138.10 (C-7), 148.41 (C-8), 147.74 (C-9), 114.90 (C-10), 123.86 (C-1'), 127.73 (C-2', C-6'), 114.53 (C-3', C-5'), 161.20 (C-4'), 62.26 (C-5), 62.04 (6-C), 61.84 (7-C), 61.66 (8-C), 55.51 (4' -C)。以上数据与文献[14]一致,故鉴定化合物 III 为橘皮素(tangeretin)。

3 讨论

3.1 色谱条件的选择 本文尝试用甲醇-水(60:40)、甲醇-水(55:45)和乙腈-水(45:55)等作为流动相进行等度洗脱,结果以乙腈-水(45:55)为流动相时分离效果较好,但分离时间比较长,后尝试采用梯度洗脱的方法,能达到分离度的要求,分离时间合适,最后确定流动相为水(A)-乙腈(B),二元梯度洗脱(0~6 min, 40%B; 6~18 min, 40%B → 80%B; 18~20 min, 80%B → 100%B; 20~25 min, 100%B)。水合橘皮内酯、川陈皮素和橘皮素的对照品溶液在326 nm处均有最大紫外吸收,故选择326 nm为测定波长。

3.2 转速及流动相流速的选择 预试验结果表明,流动相流速固定时,随着螺旋管转速的减小,固定相的保留值会减小。流动相流速过低会导致分离周期延长,过高则会导致固定相流失且分离效果变差。故经综合考虑,转速及流动相流速分别设为 $880 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

3.3 小结 HSCCC法分离制备中药对照品具有快速,成本低,制备量大等优点。本实验采用HSCCC法分离制备枳壳中的水合橘皮内酯、川陈皮素和橘皮素,快速,简便,制备量大,为这3个化合物标准品的快速制备提供了一种新途径,所得化合物纯度高,可作为枳壳药材质量控制的参考物质。

参考文献

- [1] 中国药典 2015 年版. 一部[S]. 2015: 246
ChP 2015. Vol I [S]. 2015: 246
- [2] 高学敏. 中药学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 252
GAO XM. Traditional Chinese Medicine [M]. Beijing: Chinese Press of Traditional Chinese Medicine, 2007: 252
- [3] 裴昆, 夏放高, 陈海芳, 等. 陈皮、化橘红和枳壳研究概况[J]. 江西中医学院学报, 2015, 46(4): 71
PEI K, XIA FG, CHEN HF, et al. Research on Pericarpium Citri Reticulatae, Citri Grandis Exocarpium and Fructus Aurantii [J]. Jiangxi J Tradit Chin Med, 2015, 46(4): 71
- [4] 施学骄, 张杰红, 樊丹青, 等. 枳实、枳壳挥发油化学成分及抑菌活性的比较研究[J]. 中药与临床, 2012, 3(2): 25
SHI XJ, ZHANG JH, FAN DQ, et al. Comparative studies on chemical composition and antibacterial activity of essential oil from Aurantii Fructus Immaturus and Aurantii Fructus [J]. Pharm Clin Chin Mater Med, 2012, 3(2): 25
- [5] 徐欢, 陈海芳, 介磊, 等. HPLC法测定枳壳中川陈皮素、红橘素的含量[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(9): 1411
XU H, CHEN HF, JIE L, et al. HPLC determination of nobiletin and tangeretin in Fructus Aurantii [J]. Chin J Pharm Anal, 2009, 29(9): 1411
- [6] SHI MD, LIAO YC, SHIH YW, et al. Nobiletin attenuates metastasis via both ERK and PI3K/Akt pathways in HGF-treated liver cancer HepG2 cells [J]. Phytomedicine, 2013, 20(8-9): 743
- [7] MAK NK, WONG-LEUNG YL, CHAN SC, et al. Isolation of anti-leukemia compounds from *Citrus reticulata* [J]. Life Sci, 1996, 58(15): 1269
- [8] ORTUNO A, BAIDEZ A, GOMEZ P, et al. *Citrus paradisi* and *Citrus sinensis* flavonoids: Their influence in the defence mechanism against *Penicillium digitatum* [J]. Food Chem, 2006, 98(2): 351
- [9] XIE Y, HUANG X, HU SY, et al. Meranzin hydrate exhibits anti-depressive and prokinetic-like effects through regulation of the shared alpha 2-adrenoceptor in the brain-gut axis of rats in the forced swimming test [J]. Neuropharmacology, 2013, 67: 318
- [10] 孙印石, 刘政波, 王建华, 等. 高速逆流色谱分离制备陈皮中的黄酮类化合物[J]. 色谱, 2009, 27(2): 244
SUN YS, LIU ZB, WANG JH, et al. Preparative isolation and purification of flavones from Pericarpium Citri Reticulatae by high-speed counter-current chromatography [J]. Chin J Chromatogr, 2009, 27(2): 244
- [11] 刘群娣, 徐新军, 万金志, 等. 高速逆流色谱法分离制备化橘红中的柚皮苷、橙皮内酯水合物和异橙皮内酯[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(5): 831
LIU QD, XU XJ, WAN JZ, et al. High-speed counter-current chromatography preparation and separation of naringin, meranzin hydrate and isomeranzin from Exocarpium Citri Grandis [J]. Chin J Pharm Anal, 2011, 31(5): 831
- [12] 古淑仪, 宋晓红, 苏薇薇. 化州柚中香豆素成分的研究[J]. 中草药, 2005, 36(3): 341
GU SY, SONG XH, SU WW. Coumarins from *Citrus grandis* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2005, 36(3): 341
- [13] 钱士辉, 陈廉. 陈皮中黄酮类成分的研究[J]. 中药材, 1998, 21(6): 301
QIAN SH, CHEN L. Studies on the chemical constituents of *Citrus reticulata* [J]. J Chin Med Mater, 1998, 21(6): 301
- [14] CHEN J, MONTANARI AM, WIDMER WW. Two new polyethoxylated flavones, a class of compounds with potential anticancer activity, isolated from cold pressed dancy tangerine peel oil soldis [J]. J Agric Food Chem, 1997, 45(2): 364

(本文于 2016 年 1 月 16 日收到)