

葡萄柚精油中抗癌成分橙油素的分离及鉴定

吴大鹏, 王宏涛, 张俊杰, 洪燕珍, 苏玉忠, 李 军
(厦门大学 化学化工学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 橙油素是广泛存在于柑橘类果实中的天然抗癌活性成分。选用 SP70 大孔吸附树脂分离纯化葡萄柚精油中的橙油素, 该树脂对于橙油素的吸附容量和解吸率分别达到 14.53 mg/g 和 83.32%, 并成功地从树脂床层的洗脱液中结晶分离出橙油素晶体。对所得晶体分别采用差示扫描量热仪(DSC)、紫外吸收光谱(UV)、红外吸收光谱(IR)、电喷雾质谱(ESI-MS)进行定性分析, 分析结果与橙油素标准品相符合。进一步采用高效液相色谱(HPLC)对所得晶体进行定量分析, 结果表明所得晶体中橙油素的质量分数可达 85%。

关键词: 葡萄柚精油; 橙油素; 大孔树脂吸附; 结晶

中图分类号: TQ 028 文献标识码: A 文章编号: 1005-9954(2011)11-0074-05

Separation and identification of auraptene from grapefruit peel oil

WU Da-peng, WANG Hong-tao, ZHANG Jun-jie, HONG Yan-zhen, SU Yu-zhong, LI Jun

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian Province, China)

Abstract: Auraptene exists widely in the peels and juice sacs of citrus species and is reported to be an effective inhibitor of chemical carcinogenesis in some rodent models. The separation and purification of auraptene from the grapefruit peel oil was performed by SP70 macroporous resin adsorption. The amount adsorbed and the recovery of auraptene were 14.53 mg/g and 83.32% respectively. Auraptene was crystallized out from the concentrated eluate of macroporous resin bed successfully. Differential scanning calorimetric (DSC), ultraviolet spectrum (UV), infrared spectroscopy (IR) and electrospray ionization mass spectroscopy (ESI-MS) were all used to analyze the obtained crystals qualitatively. The analytical results are in accordance with that of auraptene standard. Furthermore, high performance liquid chromatography (HPLC) was utilized to quantify auraptene of the crystals obtained. The mass fraction of auraptene in the obtained crystals can reach 85%.

Key words: grapefruit peel oil; auraptene; macroporous resin adsorption; crystallization

橙油素广泛存在于柑橘类植物的果皮及果肉中, 是由香叶基和香豆素衍生出的一种单萜类香豆素的衍生物。1997 年 Murakami 等^[1]首次报道了橙油素对小鼠皮肤肿瘤的抑制作用。此后, 许多学者研究发现橙油素能够有效抑制啮齿动物的皮肤、口腔、食道、结肠、肝等多部位肿瘤的形成^[2-6], 橙油素作为近年来发现的对多种癌症具有有效抑制作用的天然化学抑制剂, 将成为继紫杉醇之后又一个具有研究开发潜力的新天然抗癌药物。

目前, 国内外尚无直接从葡萄柚精油中提取橙油素的研究报道。并且, 对于柑橘类果皮中橙油素的分离提取研究也鲜有报道, 其提取分离方法主要

采用溶剂结晶法^[7]和柱层析法^[8-9]。溶剂结晶法耗时较长, 操作程序繁琐, 溶剂用量大且不易回收; 柱层析法提取工艺过程费时, 且所用吸附剂硅胶很难重复使用; Yasuo 等^[10]采用大孔树脂吸附法从八朔精油中获得了橙油素质量分数达到 64% 的浓缩液, 但并没有进一步纯化获得较高纯度的橙油素晶体。大孔树脂吸附方法简单省时, 吸附及解吸的条件温和, 树脂再生处理方便, 且可以重复使用。

Ogawa 等^[11]将柑橘类植物果皮及果肉粉碎后, 采用丙酮和甲醇进行多次萃取浓缩的方法, 对 100 多种柑橘类植物的果皮及果肉中含有的橙油素进行提取实验, 然后采用高效液相色谱(HPLC)分析提

收稿日期: 2011-04-06

基金项目: 福建省新世纪人才支持项目(0000-X04157)

作者简介: 吴大鹏(1987—)男, 硕士, 研究方向为天然产物提取分离技术, E-mail: danpeng26@163.com; 王宏涛, 男, 副教授, 通讯联系人, 研究方向为超临界流体及吸附技术, 电话: (0592) 2183055, E-mail: wanght@xmu.edu.cn.

取液中橙油素的质量分数,分析结果表明葡萄柚果皮中橙油素的质量分数远高于果肉中,最高可达 0.043 2%。

本研究选用葡萄柚精油作为实验原料,经 HPLC 分析可知其中橙油素的质量分数为 0.765%。实验采用 SP70 大孔树脂吸附法分离纯化葡萄柚精油中的橙油素,洗脱液经减压蒸馏回收溶剂,得到的浓缩液采用结晶法纯化得到橙油素晶体。橙油素晶体的定性分析分别采用差示扫描量热仪(DSC)、紫外吸收光谱(UV)、红外吸收光谱(IR)、电喷雾质谱(ESI-MS)进行分析检测,并与橙油素标准品的检测结果进行比较。实验所得晶体中橙油素的定量分析采用 HPLC 测定。

1 实验

1.1 原料及试剂

葡萄柚精油,上海回恩国际贸易有限公司;橙油素标准品(质量分数 $\geq 98\%$),深圳博林化工有限公司;SP70 大孔吸附树脂,北京绿百草科技发展有限公司;甲醇(色谱纯),乙醇(分析纯),国药集团化学试剂有限公司;去离子水,厦门大学化学化工学院药品库。

1.2 吸附分离与结晶纯化

橙油素的化学结构式如图 1 所示。

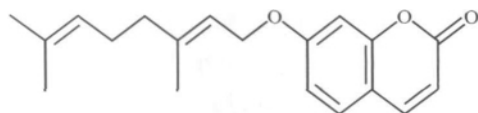


图 1 橙油素的化学结构式

Fig. 1 Structural formula of auraptene

由于橙油素分子为弱极性,故葡萄柚精油中橙油素的吸附分离过程所用树脂选用弱极性大孔吸附树脂 SP70。鉴于橙油素主要应用于医药领域中,本实验研究选用无毒性的乙醇-水体系作为大孔树脂解吸的洗脱剂。市购的 SP70 大孔吸附树脂经预处理后采用湿法装填吸附柱,再用蒸馏水冲洗吸附柱待用。原料葡萄柚精油以一定流速从上部流入吸附柱,葡萄柚精油中的橙油素被树脂吸附。然后采用体积分数为 50% 的乙醇水溶液第 1 次洗脱吸附柱,以除去吸附柱内精油中大部分极性较大的杂质,此时被树脂吸附的橙油素不会被洗脱下来。然后再用体积分数为 90% 的乙醇水溶液将吸附在 SP70 大孔吸附树脂上的橙油素洗脱下来,实现葡萄柚精油中橙油素的分离。

第 2 次洗脱得到的洗脱液经过滤和减压蒸馏以回收洗脱溶剂。减压蒸馏条件:水浴加热温度为 50 °C,真空度为 0.09 MPa。将所得到的浓缩液静置于低温环境析出晶体后将晶体从浓缩液中分离出来,用石油醚和氯仿反复洗涤以除去晶体表面上的杂质,最终得到白色晶体。

1.3 分析检测

熔点测定条件:利用 DSC 测定橙油素的熔点。分析测定仪器采用 NETZSCH DSC 204 差示扫描量热仪,温度范围为 34—100 °C,升温速率为 5 °C/min,橙油素样品 5.000 mg,Al 坩埚 10.000 mg。

紫外吸收光谱条件:分析测定仪器采用 Perkin-Elmer Lambda 35 UV Spectrometer,溶剂为色谱纯甲醇,波长范围为 190—350 nm,吸收度量程为 0—3,狭缝 2 nm,扫描速度为 200 nm/min。

红外吸收光谱条件:分析测定仪器采用 Nicolet Avatar 380 E. S. P 红外光谱仪,采用 KBr 压片。

质谱条件:分析测定仪器采用 Finnigan LCQ 型质谱仪,APCI+ 离子源, m/z 为 50—500,电离源温度 320 °C,毛细管温度 50 °C,甲醇为流动相,鞘气(氮气)流速 8.33 L/min。

高效液相色谱条件:分析测定仪器采用 Agilent Technologies 1200 Series 高效液相色谱仪,采用 XDB-C18 色谱柱,柱温保持在 40 °C,流动相体积比为 80:20 的甲醇水溶液,流速为 0.5 mL/min,采用 UV 检测器,依据紫外光谱扫描结果波长设定为 325 nm,进样量为 20 μ L。

2 结果与讨论

2.1 吸附分离

图 2 为 SP70 大孔吸附树脂对葡萄柚精油中橙油素的静态吸附曲线。由图中吸附实验结果可以计算出 SP70 大孔树脂对橙油素的吸附容量为 14.53 mg/g(以每 g 干树脂计)。吸附了橙油素的吸附柱采用体积分数 90% 的乙醇水溶液进行洗脱,洗脱液采用 HPLC 分析,经计算得到橙油素的解吸率高达 83.32%,表明橙油素的吸附容量和解吸率均比较理想。同时,从图 2 可以看出 SP70 大孔吸附树脂对橙油素的吸附速度较快,0.5 h 即达到吸附饱和。此外,SP70 大孔吸附树脂具有韧性大,机械强度高,不易破损,使用寿命长等优点,因此本实验选用 SP70 大孔吸附树脂分离纯化葡萄柚精油中的橙油素较为适合。

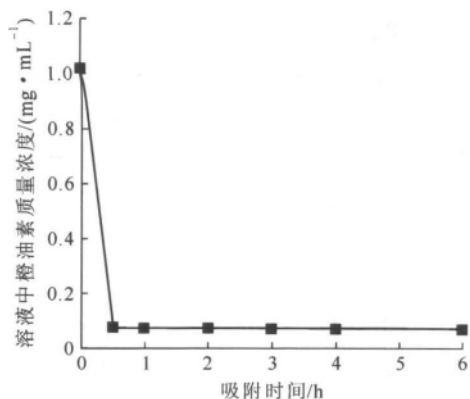


图2 SP70 大孔树脂对橙油素的静态吸附曲线

Fig. 2 Static adsorption curve of auraptene on SP70 macroporous resin

2.2 熔点测定

图3 为从葡萄柚精油中结晶纯化所得晶体与橙油素标准品的 DSC 分析曲线。从图中可看出实验所得晶体熔点为 60.885 °C ,与橙油素标准品的熔点 62.008 °C 较为接近。但从 2 个样品热流值的比较上看,橙油素标准品的热流值大于实验所得晶体,表明实验所得晶体中存在一定量的杂质成分,且杂质成分与橙油素的熔融焓相差较大。因此,从上述 DSC 分析结果的比较可初步确定葡萄柚精油结晶纯化所得晶体为橙油素,同时晶体产物中还含有少量杂质成分。

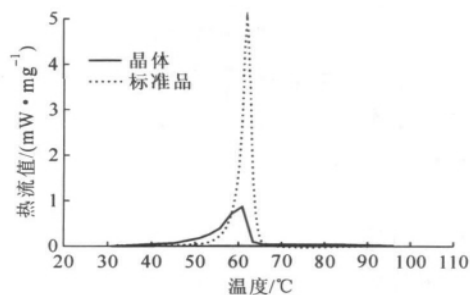


图3 实验所得晶体和橙油素标准品的 DSC 曲线

Fig. 3 DSC curves of obtained crystals and auraptene standard

2.3 紫外光谱鉴定

图4 为从葡萄柚精油中结晶纯化所得晶体与橙油素标准品的紫外光谱图。从图中可以看出实验所得晶体与橙油素标准品甲醇溶液的紫外吸收光谱图相吻合,且实验所得晶体的最大吸收波长在 325 nm 处,与橙油素标准品的最大吸收波长相同。橙油素分子的最大吸收波长依据 Woodward 规则计算^[12]: 对于 $\alpha\beta$ 不饱和酯,基本值为 193 nm; 2 个共轭双键,增加 60 nm; 1 个环外双键,增加 5 nm; γ 及更高位有 2 个取代烷基,增加 36 nm; δ 更高位有 1 个取

代烷氧基,增加 31 nm,相加后可算出橙油素的 λ_{max} 为 325 nm。因此,从上述紫外光谱图分析结果的比较可确定葡萄柚精油结晶纯化所得晶体为橙油素。

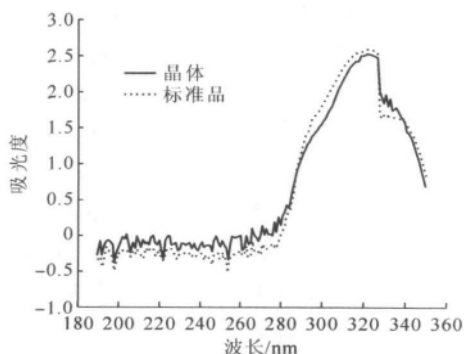


图4 实验所得晶体与橙油素标准品的紫外光谱图

Fig. 4 UV spectrograms of obtained crystals and auraptene standard

2.4 红外光谱鉴定

图5 为从葡萄柚精油中结晶纯化所得晶体与橙油素标准品的红外光谱图。从图中可以看出实验所得晶体与橙油素标准品的红外扫描结果相符合,特征基团一致。实验所得晶体在 1128 cm^{-1} 处有 1 个较强吸收峰,说明分子中有 C—O 键存在于六元双氧环中,而橙油素的分子中存在六元双氧环,其中 1 个碳原子上连着 1 个羰基;实验所得晶体在 1236 cm^{-1} 处是烷基芳基醚的特征峰,证明了橙油素分子是由香叶基和香豆素衍生物构成的醚;在 1610 cm^{-1} 处有 1 个很强的吸收峰,该峰是芳香化合物中 C=C 双键的特征峰,同时由于共轭作用存在的 π 键使得 C=C 双键刚性降低,伸缩频率下降;在 1735 cm^{-1} 处的吸收峰是 C=O 双键的特征峰,由于在环酮中羰基的角张力会使得 C=O 双键上有更大的电子密度,使得其键更强,高于 1720 cm^{-1} 。因此,从上述红外光谱图分析结果的比较可确定葡萄柚精油结晶纯化所得晶体为橙油素。

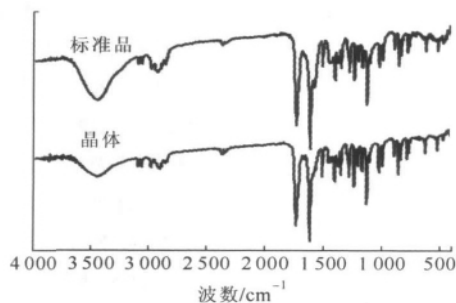


图5 实验所得晶体与橙油素标准品的红外光谱图

Fig. 5 IR spectrograms of obtained crystals and auraptene standard

2.5 质谱鉴定

图6为从葡萄柚精油中结晶纯化所得晶体与橙油素标准品的质谱分析谱图。橙油素分子中只含有C、H、O 3种元素,相对分子质量为298.38。从图中可以看出,由于在正离子扫描条件下质子化,橙油素的分子离子峰 $[M+H]^+$ 出现在 m/z 为299.0,同时该峰高度明显高于其他峰,表明橙油素分子结构比较稳定;而对于醚的断裂,通常表现为失去烷基,即橙油素会失去香叶基,形成了 m/z 为137.4和163.3 2个碎片峰; m/z 为141.3应为香叶基中的2个C=C双键打开而吸引了4个 H^+ 所形成, m/z 为127.3则是 m/z 为141.3失去了1个 CH_2 所形成; m/z 为219.2仅在实验所得晶体分析图中出现,而未出现于橙油素标准品分析图中,该峰为实验所得晶体中所含杂质的离子峰。因此,从上述质谱图分析结果的比较可确定葡萄柚精油结晶纯化所得晶体为橙油素,同时晶体中含有少量杂质成分。

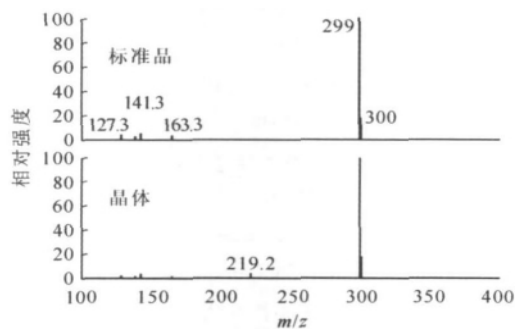


图6 实验所得晶体与橙油素标准品的质谱分析图

Fig.6 MS chromatograms of obtained crystals and auraptene standard

2.6 高效液相色谱定量分析

通过以上定性分析检测,可确定从葡萄柚精油中结晶纯化所得晶体为橙油素,同时晶体中含有少量杂质成分。为进一步确定实验所得晶体中橙油素的质量分数,本研究采用HPLC对晶体中橙油素的质量分数进行测定。首先采用橙油素标准品制得橙油素标准曲线,然后在相同分析条件下对实验所得晶体进行分析,根据分析结果计算晶体中橙油素的质量分数。图7为从葡萄柚精油中结晶纯化所得晶体与橙油素标准品的高效液相谱图。从图中可以看出,实验所得晶体与橙油素标准品的停留时间完全相同,进一步定性确定了实验所得晶体中橙油素的存在。另外,从图中可以看出实验所得晶体与橙油素标准品均存在极少且较小的杂质峰。通过对多次实验所得晶体的分析和计算,得出实验所得晶体中橙油素的质量分数超过85%。

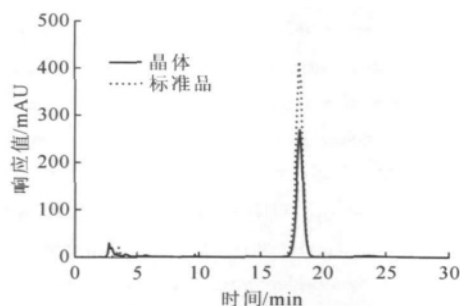


图7 实验所得晶体和橙油素标准品的高效液相色谱图

Fig.7 HPLC chromatograms of obtained crystals and auraptene standard

3 结论

本研究采用SP70大孔树脂吸附分离纯化葡萄柚精油中的抗癌药物成分橙油素。橙油素在SP70大孔树脂上的吸附容量和解吸率分别达到14.53 mg/g和83.32%。从吸附分离得到的洗脱液中成功地结晶分离出橙油素晶体,通过对分离所得晶体和橙油素标准品的差示扫描量热仪、红外光谱、紫外光谱及质谱的定性分析比较,证明实验所得晶体为橙油素,另外还含有少量杂质成分。并采用高效液相色谱分析测得该晶体中橙油素的质量分数超过85%。该实验研究表明选用SP70大孔吸附树脂分离纯化葡萄柚精油中的抗癌药物成分橙油素较为适合。

参考文献:

- [1] MURAKAMI Akira, KUKI Wataru, TAKAHASHI Yasuo, et al. Auraptene, a citrus coumarin, inhibits 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced tumor promotion in ICR mouse skin, possibly through suppression of superoxide generation in leukocytes [J]. *Jpn J Cancer Res*, 1997, 88 (5): 443-452.
- [2] KAWABATA Kyuichi, TANAKA Takuji, YAMAMOTO Tomohiro, et al. Suppression of nitrosomethyl-benzylamine-induced rat esophageal tumor genesis by dietary feeding of auraptene [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2000, 19 (1): 45-52.
- [3] TANAKA Takuji, KAWABATA Kyuichi, KAKUMOTO Mikio, et al. Chemoprevention of 4-nitroquinoline-1-oxide-induced oral carcinogenesis by citrus auraptene in rats [J]. *Carcinogenesis*, 1998, 19 (3): 425-431.
- [4] SAKATA Keiko, HARA Akira, HIROSE Yoshinobu, et al. Dietary supplementation of the citrus antioxidant auraptene inhibits *N,N*-diethyl nitrosamine-induced rat hepatocarcinogenesis [J]. *Oncology*, 2004, 66 (3): 244-252.

- [5] QIAO Zheng, YOSHINOBU Hirose, NAOKI Yoshimi, et al. Further investigation of the modifying effect of various chemopreventive agents on apoptosis and cell proliferation in human colon cancer cells [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2002, 128(10): 539-546.
- [6] TANAKA Takuji, KOHNO Hiroyuki, MURAKAMI Manabu, et al. Suppressing effects of dietary supplementation of the organoselenium 1,4-phenylenebis(methylene)selenocyanate and the Citrus antioxidant auraptene on lung metastasis of melanoma cells in mice [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(14): 3713-3716.
- [7] TANAKA Takuji, KAWABATA Kyuichi, KAKUMOTO Mikio, et al. Citrus auraptene exerts dose dependent chemopreventive activity in rat large bowel tumor genesis: the inhibition correlates with suppression of cell proliferation and lipid per oxidation and with induction of phase II drug-metabolizing enzymes [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(6): 2550-2556.
- [8] KARIYONE Tatsuo, MATSUNO Takao. Studies on the constituents of orange oil. I. On the structure of auraptene [J]. *Pharmaceutical Bulletin*, 1953, 1(2): 119-122.
- [9] 冯宝民, 裴月湖. 柚皮中的香豆素类化学成分的研究 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2000, 17(4): 253-255.
- [10] YASUO Takahashi, NOBUYA Inaba, SHIGERU Kuwahara, et al. Rapid and convenient method for preparing auraptene-enriched product from hassaku peel oil: implications for cancer-preventive food additives [J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(11): 3193-3196.
- [11] KAZUNORI Ogawa, AKEMI Kawasaki, TOSHIO Yoshida, et al. Evaluation of auraptene content in citrus fruits and their products [J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48(5): 1763-1769.
- [12] 柯以侃, 董慧茹. 分析化学手册: 第 3 分册 [M]. 2 版. 北京: 化学工业出版社, 1998: 631.

【上接第 69 页】

(3) 无论是一次性加入溶剂或分段加入溶剂, 延长反应时间虽然可提高 PVAc 的平均聚合度, 但 GPC 分析结果显示小相对分子质量 PVAc 增加或小相对分子质量 PVAc 分子数比例相对增加, 醇解后 PVA 的聚合度明显减小, 表明反应后期对 PVAc 支链化程度加剧, 如反应总时间到 7 h 时, PVA 的聚合度为醇解前 PVAc 聚合度的 68.4%。

参考文献:

- [1] SANDLER S R, KARO W, BONESTEEL J A, et al. *Polymer synthesis and characterization: a laboratory manual* [M]. San Diego: Academic Press, 1998: 71-72.
- [2] CHATTERJEE A, PARK W S, GRAESSLEY W W. Free radical polymerization with long chain branching: batch polymerization of vinyl acetate in *t*-butanol [J]. *Chemical Engineering Science*, 1977, 32(2): 167-178.
- [3] 吴行. 高分子量聚乙烯醇的合成 [J]. *维纶通讯*, 1997, 17(4): 7-12.
- [4] TAYLOR T W, REICHERT K H. The influence of reactor type and operating conditions on the molecular weight distribution in vinyl acetate polymerization [J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 1995, 30(4): 227-250.
- [5] AMBADE A V, KUMAR A. Controlling the degree of branching in vinyl polymerization [J]. *Prog Polym Sci*, 2000, 25(8): 1141-1170.
- [6] OKIEMEN E F. Chain transfer processes in vinyl polymerisation reinitiation by transfer radicals in vinyl acetate polymerisation [J]. *European Polymer Journal*, 1986, 22(2): 175-177.
- [7] 罗小砚, 张巧玲, 谢龙, 等. 采用新型引发剂乳液聚合法合成高分子量聚乙烯醇 [J]. *化学通报*, 2006(8): 606-610.
- [8] CHERN C. Emulsion polymerization mechanisms and kinetics [J]. *Prog Polym Sci*, 2006, 31(5): 443-486.
- [9] 刘新文, 崔俊青. 两步法生产高聚合度聚乙烯醇 [J]. *山西化工*, 2007, 6(6): 55-56.
- [10] TEODORESCU M, DIMONIE M, DRAGHICI C, et al. Grafting styrene onto poly(vinyl acetate) by free radical chain transfer reactions [J]. *Reactive & Functional Polymers*, 2004, 61(3): 387-395.
- [11] 李克友, 张菊华, 向福如. 高分子和成原理及工艺学 [M]. 北京: 科学出版社, 1999.