

高速逆流色谱(HSCCC)在丝瓜苷类化合物提取中的应用

李磊

(河南商业高等专科学校食品系, 河南郑州 450045)

摘要: 丝瓜正丁醇相采用AB-8大孔树脂, 利用水和30%、50%、70%和95%的乙醇溶液洗脱提纯得总糖苷。30%洗脱部分以氯仿-甲醇-异丙醇-水(5:6:1:4)为溶剂系统采用高速逆流色谱分离得到4个酯苷类化合物和一个酸, 分别为: 阿魏酰- β -D-葡萄糖(I); 1-O-p-香豆酰- β -D-葡萄糖(II); 对羟基苯甲酰葡萄糖(III); 咖啡酰- β -D-葡萄糖(IV); 香豆酸(V)。50%洗脱部分以氯仿-甲醇-水(13:7:8)为溶剂系统采用高速逆流色谱分离得到2个黄酮苷类化合物, 分别为: 香叶木素-7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷甲酯(VI); 芹菜素-7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷甲酯(VII)。70%洗脱部分以氯仿-甲醇-水(13:7:8)为溶剂系统采用高速逆流色谱分离得到1个皂苷化合物丝瓜皂苷H(VIII)。化合物I-VIII都是首次从该植物中分离得出。

关键词: 丝瓜, 苷类化合物, 高速逆流色谱

Applications of high-speed countercurrent chromatography(HSCCC) in the *Luffa cylindrical*(L.) Roem glycosides Extraction

LI Lei

(Department of Food, Henan Business College, Zhengzhou 450045, China)

Abstract: The n-butyl alcohol phase of *Luffa cylindrical*(L.) Roem was eluted through AB-8 macroporous adsorption resin with water and 30%, 50%, 70%, 95% ethanol as eluant so as to obtaining the total glucosides compounds. The extraction of 30% ethanol eluant was separated by HSCCC using Vchloroform-Vmethyl alcohol-Visopropyl alcohol-Vwater(5:6:1:4) as the solvent system, obtaining 4 ester glucoside compound and one acid as follows: 1-Feruloyl- β -D-glucose(I), 1-O-p-Coumaroyl- β -D-glucose(II), 1-(4-Hydroxybenzoyl)glucose(III), 1-Caffeoyl- β -D-glucose(IV), p-Coumaric acid(V). The extraction of 50% ethanol eluant was separated by HSCCC using Vchloroform-Vmethyl alcohol-Vwater(13:7:8) as the solvent system, obtaining 2 flavonoid glycosides as follows: Diosmetin-7-O- β -D-glucuronide methyl ester(VI), Apigenin-7-O- β -D-glucuronide methyl ester(VII). The extraction of 70% ethanol eluant was separated by HSCCC using VChloroform-Vmethyl alcohol-Vwater(13:7:8) as the solvent system, obtaining Lucyosides H(VIII). Compounds I-VIII were isolated for the first time from this plant.

Key words: *Luffa cylindrical*(L.) Roem; glycosides; HSCCC

中图分类号: TS255.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2012)01-0289-04

丝瓜为葫芦科植物丝瓜属的鲜嫩果实, 或霜后干枯的老熟果实, 一年生攀缘性草本植物。有8个品种, 分布于东半球热带和亚热带地区。我国有2个品种, 即丝瓜(*Luffa cylindrical*(L.) Roem)或粤丝瓜(*Luffa acutangula* Roxb.), 且各地均有栽培^[1]。丝瓜化学成分的研究始于上世纪中叶, 先后分离得到了三萜、生物碱、甾体化合物、萜类色素、皂甙类、脑苷、黄酮体、酚类、蛋白质、氨基酸等多种化合物^[2]。其中苷类物质是丝瓜含量最多, 也是研究最多的, 如从普通

丝瓜(*L. cylindrical*)果实及汁液中分离出人参皂甙Rg1和Re、丝瓜皂甙Lucyoside A-R、常春藤配基-3-O- β -D-葡萄糖吡喃糖甙、齐墩果酸-3-O- β -D-葡萄糖吡喃糖甙等^[3]。丝瓜皂苷具有抗应激^[4-5]、增强免疫^[6]、抗氧化^[7]等生理功能。日本将丝瓜皂甙和绞股蓝皂甙合用, 做成含有人参成分的食品, 实验证明: 这种食品含有从丝瓜和绞股蓝提出的皂甙物质, 与朝鲜人参有相同的成分与功能, 每日摄入20~500mg, 连服1个月以上, 就可达到强身、强精、延年益寿的效果, 还可防止肾皮质激素副作用, 又可有效地控制肥胖。此成分比人参成本低, 容易入口随食物成分一同摄入体内。且证明丝瓜及其叶、藤、籽、汁均含丝瓜皂甙, 可

收稿日期: 2010-12-23

作者简介: 李磊(1980-), 男, 讲师, 主要从事食品营养与安全研究。

作成多种形态食品,如散剂、颗粒、清凉、饮料、主食、副食、点心、茶等。被日本称为跨时代的食品。为进一步揭示丝瓜药理活性的化学物质基础,开发其活性成分,采用高速逆流色谱(HSCCC)对丝瓜的苷类化学成分进行了系统的研究。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜丝瓜 四川西昌,去皮后切成片状,冷冻干燥得丝瓜干品;氯仿(AR),甲醇(AR)、乙酸乙酯(AR),正丁醇(AR)、乙醇(AR)、NaOH(AR)、HCl、异丙醇、95%乙醇、硫酸等 杭州汇普化工试剂有限公司;AB-8型大孔树脂 南开大学化工厂;Sephadex LH-20。

分析型高速逆流色谱仪(HSCCC-D100)、半制备型高速逆流色谱仪(HSCCC-D400)、制备型高速逆流色谱仪(HSCCC-D1000) 浙江工商大学食品与生物工程研究所自发研制。

1.2 实验方法

由于丝瓜中含糖和色素较多,丝瓜中苷类化合物的提取和分离是首先采用乙醇提取,将提取物中的正丁醇萃取部分通过大孔树脂除去糖、蛋白质和色素从而得到各洗脱部分。由于苷类化学成分的极性都较高,如果采用传统的硅胶柱层析则样品容易被吸附损失,不利于含量较少的化合物的分离和鉴定,因此本实验采用无样品吸附损失的高速逆流色谱(HSCCC)作为主要的分离方法^[8-10]。

1.2.1 丝瓜提取物的制备 丝瓜干品,用95%乙醇50℃浸提两次,每次用乙醇50L、浸提时间2h。提取液减压浓缩至无醇味后,浓缩物分散在蒸馏水中,用等体积的氯仿、乙酸乙酯、正丁醇依次分配萃取,萃取液分配浓缩以回收溶剂。

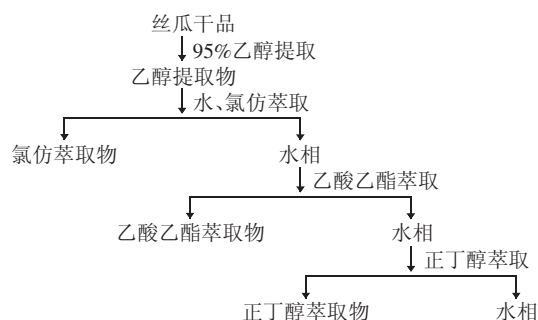


图1 丝瓜不同极性组分萃取流程

Fig.1 Extraction process of different polar component

1.2.2 AB-8大孔树脂分离丝瓜总糖苷 丝瓜提取物萃取后得到的正丁醇萃取物用水溶解,在Φ8cm×1.5m的玻璃柱中装入大孔树脂5kg,依次用2000mL

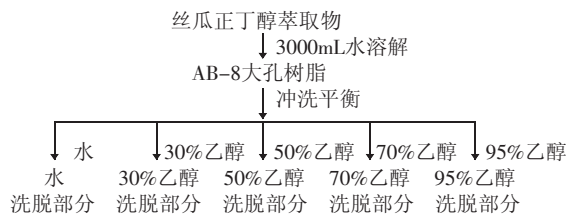


图2 大孔树脂分离流程图

Fig.2 Macroporous resin separation flow chart

水→2% NaOH→水→5% HCl→水→95%乙醇→水冲洗平衡,24h后上样,用水和30%、50%、75%、95%乙醇洗脱,用酒精计检测洗脱液的酒精度,回收各部分的前、中、末及交叉部分的洗脱液。浓缩后点于薄层层析硅胶板上,用氯仿:甲醇:水(7:3:1)下层液为展开剂展开,晾干后用10%硫酸乙醇溶液浸泡5s,置于电热炉上方5min烘干显色,观察所含的成分。

1.2.3 高速逆流色谱(HSCCC)分离大孔树脂洗脱液 分析型HSCCC能为制备或半制备HSCCC提供可靠快速的方法预试^[11]。本实验用分析型HSCCC-D100做分析,采用分离效果好的溶剂系统,用制备型HSCCC-D1000进行大量分离,纯化获得单一化合物。

高速逆流色谱的操作步骤如下:配制选择的溶剂系统,充分混合摇匀,静止分层。以上层为固定相,下层为流动相。用泵把固定相从进口注入HSCCC分离柱中,待固定相充满后,开动主机,调节转速达到900r/min并稳定后,用20mL流动相溶解样品,用恒流泵将样品溶液以一定流速注入HSCCC。进样后再以一定的流速把流动相注入HSCCC,当流动相从出口流出时,且没有固定相流出,用部分收集器收集流出的流动相。分离完成后,停止仪器转动。用气泵把HSCCC中的全部液体打出,计算其固定相保留率。固定相保留率=泵出液体中固定相的体积/泵出溶液的总体积。

1.2.4 凝胶色谱柱法提纯 对于简单的组分采用Sephadex LH-20(110cm×2cm)反复柱层析得以纯化,流动相用甲醇:水(50%~90%)梯度洗脱。纯化得到的单一化合物进行结构鉴定。

2 结果与分析

2.1 丝瓜提取物的制备

新鲜丝瓜600kg,去皮后切成片状,冷冻干燥得10.5kg丝瓜干品。粗提浓缩物冷冻干燥得氯仿萃取物87g、乙酸乙酯萃取物1g、正丁醇萃取物63g。

2.2 AB-8大孔树脂分离丝瓜总糖苷

AB-8大孔树脂分离丝瓜总皂苷得到30%、50%、70%、95%乙醇洗脱部分。TLC层析谱见图3,其中1、2、3、4分别为30%、50%、70%、95%乙醇洗脱部分。结果显示,30%洗脱部分有5个斑点,50%洗脱部分有2个斑点,70%洗脱部分有2个斑点。

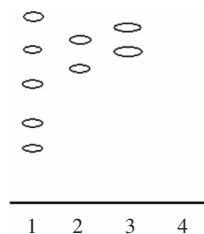


图3 大孔树脂洗脱结果TLC图

Fig.3 TLC chart of macroporous resin elution result

注:展开剂为氯仿-甲醇-水(7:3:1)下层,显色剂为10%硫酸乙醇溶液;图4~图6同。

2.3 高速逆流色谱(HSCCC)分离大孔树脂洗脱液

2.3.1 HSCCC分离30%乙醇洗脱部分糖苷 利用分析型HSCCC-D100,选择分离溶液系统为氯仿-甲醇-异丙醇-水(5:6:1:4)^[11]。

利用制备型HSCCC-D1000, 样品5g, 进样流速1mL/min, 流动相流速3mL/min, 转速900r/min, 收集10min/tube (50mL试管), 固定相保留率85%, TLC展开剂为氯仿-甲醇-水(7:3:1)下层, 显色剂为10%硫酸乙醇溶液。

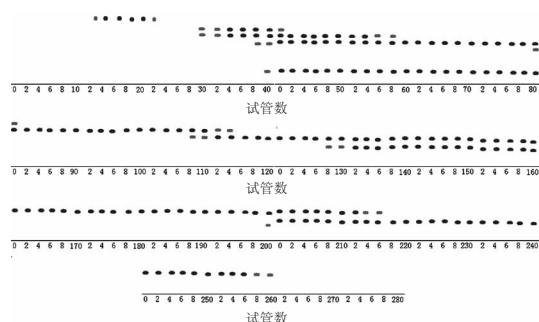


图4 HSCCC-D1000分离多糖苷类化合物的TLC结果
Fig.4 TLC of glycosides separated by HSCCC-D1000

47h实现30%洗脱部分的制备高速逆流色谱分离。根据图4大致可以分为10个分离部分。每个分离部分用图3中数字标出的范围表示, 如下(1): 12~22; (2): 30~58; (3): 59~79; (4): 82~103; (5): 103~114; (6): 115~126; (7): 127~163; (8): 164~199; (9): 200~216; (10): 217~260。组分(1)、(4)、(5)、(8)和(10)用Sephadex LH-20甲醇水梯度洗脱纯化分别得单一化合物, 经化学结构鉴定确定这五个化合物分别为阿魏酰-β-D-葡萄糖(1-Feruloyl-β-D-glucose I); 1-O-p-香豆酰-β-D-葡萄糖(1-O-p-Coumaroyl-β-D-glucose II); 对羟基苯甲酰葡萄糖(1-(4-Hydroxybenzoyl) glucose III); 咖啡酰-β-D-葡萄糖(1-Caffeoyl-β-D-glucose IV); 香豆酸(p-Coumaric acid V)。

2.3.2 HSCCC分离50%乙醇洗脱部分糖苷 利用分析型HSCCC-D100, 选择分离溶液系统为氯仿-甲醇-水(13:7:8)^[14]。

利用制备型HSCCC-D1000, 样品5g, 进样流速1mL/min, 流动相流速3mL/min, 转速900r/min, 收集10min/tube (50mL试管), 固定相保留率85%, TLC展开剂为氯仿-甲醇-水(7:3:1)下层, 显色剂为10%硫酸乙醇溶液。

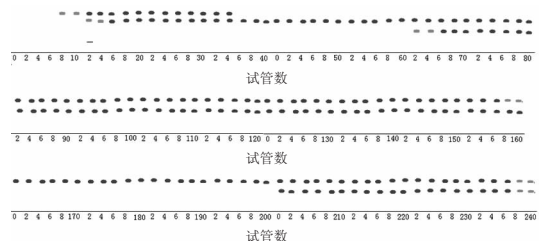


图5 HSCCC-D1000分离多酚类化合物的TLC结果图
Fig.5 TLC of polyphenol compounds separated by HSCCC-D1000

40h实现50%洗脱部分的制备高速逆流色谱分离。根据图5大致可以分为5个分离部分。每个分离部分用图4中数字标出的范围表示, 如下: (11): 8~34; (12): 35~60; (13): 61~160; (14): 161~200; (15): 201~240。

组分(12)和(14)用Sephadex LH-20甲醇水梯度洗脱纯化得单一化合物, 经化学结构鉴定确定化合

物分别为香叶木素-7-O-β-D-葡萄糖酸苷甲酯(Diosmetin-7-O-β-D-glucuronide methyl ester VI); 芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖酸苷甲酯(Apigenin-7-O-β-D-glucuronide methyl ester VII)。

其中VII为黄色无定形粉末, 分子量为460, 分子式为C₂₂H₂₀O₁₁。其¹HNMR、¹³CNMR、ESI-MS与文献[12-13]中的各项数据一致, 可能为新化合物, 需要进一步进行鉴定。

2.3.3 HSCCC分离70%乙醇洗脱部分糖苷 利用分析型HSCCC-D100, 选择分离溶液系统为氯仿-甲醇-水(13:7:8)^[14]。

利用制备型HSCCC-D1000, 样品3g, 进样流速1mL/min, 流动相流速1mL/min, 转速900r/min, 收集10min/tube (20mL试管), 固定相保留率70%, TLC展开剂为氯仿-甲醇-水(7:3:1)下层。

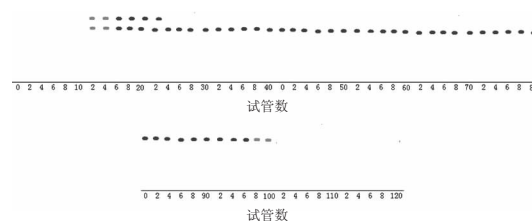


图6 HSCCC-D400分离多酚类化合物的TLC结果图
Fig.6 TLC of polyphenol compounds separated by HSCCC-D400

20h实现70%洗脱部分的制备高速逆流色谱分离。根据图6大致可以分为2个分离部分, 每个分离部分用图5中数字标出的范围表示, 如下: (16): 12~24; (17): 24~100。

组分(17)用Sephadex LH-20甲醇水梯度洗脱纯化得单一化合物, 经化学结构鉴定确定化合物为丝瓜皂苷H(Lucyosides H VIII)。

3 结论

丝瓜正丁醇相采用AB-8大孔树脂, 用水和30%、50%、70%和95%的乙醇溶液洗脱提纯得总糖苷。30%、50%和70%乙醇洗脱部分采用HSCCC分离得到8个化合物。

化合物I-VII都是首次从该植物中分得。采用大孔树脂分离, 能够起到规分化化合物的作用。高速逆流色谱在植物活性部位分离有非常广阔的应用前景。

参考文献

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典(下册)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986: 791-795.
- [2] 梁龙, 鲁灵恩, 蔡元聪. 丝瓜属植物化学成分研究概况[J]. 华西药理学杂志, 1995, 10(1): 32-38.
- [3] 李磊, 杜琪珍. 丝瓜中的皂甙及其生物活性[J]. 食品与机械, 2005(3): 68-73.
- [4] 何光星, 刘云, 齐尚斌. 丝瓜皂甙的药理实验研究[J]. 四川中草药研究, 1991(8): 54-58.
- [5] 何光星, 刘云, 齐尚斌. 丝瓜皂甙的部分药效学研究[J]. 华西药理学杂志, 1997, 12(2): 76-78.
- [6] 毛泽善, 徐自超, 宋向凤, 等. 丝瓜提取物对小鼠巨噬细胞

(下转第294页)

分别为20、30、40、50、60min,水解时间对玉米黄粉中淀粉含量的影响见图5。

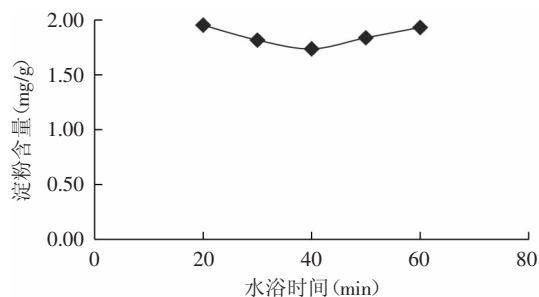


图5 水浴时间对玉米黄粉中淀粉含量的影响

Fig.5 The influence of stretching time on starch in CGM

由图5可知,当水浴时间小于40min时,淀粉含量逐渐下降,当水浴时间大于40min时,淀粉含量逐渐上升,当水浴时间为40min时,淀粉含量最低,但是随着水浴时间的增加,淀粉含量范围较小,这可能因为水浴时间对淀粉的影响相对较小,综合考虑,确定水浴时间为40min。

2.5 最佳工艺条件的选择

采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行正交实验设计,以确定最佳工艺条件,见表1。

表1 $L_9(3^4)$ 正交因子水平表

Table 1 $L_9(3^4)$ The orthogonal factor levels

水平	A 酶用量 (mg/g)	B pH	C 水浴温度 (°C)	D 水浴时间 (min)
1	15	6.5	40	30
2	20	7.0	50	40
3	25	7.5	60	50

按表1的正交因子水平设计 $L_9(3^4)$ 正交实验结果与分析见表2。

由表2可知, α -淀粉酶用量、pH、水浴时间、水浴温度这四个因素对玉米黄粉中淀粉含量的影响依次为:pH(B)> α -淀粉酶用量(A)>水浴温度(C)>水浴时间(D),pH对淀粉含量的影响最显著,水浴时间对淀粉含量的影响很小,这与单因素实验一致。因此确定玉米黄粉中淀粉测定的最佳工艺条件为 $A_2B_3C_2D_3$,即 α -淀粉酶用量为20mg/g、pH为7.5、水浴温度为50°C、水浴时间为50min。

按 $A_2B_3C_2D_3$ 条件进行3次平行验证实验,得到最终玉米黄粉中淀粉含量为0.849mg/g,由此可见,淀粉含量低于表2中每一项实验结果,故该优化条件为最佳选择。

表2 $L_9(3^4)$ 正交实验结果

Table 2 $L_9(3^4)$ The orthogonal experiment results

实验号	A	B	C	D	淀粉含量(mg/g)
1	1	1	1	1	1.787
2	1	2	2	2	1.392
3	1	3	3	3	1.040
4	2	1	2	3	1.342
5	2	2	3	1	1.272
6	2	3	1	2	1.011
7	3	1	3	2	1.428
8	3	2	2	3	1.346
9	3	3	1	1	0.891
k_1	1.406	1.519	1.381	1.317	
k_2	1.208	1.337	1.208	1.277	
k_3	1.288	0.981	1.247	1.243	
R	0.198	0.538	0.173	0.074	

3 结论

采用分光光度法测定黄粉中的淀粉含量,通过设计正交优化的玉米黄粉中淀粉水解的最佳工艺条件是 α -淀粉酶用量为20mg/g、pH为7.5、水浴温度为50°C、水浴时间为50min,在此条件下玉米黄粉中淀粉含量为0.849mg/g,大大降低了黄粉中淀粉的含量,同时降低了提取液的粘度,为提高提取物玉米醇溶蛋白和谷蛋白的提取率和纯度创造了良好的条件。分光光度法快速准确的测定,为工厂实际生产控制提供了重要参考。

参考文献

- [1] 鲁晓翔,唐津忠.玉米麸质综合利用研究进展[J].食品科技,1999,25(6):52-53.
- [2] 张锋斌,李维平.玉米蛋白粉的营养成分及应用[J].畜牧兽医学杂志,1998,17(4):26-28.
- [3] Shukla R,Chenyan M. Zein;the industrial protein from corn[J]. Industrial Crops Products,2001,13(3):171-192.
- [4] 姚艾东.玉米黄色素的提取及应用研究[J].食品工业科技,2001,22(4):32-34.
- [5] 李梦琴,李运显,宋晓燕.玉米醇溶蛋白提取工艺的研究[J].食品工业科技,2008,29(12):135-137.
- [6] 王冠禹,陈野,杜悦.玉米蛋白粉研究进展[J].农产品加工:学刊,2008(7):85-87.
- [7] 王立刚,胡晨俊,李安东. α -淀粉酶降解淀粉性能研究[J].辽宁化工,2008,37(4):223-226.
- [8] 张峻松,贾春晓,毛多斌.碘显色法测定烟草中的淀粉含量[J].烟草科学,2004(5):24-26.

(上接第291页)

- 功能的影响[J].新乡医学院学报,2004,21(2):80-82.
- [7] 康白,张义军,李华洲.丝瓜络药理作用的研究[J].中草药,2004,24(5):248-250.
- [8] 戴德舜,王义明,罗国安.高速逆流色谱研究进展[J].分析化学,2001,29(5):586-591.
- [9] 黄宝康,黄宝康,秦路平,等.高速逆流色谱技术在天然产物分离及中药质控中的应用[J].中药材,2001,24(10):575-761.
- [10] 袁黎明,傅若农,张天佑.高速逆流色谱在植物有效成分

- 分离中的应用[J].药物分析杂志,1998,18(1):60-64.
- [11] 谭龙泉,张所明,欧庆瑜.薄层色谱在高速逆流色谱溶剂系统选择过程中的应用[J].分析化学,1996(12):1448-1451.
- [12] 峰锡志,徐绥绪,李文,等.苦碟子中的新黄酮苷(II)[J].中国药物化学杂志,2000,10(2):143.
- [13] Feng Xizhi,Xu Suixu,Dong Mei. Two Novel Flavonoids from Ixeris sonchifolia[J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences,2000,9(3):134-136.