二-(2-乙基己基)磷酸/正辛醇反胶束萃取 *L*-辛弗林

李晓辉 陈红梅 周小华* 苏 昱 王永红
(重庆大学化学化工学院 重庆 400030)

摘 要 利用二-(2-乙基己基)磷酸(P_{204})/正辛醇反胶束从枳实粗提物中萃取 *L*-辛弗林。研究了萃取机理和水相 pH 值、含水量 W_0、阳离子浓度、萃取时间以及 P_{204} 浓度对 *L*-辛弗林萃取率的影响。通过原子力显微镜观察了 P_{204}/正辛醇反胶束;萃取 *L*-辛弗林的最佳条件为:萃取原料液水相 pH = 6.5,含水量 W_0 = 15、P_{204} 浓度为 0.08 mol/L,在此条件下萃取 15 min,对 *L*-辛弗林的单次萃取率为 68.0%。基于萃取率建立的数学模型可反映 pH 值、P_{204} 浓度与萃取率的关系,在一定 pH 值及 P_{204} 浓度区间可预测萃取率的变化趋势。

关键词 *L*-辛弗林,二-(乙基己基)磷酸,反胶束,萃取
中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-0518(2011)11-1311-06
DOI:10.3724/SP.J.1095.2011.00685

L-辛弗林为肾上腺素或麻黄碱类似物,具有增强新陈代谢、收缩血管和扩张气管等生理功能[1],是近期天然药物研发热点之一,广泛用于医药、食品和饮料等行业。目前,供应市场的多为含量 30% 左右 *L*-辛弗林粗制品,不利于控制产品质量,因而市场亟需高纯度的 *L*-辛弗林。现有制备较高纯度 *L*-辛弗林的方法仅有离子交换法[2],该法的优点是处理量大、离子交换树脂可反复使用;但离子交换树脂的官能团可能催化目标分子与杂质反应,形成副产物,其选择性也有限,且再生树脂产生大量废液,不利于可持续发展。与离子交换法相比较,反胶束萃取技术有特殊的优势,反胶束或称逆胶束,是表面活性剂分散于有机相中自发形成的含微量水、透明及热力学稳定的纳米级聚集体[3],其中心是“水池”,类似于细胞环境,可与目标物发生选择性反应,从而将其“增溶”于反胶束内,实现萃取分离[4]。目前,反胶束萃取技术已逐步用于蛋白质等生物大分子的分离[5]、纳米复合粒子制备,Zhou 等[6]和 Dong 等[7]分别用反胶束技术选择性分离金丝桃苷和苦参碱,显示出该技术在分离小分子活性物方面具有独特优势。

在一定的 pH 值下,*L*-辛弗林分子中亚氨基结合质子带正电荷,可以与带负电荷的萃取剂产生静电作用,因而可通过萃取实现分离。二-(2-乙基己基)磷酸(P_{204})[8]为阴离子表面活性剂,易电离出 H^+ 形成带负电荷的 P_{204}-O^-,可实现对 *L*-辛弗林的萃取。本文拟制备 P_{204}/正辛醇反胶束体系,研究萃取枳实粗提物 *L*-辛弗林的最优化萃取工艺条件,探索萃取机制,旨在丰富反胶束萃取的基础理论和实践。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

枳实粗体物(*L*-辛弗林含量 30%,西安小草植物科技有限公司);正辛醇(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);P204(工业级,上海莱雅仕化工有限公司);*L*-辛弗林标准品(>98%,上海朗科植提有限公司);其余试剂均为分析纯。

752N 型紫外可见分光光度计(UV-Vis,上海精密科学仪器有限公司);IPC-208B 型原子力显微镜(AFM,重庆恒瑞纳米科技发展有限公司);Breeze1525 型高效液相色谱(HPLC,美国 Waters 公司)。

1.2 萃取原液的制备

10.0 g *L*-辛弗林粗提粉末用 60 mL 95% 乙醇于 40 ~ 50 ℃下水浴搅拌溶解 30 min,抽滤。滤液用截留相对分子质量为 3 000 的超滤膜超滤,收集滤过液用蒸馏水稀释,在电压 60 V 下进行电渗析,收集浓水,用 Amberlite XAD7HP 极性大孔吸附树脂处理。收集过柱液,用蒸馏水调节 *L*-辛弗林质量浓度为

2010-11-18 收稿,2011-04-15 修回
中央高校基本科研业务费资助项目(CDJXS10221138,CDJXS11221170)
通讯联系人:周小华,教授; Tel/Fax:023-65111179; E-mail:zhou65306590@tom.com; 研究方向:生物化工及药物化学

0.1 ~ 0.15 g/L。密闭,4 ℃保存备用。

1.3 反胶束的制备

定量 P_{204} 配成浓度为 0.015 ~ 0.20 mol/L 的 P_{204}/正辛醇体系;搅拌下缓缓加入蒸馏水,使含水量 W_0(反胶束中水和 P_{204} 摩尔浓度比)为 5 ~ 20,继续搅拌直至溶液均匀透明,3 000 r/min 离心 10 min 不分层,即配成 P_{204}/正辛醇反胶束。密封保存,备用。

1.4 萃取实验

将 *L*-辛弗林萃取原液分别与上述反胶束混合,固定相比 $R = 1$,分别控制萃取原液 pH 值、P_{204} 浓度、W_0、盐浓度,萃取 2 ~ 60 min。静止分相,上层萃取相用于反萃取实验。收集下层萃余相于 10 000 r/min 离心 10 min,测定其中残留的 *L*-辛弗林含量,按下式计算萃取率 E。

$$E = \frac{\rho_{原} - \rho_{萃余}}{\rho_{原}} \times 100\%$$

式中,$\rho_{原}$ 为萃取原液中辛弗林的浓度(g/L),$\rho_{萃余}$ 为萃余液中辛弗林的浓度(g/L)。

1.5 反萃取实验

将萃取相与反萃取液混合,分别控制反萃取相比 R、pH 值、反萃取时间、盐浓度等,收集反萃取液,在 10 000 r/min 离心 10 min,测定其中辛弗林含量,按下式计算反萃取率 E'。

$$E' = \frac{\rho_{反萃} R}{\rho_{原} - \rho_{萃余}} \times 100\%$$

式中,$\rho_{反萃}$ 为反萃取水相中辛弗林的浓度(g/L);R 为相比 $V(W)/V(O)$(反萃取相/辛弗林萃取相)。

1.6 *L*-辛弗林分析

含量测定:*L*-辛弗林含苯基,在 280 nm 有最大吸收,可用紫外分光光度法测定其含量[9]。用 *L*-辛弗林标准品配制浓度为 0.1 ~ 0.3 g/L 的标准溶液,用紫外分光光度计于 280 nm 测定其吸光度 A,获得标准曲线及线性方程($A = 6.520\,2 \times \rho$($R = 0.998$))。取试样同法测定,获得 *L*-辛弗林含量。

纯度分析:采用高效液相色谱(HPLC)法[10]。取待测样,以确定浓度的 *L*-辛弗林标准品为内标,在色谱条件为 Symmetry C18 RP-柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相为 V(甲醇):V(水) = 50:50,进样量 25 μL,柱温 25 ℃,检测波长 275 nm 下进行 HPLC 分析,以峰面积法确定纯度。

2 结果与讨论

2.1 萃取 *L*-辛弗林的机制

图 1 为 *L*-辛弗林标准品和萃取液的 UV 谱图。进行萃取之后,原本没有紫外吸收的反胶束体系在 275 nm 处出现吸收峰,这与 *L*-辛弗林标准品吸收峰位置相符,证明 P_{204}/正辛醇反胶束体系对 *L*-辛弗林的萃取是成功的。

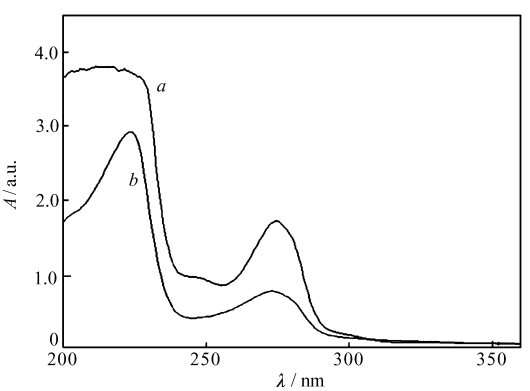


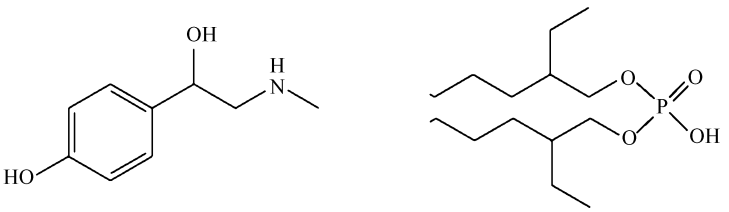
图 1 *L*-辛弗林标准品和萃合物的 UV 光谱

Fig. 1 UV spectra of standard *L*-synephrine and extracted complex

a. standard *L*-synephrine; *b*. extracted complex

Scheme 1 为 *L*-辛弗林和 P_{204} 的结构式,*L*-辛弗林的亚氨基可接受质子($pK_a = 9.3$)[11],形成带正电荷的 *L*-辛弗林阳离子;P_{204} 分子中有一个磷羟基($pK_a = 2.12$)[12],在一定的 pH 值条件下,该羟基可解离出氢离子使 P_{204} 带负电荷,因此 *L*-辛弗林阳离子与带负电荷的 P_{204} 可通过静电相互作用实现萃取分离。

图 2 为 P_{204}/正辛醇反胶束涂膜于镀金基板上的原子力显微镜三维灰度形貌图,其中较亮代表高处,较暗代表低处。该图中出现的球状突起为 P_{204} 在正辛醇体系中,形成了大小均一,分布均匀的球形反胶束,其直径在 50 ~ 80 nm。



Synephrine　　P_{204}

Scheme 1　Structures of synephrine and P_{204}

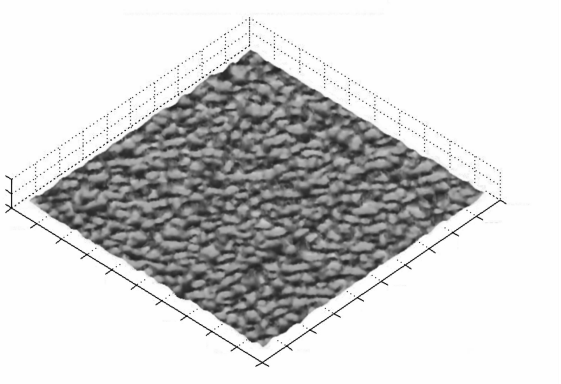


图 2　P_{204}/正辛醇反胶束三维 AFM 图

Fig. 2　Three-dimensional AFM of P_{204}/*n*-octanol reversed micelles

The image size:1750 nm × 1750 nm; the height scale is 262.4 nm

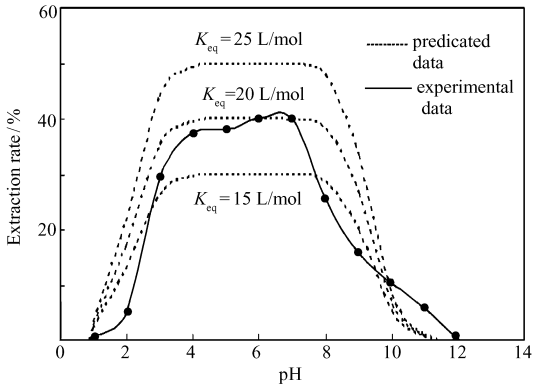


图 3　不同 pH 值下萃取率的实验值和预测值

Fig. 3　Predicted and experimental extraction rates at different pH

$c(P_{204})$ = 0.02 mol/L, time = 30 min, W_0 = 15

2.2　影响萃取 *L*-辛弗林的主要因素

2.2.1　水相 pH 值　图 3 为 pH 值与 *L*-辛弗林萃取率之间的关系。由图 3 可见,在水相 pH 值介于 5.0 ~ 7.0 区间,出现高萃取率平台;当水相 pH < 4.0 时,随着 pH 值的增大,萃取率逐渐升高;当 pH 值超过 7.0,萃取率则随着 pH 值的增大而急剧降低。在 pH 值为 2.0 ~ 4.0 区间,随着 pH 值增加,解离形成的 P_{204}-O^- 增加并与正电荷的 *L*-辛弗林通过静电相互作用形成萃合物。因此,对 *L*-辛弗林的萃取率迅速提高。当 pH = 4.0 时,P_{204} 中磷羟基几乎完全解离,萃取率达到最高值 39.9%。

当 pH < 7 时,*L*-辛弗林上的氨基几乎全为荷电正离子。因此,当萃取 pH 值在 4 ~ 7 区间,萃取率均高,形成高萃取率平台;随着 pH 值超过 7.0,带正电荷的 *L*-辛弗林随着 pH 值升高而迅速减少,所以萃取率急剧下降,当 pH 值达到 12.0,几乎所有的 *L*-辛弗林均不带电荷,不能与 P_{204}-O^- 形成萃合物,故萃取率为零。

萃取过程可以用如下反应式表示,其中 Syn-NH—表示 *L*-辛弗林分子,并将 P_{204} 中—OH 基表示出来以便显示反应过程:

$$P_{204}\text{-OH} \overset{K_a}{\rightleftharpoons} P_{204}\text{-}O^- + H^+ \tag{1}$$

$$H^+ + \text{Syn-NH—} \overset{K_b}{\rightleftharpoons} \text{Syn-}N^+H_2\text{—} \tag{2}$$

$$P_{204}\text{-}O^- + \text{Syn-}N^+H_2\text{—} \overset{K_{eq}}{\rightleftharpoons} \text{Syn-}NH_2^{\oplus\ominus}\text{O-}P_{204} \tag{3}$$

由反应式可得:

$$K_{eq} = \frac{[\text{Syn-}NH_2^{\oplus\ominus}\text{O-}P_{204}]}{[\text{Syn-}N^+H_2\text{—}][P_{204}\text{-}O^-]} \tag{4}$$

$$K_a = \frac{[H^+][P_{204}\text{-}O^-]}{[P_{204}\text{-OH}]} \tag{5}$$

$$K_b = \frac{[\text{Syn-}N^+H_2\text{—}]}{[\text{Syn-NH—}][H^+]} \tag{6}$$

P_{204}的分布系数为：

$$\delta[P_{204}\text{-}O^-] = \frac{[P_{204}\text{-}O^-]}{[P_{204}\text{-}O^-] + [P_{204}\text{-}OH]} = \frac{K_a}{[H^+] + K_a} \tag{7}$$

L-辛弗林分布系数为：

$$\delta[Syn\text{-}N^+H_2\text{—}] = \frac{[Syn\text{-}N^+H_2\text{—}]}{[Syn\text{-}NH\text{—}] + [Syn\text{-}N^+H_2\text{—}]} = \frac{[H^+]}{(1/K_b) + [H^+]} \tag{8}$$

综合上式得：

$$[P_{204}\text{-}O^-] = \delta[P_{204}\text{-}O^-][P_{204}]_0 = \frac{K_a}{[H^+] + K_a}[P_{204}]_0 \tag{9}$$

$$[Syn\text{-}N^+H_2\text{—}] = \delta[Syn\text{-}N^+H_2\text{—}][Syn\text{-}NH\text{—}]_0 = \frac{[H^+]}{(1/K_b) + [H^+]}[Syn\text{-}NH\text{—}]_0 \tag{10}$$

式中，$[\ ]_0$表示物质初始浓度。

则萃取率 E 为：

$$E = \frac{[Syn\text{-}\overset{\oplus\ominus}{N}H_2\text{-}O\text{-}P_{204}]R}{[Syn\text{-}NH\text{—}]_0} = \frac{K_{eq}[Syn\text{-}N^+H_2\text{—}][P_{204}\text{-}O^-]R}{[Syn\text{-}NH\text{—}]_0} = \frac{K_{eq}K_a[P_{204}]_0[H^+]R}{([H^+] + K_a)((1/K_b) + [H^+])} \tag{11}$$

式中，K_a和 K_b为常数，$[P_{204}]_0$为 0.02 mol/L，相比 $R=1$，分别假设 K_{eq}为 15、20 和 25 L/mol 可得 3 条拟合曲线(图 3)，当 $K_{eq}=20$ L/mol 时，模拟的关联结果是令人满意的。

2.2.2 *表面活性剂的浓度* 图 4 为 P_{204}浓度与 *L*-辛弗林萃取率的关系曲线。从图 4 可见，当 P_{204}浓度低于 0.08 mol/L 区间，萃取率随表面活性剂浓度增加而上升，当 P_{204}浓度为 0.08 mol/L，萃取率达到最大；而当 P_{204}浓度超过 0.08 mol/L 时，*L*-辛弗林的萃取率基本不变。

当 P_{204}浓度为变量时，式(11)变为 $E=B[P_{204}]_0$，其中：$B=\dfrac{K_{eq}K_a[H^+]R}{([H^+]+K_a)((1/K_b)+[H^+])}$

即萃取率和 P_{204}浓度成正比。

当 P_{204}浓度较低时，增加 P_{204}浓度可增加单个反胶束中 P_{204}浓度或反胶束数量，因在此阶段，增加 P_{204}浓度有利于萃取 *L*-辛弗林；但是，伴随 P_{204}浓度增加，体系中水分子数量未变，于是，未形成反胶束的 P_{204}分子之间相互作用形成聚合体[13]，从而丧失萃取 *L*-辛弗林的能力。因此，当 P_{204}浓度超过一定值后，对萃取率基本无影响。

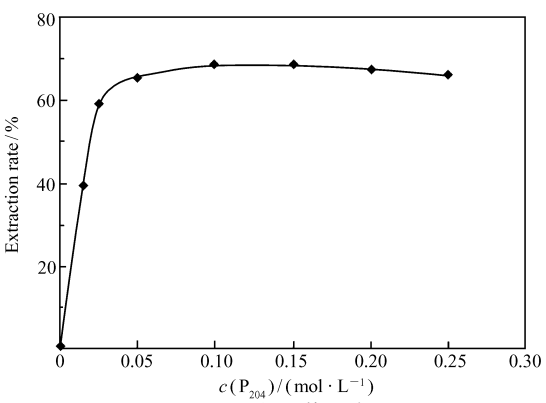


图 4 P_{204}浓度对萃取率影响

Fig. 4 Effect of P_{204} concentration on the extraction rate

pH = 6.5, time = 30 min, $c(H_2O)$ = 1.2 mol/L

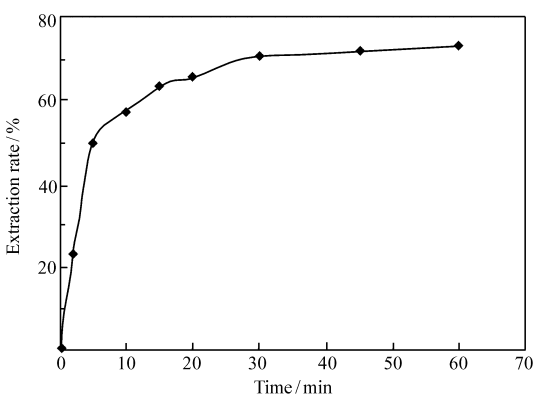


图 5 *L*-辛弗林萃取进程曲线

Fig. 5 Time course curve of *L*-syneprhine extration

$c(P_{204})$ = 0.08 mol/L, pH = 6.5, W_0 = 15

2.2.3 *萃取时间的影响* 图 5 为萃取 *L*-辛弗林的时间进程曲线。由图 5 可知，在 10 min 以内，萃取率与萃取时间呈线性关系；15 min 萃取率达到 63.4%；萃取 30 min 时，萃取达到平衡，此时的一次萃取率达到 70.1%，与萃取 15 min 相比较，仅增加 6.7%。因此，以 P_{204}萃取 *L*-辛弗林，应以 15 min 为宜。

2.2.4　含水量的影响　图 6 为 W_0 与 *L*-辛弗林萃取率的关系曲线。从图 6 可看出,当 $W_0 = 15$ 时,萃取率最高;当 $W_0 < 15$ 时,萃取率随 W_0 增加而增高;当 $W_0 > 15$ 时,萃取率随 W_0 增加而降低。但总体来说,在该研究范围内,W_0 对萃取率的影响并不十分明显。

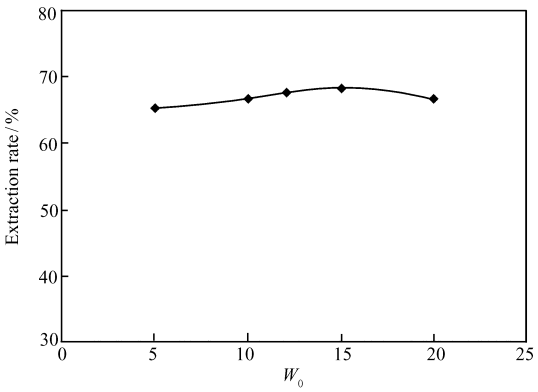


图 6　含水量 W_0 对萃取率的影响

Fig. 6　Effect of water content W_0 on extraction rate

$c(P_{204}) = 0.08$ mol/L, pH = 6.5, time = 30 min

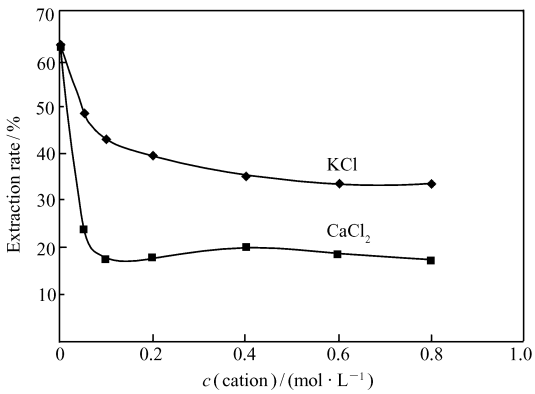


图 7　阳离子类型及浓度的影响

Fig. 7　Effects of cation types and concentration

$c(P_{204}) = 0.08$ mol/L, pH = 6.5, time = 30 min, $W_0 = 15$

2.2.5　阳离子的影响　图 7 为阳离子与萃取率的关系曲线。阳离子的加入会使反胶束内部阳离子增多,而与 *L*-辛弗林正电荷相斥,阻碍 *L*-辛弗林进入反胶束,从而降低萃取率。Ca^{2+}、K^+ 对 *L*-辛弗林的萃取有显著影响,而 Ca^{2+} 影响力大于 K^+。并且随离子浓度增加,萃取率反而下降。分析 Ca^{2+} 和 K^+ 对 *L*-辛弗林萃取率的影响可知,在二者涉及的浓度区间,后者对 *L*-辛弗林萃取率几乎总为前者的 2 倍。

2.3　反萃取 *L*-辛弗林

反萃取是萃取的逆过程,其机制及影响因素基本相同。以 0.6 mol/L 的 KCl 溶液为反萃取液,在相比(V(W):V(O))为 3:1、pH = 11.0 条件下,反萃取 20 min,一级反萃取率为 70.1%,二级和三级反萃取率分别为 97.1% 和 98.1%。因此,通过二次反萃取即可分离粗提液中 97.1% 的 *L*-辛弗林。

图 8 为标准品、萃取原液、反萃液的 HPLC 图。从图 8 曲线 *a* 可见,标准液中 *L*-辛弗林的保留时间为 8.382 min。从图 8 曲线 *b* 可知,保留时间为 8.535 min 者即是粗提液中的 *L*-辛弗林,其余均为杂质峰。图 8 曲线 *c* 显示,反萃取液中主要物质的保留时间 8.393 min,峰位置与 *L*-辛弗林标准品基本一致,可确定为 *L*-辛弗林。而 3.8 和 4.9 min 的杂质峰面积减小,仅占 8.6%;6.0 min 的杂质峰已消除,说明经反胶束萃取实现了对 *L*-辛弗林的部分纯化。

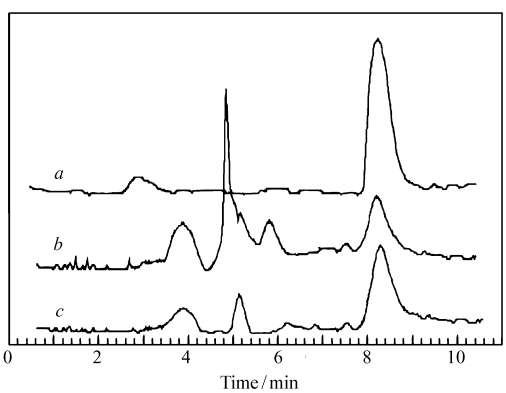


图 8　标准品(a)与原液(b)、反萃液(c)的 HPLC 图

Fig. 8　HPLC of standard sample(a), raw liquid(b) and re-extracted liquid(c)

与萃取原液中 *L*-辛弗林含量仅为 50.7% 相比,反萃液中 *L*-辛弗林纯度为 87.8%,纯化倍数达 1.73 倍。

3　结　论

以 P_{204}/正辛醇反胶束萃取 *L*-辛弗林含量为 30% 的粗提取液,可有效纯化 *L*-辛弗林;基于萃取分配系数建立的数学模型,可以在一定 pH 值及 P_{204} 浓度区间,准确预测对 *L*-辛弗林的萃取率随 pH 值与 P_{204} 浓度的变化趋势。

参　考　文　献

[1] Pharmacopoeia Commission. Chinese Pharmacopoeia(a)[M]. Beijing:Chemical Industry Press,2005:172(in Chinese).

中国药典委员会. 中国药典(一部)[M]. 北京:化工工业出版社,2010:172.
[2] SHEN Lianqing, ZHANG Chao. Study on Comparision of Two Metheds for the Extraction and Seperation of Synephrine from Fructus Citri Immaturus[J]. *J Food Sci Biotechnol*,2008,**27**(6):14-17(in Chinese).
沈莲清, 张超. 个青皮中辛弗林两种提取分离方法的比较研究[J]. 食品与生物技术学报,2008,**27**(6):14-17.
[3] Regalado C, Asenjo J A, Pyle D L. Studies on the Purification of Peroxidase from Horseradish Roots Using Reverse Micelles [J]. *Enzyme Microb Technol*,1996,**18**(5):332-339.
[4] LI Runxia, CHEN Fusheng, ZHAO Junting. Research Progress of Reverse Micelles Extraction in Food Science[J]. *Food Machinery*,2006,**22**(5):115-119(in Chinese).
李润霞,陈复生,赵俊廷. 反胶束萃取技术在食品中的应用研究[J]. 食品与机械,2006,**22**(5):115-119.
[5] Zhao X Y, Chen F S, Chen J Q, *et al*. Effects of AOT Reverse Micelle on Properties of Soy Globulins[J]. *Food Chem*, 2008,**111**(3):599-605.
[6] Zhou X H, Dong L C, Li D H. A Comprehensive Study of Extraction of Hyperoside from *Hypericum Perforatum* L. Using CTAB Reverse Micelles[J]. *J Chem Technol Biotechnol*,2008,**83**(10):1413-1421.
[7] Dong L C, Li W P, Zhou X H, *et al*. Liquid-liquid Extraction of Matrine Using Trpo/Cyclohexane Reverse Micelles[J]. *Braz J Chem Eng*,2009,**26**(2):415-425.
[8] Pereira D D, Rocha D F, Mansur M B. Recovery of Zinc Sulphate from Industrial Effluents by Liquid-Liquid Extraction Using D_2EHPA[J]. *Sep Purif Technol*,2007,**53**(1):89-96.
[9] Santana J, Sharpless K E, Nelson B N. Derermination of Para-synephrine and Meta-synephrine Positional Isomers in Bitter Orange-containing Dietary Supplements by LC/UV and LC/MS/MS[J]. *Food Chem*,2008,**109**(3):675-682.
[10] SUN Dongmei, BI Xiaoli, XU Aili, *et al*. Content Determination of Synephrine in Pericarpium Citri Reticulate of Different Origin by HPLC Method[J]. *Pharm Today*,2009,**19**(8):3-4(in Chinese).
孙冬梅,毕晓黎,胥爱丽,等. 高效液相色谱法测定不同产地陈皮中辛弗林的含量[J]. 今日药学,2009,**19**(8):3-4.
[11] Andrade A S, Schmitt G C, Rossato L G, *et al*. Gas Chromatographic Method for Analysis of *p*-Synephrine in *Citrus Aurantium* L. Products[J]. *Chromatographia*,2009,**69**(2):225-229.
[12] ZHOU Xiaohua, WANG Dong, ZHENG Shengshen. Extraction of Glutathione from Distillate of Bread Yeast with Reversed Micelle of P_{204}/Octanol[J]. *Chinese J Appl Chem*,2009,**26**(9):1088-1093(in Chinese).
周小华,王东,郑声申. 用磷酸二异辛酯/正辛醇反胶束从面包酵母粗提液中萃取谷胱甘肽[J]. 应用化学,2009,**26**(9):1088-1093.
[13] YAN Xikang. Biochemical Engineering[M]. Beijing: Chemical Industry Press,2000:154-155(in Chinese).
严希康. 生化分离工程[M]. 北京:化学工业出版社,2000:154-155.

Extraction of *L*-Synephrine by Bis(2-ethylhexyl)phosphoric acid/*n*-octanol Reversed Micelle

LI Xiaohui, CHEN Hongmei, ZHOU Xiaohua*, SU Yu, WANG Yonghong
(*College of Chemistry and Chemical Engineering*, *Chongqing University*, *Chongqing* 400030)

Abstract Bis(2-ethylhexyl)phosphoric acid(P_{204})/*n*-octanol reversed micelle system was prepared to extract *L*-synephrine in *Citrus aurantium* fruit crude extract. The extraction mechanism as well as influencing factors including the pH of the aqueous phase, water content(W_0), surfactant concentration, and extraction time were studied. P_{204}/octanol reversed micelles was observed by AFM. The optimal extraction conditions determined *via* a series of experiments are as follows: aqueous phase pH = 6.5, water content(W_0) = 15, surfactant concentration = 0.08 mol/L, and extraction time = 15 min. Under the optimized conditions, the one-time *L*-synephrine extraction rate reaches 68.0%. The mathematical model to fit the relationships of *L*-synephrine extraction rate with aqueous phase pH and surfactant concentration is also discussed.

Keywords *L*-synephrine, bis(ethylhexyl)phosphoric acid, reversed micelle, extraction