

色谱法监测 β -D-吡喃葡萄糖苷的合成

解万翠¹, 杨锡洪¹, 夏咏梅², 陈超平³, 汤坚²

(1. 水产品深加工广东省普通高校重点实验室, 广东海洋大学食品科技学院, 广东湛江 524088)

(2. 江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏无锡 214036)

(3. 浙江海洋学院食品与药学学院, 浙江舟山 316000)

摘要: 用改进的 Koenigs-knorr 法立体选择性地合成了 2,3,4,6-四乙酰基-香叶基-1-O- β -D-吡喃葡萄糖苷(GLY-A)和香叶基- β -D-吡喃葡萄糖苷(GLY-B)两种键合态香料前体。采用薄层色谱法(TLC)监控反应条件; 硅胶柱层析色谱法(SGCC)分离并纯化产物; 反向液相色谱法(RP-HPLC)测定样品纯度, 得到 GLY-A、GLY-B 的纯度分别为 98.2%、96.0%。色谱技术分别从反应进程的监控、产物的分离纯化、目标产物的纯度检测三个方面, 综合应用于糖苷的立体选择性合成中, 得到较好的实验结果。

关键词: β -D-吡喃葡萄糖苷; 香料前体; 合成; 色谱

文章编号: 1673-9078(2011)1-106-108

Chromatography Technology for Monitoring the Synthesis of β -D-Glucopyranosides

XIE Wan-cui¹, YANG Xi-hong¹, XIA Yong-mei², CHEN Chao-ping³, TANG Jian²

(1. The School of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

(2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

(3. School of Food and Pharmacy and Medical, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316000, China)

Abstract: Two glycosidically bond flavor precursors 2,3,4,6-tetraacetyl-geranyl-1-O- β -D-glucopyranoside (GLY-A) and geranyl- β -D-glucopyranoside (GLY-B) were stereo-synthesized by the modified Koenigs-Knorr reaction. Thin layer chromatography (TLC) was used to monitor the reaction. Silica gel column chromatography was used for separating and purifying the samples. By reverse phase HPLC (RP-HPLC), the purity of GLY-A and GLY-B were analyzed as 98.2% and 96.0%, respectively. The chromatography technology was suitable for the monitoring of the stereo-synthesis of glycosides in monitoring, separation and analysis, obtained an ideal experimental results.

Key words: β -D-glucopyranosides; flavor precursors; synthesis; chromatography

糖苷(glycosides)又称苷或甙, 是糖的衍生物, 自然界存在着许多糖苷类化合物, 有许多糖苷是天然香料的前体物质, 具有良好的稳定性^[1], 且在一定条件下可以释放香气成分。进行香料前体的研究, 可以开发出性质稳定且能在使用过程中释放香气的新型香原料。使其在加工、储存期间避免挥发, 并能够在加热条件下发生分解, 释放出相应的致香单体香料, 达到提高稳定性、适用于高温加工工艺生产的目的^[2-3]。

香叶基- β -D-葡萄糖苷(GLY-B), 天然存在于茶叶

等植物中, 是植物体内挥发性香料物质香叶醇的糖苷键合态的香味前体^[4-6]。但是, 香叶醇糖苷在天然原料中含量极微少, 提取成本高, 为进一步研究其理化性质, 用改进的 Koenigs-knorr 法立体选择性的合成了天然等同(natural identical)结构的糖苷化合物 GLY-B 和它的全乙酰化产物 2,3,4,6-四乙酰基-香叶基-1-O- β -D-吡喃葡萄糖苷(GLY-A), 结合 IR、NMR、元素分析法对合成产物的结构进行了系统的鉴定, 其结构与文献报道一致^[7-8]。

色谱技术目前已逐渐成为糖苷分离制备的主要手段。但是, 薄层色谱(Thin layer chromatography, TLC)分离样品量较小, 使用范围窄; 硅胶柱层析色谱(Silica gel column chromatography, SGCC)处理量大、操作简单、成本低; 液相色谱(HPLC)制备能获得较高的纯度,

收稿日期: 2010-10-05

基金项目: 863 科技计划支持项目 (2006AA102310)

作者简介: 解万翠 (1969-), 女, 副教授, 博士, 主要研究方向: 食品风味和食品质量与安全

通讯作者: 杨锡洪 (1963-), 男, 博士

但成本高,制备量小。本文在糖苷合成中,由薄层色谱法监控反应条件;硅胶柱层析色谱法分离并纯化产物;反向液相色谱法测定样品纯度。将三种色谱方法综合应用于糖苷合成实验中,旨在探索适合糖苷类香料前体的分析、制备、定量检测的最优方案。

1 材料与方

1.1 材料与仪器

香叶醇,分析纯,进口分装(由上海华宝香精香料有限公司提供);硅胶板,GF254100×200 mm,青岛海洋化工厂;SGCC 玻璃柱,Φ100 cm×6 cm;硅胶 G,300 目,青岛海洋化工厂;香草醛、石油醚:乙酸乙酯、甲醇、乙醇等试剂均为分析纯。

HPLC, Agilent HP1100 系统,配四元梯度泵、自动进样器和柱恒箱,美国安捷伦 Agilent 公司;色谱柱为: Waters symmetry C18 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);超纯水由 Millipore 过滤器自制, HPLC 所用试剂为色谱纯。

1.2 合成方法

化合物 2,3,4,6-四-乙酰基-香叶基-1-O-β-D-吡喃葡萄糖苷 **3** (GLY-A)和香叶基-β-D-吡喃葡萄糖苷 **4** (GLY-B)由改进的 Koenigs-knorr 法制备^[9-10],合成路线如图 1:

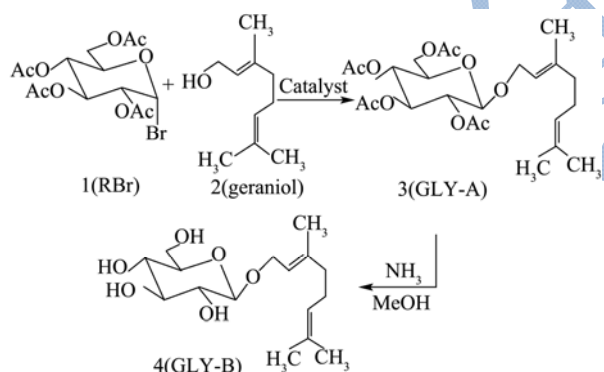


图1 糖苷 GLY-A 和 GLY-B 的合成路线

Fig.1 Synthesis route for glycosides of GLY-A and GLY-B

1.3 TLC 条件及方法

TLC 选用青岛海洋化工厂生产的 GF₂₅₄100×200 mm 硅胶板,显色剂用 5%香草醛乙醇溶液,110 °C 加热 5 min,各化合物显示不同的颜色;化合物 3(GLY-A)的展开剂系统为石油醚:乙酸乙酯=4:1(体积比),化合物 4(GLY-B)的展开剂系统为乙酸乙酯:乙醇=10:1。

1.4 SGCC 条件及方法

SGCC 色谱柱为实验室自装,玻璃柱(Φ100 cm×6 cm),下部具有 3#砂芯滤板,填料选择青岛海洋化工

厂生产的 300 目硅胶 G,湿法装柱。GLY-A 洗脱液选择石油醚:乙酸乙酯(30:1、25:1、20:1、18:1、16:1)梯度洗脱;用 100 mL 试剂瓶收集洗脱液, TLC 检测,将目标产物混和、浓缩即得化合物 3 (GLY-A)。化合物 4 (GLY-B)的洗脱液组成为乙酸乙酯:乙醇=100:1,洗脱液经 TLC 检测后浓缩得 GLY-B。

1.5 RP-HPLC 条件及方法

Agilent HP1100 液相色谱系统(包括四元梯度泵、自动进样器和柱恒温系统); Agilent DAD 检测器, On-line 色谱工作站,色谱柱为 Waters symmetry C18 柱(Φ150 mm×4.6 mm, 5 μm); GLY-A 流动相采用 H₂O:乙腈=30:70, GLY-B 的流动相采用 H₂O:乙腈=50:50,流速为 1.0 mL/min;紫外检测波长为 210nm;柱温 25 °C。超纯水由 Millipore 过滤器自制, RP-HPLC 所用试剂为色谱纯,其它试剂均为分析纯。

2 结果与讨论

2.1 TLC 用于反应进程的监控

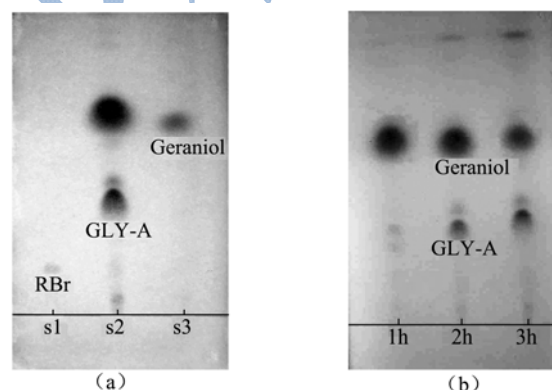


图2 TLC 检测糖苷化反应进程(a) 新物质 GLY-A 的生成 (b) 生成 GLY-A 进程的监控

Fig.2 TLC chromatography of (a) synthesis of GLY-A (b) the progress of the reaction

反应进程的监控和反应条件的优化都是通过薄层色谱分析确定。在本合成过程中,用薄层色谱法对原料、中间产物及最终产物进行检测,确定了适宜的实验条件。以糖苷化反应为例说明。展开剂系统为石油醚:乙酸乙酯=4:1(V/V)。图 2(a)中 s1 为原料 1(R_f=0.17)、s2 为进行过程中的反应液、s3 为原料 2(R_f=0.64)。从图中可以看到,在反应原料中间, R_f 为 0.36 处有明显的新物质生成。图 2(b)中 1h、2h、3h 分别为反应进行了 1 h、2 h、3 h 取样进行的 TLC 检测图,反应物初始比例采取香叶醇过量投料,如 TLC 结果显示,可以看出,随着反应的进行,生成物 GLY-A 的浓度呈增加趋势,反映了一个动态的反应过程,当

GLY-A 的浓度不再增加时,证明反应基本完成。该产物经 IR、NMR、元素分析法等进行进一步的结构鉴定确认为 GLY-A.,即乙酰化的香叶醇糖苷,此物质经过脱乙酰化处理,即得 GLY-B。脱乙酰后的产物由于乙酰基被羟基取代,极性相应增大,展开剂条件相应为乙酸乙酯:乙醇=10:1(V/V)。经过脱乙酰化反应, GLY-A($R_f=0.84$)转变为 GLY-B($R_f=0.38$)。

2.2 SGCC 分离并纯化糖苷化反应粗品

在 TLC 展开剂的基础上选择、优化 SGCC 洗脱液条件,因反应混合物中的组分较多,采取分级洗脱,以提高分离效率。经 SGCC 分离、纯化,得到分离后的目标产物,浓缩得 GLY-A。将 GLY-A 脱乙酰化处理,乙醇重结晶,得白色固体 GLY-B。图 3 为生成 GLY-A 的反应液经 SGCC 分离、洗脱液的各样品 TLC 图谱(1~21 为柱层析洗脱后收集的溶液),分步收集,可以得到纯度不同的产物,经筛选得目标产物。GLY-A 收率 56%, GLY-B 收率 48%。

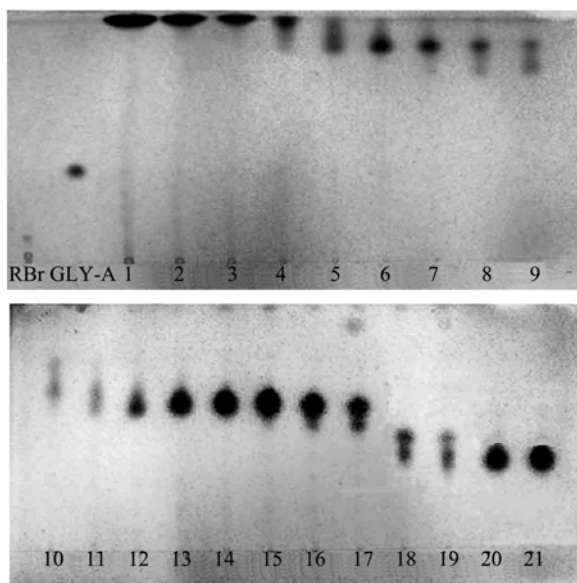


图 3 SGCC 法分离过程中的检测

Fig.3 Analysis of separation by SGCC samples

2.3 RP-HPLC 色谱柱及色谱条件的确定

GLY-A 和 GLY-B 没有市售对照品,因此定量分析采用自身对照法,纯度分析采取面积归一化法。全乙酰化糖苷 GLY-A 极性相对较小,易溶于乙腈,在 H_2O :乙腈=30:70 流动相条件下,保留时间 5.964 min,纯度约 98.2%(见图 4)。脱乙酰产物 GLY-B 极性较大,适当调整流动相配比,在 H_2O :乙腈=50:50 流动相条件下,保留时间 1.888 min,纯度约 96.0%(见图 5)。

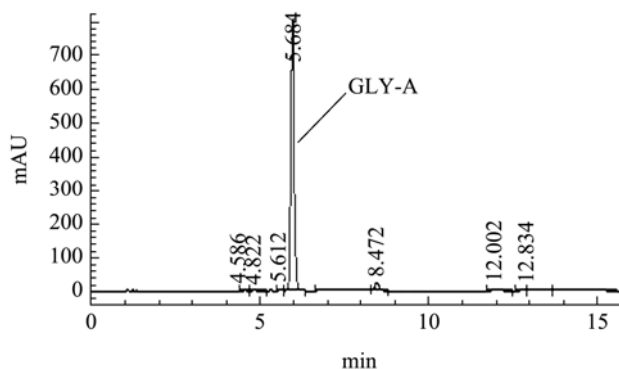


图 4 GLY-A 的 RP-HPLC 图谱

Fig.4 RP-HPLC chromatography of GLY-A

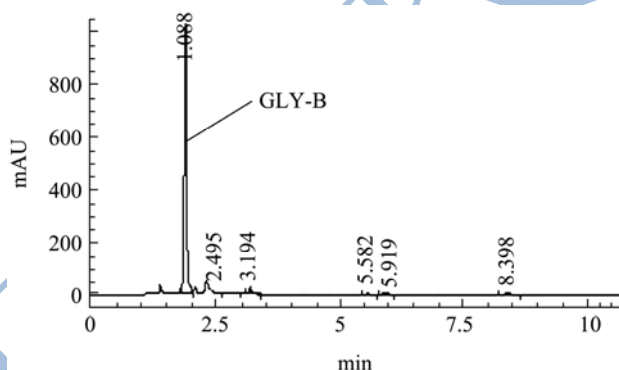


图 5 GLY-B 的 RP-HPLC 图谱

Fig.5 RP-HPLC chromatography of GLY-B

3 结论

糖苷化合物因具有一定的生理活性,极具研究潜力,因此,探索此类化合物的合成、制备及检测方法,具有一定的现实意义。采用 TLC 监控反应条件,SGCC 方法分离并纯化产物,RP-HPLC 法测度样品纯度,使得反应条件的监控、反应产物的分离纯化、目标化合物的质量控制更加简便、高效,合成后的产物 GLY-A 的纯度达 98.2%, GLY-B 的纯度达 96.0%,达到了较好的实验结果。本实验目的明确,将合成、分离、分析形成合理的操作规程,实验操作简便、快速,成本低廉、分离效率高,能够分离并制备更多更纯的样品,对色谱法在糖苷类化合物的合成及研究具有重要的参考价值。

参考文献

[1] Croset J, Chassagne D. Naturally Occurring Glycosides [M]. London: Cichester, 1998
 [2] W C Xie, Z-C Tan, X-H Gu, et al. Thermal Decomposition of Two Synthetic Glycosides by TG, DSC and Simultaneous Py-GC-MS Analysis [J]. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2007, 87(2):505-510

- [3] Wan-cui Xie, Jian Tang, Xiao-hong Gu, et al. Thermal decomposition study of menthyl-glycoside by TGA /SDTA,DSC and simultaneous Py-GC-MS analysis [J]. J. Anal. Appl. Pyrolysis. 2007, 78: 180-184
- [4] Wenfei Guo, Kanzo Sakata, Naoharu Watanabe, Geranyl 6-O- β -d-xylopyranosyl- β -d-glucopyranoside isolated as an aroma precursor from tea leaves for oolong tea[J]. Phytochemistry, 1993, 33(12):1373-1375
- [5] Kazuko Yoshikawa, Masahiro Nagai, Mitsuru Wakabayashi, et al. Aroma glycosides from *Hovenia dulcis*[J]. Phytochemistry, 1993, 34(5): 1431-1433
- [6] R. Boulanger, J. Crouzet. Free and bound flavour components of Amazonian fruits: 3-glycosidically bound components of cupuacu [J]. Food Chemistry, 2000, 70(4): 463-470
- [7] Lihua Jiang, Hiroshi Kojima, Kumi Yamada. Isolation of some glycosides as aroma precursors in young leaves of Japanese pepper (*Xanthoxylum piperium* DC) [J]. J. Agric. Food Chem. 2001, 49: 5888-5894
- [8] Ste'phane Voirin, Raymond Baumes, Claude Bayonove, et al. Synthesis and n.m.r. spectral properties of grape monoterpenyl glycosides [J]. Carbohydrate Research, 1990, 207(1): 39-56
- [9] Veronika Nagy, Katalin Czifrák, Attila Bényei, et al. Synthesis of some O-, S- and N-glycosides of hept-2-ulopyranosonamides [J]. Carbohydrate Research, 2009, 344(7): 921-92
- [10] 解万翠,顾小红,罗昌荣,等.气相色谱-质谱法研究香叶基- β -D-吡喃葡萄糖苷的热裂解行为[J].色谱,2006,24(4): 339-342