

# 花椒油素的纯化和鉴定

孙克奎

(黄山学院旅游学院, 安徽黄山 245021)

**摘要:** 研究了从花椒中提取制备高纯花椒油素的方案。采用同时蒸馏萃取(SDE)提取花椒油素, 利用硅胶柱色谱分离得到粗品, 经过重结晶纯化得高纯花椒油素, 利用核磁共振(NMR)和反相高效液相色谱(RP-HPLC)进行定性和定量分析。在 SDE 过程中, 料水比为 1:10, 溶剂(无水乙醚)用量为 60 mL, 提取时间为 1.5 h 时, 粗提物中花椒油素含量达 47.26%。以洗脱液配比(乙酸乙酯:石油醚)为 1:15、径高比为 1:12、样品与硅胶质量比(上样量)为 1:40、洗脱液流速为 4 mL/min 的硅胶柱分离得到花椒油素粗品(纯度 81.79%), 回收率达 99.12%。最后通过重结晶获得高纯花椒油素(纯度 98.23%), 总回收率达 90.63%, 得率为 0.88%。NMR 分析证实晶体确为花椒油素。该方案可实现从花椒中高回收地制取高纯花椒油素, 为拓宽花椒的精深加工提供参考。

**关键词:** 花椒; 花椒油素; 高效液相色谱; 同时蒸馏萃取; 硅胶; 重结晶; 核磁共振

文章编号: 1673-9078(2015)1-137-141

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.1.025

## Purification and Identification of Xanthoxylin

SUN Ke-kui

(Tourism College, Huangshan University, Huangshan 245021, China)

**Abstract:** The aim of this work was to study an approach for the preparation of high-purity xanthoxylin from *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. Xanthoxylin was extracted by simultaneous distillation extraction (SDE), crude xanthoxylin was isolated using a silica gel column, and high-purity xanthoxylin was obtained by recrystallization. Nuclear magnetic resonance (NMR) and reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) were used for qualitative and quantitative analysis, respectively. During the SDE, the following conditions were used: material to water ratio 1: 10; solvent volume 60 mL; extraction time 1.5 h. RP-HPLC analysis showed that the xanthoxylin content in the crude extract was 47.26%. Crude xanthoxylin was isolated using a silica gel column under the following conditions: eluent ratio (ethyl acetate: petroleum ether) 1: 15; diameter to height ratio 1:12; sample to silica gel ratio 1:40; eluent rate 4 mL/min. The purity of the isolated xanthoxylin was 81.79% and the recovery was 99.12%. Finally, high-purity xanthoxylin (98.23%) was obtained by recrystallization; the total recovery was 90.63% and the yield was 0.88%. NMR analysis showed that the isolated crystal was xanthoxylin. Thus, this approach could achieve the preparation of high-purity xanthoxylin, with high-recovery, from the leaves of *Zanthoxylum bungeanum* and serve as a reference for broadening the scope of *Zanthoxylum bungeanum* deep-processing.

**Key words:** *Zanthoxylum bungeanum* Maxim.; xanthoxylin; high performance liquid chromatography; simultaneous distillation extraction; silica gel; recrystallization; nuclear magnetic resonance

花椒 (*Zanthoxylum bungeanum* Maxim.) 属芸香科花椒属植物, 在我国分布广泛, 多见于平原与海拔较高的山地<sup>[1]</sup>。花椒在我国应用已有两千多年历史, 是常用的调味品, 可增麻香之味, 被誉为“八大味”之一<sup>[2]</sup>。传统中医认为花椒性温, 有温中散寒、止痛杀虫、健胃除湿、解毒理气、止痒祛腥的功效; 现代药理学研究发现, 花椒具有抑菌、驱虫、镇痛、抗血栓、抗癌等作用。花椒的化学成分主要有挥发油、生物碱、酰胺、香豆素和脂肪酸等, 花椒果皮中含有丰

富的花椒油素 (Xanthoxylin), 化学名 2-羟基-4, 6-二甲氧基苯乙酮<sup>[3]</sup>。

现代医学研究发现, 花椒油素可抑制血小板凝聚, 抑制药物引起的肠、子宫、膀胱等肌肉收缩, 引起小鼠胚胎心肌细胞的自发搏动, 其衍生物具有驱虫、杀菌、防霉的功效<sup>[4-5]</sup>。花椒油素是间苯三酚的衍生物, 很多资料显示多种间苯三酚衍生物都有生理活性, 引起化学与药学研究人员重视<sup>[6]</sup>。花椒油素的来源分两类, 一类是化工合成, 以间苯三酚为原料, 经过酰化反应和甲基化反应得到花椒油素<sup>[7]</sup>; 另一类是从植物中提取, 主要是通过溶剂浸提和色谱分离收集花椒油素, 多用于分析测定, 测定时常用反相液相色谱法<sup>[8]</sup>, 极少用于制备。此外, 花椒油素多出现在溶剂

收稿日期: 2014-03-27

基金项目: 安徽省教育厅高校人文社科重点研究基地项目 (SK2013B484);

黄山学院科学研究计划项目 (2010xsk005)

作者简介: 孙克奎 (1978-), 男, 讲师, 研究方向: 烹饪营养与食品卫生

浸提和蒸馏获得的花椒油树脂和精油中<sup>[3]</sup>, 仅限于获得粗提物或混合物, 并未发展为制备高纯花椒油素。为充分收集花椒中所含花椒油素, 并制备高纯产品, 需设计新的工艺方案。本文使用同时蒸馏萃取法、色谱柱层析、重结晶组成工艺方案制备花椒油素, 并通过反相高效液相色谱(RP-HPLC)进行定量测定, 通过核磁共振(NMR)进行定性验证。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

鲜花椒采集于安徽黄山, 以全果实作原料, 水分含量为 71.49%。AR224CN 电子天平, 奥豪斯(上海)仪器有限公司; 1100 型高效液相色谱仪, 配备四元梯度泵、自动进样器、二极管阵列检测器、化学工作站, 美国 Agilent; AVANCE III 400MHz 全数字化核磁共振谱仪, 瑞士 Bruker; 柱层析硅胶(100~200 目)和 G254 硅胶板, 青岛海洋; 标准品花椒油素(97%)、氘代氯仿(99.8%)、甲醇(色谱纯), 上海 Sigma-Aldrich; 其他试剂(均为分析纯), 购自国药集团化学试剂有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 花椒油素的测定

花椒油素的测定方法参考文永新等建立的反相高效液相色谱法(RP-HPLC)<sup>[8]</sup>。色谱条件: 色谱柱为 Agilent ZORBAX XDB-C<sub>18</sub>(4.6 mm×150 mm, 5 μm); 柱温 30 °C; 甲醇:水=70:30 (V/V)作为流动相; 流速 1 mL/min; 进样量 10 μL; 检测波长 290 nm。采用外标法定量。

#### 1.2.2 同时蒸馏萃取(SDE)

为维持蒸馏的正常进行选择料水比 1:10(鲜花椒:水), 称取 100 g 鲜花椒, 加 1 L 蒸馏水于 2 L 烧瓶, 接 Likens-Nickerson 同时蒸馏萃取装置, 另一侧接 500 mL 烧瓶, 加入适量无水乙醚, 水浴 50 °C 加热, 提取花椒油素。提取结束后, 减压回收无水乙醚并收集粗提物。实验平行 10 次。测定粗提物中花椒油素含量, 确定最佳溶剂用量和提取时间。

#### 1.2.3 硅胶柱层析

使用层析用硅胶(50 g)装柱(长度 400 mm, 直径 23 mm), 称量粗提物, 溶于 5 mL 洗脱液上样, 洗脱液作为流动相, 以 20 mL 为一个单元流份收集。每单元流份用薄层层析点样跟踪分析其所含组分, 挥去溶剂收集流份中溶质, 并精密称量其质量绘制洗脱曲线。柱分离所用洗脱液按不同比例配置(乙酸乙酯:

石油醚(60~90 °C))。对层析柱的洗脱液(乙酸乙酯:石油醚)、径高比、样品与硅胶质量比(上样量)和洗脱液流速进行优化。在最佳洗脱条件下分离, 收集相同溶质的流份, 室温下减压回收溶剂, 再收集溶质并称重, 测定其花椒油素含量, 计算回收率。

#### 1.2.4 重结晶

将加热沸腾的石油醚(60~90 °C)加入盛有花椒油素粗品的烧杯中, 至固体完全溶解。迅速过滤, 滤液于室温静置缓慢冷却 2 h, 再置于 4 °C 冰箱中 2 h, 最后置于 -20 °C 冰箱过夜。溶液经过抽滤, 使母液和晶体分离, 收集晶体; 母液中残留物也被收集, 再重结晶收集晶体, 最大限度收集花椒油素。对花椒油素粗品进行 3 次重结晶, 测定其纯度。

#### 1.2.5 核磁共振分析

将重结晶得到的高纯花椒油素溶解于氘代氯仿(纯度 99.8%)中, 终浓度为 10 mmol/L。以四甲基硅烷为内标物, 利用核磁共振仪测定氢谱(<sup>1</sup>H-NMR)和碳谱(<sup>13</sup>C-NMR)。

## 1.3 数据分析

数据均以(平均值±标准偏差)表示, 不同水平间差异采用 SPSS 16.0 进行差异显著性分析(ANOVA), 以 P<0.05 确定差异是否具有统计学意义。计算粗提物和花椒油素得率时, 以扣去水分的花椒干物质计算; 计算回收率时, 分不同阶段和总回收率分别计算。得率和回收率按下式计算:

$$\text{得率}/\% = \text{收得物质质量} / \text{花椒质量(干基)}$$

$$\text{回收率}/\% = \text{处理后得到花椒油素质量} / \text{基料中花椒油素质量}$$

## 2 结果与讨论

### 2.1 花椒油素的提取

为最大限度提取花椒中所含花椒油素, 使用新鲜花椒全果实为原料。在固定料水比的前提下, 对同时蒸馏萃取的无水乙醚用量和提取时间进行优化, 结果见图 1。根据方差分析(P<0.05)结果, 无水乙醚用量为 50 mL 时, 再增加溶剂用量无助于提高得率(图 1a)。溶剂用量过小, 其蒸发量小, 不足以维持蒸发冷凝回流的运行过程, 故得率偏低; 而用量过大, 无益于得率提高, 并增加成本。由图 1b 知, 提取 1.5 h 后花椒油素得率未显著(P>0.05)增加。因此认为 SDE 最佳参数为无水乙醚用量 50 mL, 提取时间 1.5 h。

粗提物呈白色, 经 RP-HPLC 测定发现粗提物中花椒油素含量达 47.26% (表 1)。目前, 花椒油素的提取多使用有机溶剂, 郑安庆等<sup>[9]</sup>使用乙醇、乙酸乙

酯、氯仿等从花椒中提取花椒油素，文永新、朱廷春等<sup>[8, 10]</sup>使用甲醇、乙酸乙酯提取艾纳香中花椒油素。但是，溶剂浸提法收获的粗提物色泽深、成分复杂，为后续分离纯化工作增加难度，所以仅限于提取粗提物或分析测试应用，作为制备工艺并不适合。同时，王远辉等<sup>[11]</sup>报道蒸馏得到的花椒精油和艾纳香挥发油中都含有较高比例的花椒油素，说明通过蒸馏方式也可提取花椒油素。而且，蒸馏得到的挥发物相对纯净，杂质较少。结果证实，同时蒸馏萃取法可从花椒中蒸出并收集到花椒油素，而粗提物中花椒油素含量达47%（表1），富集较高含量的目标物将降低后续分离的难度。

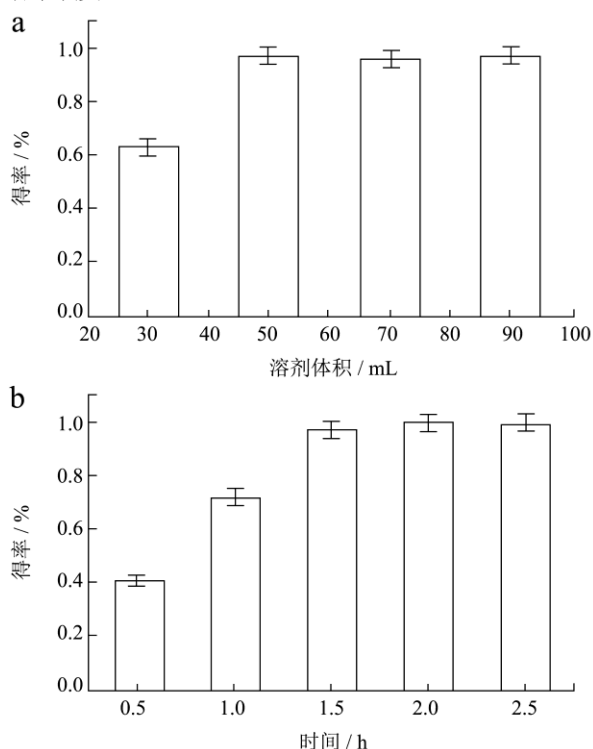


图1 同时蒸馏萃取法中溶剂用量与提取时间对花椒油素得率的影响

Fig.1 Influence of solvent volume and extraction time on the yield of xanthoxylin in SDE

表1 不同阶段花椒油素的产量

Table 1 Yields of xanthoxylin in the different steps

阶段	粗提物得率/%	花椒油素得率/%	纯度/%	回收率/%
同时蒸馏萃取	2.05±0.09	0.97±0.03	47.26±1.92	100.00±2.31
柱层析分离	1.18±0.06	0.96±0.03	81.79±1.42	99.12±1.84
重结晶	0.89±0.02	0.88±0.02	98.23±2.35	90.63±1.96

## 2.2 花椒油素的分离

花椒油素与挥发组分同时被蒸馏得到，花椒中挥发物多为萜类化合物<sup>[5]</sup>，硅胶柱色谱常被用来分离此

类化合物。硅胶柱是一种极性柱，自身含有羟基使其更易吸附极性较强的化合物，而极性较低的化合物先流出层析柱<sup>[12]</sup>。优化硅胶柱色谱条件后，从粗提物中分离到花椒油素，结果见图2。

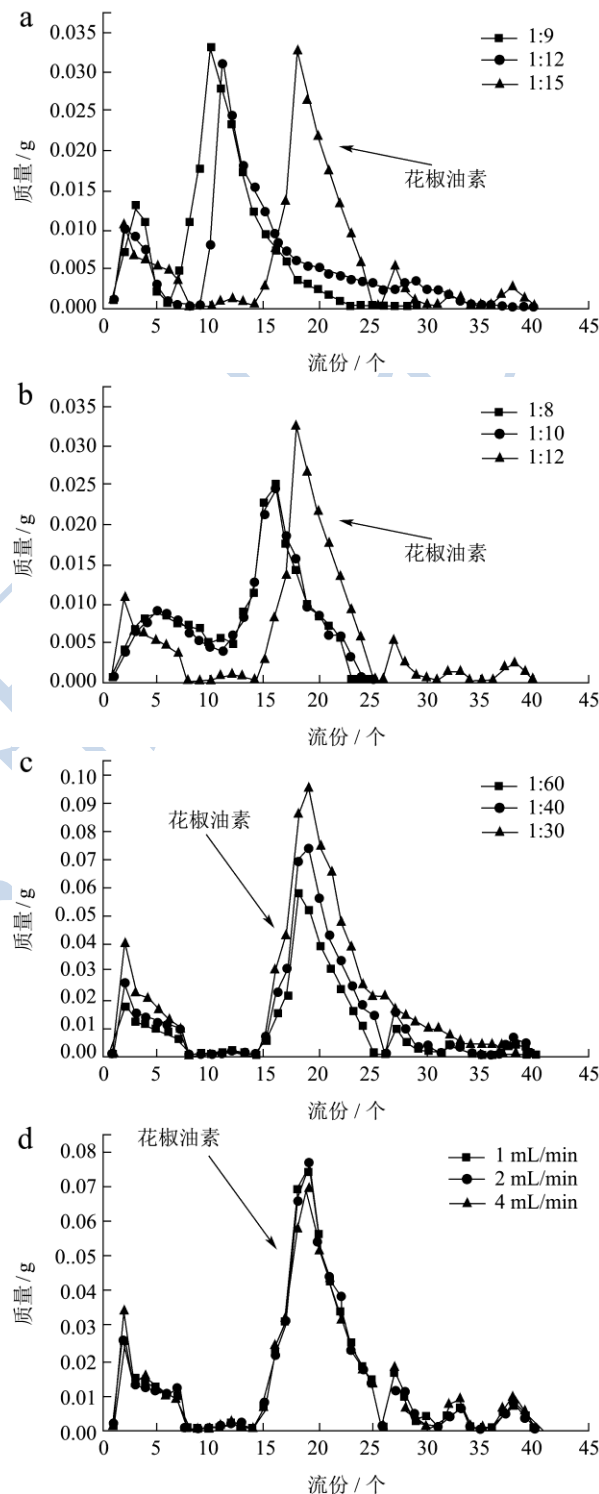


图2 洗脱液比例 (a)、径高比 (b)、上样量 (c)、流速 (d) 对柱层析的影响

Fig.2 Purities and recoveries of xanthoxylin in the crystal and mother liquor

由图 2a 可知，洗脱液配比为 1:15（乙酸乙酯:石

油醚)较合适,洗脱液极性较强时,洗脱效率高,但是分辨率较低,所以洗脱液极性稍弱较合适。图 2b 显示硅胶柱径高比为 1:8 和 1:10 时都未能实现分离,当径高比为 1:12 时成功分离。图 2c 显示样品与硅胶质量比(上样量)为 1:40 和 1:60 都可实现分离,而再增加上样量至 1:30 时未能实现分离,因此粗提物与硅胶质量比选 1:40。最后考察流速对分离的影响,图 2d 显示不同洗脱液流速(1、2、4 mL/min)的峰型基本一致,都可实现分离,流速选 4 mL/min 作为最佳流速,也是柱子所承载的最大流速。使用硅胶为 100~200 目,可用于中等规模制备水平,更有希望放大为工业级水平。朱廷春等<sup>[10]</sup>利用 300~400 目硅胶和梯度洗脱分离得到花椒油素,用于定量分析,处理量偏小。本色谱系统分离得到的花椒油素仅为粗品,纯度为 81.79%,仍需进一步纯化;而回收率达 99.12%,说明柱分离可较完全回收花椒油素。

### 2.3 花椒油素的纯化

在分离得到的粗品基础上,通过重结晶进行纯化,

表 2 晶体与母液的纯度和花椒油素回收率

Table 2 Purities and recoveries of xanthoxylin in crystal and residue

指标	重结晶 1 次		重结晶 2 次		重结晶 3 次	
	晶体	母液残留物	晶体	母液残留物	晶体	母液残留物
纯度/%	98.42±1.78	89.58±1.15	98.23±1.89	88.76±1.46	98.04±1.81	86.54±1.46
回收率/%	55.32±0.95	43.54±0.91	25.63±0.51	16.52±0.42	9.68±0.28	6.54±0.21

### 2.4 核磁共振鉴定

通过核磁共振分析纯化得晶体的结构,结果为 <sup>1</sup>HNMR (CDCl<sub>3</sub>, δ): 2.61 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 3.82 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 4.03 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 5.91 (1H, d, J=2.6 Hz, H-3), 6.04 (1H, d, J=2.7 Hz, H-5), 14.08 (1H, s, -OH)。<sup>13</sup>CNMR (CDCl<sub>3</sub>, δ): 32.7 (-CH<sub>3</sub>), 55.4 (2C, -OCH<sub>3</sub>), 90.8 (C-5), 93.6 (C-3), 106.1 (C-1), 162.8 (C-2), 166.0 (C-6), 167.4 (C-4), 203.2 (C=O)。与文献<sup>[14]</sup>核对,证实此晶体是花椒油素(图 3)。

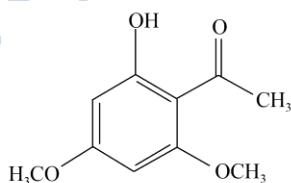


图 3 花椒油素结构图

Fig.3 Structure of xanthoxylin

## 3 结论

将结晶后母液中残留的花椒油素再次结晶,重复 3 次,结果见表 2。第 1 次重结晶后得到的花椒油素晶体纯度达到 98.42%,可收回粗品中 55.32%的花椒油素,残留于母液的占比 43.54%,总量达 98.86%,说明重结晶过程可获得高纯度花椒油素晶体,损失也较少。残留于母液中的花椒油素继续通过重结晶收集,力求最大限度回收花椒油素,经过 2 次和 3 次重结晶制得的晶体纯度分别为 98.23%和 98.04%,而两次收得花椒油素占粗品中总量的回收率分别为 25.63%和 9.68%。3 次重结晶后,获得的花椒油素晶体平均纯度达 98.23% (表 1); 累计总回收率达到 90.63%,说明重结晶过程即实现纯化,又较好的收回花椒油素。花椒中花椒油素的最终得率为 0.88%。在已有研究中,谭道鹏等<sup>[13]</sup>使用有机溶剂经重结晶后得到纯度达 98%的花椒油素,收率为 62.6%~83.8%;杨健等<sup>[7]</sup>通过重结晶从合成花椒油素粗品中获得花椒油素,收率为 60%~70%。根据以上结果,重结晶可用于纯化花椒油素,制得高纯花椒油素(纯度 98.23%),本方案中回收率超过 90%,优于前辈研究结果。

以鲜花椒为原料,经过同时蒸馏萃取、硅胶柱分离和重结晶纯化后制得高纯花椒油素。在统计学水平上(P<0.05),同时蒸馏萃取 1.5 h 后可充分提取花椒中的花椒油素,粗提物中含量达 47.26%;再经过硅胶柱色谱分离,可从粗提物中分离出纯度为 81.79%花椒油素粗品,回收率达 99.12%;最后通过重结晶将花椒油素纯化达高纯水平(98.23%),经过 3 次重结晶可回收 90.63%的花椒油素,最终得率为 0.88%。本工艺基本实现高纯度、高回收制备花椒油素的目标,为花椒精深加工提供参考方案,也为工业化制备天然、高纯花椒油素提供数据支撑。

### 参考文献

- [1] Wang L, Wang Z, Li X, et al. Analysis of volatile compounds in the pericarp of *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. by ultrasonic nebulization extraction coupled with headspace single-drop microextraction and GC-MS [J]. Chromatographia, 2010, 71(5-6): 455-459
- [2] Ye Q. Rapid analysis of the essential oil components of dried *Zanthoxylum bungeanum* Maxim by Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-magnetic-

- microsphere-assisted microwave distillation and simultaneous headspace single-drop microextraction followed by GC-MS [J]. *J. Sep. Sci.*, 2013, 36(12): 2028-2034
- [3] 赵秀玲.花椒的化学成分、药理作用及其资源开发的研究进展[J].中国调味品,2012,37(3):1-4  
ZHAO Xiu-ling. Research progress in chemical constituents, biological activities and exploration utilization of *Pericarpium zanthoxyli* [J]. *China Condiment*, 2012, 37(3): 1-4
- [4] Wen M G, Zhang X B, Tian J N, et al. Binding interaction of xanthoxylin with bovine serum albumin [J]. *J Solution Chem.*, 2009, 38: 391-401
- [5] Boeck P, Leal P C, Yunes R A, et al. Antifungal activity and studies on mode of action of novel xanthoxylin-derived chalcones [J]. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, 2005, 338: 87-95
- [6] De Campos-Buzzi F, De Campos J P, Tonini P P, et al. Antinociceptive effects of synthetic chalcones obtained from xanthoxylin [J]. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, 2006, 339: 361-365
- [7] 杨健,吴婷,杨涛,等.一种制备花椒油素的方法:中国, CN102070430A [P].2011-05-25  
YANG Jian, WU Ting, YANG Tao, et al. A method of preparation of xanthoxylin: China, CN 102070430A [P]. 2011-05-25
- [8] 文永新,黄永林,朱廷春,等.反相高效液相色谱法测定艾纳香中不同部位花椒油素的含量[J].时珍国医国药,2007, 18(9):2137-2138  
WEN Yong-xin, HUANG Yong-lin, ZHU Ting-chun, et al. Analysis of xanthoxylin in different section of *Blumea balsanifera* DC. by RP-HPLC [J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2007, 18(9): 2137-2138
- [9] 郑安庆,张灿奎,向瑛,等.川陕花椒化学成分研究[J].中草药,2001,32(5):399-400  
ZHENG An-qing, ZHANG Can-kui, XIANG Ying, et al. Chemical constituents from *Zanthoxylum piasezkii* [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2001, 32(5): 399-400
- [10] 朱廷春,文永新,王恒山,等.艾纳香的化学成分研究(I)[J].广西植物,2008,28(1):139-141  
ZHU Ting-chun, WEN Yong-xin, WANG Heng-shan, et al. Chemical constituents in *Blumea balsanifera* (I) [J]. *Guihaia*, 2008, 28(1): 139-141
- [11] 王远辉,田洪芸,何思佳,等.不同方法提取艾纳香叶挥发性成分的气相色谱-质谱分析[J].食品工业科技,2012,33(12): 97-105  
WANG Yuan-hui, TIAN Hong-yun, HE Si-jia, et al. Analysis of volatile components from *Blumea balsanifera* (L.) DC. leaf with different extraction methods by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 33(12): 97-105
- [12] Bawazeer S, Sutcliffe O B, Euerby M R, et al. A comparison of the chromatographic properties of silica gel and silicon hydride modified silica gels [J]. *J. Chromatogr A*, 2012, 1263: 61-67
- [13] 谭道鹏,严启新,康晖,等.一种以天然艾粉为原料制备花椒油素的方法:中国,CN102701939A [P].2012-10-03  
TAN Dao-peng, YAN Qi-xin, KANG Hui, et al. A method of preparation of xanthoxylin from natural Aifen: China, CN 102701939A [P]. 2012-10-03
- [14] Valenciennes E, Smadja J, Conan J Y. Screening for biological activity and chemical composition of *Euodia borbonica* var. *borbonica* (Rutaceae), a medicinal plant in Reunion Island [J]. *J. Ethnopharm.*, 1999, 64: 283-288