

十字花科植物种子中莱菔硫烷的薄层色谱鉴别

胡 晔 梁 浩 袁其朋*

(北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029)

摘 要: 用正己烷-乙醇体积比为 5:5 的混合溶剂作为展开剂, 碘蒸汽为显色剂, 建立了十字花科植物中莱菔硫烷薄层色谱定性分析的方法。并运用相同的方法对甘蓝和白菜种子的粗提液进行鉴别, 实验表明甘蓝种子中含少量莱菔硫烷, 白菜种子中几乎不含这种物质; 并用 HPLC 对其进行分析验证。该方法操作简便, 专属性强, 斑点清晰, 无需大型仪器和特殊试剂, 适用于多个样品的低价快速检测。

关键词: 莱菔硫烷; 薄层色谱; 快速检测

中图分类号: TQ225.27

引言

莱菔硫烷 (sulforaphane, SFN), 分子式: $\text{CH}_3\text{S}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}=\text{C}=\text{S}$, 是众多异硫氰酸酯中的一种, 硫代葡萄糖苷的一种水解产物, 是蔬菜中防癌和抗癌效果最好的天然活性物质之一, 尤其对食道癌、肺癌、结肠癌、乳腺癌、肝癌及大肠癌等有很好的防治效果, 也因此具有较为广阔的市场前景。现已证实, 十字花科植物 (如甘蓝、花椰菜、青花菜等) 含量最为丰富^[1-5]。目前, 国际上大多数的研究只是针对十字花科植物的药性研究, 而对莱菔硫烷的制备研究还很薄弱, 国内也少有相关报道。

对于莱菔硫烷的检测方法, 目前主要是紫外分光光度法^[6]、气相色谱法^[7]和 HPLC 法^[8]。但紫外分光光度法需进行预处理, 反应步骤多, 特异性低, 重现性差; HPLC 法和气相色谱法虽均可达到理想的精度, 重现性也不错, 但对于莱菔硫烷的初步鉴定, 运用这两种方法势必会增加研究成本。本实验利用薄层色谱法对莱菔硫烷的存在及含量进行定性鉴定, 确定分离效果最佳的展开剂, 同时也为其他可能含有莱菔硫烷的十字花科植物种子薄层色谱鉴别提供了良好的前处理方法及色谱条件。薄层色谱法操作简单快捷、灵敏度高、准确可靠, 可作为莱菔硫

烷分析的一种有效手段。

1 实验部分

1.1 材料和试剂

青花菜种子、甘蓝种子 中国农业科学院蔬菜花卉研究所; 白菜种子 北京京研益农种苗技术中心; 去离子水; 超纯水; 莱菔硫烷标准样品 美国 Sigma 公司; Tris-HCl (pH7.2) 缓冲溶液; 无水硫酸钠、石油醚、乙醇、正己烷、三氯甲烷、二氯甲烷、乙酸乙酯、丙酮、异丙醇、甲醇均为分析纯 康科德科技有限公司; 乙腈 色谱纯, 百灵威化学试剂有限公司; 固体碘。

1.2 实验主要仪器

恒温磁力搅拌器, JB-2 上海雷磁新泾仪器有限公司; 离心机, TDL-5 上海安亭科学仪器厂; 旋转蒸发仪, RE-52A 上海亚荣生化仪器厂; 层析缸; 硅胶 G 预制板 (10 cm × 5 cm, 厚度 0.2 ~ 0.25 mm), 烟台市化学工业研究所; 微量进样器 (25 μL), 上海医用仪器厂; HPLC 仪, 日立 (Hitachi)。

1.3 实验步骤

1.3.1 试样制备 称取青花菜种子 1 g, 研磨成粉状。加入 Tris-HCl (pH7.2) 缓冲溶液 8 mL, 水解 2 h。加乙醇 2 mL。再用石油醚脱脂三次, 每次 10 mL。向乙醇-水相加乙酸乙酯萃取三次, 每次 10 mL。收集乙酸乙酯相, 加无水硫酸钠吸水至澄清, 旋转蒸发仪真空浓缩该相。加 5 mL 乙酸乙酯溶解, 最终得一金褐色溶液。

1.3.2 薄层层析 本实验采用硅胶为吸附剂, 通过选用不同的展开剂来考察其对莱菔硫烷粗提液的分

收稿日期: 2005-05-13

基金项目: 北京市生物加工重点实验室资助 (SYS100100421)

第一作者: 女, 1982 年生, 本科生

*通讯联系人

E-mail: yuanqp@mail.buct.edu.cn

离效果。

将 10 mL 展开剂(纯溶剂或一定配比的混合溶剂)倒入层析缸中,盖上瓶塞,尽量使层析缸中气体达到饱和。用微量进样器在硅胶 G 预制板上距下端 1 cm 的基线上点样,均取样 2 μ L;点完样液后用电吹风机吹干。将该硅胶板放入倒有展开剂的层析缸中,室温、垂直上行展开,展距为 8.5 cm。当溶剂前沿到达终止线时,取出硅胶板,用电吹风机吹干后放入碘瓶中显色。

1.3.3 专属性研究实验 改变反应条件,大量减少莱菔硫烷产量,制备对比试样,进一步考察薄层色谱法定性检测莱菔硫烷的专属性。

对比试样 1 取青花菜种子 1 g,研磨成粉状,放入 pH 值 2.0 的冰醋酸溶液^[10]中水解 2 h,后续步骤同 1.3.1。

对比试样 2 取青花菜种子 1 g,研磨成粉状,沸水浴加热 2 h。再加入 Tris-HCl(pH 7.2)缓冲溶液 8 mL,沸水浴水解 1 h。后续步骤同 1.3.1。

将以上两个试样与标样、青花菜粗提液作对比,用正己烷-乙醇体积比 5:5 的二元混合展开剂展开分析。并用 HPLC 法对该两个对比试样加以验证。

1.3.4 甘蓝和白菜种子中莱菔硫烷的薄层色谱鉴别 取甘蓝种子和白菜种子各 1 g,后续步骤同 1.3.1。将该两个试样与标样、青花菜粗提液作对比,用正己烷-乙醇体积比 5:5 的二元混合展开剂展开分析。并用 HPLC 法对该两个对比试样加以验证。

1.3.5 HPLC 检测 Hitachi HPLC 仪,色谱柱为反相 C18 柱(250 nm \times 4.6 mm, 5 μ m, DiamodsilTM),展开剂为乙腈和水,检测波长为 254 nm,流速 1 mL/min,进样量为 10 μ L,采用梯度洗脱,A 泵为质量分数 100% 乙腈,B 泵为纯净水,在 20 min 内乙腈的浓度由 20% 升至 100%。

2 结果与讨论

2.1 固定相的选择

在 Kore^[10]等人实验的基础上,本实验采用硅胶 G 预制板为固定相。

2.2 显色方法的选择

本实验选择碘蒸气显色法,因为碘与异硫氰酸酯和腈结合过程是不变性的,且还与大多数有机成分可逆结合,最后,每种纯物质都会在薄层板上产生一个斑点。

2.3 展开剂的选择

在实验中,各个组分极性有差异,故不同的组分在吸附剂和展开剂间的分配情况不同,从而导致各个组分在薄层层析板上的移动距离不同。溶剂强度太弱或太强都会导致组分斑点之间距离近甚至分不开,只有适宜强度的溶剂会使组分斑点之间距离拉大。故根据各组分 R (斑点至样点的距离与总距离的比) 选择适宜的溶剂。实验中采用的是层析板是硅胶板,先采用一些溶剂作为单一展开剂,保持点样样品量基本相同,观察样品中各组分斑点在薄层板上的分布情况;然后根据分离情况,指导二元展开剂的配制,以求一个强度适宜的展开剂。

由图 1 可知,莱菔硫烷处于极性杂质斑点和溶剂前沿的中间,并能与其他杂质有效分离时是最理想的分布,即可用

$$I_1 / (I_1 + I_2) = (1 - R_s) / (1 - R_a)$$

式中, R_s 为莱菔硫烷斑点的 R ; R_a 为杂质 a 斑点的 R ; I_1, I_2 为图 1 中相应距离。

当 $I_1 / (I_1 + I_2) = 0.5$ 左右时,溶剂最适宜。

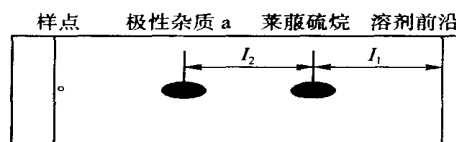


图 1 薄层层析示意图

Fig. 1 Sketch of TLC plate

2.3.1 单一展开剂 由表 1 可知,各单一展开剂并不能将莱菔硫烷粗提液有效地分离开来,所以配制二元混合溶液作展开试验,初步定下混合展开剂的溶剂类型,以求进一步找到二者合适的配比。

表 1 不同单一展开剂下的检测结果

Table 1 Analysis results in different single solvents

展开剂	溶剂在硅胶上的强度因子	R_s	R_a	$\frac{1 - R_s}{1 - R_a}$
正己烷	0.01	0.00	0.00	莱菔硫烷 R 过小,均未得以展开。
三氯甲烷	0.31	0.00	0.00	
二氯甲烷	0.32	0.01	0.00	
乙酸乙酯	0.45	0.07	0.00	
丙酮	0.43	0.32	0.04	0.71
异丙醇	0.63	0.33	0.08	0.73
乙醇	0.68	0.55	0.55	1.00

2.3.2 二元混合展开剂 从 R 值适宜范围和分离出的杂质数看(表 2),展开剂为正己烷-丙酮体积比 2:8、正己烷-乙醇体积比分别为 2:8, 5:5, 8:2、丙酮

-乙醇体积比分别为 2 8,5 5 时分离效果较好。丙酮具有毒性,容易造成污染,下面就正己烷-乙醇体系作更细致的讨论。

表 2 不同二元混合展开剂下的检测结果

Table 2 Analysis results in different mixed pairs of solvent						
二元溶剂 及其体积 比	R_s	R (杂质)				
		1	2	3	4	
正己烷	2 8	0.42	0.06	0.08	0.72	0.91
-丙酮	5 5	0.15	0.02	0.51	0.61	0.86
正己烷-	5 5	0.18	0.29	0.41	0.85	0.89
异丙醇	8 2	0.11	0.46	0.89	0.93	0.94
正己烷-	2 8	0.54	0.21	0.50	0.91	0.97
乙醇	5 5	0.48	0.06	0.57	0.95	0.98
	8 2	0.18	0.04	0.60	0.73	0.94
丙酮-	2 8	0.65	0.08	0.51	0.92	0.97
乙醇	5 5	0.66	0.12	0.49	0.91	0.97
丙酮-	2 8	0.74	0.29			
甲醇	5 5	0.74	0.14	0.66		

杂质栏中表示的是薄层板上除莱菔硫烷斑点外,由始端到终端依次所显示的其余斑点的 R

2.3.3 正己烷-乙醇不同体积比的溶液作为展开剂
在对展开剂正己烷-乙醇体系组成进行考察中,观察了展开剂中有机溶剂正己烷和乙醇体积比对莱菔硫烷粗提物分离的影响。表 3 表明,增加乙醇的体积,可使莱菔硫烷的 R 值增大;但当乙醇体积增加到一定值后,分离效果反而不佳。出于对 R 值(0.25~0.75)和溶剂 $(1 - R_s)/(1 - R_a) = 0.5$ 的考虑,当展开剂正己烷-乙醇以 5 5 的体积比混合时比较合适。

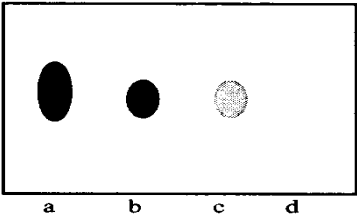
表 3 正己烷-乙醇混合展开剂体积比对
莱菔硫烷检测的影响

Table 3 Effect of different proportions in the solvent system hexane-ethanol on sulforaphane			
体积比	R_s	R_a	$\frac{1 - R_s}{1 - R_a}$
1 9	0.55	0.55	1.00
3 7	0.54	0.20	0.58
5 5	0.48	0.06	0.55
7 3	0.22	0.06	0.83
10 0	0.00	0.00	1.00

2.4 专属性

将两个对比试样与标样、青花菜粗提液作对比。由图 2 可见,青花菜莱菔硫烷粗提物迁移率与标准样品的迁移率基本一致,但在相同水平线上,两对比试样均无明显斑点。经 HPLC 分析(表 4),该两试

样莱菔硫烷含量很少。这说明用薄层色谱法鉴别莱菔硫烷的专属性强且干扰少。同时也说明,在这两种反应条件下可有效抑制莱菔硫烷的生成。



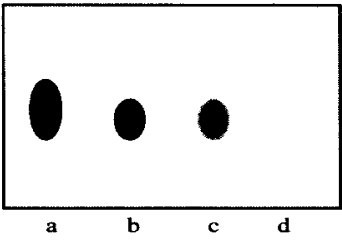
a. 标准样;b. 青花菜粗提物;c. 对比试样 1;d. 对比试样 2(点样体积均为 2 μ L)

图 2 莱菔硫烷粗提物薄层色谱图(专属性)

Fig. 2 TLC analysis of crude sulforaphane (specificity)

2.5 应用

来自甘蓝种子和白菜种子的粗提液用正己烷-乙醇(5 5)的二元混合展开剂展开分析。由图 3 可见,3 种莱菔硫烷粗提物的迁移率与标准样品的迁



a. 标准样;b. 青花菜粗提物;c. 甘蓝粗提物;d. 白菜粗提物(点样体积均为 2 μ L)

图 3 莱菔硫烷粗提物薄层色谱图(应用)

Fig. 3 TLC analysis of crude sulforaphane (application)

移率基本一致,且由斑点的大小和颜色的深浅可知,青花菜种子中莱菔硫烷的含量高于甘蓝种子,而白菜种子中则含量很少。该结果与所得的 HPLC 分析结果(表 4)一致。说明该薄层色谱法可广泛运用于十字花科植物种子中莱菔硫烷的鉴别。

表 4 HPLC 与薄层色谱对比分析

Table 4 HPLC and TLC results		
	斑点颜色 深浅	SFN 与种子粉末的质量比 (HPLC 测定结果)/mg \cdot g ⁻¹
标样	深	
青花菜种子 粗提液	较深	4.2249
经沸水浴加热 灭酶的试样	很浅	0.1397
经酸水解的试样	不明显	0.0907
甘蓝种子粗提液	较浅	0.8650
白菜种子粗提液	不明显	0.0767

3 结论

利用硅胶 G 薄层板,展开剂采用正己烷-乙醇体积比为 5:5 的混合试剂,碘蒸气为显色剂;实验中标样与提取的莱菔硫烷在 R_f 为 0.55 附近呈现清晰的黄褐色斑点,最终达到快速检测样品中莱菔硫烷的目的;并用 HPLC 色谱验证其分离效果良好。本文介绍的方法与文献报道的其他方法相比,简单易行、专属性强、样品用量少、斑点清晰、实验时间短、成本低,是莱菔硫烷快速检测的一种有效手段,为其他可能含有莱菔硫烷的十字花科植物种子薄层色谱鉴别提供了良好的前处理方法及色谱条件。

参 考 文 献

- [1] Zhang Y, Talalay P, Cho CG, *et al.* A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(6): 2399 - 2403.
- [2] Kolonel LN, Hankin JH, Whittemore AS, *et al.* Vegetables, fruits, legumes and prostate cancer: a multiethnic case - control study [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2000, 9(8): 795 - 804.
- [3] Camel-Payastre L, Li P, *et al.* Sulforaphane, a naturally occurring isothiocyanate, induces cell cycle arrest and apoptosis in HT29 human colon cancer cells [J]. *Cancer Research*, 2000, 60(5): 1426 - 1433.
- [4] Berman D M, Karhadkar S S, Hallahan A R, *et al.* Medulloblastoma growth inhibition by Hedgehog pathway blockade [J]. *Science*, 2002, 297(5586): 1559 - 1561.
- [5] Chiao J W, Chung F L, Kancherla R, *et al.* Sulforaphane and its metabolite mediate growth arrest and apoptosis in human prostate cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2002, 20(8): 631 - 636.
- [6] Zheng Y, Cho C, Gary H, *et al.* Spectroscopic quantitation of organic isothiocyanates by cyclocondensation with vicinal dithiols [J]. *Analytical Biochemistry*, 1992, 205(6): 100 - 107.
- [7] Chiang W C K, Pusateri D J, Leitz R E A. Gas chromatography/ Mass spectrometry method for the determination of sulforaphane and sulforaphane nitrile in broccoli [J]. *J Agric Food Chem*, 1998, 46(3): 1018 - 1021.
- [8] Bertelli D, Plessi M, Braghikroll D, *et al.* Separation by solid phase extraction and quantification by reverse phase HPLC of sulforaphane in broccoli [J]. *Food Chemistry*, 1998, 63(3): 417 - 421.
- [9] Kurata U Y, Arakawa T N. Effects of pH and ferrous ion on the degradation of glucosinolates by myrosinase [J]. *Agric Biol Chem*, 1986, 50(11): 2735 - 2740.
- [10] Kore A M, Spencer G F, Wallig M A. Purification of the α -(Methylsulfinyl)alkyl glucosinolate hydrolysis products: 1-isothiocyanato-3-(methylsulfinyl)propane, 1-isothiocyanato-4-(methylsulfinyl)butane, 4-(methylsulfinyl)butanenitrile, and 5-(methylsulfinyl)pentanenitrile from broccoli and *Lesquerella fendleri* [J]. *J Agric Food Chem*, 1993, 41(1): 89 - 95.

Qualitative identification of the sulforaphane of cruciferae by thin layer chromatography

HU Ye LIANG Hao YUAN Qi-peng

(College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: In this article, a thin-layer chromatography (TLC) qualitative analysis method for the isolation and identification of sulforaphane in broccoli seeds is reported. The conditions employed were: the solvent system of hexane-ethanol was a 5:5 mixed solution; the color development reagent was iodine vapor. This method was also used to identify components in the crude extracts of cabbage and Chinese cabbage seeds. The results showed that the content of sulforaphane in the former was less than that in broccoli and that in the latter was low. HPLC was also employed to analyze the same samples. The TLC method is simple, reliable, specific, and inexpensive, and does not require any large equipment or special reagents; moreover, the spots are clearly observable. The method is suitable for rapid analysis of many samples.

Key words: sulforaphane; TLC; rapid analysis