

姜油树脂中 β -倍半水芹烯的分离纯化

周长远¹, 王艳², 杜爱玲^{3,*}

(1. 枣庄市台儿庄区林业局, 山东枣庄 277400;

2. 山东职业学院生物工程系, 山东济南 250104;

3. 山东大学化学与化工学院, 山东济南 250061)

摘要:应用超临界二氧化碳萃取姜油树脂, 选用乙醇-水作流动相, HPD-100 大孔树脂作固定相分离出其中的烯类物质, 并用高效液相色谱法进行跟踪检测确定含烯类的洗脱段。对比不同展开剂下烯类物质在硝酸银硅胶板上的层析效果, 最终选用 $V_{\text{正己烷}}:V_{\text{乙酸乙酯}}=95:5$ 的溶剂作流动相分离其中的 β -倍半水芹烯。GC/MS 检测结果表明, 分别选用 HPD-100 大孔树脂和硝酸银硅胶作为固定相可以将姜油树脂中的 β -倍半水芹烯很好的分离出来, 其峰面积百分数达 88.73%, 收率为 84.05%。通过进一步 HPLC 检测证明 β -倍半水芹烯具有紫外吸收, 其特征吸收波长为 232 nm。

关键词:硝酸银硅胶, β -倍半水芹烯, 分离

Separation of β -sesquiphellandrene from ginger oleoresin

ZHOU Chang-yuan¹, WANG Yan², DU Ai-ling^{3,*}

(1. TaiEr zhuang Forestry Bureau of Zaozhuang Municipal, Zaozhuang 277400, China;

2. Department of Bioengineering, Shandong Polytechnic, Ji'nan 250104, China;

3. School of Chemistry and Chemical Engineering, Shandong University, Ji'nan 250061, China)

Abstract: A ethanol-water solution was used as mobile phase, and the HPD-100 macroporous resin as the stationary phase to separate the vinyl part from ginger oleoresin extracted by supercritical carbon dioxide, and HPLC was used for detecting vinyls tracing. Different developing solvents of vinyls on argentated silica gel G pre-coated plate were compared, $V_{\text{hexane}}:V_{\text{ethylacetate}}=95:5$ was determined as the mobile phase to separate β -sesquiphellandrene. The GC/MS test results indicated that HPD-100 macroporous resin and silver nitrate modified silica gel were separately used as the stationary phase which could effectively separate β -sesquiphellandrene from ginger oleoresin with 88.73% area percentage and 84.05% recovery. Through further HPLC analysis, β -sesquiphellandrene was found its existence of UV absorption at 232 nm.

Key words: silver nitrate modified silica gel; β -sesquiphellandrene; separation

中图分类号: TS201.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2016)03-0225-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2016.03.039

β -倍半水芹烯与姜烯等属倍半萜烯类化合物, 均为姜油树脂的主要活性成分^[1]。研究证实, 其性质同姜烯相似, 具有多种生物活性, 如抗病毒、抗生育和抗溃疡等^[2]。由于姜油树脂中倍半萜烯类化合物同分异构体较多, 目前针对 β -倍半水芹烯的分离纯化方法较少。贾雁高等^[3]曾采用普通硅胶柱进行姜烯的分离纯化, 最终所得的样品姜烯和 β -倍半水芹烯也没有完全分离。Winstein 等人^[4]发现银离子可以与烯炔类物质发生可逆反应, 形成稳定的络合物, 其稳定性与双键的位置有关^[5-6]。黄汉昌等人^[7]曾利用银离子络合分离出了香茅次油中的 β -榄香烯。

姜油树脂中不同类型倍半萜的双键位置不同,

因此可以与银离子形成稳定性不同的络合物。本文根据 β -倍半水芹烯的结构特点, 参照普通硅胶柱的工艺流程, 利用硝酸银硅胶柱从姜油树脂中分离纯化 β -倍半水芹烯。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

姜油树脂 南阳张仲景大厨房股份有限公司; HPD-100 大孔树脂 沧州宝恩吸附材料科技有限公司; 柱层析硅胶 200~300 目、硅胶层析 G 板 青岛海洋化工厂; 乙醇、硝酸银、甲醇、乙酸乙酯、正己烷、香草醛、浓硫酸, 分析纯 天津市广成化学试剂有限公司。

HY-4 调速多用振荡器 江苏金城国胜实验仪器

收稿日期: 2015-04-23

作者简介: 周长远 (1985-), 男, 硕士, 研究方向: 种质资源创新与分子生物学研究, E-mail: fangfeiyuanfang@126.com。

* 通讯作者: 杜爱玲 (1956-), 女, 硕士, 教授, 研究方向: 天然产物的提取分离等, E-mail: duailing56@163.com。

基金项目: 科技部农业科技成果转化项目 (2008GB2C600178)。

厂;上海沪西自动柱层析系统;TU-1901 双光束紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限公司;气相-质谱联用仪、高效液相色谱仪(紫外检测器) 美国安捷伦公司。

1.2 实验方法

1.2.1 HPD-100 大孔树脂分离烯类段物质 参照王艳等^[8]有关树脂柱的操作,将已处理好的 HPD-100 大孔树脂采用 40% 的乙醇装柱,称取 1 g 左右姜油树脂加入层析柱中,用 50% 的乙醇淋洗,采用不同配比的乙醇-水体系分别进行洗脱,控制流速为 1 mL/min 左右,收集洗脱液,备测。

1.2.2 UV 和 HPLC 分析 用紫外分光光度计跟踪检测,分别记录 232、262、282 nm 下的实验结果。

同时用高效液相色谱仪测定各洗脱液的组成。

检测条件:ODS 柱,柱温 25 °C;二极管阵列检测器,检测波长 232、262、282 nm;甲醇-水体系,梯度洗脱,流量 1 mL/min。

1.2.3 硝酸银硅胶 G 板及硝酸银硅胶的制备 将硅胶 G 板(含硅胶的一面向下),轻轻放到 10% 的硝酸银溶液中,浸泡 10~20 s 左右,取出,放在避光处晾干,备用^[9]。

称取硝酸银于体积分数为 70% 的甲醇溶液中,待硝酸银溶解后加入硅胶,搅拌均匀,于 110 °C 下避光烘干,备用。

1.2.4 TLC 分析 将烯类段流出液点样于硝酸银硅胶 G 板一端,展开,然后用 1% 的香草醛浓硫酸溶液显色。

1.2.5 硝酸银硅胶柱层析法分离 β -倍半水芹烯 避光条件下,将已处理好的硝酸银硅胶采用干法装柱^[10]。取烯类段样品上样,加洗脱剂,控制流速,收集洗脱液,备测。

1.2.6 HPLC 和 GC-MS 分析 用高效液相色谱仪和气相-质谱联用仪测定 1.2.5 中洗脱液的组成。

HPLC 检测条件同 1.2.2。

GC-MS 检测条件参照姜烯的检测条件^[3]。

1.2.7 β -倍半水芹烯回收率的计算 参照贾雁高等人的计算方法^[3],利用分离所得 β -倍半水芹烯样品和姜油树脂的 GC/MS 分析数据,计算 β -倍半水芹烯的收率:

$$Y(\%) = \frac{A_1 \times V_1}{A_2 \times m \times N} \times 100$$

其中, Y 为 β -倍半水芹烯的收率; A_1 为单位体积样品中 β -倍半水芹烯的峰面积计数; A_2 为姜油树脂单位体积样品中 β -倍半水芹烯的峰面积计数; V_1 为 β -倍半水芹烯样品的体积, mL; m 为姜油树脂的上样量; N 为姜油树脂的稀释倍率。

2 结果与分析

2.1 HPD-100 大孔树脂分离烯类段物质

对 1.2.1 中分离所得样品利用紫外分光光度计跟踪检测,结果初步表明:70% 的乙醇水溶液可以将姜油树脂中的酚类物质洗下,90% 的乙醇溶液洗脱其中的烯类物质(如图 1)。

为进一步确定 HPD-100 大孔树脂的分离效果,

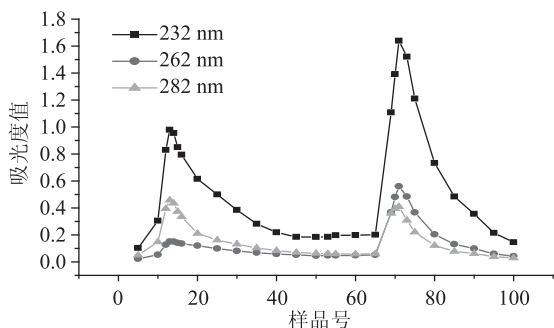


图 1 HPD 大孔树脂的洗脱曲线

Fig.1 Eluant curve of HPD macroporous resin

对烯类段物质峰值样在 232、262、282 nm 下进行 HPLC 检测,所得色谱图如图 2 所示。

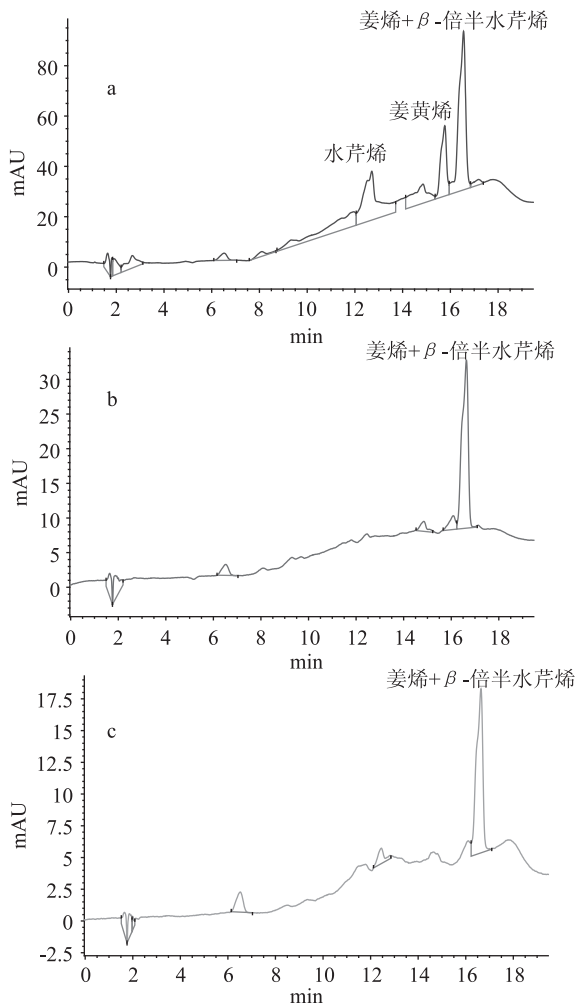


图 2 烯类洗脱段峰值样的 HPLC 谱图

Fig.2 HPLC chromatograms of vinyl peak sample
注:a:232 nm;b:262 nm;c:282 nm。

HPLC 分析结果表明,10 min 前没有姜烯的特征吸收峰(RT 为 2.9 min 左右),仅有少量的溶剂峰存在,保留时间达 12 min 后出现明显的谱峰,且均为烯类物质的吸收峰;又因在 262 nm 下的吸收强于 282 nm(酚类物质的特征吸收波长),由此我们可推断 90% 的乙醇水溶液可以将 RT 值为 12 min 以后的烯类物质完全洗脱下来,所得烯类样中不含姜酚类物质,烯类与酚类物质实现充分分离。

2.2 烯类段物质的 TLC 分析

合并烯类段洗脱液,以硝酸银处理后的硅胶 G 板作为层析介质,采用不同配比的正己烷和乙酸乙酯作展开剂,展开样品,分析效果如图 3 所示。

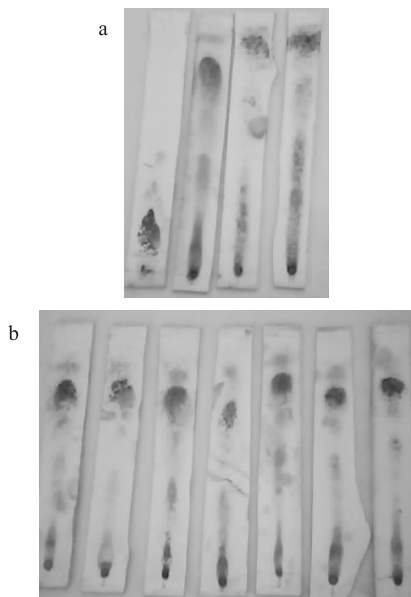


图 3 烯类段物质在硝酸银硅胶 G 板上的 TLC
Fig.3 Thin layer chromatography of vinyl sample on argentated silica gel G pre-coated Plate

注:a 图从左到右分别为 $V_{\text{正己烷}}:V_{\text{乙酸乙酯}} = 100:0; 90:10; 80:20; 70:30$; b 图从左至右分别为 $V_{\text{正己烷}}:V_{\text{乙酸乙酯}} = 98:2; 97:3; 96:4; 95:5; 94:6; 93:7; 92:8$ 。

图 3 分析结果表明,以正己烷含量为 92%~98% 的正己烷-乙酸乙酯的混合溶剂作展开剂时,烯类物质的展开效果较好但是区别不大;考虑到硅胶在极性条件下较易发生溶胀,致使柱压力过大的性质^[11],层析过程中适宜选用弱极性的溶剂,因此最终确定为 $V_{\text{正己烷}}:V_{\text{乙酸乙酯}} = 95:5$ 的溶液体系。(经 GC-MS 检测证明 β -倍半水芹烯的显色点为 a 点, R_f 值为 0.8 左右,该点在加热显色过程中挥发)。

2.3 硝酸银硅胶柱层析分离 β -倍半水芹烯

量取 8 mL 烯类段洗脱液上样,选用 $V_{\text{正己烷}}:V_{\text{乙酸乙酯}} = 95:5$ 的溶液体系洗脱,洗脱流速为 2 mL/min 左右。GC-MS 法分析收集的 β -倍半水芹烯峰值样,所得质谱图如图 4 所示,样品的质谱数据为:MS m/z (rel.int.): 204.1 (M+, 29), 161.0 (63), 162.1 (9), 133.0 (44), 134.0 (9), 120.0 (39), 119.0 (26), 109.0 (31), 93.0 (60), 92.0 (39), 91.0 (58), 76.9 (38), 68.9 (100), 54.9 (20), 所得结果与 Teris A. 等人分析的 β -倍半水芹烯的质谱结果^[12] 基本相同,由此确定该样品所含物质是 β -倍半水芹烯,该峰值样的总离子流图如图 5 所示,其含量见表 β -倍半水芹烯峰值样成分组成。

2.4 β -倍半水芹烯的紫外吸收

将 2.3 中的峰值样在不同波长条件下进行 HPLC 检测(DAD 检测器),该峰值样仅在 232 nm 下出现吸收峰,如图 6。分析结果表明, β -倍半水芹烯具有紫

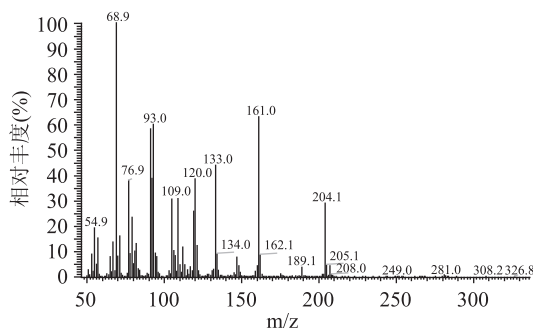


图 4 β -倍半水芹烯峰值样品的质谱图
Fig.4 Mass Spectrum of the β -sesquiphellandrene Sample

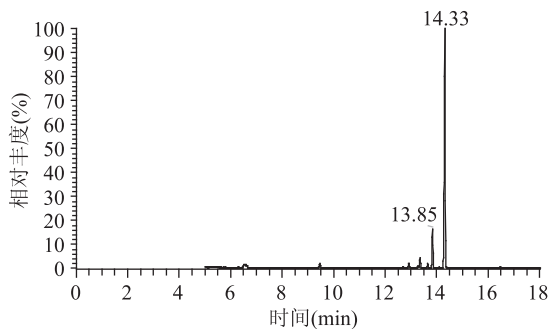


图 5 β -倍半水芹烯峰值样品的总离子流图
Fig.5 Total ion chromatogram of the β -sesquiphellandrene peak sample

外吸收,其特征吸收波长为 232 nm,在 1.2.1 与 1.2.5 的分离条件下 β -倍半水芹烯的峰面积百分含量可达 93.39%。

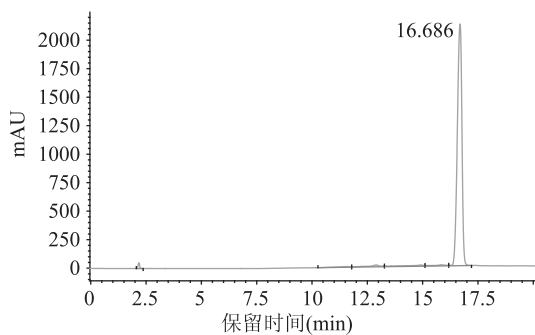


图 6 β -倍半水芹烯峰值样品的 HPLC 谱图
Fig.6 HPLC spectrums of the β -sesquiphellandrene peak sample

2.5 β -倍半水芹烯收率的计算

利用表 1 中得到的 β -倍半水芹烯峰面积计数和姜油树脂的 GC/MS 分析数据^[13],姜油树脂中 β -倍半水芹烯的 AA 为 19138673,利用 1.2.7 中的计算公式计算其收率。在选定的分离条件下,共收集样品约 200 mL,其中含 β -倍半水芹烯样品约 35 mL,最终计算其收率为 84.05%。

3 结论

选用 HPD-100 大孔树脂作固定相,90% 的乙醇-水作流动相,可以分离出姜油树脂中的烯类物质,然后选用 $V_{\text{正己烷}}:V_{\text{乙酸乙酯}} = 95:5$ 的混合溶剂,采用硝酸银硅胶柱能较完全的分离出其中的 β -倍半水芹

表1 β -倍半水芹烯峰值样成分组成
Table 1 Components of β -sesquiphellandrene Product

序号	保留时间 (min)	化学成分中英文名称	分子式	峰面积计数 /AA	峰面积 百分数(%)
1	13.85	3-(4-羟基-3-甲氧)-2-丙烯-1-醇 3-(4-hydroxy-1-propenyl)-2-methoxy-Phenol	$C_{10}H_{12}O_3$	11675216	11.27
2	14.33	β -倍半水芹烯(β -Sesquiphellandrene)	$C_{15}H_{24}$	91920314	88.73

烯,其峰面积百分数为 88.73%,收率达 84.05%,HPLC 的分析结果证明 β -倍半水芹烯在 232 nm 下具有紫外吸收。

参考文献

[1] Pinder A R. 萜类化学[M]. 北京:科学出版社,1964,135-143.
[2] 倪明红,陈钟瑛,严秉淳. 光学活性姜烯类倍半萜烯的合成及其抗生育活性的探讨[J]. 华东化工学院学报,1988,14(6):677-678.
[3] 贾雁高. 生姜精油中姜烯成分的分离纯化[D]. 济南:山东大学,2010.
[4] Vries B DE. Quantitative separation of highel fatty acid methyl esters by adsorption chromatography on silica impregnated with silver nitrate[J]. JAOCS.1963,40(5):184-186.
[5] Bennett B, Larter S R. Quantitative Separation of Aliphatic and Aromatic Hydrocarbons Using Silver Ion - Silica Solid - Phase Extraction[J]. J Anal Chem.2000,72(5):1039-1044.
[6] 欧阳长庚,卢文彪. 利用硝酸银处理的硅胶色谱方法分离和提纯中药有效成分的思考[J]. 广州中医药大学学报,2004,

21(4):319-321.

[7] 黄汉昌,朱宏吉,姜招峰. 银离子配位色谱法分离香茅次油中的 β -榄香烯的研究[J]. 无机化学学报,2009,25(3):433-438.
[8] 王艳,杜爱玲,薛岩明,等. D4020 大孔树脂分离姜油树脂中的姜酚[J]. 山东大学学报,2011,41(3):148-153.
[9] Ghosh A, Hoque M Dutta. Separation of polyunsaturated fatty acid esters by argentation column chromatography on silicic acid[J]. J Chromatography,1972,69(1):207-208.
[10] 张余,阚建全,陈宗道. 硝酸银硅胶纯化 α -亚麻酸的研究[J]. 离子交换与吸附,2005,21(1):47-54.
[11] Snyder L R, Dolan J W, Grant J R. Gradient elution in high-performance liquid chromatography: I. Theoretical basis for reversed-phase systems[J]. Chromatography,1979,165(1):3-30.
[12] Teris A, Van B, Gerrit P. Isolation and Identification of the Five Major Sesquiterpene Hydrocarbons of Ginger [J]. J Phytochemical Analysis,1991,2(1):26-34.
[13] 王艳,杜爱玲,杜爱琴. 银离子配位柱层析法分离姜油树脂中的姜烯[J]. 精细化工,2012,29(7):673-677.

(上接第 224 页)

[3] Ramunè Bobinaitė, Pranas Viškelis, Petras Rimantas Venskutonis. Variation of total phenolics, anthocyanins, ellagic acid and radical scavenging capacity in various raspberry (Rubus spp.) cultivars[J]. Food Chemistry,2012,132:1495-1501.
[4] William Mullen, Michael E J Lean, Alan Crozier. Rapid characterization of anthocyanins in red raspberry fruit by high-performance liquid chromatography coupled to single quadrupole mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A,2002,966:63-70.
[5] Kashif Ghafoor, Yong Hee Choi, Ju Yeong Jeon, et al. Optimization of ultrasound - assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (Vitis vinifera) seeds[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2009,57:4988-4994.
[6] 李金星,胡志和,马立志,等. 超声波辅助提取蓝莓果渣中花色苷的条件研究[J]. 食品工业科技,2013,34(20):255-259.
[7] 李双石,李淳,张虎成,等. 超声波提取条件对酿酒葡萄皮渣花色苷的影响[J]. 食品工业科技,2013,34(18):294-297.
[8] 肖军霞,黄国清,仇宏伟,等. 红树莓花色苷的提取及抗氧化活性研究[J]. 食品科学,2011,32(8):15-18.
[9] 李钰,吴卫,苏华,等. 响应面法优化紫苏籽粕超声辅助提取原花青素工艺[J]. 食品科学,2014,35(4):50-54.
[10] 白立敏,辛秀兰,江波,等. 树莓红色素的提取及稳定性研究[J]. 食品添加剂,2007,28(12):170-195.

[11] 左勇,李杨,谢晖,等. 超声波辅助提取桑椹酒糟中花青素的研究[J]. 中国食品添加剂,2012(6):115-121.
[12] 熊海蓉,文祝友,蒋利华,等. 超声波辅助提取野生火棘果中红色素的研究[J]. 中国食品添加剂,2013(1):121-125.
[13] 蒋利华,熊海蓉,文祝友,等. 超声波辅助提取野生火棘果中黄色素的研究[J]. 粮油食品科技,2013,21(3):68-71.
[14] 杨雪飞,潘利华,罗建平,等. 蓝莓色素的超声提取工艺及稳定性[J]. 食品科技,2010,31(20):251-255.
[15] Roman Buckow, Anja Kastell, Netsanet Shiferaw Terefe, et al. Pressure and temperature effects on degradation kinetics and storage stability of total anthocyanins in blueberry juice [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2010,58:10076-10084.
[16] 孙海燕. 响应面法优化草莓中花青素提取工艺参数[J]. 食品工业科技,2013,34(10):243-250.
[17] 孟宪军,王成,宋德群,等. 响应面法优化超声提取蓝莓花色苷工艺的研究[J]. 食品科技,2010,35(9):249-253.
[18] 杨喆,万山,张乔会,等. 响应面法优化山杏核壳总黄酮提取工艺及其抗氧化性的研究[J]. 食品工业科技,2015,36(6):279-284.
[19] Hui Teng, Won Y Lee, Yong H Choi. Optimization of ultrasonic - assisted extraction of polyphenols, anthocyanins, and antioxidants from raspberry (Rubus coreanus Miq.) using response surface methodology[J]. Food Analytical Methods,2014,7:1536-1545.