

硅胶—硝酸银硅胶柱层析分离纯化 β -倍半水芹烯

Separation of β -sesquiphellandrene by silica gel and argentation column chromatography

王艳¹ 周长远² 杜爱玲³

WANG Yan¹ ZHOU Chang-yuan² DU Ai-ling³

(1. 山东职业学院生物工程系, 山东 济南 250104; 2. 枣庄市台儿庄区林业局, 山东 枣庄 277400;
3. 山东大学化学与化工学院, 山东 济南 250061)

(1. Department of Bioengineering, Shandong Polytechnic, Jinan, Shandong 250104, China;

2. Taier zhuang forestry bureau of Zaozhuang municipal, Zaozhuang, Shandong 277400, China;

3. Institute of Chemistry and Chemical Engineering, Shandong University, Jinan, Shandong 250061, China)

摘要:利用普通硅胶柱,选用乙醚—正己烷作流动相对姜油树脂进行初步分离,采用 GC—MS 法进行跟踪检测。对比不同展开剂下 β -倍半水芹烯和姜烯混合液在硝酸银硅胶板上的层析情况,选用体积比为 99:1 的正己烷—乙酸乙酯流动相体系分离其中的 β -倍半水芹烯。结果表明: β -倍半水芹烯的 GC—MS 峰面积百分数达 95.79%,收率为 89.73%。通过对 β -倍半水芹烯峰值样进行 HPLC 检测,证明 β -倍半水芹烯的紫外特征吸收波长为 232 nm,在姜烯的特征吸收峰 262 nm 下基本无吸收。

关键词:硅胶;硝酸银硅胶; β -倍半水芹烯;柱层析

Abstract: A aether and *n*-hexane solution was used as mobile phase to preliminary extract β -sesquiphellandrene from ginger oleoresin by common silica gel column chromatography, and GC—MS was used for detecting β -sesquiphellandrene tracing. Comparison of different developing solvents of β -sesquiphellandrene and zingiberene on argentated silica gel G pre-coated plate, hexane-ethyl acetate (99:1) was used as the mobile phase to separate β -sesquiphellandrene, the results indicated that the GC—MS area percentage of the silica gel and argentation column chromatography product was 95.79% with 89.73% recovery. Through the HPLC detection of β -sesquiphellandrene peak sample, β -sesquiphellandrene was found its existence of UV absorption at 232 nm, and generally had no absorption at 262 nm the characteristic absorption of zingiberene.

Keywords: silica gel; argentation silica gel; β -sesquiphellandrene; column chromatography

基金项目:科技部农业科技成果转化项目(编号:2008GB2C600178)

作者简介:王艳,女,山东职业学院助教,硕士。

通讯作者:杜爱玲(1956—),女,山东大学教授,硕士。

E-mail: duailing56@163.com

收稿日期:2015—10—20

β -倍半水芹烯与姜烯等均为倍半萜烯类化合物,同属姜油树脂的主要活性成分^[1]。研究^[2]证实, β -倍半水芹烯同姜烯均具有抗溃疡、抗生育、抗病毒等多种生物活性。 β -倍半水芹烯的性质与姜烯极为相似,常规的分离方法难以得到高纯度的 β -倍半水芹烯。Winstein 等^[3]发现银离子可以与烯烴类物质形成络合物,该物质所含双键的位置对络合物的稳定性有一定的影响^[4-5];姜油树脂中所含倍半萜类型不同,其双键位置不同,因此与银离子形成的络合物稳定性也不同。本试验拟根据 β -倍半水芹烯的结构特点,在前期研究^{[6]38-43}的基础上结合贾雁高^{[7]35-52}研究的普通硅胶柱层析的工艺路线,利用 β -倍半水芹烯和姜烯与银离子形成络合物稳定性的不同,采用二次柱层析法^[8]从姜油树脂中分离提纯 β -倍半水芹烯,旨在为高纯度 β -倍半水芹烯的提取分离提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 材料与试剂

姜油树脂:南阳张仲景大厨房股份有限公司;

乙醚、甲醇、硝酸银、正己烷、乙酸乙酯、香草醛、浓硫酸;

A.R.,天津广成化学试剂有限公司;

柱层析硅胶:200~300目,青岛海洋化工有限公司;

G型薄层层析硅胶板:青岛海洋化工有限公司。

1.1.2 主要设备

自动核酸蛋白分离层析仪:MA99-3型,上海沪西分析仪器有限公司;

气相色谱—质谱联用仪:HP6890N-5972NMSD型,Agilent Technologies;

高效液相色谱仪(UVD):1260 Infinity型,Agilent Technologies。

1.2 试验方法

1.2.1 硅胶柱层析法分离姜油树脂中的 β -倍半水芹烯和姜烯 参照贾雁高^[7] 35-37和董新荣等^[9]有关硅胶柱的分离研究,将层析用硅胶110℃下活化10 min后干法装柱,量取1 g姜油树脂于层析柱中,柱长60 cm,用体积比3:97的乙醚—正己烷流动相体系进行洗脱,控制流速2 mL/min,分瓶收集流出液,以GC—MS测定其组成。

1.2.2 GM—MS和HPLC分析 用气质联用色谱仪进行跟踪检测,确定流出液的组成。检测过程中的色谱条件与质谱条件参照前期姜烯的分析条件^[10]。同时以高效液相色谱法进一步分析 β -倍半水芹烯的紫外吸收情况。

色谱条件:ODS柱,柱温25℃;流动相为甲醇—水体系,梯度洗脱(0~5 min内甲醇浓度由0升至5%;5~12 min内,甲醇浓度由5%升至20%;12 min后甲醇浓度为20%),流量1 mL/min;DAD检测器,检测波长232 nm。

1.2.3 硝酸银硅胶与硝酸银硅胶G板的制备 称少量硝酸银于体积比为7:3的甲醇—水溶液中,待其完全溶解后加入硅胶,搅拌均匀,110℃条件下避光烘干,避光保存备用。将G型薄层层析板置于10%的硝酸银溶液中浸泡10~20 s后取出,避光晾干。

1.2.4 硝酸银硅胶G板TLC试验 参照前期研究^[10],吸取 β -倍半水芹烯的峰值样品,用毛细管点样于已处理好的硝酸银硅胶G薄层板上,以正己烷和乙酸乙酯不同配比的混合溶液作为展开剂,展开后取出G板,用1%的香草醛—浓硫酸溶液显色。

1.2.5 硝酸银硅胶柱层析分离 β -倍半水芹烯 参照普通硅胶柱的装法,避光下将处理好的硝酸银硅胶^[11]一次性加入层析柱中,取硅胶柱中富含 β -倍半水芹烯的流出液加入层析柱的上端,加流动相,控制流速,分瓶收集样品,待测。

1.2.6 β -倍半水芹烯的GC—MS和HPLC分析 采用GC—MS和HPLC测定硝酸银硅胶柱各样品的组成及 β -倍半水芹烯的含量。分析条件同1.2.2。

2 结果与分析

2.1 硅胶柱层析法分离 β -倍半水芹烯

图1普通硅胶柱峰值样的GC—MS检测结果表明,该样品中主要含有姜烯和 β -倍半水芹烯两种物质(见表1)。经HPLC在232 nm下进一步检测却只出现一个吸收峰(见图2),前期的研究表明姜烯在232 nm下具有紫外吸收,分析其原因如下:

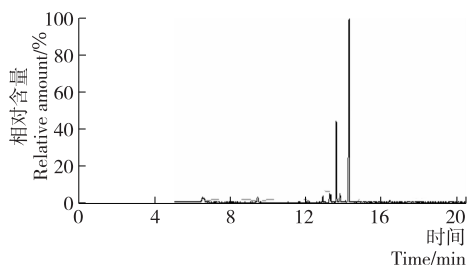


图1 硅胶柱层析法的GC/MS色谱图

Figure 1 GC/MS chromatograms of β -sesquiphellandrene by silica gel chromatography column

表1 硅胶柱 β -倍半水芹烯峰值样的化学组成及相对含量

Table 1 The chemical compositions and their relative amount of β -sesquiphellandrene peak sample

保留时间	化学成分	峰面积百分数/%
13.64	姜烯	31.03
14.29	β -倍半水芹烯	68.97

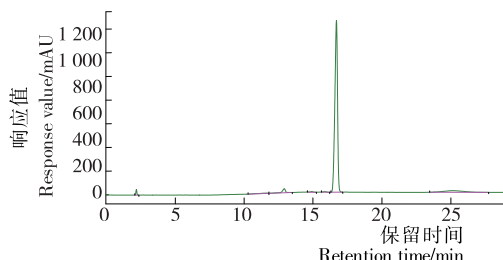


图2 β -倍半水芹烯峰值样的HPLC色谱图

Figure 2 HPLC chromatograms of β -sesquiphellandrene peak sample

① 在232 nm下 β -倍半水芹烯不具有紫外吸收;② 在232 nm下 β -倍半水芹烯与姜烯具有完全相同的紫外吸收。为了证实 β -倍半水芹烯的紫外吸收情况,进行进一步的研究。

2.2 硝酸银硅胶G板薄层层析

由图3可知,正己烷含量在96%~99%范围内的混合溶剂对 β -倍半水芹烯和姜烯的分离效果较好,但是整体区别不大,试验过程中考虑到硅胶的性质^[12],层析过程适宜选用弱极性的溶剂,最终确定体积比99:1的正己烷—乙酸乙酯混合溶剂作为柱层析的流动相。图3中 β -倍半水芹烯的显色点为最上端的紫红色斑点, R_f 值约为0.6,在烘干显色过程中该点逐渐消失,出现此现象的原因可能是 β -倍半水芹烯与银离子形成的络合物具有受热不稳定性,该结论有待进一步的研究。

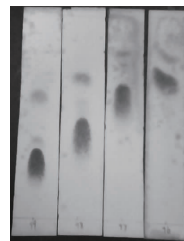


图3 β -倍半水芹烯峰值样在硝酸银硅胶G板上的薄层层析
Figure 3 Thin layer chromatography of β -sesquiphellandrene on argentated silica gel G pre-coated plate

2.3 β -倍半水芹烯的硝酸银硅胶柱层析

以体积比为99:1的正己烷—乙酸乙酯为流动相体系,以1.2.3中处理好的硝酸银硅胶干法装柱,取1.2.1硅胶柱中 β -倍半水芹烯和姜烯的混合液上柱,控制流速2 mL/min,收集流出液。将所得峰值样品进行GC—MS检测,检测结果见图4及表2。

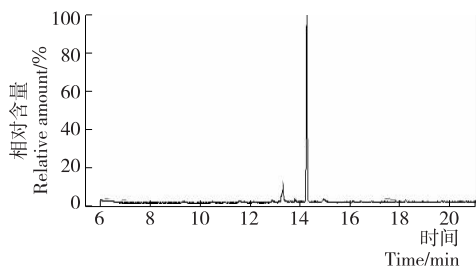
图 4 硝酸银硅胶柱 β -倍半水芹烯的 GC/MS 色谱图

Figure 4 GC/MS chromatograms of β -sesquiphellandrene by argentated silica gel chromatography column

表 2 硝酸银硅胶柱 β -倍半水芹烯峰值样的化学组成及相对含量

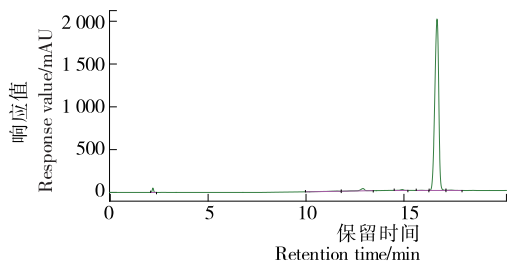
Table 2 The chemical compositions and their relative amount of β -sesquiphellandrene product

保留时间/min	化学成分	峰面积百分数/%
13.33	十二甲基环六硅氧烷	4.21
14.27	β -倍半水芹烯	95.79

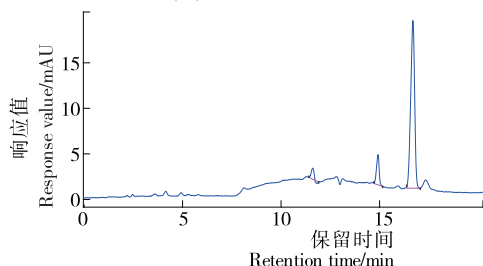
GC—MS 检测结果表明, β -倍半水芹烯和姜烯经硝酸银硅胶柱可实现充分分离, β -倍半水芹烯峰值样中其相对含量可达 95.79%。分析该峰值样所得质谱数据, 其检测结果与 Teris A 等^[13]所得 β -倍半水芹烯的质谱数据基本相同, 因此可判定该峰值样为 β -倍半水芹烯。

2.4 β -倍半水芹烯的紫外吸收

将 2.3 中的峰值样分别在 232 nm 和 262 nm 下进行 HPLC 检测, 所得结果见图 5。结果表明, β -倍半水芹烯具有紫外吸收, 其特征吸收波长为 232 nm, 峰面积百分含量达 96.20%; 在姜烯的紫外特征吸收峰 262 nm 下 β -倍半水芹烯基本无吸收, 在硅胶—硝酸银硅胶柱上两种烯可以实现充分的分离。



(a) 232 nm



(b) 262 nm

图 5 β -倍半水芹烯峰值样的 HPLC 色谱图

Figure 5 HPLC chromatograms of β -sesquiphellandrene peak sample

2.5 β -倍半水芹烯的收率

根据硅胶—硝酸银硅胶柱所得样品和姜油树脂的 GC/MS 分析结果, 参照贾雁高^{[7]59}的计算方法, 计算 β -倍半水芹烯的收率:

$$Y = \frac{A_1 \times V_1}{A_2 \times m \times N} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

Y ——收率, %;

A_1 ——单位体积柱层析样品中 β -倍半水芹烯的 GC 峰面积计数;

A_2 ——单位体积姜油树脂样品中 β -倍半水芹烯的 GC 峰面积计数;

V_1 ——柱层析所得 β -倍半水芹烯样品的体积, mL;

m ——姜油树脂的样品量, g;

N ——姜油树脂的稀释倍数。

在选定的分离条件下, 共收集样品 96 mL, 样品中 β -倍半水芹烯的峰面积计数为 35 777 357, 计算得 β -倍半水芹烯的收率为 89.73%。

3 结论

Winstein^[3]研究证明烯炔类物质与银离子可形成络合物, 该络合物的稳定性与其双键位置有关。本试验根据姜油树脂中 β -倍半水芹烯和姜烯双键位置的差异, 在贾雁高^{[7]35-52}和作者前期研究^{[6]38-43}的基础上以普通硅胶柱—硝酸银硅胶柱分离出了姜油树脂中的 β -倍半水芹烯, 同时证明了 β -倍半水芹烯在 232 nm 下具有紫外吸收。该方法具有较高的收率与纯度, 为分离提纯天然产物中的 β -倍半水芹烯提供了参考依据。硝酸银硅胶 G 板薄层层析过程中, 显色点在加热条件下逐渐消失, 对于 β -倍半水芹烯与银离子形成的络合物是否具有受热不稳定性, 还有待进一步的研究与探讨。

参考文献

- [1] Pinder A R. 萜类化学[M]. 刘铸晋, 译. 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] Vries B D. Quantitative separation of highel fatty acid methyl esters by adsorption chromatography on silica impregnated with silver nitrate[J]. JAOCS, 1963, 40: 184-186.
- [4] 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): 1 039-1 044.
- [5] 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.
- [6] 王艳. 姜油树脂中姜黄烯、姜烯和 β -倍半水芹烯的分离[D]. 山东: 山东大学, 2012.
- [7] 贾雁高. 生姜精油中姜烯成分的分离纯化[D]. 山东: 山东大学, 2010.

(下转第 228 页)

- physicochemical properties of microcapsules[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 80(3): 808-816.
- [12] He Sheng-bin, Yin Ting, Zhen Jin-wang, et al. Cross-linking of gelatin by chlorine dioxide steam[J]. *Food Hydrocolloids*, 2015 (45): 63-71.
- [13] Jalal Rouhi, Shahrom Mahmud, Nima Naderi, et al. Physical properties of fish gelatin-based bio-nanocomposite films incorporated with ZnO nanorods[J]. *Nanoscale Research Letters*, 2013, 8(1): 364-370.
- [14] Nickerson M T, Paulson A T, Wagar E, et al. Some physical properties of crosslinked gelatin-maltodextrin hydrogels [J]. *Food Hydrocolloids*, 2006, 20(7): 1 072-1 079.
- [15] Farris S, Schaich K M, Liu Lin-shu, et al. Gelatin-pectin composite films from polyion-complex hydrogels[J]. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25(1): 61-70.
- [16] 李玉辉, 章铁锋. 明胶与甜菜果胶的相互作用[J]. *食品科学*, 2014, 35(1): 29-33.
- [17] Bhuvanesh Gupta, Mythili Tummalapalli, B L Deopuraa, et al. Preparation and characterization of in-situ crosslinked pectin-gelatin hydrogels[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 106(15): 312-318.
- [18] Gao Chuan, Yan Tao, Dai Ke-rong, et al. Immobilization of gelatin on to natural nanofibers for tissue engineering scaffold applications without utilization of any crosslinking agent [J]. *Cellulose*, 2012, 19(3): 761-768.
- [19] 李星科, 纵伟, 夏文水. 壳聚糖与明胶的复配及应用[J]. *食品工业*, 2012, 33(11): 13-16.
- [20] 宋慧君, 孟春丽, 汤克勇. 明胶-壳聚糖共混膜的性能研究[J]. *中国皮革*, 2012, 41(15): 25-28.
- [21] 宋慧君, 孟春丽, 汤克勇. 明胶-壳聚糖复合膜的制备与性能 [J]. *高分子材料科学与工程*, 2011(8): 165-167.
- [22] Cristian A Acevedo, Paulo Díaz-Calderón, Daniel López, et al. Assessment of gelatin-chitosan interactions in films by a chemometrics approach Evaluación de las interacciones gelatina-chitosano mediante un enfoque de quimiometría[J]. *CyTA - Journal of Food*, 2015(13): 227-234.
- [23] Seyed Fakhreddin Hosseini, Masoud Rezaei, Mojgan Zandi, et al. Fabrication of bio-nanocomposite films based on fish gelatin reinforced with chitosan nanoparticles[J]. *Food Hydrocolloids*, 2015(44): 172-182.
- [24] 王亚娟, 蒋岚, 袁冰, 等. 氧化壳聚糖/明胶共混膜的制备与性能研究[J]. *中国皮革*, 2012(13): 12-16.
- [25] 秦丽娜. 明胶-壳聚糖复合神经营养素 3 神经支架材料的构建及其生物相容性检测[J]. *山东医药*, 2015(7): 1-4.
- [26] Nor Fazliyana Mohtar, Conrad O Perera, Yacine Hemar. Chemical modification of new zealand hoki (*Macrurus novaezelandiae*) skin gelatin and its properties [J]. *Food Chemistry*, 2014, 155: 64-73.
- [27] Tanong Aewsiri, Soottawat Benjakul, Wonnop Visessanguan, et al. Surface activity and molecular characteristics of cuttlefish skin gelatin modified by oxidized linoleic acid[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2011, 48(4): 650-660.
- [28] 王鸿儒, 罗琼, 张小波, 等. 环氧基封端的聚氨酯改性明胶的研究[J]. *陕西科技大学学报*, 2013(6): 77-81.
- [29] 陈颖佳, 李文丽, 刘海英. 单宁改性的明胶性质变化研究[J]. *食品与发酵工业*, 2009, 35(10): 40-43.
- [30] 夏雨, 焦志华, 刘海英. 茶多酚对明胶的改性作用[J]. *食品与发酵工业*, 2011, 37(10): 36-40.
- [31] 王艺峰, 郭雪成, 王燕梅, 等. 生物酶修饰的明胶/纳米银复合生物材料[J]. *高分子学报*, 2014(11): 1 494-1 499.
- [32] Sutee Wangtueai, Athapol Noomhorm, Joe M Regenstein. Effect of microbial transglutaminase on gel properties and film characteristics of gelatin from lizardfish (*Saurida spp*) scales [J]. *Food Chemistry*, 2010, 75(9): 731-739.
- [33] Hanna Staroszczyk, Julia Pielichowska, Katarzyna Sztuka, et al. Molecular and structural characteristics of cod gelatin films modified with EDC and TGase[J]. *Food Chemistry*, 2012, 130 (2): 335-343.
- [34] 曾少葵, 杨思新, 冯翠玲, 等. 转谷酰胺酶及阿魏酸改性对鱼皮明胶可食膜性能的影响[C]// 2011 年中国水产学会学术年会. 北京: 中国水产学会, 2011: 413.
- [35] Jayappa M Koli, Subrata Basu, Binay B Nayak, et al. Improvement of gel strength and melting point of fish gelatin by addition of coenhancers using response surface methodology[J]. *Journal of Food Science*, 2011, 76(6): 503-509.
- [36] 安广杰, 王璋. 改性水解明胶的理化性质分析[J]. *食品科学*, 2007, 28(7): 68-72.
- [37] 葛晓军. 鱼皮明胶的壳聚糖与酶法复合改性及其膜性能研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011: 40-42.
- [38] Yasir Ali Arfat, Soottawat Benjakul, Kitiya Vongkamjan, et al. Shelf-life extension of refrigerated sea bass slices wrapped with fish protein isolate/fish skin gelatin-ZnO nanocomposite film incorporated with basil leaf essential oil [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2015, 52(10): 6 182-6 193.

(上接第 167 页)

- [8] 朱斌, 陈晓光. 二次柱层析制备高纯度表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)的工艺研究[J]. *食品与机械*, 2009, 25(4): 83-85.
- [9] 董新荣, 刘仲华, 何新益, 等. 辣椒色素的分离纯化与光学性质的研究[J]. *食品与机械*, 2006, 22(6): 53-55.
- [10] 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.
- [11] Ghosh A, Hoque M, Dutta. Separation of polyunsaturated fatty acid esters by argentation column chromatography on silica acid [J]. *J. Chromatography*, 1972, 69(1): 207-208.
- [12] Snyder L R, Dolan J W, Grant J R. Gradient elution in high-performance liquid chromatography [J]. *Chromatography*, 1979, 165(1): 3-30.
- [13] 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.