

李沁,夏菁,施蕊,等. 辣木叶低极性组分的分离纯化和 GC-MS 分析[J]. 江苏农业科学,2020,48(20):229-233.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.20.044

辣木叶低极性组分的分离纯化和 GC-MS 分析

李沁¹,夏菁²,施蕊²,张静美³,赵一鹤¹

(1. 云南省林业和草原科学院/国家林业局经济林产品质量检验检测中心(昆明),云南昆明 650021;

2. 西南林业大学轻工与食品学院,云南昆明 650024; 3. 云南林业职业技术学院,云南昆明 650021)

摘要:为分析和鉴定辣木叶低极性成分的组成,采用硅胶层析柱、薄层色谱分析法以及重结晶等方法对辣木叶石油醚提取物进行分离纯化,再运用气质联用技术分析分离得到的结晶,质谱数据经数据库检索鉴定确定成分,并应用面积归一化法计算各成分的相对含量。结果表明,从辣木叶石油醚提取物中共分离纯化得到 3 个结晶,GC-MS 分析鉴定后得出 3 个物质,分别是棕榈酸甲酯、硬脂酸甲酯、 β -谷甾醇,这 3 种物质都具有较好的生物活性且在工业上得到广泛利用。结果可为今后辣木叶功能成分的研究和开发利用提供参考依据。

关键词:辣木叶;低极性成分;分离纯化;GC-MS 分析;棕榈酸甲酯;硬脂酸甲酯; β -谷甾醇

中图分类号:S184 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)20-0229-05

辣木(*Moringa oleifera* Lam.) 别称鼓槌树,为辣木科辣木属多年生乔木,该科仅有 1 个属 14 个种^[1]。目前所有品种中生长快、分布广且利用和研究最多的是辣木。早在古罗马时期就有种植和利

用辣木的记载,因辣木具有极强的环境适应能力,现已在亚洲、非洲和中美洲的 30 多个热带、亚热带国家和地区广泛种植^[2]。2012 年 11 月,我国卫生部已将辣木叶纳入新资源食品名录,2014 年 7 月,习近平总书记将辣木种子作为国礼赠送给古巴革命领导人菲德尔·卡斯特罗,这让更多的国人知道并开始了解这一神奇的植物。云南省是我国最早开展辣木引种种植及科学研究的地区,目前全国辣木种植面积约 4 000 hm²,其中云南省约 2 800 hm²,占全国种植面积的 70%,广西、福建、广东、重庆、湖南、海南等地也有种植^[3]。现代社会生活节奏加快,工作压力加大,随着人们健康意识的不断增强,

收稿日期:2019-11-13

基金项目:云南省应用基础研究计划青年项目(编号:2016FD098);

云南省创新人才培养对象(编号:2016HB005);云南省“云岭产业技术领军人才”项目[编号:云发改人事(2018)212 号]。

作者简介:李沁(1988—),女,云南玉溪人,硕士,助理研究员,主要从事植物化学及功能成分研究。E-mail:575742566@qq.com。

通信作者:赵一鹤,博士,研究员,主要从事特色经济林资源培育与开发利用研究。E-mail:kjzc123@163.com。

[6]何水平,郭春芳,孙云. 茶叶有机酸的研究进展[J]. 亚热带农业研究,2015,11(1):63-67.

[7]谭和平,叶善蓉,陈丽,等. 茶叶中有机酸的测试方法概述[J]. 中国测试技术,2008,34(6):77-80.

[8]刘盼盼,钟小玉,许勇泉,等. 茶叶中有机酸及其浸出特性研究[J]. 茶叶科学,2013,33(5):405-410.

[9]章剑扬,刘新,车金水,等. 快速溶剂萃取-离子色谱法测定茶叶中的有机酸[J]. 化学分析计量,2012,21(1):43-45.

[10]张静,蒋华军,刘仲华,等. 亲水性 C₁₈ 硅胶反相色谱柱同时分离测定红茶中的有机酸[J]. 食品安全质量检测学报,2014,5(8):2476-2481.

[11]袁玲,黄建安,龚志华,等. 茯砖茶有机酸反相高效液相色谱分析方法建立及其应用[J]. 中国农学通报,2011,27(30):246-252.

[12]丁玲,屠幼英,陈晓敏. 高效液相色谱测定紧压茶中有机酸条件研究[J]. 茶叶,2005,31(4):224-227.

[13]陆敏,张绍岩,于宏伟,等. 绿茶毛尖中有机酸的高效液相色谱分析[J]. 广东农业科学,2012,39(2):86-87.

[14]Marat T,张钊,屈艳勤,等. 白茶加工过程中有机酸组分含量分析[J]. 福建茶叶,2019(3):11-12.

[15]谢娇枝,罗敏燕,刘易凡,等. 陈年祁门红茶品质分析[J]. 湖南农业科学,2012(11):100-102,105.

[16]谢娇枝. 黑毛茶存放过程中品质化学研究[D]. 长沙:湖南农业大学,2013.

[17]谢旻皓,王晴川,徐冬兰,等. 苦丁茶冬青苦丁茶提取物与 3,5-双咖啡酰奎尼酸对肠道微生物体外发酵的影响[J]. 食品科学,2015,36(17):124-129.

[18]屠幼英,梁慧玲,陈暄,等. 紧压茶儿茶素和有机酸的组成成分分析[J]. 茶叶,2002,28(1):22-24.

[19]湛滢,李适,刘仲华,等. 黑茶陈化机制研究进展[J]. 湖南农业科学,2016(12):118-122.

[20]赵和涛. 红茶加工中有机酸代谢及对茶叶香气形成的影响[J]. 茶叶通讯,1993(1):25-27.

[21]刘霞林. 茶叶陈化机理及保鲜技术研究进展[J]. 茶叶通讯,1998(4):24-26.

辣木以其近乎完美的营养及功效逐渐走入人们的视野。近年来的研究发现,辣木除了富含蛋白质、膳食纤维、多种维生素和矿物质外^[4],还含有多种活性成分如胡萝卜素、酚类、黄酮类植物甾醇、苷类、多糖、生物碱、有机酸、细胞分裂素等^[5],具有抗动脉粥样硬化、增强免疫调节能力、抗肿瘤、抗氧化、抑菌、抗炎、抗病毒、降血糖、降血脂等作用^[6-8]。但目前对辣木叶活性物质的研究主要集中在粗提物上^[9-11],对于粗提物的进一步分离纯化以及单体化合物结构分析的探讨还比较少。本研究采用有机溶液萃取法、薄层色谱分析法、结晶法、GC-MS 法对辣木叶低极性组分进行分离和鉴定,旨在为更好地了解辣木生物活性物质和成分以及辣木叶进一步的开发利用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 辣木叶 辣木叶样品于 2018 年 7 月采自云南省大理州宾川县,将其阴干,备用。

1.1.2 试验仪器 主要仪器包括旋转蒸发仪、循环水式多用真空泵、电炉、电子天平、气相色谱-质谱联用仪(HP6890GC/5973MS)、薄层色谱展开缸、硅胶柱、硅胶板、移液管、移液枪、铁夹子、胶头滴管、试管、毛细管、洗耳球、玻璃棒、镊子。

1.1.3 试验试剂 石油醚、乙酸乙酯、二氯甲烷、甲醇、乙醇、丙酮、1% 硫酸-甲醇、氯仿、柱层析硅胶、正己烷。

1.2 辣木叶石油醚层的化学成分

1.2.1 辣木叶石油醚层的制备 称取辣木叶 10 kg,用 75% 乙醇冷浸 3 次,每次 48 h,合并 3 次滤液,55 ℃ 下旋蒸浓缩,再用等体积石油醚萃取,重复 3 次,合并并在 35 ℃ 下旋蒸浓缩,得到辣木叶石油醚层浸膏 218.5 g。

1.2.2 单体化合物的分离纯化 依次用石油醚:乙酸乙酯=100:1、石油醚:乙酸乙酯=100:3、石油醚:乙酸乙酯=20:1、石油醚:乙酸乙酯=100:7、石油醚:乙酸乙酯=10:1、石油醚:乙酸乙酯=8:1、石油醚:乙酸乙酯=5:1、石油醚:乙酸乙酯=3:1、石油醚:乙酸乙酯=2:1、石油醚:乙酸乙酯=1:1、100% 乙酸乙酯(以上均为体积比)对所得的辣木叶石油醚层通过硅胶柱进行梯度洗脱,用薄层色谱法(TLC)检测洗脱液成分,将不同比移植(R_f)分开,待洗脱液挥干,结晶。

1.2.3 甲酯化 石油醚提取物含大量脂肪酸类物质,如果直接进行 GC-MS 分析,通常柱温偏高,容易出现色谱峰拖尾和假峰现象,故需先进行甲酯化处理。称取辣木叶石油醚层各单体化合物 0.05 g 加入 1% 硫酸-甲醇 2 mL 置于 70 ℃ 水浴加热 30 min,加入 1 mL 正己烷,再加入几滴蒸馏水萃取,取上清液,重复以上步骤再萃取 1 次,合并上清液,放入小瓶中待测。

1.2.4 辣木叶石油醚层成分的鉴定 此次成分鉴定主要在云南省林业和草原科学院进行,使用的气相色谱-质谱联用仪购自美国安捷伦公司,型号为 HP6890GC/5973MS。GC(气相色谱)条件为 HP-5MS 石英毛细管柱(30.00 mm × 0.25 mm × 0.25 μm);柱温起始温度 80 ℃,程序升温 3 ℃/min 升至 280 ℃,保持 30 min;柱流量为 1.0 mL/min;进样口温度 250 ℃;柱前压 100 kPa;进样量 0.4 L;分流比 30:1;载气为高纯氦气。质谱(MS)的条件:电离方式 EI;电子能量 70;传输线温度 250 ℃;离子源温度 230 ℃;四极杆温度 150 ℃;质量范围 35~500。质谱数据采用 Wiley7n.1 标准谱库进行检索定性和分析。

2 结果与分析

2.1 辣木叶低极性组分的分离纯化

通过将试验分离得到的辣木叶石油醚层提取物进行硅胶柱洗脱后,收集到 570 个流分洗脱液;根据薄层色谱(TLC)检测后合并为 12 个流分洗脱液,其中有 3 个结晶,硅胶柱洗脱结果见表 1。

2.2 辣木叶低极性组分的分析鉴定

选取洗脱得到的辣木叶石油醚层的 3 个结晶,131 号、148 号和 252 号点分别进行 GC-MS 分析,得到离子流图。经过人工解析及计算机质谱数据库检索比对,并结合相关文献,用面积归一化法确定各组分相对含量分别对色谱峰加以确认。3 个结晶点的 GC-MS 离子流图和化合物百分含量表见图 1 和表 2。

从图 1 和表 2 可以看出,结晶点 1(131 号化合物)通过 GC-MS 分离鉴定出 4 个主要化合物,其中主要化学成分为棕榈酸甲酯,占总峰面积的 94.90%。还有另外 4 个色谱峰由于匹配度不高且峰面积的积分值较小,未得出鉴定结果。

从图 2 和表 3 可以看出,结晶点 2(143 号化合物)通过 GC-MS 分离鉴定出 4 个主要化合物,其

表 1 硅胶柱洗脱数据

编号	展开剂体积比 (石油醚：乙酸乙酯)	TLC 薄层板现象	有无结晶
1 ~ 109	100 : 1	5 号显色	脂肪酸类物质
110 ~ 140	100 : 3	131 号显色, 由 131 号重结晶, 分离出 3 瓶不同点物质	有结晶 1
141 ~ 180	25 : 1	148 显色	有结晶 2
181 ~ 218	20 : 1	181 ~ 218 合并, TLC 展开有明显拖尾, 点较多	有橙黄色油状物质
219 ~ 229	100 : 7	219 ~ 229 合并, TLC 展开有明显主点, 存在拖尾现象	有淡黄色油状物质
230 ~ 244	10 : 1	230 ~ 244 合并, TLC 展开有明显主点, 存在拖尾现象	有褐色油状物质
245 ~ 255	8 : 1	252 号 TLC 展开有单点	有结晶 3
256 ~ 305	5 : 1	256 ~ 305 合并, TLC 展开有明显拖尾, 点较多	无结晶, 橙色物质
306 ~ 385	3 : 1	306 ~ 385 合并, 没有明显的主点, 有拖尾现象	无结晶, 褐色物质
386 ~ 435	2 : 1	386 ~ 435 合并, TLC 展开为一条直线, 有 1 个明显的主点	无结晶, 墨黑色物质
436 ~ 492	1 : 1	436 ~ 492 合并, TLC 展开为一条直线, 没有明显的主点	无结晶, 墨黑色物质
493 ~ 570	纯乙酸乙酯	493 ~ 570 合并, TLC 展开为一条直线, 没有明显的主点	无结晶, 墨黑色物质

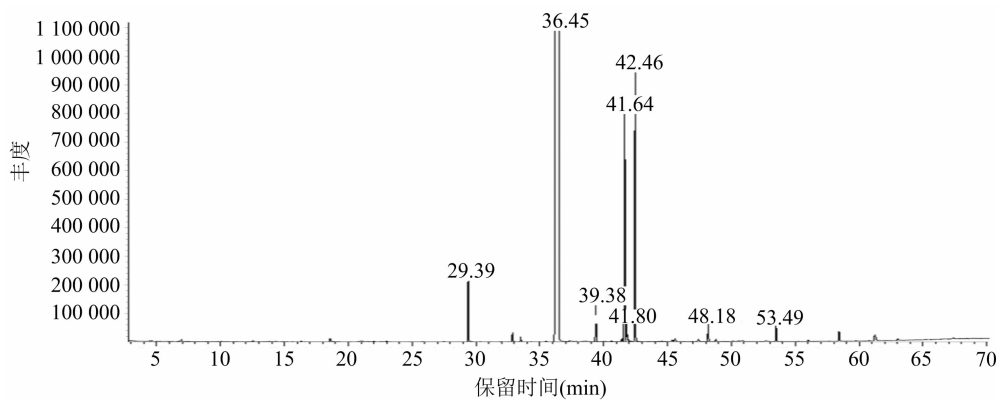


图1 结晶 1 的离子流图

表 2 131 号化合物保留时间及含量百分比

序号	保留时间 (min)	化合物	百分含量 (%)
1	29.39	十四烷酸甲酯(肉豆蔻酸甲酯)	1.19
2	36.45	十六烷酸甲酯(棕榈酸甲酯)	94.90
3	39.38	十七烷酸甲酯	0.78
4	48.18	十九烷酸甲酯	0.04

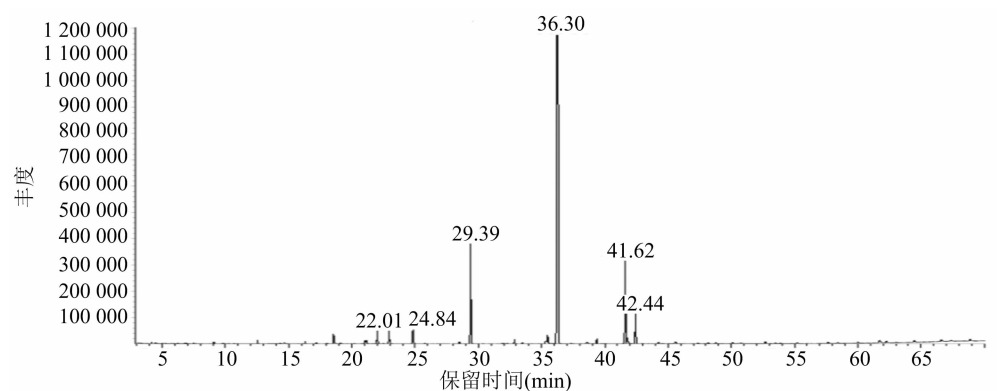


图2 结晶 2 的离子流图

表 3 143 号化合物保留时间及含量百分比

序号	保留时间 (min)	化合物	百分含量 (%)
1	24.84	十二醛二甲缩醛	0.10
2	29.39	十四烷酸甲酯	0.80
3	36.30	十六烷酸甲酯	1.31
4	42.44	十八烷酸甲酯(硬脂酸甲酯)	92.38

中主要化学成分为硬脂酸甲酯, 占总峰面积的 92.38%。还有另外 2 个色谱峰由于匹配度不高且峰面积的积分值较小, 未得出鉴定结果。

从图 3 和表 4 可以看出, 结晶点 3(249 号化合物) 通过 GC-MS 分离鉴定出 4 个主要化合物, 其中主要化学成分为 β -谷甾醇, 占总峰面积的 96.24%。

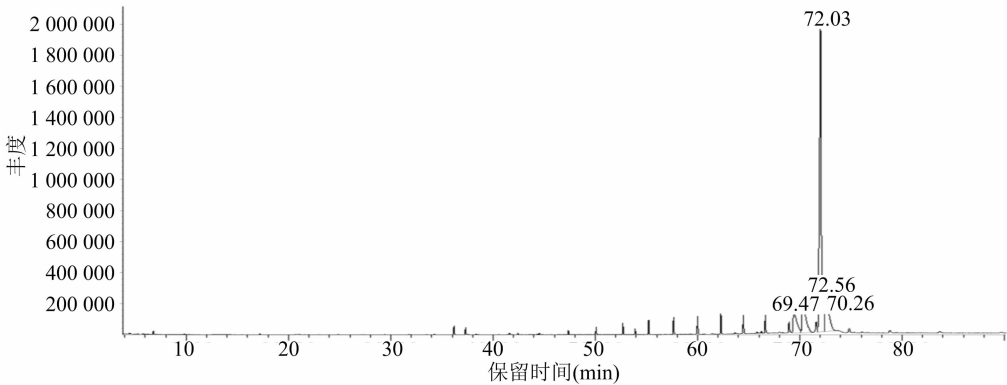


图3 结晶 3 的离子流图

表 4 结晶 3 的保留时间及含量百分比

序号	保留时间 (min)	化合物	百分含量 (%)
1	69.47	菜油甾醇	1.04
2	70.26	豆甾-5,22-二烯-3-醇	0.98
3	72.03	β -谷甾醇	96.24
4	72.56	FUCOSTEROL	12.37

GC-MS 分析结果表明, 从辣木叶石油醚提取物纯化结晶中共分离得到 3 个化合物, 分别是棕榈酸甲酯(化合物 1)、硬脂酸甲酯(化合物 2)、 β -谷甾醇(化合物 3), 它们的结构如图 4 至图 6 所示。

3 讨论与结论

本研究通过对辣木叶石油醚提取物进行分离

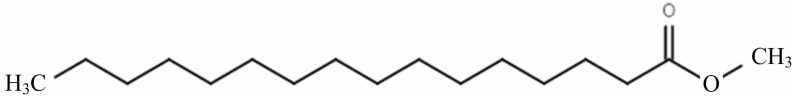


图4 棕榈酸甲酯结构

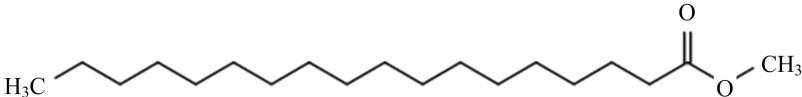
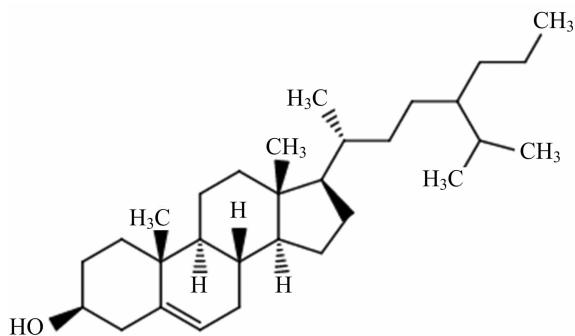


图5 硬脂酸甲酯结构

纯化, 并利用 GC-MS 分析鉴定结晶化学成分, 得到 3 个主要的辣木叶低极性组分, 包括棕榈酸甲酯、硬脂酸甲酯和 β -谷甾醇。目前针对辣木叶挥发性成分的研究主要集中于比较挥发性成分种类及数量的差异^[12-14], 但由于样品状态、品种、挥发物质提取方法等不同, 所鉴定出的化合物也存在较大的差异。另外, 以上这些研究均直接采用粗提物进行 GC-MS 分析, 再进行成分鉴定, 所关注的都是辣木

叶中挥发性成分的丰富度, 鉴定出的物质很大一部分都是相对含量较低的, 对于研究辣木生物活性来说意义不大。本研究聚焦的是辣木叶低极性组分, 且先将石油醚提取物进行分离纯化, 得到结晶物质, 再进行 GC-MS 分析和鉴定, 这样在很大程度上避免了含量较低物质对质谱分析的影响, 所得到的都是辣木叶挥发性成分中含量较高的物质, 为后续生物活性的分析研究提高了指向性。其中棕榈

图6 β -谷甾醇结构

酸甲酯在蔡彩虹等的研究结果^[13,15]中也显示有较高含量, β -谷甾醇的结果与袁明焱等的研究结果^[12]相似。而硬脂酸甲酯仅在蔡彩虹等的研究结果^[13]中发现,且含量较低,可能与提取方法和未进行纯化有关。

活性成分提取时所采用的试剂与方法对结果的影响较大,用石油醚进行浸提,提取物含各类低极性成分,其化学成分种类以脂肪酸、烷烃和甾醇为主^[16-17]。本试验中分离得到的棕榈酸甲酯、硬脂酸甲酯属脂肪酸类物质, β -谷甾醇则属于植物甾醇类物质。棕榈酸别称软脂酸,是一种饱和高级脂肪酸,可用作沉淀剂、化学试剂及防水剂,棕榈酸与甲醇在催化条件下会生成棕榈酸甲酯,棕榈酸甲酯是表面活性剂及其他精细化工产品的原料,是制造乳化剂、湿润剂、稳定剂、防锈剂和增塑剂剂的优良中间体^[18]。另外据报道,棕榈酸甲酯还具有治疗胃肠功能失调的作用^[19]。 β -谷甾醇是植物甾醇类成分之一,属于四环三帖类化合物,研究显示, β -谷甾醇的摄入量与人群许多慢性病的发生率有关^[20],还有研究表明, β -谷甾醇具有促进血中胆甾醇降解代谢的作用,可有效防止冠心病粥样硬化^[21]。本研究分离鉴定出的这3种物质都具有一定的生物活性,且在工业上被广泛利用,本研究结果能为今后辣木叶的开发利用提供参考依据。

参考文献:

[1] Ramachandran C, Peter K V, Gopalakrishnan P K. Drumstick (*Moringa oleifera*): a multipurpose Indian vegetable[J]. Economic Botany, 1980, 34(3): 276-283.

[2] 刘昌芬,李国华. 辣木的研究现状及其开发前景[J]. 云南热作科技, 2002, 25(3): 20-24.

[3] 矫健,陈伟忠,穆钰,等. 国内外辣木产业发展现状及思考[J]. 世界农业, 2015(5): 126-128.

[4] Maldini M, Maksoud S A, Natella F, et al. *Moringa oleifera*: study of phenolics and glucosinolates by mass spectrometry[J]. J Mass Spec, 2014, 49(9): 900-910.

[5] 孔令钰,贺艳培,陶遵威,等. 辣木生物活性的研究进展[J]. 天津药学, 2015(2): 57-59.

[6] Vongsak B, Sithisarn P, Mangmool S, et al. Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method[J]. Industrial Crops and Products, 2013, 44: 566-571.

[7] Coppin J P, Xu Y P, Hong C, et al. Determination of flavonoids by LC/MS and anti-inflammatory activity in *Moringa oleifera*[J]. Journal of Functional Foods, 2013, 5(4): 1892-1899.

[8] Juliani H R, Wu Q L. Variations in polyphenols and lipid soluble vitamins in *Moringa oleifera*[M]. Pittsburgh: Academic Press, 2015: 72-79.

[9] 李倩,夏杏洲,周伟,等. 辣木叶提取液在发酵过程营养成分及其抗氧化活性的变化[J]. 食品工业科技, 2019, 40(1): 110-115.

[10] 郭妍. 辣木叶植物化学物质分析及体外生物活性研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2018.

[11] 赵谋明,李巧琳,林彦竹,等. 辣木叶提取物的制备及抗氧化活性[J]. 食品科学, 2018, 39(21): 25-30.

[12] 袁明焱,刘守金,杨柳,等. 辣木叶挥发性成分的GC-MS研究[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(8): 174-176, 187.

[13] 蔡彩虹,梅文莉,董文化,等. 辣木叶挥发性成分GC-MS的分析及生物活性[J]. 热带生物学报, 2016, 7(3): 381-386.

[14] 梁文娟. 云南产辣木叶挥发油化学成分 GC-MS 分析[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(4): 174-178.

[15] 陈荣荣,张献忠,王根女,等. HD/GC-MS 法测定辣木树不同部位挥发性香气成分的研究[J]. 粮食与食品工业, 2014, 21(4): 58-61.

[16] 罗禹,张添植,辜晓英,等. 泸州和安岳枳壳中的低极性化学成分[J]. 应用与环境生物学报, 2019, 25(2): 432-437.

[17] 薛焕焕,张海生,赵鑫帅,等. 不同提取方法对大扁杏仁油品质的影响[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(2): 439-446.

[18] 刘群,丁斌,郝凤岭,等. 棕榈酸甲酯的合成及其动力学研究[J]. 粮食与油脂, 2015, 28(7): 26-29.

[19] 兰茂. 滇南本草[M]. 昆明: 云南科学技术出版社, 2004: 675-676.

[20] 魏金婷,刘文奇. 植物药活性成分 β -谷甾醇研究概况[J]. 莆田学院学报, 2007, 14(2): 38-40, 46.

[21] 刘滨城,任远宏. 植物甾醇酯对高脂血症小鼠的降血脂作用研究[J]. 食品科学, 2011, 32(17): 326-329.