

文章编号:1001-6880(2014)Suppl-0046-06

迷迭香叶中鼠尾草酸的纯化及其结构鉴定

夏田娟¹,毕良武^{1,2*},赵振东^{1,2},邢雅丽¹,程贤¹

¹中国林业科学研究院林产化学工业研究所 生物质化学利用国家工程实验室 国家林业局林产化学工程重点开放性实验室
江苏省生物质能源与材料重点实验室,南京 210042; ²中国林业科学研究院林业新技术研究所,北京 100091

摘要:以迷迭香叶子为原料,采用两步法分离纯化鼠尾草酸,第一步:迷迭香叶经超声辅助乙醇提取,得到迷迭香提取物;第二步:迷迭香提取物经硅胶柱层析,得到鼠尾草酸纯品。单因素试验的结果表明:第二步操作的合理条件为:200~300目硅胶、洗脱剂为乙酸乙酯:石油醚(4:13,v/v)、洗脱剂流速4 mL/min、负载量为0.5 g。通过此种方法得到的鼠尾草酸纯度≥97%。同时,对实验所得物质进行紫外、红外、核磁、质谱验证,证明所得物质为鼠尾草酸。

关键词:鼠尾草酸;两步法纯化;结构鉴定

中图分类号:TQ351.0

文献标识码:A

Study on Two-step Method Purification and Structure Identification of Carnosic Acid from Rosemary Leaves

XIA Tian-juan¹, BI Liang-wu^{1,2*}, ZHAO Zhen-dong^{1,2}, XING Ya-li¹, CHENG Xian¹¹Institute of Chemical Industry of Forest Products, CAF; National Engineering Lab for Biomass Chemical Utilization;

Key and Open Lab on Forest Chemical Engineering, SFA; Key Lab of Biomass Energy and Material, Jiangsu Province, Nanjing 210042, China;

²Institute of New Technology of Forestry, CAF, Beijing 100091, China

Abstract: The two-step method to get carnosic acid from rosemary leaves was employed. The first step was getting rosemary extracts from rosemary leaves by ultrasound-assisted ethanol extraction; the second step was to get purified carnosic acid from rosemary extracts by silica gel column chromatography. Results of single factor experiments showed that: the reasonable conditions of silica gel column chromatography were 200-300 mesh silica gel, the eluent ethyl acetate: petroleum ether(4:13,v/v), the flow rate 4mL/min and 0.5 g solid loaded. The purity of carnosic acid was ≥97% by this method. Meanwhile, through UV, IR, NMR, LC-MS to verify the substance obtained by experiment is carnosic acid.

Key words:carnosic acid;two-step method purification;identification

鼠尾草酸(Carnosic acid,简称CA),酚型二萜类化合物,分子式为C₂₀H₂₈O₄,相对分子质量为332.43,是迷迭香和鼠尾草中重要的天然抗氧化活性成分^[1,2]。鼠尾草酸的外观为无色至淡黄色粉末晶体,易溶于油脂不溶于水,具有高效、安全、耐高温等特性^[3,4]。作为重要的天然抗氧化剂,鼠尾草酸被广泛地应用于油脂及含脂食品、医药、饲料和化妆品等方面^[5-10]。

鼠尾草酸的纯化方法主要有缓冲溶液精制法^[11]、pH值控制沉淀法^[12]、柱层析精制法,使用最多的是柱层析精制法,可以为中压或常压柱。缓冲

溶液精制法工艺简单,便于操作,但所得鼠尾草酸的纯度不够高;pH控制沉淀法纯化鼠尾草酸,所得产品纯度可以达到一定要求,但工艺复杂,用时较长,且实验需要很低的温度来保证鼠尾草酸的冷冻结晶;柱层析法使用较为广泛,但是所用聚酰胺、C₁₈柱以及中压柱等实验成本较高^[13-15]。本研究考察经超声辅助乙醇提取和硅胶柱层析两步结合的方法纯化鼠尾草酸,快速、高效,提高了鼠尾草酸的纯化效率和原料、设备的利用率。

1 材料与仪器

1.1 原料、试剂与仪器

岛津高效液相色谱仪;FZ102型植物细胞粉碎机,天津泰斯特仪器有限公司;JY99-II DN型超声波细胞粉碎机,宁波新芝科技股份有限公司;SHB-III

收稿日期:2014-07-02 接受日期:2014-09-30

基金项目:引进国际先进林业科学技术项目(2011-4-01)

*通讯作者 Tel:86-25-85482534;E-mail:biliangwu@126.com.

循环水式多用真空泵, 河南省太康科教器材厂; KQ5200 型超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; UV9100 紫外可见分光光度计, 北京莱伯泰科仪器有限公司; RE-1102-VN 型旋转蒸发仪, 南京科尔仪器设备有限公司; MAGNA-IR 550 傅里叶变换红外光谱仪, 美国 Nicolet 公司; 1200LC/MSD Trap SL 液相色谱质谱联用仪, 美国 Agilent 公司; AVANCE DRX-500 型超导核磁共振波谱仪, 瑞士布鲁克公司。

鼠尾草酸(≥98.13%)标准品, 成都普瑞科技开发有限公司; 甲醇、乙腈、乙酸均为色谱纯, 南京化学试剂有限公司; 无水乙醇, 南京化学试剂有限公司; 娃哈哈纯净水, 杭州娃哈哈集团有限公司。中速定性滤纸, 杭州新华纸业有限公司。

迷迭香叶子购于河南省禹州市湫水迷迭香种植有限公司。

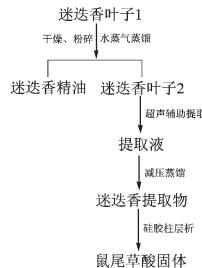


图 1 鼠尾草酸的分离纯化流程图

Fig. 1 Process flow diagram of separation and purification of carnosic acid

1.2 实验方法

1.2.1 迷迭香提取物的制备

迷迭香提取物的制备参考文献[16]。采用超声辅助提取法处理自然晾干的迷迭香叶子粉(含水率2.1%), 条件为: 加入75%乙醇、3%(w/w)酸稳定剂用量(相对于乙醇)、超声提取时间40 min、固液比1:16(g/mL)。过滤得滤液, 滤液中加入活性炭脱色, 得到迷迭香提取液。提取液经减压蒸馏、真空干燥, 得到迷迭香提取物。在研钵中研磨, 得迷迭香提取物粉末。同时对其做HPLC检测。

1.2.2 鼠尾草酸纯品的制备

称取一定量硅胶, 用石油醚分散后匀浆湿法装柱。在层析柱中装入半柱石油醚, 缓慢加入硅胶。用石油醚淋洗使填料充分沉降, 敲击层析柱使填料紧密、均匀。称取一定量的迷迭香提取物, 用少量乙酸乙酯溶解后除去不溶物, 湿法上样, 加入洗脱剂洗

脱。洗脱后的级分分段收集, 合并减压浓缩, 得鼠尾草酸纯品。同时对其做HPLC检测。

1.2.3 鼠尾草酸的鉴定

经紫外、红外、核磁、质谱验证试验所得物质为鼠尾草酸^[17]。

1.3 分析方法

1.3.1 高效液相色谱定量测定条件

高效液相色谱检测条件参考文献[16]。

1.3.2 鼠尾草酸标准曲线的绘制

鼠尾草酸在进样量为4~70 μg之间时响应的色谱峰面积和进样量呈现良好的线性关系, 其线性回归方程及相关系数为: $Y = 160464.069X + 85743.526$, 其中 $R = 0.9999$, $R^2 = 0.9998$ 。

1.3.3 鼠尾草酸含量的计算

称取一定质量的固体, 用乙醇溶解, 配成一定浓度的鼠尾草酸的乙醇溶液。进行HPLC检测, 进样20 μL, 重复三次, 将峰面积取平均值, 依(3)计算进样量; 依(4)计算固体中鼠尾草酸的质量分数。

$$X = \frac{Y - 85743.526}{160464.069} \quad (3)$$

$$w = \frac{X * V}{v * M} * 100\% \quad (4)$$

式中 X 为进样量, μg; Y 为响应的色谱峰面积; V 为 B 的体积, mL; M 为固体的质量, mg; v 为色谱检测进样量, μL; w 为固体中 CA 的质量分数, %。

2 结果与分析

2.1 硅胶柱层析条件的优化

2.1.1 展开剂的选择

依次尝试石油醚(沸程60~90 °C)、正己烷、甲苯、二氯甲烷、乙酸乙酯、丙酮、甲醇的单一组分作为薄层色谱的展开剂, 经GF₂₅₄荧光硅胶板展开, 确定鼠尾草酸的理想展开条件^[18]。因目标物质为酸, 加入适当的冰乙酸防止拖尾。由表1可以看出, 甲苯、二氯甲烷和乙酸乙酯均可以作为薄层色谱的展开剂。但是考虑到实验成本和安全性, 选择乙酸乙酯和石油醚的组合作为薄层色谱的展开剂。经过进一步实验探索, 发现乙酸乙酯: 石油醚=8:4(v/v), 加入一滴乙酸防止拖尾, 此时鼠尾草酸的 R_f 值为0.5534, 是不同比例组合中最恰当的。因此, 选择乙酸乙酯: 石油醚=8:4(v/v), 加入一滴乙酸, 作为展开剂。

表 1 使用单一展开剂时鼠尾草酸的 R_f 值Table 1 R_f value of carnosic acid using different single solvent

溶剂 Solvent	R_f 值 R_f value
石油醚 petroleum ether	未展开
正己烷 <i>n</i> -hexane	未展开
甲苯 methylbenzene	0.5642
二氯甲烷 methylene chloride	0.6832
乙酸乙酯 ethyl acetate	0.7825
丙酮 acetone	展至硅胶板顶端
甲醇 methyl alcohol	展至硅胶板顶端

2.1.2 硅胶颗粒度的选择

分别称取 80-100、100-200、200-300 目硅胶 50 g, 洗脱剂为乙酸乙酯: 石油醚(4: 13, v/v), 流速 4 mL/min, 上样量为 0.5 g, 接样量为 4 mL/管, 进行硅胶柱层析分离, 经薄层色谱鉴定收集鼠尾草酸含量较高的几个级分合并、减压浓缩, 计算回收率, 以确定合适的硅胶颗粒度。表 2 表明, 随着硅胶颗粒度的减小, 鼠尾草酸的柱层析回收率逐渐增大, 200 ~ 300 目硅胶时柱层析所得到的鼠尾草酸的回收率最高。所以选择 200 ~ 300 目硅胶作为合适的硅胶颗粒度。

表 2 不同硅胶颗粒度对鼠尾草酸回收率的影响

Table 2 Effect of different granularity of silica gel on recovery rate of carnosic acid

硅胶粒度(目) Granularity of silica gel(mesh)	鼠尾草酸回收率(%) Recovery rate of carnosic acid(%)
80-100	61.63
100-200	75.78
200-300	80.24

2.1.3 洗脱剂极性的选择

取硅胶 50 g(200 ~ 300 目), 流速 4 mL/min, 接样量为 4 mL/管, 分别将乙酸乙酯与石油醚按体积比 4: 10、4: 11、4: 12、4: 13、4: 14 配制成混合溶液作为洗脱剂, 上样量为 0.5 g, 进行硅胶柱层析分离, 经薄层色谱鉴定收集鼠尾草酸含量较高的几个级分合并、减压浓缩, 计算回收率, 确定合适的洗脱剂极性。如表 3 所示, 随着加入石油醚比例的不断加大, 鼠尾草酸的回收率呈现先增大后减小的趋势。由于石油醚比例的不断加大持续降低了洗脱剂的极性, 导致目标成分在硅胶柱上的停留时间变长, 有助于

分离效果的改善, 提高了回收率, 但并不是洗脱剂极性越小分离效果和回收率越理想, 所以选择体积比 4: 13 为合适的洗脱剂。

表 31 洗脱剂极性对鼠尾草酸回收率的影响

Table 3 Effect of different polarity of eluent on recovery rate of carnosic acid

乙酸乙酯: 石油醚 Ethyl acetate: petroleum ether(v/v)	鼠尾草酸回收率 Recovery rate of carnosic acid(%)
4: 10	60.97
4: 11	68.95
4: 12	77.87
4: 13	80.24
4: 14	78.84

2.1.4 洗脱剂流速的影响

取硅胶 50 g(200 ~ 300 目), 洗脱剂为乙酸乙酯: 石油醚(4: 13, v/v), 上样量为 0.5 g, 接样量为 4 mL/管, 流速分别为 2、4、6、8 mL/min, 进行硅胶柱层析分离, 经薄层色谱鉴定收集鼠尾草酸含量较高的几个级分合并、减压浓缩, 计算回收率, 确定合适的洗脱剂流速。表 4 表明, 随着洗脱剂流速的加快, 目标成分在硅胶柱上的停留时间变短, 影响了分离效果, 柱层析鼠尾草酸的回收率降低, 4 mL/min 时, 回收率最高, 因此洗脱剂选择此流速。

表 4 洗脱剂流速对鼠尾草酸回收率的影响

Table 4 Effect of different flow rate of eluent on recovery rate of carnosic acid

洗脱剂流速 Flow rate of eluent(mL/min)	鼠尾草酸回收率 Recovery rate of carnosic acid(%)
2	60.30
4	80.24
6	68.47
8	66.76

2.1.5 负载量的选择

取硅胶 50 g(200 ~ 300 目), 洗脱剂为乙酸乙酯: 石油醚(4: 13, v/v), 流速 4 mL/min, 上样量分别为 0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 g, 接样量为 4 mL/管, 进行硅胶柱层析分离, 经薄层色谱鉴定收集鼠尾草酸含量较高的几个级分合并、减压浓缩, 计算回收率, 确定合适的负载量。表 5 表明, 随着负载量的不断加大, 鼠尾草酸的柱层析回收率呈现先增大后减小的趋势, 可能是由于上样量不断增大, 以致硅胶柱吸附

饱和,混合物各组分在层析柱中峰形出现重叠,导致分离效果变差,鼠尾草酸回收率明显降低。因此选择0.5 g作为合适的上样量。

表5 负载量对鼠尾草酸回收率的影响

Table 5 Effect of different load on recovery rate of carnosic acid

负载量 The load(g)	鼠尾草酸回收率 Recovery rate of carnosic acid(%)
0.3	63.94
0.4	68.97
0.5	73.22
0.6	72.33
0.7	68.31

2.2 高效液相色谱测定结果

取柱层析后所得鼠尾草酸固体粉末5 mg,加入乙醇溶解,定容至10 mL容量瓶中。用1.3节所述分析方法,进样10 μ L,分析结果如下:

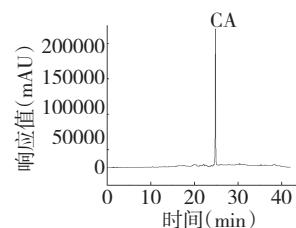


图2 鼠尾草酸的高效液相色谱(284 nm)

Fig. 2 HPLC chromatogram of carnosic acid at 284 nm

2.3 鼠尾草酸的结构鉴定

鼠尾草酸的结构式如下:

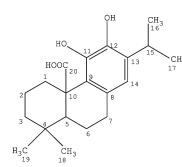


图3 鼠尾草酸的化学结构式

Fig. 3 The chemical structure of carnosic acid

为了进一步确认实验所得物质为鼠尾草酸,对所得物质进行了紫外、红外、核磁、质谱的确认。具体结果如下:

2.3.1 UV 分析

取一定量的鼠尾草酸产品用适量乙醇溶解,于190~400 nm波长范围内进行紫外光谱扫描,波长间隔为0.2 nm。结果如下图所示,在237.00和285.8 nm都有强的吸收峰。实验中液相测定条件选择284 nm是因为在此波长下,鼠尾草酚和迷迭香

酸都有强吸收。

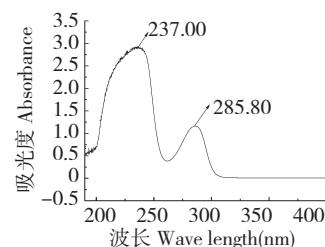


图4 鼠尾草酸的紫外光谱图

Fig. 4 UV spectrum of carnosic acid

2.3.2 IR 分析

鼠尾草酸的IR光谱图如图5所示。游离羧酸的O-H伸缩振动吸收位于 $\sim 3550\text{ cm}^{-1}$ 处,由于形成二聚体,羟基向低波数方向位移,在 3200 cm^{-1} ~ 2500 cm^{-1} 区形成宽而散的峰, 3529 cm^{-1} 为羟基特征吸收峰。羧酸在 $\sim 920\text{ cm}^{-1}$ 附近有一个比较强的峰,这是两分子缔合体O-H非平面摇摆振动吸收, 913 cm^{-1} 为羧酸的特征吸收峰。 1454 cm^{-1} , 1320 cm^{-1} , 912 cm^{-1} 为苯环的特征吸收峰, 2958 cm^{-1} 为烷基碳所特有的吸收峰。

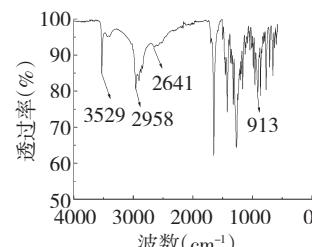


图5 鼠尾草酸的红外光谱图

Fig. 5 IR spectrum of carnosic acid

2.3.3 ^1H NMR 分析

鼠尾草酸的 ^1H NMR($500\text{ MHz}, \text{CDCl}_3$)谱如图6所示, $\delta(\text{ppm})$:0.91、1.06显示两个季碳甲基(各

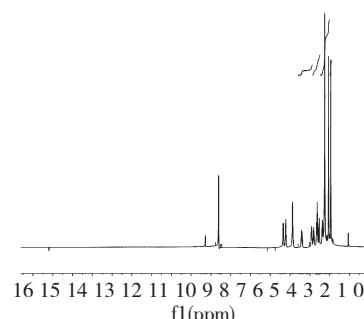


图6 鼠尾草酸的 ^1H NMR($500\text{ MHz}, \text{CDCl}_3$)

Fig. 6 ^1H NMR of carnosic acid($500\text{ MHz}, \text{CDCl}_3$)

$3\text{H},\text{s}$, δ (ppm):1.27($J=4.0\text{ Hz}$)、1.30($J=3.0\text{ Hz}$)显示两个叔碳甲基(各3 H,d), δ (ppm):1.32($J=3.5\text{ Hz}$)、1.36($J=4.0\text{ Hz}$)、1.39($J=3.5\text{ Hz}$)显示两个亚甲基(各2 H,td), δ (ppm):1.25(1 H,t, $J=5.0\text{ Hz}$,C₅-H), δ (ppm):6.57(1 H,s,C₁₄-H)。

2.3.4 ^{13}C NMR 分析

鼠尾草酸的 ^{13}C NMR(500 MHz, CDCl₃)谱如图7所示, 谱图中显示共20个碳, 其中9个季碳, 4个甲基, 5个亚甲基和2个次甲基, δ_{C} (ppm):122.1、142.3、142.1、133.8、129.1、119.4六个峰来自于芳香碳原子(C8, C9, C11, C12, C13, C14), δ_{C} (ppm):183.6来自羧酸碳原子C20。 ^{13}C NMR谱各碳原子归属表见表6。

表6 鼠尾草酸的 ^{13}C NMR数据(500 MHz, CDCl₃)

Table 6 The ^{13}C NMR data of carnosic acid

No.	δ_{C} (ppm)	No.	δ_{C} (ppm)
1	77.0	11	142.1
2	76.7	12	133.8
3	77.3	13	129.1
4	32.6	14	119.4
5	41.8	15	27.1
6	54.0	16	34.3
7	48.7	17	34.1
8	122.1	18	22.1
9	142.3	19	22.5
10	31.4	20	183.6

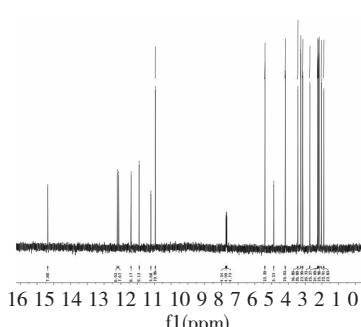


图7 鼠尾草酸的 ^{13}C NMR(500 MHz, CDCl₃)

Fig. 7 ^{13}C NMR of carnosic acid(500 MHz, CDCl₃)

2.3.5 MS 分析

图8是对实验所得物质进行的MS分析得到的结果图。其中, 液相条件即为1.3.1节高效液相定量测定条件, 质谱所选用的电离源是ESI, 能量较

低, 分子离子峰明显。由图8, 可以看到331.0的分子离子峰, 来自于鼠尾草酸电离掉一个氢原子后所得到。因此, 验证了鼠尾草酸的分子量。

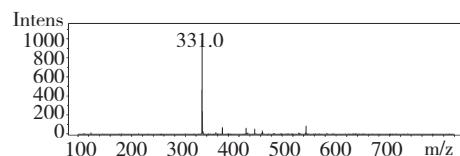


图8 鼠尾草酸的MS图

Fig. 8 MS of carnosic acid

由以上谱图及相应的分析, 可以确认迷迭香提取物经过200~300目硅胶、洗脱剂为乙酸乙酯:石油醚(4:13,v/v)、洗脱剂流速4 mL/min、负载量为0.5 g的柱层析条件所得到的物质为鼠尾草酸。

3 结论

两步法纯化鼠尾草酸时硅胶柱层析的合理条件为: 200~300目硅胶、洗脱剂为乙酸乙酯:石油醚(4:13,v/v)、洗脱剂流速4 mL/min、负载量为0.5 g。通过此种方法得到的鼠尾草酸纯度≥97%。

经紫外、红外、核磁、质谱等鉴定证实本研究所得物质为鼠尾草酸。

参考文献

- Rosemary C, Bi LW(毕良武), Zhao ZD(赵振东). Research progress of rosemary in Europe. *Bio Chem Engineering*(生物化学工程), 2006, 40:41-44.
- Xiao X(肖香), Huang MD(黄明达), Wang HX(王洪新), et al. Separation the water-soluble and oil-soluble rosemary antioxidant. *Food Res Dev*(食品研究与开发), 2007, 28: 188-191.
- Zhang HT(张海涛), Zhang WC(张文成), Zheng RJ(郑仁娟). Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of antioxidant components from rosemary leaves using response surface methodology. *Food Sci*, 2011, 32:64-67.
- Li DW(李大伟), Bi LW(毕良武), Zhao ZD(赵振东). Research progress on extraction and purification of carnosic acid. *Chem Industry Forest Prod*(林产化学与工业), 2010, 30:122-126.
- Liu XZ(刘先章), Zhao ZD(赵振东), Bi LW(毕良武), et al. Progress on research of natural rosemary antioxidant. *Chem Industry Forest Prod*(林产化学与工业), 2004, 24: 132.

(下转第55页)