

油菜蜂花粉中核苷类成分的分离及鉴定

段元锋, 吴盼盼, 徐德平*

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 经粉碎后的油菜蜂花粉用去离子水提取, 经大孔树脂 AB-8 色谱柱粗分离, 再用 MCI-GEL 色谱柱和 ODS-B 色谱柱分离, TLC 薄层法检测纯度, 最终得到 3 个化合物。经 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 和 $^{135}\text{DEPT-NMR}$ 鉴定分析, 3 个化合物分别为: 鸟嘌呤核苷、腺嘌呤核苷、胞嘧啶脱氧核苷。这 3 种核苷类化合物是首次从油菜蜂花粉中分离、鉴定的核苷类物质。

关键词: 油菜蜂花粉; 分离纯化; 核苷; 结构鉴定

中图分类号: S 896.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2014)04—0392—04

Separation and Identification the Nucleoside Components From Rape Bee Pollen

DUAN Yuanfeng, WU Panpan, XU Deping*

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Rape bee pollen is crushing by grinder, then extraction with deionized water, take appropriate amount of the extract, through the macroporous resin column of AB-8 to crude separation, and then isolated by the MCI-GEL column and the ODS-B column, and at last I get three pure compounds. These three compounds are Being analyzed by $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ and $^{135}\text{DEPT-NMR}$, These three compounds were: guanosine, adenosine, deoxycytidine. These three kinds of nucleosides is the first time direct purification and structural identification from rape bee pollen.

Keyword: Rape bee pollen, separation and purification, nucleoside, structure identification

油菜 (*Brassica campestris* L.) 是十字花科芸薹属植物, 原产中国, 颜色深绿, 帮如白菜, 为中国大面积种植的农业经济作物。油菜蜂花粉 (Rape Bee Pollen) 是蜜蜂采集油菜的花粉, 再经蜜蜂加工而成的花粉团状物, 蜜蜂在采集花粉的过程中加入了一些分泌物^[1-4]。蜂花粉内含有许多的生物活性物质如

酚类、类黄酮、脂类、蛋白质、维生素、微量元素等, 被人们认为是天然的健康食品, 因此有“浓缩的营养库”之称, 具有抗氧化和清除自由基、抗衰老、提高免疫力等功效^[5-7]。

油菜蜂花粉中功能性成分的研究已有大量文献报道, 但油菜蜂花粉中的核苷类物质研究少见报

收稿日期: 2013-09-27

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目 (2007BAD83B02)。

* 通信作者: 徐德平 (1965—), 男, 安徽宣城人, 工学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事天然产物化学研究。

E-mail: xdp1219@sina.com

道。核苷类成分是生物细胞维持生命的重要物质,具有免疫调节、改善脑细胞代谢以及调节中枢神经等多种生理活性,人们现已研究开发了多种核苷类产品^[8-10]。黄兰等人对油菜蜂花粉中一种化合物,通过 TLC 薄层色谱法、LC-Q-TOF 测定与腺嘌呤标准品比对等辅助方法,确定化合物为腺嘌呤,并未直接分离并进行结构解析^[11]。作者首次从油菜蜂花粉中直接分离出 3 种核苷类成分并对其化学结构进行鉴定,为油菜蜂花粉中核苷类物质的活性及生理作用等各方面的研究提供了理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

油菜蜂花粉:购自青海门源蜂场;ODS 柱填料:Nacalai Tosoh Inc 产品;AB-8 型大孔吸附树脂:天津南开大学化学工厂产品;GF₂₅₄ 硅胶板:山东烟台芝罘化工厂产品;无水乙醇、甲醇、正丁醇、冰醋酸、硫酸、茴香醛、氯仿:均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司产品。

1.2 仪器与设备

WFJ8-20 中药粉碎机:江阴市灵杏药化设备有限公司产品;CQ-005 萃取罐:常州市特威电气自动化系统有限公司产品;R-1002 旋转蒸发器:上海申顺生物科技有限公司产品;BS-100A 自动分份收集器:上海沪西分析仪器厂有限公司产品;ZF-90 暗箱式紫外透射仪:上海顾村电光仪器厂产品;Avance-500 核磁共振仪:瑞士 Bruker 公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 油菜蜂花粉水溶性成分的提取 称取油菜蜂花粉 10 kg,粉碎后过 40 目筛,置于 100 L 萃取罐中,按 1 g:5 mL 料液质量体积比加入去离子水,60 ℃ 条件下搅拌提取 3 h,过滤取滤液,渣在同样条件下,重复提取一次,合并滤液,减压浓缩成浸膏保存。

1.3.2 油菜蜂花粉水溶性成分的粗分离 取浸膏加适量去离子水超声条件下溶解,上大孔树脂 AB-8 柱(10 cm×150 cm),流量 20 mL/min,依次用去离子水,体积分数 20%、95%乙醇溶液进行洗脱,洗出液 500 mL/段,分步收集,合并体积分数 20%乙醇洗脱液,减压浓缩至无乙醇,得体积分数 20%乙醇洗脱物。

1.3.3 乙醇洗脱物分离 将体积分数 20%乙醇洗

脱物上 MCI-GEL 柱(5 cm×150 cm),分别用去离子水,体积分数 5%、15%、25%乙醇溶液进行洗脱,自动收集器 15 mL/管收集洗脱液,采用 TLC 薄层法检测,根据 R_f 值将洗脱液粗分为 A、B、C 等 3 部分,各部分分别减压浓缩保存。

1.3.4 纯化 将 3 部分分别上 ODS-B (3 cm×100 cm)色谱柱,用乙醇溶剂梯度洗脱,流量 10 mL/min,自动收集器 15 mL/管收集洗脱液,TLC 薄层法跟踪检测洗脱液,将 R_f 值和显色反应一致的洗脱液合并减压浓缩,反复上 ODS-B(3 cm×100 cm)色谱柱,直至得 3 个纯化合物,Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ。

1.3.5 纯度鉴定 将色谱分离的纯的化合物 Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ,通过薄层层析法(TLC)进行纯度鉴定。展开剂为正丁醇-水-冰醋酸(体积比 5:4:3)溶液,显色剂为甲醇-冰醋酸-浓硫酸-茴香醛(体积比 17:2:1:0.1)溶液。

1.3.6 Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ 3 个化合物结构鉴定 对得到的化合物 Ⅰ、Ⅱ 和 Ⅲ 以氘代吡啶为溶剂,四甲基硅烷(TMS)为内标物,通过 ¹H-NMR、¹³C-NMR 和 ¹³⁵DEPT-NMR 进行分析。经 ¹H-NMR、¹³C-NMR 和 ¹³⁵DEPT-NMR 等方法鉴定其化学结构。

2 结果与讨论

2.1 化合物 Ⅰ、Ⅱ 和 Ⅲ 的纯度

如图 1 显示,由 TLC 薄层检测化合物 Ⅰ、Ⅱ 和 Ⅲ 在薄层板上均为单一斑点,表明分离后得到的化合物 Ⅰ、Ⅱ 和 Ⅲ 的纯度已达到核磁分析的要求。

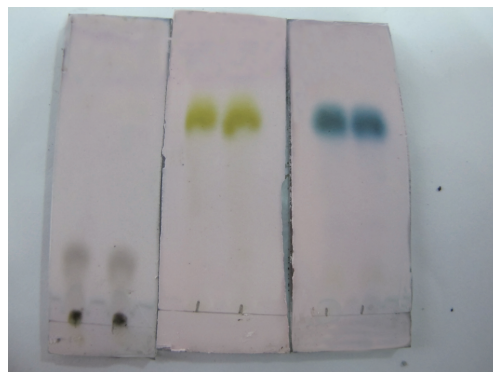


图 1 化合物 Ⅰ、Ⅱ 和 Ⅲ 的薄层色谱图

Fig. 1 Thin layer chromatographic spectrum of component Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ

2.2 NMR 分析

2.2.1 化合物 Ⅰ 白色无定形粉末,可溶解于水、

含水甲醇、乙醇中。从化合物 I 的 ^1H -NMR 图谱可见, δ 10.65, 7.94 各有 1 个单峰 H 信号, 这二个 H 应为活泼 H, δ 6.46 有 1 个单峰 H_2 信号, 表明这二个 H 是 N 上 H, δ 5.70 有 1 个双峰质子信号, J 值为 6.0, 可能为糖的端基 H 信号, 其余 H 信号为糖上 H 信号, 推测该化合物含有 1 个糖基。 ^{13}C -NMR (125 MHz) 中可见到 10 个碳信号 (见表 1), δ 95~110 处未见到糖的端基碳信号, δ 61~87 有 5 个碳信号, 推测该化合物含有 1 个五碳糖, δ 86.4 应为与 N 相连的端基碳, 经与文献相比较得出为核糖。 δ 110~160 处见到 5 个碳信号, ^{13}C DEPT 中可见只有 1 个 CH 信号, 其余 4 个为季碳, 参照文献可得这 5 个碳信号与鸟嘌呤一致。通过以上分析和文献比较, 确定化合物 I 为鸟嘌呤核苷。

2.2.2 化合物 II 白色无定形粉末, 可溶解于水, 含水甲醇、乙醇中。从化合物 II 的 ^1H -NMR 图谱可见, δ 8.37, 8.16 各有 1 个单峰 H 信号, 这二个 H 应为活泼 H, δ 7.35 有 1 个单峰 H_2 信号, 提示这二个 H 是 N 上 H, δ 5.90 有 1 个双峰质子信号, J 值为 6.0, 可能为糖的端基 H 信号, 其余 H 信号为糖上 H 信号, 推测该化合物含有 1 个糖基。 ^{13}C -NMR (125 MHz) 中可见到 10 个碳信号 (见表 1), δ 95~110 处未见到糖的端基碳信号, δ 61~87 有 5 个碳信号, 推测该化合物含有 1 个五碳糖, δ 86.4 应为与 N 相连的端基碳, 经与文献相比较得出为核糖。 δ 110~160 处见到 5 个碳信号, ^{13}C DEPT 中可见只有 2 个 CH 信号, 其余 4 个为季碳, 参照文献可得这 5 个碳信号与腺嘌呤一致。通过以上分析和文献比较, 确定化合物 II 为腺嘌呤核苷。

2.2.3 化合物 III 白色无定形粉末, 可溶解于水, 含水甲醇和乙醇中。从化合物 III 的 ^1H -NMR 图谱可见, δ 13.22 有 1 个单峰 H 信号, 应为活泼 H; δ 5.11

有 1 个双峰质子信号, J 值为 6.4, 可能为糖的端基 H 信号, δ 1.95 有一个单峰甲基, δ 5.11 其余 H 信号为糖上 H 信号, 推测该化合物含有 1 个糖基。 ^{13}C -NMR (125 MHz) (见表 1) 中可见到 10 个碳信号, δ 95~110 处未见到糖的端基碳信号, δ 89.0 应为与 N 相连的端基碳, δ 61~87 有 4 个碳信号, δ 41.5 有一个 CH_2 信号, 推测该化合物含有 1 个脱氧五碳糖, 经与文献相比较得出为 2-脱氧核糖。 δ 110~160 处见到 4 个碳信号, ^{13}C DEPT 中可见只有 1 个 CH 信号, 其余 3 个为季碳, δ 12.9 有一个甲基碳信号, 参照文献可得这 5 个碳信号与胞嘧啶一致。通过以上分析和文献比较, 确定化合物 III 为胞嘧啶脱氧核苷。

表 1 化合物 I、II 和 III 在 ^{13}C -NMR 中的碳信号

Table 1 Signals of carbon in the ^{13}C -NMR of Compound I, II and III

分离的化合物	化学位移值/ $\times 10^{-6}$				
化合物 I	156.746 8	153.651 9	151.309 4	135.581 5	116.672 0
	86.358 0	85.199 4	73.695 9	70.367 1	61.395 0
化合物 II	156.258 4	152.580 3	149.188 6	140.156 6	119.462 9
	88.127 6	86.078 7	73.654 0	70.815 0	61.827 9
化合物 III	85.45	71.59	62.45	41.50	12.87
	165.11	152.08	136.80	110.59	88.98

3 结 语

油菜蜂花粉的水提物, 经过 AB-8 柱粗分离, 再经 MCI-GEL 柱, ODS-B 色谱柱分离纯化, 得到 3 种化合物, 最后通过核磁共振分析, 3 种化合物分别为: 鸟嘌呤核苷、腺嘌呤核苷、胞嘧啶脱氧核苷。3 种化合物均为首次从油菜蜂花粉中直接分离纯化并进行结构分析的核苷类物质, 其中的鸟嘌呤核苷、胞嘧啶脱氧核苷在油菜蜂花粉中首次报道。

参考文献:

- [1] XU Xiang, SUN Liping, DONG Jie, et al. Breaking the cells of rape bee pollen and consecutive consecutive extraction of functional oil with supercritical carbon dioxide[J]. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2009, 10: 42-46.
- [2] 杨洁, 陈纯, 邢建军. 油菜蜂花粉中黄酮类化合物的提取与鉴定[J]. *食品科学*, 2010, 31(22): 273-278.
YANG Jie, CHEN Chun, XING Jianjun. Extraction and identification of flavonoids in rape bee pollen[J]. *Food Science*, 2010, 31(22): 273-278. (in Chinese)
- [3] XU Xiang, GAO Yanxiang, SUN Liping. Free and esterified triterpene alcohol composition of bee pollen from different botanical origins[J]. *Food Research International*, 2012, 48: 650-656.
- [4] 冯慧, 焦士蓉, 唐远谋, 等. 油菜花粉研究进展[J]. *食品工业*, 2011(9): 108-110.

- FENG Hui, JIAO Shirong, TANG Yuanmou, et al. Advance studying of rape pollen [J]. **Food Industry**, 2011 (9): 108–110. (in Chinese)
- [5] XUE Xiaofeng, ZHAO Jing, CHEN Lanzhen, et al. Analysis of coenzyme Q10 in bee pollen using online cleanup by accelerated solvent extraction and high performance liquid chromatography[J]. **Food Chemistry**, 2012, 133: 573–578.
- [6] 孙毅, 杨义芳, 杨必成, 等. 油菜蜂花粉生理活性及作用机制研究进展[J]. 中国蜂业, 2010, 61(9): 5–9.
SUN Yi, YANG Yifang, YANG Bicheng, et al. Advances in studies on physiological activities and mechanisms of Bee Pollen of *Brassica campestris*[J]. **Apiculture of China**, 2010, 61(9): 5–9. (in Chinese)
- [7] 王霓, 赵建怡, 李晓华, 等. 蜂花粉的营养价值研究[J]. 广东微量元素科学, 2011, 18(8): 52–54.
WANG Ni, ZHAO Jianyi, LI Xiaohua, et al. The study of the nutritional value of bee pollen [J]. **Trace Elements Science of Guang Dong**, 2011, 18(8): 52–54. (in Chinese)
- [8] 孔德平, 钱大玮, 郭盛, 等. 9种果实种子类补益中药的核苷类成分分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 98–101.
KONG Deping, QIAN Dawei, GUO Sheng, et al. Determination of nucleosides compounds in nine tonic traditional Chinese medicines of fruit and seeds[J]. **Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae**, 2011, 17(4): 98–101. (in Chinese)
- [9] 张雪梅, 杨丰庆, 夏之宁. 食品中核苷类成分的药理作用研究进展[J]. 食品科学, 2012, 33(9): 277–282.
ZHANG Xuemei, YANG Fengqing, XIA Zhining. Recent advances in research on pharmaceutical functions of nucleosides and nucleotides in dietary foods[J]. **Food Science**, 2012, 33(9): 277–282. (in Chinese)
- [10] 吕爱娟, 吴皓. 中药中核苷类成分的研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2006, 13(7): 94–97.
LV Aijuan, WU Hao. Advances in research on nucleoside ingredient in traditional Chinese medicine [J]. **Chinese Journal of Information on TCM**, 2006, 13(7): 94–97. (in Chinese)
- [11] 黄兰, 孙丽萍, 薛晓峰, 等. 油菜蜂花粉中一种核苷类成分的分离[J]. 食品科学, 2011, 32(17): 151–154.
HUANG Lan, SUN Liping, XUE Xiao, et al. Separation of a nucleoside analogue from rape bee pollen[J]. **Food Science**, 2011, 32(17): 151–154. (in Chinese)

会议信息

会议名称(中文): 2014年第六届生物分析、生物医学工程与纳米技术国际会议

会议名称(英文): 2014 sixth International Symposium on Bioanalysis, Biomedical Engineering and Nanotechnology (ISBBN 2014)

所属学科: 生物技术与生物工程, 生物医学工程学, 纳米科学与技术

开始日期: 2014-05-29 结束日期: 2014-06-01

所在城市: 湖南省 长沙市 具体地点: 湖南大学

主办单位: 湖南大学化学生物传感与计量学国家重点实验室和湖南大学化学化工学院、湖南大学生物学院、湖南大学化学生物与纳米医学研究所

会议主席: 谭蔚泓 王柯敏 Chad Mirkin 聂书明

摘要截稿日期: 2014-04-30 联系人: 陈燕 联系电话: 0731-88823211

E-MAIL: chenyan_mail@126.com

会议网站: http://cc.hnu.cn/index.php?option=com_content&task=view&id=2678&Itemid=

会议背景介绍: 在教育部、国家自然科学基金委员会和湖南大学的大力支持下, 湖南大学化学生物传感与计量学国家重点实验室和湖南大学化学化工学院、湖南大学生物学院、湖南大学化学生物与纳米医学研究所共同举办的“2014年第六届生物分析、生物医学工程与纳米技术国际会议 (ISBBN 2014)”将于 2014 年 5 月 29 日至 6 月 1 日在中国湖南省长沙市湖南大学举行。作为生物分析、生物医学工程和纳米技术前沿探索的系列会议, 湖南大学已经于 2002 年、2006 年、2008 年、2010 年和 2012 年成功地举办了五届, 今后有关生命分析和生物医药等相关学科与工程前沿领域探索的国际会议将以每两年举办一届的形式延续。本次会议的主题是“交流、探索、合作”, 主旨是搭建来自相关领域科学家的互动和交流平台。会议主要以大会特邀报告、口头报告和墙报等形式来交流生物分析、纳米技术、生物医学工程和生物技术前沿研究新成果。本次会议期间还将组织优秀墙报评选活动。