

高速逆流色谱法分离花椒中的黄酮化合物

石雪萍¹, 吴亮亮², 张卫明²

(1.江苏经贸职业技术学院工程技术学院, 江苏省食品安全工程技术研究开发中心, 江苏 南京 210007;

2.南京野生植物综合利用研究院, 江苏 南京 210042)

摘要:应用高速逆流色谱法分离制备花椒中的黄酮化合物。以氯仿-甲醇-正丁醇-水(4:3:0.5:2, *V/V*)为两相溶剂系统, 在主机转速为850r/min、流速2mL/min、检测波长254nm条件下进行分离制备, 共得到6个峰。采用高效液相色谱对所收集的峰进行纯度检测, 对纯度较高的4种化合物(按照出峰次序标记为A、B、C、D)进行结构鉴定, A为茴香苷(foeniculin); B为槲皮素-7-葡萄糖苷(quercetin-7-glucoside); C为芦丁(rutin); D为槲皮素-3-半乳糖苷(quercetin-3-galactoside)。

关键词:高速逆流色谱; 黄酮; 花椒; 分离

Separation and Preparation of Flavonoids from *Zanthoxylum bungeanum* by High-speed Countercurrent Chromatography

SHI Xue-ping¹, WU Liang-liang², ZHANG Wei-ming²

(1. Jiangsu Food Safety Engineering Research and Development Center, College of Engineering and Technology,

Jiangsu Institute of Economic and Trade Technology, Nanjing 210007, China;

2. Nanjing Institute for Comprehensive Utilization of Wild Plant, Nanjing 210042, China)

Abstract: Flavonoids from *Zanthoxylum bungeanum* were separated by high-speed countercurrent chromatography. The separation was performed using a two-phase solvent system composed of chloroform, methanol, *n*-butanol and water (4:3:0.5:2, *V/V*) at a flow rate of 2.0 mL/min, and rotation speed and detection wavelength were set at 850 r/min and 254 nm, respectively. Six flavonoids were detected by HPLC. The purities of peaks 1, 2, 3, 4, 5 and 6 were 72.7%, 67.8%, 89.6%, 96.5%, 94.1% and 91.3%, respectively. Their structures were characterized as foeniculin, quercetin-7-glucoside, rutin and quercetin-3-galactoside by MS and ¹H-NMR.

Key words: high-speed countercurrent chromatography (HSCCC); flavonoids; *Zanthoxylum bungeanum*; separation

中图分类号: R284.2; TS209

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)12-0006-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201312002

花椒是我国特有的食用辛香料之一, 也是一味传统中药, 具有温中散寒、除湿、杀虫、止痛等作用。花椒中的化学成分主要有生物碱、酰胺、木脂素、黄酮、香豆素及三萜、甾醇、烃类和挥发油等成分。其中黄酮类化合物含量丰富, 种类较多。随着种植面积的增长, 除东南亚传统地区对花椒进口量增加, 对欧美市场的出口也逐渐增多。但是花椒产业还属于粗放型, 同时对花椒中活性成分研究不全面, 影响花椒的综合利用和深度加工。

逆流色谱(countercurrent chromatography, CCC)是20世纪60年代发展起来一种新型液-液分配色谱分离技术, 到20世纪80年代发展成为高速逆流色谱(high-speed countercurrent chromatography, HSCCC)^[1]。相对于传统的固-液柱层析技术, 它具有制备量大、回收率高、费用

低、适用范围广、操作灵活等优点。经过三十多年的发展, CCC技术已经发展成为一种倍受关注的新型分离纯化技术, 广泛应用于生物医药、天然产物、食品分离等领域^[2-3]。

本研究运用高速逆流色谱分离花椒中的黄酮成分, 有利于进一步研究探讨花椒黄酮类成分药效机理, 更好更合理地开发花椒资源。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

茂汶红花椒、韩城红花椒、云南青花椒、四川青花椒(市售); 甲醇(色谱纯) 美国Tedia公司; 磷酸(色谱

收稿日期: 2012-03-09

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAD06B02)

作者简介: 石雪萍(1974—), 女, 副研究员, 博士, 主要从事食品功能成分研究以及功能食品开发。E-mail: stbdw@yahoo.com.cn

纯) 天津市科米欧化学试剂有限公司; 其他试剂为国产分析纯; 实验用水为双蒸水。

1.2 仪器与设备

LXJ-II型离心沉淀机 上海医用分析仪器厂; EL-410s电子天平 美国Setra公司; KQ-600E超声波清洗器 昆山市舒美超声仪器有限公司; TBE300A高速逆流色谱仪(TBP-50A泵、TBD-2000紫外检测器、TC-1050恒温循环器、金达工作站) 上海同田生化技术有限公司; 1200高效液相色谱仪、色谱柱Zorbax C₁₈(150mm×4.6mm, 5μm) 美国安捷伦科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 花椒黄酮的提取和纯化

取干花椒果皮(茂汶红花椒)进行粉碎, 准确称取500g, 用石油醚脱脂处理1h。以60%乙醇溶液为提取溶剂, 料液比为1:20, 浸提温度 70℃, 浸提1h。抽滤后真空干燥得花椒黄酮初提取物。花椒初提物经AB-8型大孔吸附树脂纯化。纯化条件: 上样质量浓度3.0mg/mL; 上样pH 5.0; 70%乙醇作为洗脱剂, 用量 3BV。洗脱液经浓缩置真空干燥箱中干燥, 此干燥褐色粉末即为花椒黄酮样品。

1.3.2 高速逆流色谱分离制备花椒黄酮

1.3.2.1 高速逆流色谱溶剂系统的选择

根据高速逆流色谱分离黄酮类化合物的相关报道^[4-7], 选取了12种溶剂体系通过沉降时间和分配系数 K 的测定来进行筛选。文献[2]要求沉降时间小于 30s。选用沉降时间小于30s的溶剂体系比例再作分配系数 K 的测定。结合实际上机结果分析优选溶剂系统。

沉降时间的测定方法: 在15mL的刻度试管中按溶剂系统的比例加入混合溶剂约10mL, 密封试管上下振荡10次后静置, 分层的时间记为沉降时间。

分配系数 K 的测定方法: 称取20mg花椒黄酮样品, 用2mL甲醇超声溶解, 取0.1mL加入溶剂体系中, 充分振摇, 静置分层, 分取上、下层溶液, 按液相要求过滤后, 分别取上下相各10μL进样, 利用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)法测定溶剂体系上、下相所含样品的质量浓度, 以下相中组分峰面积与上中组分峰面积的比来求得样品在该溶剂系统中的分配系数(K)。液相条件: 流动相为甲醇-0.4%磷酸(50:50, V/V), 柱温25℃, 流速1.0mL/min, 检测波长254nm。

1.3.2.2 高速逆流色谱仪的工作流程^[8]

用分液漏斗按一定的体积比配制溶剂体系, 密封振荡混合后静置分层过夜, 分离的上下层溶剂超声排气后静置约30min, 样品称量, 用固定相超声溶解再离心后备用。取上层液作为高速逆流色谱的固定相, 取下层液作为流动相。打开循环水浴使高速逆流色谱系统预热, 当循环水浴温度达到设置温度(本实验设置为25℃)后, 先开

泵将固定相以10.0mL/min的流量充满分离柱, 即等有液体流出15~20mL后按泵暂停键; 开启主机转速控制器, 使高速逆流色谱仪螺旋管柱按顺时针方向旋转并达到850 r/min, 再调泵流以2.0mL/min泵入流动相, 同时打开检测器电源开关进行预热; 待检测器出口接收到流动相约15~20mL, 工作站中检测到的曲线平稳后进行进样, 同时开启检测器, 以254nm波长进行监测, 根据色谱图手动收集各色谱峰组分。当正相洗脱无组分峰出现时, 暂停泵, 以上相为流动相, 下相为固定相, 增加压力, 进行反相洗脱并收集组分峰。

1.3.3 高效液相色谱分析检测条件

对花椒黄酮样品和经HSCCC分离纯化所收集的纯化液进行HPLC图谱分析。液相条件如下: 流动相为甲醇-0.4%磷酸(50:50, V/V), 柱温25℃, 流速1.0mL/min, 检测波长254nm; 色谱柱为Zorbax C₁₈(150mm×4.6mm, 5μm); 进样量为10μL。

分离所得黄酮单体化合物经HPLC检测纯度达到85%以上的, 进一步通过核磁共振氢谱(¹H-NMR)方法检测并推断其结构。

2 结果与分析

2.1 HSCCC 溶剂系统的选择结果

在高速逆流色谱中, 合适的溶剂系统是逆流色谱分离的关键。根据所分离化合物的极性参考HSCCC分离黄酮文献中的体系, 选择了氯仿-甲醇-水、正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水、乙酸乙酯-乙醇-水、氯仿-甲醇-正丁醇-水4种不同溶剂系统进行考察, 对于沉降时间大于30s的不再进行分配系数测定。再通过HPLC分析, 得出不同体系中样品的分配系数和上机实际结果来优选最佳分离溶剂体系。结果见表1。

表1 不同溶剂体系混合后的分层时间和样品在不同溶剂体系中的分配系数

Table 1 Settling time of different two-phase solvent systems and partition coefficients of flavonoid extracts from *Zanthoxylum bungeanum*

溶剂体系	比例 (V/V)	沉降时间/s	分配系数(K)					
			1	2	3	4	5	6
氯仿-甲醇-水	4:2.5:2	24	∞	3.69	4.05	∞	4.77	6.57
	4:2:2	18	2.35	1.78	1.14	∞	3.32	4.48
	4:3.5:2	15	0.89	0.73	1.07	1.35	1.41	3.23
	4:4:2	16	0.56	0.45	0.71	0.94	0.82	2.56
正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水	3:5:3:5	15	∞	4.20	4.85	∞	5.68	4.45
	3:5:5:5	17	12.63	1.65	3.12	9.77	3.59	3.34
氯仿-甲醇-正丁醇-水	4:3:0.5:2	17	0.61	0.43	0.92	0.78	1.15	2.13
	4:4:0.5:2	22	0.45	0.05	0	0	0.85	1.78
乙酸乙酯-乙醇-水	2:1:2	14	∞	0.35	0.82	∞	1.96	2.35

样品在系统中的分配系数(K)要有一个合适的范围, 当 $K \ll 0.5$ 时, 出峰时间太快, 峰之间的分离度较差;

当 $K \gg 1$ 时, 出峰时间太长, 且峰形变宽。根据表1的数据, 选取氯仿-甲醇-正丁醇-水(4:3:0.5:2)和氯仿-甲醇-水(4:4:2)两种体系进行上机实验, 结果氯仿-甲醇-水(4:4:2)体系固定相流失严重, 只能分离出3种黄酮单体, 而氯仿-甲醇-正丁醇-水(4:3:0.5:2)体系可以分离出6种黄酮单体且图谱峰型较好, 故选择氯仿-甲醇-正丁醇-水(4:3:0.5:2)溶剂系统进行HSCCC分离制备花椒黄酮单体。

2.2 HSCCC分离结果

用该溶剂体系HSCCC分离时, 当接收的流出液出现乳浊, 可适当提高循环水浴温度或降低主机螺旋管的旋转速度或调低流动相的流速或同时调节。该溶剂系统上下相体积之比为40:60, 在上述操作条件下固定相的保留值在进样时为70%。样品量为250mg, 用等量上下相(各5mL)溶解后进样。花椒黄酮类化合物的高效逆流色谱分离图谱见图1。

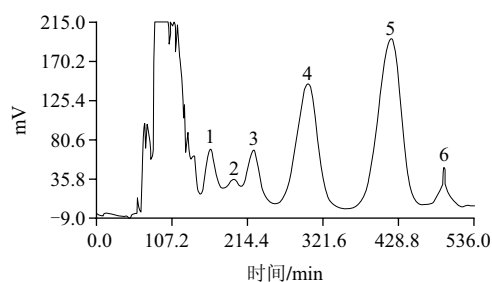


图1 花椒黄酮类化合物的高效逆流色谱分离图谱

Fig.1 HSCCC chromatogram of flavonoid extracts from *Zanthoxylum bungeanum*

由图1可见, 在本实验条件下HSCCC进行正相洗脱480min分离纯化得5种单体化合物。因为组分6的 K 值较大难以分离, 故在正相洗脱无明显组分峰出现后, 暂停泵调换流动相进行反向洗脱, 得到较明显的组分6的峰。因为反相洗脱需要有压力, 而压力很难维持稳定, 所以峰型与传统正向洗脱峰型有所差别。分别收集这6个峰以待进一步采用HPLC对其纯度进行检测。

2.3 HPLC对收集峰纯度检测结果

经HPLC检测, 用峰面积归一法测得6个分离峰接收液纯度分别为: 1号峰72.7%、2号峰67.8%、3号峰89.6%、4号峰96.5%、5号峰94.1%、6号峰91.3%。对接液蒸去溶剂后干燥称质量, 得样品质量分别为15、5、11、16、30、21mg。

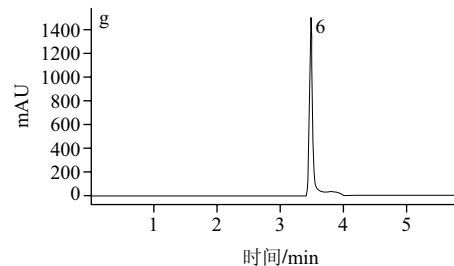
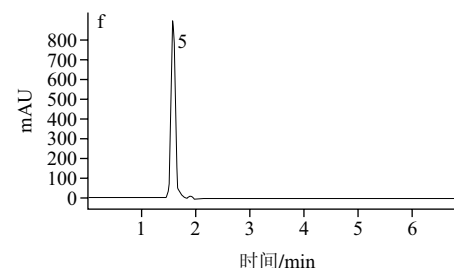
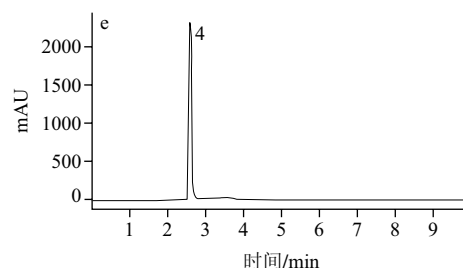
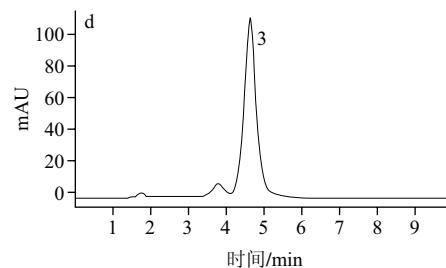
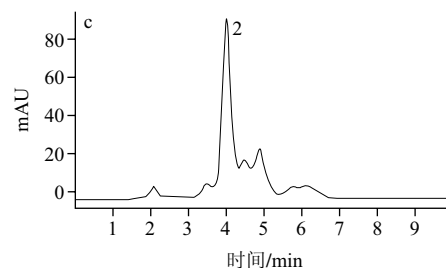
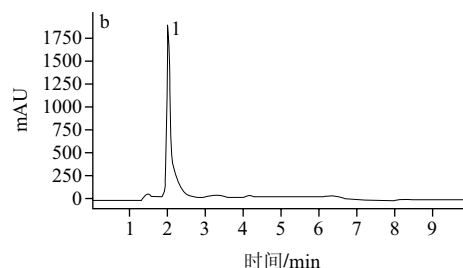
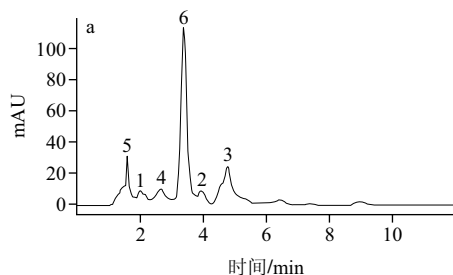


图2 花椒黄酮样品及各分离峰的HPLC色谱图

Fig.2 HPLC chromatogram of flavonoid extracts from *Zanthoxylum bungeanum* and HPLC chromatograms of 6 purified peaks obtained by HSCCC

2.4 结构鉴定

将经HPLC检测纯度达到85%以上的4个化合物进行电喷雾电离质谱和核磁共振氢谱结构鉴定。图1上的3、4、5、6号峰接受的化合物经干燥后分别标记为化合物A、B、C、D。

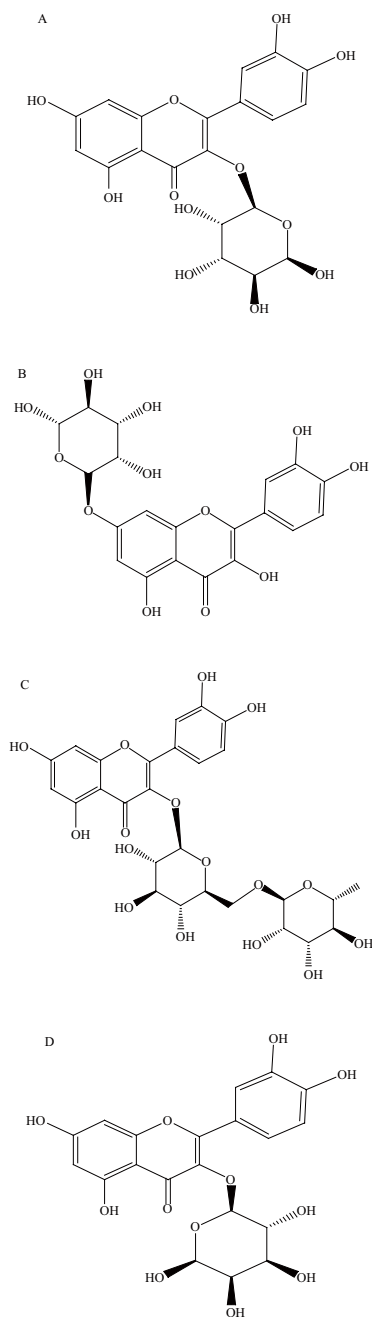


图3 各化合物的结构图

Fig.3 Structures of compounds (peaks) 3 (A), 4 (B), 5 (C) and 6 (D)

化合物A为黄色结晶粉末；质谱图显示， m/z 为574。 $^1\text{H-NMR}$ (500Hz, DMSO)分析得化学位移 δ : 7.29(^1H , d, $J=2.2\text{Hz}$, H-2'), 7.25(^1H , dd, $J=2.2, 8.3\text{Hz}$, H-6'), 6.86(^1H , d, $J=8.3\text{Hz}$, H-5')。以上为黄酮B环上3个氢。处于A环

上的氢比处于B环上的氢位于高场。A环上的两个氢分别为 δ : 6.39(^1H , d, $J=2.1\text{Hz}$, H-8), 6.21(^1H , d, $J=2.1\text{Hz}$, H-6)。阿拉伯糖的端基氢: 5.25(^1H , d, $J=1.5\text{Hz}$)，在化学位移3~4之间，有阿拉伯糖其他位置的5个氢。以上信息与文献[9-10]对照基本一致，故鉴定化合物为茴香苷(foeniculin)，推测分子式为 $\text{C}_{35}\text{H}_{58}\text{O}_6$ ，化合物A的结构式见图3A。

化合物B为黄色结晶粉末；质谱图显示其 m/z 为344。 $^1\text{H-NMR}$ (500Hz, DMSO)分析得化学位移 δ : 7.66(^1H , dd, $J=2.3, 8.5\text{Hz}$, H-6'), 7.53(^1H , d, $J=2.3\text{Hz}$, H-2'), 6.82(^1H , d, $J=8.5\text{Hz}$, H-5')。以上为黄酮B环上3个氢。处于A环上的氢比处于B环上的氢位于高场。A环上的两个氢分别为 δ : 6.40(^1H , d, $J=1.9\text{Hz}$, H-8), 6.20(^1H , d, $J=1.9\text{Hz}$, H-6)。葡萄糖的端基氢: 5.37(^1H , d, $J=7.7\text{Hz}$)，在化学位移3~4之间，有葡萄糖其他位置的6个氢。以上信息与文献[7]对照基本一致，故鉴定化合物为槲皮素-7-葡萄糖苷(quercetin-7-glucoside)，推测分子式为 $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$ ，化合物B的结构式见图3B。

化合物C为黄色粉末；质谱图显示其 m/z 为610。 $^1\text{H-NMR}$ (500Hz, DMSO)分析得化学位移 δ : 7.55(^1H , dd, $J=2.3, 8.5\text{Hz}$, H-6'), 7.53(^1H , d, $J=2.3\text{Hz}$, H-2'), 6.85(^1H , d, $J=8.5\text{Hz}$, H-5')。以上为黄酮B环上3个氢。处于A环上的氢比处于B环上的氢位于高场。A环上的两个氢分别为 δ : 6.38(^1H , d, $J=2.1\text{Hz}$, H-8), 6.19(^1H , d, $J=2.1\text{Hz}$, H-6)。葡萄糖的端基氢: 5.35(^1H , d, $J=7.6\text{Hz}$)，鼠李糖端基氢: 4.39(^1H , d, $J=1.4\text{Hz}$)，在化学位移3~4之间，有葡萄糖和鼠李糖其他位置的10个氢。以上信息与文献[11]对照基本一致，故鉴定化合物为芦丁(rutin)，推测分子式为 $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$ ，化合物C的结构式见图3C。

化合物D为淡黄色结晶粉末；质谱图显示其 m/z 为464。 $^1\text{H-NMR}$ (500Hz, DMSO)分析得化学位移 δ : 7.58(^1H , dd, $J=1.5, 8.5\text{Hz}$, H-6'), 7.54(^1H , d, $J=1.5\text{Hz}$, H-2'), 6.84(^1H , d, $J=8.5\text{Hz}$, H-5')。以上为黄酮B环上3个氢。处于A环上的氢比处于B环上的氢位于高场。A环上的两个氢分别为 δ : 6.41(^1H , d, $J=2.1\text{Hz}$, H-8), 6.21(^1H , d, $J=2.1\text{Hz}$, H-6)。半乳糖的端基氢: 5.38(^1H , d, $J=7.7\text{Hz}$)，在化学位移3~4之间，有半乳糖其他位置的6个氢。以上信息与文献[12-13]对照基本一致，故鉴定化合物为槲皮素-3-半乳糖苷(quercetin-3-galactoside)，推测分子式为 $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$ ，化合物D的结构式见图3D。

3 结论

3.1 氯仿-甲醇-正丁醇-水(4:3:0.5:2, V/V)体系可以分离出6种黄酮单体，且固定相保留率高，最终选择此体系进行HSCCC分离制备花椒黄酮单体。通过高速逆流分离出

了6个峰,采用HPLC对其纯度进行检测,纯度分别为:1号峰72.7%、2号峰67.8%、3号峰89.6%、4号峰96.5%、5号峰94.1%、6号峰91.3%。对接收液蒸去溶剂后干燥称质量,得样品质量分别为15、5、11、16、30、21mg。

3.2 将经HPLC检测纯度达到85%以上的4个化合物A、B、C、D进行电喷雾电离质谱和核磁共振氢谱结构鉴定。A为茴香苷;B为槲皮素-7-葡萄糖苷;C为芦丁;D为槲皮素-3-半乳糖苷。

参考文献:

- [1] ITO Y, CONWAY W D. High-speed countercurrent chromatography[J]. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 1986, 17: 65-143.
- [2] ITO Y. High-speed countercurrent chromatography, chemical analysis[M]. New York: Wiley, 1996: 225.
- [3] 曹学丽. 高速逆流色谱分离技术及应用[M]. 北京: 化工出版社, 2005: 188.
- [4] 张天佑. 逆流色谱技术[M]. 北京: 北京科学技术出版社, 2001: 171.
- [5] 陈山, 韩忠, 袁竹连. 高速逆流色谱法纯化糖厂混合汁浮渣中的黄酮类物质[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(8): 69-71.
- [6] 马晓丰, 屠鹏飞, 陈英杰, 等. 高速逆流色谱法分离纯化黄芪中的芒柄花素和毛蕊异黄酮[J]. 色谱, 2005, 23(3): 299-301.
- [7] 冯顺卿, 李药兰, 邱玉明. 高速逆流色谱分离长瓣金莲花中的黄酮类物质[J]. 色谱, 2003, 21(6): 627.
- [8] 吴素玲, 张锋伦, 张卫明, 等. 高速逆流色谱法分离制备刺梨黄酮成分[J]. 食品科学, 2009, 30(14): 37-40.
- [9] MARKHAM K R, CHARI V M. The flavonoids, advances in research[M]. London: Chapman & Hall, 1982: 223.
- [10] 向璞, 郑庆安, 张灿奎, 等. 水松叶黄酮化合物的研究[J]. 中草药, 2001, 32(7): 588-589.
- [11] MARSTON A, BOREL C, HOSTETTMANN K. Separation of natural products by centrifugal partition chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 1988, 450(1): 91-99.
- [12] 田景奎, 邹忠梅, 徐丽珍, 等. 黄连花化学成分研究[J]. 中草药, 2001, 32(11): 967-969.
- [13] ZHOU Tingting, CHEN bin, FAN Guorong, et al. Application of high-speed counter-current chromatography coupled with high-performance liquid chromatography-diode array detection for the preparative isolation and purification of hyperoside from *Hypericum perforatum* with online purity monitoring[J]. Journal of Chromatography A, 2006, 1116(1/2): 97-101.

更正

《食品科学》2013年34卷第8期317-320页刊登的余孔捷等作者论文《茶叶中联苯菊酯残留自然基体标准样品的研制》,图2刊误,特此更正。在此,本刊诚挚的向作者及广大读者致歉。更正后的图2为:

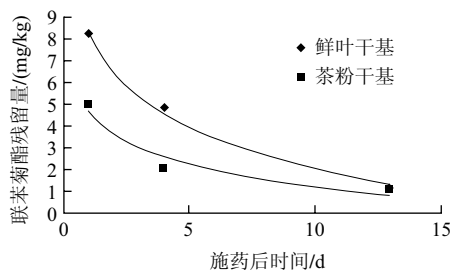


图2 不同采集日期的鲜叶干基、茶粉干基中联苯菊酯残留量

Fig.2 Bifenthrin residues in fresh tea and tea powder from different tea-picking dates

《食品科学》编辑部