

文章编号:1673-1689(2007)06-0013-04

高速逆流色谱分离芝麻菜种子中的硫代葡萄糖苷

沈莲清, 许明峰

(浙江工商大学食品与生物工程学院, 浙江 杭州 310035)

摘要:比较了各种溶剂系统对高速逆流色谱法分离硫代葡萄糖苷的影响,考察了高速逆流色谱的流速、转速和进样量对提取效果的影响。用V(正丁醇):V(乙腈):V(15%的硫酸铵溶液)=1:0.5:2.4作为溶剂系统上相作流动相,在体积流量为1.0 mL/min、转速为600 r/min的条件下,成功地从甲醇粗提物中分离了硫代葡萄糖苷,并用高效液相色谱法测定硫代葡萄糖苷,纯度达到95.2%。

关键词:芝麻菜种子;硫代葡萄糖苷;高速逆流色谱;高效液相色谱

中图分类号:TS 201.2

文献标识码:A

Separation of Glucosinolate from *Eruca sativa* Seed by High-Speed Counter-Current Chromatography

SHEN Lian-qing, XU Ming-feng

(College of Food Science and Biotechnology Engineering, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310035, China)

Abstract: In the manuscript, the effects on different solvent system, flow rate, rotary speed and sample value for extract glucosinolate from *Eruca sativa* seed were studied. Glucoerucin was obtained by HSCCC with a binary phase solvent system composed of EtOH-ACN-15% (NH₄)₂SO₄ (1:0.5:2.4). The mobile phase was the upper phase and performed at a flow rate at 1.0 mL/min, while the apparatus rotated at 600 r/min. The result of high performance liquid chromatographic revealed that the purity was 95.2%.

Key words: *Eruca sativa* seed; glucosinolate; HSCCC; HPLC

硫代葡萄糖苷(glucosinolate)广泛存在于十字花科(Cruciferea)植物中,是最主要的次生代谢产物^[1]。到目前为止,已经发现120多种硫苷^[2]。根据侧链R基团的不同,可以把硫苷分为:脂肪类、吲哚类和芳香类^[3]。在十字花科相应内源黑芥子酶(thioglucoside glucohydrolase, EC 3. 2. 3. 1)的作

用下,硫苷容易水解生成异硫氰酸盐、硫氰酸盐和腈类等化合物^[4], pH、侧链R基团和金属离子的不同将影响各产物的形成^[5]。最近几年发现,硫苷的降解产物可以抑制真菌和微生物的生长,同时还发现某些硫苷还具有抗癌的作用,这主要是通过降解产物激发人体免疫力而起作用。硫苷的降解产物

收稿日期:2007-03-28.

基金项目:浙江省重大科技项目(2004C12005).

作者简介:沈莲清(1946-),女,江苏苏州人,教授,博导,主要从事农产品加工及天然活性物质提取方面的研究.

通讯作者:许明峰(1981-),男,浙江长兴人,农产品加工及天然活性物质提取硕士研究生. Email:cxmxf@163.com

是抗癌药的重要组成部分,其提取和纯化方法正日益引起人们的关注。目前已有很多方法用于分离提取硫苷,比如离子交换法和 HPLC,但只能得到很少量的硫苷^[6]。吴谋成^[7]等用 DEAE Sephadex A-25 葡聚糖凝胶柱阴离子交换与高效液相色谱联用分离的方法,分别从甘蓝型油菜种子和芥菜型油菜种子中各提纯分离出一种硫代葡萄糖苷,得到了较纯的化合物。作者选择高速逆流色谱可快速、大量地提取硫苷,具有一定的理论和现实意义。芝麻菜属十字花科植物,原产于我国云南,是一种重要的植物油和蛋白质来源,近年来风行于印度和巴基斯坦^[8],作者报道了从芝麻菜种子中提取、分离硫代葡萄糖苷的方法。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料 芝麻菜种子,成都市特色种业研究所提供;硫苷标准品, Sigma 公司提供。

1.1.2 试剂 甲醇,乙酸乙酯,正丁醇,乙腈,甲醇,乙腈。

1.1.3 仪器 高速逆流色谱仪(HSCCC-D400):浙江工商大学食品与生物工程研究所研制;岛津公司高效液相色谱仪:由 LC-20AT 泵、SPD-20A 紫外检测器、柱温箱组成;LOOYE ZX98-1 型旋转蒸发器;上海申胜仪器厂制造;LGJ-10 型冷冻干燥机:北京四环科学仪器厂制造。

1.2 测定方法与指标

高效液相色谱方法鉴定提纯物的纯度。色谱条件:色谱柱, Shimadzu VP-ODS, 250 mm × 4.6 mm;流动相为乙腈+3 mmol/L 四甲基溴化铵溶液(体积比 10:90);体积流量 1.0 mL/min;紫外检测波长 230 nm;柱温 25 ℃。

1.3 实验方法

1.3.1 硫代葡萄糖苷的提取 为了保证硫苷不被酶解,首先必须使酶失活。采用高温钝化的方法,把芝麻菜种子加入到沸腾的甲醇中灭酶 30 min。然后用粉碎机粉碎,并用沸腾的甲醇对原料进行提取,每次 1 h,共进行 3 次,可以萃取出其中的大部分硫苷。对甲醇提取物进行浓缩,将浓缩得到的高状物溶于适量水,再以等量乙酸乙酯对其进行脱脂处理,连续 3 次。将水相旋转蒸发至含水量较少时,再对其进行冷冻干燥,就可得到粗样品。

1.3.2 硫代葡萄糖苷逆流色谱分离条件的选择 选择合适的溶剂系统、转速、流速和进样量,用高速逆流色谱技术,分离单种硫代葡萄糖苷。逆流色谱

技术的关键在于溶剂系统的选择。硫代葡萄糖苷是一类水溶性化合物,作者选用的是一个含盐的高极性溶剂系统^[9],以正丁醇、乙腈、盐溶液为系统组分,试验不同的比例及盐溶液浓度的有关参数,找到对硫苷分离较为有效的系统。

2 结果与分析

2.1 溶剂系统的选择

在试验过程中,首先是 TLC 分析初选,测定被分离组分在溶剂系统的上相和下相的溶解分配情况,再通过小型的逆流色谱仪实验以确定其可行性,最终选定合适的溶剂系统,结果见表 1。

表 1 不同溶剂系统

Tab. 1 The different solvent system

编号	溶剂系统	体积比例
1	正丁醇-乙腈-5%硫酸铵溶液	1:0.5:1.6
2	正丁醇-乙腈-5%硫酸铵溶液	0.5:1:1.6
3	正丁醇-乙腈-15%硫酸铵溶液	0.5:2:2.2
4	正丁醇-乙腈-15%硫酸铵溶液	1:0.5:2.4

对芝麻菜种子粗提物进行 TLC 分析,结果见图 1 的 0 号所示。由图 1 可见,该粗样品中至少含有 A、B、C、D 4 种主要成分。因为 TLC 板上某斑点颜色的大小、深浅程度与该斑点所代表的物质在溶液中的浓度相关,故可以通过 TLC 分析判定各物质在某一溶剂系统中的分配情况。从图 1 看出,在各个溶剂系统中除了组分 A 与组分 B 外,其它各组分的分配情况变化不大,且两组分在 2 号系统和 4 号系统中的分配系数与在其它系统中的分配系数有较大差距。又因为在 2 号系统中 A、B、C 3 种组分的分配系数相似,不易于三者的分离,故选择 4 系统。

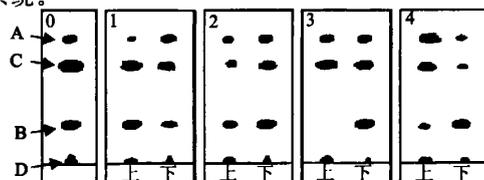


图 1 展开剂:氯仿-甲醇-水(体积比 10:10:1)
显色剂:质量分数 15% 的硫酸乙醇溶液

Fig. 1 The result of separation under the circumstance of 0.7g sample Developing solvent system: chloroform-methanol-water(10:10:1)
Colorizing agent:15% sulfuric acid-ethanol solution

2.2 体积流量对 HSCCC 保留率的影响

将高速逆流色谱仪的转速设为 600 r/min, 分别测定流动相在 0.5、1.0、1.5、2.0 mL/min 的条件下固定相的保留率, 测定流动相体积流量对固定相保留率的影响。HSCCC-D400 型高速逆流色谱仪的转速为 600 r/min 时, 流动相体积流量对固定相的保留率的影响见图 2。从图 2 可以看出, 在转速固定时, 随着流动相体积流量的增大, 固定相的保留率呈下降的趋势。当流动相的体积流量为 0.5 mL/min 和 1.0 mL/min 时, 固定相保留率分别为 86.5% 和 82.6%; 当流动相的体积流量增加到 1.5 mL/min 时, 固定相的保留率降到 75.8%; 当流动相的体积流量增加到 2.0 mL/min 时, 固定相的保留率降低到 62.4%。可见低流量时保留率较高, 但低流量也会导致分离效率的降低。综合考虑保留率和分离效率的影响, 选取体积流量为 1.0 mL/min。

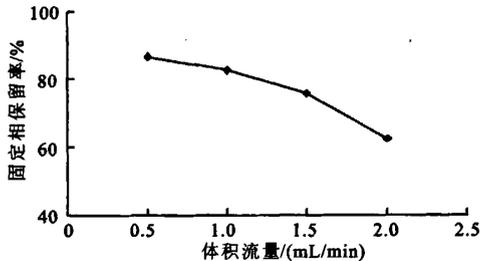


图 2 不同体积流量对固定相保留率的影响

Fig. 2 Effect of different flow rate on the retention ratio of stationary phase

2.3 转速对 HSCCC 保留率的影响

将流动相的体积流量设为 1.0 mL/min 并保持恒定, 分别测定转速在 200、400、600、800 r/min 时固定相的保留率, 测定转速对固定相保留率的影响。

流动相的体积流量为 1.0 mL/min 时高速逆流色谱仪转速的变化对固定相保留率的影响见图 3。从图 3 可以看出, 当转速为 200 r/min 和 400 r/min 时, 固定相的保留率分别为 54.1% 和 73.1%; 当转速达到 600 r/min 时, 固定相的保留率达到 82.6%; 随着转速的增大, 固定相的保留率相应增大。当转速为 800 r/min 时, 固定相保留率达到了 83.5%, 可见转速越高保留率较高, 但考虑到仪器承受力有限, 故选取转速为 600 r/min。

2.4 进样量对分离效果的影响

将流动相体积流量固定为 1.0 mL/min, 色谱

柱转速固定为 600 r/min, 分别测定进样量为 0.5、1.0、1.5、2.0 g (均溶解在 20 mL 由固定相和流动相等体积组成的溶剂系统中) 时的分离情况。比较其分离效果以确定该逆流色谱仪较为有效的最大进样量。

进样 0.5 g 和 1.0 g 时, A 与 B 组分可以分离开来; 当进样为 1.5 g 时, 各组分有少量交叉; 当进样 2.0 g 时, 分离效果很差, 各组分有很严重的交叉现象。图 4 即为进样 1.5 g 时对收集样品 TLC 分析的结果。

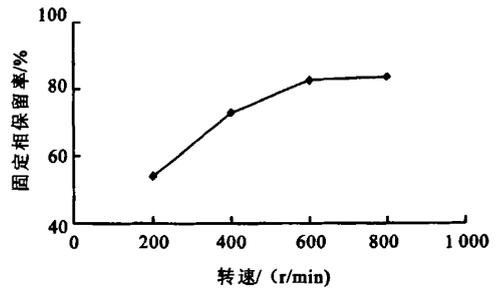
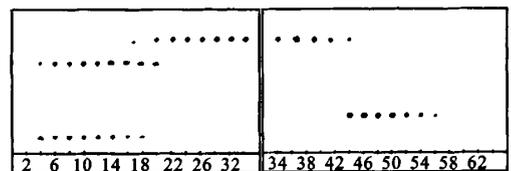


图 3 不同转速对固定相保留率的影响

Fig. 3 The effect of rotary speed on the retention ratio of stationary phase



展开剂: 氯仿-甲醇-水 (10:10:1), 显色剂: 15% 硫酸乙醇溶液

图 4 进样量为 1.5 g 时的分离结果

Fig. 4 The result of separation under the circumstance of 1.5 g sample

2.5 高效液相色谱图分析

当选用 V(正丁醇): V(乙腈): V(15% 的硫酸铵溶液) = 1: 0.5: 2.4 溶剂体系, 体积流量 1.0 mL/min、转速为 600 r/min 时一个组分的 HPLC 图谱见图 5。

通过 HPLC 检测可知, 样品的纯度达到了 95.2%, 从而可知高速逆流色谱具有很好的分离效率。

3 结 语

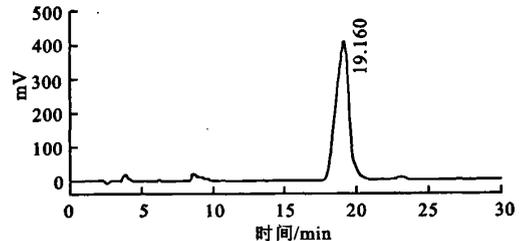
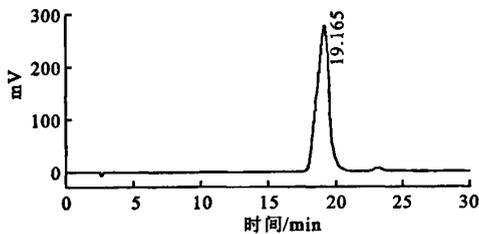
1) 对逆流色谱分流芝麻菜种子中的硫代葡萄糖苷的溶剂系统进行了研究, 找到了合适的溶剂系

统一正丁醇-乙腈-15%硫酸铵溶液(体积比1:0.5:2.4)。

2) 采用柱容积400 mL的HSCCC-D400型高速逆流色谱仪分离芝麻菜种子粗提物,可以分离得

到较纯的样品组分。

3) 研究了影响逆流色谱分离的主要参数:流动相流量、色谱柱转速、进样量等对固定相的保留率及分离效果的影响,优化了分离条件。



柱规格:Shimadzu VP-ODS 250 mm×4.6 mm I.D.; 流动相:乙腈:3 mmol/L 四甲基氯化铵溶液(10:90) 流速:1.0 mL/min; 检测波长:UV 检测器 230 nm

图5 标准品和样品的HPLC谱图

Fig. 5 The HPLC chromatogram of the standard and the sample

参考文献(References):

- [1] Leonardo V, Heiko C B. Variability for seed glucosinolates in a germplasm collection of the genus *Brassica*[J]. *Phytochemistry*, 2000, 47: 231-238.
- [2] Chen S, Andreasson E. Update of glucosinolate metabolism and transport[J]. *Plant Physiol Biochem*, 2001, 39: 743-758.
- [3] Richard N, Bennett, Rosa C, et al. Identification and quantification of glucosinolates in sprouts derived from seeds of wild *Eruca sativa* L. (Salad Rocket) and *Diplotaxis tenuifolia* L. (Wild Rocket) from diverse geographical locations[J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2007, 55: 67-74.
- [4] Jed W, Fahey, Amy T, et al. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants [J]. *Phytochemistry*, 2001, 56: 5-51.
- [5] Leoni O, Iori R, Palmieri S, et al. Myrosinase-generated from glucosinolates; isolation, characterization and in vitro anti-proliferative studies[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 1997, 5: 1799-1806.
- [6] Tory P, Jed W F, David W H, et al. Comprehensive chromatographic and spectroscopic methods for the separation and identification of intact glucosinolates[J]. *Analytical Biochemistry*, 1996, 239: 168-179.
- [7] 吴谋成, 况成尘, 黄伟. 用液相制备色谱从菜籽中分离、纯化制备硫代葡萄糖苷[J]. *色谱*, 2005, (13): 4-7.
WU Mou-cheng, KUANG Cheng-chen, HUANG Wei. Separation and purification glucosinolate from rape seed by pre-HPLC[J]. *Chromatography*, 2005, 13: 4-7. (in Chinese)
- [8] Sun J K, Gensho I. Glucosinolate profiles in the seeds, leaves and roots of rocket salad and anti-oxidative activities of intact plant power and purified 4-methoxyglucobrassicin[J]. *Soil Science and Plant Nutrition*, 2006, 52: 394-400.
- [9] Fahey J W, Kristina L Wade, Katherine K. et al. Separation and purification of glucosinolates from crude plant homogenates by high-speed counter-current chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 2003, 996: 85-93.

(责任编辑:李春丽)