

高速逆流色谱法分离蜜环菌发酵上清液乙醇提取物条件的研究

蔡 丹, 刘景圣*, 郭丽丽, 刘义军, 陈春阳
(吉林农业大学食品科学与工程学院, 吉林 长春 130118)

摘 要: 利用高速逆流色谱法分离蜜环菌发酵液乙醇提取部位, 筛选其最佳溶剂体系分离条件。结果表明: 溶剂体系为正丁醇-乙酸乙酯-水、且体积比为1:4:5的条件下, 能得到最佳分离效果, 最终分离出4个峰, 效果较好, 4个峰的提取率分别为51.10%、1.47%、0.86%、1.80%。

关键词: 蜜环菌发酵液; 高速逆流色谱法; 溶剂体系

Experimental Conditions for High-Speed Countercurrent Chromatography Separation of Ethanol Extract from *Armillaria mellea* Fermentation Broth Supernatant

CAI Dan, LIU Jing-sheng*, GUO Li-li, LIU Yi-jun, CHEN Chun-yang
(College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: This study was designed to investigate experimental conditions for high-speed countercurrent chromatography (HSCCC) separation of the ethanol extract of *Armillaria mellea* fermentation broth supernatant. The best separation results were achieved using a solvent system composed of butanol, ethyl acetate and deionized water (1:4:5, V/V). Four peaks were separated well with an extraction yield of 51.10%, 1.47%, 0.86% and 1.80%, respectively.

Key words: *Armillaria mellea* fermentation broth supernatant; high-speed countercurrent chromatography; solvent system
中图分类号: TS201.3 文献标识码: A 文章编号: 1002-6630(2012)21-0245-04

蜜环菌(*Armillariella mellea* (Vahl.ex Fr.) karts)又名蜜环蕈, 榛蘑, 属于担子菌亚门、伞菌目、白蘑科、蜜环菌属, 是一种著名的食药兼用真菌^[1]。能兼性寄生于多种木本、草本植物的著名药食兼用真菌, 是我国传统著名滋补防病保健中药材之一。在天麻(*Gastrodia elata* Blume)生长过程中, 蜜环菌是必不可少的共生菌。蜜环菌化学成分十分丰富, 具有较高的药用价值, 尤其是蜜环菌液体深层发酵产物成分复杂, 目前已经确定含有多糖、原伊鲁烷型倍半萜醇芳香酸酯类、嘌呤等化合物。近年来大量的研究^[2-8]表明, 蜜环菌发酵产物具有较强的神经调节功能, 显著的睡眠调节作用、抗惊厥、抗缺氧和调节心、脑血管功能、增强机体免疫调节等生理活性。

高速逆流色谱(high-speed countercurrent chromatography, HSCCC)^[9]是一种新型的液-液分配色谱, 其原理是样品在旋转螺旋管内的互不溶解的两相溶剂间分配系数的不同而获得分离, 因此无需任何固体载体或者支撑体, 在短时间内能够实现高效分离和制备, 并且可以达

到几千个理论塔板数^[10]。具有应用范围广、适应性好、操作简便、回收率高、重现性好、分离效率高、可实现高通量筛选等优点, 广泛应用生物碱、黄酮、苷类等天然活性成分的分离纯化过程中^[11-15]。本实验采用HSCCC对蜜环菌液体深层发酵液的乙醇提取部位进行分离, 根据分离效果确定高速逆流色谱实验条件参数, 为明确蜜环菌发酵液的活性成分、开发新的蜜环菌保健品和药品及其质量监控提供必要的理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与培养基

Am-07蜜环菌种由吉林农业大学食品科学与工程学院小麦和玉米深加工国家工程实验室提供。

GF254高效薄层硅胶 青岛海洋化工有限公司; 固体碘、石油醚、乙醇、氯仿、正己烷、乙醚、甲醇、正丁醇、乙酸乙酯、乙酸均为国产分析纯。

收稿日期: 2012-02-28

基金项目: 吉林省科技发展计划项目(20085021)

作者简介: 蔡丹(1980—), 女, 博士研究生, 研究方向为食品资源深加工与综合利用。E-mail: dan1980623@yahoo.com.cn

*通信作者: 刘景圣(1964—), 男, 教授, 博士, 研究方向为乳品科学与功能性食品开发。E-mail: liujings1007@vip.sina.com

斜面培养基(质量分数, %): 马铃薯20、葡萄糖1、蔗糖1、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.075、 KH_2PO_4 0.15、酵母浸粉2、 VB_1 0.001、琼脂2, 自然pH值, 121℃灭菌30min。

种子培养基(质量分数, %): 马铃薯20、葡萄糖2、蚕蛹粉0.5、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.075、 KH_2PO_4 0.15、酵母浸粉2、 VB_1 0.001, 自然pH值, 121℃灭菌30min。

发酵培养基(质量分数, %): 葡萄糖1.5、玉米糖浆2.0、酵母浸粉0.5、蚕蛹粉1.0、大豆粉1.0、乙醇0.5、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.075、 KH_2PO_4 0.15、 VB_1 0.001, 自然pH值, 121℃灭菌30min。

1.2 仪器与设备

TBE300B型高速逆流色谱 上海同田生物有限公司; 1200型高效液相色谱仪(配备G1311A型四元梯度泵)、G1328型手动进样器、G1314B型可变波长检测器、G1316A型柱温箱、Agilent Zorbax Eclipse XDB-C₁₈柱(4.6mm×150mm, 5μm)、化学工作站 美国Agilent公司; JK-3200B型超声波清洗器 合肥金尼机械制造有限公司; 无油空压机 福建巨霸机械有限公司; HH-1数显恒温水浴锅 江苏金坛市江南仪器厂。

1.3 蜜环菌发酵液乙醇提取部位的制备

将活化好的蜜环菌斜面菌种接种于种子培养基中, 摇瓶装量为30mL/100mL三角瓶, 于恒温振荡器, 27℃振荡培养, 转速180r/min, 培养6d, 作为种子备用; 将培养好的种子按照匀浆破碎接种法以6%接种量接入发酵培养基中, 摇瓶装量为100mL/500mL三角瓶, 27℃振荡培养, 转速180r/min, 培养6d。发酵结束后过滤得蜜环菌发酵液, 经真空浓缩制备干物质含量为50%的浓缩液, 放入3倍量的石油醚萃取1h, 重复萃取7次, 取石油醚不溶部分挥干石油醚, 然后加入2倍量的70%乙醇萃取2h, 重复萃取5次, 4000r/min离心5min, 收集70%乙醇上清液, 真空浓缩得蜜环菌发酵液乙醇提取部位, 备用。

1.4 蜜环菌发酵液乙醇提取部位主要目标组分的薄层色谱分析

1.4.1 薄层分析(TLC)板的制备

将5g硅胶GF254和15g水混合搅拌均匀, 除去表面的气泡后, 迅速铺板于100mm×100mm玻璃板, 晒干后在110℃烘箱烘30min, 取出置于干燥器中备用。选择氯仿、甲醇、水作为展开剂, 按照氯仿-甲醇-水体积比为20:10:2.5配制, 混合均匀, 放入层析缸中饱和, 备用。

1.4.2 点样

量取30mg乙醇提取部位用0.1mL甲醇溶解, 用毛细管取溶液点样于TLC板上, 点样原点3mm, 点样之间相距1~2cm, 起始线距离底边1~2cm, 待溶剂挥发完后用所选展开剂展开样品。将板放入装有展开剂的层析缸中, 密封, 上行法展开, 待展开距离上边1cm左右时, 取出薄层板, 挥干溶剂后将其放入饱和的碘缸中显色。观

察斑点个数、色度及斑点大小, 并计算R_f值, 确定有效部位的主要目标组分。

1.5 HSCCC溶剂体系的确定

1.5.1 溶剂体系分层时间的测定

先把已选两相溶剂体系包括弱极性、中性、强极性溶剂体系, 按照一定的比例分别量取一定量溶剂置入分液漏斗里, 使之在室温条件下平衡; 静置分层后成两相, 分别取上下相各5mL共10mL放入15mL的刻度带塞玻璃试管中, 用玻璃塞将试管口封住, 倒转试管数次, 使两相溶剂充分混合; 之后把试管竖直地放在平坦的桌面上, 并立即用秒表测定试管里两相完全分层所需的时间(*t*)。应用这种方法反复测定3次, 取平均值作为最后结果, 选择分层时间<30s的溶剂体系。

1.5.2 分配系数和固定相保留率的测定

1.5.2.1 分配系数的测定

通过测量粗提物中欲被分离的目标组分的分配系数(*K*)来选择两相溶剂体系的组成, *K*通过高效液相色谱测定^[16]。将符合1.5.1节要求的溶剂体系上相、下相各取2mL, 加入乙醇提取部位后漩涡振荡, 待两相分层并澄清后, 上相、下相各取1mL, 旋干, 各加入1mL乙腈-水溶液(体积比10:90)溶解, 分别进行HPLC测定。按式(1)计算分配系数。

$$K = \frac{c_U}{c_L} = \frac{A_U}{A_L} \quad (1)$$

式中: c_U 为上相中的浓度/(mol/L); c_L 为下相中的浓度/(mol/L); A_U 为上相峰面积/(mAU·s); A_L 为下相峰面积/(mAU·s)。

HPLC 测定条件: 色谱柱: Agilent Zorbax Eclipse XDB-C₁₈柱(4.6mm×150mm, 5μm); 流动相: 乙腈-水(体积比10:90); 检测波长: 259nm; 柱温: 30℃; 流速: 0.5mL/min; 进样量: 20μL。

1.5.2.2 固定相的测定

以50mL/min的流速将上相(固定相)泵入管路, 待固定相充满整个管路后, 启动主机, 转速调至900r/min, 然后以1.5mL/min的流速泵入流动相。当流动相从出口处流出, 管路内固定相和流动相达到动力学平衡状态, 此时测量被流动相推出的固定相的体积(*V*, mL), 按式(2)计算固定相的保留率(*W*)。

$$W/\% = \frac{V_{\text{总}} - V_{\text{出}}}{V_{\text{总}} - V_{\text{环}}} \times 100 \quad (2)$$

式中: $V_{\text{总}}$ 为管路总体积/mL; $V_{\text{出}}$ 为流动相推出的固定相体积/mL; $V_{\text{环}}$ 为进样环的体积/mL。

1.6 HSCCC法分离制备过程

配制选定的溶剂体系, 将其充分振荡混合后, 静置分层, 两相分别超声波脱气20min。选择上相为固定相,

下相为流动相。将固定相以50mL/min的流速泵入高速逆流色谱分离柱中,启动主机,调节转速为900r/min,正转(顺时针),将流动相以1.5mL/min的流速由首端向尾端泵入。当流动相从尾端流出时,说明两相体系在高速逆流色谱分离柱中达到了动态平衡。此时将样品溶液注入进样环中(样品溶液的制备:取一定量的蜜环菌发酵液乙醇提取部位溶于5mL上相和5mL下相的混合溶剂中。完全溶解后超声波脱气5min,以备进样)。根据工作站谱图收集各组分。

色谱条件:柱容积300mL,流动相流速1.5mL/min,转速900r/min,紫外检测器波长为254nm,温度30℃,上样量400mg。

2 结果与分析

2.1 蜜环菌发酵液乙醇提取部位中主要目标组分的薄层色谱分析



图1 乙醇提取部位薄层点板图
Fig.1 TLC pattern of the ethanol extract

由图1可知,在展开剂为氯仿-甲醇-水体积比20:10:2.5条件下,蜜环菌发酵液乙醇提取物中主要目标组分的薄层分离效果较理想,主要目标组分 R_f 如下:
 $R_{f1}=2.0/5.5=0.36$, $R_{f2}=3.5/5.5=0.64$, $R_{f3}=4.0/5.5=0.73$, $R_{f4}=5.0/5.5=0.91$,可初步确定有效部位中主要有4类化学物质。

2.2 HSCCC两相溶剂体系的确定

2.2.1 HSCCC两相溶剂体系的初步确定

按照两相溶剂体系从弱极性到中性再到强极性的顺序,考察两相的体积比、分层时间及目标成分分配情况,初步确定溶剂体系。由表1可知,蜜环菌发酵液乙醇提取部位几乎不溶于弱极性体系,中性体系中几乎都溶于水相,在强极性体系中在上、下相都有一定程度溶解,且从薄层色谱实验色斑大小及色泽可以看出,在弱极性体系中无论怎样调节溶剂的比例,分配效果都达不到要求,而强极性溶剂体系通过调节各溶剂的比例,有望使其分配系数在0.5~2之间。最终初步确定用乙酸乙酯-乙酸-水4:1:4、正丁醇-水1:1、正丁醇-水-甲醇9.5:9.5:1、正丁醇-水-乙酸4:5:1、正丁醇-水-乙酸4:4:1、

正丁醇-乙酸乙酯-水1:4:5、正丁醇-乙酸乙酯-水3:2:5共7个溶剂体系进行HSCCC实验。

表1 溶剂体系的分层情况及样品在其中的分配情况

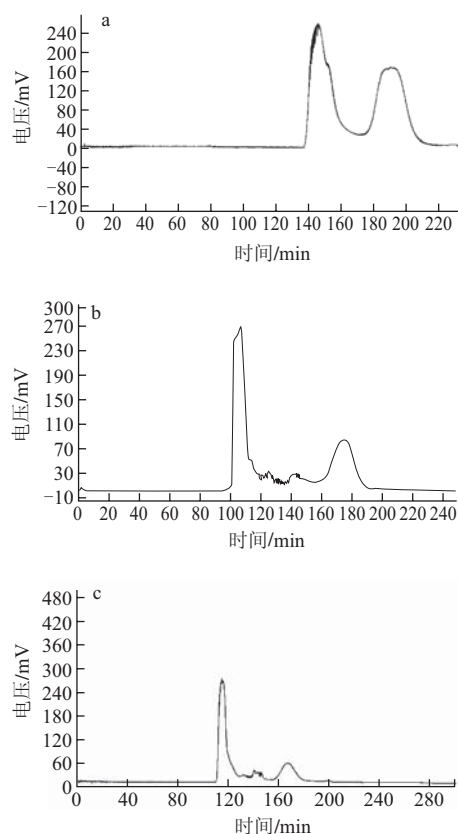
Table 1 Effect of solvent system composition on sample layering and partition

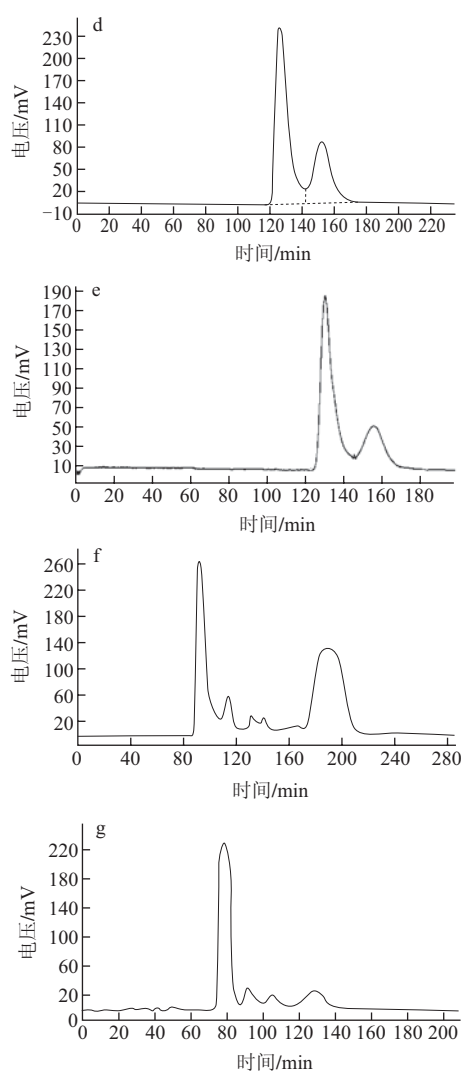
溶剂体系	体积比	上下相 体积比	分层 时间/s	目标组分 分配情况	分配系 数(K)
正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水	1:0.8:1:0.8	1:1	12	不溶于上相(有机相)	—
正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水	5:2:4:1	2:8	26	不溶于上相(有机相)	—
正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水	9:1:5:5	1:1	30	不溶于上相(有机相)	—
正己烷-乙酸乙酯-正丁醇-水	1:1:1:1	1:2	28	不溶于上相(有机相)	—
氯仿-甲醇-水	10:3:7	2:5	29	溶于上相(水相)	—
氯仿-甲醇-水	4:3:2	1:1	20	溶于上相(水相)	—
氯仿-甲醇-水	4:4:3	3:7	18	溶于上相(水相)	—
乙酸乙酯-乙酸-水	4:1:4	1:1	28	上下相均有一定溶解	0.52
正丁醇-水	1:1	3:2	35	上下相均有一定溶解	0.59
正丁醇-水-甲醇	9.5:9.5:1	4:3	39	上下相均有一定溶解	0.63
正丁醇-水-乙酸	4:5:1	2:1	30	上下相均有一定溶解	0.89
正丁醇-水-乙酸	4:4:1	4:3	29	上下相均有一定溶解	1.02
正丁醇-乙酸乙酯-水	1:4:5	4:3	28	上下相均有一定溶解	0.92
正丁醇-乙酸乙酯-水	3:2:5	5:4	29	上下相均有一定溶解	0.78

注:—,没有相关数据。

2.2.2 溶剂体系的选择结果

采用乙酸乙酯-乙酸-水4:1:4、正丁醇-水1:1、正丁醇-水-甲醇9.5:9.5:1、正丁醇-水-乙酸4:5:1、正丁醇-水-乙酸4:4:1、正丁醇-乙酸乙酯-水1:4:5、正丁醇-乙酸乙酯-水3:2:5为溶剂体系的高速逆流色谱图,如图2所示。





a. 乙酸乙酯-水(4:1:4); b. 正丁醇-水(1:1); c. 正丁醇-水-甲醇(9.5:9.5:1); d. 正丁醇-水-乙酸(4:5:1); e. 正丁醇-水-乙酸(4:4:1); f. 正丁醇-乙酸乙酯-水(3:2:5); g. 正丁醇-乙酸乙酯-水(1:4:5)。

图2 不同溶剂体系HSCCC图谱

Fig.2 HSCCC patterns of the ethanol extract in different solvent systems

由图2可知, 根据HSCCC实验图谱比较, 发现正丁醇-乙酸乙酯-水(1:4:5)和正丁醇-乙酸乙酯-水(3:2:5)溶剂体系分离效果比较好, 且分离时间明显缩短, 但是最终采用的溶剂体系是正丁醇-乙酸乙酯-水(1:4:5), 原因主要是此体系较正丁醇-乙酸乙酯-水(3:2:5)的固定相保留率高。

2.3 HSCCC分离得到各收集峰提取率结果

表2 各收集峰的提取率结果
Table 2 Extraction yields of four separated peaks

收集峰	A	B	C	D
得率/%	51.10	1.47	0.86	1.80

蜜环菌发酵液乙醇提取部位采用溶剂体系是正丁醇-乙酸乙酯-水(1:4:5)、经HSCCC分离140min后, 得到4个分离效果较好的峰(图2g)。分别收集峰A、B、C、D并

计算得率, 以待进一步药理活性实验确定功能活性及单一成分纯化。由表2可知, 收集到4个峰的得率分别为: 51.10%、1.47%、0.86%、1.80%。

3 结论

本实验采用高速逆流色谱法对蜜环菌发酵液的乙醇提取部位进行了分离纯化, 确定了溶剂体系为正丁醇-乙酸乙酯-水, 体积比为1:4:5, 在前期实验已经确定的转速900r/min、流速1.5mL/min、温度30℃、上样量为400mg、上样体积10mL的分离条件下, 最终收集得到4个分离效果较好的峰, 提取率分别为51.10%、1.47%、0.86%、1.80%。

应用HSCCC对蜜环菌发酵液乙醇提取部位中的未知成分进行分离, 由于HSCCC固定相为液体, 避免了固体载体填充所形成的不可逆吸附, 减少了样品的损耗, 具有高效、快速等特点, 对于有效的分离纯化蜜环菌发酵液中的活性成分具有较高的应用价值, 为进一步开发新的蜜环菌保健品和药品及其质量监控提供必要的理论参考。

参考文献:

- [1] 中国医学科学院药物研究所. 中草药现代研究(第一卷)[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1995.
- [2] 刘景圣. 蜜环菌催眠功能优良菌株筛选和发酵工艺优化研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2005.
- [3] 刘景圣. 蜜环菌的活性成分研究及其在功能性食品中的应用[J]. 食品科学, 2003, 24(6): 82-85.
- [4] 刘景圣. 长白山地区蜜环菌菌种的分离与筛选[J]. 食品科学, 2005, 26(7): 165-168.
- [5] GAO Jinming, YANG Xue, WANG Chenying, et al. Armillaramide, a new sphingolipid from the fungus *Armillaria mellea*[J]. Fitoterapia, 2001, 72(8): 858-864.
- [6] 中国医学科学院药物研究所药理室新药组. 天麻水剂及蜜环菌发酵液对神经系统的药理作用[J]. 中华医学杂志, 1997(8): 470-472.
- [7] 郑建仙. 功能性食品(第二卷)[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
- [8] 于敏, 沈业寿, 梅一德. 蜜环菌菌索多糖的免疫增强功能的研究[J]. 生物学报, 2001(4): 16-18.
- [9] ITO Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1065(2): 145-168.
- [10] 戴卓昊, 武彦文, 欧阳杰. 高速逆流色谱在中药保健品功效成分制备中的应用[J]. 中国食物与营养, 2009(1): 45-47.
- [11] 袁黎明, 吴平, 夏滔. 高速逆流色谱制备分离中药黄柏中的生物碱[J]. 色谱, 2002, 20(2): 185-186.
- [12] YANG Fuquan, ZHANG Tianyou, ZHANG Ren, et al. Application of analytical and preparative high-speed countercurrent chromatography for separation of alkaloids from *Coptis chinensis* Franc[J]. Chromatogr, 1998, 829(1/2): 137-141.
- [13] 冯顺卿, 李药兰, 邱玉明, 等. 高速逆流色谱分离长瓣莲花中的黄酮类物质[J]. 色谱, 2003, 21(6): 627.
- [14] HAN Xiao, ZHANG Tianyou, WEI Yun, et al. Separation of salidroside from *Rhodiola crenulata* by high-speed counter current chromatography[J]. J Chromatogr, 2002, 971(1/2): 237-241.
- [15] 魏芸, 张天佑, 吴克友. 高速逆流色谱法对刺五加有效成分刺五加苷E的分离制备[J]. 色谱, 2002, 20(6): 543-545.
- [16] 曹学丽. 高速逆流色谱分离技术及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 442-447.