

柱层析纯化 6-姜酚的工艺研究

于海^{1,2}, 马龙利^{1,2}, 陈可可^{1,2}, 余德顺^{1,2}

(1. 贵州大学化学与化工学院, 贵阳 550025;

2. 中国科学院地球化学研究所环境地球化学国家重点实验室/超临界流体研究中心, 贵阳 550002)

摘要: 以姜油树脂的粗分离物为原料, 采用减压梯度柱层析技术对粗分离物中的 6-姜酚进行分离纯化, 研究了洗脱剂种类、填料比、洗脱剂浓度、硅胶颗粒目数等因素对 6-姜酚含量及收率的影响。结果表明, 以 300~400 目硅胶为填料, 填料比为 100, 石油醚、正己烷及乙酸乙酯为洗脱剂, 洗脱剂密度增量为 0.005 g/mL, 起始浓度范围为 0.695~0.725 g/mL, 在此工艺参数下对 6-姜酚进行减压梯度柱层析分离纯化, 可将其含量从 55.03% 提高到 93.04%, 收率大于 83%。

关键词: 姜油树脂; 柱层析; 6-姜酚

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 0439-8114(2017)19-3717-03

DOI: 10.14088/j.cnki.issn0439-8114.2017.19.030

Process Study on Purification of 6-Gingerol by Column Chromatography

YU Hai^{1,2}, MA Long-li^{1,2}, CHEN Ke-ke^{1,2}, YU De-shun^{1,2}

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. Supercritical Fluids Research Center, State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, China)

Abstract: With ginger oleoresin of crude extracts as raw material, the crude extracts of 6-gingerol were separated and purified by decompression gradient column chromatography. The effects of types of eluent, ratio of filling, elution of gradient, filler particle mesh factors on the content and yield of 6-gingerol were studied. The results showed that 300-400 mesh silica gel was used as filler and the packing ratio was 100. Petroleum ether, hexane and ethyl acetate were used as eluents and the density increment of them was 0.005 g/mL and the initial concentration range was 0.695-0.725 g/mL. Under these process parameters, the content of 6-gingerol could be increased from 55.03% to 93.04% and the yield was higher than 83%.

Key words: ginger oleoresin; column chromatography; 6-gingerol

姜酚 (Gingerols) 是生姜 (*Zingiber officinale* Rosc.) 原料中天然存在的一类辣味成分, 呈黄色油状液体, 由含有羟基酮结构的烷基链同系物组成的酚类化合物^[1]。作为生姜主要生物活性成分之一, 姜酚在姜辣素中含量很高^[2]。姜酚是一类化合物, 可分为单芳环和双芳环庚烷 2 类。前者主要包括 6-姜酚、8-姜酚、10-姜酚和 12-姜酚等 10 余种成分, 后者包含许多成分, 其结构差异主要是芳环取代基不同。姜酚中 6-姜酚含量最高, 占姜酚类物质的 75% 以上^[2]。鲜姜中, 6-姜酚含量占总姜辣素 80% 以上^[3]。研究表明, 6-姜酚具有多种生物活性, 如抗氧化^[4]、

抗诱变^[5]、抗炎^[6]、抗癌^[7]、抗肿瘤^[8]、驱寒、保肝利胆等作用^[9]。6-姜酚可用于保健食品和治疗心脑血管、风湿性关节炎、胃溃疡等疾病的药物^[10]。

6-姜酚分离纯化方法主要有硅胶柱层析法、大孔吸附树脂法、聚酰胺柱分离法、分子蒸馏技术、制备型高效液相色谱法和高速逆流色谱法等^[11-17]。6-姜酚的分离方法中运用最多、最成熟的是柱层析法, 这是由于柱层析法不仅可以得到丰富的组分信息, 不破坏天然产物中原有成分, 而且能分离结构和性质非常相似的化合物, 分离出的组分纯度较高^[18,19]。既可以用于少量物质的分析鉴定, 又可用于大量物

收稿日期: 2017-07-19

基金项目: 贵州省社会发展科技攻关项目 (2014SY3080)

作者简介: 于海 (1992-), 男, 辽宁沈阳人, 在读硕士研究生, 研究方向为精细化工技术, (电话) 17678917967 (电子信箱) 2212752768@qq.com;

通信作者: 余德顺 (1963-), 男, 贵州贵阳人, 研究员, 硕士, 主要从事生物资源开发与精细化工研究, (电话) 13608582488 (电子信箱)

质的分离纯化制备^[20]。

目前,硅胶柱层析分离纯化 6-姜酚的研究中,不同洗脱剂、硅胶颗粒目数等因素对 6-姜酚分离效果的试验研究较少,很多研究结果中都没有涉及到 6-姜酚的收率,且研究内容以小柱居多,缺少大规格层析柱纯化 6-姜酚的工艺参数及试验数据,不利于 6-姜酚大规模生产及制备。为了给企业利用大规格层析柱分离 6-姜酚提供参考,本研究以普通精制硅胶为填料,采用减压冲柱,洗脱剂梯度洗脱,对姜油树脂的粗分离物(自制)进行了纯化试验研究,也为大规模生产制备 6-姜酚奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 材料及试剂

6-姜酚含量为 55.03%粗分离物(自制),98% 6-姜酚标准品(天津中新药业),GF254 板(青岛海洋化工厂),普通精制硅胶(青岛鼎康硅胶有限公司),其余试剂为分析纯。

1.2 仪器及设备

Aglient 1200 型高效液相色谱仪(美国 Aglient);旋转蒸发仪(美国 BUCHI Labortechnik AG);XP205 电子分析天平(美国 METTLER TOLEDO);循环水式真空泵(山海予英仪器有限公司);BZF50 型真空干燥箱(Boxun);60 mm×1 200 mm 层析柱;Aglient 1260 型 HPLC。

1.3 方法

1.3.1 装柱及上样 称取适量硅胶,干法装入层析柱(60 mm×1 200 mm);按比例称取一定质量的 6-姜酚粗分离物(6-姜酚含量 55.03%),加入 1.5~2.0 倍乙酸乙酯溶解,再加入 2~3 倍拌样硅胶(40~80 目),搅拌挥干,干法上样。

1.3.2 洗脱 先向层析柱中加入石油醚(二类)或正己烷进行润柱,再用配好的洗脱剂(由石油醚、正己烷及乙酸乙酯配制成一定密度的溶剂)冲柱,洗脱剂密度单位增加量为 0.005 g/mL,洗脱过程中采用薄板层析(TLC)进行检测。

1.3.3 收集 当点板显色后样品点与 6-姜酚标准品点水平位置重叠或平行时,开始收集。当样品点变小、颜色变得很浅时,表明 6-姜酚组分已基本全冲出,停止收集接液。

1.3.4 溶剂回收及样品干燥 将冲柱后的洗脱剂进

行旋转蒸发回收溶剂,回收的溶剂可重复利用。含 6-姜酚的收集液回收完溶剂后,放入 40℃、0.08 MPa 的真空干燥箱中干燥,用 HPLC 测定样品中 6-姜酚的含量。

1.4 检测分析

1.4.1 高效液相色谱条件 Agilent 高效液相色谱仪,色谱柱:迪马 Diamonsil C18(4.6 mm×250 mm,5 m);乙腈-水(V/V=70:30)为流动相;流速 1.0 mL/min;检测波长为 280 nm,柱温 30℃,进样量 10 L。

1.4.2 标准曲线的绘制 精密称取 6-姜酚标准品 20.30 mg,以色谱纯甲醇溶解并定容至 25 mL 容量瓶作标准品溶液。分别精确移取适量标准品溶液于 6 个 10 mL 容量瓶内,用甲醇稀释至 6 个不同浓度水平的系列标准品溶液。各标准品溶液分别进样 10 μL,重复进样 3 次,计算峰面积平均值,以峰面积平均值为纵坐标,进样浓度为横坐标,绘制标准曲线计算回归方程。最终得到回归方程 $y=5\ 511.646\ 73x-17.16$ ($R=0.999\ 99$),结果表明 6-姜酚在 0.081 2~0.487 2 mg/mL 呈良好的线性关系。

2 结果与分析

2.1 洗脱剂的选择

以 300~400 目硅胶为填料,采用干法装柱,在填料比(填料质量与样品质量的比值)为 40,冲柱时间为 3~4 d,考察不同种类洗脱剂对 6-姜酚含量及收率的影响(表 1)。结果表明,以正己烷和乙酸乙酯、石油醚和乙酸乙酯、石油醚和正己烷及乙酸乙酯配制的溶剂作洗脱剂进行减压梯度过柱分离,获得的分离物中 6-姜酚含量在 83%左右,收率在 92%左右,3 种洗脱剂的分离效果差异不明显。

2.2 填料比的选择

以 300~400 目硅胶为填料,干法装柱及上样,以石油醚和正己烷及乙酸乙酯配制成洗脱剂,梯度范围为 0.670~0.710 g/mL,考察填料比对 6-姜酚含量及收率的影响(图 1)。由图 1 可知,随着填料比的增加,纯化物中 6-姜酚含量随之增加,6-姜酚收率是先增加后减小。这是因为填料比增加,6-姜酚组分与杂质的分离度增大,所以纯化物中 6-姜酚含量增大。但填料增加,硅胶中 6-姜酚的吸附量增加,导致纯化物中 6-姜酚收率降低。当填料比为 100 时,纯化分离物中 6-姜酚的含量大于 91%,收率大于

表 1 洗脱剂种类对柱层析分离效果的影响

洗脱剂种类	密度梯度/g/mL	溶剂消耗量/mL	6-姜酚含量/%	6-姜酚收率/%
正己烷+乙酸乙酯	0.665~0.680	26050	83.42	92.38
石油醚+乙酸乙酯	0.670~0.690	28500	84.34	91.18
石油醚+正己烷+乙酸乙酯	0.675~0.695	26500	83.65	93.38

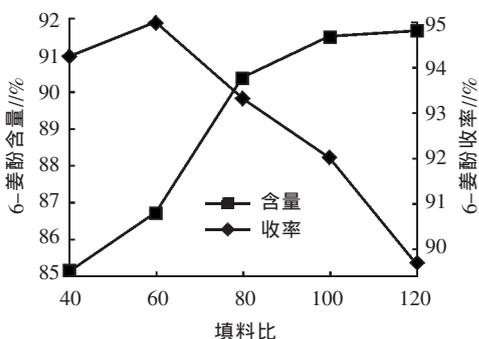


图 1 填料比对 6-姜酚含量及收率的影响

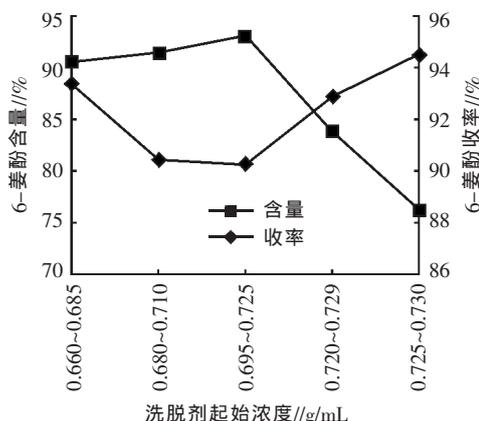


图 2 洗脱剂起始浓度对 6-姜酚含量及收率的影响

92%, 分离效果较好。

2.3 洗脱剂起始浓度

以 300~400 目硅胶为填料, 填料比为 100, 以石油醚和正己烷及乙酸乙酯配制成不同密度的洗脱剂, 从开始更换梯度洗脱剂到 6-姜酚冲完(TLC 结果样品点没有 6-姜酚)截止, 考察洗脱剂密度梯度对洗脱剂用量的影响(图 2)。由图 2 可知, 随着洗脱剂起始浓度(即密度)增加, 6-姜酚含量先增加后降低, 而收率是先降低再增加。当洗脱剂起始浓度分别大于 0.695 g/mL 和 0.725 g/mL 时, 虽然 6-姜酚收率增大, 但含量下降较大。这是由于洗脱剂密度增大极性增强, 弱极性杂质与 6-姜酚不能有效分离, 导致含量降低收率升高。当洗脱剂起始浓度为 0.695~0.725 g/mL 时(洗脱剂密度增量为 0.005 g/mL), 6-姜酚含量最高, 收率为 90% 左右, 说明该洗脱剂浓度对 6-姜酚的分离效果好。

2.4 填料目数

以 300~400 目普通精制硅胶作填料时, 洗脱剂

流经柱子时阻力过大, 真空度在 0.07~0.08 MPa, 真空泵压力较大, 洗脱剂流速较低。因此, 以 100~200、200~400 和 300~400 目硅胶为填料, 石油醚和正己烷及乙酸乙酯配为洗脱剂, 研究硅胶目数对 6-姜酚分离效果的影响(表 2)。由表 2 可看出, 随着填料颗粒目数减小, 冲柱时间变短。这是因为填料目数变小, 粒径变大, 填料间缝隙变大, 孔道变多, 洗脱剂流经柱子时阻力减小, 流速加快, 冲柱时间就减小。以 100~200、200~300 目硅胶为填料时, 冲柱后获得的纯化物中 6-姜酚收率虽然比较高, 分别为 95.23% 和 93.22%, 但含量较低, 均低于 90%。当填料目数为 300~400 目时, 过柱所得纯化物中 6-姜酚含量较高, 为 93.04%, 但收率较低, 仅为 83.11%, 这可能是由于起始接液点过晚, 部分 6-姜酚从柱内冲出但未及时收集, 导致 6-姜酚收率降低, 说明硅胶目数越大, 越有利于 6-姜酚含量的提高。

表 2 填料目数对 6-姜酚分离效果的影响

填料颗粒目数/目	填料比/g/g	冲柱时间/d	密度梯度/g/mL	溶剂消耗量/mL	6-姜酚含量/%	6-姜酚收率/%
100~200	100	3	0.695~0.720	57 000	89.18	95.23
200~300	100	4	0.695~0.720	56 600	88.32	93.22
300~400	100	5	0.695~0.725	36 500	93.04	83.11

3 结论

硅胶柱层析分离纯化 6-姜酚试验中, 洗脱剂种类对分离效果影响较小, 增加了洗脱剂的选择性, 并可进行自由组合; 其次, 填料比增大有利于 6-姜酚含量的提高, 但收率会有所降低, 洗脱时间会增加。洗脱剂起始浓度对 6-姜酚的分离效果也有较大影响, 选择合适的洗脱剂起始浓度, 可获得较高的 6-姜酚含量及收率。

层析柱规格为 60 mm×1 200 mm, 300~400 目硅胶为填料, 填料比为 100, 石油醚、正己烷及乙酸乙酯配制成密度为 0.695~0.725 g/mL 的洗脱剂, 单位增量为 0.005 g/mL, 在此工艺参数下进行减压梯度

柱层析分离纯化 6-姜酚, 可将其含量从 55.03% 提高到 93% 左右, 收率在 83% 以上。

致谢: 感谢贵州百灵制药技术中心为试验研究提供的帮助和支持。

参考文献:

[1] ALI B H, BLUNDEN G, TANIRA M O, et al. Some phytochemical pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): a review of recent research[J]. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46(2): 409-420.
 [2] 张英锋, 马子川. 生姜的成分及应用[J]. 化学教学, 2012(8): 73-74.
 [3] 项 敏, 郭 嘉, 刘竞博, 等. 姜辣素提取与分离纯化工艺的研究进展[J]. 化学与生物工程, 2015, 32(5): 7-10.
 [4] MUSTAFA T, SRIVASTAVA K C, JENSEN K B. Drug develop-

(下转第 3735 页)

之对物流过程的不信任,消费者往往会选择在实体店挑选购买,而代用茶、花茶,则会受到网购者的偏爱,所以网店销售茶叶的品类也是影响消费者网购态度的一个重要因素。

5 结论与启示

根据实证分析可知,消费者茶叶网购态度的影响因素既有与一般商品类似的部分,也存在别于一般商品的部分。感知有用性、感知易用性及茶叶属性直接影响消费者对茶叶的网购态度,销售平台的质量和支付方式则通过感知有用性、感知易用性对其产生间接影响。

根据以上实证结果得到启示:茶叶电商的发展,应有其独特的发展模式,照搬一般商品的电商发展手段是不足以对茶叶电商发展产生带动作用,这一点由近几年其他电商迅速发展,茶叶电商却停滞不前的境况即可得到证明。建设完善的茶叶线上销售平台、选择合适的支付方式、更新符合消费者喜好的茶叶结构等,都是提高消费者参与茶叶网购热情的重要手段。

由于某些现实因素的限制,受到网上问卷回收率低的影响,仅仅 179 个样本,样本量仍显不足,且线下样本发放集中在武汉地区,虽然尽量做到随机

抽取,但调查对象仍是以城市人口为主。进一步的研究如能扩大样本容量,结合城乡因素,可能会取得较大改进。

参考文献:

- [1] VENKATESH V, DAVIS F D. A theoretical extension of the technology acceptance model: Four longitudinal field studies [J]. *Management Science*, 2000, 46(2): 186-204.
- [2] MCCLOSKEY D W. The importance of ease of use, usefulness, and trust to online consumers: An examination of the technology acceptance model with older consumers [J]. *Journal of Organizational and End User Computing*, 2006, 18(3): 1-19.
- [3] 曹培培, 赵宇翔, 徐一新. 基于 TAM 模型的政府网站使用行为实证研究 [J]. *现代图书情报技术*, 2008(2): 76-81.
- [4] 李琼, 李晓霞. 基于 TAM 模型的微信平台购物接受程度实证研究 [J]. *统计与决策*, 2016(19): 54-57.
- [5] 杨杰, 赖杰, 冯丽敏. 基于技术接受模型(TAM)理论的网购影响因素分析 [J]. *内蒙古科技与经济*, 2016(7): 104-105.
- [6] DAVIS F D, DAVIS F. Perceived usefulness, perceived ease of use, and user acceptance of information technology [J]. *MIS Quarterly*, 1989, 13(3): 319-340.
- [7] 温忠麟, 侯杰泰, 马仕赫伯特. 结构方程模型检验: 拟合指数与卡方准则 [J]. *心理学报*, 2004, 36(2): 183-194.
- [8] 胡振涛, 项喜章, 吴素春. 武当道茶区域品牌忠诚影响因素的结构模型分析——基于消费者感知视角 [J]. *中国农业资源与区划*, 2015(1): 38-43.
- [9] 曹培培, 赵宇翔, 徐一新. 基于 TAM 模型的政府网站使用行为实证研究 [J]. *现代图书情报技术*, 2008(2): 76-81.
- [10] 李琼, 李晓霞. 基于 TAM 模型的微信平台购物接受程度实证研究 [J]. *统计与决策*, 2016(19): 54-57.
- [11] 杨杰, 赖杰, 冯丽敏. 基于技术接受模型(TAM)理论的网购影响因素分析 [J]. *内蒙古科技与经济*, 2016(7): 104-105.
- [12] DAVIS F D, DAVIS F. Perceived usefulness, perceived ease of use, and user acceptance of information technology [J]. *MIS Quarterly*, 1989, 13(3): 319-340.
- [13] 温忠麟, 侯杰泰, 马仕赫伯特. 结构方程模型检验: 拟合指数与卡方准则 [J]. *心理学报*, 2004, 36(2): 183-194.
- [14] 胡振涛, 项喜章, 吴素春. 武当道茶区域品牌忠诚影响因素的结构模型分析——基于消费者感知视角 [J]. *中国农业资源与区划*, 2015(1): 38-43.
- [15] 曹培培, 赵宇翔, 徐一新. 基于 TAM 模型的政府网站使用行为实证研究 [J]. *现代图书情报技术*, 2008(2): 76-81.
- [16] 李琼, 李晓霞. 基于 TAM 模型的微信平台购物接受程度实证研究 [J]. *统计与决策*, 2016(19): 54-57.
- [17] 杨杰, 赖杰, 冯丽敏. 基于技术接受模型(TAM)理论的网购影响因素分析 [J]. *内蒙古科技与经济*, 2016(7): 104-105.
- [18] DAVIS F D, DAVIS F. Perceived usefulness, perceived ease of use, and user acceptance of information technology [J]. *MIS Quarterly*, 1989, 13(3): 319-340.
- [19] 温忠麟, 侯杰泰, 马仕赫伯特. 结构方程模型检验: 拟合指数与卡方准则 [J]. *心理学报*, 2004, 36(2): 183-194.
- [20] 胡振涛, 项喜章, 吴素春. 武当道茶区域品牌忠诚影响因素的结构模型分析——基于消费者感知视角 [J]. *中国农业资源与区划*, 2015(1): 38-43.

(上接第 3719 页)

ment report 9. Pharmacology of ginger [J]. *Drug Dev*, 1993, 6(1): 25-39.

- [5] OYAGBEMI A A, SABA A B, AZEEZ O I. Molecular targets of [6]-gingerol: Its potential roles in cancer chemoprevention [J]. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 36(3): 169-178.
- [6] 曾高峰, 宗少晖, 傅松文, 等. 6-姜酚对淀粉样蛋白诱导损伤 PC12 细胞的保护作用 [J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2016, 18(2): 193-195.
- [7] LEE H S, SEO E Y, KANG N E, et al. [6]-Gingerol inhibits metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells [J]. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2008, 19(5): 313-319.
- [8] KIM E C, MIN J K, KIM Y, et al. [6]-Gingerol a pungent ingredient of ginger, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 335(2): 300-307.
- [9] 杨光. 6-姜酚生物学作用的细胞与分子机制研究 [D]. 辽宁大连: 大连医科大学, 2011.
- [10] 于艳静, 锁然, 于艳敏, 等. 大孔吸附树脂纯化生姜中 6-姜酚的研究 [J]. *中国食品学报*, 2013, 13(8): 155-160.
- [11] 马龙利, 李岗, 叶菲菲, 等. 6-姜酚的分离纯化及抗氧化能力研究 [J]. *食品科技*, 2016(8): 206-209.
- [12] BALLADIN D A, HEADLEY O, CHANG-YEN I, et al. High pressure liquid chromatographic analysis of the main pungent principles of solar dried West Indian ginger (*Zingiber officinale*

Roscoe) [J]. *Renewable Energy*, 1998, 13(4): 531-536.

- [13] 刘伟, 周春丽, 赵婧, 等. 姜酚的研究进展 [J]. *食品研究与开发*, 2014, 35(17): 127-131.
- [14] 孙凤娇, 李振麟, 钱士辉, 等. 干姜化学成分研究 [J]. *中国野生植物资源*, 2016, 35(5): 20-29.
- [15] 柳乃奎. 聚酰胺柱层析分离姜酚类物质的效果 [J]. *食品工业科技*, 2005, 26(1): 99-102.
- [16] 徐美霞, 王晓, 刘建华, 等. 高速逆流色谱结合硅胶柱色谱法分离制备干姜中的 6-姜酚、8-姜酚、6-姜烯酚 [J]. *山东科学*, 2013, 26(2): 61-65.
- [17] ZHAN K, XU K, YIN H. Preparative separation and purification of gingerols from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) by high-speed counter-current chromatography [J]. *Food Chemistry*, 2011, 126(4): 1959-1963.
- [18] 赖榕辉, 黄亚辉. 中低压柱层析分离儿茶素的研究 [J]. *离子交换与吸附*, 2012, 28(2): 165-170.
- [19] YULIANA M, NGUYEN-THI B T, FAIKA S, et al. Separation and purification of cardol, cardanol and anacardic acid from cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut-shell liquid using a simple two-step column chromatography [J]. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2014, 45(5): 2187-2193.
- [20] GHANBARI K, AGHAJANI H, GOLBABAEE M, et al. Column chromatography: A facile and inexpensive procedure to purify the red dopant DCJ applied for OLEDs [J]. *Advances in Materials Physics and Chemistry*, 2011, 1: 91-93.