

土豆叶中茄尼醇的高速逆流色谱法分离纯化及质谱解析

胡江涌, 梁 勇, 谢 亚, 黄肇锋, 钟汉佐

(华南师范大学化学与环境学院, 广东 广州 510006)

摘要 采用超微回流提取方法提取土豆叶中的茄尼醇, 用高速逆流色谱(HSCCC)对粗提物中的茄尼醇进行分离纯化。以正己烷-甲醇(体积比为 10:7)作为两相溶剂系统, 以其下相为流动相, 上相为固定相, 经过一步 HSCCC 从 60 mg 茄尼醇粗提物中分离得到了 5 mg 纯度为 98.7% 的茄尼醇; 对分离得到的茄尼醇进行大气压化学电离质谱解析, 研究了茄尼醇的大气压化学电离质谱的一级电离规律和二级质谱裂解规律。

关键词 高速逆流色谱; 大气压化学电离质谱; 茄尼醇; 土豆叶; 制备分离

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2007)04-0528-04 栏目类别: 研究论文

Isolation and Purification of Solanesol from Potato Leaves by High-Speed Counter-Current Chromatography and Identification by Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry

HU Jiangyong, LIANG Yong, XIE Ya, HUANG Zhaofeng, ZHONG Hanzuo

(School of Chemistry and Environment, South China Normal University, Guangzhou 510006, China)

Abstract : Preparative high-speed counter-current chromatography (HSCCC) was used for the isolation and purification of solanesol from potato leaves. Experimental conditions of the extraction of solanesol from potato leaves have been optimized. An ultrafine extraction method was applied in this study. The efficiency using an ultrafine extraction was found to be improved in the investigation, the yields of solanesol by different extraction methods were 0.083% by ultrafine extraction and 0.050% by ultrasonic extraction. Using *n*-hexane-methanol (10:7, v/v) as the two-phase solvent system, preparative HSCCC was successfully performed with the yield of 5 mg solanesol at 98.7% of purity from 60 mg of crude extract in the one-step separation. The mobile phase was the lower phase and operated at a flow rate of 1.5 mL/min, while the apparatus rotated at 800 r/min. The solanesol was identified by the atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (APCI-MS). The ionization and cleavage mechanisms of solanesol in APCI-MS and APCI-MS/MS are discussed.

Key words : high-speed counter-current chromatography (HSCCC); atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (APCI-MS); solanesol; potato leaves; preparative isolation

茄尼醇(solanesol)是药物合成的重要原料, 是合成泛醌类药物不可替代的关键中间体。目前许多发达国家已生产和广泛应用的辅酶 Q10 均须依赖高纯度的茄尼醇作为原料^[1]。辅酶 Q10 在医药保健和化妆品领域中应用十分广泛, 如在医药领域中用于治疗心脑血管疾病、病毒性肝炎、十二指肠溃疡和癌症病人减轻化疗副作用等; 在保健品领域, 辅酶 Q10 用于预防多种疾病和减缓衰老等, 是欧洲、美

国、日本等国家非常流行的一种保健品; 在化妆品领域, 辅酶 Q10 用于祛斑除皱、防止肌肤老化等, 是高档化妆品的原料^[2]。此外, 近来还发现辅酶 Q10 有更多的用途, 如治疗老年痴呆、先天障碍性贫血等。更重要的是, 美国食品药品监督管理局(FDA)于 2004 年 3 月将辅酶 Q10 的建议用量提高了 4 倍。近年来随着国际市场上辅酶 Q10 用量的日益增加^[1], 茄尼醇的需求量也与日俱增。

茄尼醇是九聚异戊二烯伯醇(四倍半萜烯醇),具有特殊的全反式链状结构,其分子式为 $C_{45}H_{74}O$,熔点为 $41.5 \sim 42.5\text{ }^{\circ}\text{C}$,沸点为 $130\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右,易溶于冰醋酸、甲醇和正己烷等溶剂,不溶于水,无光学活性,其结构式见图 1。

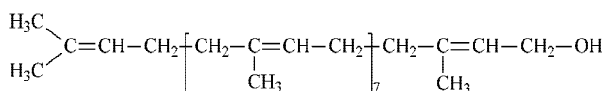


图 1 茄尼醇的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of solaneseolol

高速逆流色谱(high-speed counter current chromatography, HSCCC)是美国国家医学院 Ito 博士^[3]于 20 世纪 80 年代发明的一种无任何固态支持介质的液-液分配色谱技术,其基本原理是根据被分离的物质在两相溶剂系统中的分配系数不同而得到最终分离。作为近 20 年来发展起来的一种新型液-液分配色谱技术,已广泛应用于生物、化工等各个领域^[4-7]。

茄尼醇的常用分离方法有溶剂提纯法、柱色谱法、分子蒸馏法、 CO_2 超临界萃取法、硫脲包合法、聚合态共沉淀法等^[2]。这些方法存在操作复杂,或成本较高,或分离效果不好等问题。为了寻找一种简单、高效的茄尼醇分离方法,本文建立了用高速逆流色谱分离纯化茄尼醇的方法。茄尼醇是一种弱极性的化合物,目前还没有关于茄尼醇高速逆流色谱分离的报道,但有一些类似结构的化合物如叶黄素、番茄红素分离的报道^[7,8],本文参考番茄红素、叶黄素的高速逆流色谱分离方法,从土豆叶的粗提物中分离纯化了茄尼醇,取得了理想的结果。

1 实验部分

1.1 试剂和原料

所有用于制备茄尼醇粗品和 HSCCC 分离的试剂均为分析纯试剂(天津大茂化学试剂厂),用于高效液相色谱(HPLC)检测的甲醇和乙醇是色谱纯试剂(DIMA technology INC, USA),茄尼醇标准品(纯度不低于 90%)购于 American J & K Chemical Ltd., Lot: LB70F02。本文实验用的土豆叶取自陕西省。

1.2 仪器

GS10 A2 型半制备高速逆流色谱仪:多层螺旋管柱(长 110 m,直径 1.6 mm,总体积 230 mL), β 值(螺旋管支持件的自转半径 r 与公转半径 R 的比值,即 $\beta = r/R$)为 $0.5 \sim 0.8$,Six star NS21007 恒流泵(流速为 $0 \sim 9.99\text{ mL/min}$),8823B 紫外检测器(北京市新技术应用研究所生产)。2 mL 手动进样

阀(天津高新科技公司);Yokogawa Model 3057 便携式记录仪(四川仪器厂)。

Waters 高效液相色谱仪,包括 Waters 600 泵, Waters 2487 全波长紫外检测器,杭州英谱色谱工作站。

质谱仪:Finigan LCQ DE CA XP Max (USA)。

1.3 茄尼醇的粗提

将土豆叶用中药粉碎机超微粉碎(80 目),取 150 g 超微粉碎后的土豆叶粉末,加入 1 500 mL 乙醇于 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下热回流浸提 6 h,提取液浓缩,蒸馏除去乙醇,得粗提物浸膏。

1.4 HSCCC 条件

两相溶剂体系:正己烷-甲醇(体积比为 10:7);固定相:两相溶剂的上相;流动相:两相溶剂的下相;流速:1.5 mL/min;检测波长:254 nm;仪器转速:800 r/min;螺旋管柱按顺时针方向转向,由首端向尾端洗脱。

1.5 茄尼醇的 HSCCC 分离

取 150 mg 茄尼醇粗提物,用 5 mL 下相溶剂溶解,作为 HSCCC 的样品。每次 HSCCC 的分离都是用两相溶剂体系中的上相作为固定相,下相作为流动相。以 9.99 mL/min 的流速注入上相溶剂,待上相注满后,开动主机,调转速为 800 r/min,通过六通阀进样 2 mL,然后以 1.5 mL/min 的流速开始注入下相,当有下相从管末端流出时,开始记录。从 100 min 开始每 1.5 min 收集一管,用 HPLC 检测其中的茄尼醇含量,将含有最高纯度茄尼醇的样品合并,蒸去溶剂,得到茄尼醇产品。

1.6 HPLC 及质谱条件

HPLC 条件:色谱柱为 Kromsil ODS-1 柱(4.6 mm $\times$ 250 mm 5 μm);检测波长为 211 nm;流动相为甲醇-乙醇(体积比为 55:45);流速 1 mL/min;进样量为 20 μL ;柱温为室温。

质谱条件:大气压化学电离(APCI)源,正离子检测;气化室温度:450 $^{\circ}\text{C}$;毛细管温度:300 $^{\circ}\text{C}$;鞘气: N_2 ;辅助气: N_2 ;碰撞气:氩气;碰撞诱导解离电压 35 V;扫描范围 m/z : 10 ~ 1 000;扫描方式:全扫描及选择离子扫描。

2 结果与讨论

2.1 HPLC 条件的优化

影响 HPLC 测定的主要因素是流动相。本文考察了一系列流动相,如甲醇-异丙醇(体积比为 55:45)、甲醇-乙醇(体积比为 75:25)、甲醇-乙醇(体积比为 50:50)、甲醇-乙醇(体积比为 55:45)等,最终确定以甲醇-乙醇(体积比为 55:45)作为本文的

HPLC 的流动相。

2.2 提取溶剂的选择

茄尼醇为四倍半萜醇,极性较小,因此用低极性的溶剂作为提取溶剂较好。目前常用的提取溶剂有正己烷、6[#]溶剂油、甲醇、丙酮等。考虑到成本和试剂毒性的因素,本文尝试用乙醇作为提取溶剂,并用乙醇和丙酮做平行对比实验,用乙醇作提取溶剂时茄尼醇的得率为 0.051%,用丙酮作提取溶液时茄尼醇的得率为 0.045%。乙醇的提取效果比丙酮略好,故本文选乙醇为提取溶剂。

2.3 超微回流提取

用乙醇作为茄尼醇的提取溶剂,从经过超微粉碎的土豆叶粉末中提取茄尼醇。以 10 g 粉碎后的土豆叶加入 100 mL 乙醇为对象,分别考察了在不同的温度和浸提时间下热回流浸提茄尼醇的得率(结果见表 1)。

表 1 不同提取时间及温度下乙醇超微提取茄尼醇的得率

Table 1 Yields of solanesol by ultrafine extraction with ethanol under different extraction times and temperatures %

Extraction temperature/℃	Extraction times/h		
	3	6	9
60	0.028	0.047	0.072
70	0.040	0.073	0.065
80	0.055	0.083	0.070

从以上结果可以看出,最佳的热回流提取条件是用乙醇在 80 ℃ 下回流浸提 6 h,该条件下茄尼醇的得率为 0.083%。在此条件下,用 150 g 超微粉碎后的土豆叶粉末热回流浸提,得到 11.2 g 的粗提物。

2.4 HSCCC 的两相溶剂系统的选择和优化

在 HSCCC 分离过程中,两相溶剂选择直接关系到目标物质的分离效果。本实验通过 HPLC 方法测定两相溶剂对茄尼醇的分配系数($K_{U/L}$)来选择合适的两相溶剂系统。

在 HSCCC 分离过程中,最好使被分离物质在两相中的溶解度基本相似。因茄尼醇极性很小,故选择较低极性的溶剂系统。实验采用了一系列的两相溶剂系统。以极性小的正乙烷-甲醇-水(体积比为 8:7:1)和正乙烷-甲醇-水(体积比为 4:4:1)的两相溶剂系统做预实验,发现只出现了一个大峰,分不出茄尼醇。考虑到样品提取时以乙醇作提取溶剂,故换为正乙烷-乙醇-水系列溶剂体系,通过 HPLC 测定发现这一系列两相溶剂的茄尼醇分配系数都比较大。以正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(体积比为 4:5:5:5)的两相溶剂体系,但茄尼醇的分配系数仍然较大。这可能是由于茄尼醇不溶于水,用含水的两相

溶剂体系时,在含水相中茄尼醇的溶解度很差,茄尼醇基本上都溶解在非水相中,因此应采用非水相的溶剂系统来分离茄尼醇。

考虑到茄尼醇易溶于正己烷和甲醇,选用比较常见的正己烷-甲醇两相溶剂系统,在该两相溶剂系统中茄尼醇的 $K_{U/L}$ 值比较合适。由表 3 可知,增加甲醇的用量可以减小 $K_{U/L}$ 值,但是两相溶剂中上相的体积也随着减小。当正己烷-甲醇的体积比为 1:1 时上相的体积太少,当其比例为 2:1 时上相和下相的体积比约为 1:1,用该溶剂体系做 HSCCC 分离实验,分离效果比较好。在本文实验中,相对于作为固定相的上相而言,下相流动相的用量较多,因此,较大的下相体积较为合适。考虑上述因素,最终采用正己烷-甲醇(体积比为 10:7)作为本次实验的两相溶剂系统。

表 2 不同两相溶剂体系下茄尼醇的分配系数 $K_{U/L}$ 值

Table 2 $K_{U/L}$ values of solanesol in different two-phase solvent systems

Solvent system	$K_{U/L}$
<i>n</i> -Hexene-ethanol-water (6:3:1, v/v)	16.3
<i>n</i> -Hexane-ethanol-water (6:5:1, v/v)	31.9
<i>n</i> -Hexane-ethanol-water (6:4:1, v/v)	37.5
<i>n</i> -Hexane-ethanol-water (4:3:1, v/v)	26.8
<i>n</i> -Hexane-ethyl acetate-methanol-water(4:5:5:5, v/v)	6.26
<i>n</i> -Hexane-methanol (1:1, v/v)	2.06
<i>n</i> -Hexane-methanol (2:1, v/v)	2.08
<i>n</i> -Hexane-methanol (10:7, v/v)	2.60

2.5 茄尼醇的 HSCCC 分离

首先按常规方法,即先注入上相(固定相),充满后开动主机,再注入下相(流动相),待有下相流出且两相系统达到平衡后加入样品进行分离。将 300 mg 土豆叶的粗提物溶于 5 mL 下相中,取 2 mL 进样进行 HSCCC 分离,发现固定相保留很低,这可能是由于样品浓度太高,而高浓度的样品溶液进入色谱柱时固定相有可能被高浓度的“样品栓”推出柱外^[9]。这种情况下一般要对样品进行稀释或降低流速,因此将 150 mg 茄尼醇粗提物溶于 5 mL 下相中,取 2 mL(即相当于 60 mg 粗提物)进样进行 HSCCC 分离,可得到比较好的固定相保留(60.9%),并成功地从粗提物中分离出茄尼醇。

由于样品中杂质比较多,茄尼醇在 2 h 后才出峰,分离时间比较长。用固定相平衡色谱柱时需要大约 100 mL 的流动相。改变进样方式,采用直接进样法,在上相充满之后先进样品,然后开动主机,再注入流动相,让样品和流动相一起进入柱中与固定相建立平衡。流动相溶剂前沿出现时开始记录。采用这种方法时固定相的保留值很好(62%),且缩

短了出峰时间,节省了流动相。按最佳的 HSCCC 条件对 60 mg 粗提物进行 HSCCC 分离。由于本实验所用的 HSCCC 仪器条件有限,只配有波长为 254 nm 的单波长检测器,而茄尼醇在此波长下没有吸收,故我们采用 HPLC 来测定 HSCCC 分离过程中

茄尼醇含量的分布。根据 HPLC 的检测结果,从 100 min 开始收集 HSCCC 分离出来的样品,每 1.5 min 收集一管。将含有最高纯度茄尼醇的 3 个试管的样品合并,蒸去溶剂,得到纯度为 98.7% 的茄尼醇 5 mg,其色谱图见图 2。

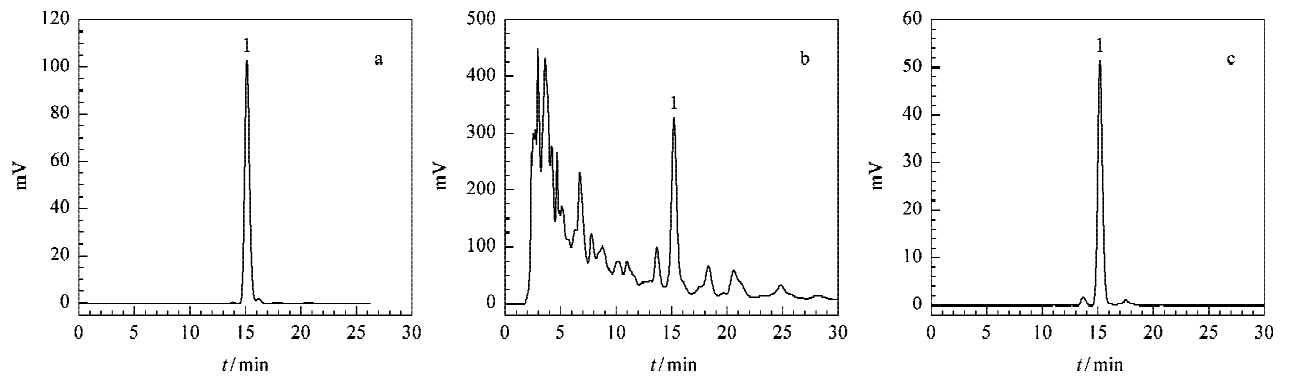


图 2 (a)茄尼醇标准品、(b)土豆叶粗提物和(c)HSCCC 分离得到的茄尼醇的 HPLC 色谱图
Fig. 2 HPLC chromatograms of (a) the standard sample of solanesol, (b) crude extract from potato leaves and (c) the solanesol from potato leaves by HSCCC
1. solanesol.

2.6 茄尼醇的质谱解析

对经 HSCCC 分离得到的纯度为 98.7% 的茄尼醇做电喷雾电离质谱和大气压化学电离质谱检测。在电喷雾电离质谱检测时看不到茄尼醇的分子离子峰,而在能量较低的大气压化学电离质谱的谱图(见图 3-a)中出现了一个很强的 m/z 613 峰,该峰是茄尼醇分子失去一个羟基而形成的离子峰。 m/z

613 峰的二级质谱(见图 3-b)中出现了一系列碎片峰,其中 m/z 558 峰为 m/z 613 失去一个 C_4H_6 得到的碎片峰, m/z 532 峰为 m/z 558 同时均裂和异裂失去 1 个 CH_2 和 CH_3 后得到的碎片峰,其他峰的质荷比均相差 14 或 14 的整数倍。这是直链烷烃特有的断裂方式,是分子失去 n 个 CH_2 基团后得到的碎片峰。

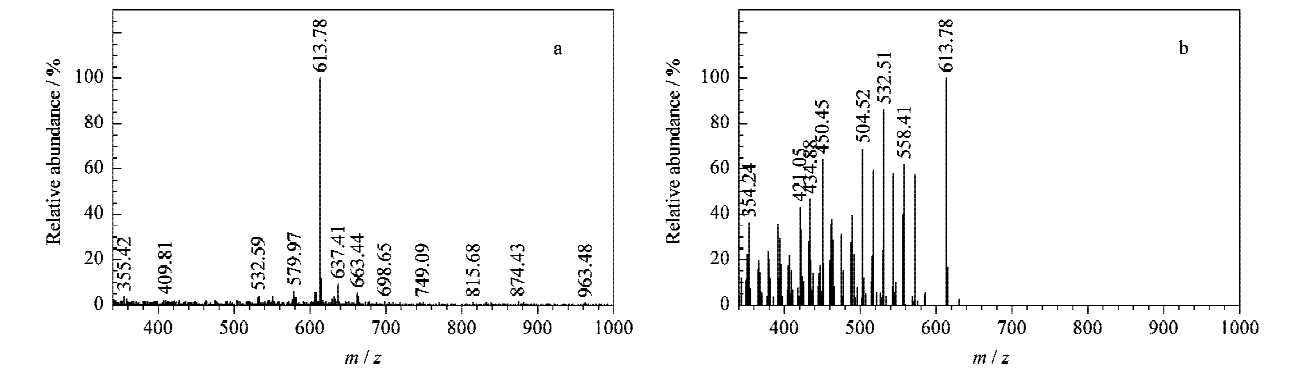


图 3 从土豆叶中分离得到的茄尼醇的(a)一级和(b)二级质谱图
Fig. 3 (a) MS and (b) MS/MS spectra of solanesol obtained from potato leaves

参考文献:

[1] West D D. US , 20040151711. 2004

[2] Wang F , Zheng H , Yu Y Z , Yang X. Chinese Journal of Modern Chemical Industry (王非,郑珩,余永柱,杨欣. 现代化工), 2005 , 25 (8) : 63

[3] Ito Y. J Chromatogr A , 2005 , 1 065 : 6

[4] Liu R M , Sun Q H , Sun A L , Cui J C. J Chromatogr A , 2005 , 1 072 : 195

[5] Li A F , Sun A L , Liu R M. J Chromatogr A , 2005 , 1 076 : 193

[6] Cao X L , Tian Y , Zhang T Y , Li X , Ito Y. J Chromatogr A , 1999 , 855 : 709

[7] Li H B , Chen F , Zhang T Y , Yang F Q , Xu G Q. J Chromatogr A , 2001 , 905 : 151

[8] Wei Y , Zhang T Y , Xu G Q , Ito Y. J Chromatogr A , 2001 , 929 : 169

[9] Cao X L. Isolation Technology and Application of High-Speed Counter-Current Chromatography. Beijing : Chemical Industry Press (曹学丽. 高速逆流色谱分离技术及应用. 北京 : 化学工业出版社), 2004 : 44