

高速逆流色谱在保健食品功能成分纯化中的应用

毛立新¹, 刘 诚^{2,*}, 杨小兰¹

(1. 山西大学生命科学与技术学院, 山西 太原 030006; 2. 北京市食品研究所, 北京 100076)

摘 要 高速逆流色谱(high speed countercurrent chromatography, 简称HSCCC)是一种快速、高效、连续的液-液色谱分离技术, 在中药、生化、保健食品、天然产物化学、环境分析等领域有着广泛的应用, 本文综述了高速逆流色谱在食品功能成分分离纯化领域的应用, 并对高速逆流色谱今后的研究方向提出了一些建议。

关键词 高速逆流色谱; 液-液色谱; 功能成分

Application Review for High-speed Counter-current Chromatography for Purification of Functional Ingredients from Chinese Herb Medicines and Foodstuffs

MAO Li-xin¹, LIU Cheng^{2,*}, YANG Xiao-lan¹

(1. Institute of Life Science and Technology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China
2. Beijing Food Research Institute, Beijing 100076, China)

Abstract: High-speed counter-current chromatography (HSCCC) is a kind of liquid-liquid partition chromatography, which has the unique features of high speed, high efficiency and continuous processing capability. It has been widely used in the separation and purification of Chinese herbal medicines, natural products and healthy foods, as in biochemistry, in environmental chemistry analysis as well. In this paper, the application of high-speed counter-current chromatography for purification of functional ingredients from healthy foodstuffs has been reviewed. Some suggestions to the further use of HSCCC in the future have also

收稿日期: 2005-11-20

*通讯作者

作者简介: 毛立新(1963-), 男, 高级工程师, 博士研究生, 研究方向为食品生物技术。

- [10] 叶嗣颖, 谢昕, 黄庆华, 等. 乳链菌肽nisinZ的pH吸附法分离纯化技术研究[J]. 同济医科大学学报, 2000, 29 (2): 124-126.
- [11] 刘稳, 朱文, 马贵荣. 乳链菌肽的分离纯化和部分生物学性质[J]. 生物化学杂志, 1996, 12(5): 588-592.
- [12] COVENTRY M J, Gordon J B, Alexander M, et al. A food-grade process for isolation and partial purification of bacteriocins of lactic acid bacteria that uses diatomite calcium silicate[J]. J Applied and Environment Microbiology, 1996, 62: 1764-1769.
- [13] 还连栋, 陈秀珠, 王明华, 等. 从发酵液中提取乳链菌肽的方法: 中国, CN 00129928. X[P]. 2001-05-02.
- [14] CHEIGH C I, KOOK M C, KIM S B, et al. Simple one-step purification of nisin Z from unclarified culture broth of *Lactococcus Lactis* Subsp. *Lactis* A164 using expanded bed ion exchange chromatography[J]. Biotechnology Letters, 2004, 26: 1341-1345.
- [15] 郭本恒. Nisin的物理化学性质[J]. 农牧产品开发, 2001(2): 4-6.
- [16] 姚红娟, 王晓彬, 丁宁. 膜分离在蛋白质分离纯化中的应用[J]. 食品科学, 2003, 24(1): 167-171.
- [17] DAUDI L, TURCOTTE C, LACROIX C, et al. Production and characterization of anti-nisin monoclonal antibodies: suitability for distinguishing active from inactive forms through a competitive enzyme immunoassay[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, 56: 114-119.
- [18] 殷钢, 周蕊, 李琛, 等. 糖-蛋白质混合体系泡沫分离过程研究[J]. 化学工程, 2002, 28(6): 34-37.
- [19] 杨博, 王永华, 姚汝华. 蛋白质的泡沫分离[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(2): 76-78.
- [20] HIRSCH A. The assay of the antibiotic nisin[J]. Gen Microbiol, 1950 (4): 70-74.
- [21] HAWLEY H, HALL R. UK, 844782[P]. 1957.
- [22] SUAREZ A M, AZCONA J I, RODRIGUEZ J M, et al. One-step purification of nisin A by immunoaffinity chromatography[J]. Applied and Environment Microbiology, 1997, 63: 4990-4992.
- [23] GUENOLEE P, CARL T, LYND A L, et al. Rapid purification of nisin Z using specific monoclonal antibody-coated magnetic beads[J]. International Dairy Journal, 2000(10): 627-633.
- [24] LI Chan, BAI Jing-hua, LI Wei, et al. Optimization of condition for bacteriocin extraction in PEG/salt aqueous two-phase system using statistical experimental designs[J]. Biotechnol Prog, 2001, 17: 266-368.

been put forward.

Key words: HSCCC; liquid-liquid partition chromatography; functional ingredients

中图分类号: 0657.72

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)02-0372-03

高速逆流色谱(high speed countercurrent chromatography, 简称HSCCC)是一种液-液色谱分离技术, 它的固定相和流动相都是液体, 没有不可逆吸附, 具有样品无损失、无污染、高效、快速和大制备量分离等优点^[1-2]。由于HSCCC与传统的分离纯化方法相比具有明显的优点, 因此此项技术已被广泛应用于中药成分分离、保健食品、生物化学、生物工程、天然产物化学、有机合成、环境分析等领域^[3-5]。我国是继美国、日本之后最早开展逆流色谱应用的国家。张天佑等在国内首先自行研制了分析型和制备型的高速逆流色谱仪, 对我国中药功能成分的分离制备取得了显著成果^[6]。上海同田生化技术有限公司生产的高速逆流色谱仪, 分离中药成分纯度达到99%, 可用于HPLC检测标准样。本文对高速逆流色谱在保健食品功能成分分离纯化中的应用作一综述。

1 高速逆流色谱仪及其原理

高速逆流色谱法是在流体动力学平衡系统(HDES)中, 聚四氟乙烯管螺旋缠绕构成分离管柱, 管柱绕公转轴公转, 同时自转形成行星运动, 这样的运动导致两相溶剂剧烈混扰、反复混合和分层, 对溶质的分配分离极为有利, 其分配转移的频率高达每秒13次以上, 此技术能用很小的溶剂实现快速有效的分离^[1,6]。利用螺旋管方向性与高速行星式运动相结合, 产生的一种独特的流体动力学现象, 使相对移动的互不相溶的两相(一相为固定相, 一相由柱塞泵连续输入的为流动相)在螺旋管中实现高效的接触、混合、分配和传递, 并按照分配系数的不同依次洗脱获得分离。在逆流色谱中, 留在管中固定相的量是影响溶质峰分离度的一个重要因素, 高保留量将会大大改进峰分离度。研究表明: 螺旋管的旋转速度对两相溶剂在流体动力学平衡时的体积比影响很大。基于流体动力学平衡系统(HDES)的高速逆流色谱仪设计是一种同步行星运动系统, 其原理见图1^[6], 结构见图2。

2 高速逆流色谱分离纯化保健食品功能成分

2.1 HSCCC分离纯化银杏中的功能成分

银杏叶提取物是心脑血管疾病非常有效的药物之一^[7-8], 其功能成分主要是黄酮类物质, 银杏叶提取物制剂产品的含量批标一般规定为总黄酮24%和总内酯6%。目前, 国内外已从银杏叶分离出20多种黄酮类成分, 其中含测指标成分为异鼠李素、山奈酚和槲皮素, 通过

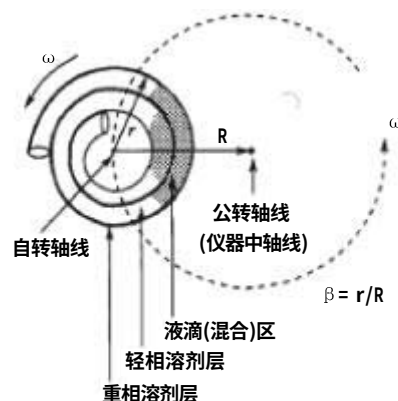
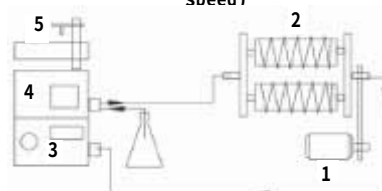


图1 高速逆流色谱仪原理图(ω = 转动度)

Fig.1 Sketch map for working principle of HSCCC(ω = angular speed)



1. 电机; 2. 分离柱; 3. 检测器; 4. 柱塞泵; 5. 部分收集器。

图2 高速逆流色谱仪结构示意图

Fig.1 Sketch map for structure of HSCCC

HPLC法测定它们的含量得以控制上述总黄酮指标。鉴于该3种黄酮醇甙元对照品是控制银杏叶提取物和制剂质量必不可少的对照品, 价格昂贵。利用高速逆流色谱(HSCCC), 从银杏叶分离异鼠李素、山奈酚和槲皮素含量可达98%以上, 达到化学对照品的要求^[9-10]。

2.2 HSCCC分离纯化芦荟中功能成分

芦荟为一种国际公认的保健食品原料, 在饮料及食品等工业中, 它得到了广泛应用, 其化学有效成分主要是芦荟甙, 以及一些少量的芦荟大黄素、异芦荟甙, β -芦荟甙等蒽醌类活性成分^[11-12]。

芦荟色酮是在芦荟叶中特有的一类具有抗炎和抑制酪氨酸酶等作用的活性物质, 以芦荟全叶为原料, 经过一系列的预处理手段, 从脱色剂活性炭中获得芦荟色酮粗提物, 再经过溶剂分配和富集后采用高速逆流色谱(HSCCC)对其中的色酮成分进行分离纯化, 研究结果表明, 采用氯仿-甲醇-水(体积比为4:3:2)混合溶液和二氯甲烷-甲醇-水(体积比为5:4:2)混合溶液作为溶剂分离系统, 经过两步HSCCC可以分离纯化出色谱纯度在95%以上的芦荟色酮的单体, 经过紫外检测、快原子轰击质谱及核磁共振等方法的结构分析鉴定, 证实分离所得

物质为肉桂酰基-G-葡萄糖甙芦荟色酮^[11]。

2.3 HSCCC 分离纯化红曲中的功能成分

红曲色素是一种用微生物方法生产的天然食用色素,它是由红曲菌属真菌发酵稻米所得的代谢产物,目前已知结构的红曲色素可以分为三类^[13]。a.红色素类,包括潘红(rubropunctatin,又名红斑素), $C_{21}H_{22}O_5$,分子量354.40;梦那玉红(monascorubrin,又名红曲红素), $C_{23}H_{26}O_5$,分子量382.46; b.紫红色素类,包括潘红胺(rubropunctamine), $C_{21}H_{23}NO_4$,分子量339.39;梦那玉红胺(monascorubramine), $C_{23}H_{27}NO_4$,分子量367.44; c.黄色素类,包括安卡黄素(ankaflavin), $C_{23}H_{30}O_5$,分子量386.49;梦那红(monascin), $C_{21}H_{26}O_5$,分子量358.43。这些色素都是酮类的有机物,结构与溶解性非常相似,易溶于醇类有机溶剂与偏碱性水溶液,由于潘红和梦那玉红在红曲色素中的含量较高,因而目前有关红曲色素的应用,主要是利用这两种色素,作为红色的着色剂,采用高速逆流色谱的方法,可将紫红色素与黄色素从红曲色素的提取产物中分离出来^[14]。

2.4 HSCCC 分离纯化甘草中的功能成分

甘草为中医最常用的药物之一,甘草具有补脾益气,清热解毒,祛痰止咳,缓急止痛,调和诸药等功能。胀果甘草(*Glycyrrhiza inflata* Bat)是我国药典收录的三种药食两用甘草品种之一^[15],主产于我国西北部。药理实验表明,它所包含的化学成分,如甘草素、光甘草酮等,具有较强的抗氧化活性。香豆素是邻羟桂皮酸的酯,具有抗菌、抗病毒、抗氧化、抗凝血等药理活性,是胀果甘草的活性成分^[16]。采用正己烷-氯仿-甲醇-水(5:6:3:2)溶剂系统分离甘草黄酮,以轻相为固定相,重相为流动相,获得了纯度98%以上的胀果香豆素胀果甲^[17]。

2.5 HSCCC 分离纯化山茱萸中的功能成分

山茱萸为山茱萸科植物山茱萸(*Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.)的干燥成熟果肉,味酸涩、微温有补益肝肾,涩精固脱的功效,是中医临床常用的名贵中药材^[18],其活性成分为没食子酸。应用高速逆流色谱分离山茱萸的正丁醇萃取相,例如,进样量为1g,分离后得到六个部分,经高压液相色谱检测证明没食子酸是柱内推出的第五部分,纯度在70%以上,分离时间不到8.5h^[19]。

3 结 语

综上所述,高速逆流色谱对保健食品功能成分分离纯化具有广阔的应用前景。在高速逆流色谱法的应用中,关键的问题是溶剂系统的选择,不同的溶剂系统具有不同的上、下相之比,由于粘度、极性、密度

等性质的差异,均会对相同的成分产生不同的溶解、分配能力,形成分配系数的差异,对分离效果产生一定的影响。因此深入研究各种活性成分分离纯化溶剂系统配比是高速逆流色谱研究领域的重点。此外,目前高速逆流色谱仪主要停留在分析和小规模制备上,因此开发生产型大规模高速逆流色谱设备,将对我国保健品功能成分分离纯化以及产品升级换代起到不可替代的作用。

参考文献:

- [1] ITO Y, BOWNAN R L. Countercurrent chromatography: liquid-liquid partition chromatography without solid support[J]. Science, 1970, 167: 281-283.
- [2] 张天佑. 逆流色谱技术[M]. 北京: 北京科学技术出版社, 1991.
- [3] MANDAVATHI N B, ITO Y. Countercurrent chromatography: theory and practice[M]. Marcel Dekker, New York, 1988.
- [4] ALBERTSON P A. Partition of cell particles and macromolecules[M]. Wiley, New York, 1986.
- [5] WU Y T, PEREIRA M, VENANCIO A, et al. Separation of endopolygalacturonase using aqueous two-phase partitioning[J]. J Chromatogr A, 2001, 929: 23.
- [6] GUEGUEN G, GAIGE B, GREVY J M, et al. Structure-activity analysis of the effects of lysophosphatidic acid on platelet aggregation[J]. Biochemistry, 1999, 38(26): 8440-8450.
- [7] 徐任生, 叶阳, 赵维民. 天然产物化学[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 2004: 21.
- [8] 史洁, 朵振顺. 溶血磷脂酸与缺血性脑血管病[J]. 国外医学: 脑血管疾病分册, 2004, 12(3): 227-230.
- [9] 潘霞, 曹学丽, 董银卯, 等. 芦荟色酮的高速逆流色谱分离制备方法研究[J]. 色谱, 2005, 23(1): 96-99.
- [10] 蔡定国, 缪平, 顾明娟. 高速逆流色谱法从银杏叶分离异鼠李素、山奈酚和槲皮素对照品[J]. 中药新药与临床药理, 1999, 10(1): 44.
- [11] 余佳红, 柳正良, 蔡定国. 高速逆流色谱分离制备白果内酯[J]. 中国新药杂志, 2000, 9(6): 392-394.
- [12] 袁黎明, 堪学先, 刘国祥, 等. 高速逆流色谱对芦荟有效成分的制备性分离研究[J]. 分析化学, 2003(2): 25.
- [13] 陈存社, 刘玉峰, 周志兰. 高速逆流色谱分离纯化芦荟中的活性物质[J]. 色谱, 2003, 21(4): 435.
- [14] BLANCE P J, LORET M O, et al. Pigments of Monascus[J]. Journal of Food Science, 1994, 59(4): 862-865.
- [15] 夏明, 杜琪珍. 高速逆流色谱提取分离红曲色素的研究[J]. 广州食品工业科技, 2002(4): 5-6.
- [16] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典: 第一部[M]. 2005版. 北京: 化学工业出版社, 2005: 59.
- [17] 王彩兰, 韩永生, 王艳, 等. 甘草的调和诸药及解毒作用初探[J]. 微量元素与健康研究, 1996, 13(3): 31.
- [18] 王巧娥, 王小如, 曹建敏. 高速逆流色谱法分离纯化甘草查尔酮甲和胀果香豆素甲[J]. 现代中药研究与实践, 2004, 18(增刊): 53-55.
- [19] 赵世萍, 付桂香. 山茱萸化学成分和药理作用的研究进展[J]. 中草药, 1997, 3(28): 187.
- [20] 田桂莲, 张天佑, 杨福全. 应用高速逆流色谱(HSCCC)分离纯化山茱萸中的没食子酸[J]. 天然产物研究与开发, 2000, 12(6): 52-55.

作者: 毛立新, 刘诚, 杨小兰, MAO Li-xin, LIU Cheng, YANG Xiao-lan
作者单位: 毛立新, 杨小兰, MAO Li-xin, YANG Xiao-lan(山西大学生命科学与技术学院, 山西, 太原, 030006), 刘诚, LIU Cheng(北京市食品研究所, 北京, 100076)
刊名: 食品科学 
英文刊名: FOOD SCIENCE
年, 卷(期): 2007, 28(2)
被引用次数: 2次

参考文献(20条)

1. 蔡定国; 缪平; 顾明娟 高速逆流色谱法从银杏叶分离异鼠李素、山奈酚和槲皮素对照品[期刊论文]-中药新药与临床药理 1999(01)
2. 张天佑 逆流色谱技术 1991
3. ITO Y; BOWNAN R L Countercurrent chromatography: liquid-liquid partition chromatography without solid support[外文期刊] 1970
4. 潘霞; 曹学丽; 董银卯 芦荟色酮的高速逆流色谱分离制备方法研究[期刊论文]-色谱 2005(01)
5. 史洁; 宋振顺 溶血磷脂酸与缺血性脑血管病[期刊论文]-国外医学(脑血管疾病分册) 2004(03)
6. 徐任生; 叶阳; 赵维民 天然产物化学 2004
7. GUEGUEN G; GAIGE B; GREVY J M Structure-activity analysis of the effects of lysophosphatidic acid on platelet aggregation[外文期刊] 1999(26)
8. WU Y T; PEREIRA M; VENANCIO A Separation of endopolygalacturonase using aqueous two-phase partitioning[外文期刊] 2001
9. ALBERTSON P A Partition of cell particles and macromolecules 1986
10. MANDAVAWITH N B; ITO Y Countercurrent chromatography: theory and practice 1988
11. 田桂莲; 张天佑; 杨福全 应用高速逆流色谱(HSCCC)分离纯化山茱萸中的没食子酸[期刊论文]-天然产物研究与开发 2000(06)
12. 赵世萍; 付桂香 山茱萸化学成分和药理作用的研究进展 1997(03)
13. 王巧娥; 王小如; 曹建敏 高速逆流色谱法分离纯化甘草查尔酮甲和胀果香豆素甲[期刊论文]-现代中药研究与实践 2004(zk)
14. 王彩兰; 韩永生; 王艳 甘草的调和诸药及解毒作用初探 1996(03)
15. 国家药典委员会 中华人民共和国药典(一部) 2005
16. 夏明; 杜琪珍 高速逆流色谱提取分离红曲色素的研究[期刊论文]-广州食品工业科技 2002(04)
17. BLANCE P J; LORET M O Pigments of Monascus 1994(04)
18. 陈存社; 刘玉峰; 周志兰 高速逆流色谱分离纯化芦荟中的活性物质[期刊论文]-色谱 2003(04)
19. 袁黎明; 堪学先; 刘国祥 高速逆流色谱对芦荟有效成分的制备性分离研究[期刊论文]-分析化学 2003(02)
20. 余佳红; 柳正良; 蔡定国 高速逆流色谱分离制备白果内酯[期刊论文]-中国新药杂志 2000(06)

引证文献(2条)

1. 辛莉, 施江, 刘素云, 郭永新, 郁飞燕 高速逆流色谱及其在天然产物分离中的研究进展[期刊论文]-食品工业科技 2009(11)
2. 孙磊, 李杰梅, 王冬梅, 朱龙平, 陈建萍, 何峰, 杨得坡 应用QuikPrep HSCCC系统实现共轭亚油酸及其异构体的分离[期刊论文]-分析试验室 2008(z1)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_spkx200702095.aspx