

橘核中柠檬苦素类物质纯化工艺

罗静¹, 何中燕^{1,2}, 裴瑾^{1*}, 康亚兰¹, 刘维¹, 陈翠平¹

(1. 成都中医药大学, 成都 611137; 2. 四川科伦药物研究院有限公司, 成都 610071)

〔摘要〕 目的:优选橘核中柠檬苦素类物质的大孔树脂纯化工艺。方法:通过静态吸附-洗脱试验综合考察 16 种不同厂家和极性大孔树脂对橘核中柠檬苦素类物质的纯化效果,筛选最佳树脂型号。通过单因素试验考察 HPD-722 型大孔树脂对柠檬苦素类物质的动态吸附-洗脱条件,包括清洗剂用量、上样液质量浓度、洗脱剂浓度及用量等。结果:HPD-722 型大孔吸附树脂对柠檬苦素类物质的纯化效果最佳;最佳纯化工艺为上样液质量浓度在 3.503 3~5.403 4 g·L⁻¹,上样流速 1~2 BV·h⁻¹,样品溶液 pH 6,水洗用量 1 BV,80% 乙醇 6 BV 为洗脱剂,洗脱流速 2 BV·h⁻¹,洗脱液 pH 7;洗脱液中柠檬苦素类物质纯度 82.82%,其中柠檬苦素 22.53%,诺米林 45.90%。结论:采用 HPD-722 型大孔吸附树脂纯化橘核中柠檬苦素类物质的工艺可行性较高,可有效提高柠檬苦素类物质纯度。

〔关键词〕 橘核; 柠檬苦素类物质; 大孔树脂; 诺米林

〔中图分类号〕 R283.6;R282.4 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2014)20-0013-04

〔doi〕 10.13422/j.cnki.syfjx.2014200013

Purification Technology of Limonoids in Citri Reticulatae Semen

LUO Jing¹, HE Zhong-yan^{1,2}, PEI Jin^{1*}, KANG Ya-lan¹, LIU Wei¹, CHEN Cui-ping¹

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;

2. Sichuan Kelun Pharmaceutical Research Institute Co. Ltd., Chengdu 610071, China)

〔Abstract〕 **Objective:** To optimize purification process of limonoids in Citri Reticulatae Semen by macroporous resin. **Method:** Static adsorption and desorption tests were adopted to select optimal type from 16 kinds of macroporous resin with different manufacturers and polarities. Purification process was optimized by single factor tests. **Result:** HPD-722 macroporous resin was selected, optimal purification process was as following: the concentration of sample solution between 3.503 3-5.403 4 g·L⁻¹, sampling speed of 1-2 BV·h⁻¹, pH of sample solution 6, washed impurity by 1 BV of water and eluted by 6 BV of 80% ethanol with elution rate of 2 BV·h⁻¹, eluent pH of 7; under these conditions, purity of limonoids was 82.82%, including limonin of 22.53% and nomilin of 45.90%. **Conclusion:** Limonoids can be purified by HPD-722 macroporous resin, this process can effectively improve the purity of limonoids.

〔Key words〕 Citri Reticulatae Semen; limonoids; macroporous resin; nomilin

橘核具有理气、散结、止痛的功效,临床主要用于治疗急性乳腺炎、乳腺增生等疾病^[1]。其主要有效组分为柠檬苦素类似物^[2],该类化合物具有抗肿瘤^[3-4]、抗病毒^[5]、昆虫拒食^[6]等作用,具有良好的开发应用前景。目前有关柠檬苦素类物质的大孔树脂纯化工艺国内外均有报道^[7]。本实验收集了 16 种不同厂家和极性大孔树脂,通过静态吸附-洗脱试验筛选最佳树脂,利用单因素试验优选橘核中柠檬苦素类物质的大孔树脂纯化工艺,为该类物质的开发应用提供参考。

1 材料

UV1100 型紫外-可见分光光度仪(上海天美科

〔收稿日期〕 20140304(014)
〔第一作者〕 罗静,在读硕士,从事中药资源开发与利用研究,Tel:18224426244,E-mail:xiaojing_er123@163.com
〔通讯作者〕 *裴瑾,博士,教授,从事中药品种品质与资源研究,Tel:028-61800127,E-mail:peixin@163.com

学仪器有限公司),玻璃层析柱(2 cm×50 cm,济南博纳生物技术有限公司)。橘核购于四川科伦天然药业有限公司,经成都中医药大学裴瑾教授鉴定为芸香科植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 及其栽培变种的干燥成熟种子;柠檬苦素和诺米林对照品(四川维克奇生物科技有限公司,批号 120908);显色剂 A

液(称取对-二甲氨基苯甲醛 125 mg 溶于 100 mL 的 65% 硫酸乙醇溶液中,放冷使用)、显色剂 B 液(取三氯化铁 0.9 g 加水溶解并定容于 100 mL 量瓶中)均为自制,柠檬苦素、诺米林对照品(四川维克奇生物科技有限公司,批号均为 120908),水为蒸馏水,试剂均为分析纯,16 种不同批次大孔树脂见表 1。

表 1 不同型号大孔树脂物理性能

型号	供应厂家	结构	极性	粒径 /mm	比吸附量 /mg·g ⁻¹	吸附率 /%	比洗脱量 /mg·g ⁻¹	洗脱率 /%
LD605	中蓝晨光化工研究所	聚苯乙烯	非极性	0.3~1.0	90.92	57.25	77.80	85.57
D140	中蓝晨光化工研究所	聚苯乙烯	非极性	0.3~1.0	90.66	57.09	87.65	79.28
D100	中蓝晨光化工研究所	聚苯乙烯	非极性	0.3~1.0	89.03	56.06	77.38	86.92
HPD100	河北沧州宝恩化工有限公司	聚苯乙烯	非极性	0.2~0.8	114.42	72.05	84.50	73.85
HPD300	河北沧州宝恩化工有限公司	聚苯乙烯	非极性	0.3~1.0	111.11	69.96	74.05	76.28
HPD400A	河北沧州宝恩化工有限公司	聚苯乙烯	中极性	0.3~1.0	110.01	69.27	81.85	74.41
HPD722	河北沧州宝恩化工有限公司	聚苯乙烯	弱极性	0.3~1.25	122.63	77.22	96.25	78.84
D900	河北沧州宝恩化工有限公司	离子交换	离子交换	0.3~1.0	103.53	65.19	71.45	69.01
LX-10	西安蓝晓科技有限公司	苯乙烯-二乙烯苯聚合物	弱极性	—	86.41	54.41	69.79	80.77
LX-10G	西安蓝晓科技有限公司	苯乙烯-二乙烯苯聚合物	弱极性	—	118.90	74.87	90.89	76.45
AB-8	西安蓝晓科技有限公司	聚苯乙烯	弱极性	0.3~1.25	108.42	68.27	75.71	69.83
RS-3	西安朴天生物科技	聚苯乙烯	弱极性	—	88.32	55.61	82.96	93.94
RS-4	西安朴天生物科技	聚苯乙烯	弱极性	—	114.17	71.89	89.72	78.58
HZ-816	上海华震科技有限公司	聚苯乙烯	弱极性	0.3~1.2	119.36	75.16	84.04	70.40
HZ-16	上海华震科技有限公司	聚苯乙烯	弱极性	—	126.08	79.39	91.06	72.22
HZ-20SS	上海华震科技有限公司	聚苯乙烯	弱极性	—	109.24	68.79	98.87	90.51

注:比吸附(洗脱)量为平均每克大孔树脂吸附(洗脱)的柠檬苦素类物质的质量。

2 方法与结果

2.1 柠檬苦素类物质的含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取柠檬苦素对照品 6.82 mg 于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

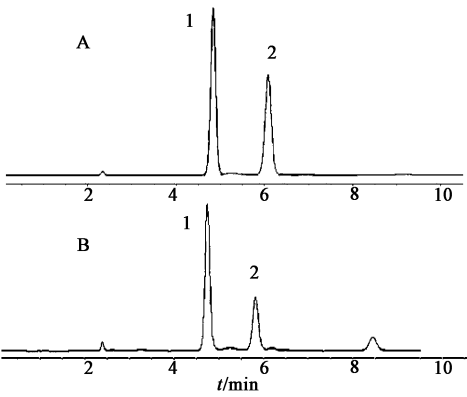
2.1.2 供试品溶液的制备 在预试验基础上,称取一定量橘核粉末 50 g,加石油醚(60~90℃)于 60℃水浴下脱脂 6 h,弃去石油醚,加 6 倍量 50%乙醇于 60℃水浴提取 2 h,抽滤,滤液浓缩,备用。

2.1.3 标准曲线的绘制 在 6 支试管中分别加入柠檬苦素对照品溶液 0.2,0.4,0.6,0.8,1.0,1.2 mL,加无水乙醇稀释至 2 mL,加入显色剂 A 5 mL 和显色剂 B 0.5 mL,静置 30 min,于 500 nm^[8]处测定吸光度(A),以 A 为横坐标,质量浓度(C)为纵坐标,得回归方程 $C = 0.383\ 9A - 0.002\ 3$ ($r = 0.997\ 6$),线性范围 0.068 2~0.409 2 g·L⁻¹。

2.2 柠檬苦素和诺米林的含量测定 选择柠檬苦

素、诺米林含量作为评价指标测定纯度。色谱条件^[9]为 Dikma C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相 甲醇-水(65:35),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 25℃,检测波长 210 nm,进样量 10 μL。精密称取柠檬苦素、诺米林对照品适量,置于量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,得质量浓度分别为 0.372,0.242 g·L⁻¹的混合溶液。见图 1。

2.3 静态吸附-洗脱试验 精密称取预处理好的 16 种树脂各 2 份,每份 2.0 g,分别置于具塞锥形瓶中,各加入供试品溶液 20 mL,置于摇床中于 120 r·min⁻¹振荡 24 h,过滤,抽干,加水 100 mL 清洗树脂,合并滤液,稀释,于 500 nm 处测定 A。将清洗后的大孔树脂分别置于具塞锥形瓶中,各加入 80%乙醇 40 mL,于 120 r·min⁻¹的摇床中振荡洗脱 24 h,取洗脱液稀释,于 500 nm 处测定 A,计算比吸附量、吸附率、比洗脱量和洗脱率,见表 1。结果表明 HZ-16,HPD-722,HZ-816 型大孔树脂的



A. 对照品;B. 供试品;1. 柠檬苦素;2. 诺米林
图1 橘核提取液 HPLC

吸附率明显高于其他型号树脂,且这3种树脂相差不大;但HPD-722型树脂的洗脱率高于HZ-16和HZ-816型树脂,故选择HPD-722型树脂进行动态吸附试验。

2.4 大孔树脂纯化工艺考察

2.4.1 泄露曲线 将HPD-722型大孔树脂装入20 mm×500 mm的玻璃柱中,树脂体积20 mL,取柠檬苦素类物质4.634 9 g·L⁻¹的样品溶液过柱,流速1 BV·h⁻¹,收集流出液,每1 BV为1份,于500 nm处测定A,绘制泄露曲线,结果发现上样液体积>2.5 BV后,HPD-722型大孔树脂已达吸附饱和,样品溶液出现较大泄露,HPD-722型大孔树脂20 mL最多可吸附4.639 4 g·L⁻¹样品溶液2.5 BV。

2.4.2 清洗剂用量 取相同质量浓度的样品溶液60 mL,共5份,上样流速1 BV·h⁻¹,通过装有HPD-722型树脂20 mL的玻璃柱,分别加水10,20,30,40,50 mL冲洗,加90%乙醇以2 BV·h⁻¹的速度洗脱,测定洗脱液中柠檬苦素类物质含量。结果显示当水用量为1 BV时,已将水溶性杂质去除,同时不会造成柠檬苦素类物质过多损失。

2.4.3 上样液质量浓度 称取预处理好的HPD-722型树脂20 mL,湿法装柱,加1.54,2.50,3.50,5.50,6.00 g·L⁻¹的样品溶液各4 BV上柱,吸附完全,加1 BV水洗除杂,加95%乙醇2 BV洗脱,计算吸附量、吸附率、洗脱量和洗脱率,结果见表2,故确定上样液质量浓度在3.50~5.50 g·L⁻¹。

2.4.4 上样流速 称取预处理好的HPD-722型树脂20 mL,湿法装柱,取3.52 g·L⁻¹样品溶液4 BV上柱,共6份,上柱速率分别为1,2,3,4,5,6 BV·h⁻¹,收集洗脱液,按2.4.3项下方法洗脱,结果见表3。表明随着上样流速的升高吸附率逐渐降低,结合洗脱

表2 橘核中柠檬苦素类物质纯化工艺
上样液质量浓度考察(n=2)

上样液质量 浓度/g·L ⁻¹	吸附量 /mg	吸附率 /%	洗脱量 /mg	洗脱率 /%
1.54	92.76	75.29	81.86	88.33
2.50	165.39	82.70	139.69	84.46
3.50	255.68	91.31	210.55	82.35
5.50	394.35	89.62	312.36	79.21
6.00	417.05	86.89	327.80	78.60

率考虑,选择上样流速1~2 BV·h⁻¹。

表3 橘核中柠檬苦素类物质纯化工艺上样流速考察(n=2)

上样流速 /BV·h ⁻¹	吸附量 /mg	吸附率 /%	洗脱量 /mg	洗脱率 /%
1	231.03	82.04	200.26	86.68
2	228.82	81.26	192.76	84.24
3	227.13	80.66	200.08	88.09
4	225.29	80.00	192.96	85.65
5	205.78	73.08	185.37	90.08
6	198.42	70.46	165.18	83.25

2.4.5 上样液 pH 称取预处理好的HPD-722型树脂20 mL,湿法装柱,取一定质量浓度的样品溶液4份,调节pH分别为4.0,5.0,6.0,7.0,以2 BV·h⁻¹的流速上柱。结果发现当pH 6.0时,吸附率达到最高值83.11%,且洗脱率达89.40%,故选择样品溶液pH 6.0。

2.4.6 洗脱剂浓度 按上述优选的工艺条件吸附、除杂后,分别加等量60%,70%,80%,90%的乙醇溶液以2 BV·h⁻¹的流速进行洗脱,收集洗脱液,计算洗脱率。结果发现当选择80%乙醇时,洗脱率达最高值。

2.4.7 洗脱流速 按上述优选的工艺条件吸附、除杂后,加等量80%乙醇分别以1,2,3,4,5,6 BV·h⁻¹的流速进行洗脱,收集洗脱液,计算洗脱率,结果发现当洗脱速率为2 BV·h⁻¹时,HPD-722型大孔树脂对柠檬苦素类物质的洗脱率达最高值。

2.4.8 洗脱剂 pH 按上述优选的工艺条件吸附、除杂后,加等量80%乙醇以2 BV·h⁻¹的流速,调节洗脱液pH分别为5.0,6.0,7.0,8.0,计算洗脱率,结果显示当洗脱剂pH 7.0时,HPD-722型大孔树脂对柠檬苦素类物质的洗脱率达最高值。

2.4.9 洗脱剂用量 按上述优选的工艺条件吸附、除杂后,加80%乙醇以2 BV·h⁻¹的流速洗脱,收集洗脱液,每1 BV收集为1份,测定每份溶液中柠檬

苦素类物质含量,结果表明当洗脱机用量 6 BV 时,柠檬苦素类物质基本洗脱完全,结合生产成本考虑,选择 80% 乙醇用量 6 BV。

2.5 制品纯度测定 称取适量预处理好的 HPD-722 型树脂 3 份,湿法装柱,精密吸取 3.7 g·L⁻¹,pH 6.0 的样品溶液以 1 BV·h⁻¹ 的流速上柱吸附,放置 30 min,加 1 BV 水清除杂,加 pH 7.0 的 80% 乙醇 6 BV 以 2 BV·h⁻¹ 的流速洗脱,计算吸附率和洗脱率。洗脱液于 50 ℃,1.0 kPa 条件下进行回收,得干燥品,测定成品中柠檬苦素类物质、柠檬苦素及诺米林含量,见表 4。结果表明洗脱液中柠檬苦素类物质纯度 82.82%,其中柠檬苦素 22.53%,诺米林 45.90%。

表 4 柠檬苦素类物质制品纯度的测定						%
批号	吸附率	洗脱率	柠檬苦素类物质	柠檬苦素	诺米林	
201101	82.42	93.44	82.55	23.88	49.67	
201102	81.28	92.87	82.83	21.01	42.14	
201103	81.97	93.01	83.07	22.68	45.89	

3 讨论

大孔吸附树脂技术已被广泛用于三萜类化学成分的纯化^[10],本文采用 HPD-722 型大孔树脂对柠檬苦素类物质进行纯化,所得提取物中柠檬苦素类似物纯度 >80%,主要成分柠檬苦素、诺米林的质量分数分别高于 20% 和 40%。本文还对自制的柠檬苦素类似物提取物中正己烷、苯、甲苯、乙基苯、对二甲苯、间二甲苯、邻二甲苯、苯乙烯、二乙烯苯的残留做了检测,结果表明提取物中各物质残留量符合《中国药典》2010 年版二部附录Ⅷ中限量要求。柠檬苦素类似物为三萜类化合物,高温下性质不稳定^[10-11],本文采用橘核药材进行提取浓缩,按优选的工艺条件进行纯化,所得溶液经旋转蒸发仪浓缩成浸膏,放入五氧化二磷干燥器中干燥得固形物(干燥粉末),固形物得率 0.5%;建议大规模生产中

采用其他现代高效浓缩技术,如滤膜浓缩技术、反渗透浓缩技术、三效浓缩技术等,以提高固形物得率及柠檬苦素类似物的纯度。

[参考文献]

[1] 张彬,额都,任立群,等. 蒙药乳腺- I 号治疗乳腺增生研究现状与展望[J]. 吉林医药,2009,30(6):481.

[2] 蔡护华,桥永文男. 柑桔果实中柠檬苦素类化合物的研究现状与展望[J]. 植物学报,1996,38(4):328.

[3] Maneerat W, Laphookhieo S, Koysomboon S, et al. Antimalarial, antimycobacterial and cytotoxic limonoids from *Chisocheton siamensis*[J]. Phytomedicine,2008,15(12):1130.

[4] Genupur A, Jesu J L, Srinivasan N, et al. Synthesis and cytotoxicity of novel isomeric C-seco limonoids[J]. Eur J Med Chem,2006,41(8):997.

[5] Xie F, Zhang M, Zhang C F, et al. Anti-inflammatory and analgesic activities of ethanolic extract and two limonoids from *Melia toosendan* fruit[J]. J Ethnopharmacol,2008,117(3):463.

[6] 罗水忠,潘利华. 柠檬苦素类似物的研究与应用进展[J]. 饮料工业,2008,11(1):6.

[7] 施英,徐玉娟,吴娱明,等. 桔核中柠檬苦素类物质纯化工艺的研究[J]. 广东农业科学,2006(11):70.

[8] 田庆国,丁霄霖. 测定橘核中柠檬苦素类似物的分光光度法[J]. 分析测试学报,1999,18(5):45

[9] 何中燕,裴瑾,莫书蓉,等. 不同橘核炮制品中柠檬苦素和诺米林的测定[J]. 中成药,2011,33(10):1761.

[10] 张旭,王锦玉,全燕,等. 大孔树脂技术在中药提取纯化中的应用及展望[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(6):286.

[11] 刘亮,戚向阳,董绪燕. 柑橘中柠檬苦素类似物的研究新进展[J]. 农产品加工,2007(7):37.

[12] 王瑛,张艳华,王伟明. 中药三萜类化合物提取纯化工艺的研究进展[J]. 黑龙江医药,2010,23(2):226.

[责任编辑 刘德文]