

加压条件下油菜籽中硫苷非酶降解规律及其机理

钱和 雕鸿荪 沈蓓英

(食品学院)

摘要 研究了加压条件下油菜籽中硫苷非酶降解规律,探讨了硫苷非酶降解机理。

主题词 油菜籽; 硫苷; 非酶降解

中图分类号 S565.4

0 前言

前文报道^[1],加压热处理可加速硫苷降解反应,提高单位时间内硫苷降解率,但最终各种硫苷及其降解产物在菜籽粕中的残留情况,影响到菜籽粕饲用质量,有必要深入研究。同时,了解各种硫苷的非酶降解规律及其降解产物,有助于分析探讨硫苷非酶降解机理,因此具有重要的理论意义。本文研究了加压条件下油菜籽中硫苷非酶降解规律,探讨了硫苷非酶降解机理。

1 材料和方法

1.1 材料

样品来自绍兴,属甘蓝型双高油菜籽。

1.2 色质联用测定样品中各种硫苷的含量

1.2.1 原理 用TMS试剂与脱硫的硫苷作用生成相应的衍生物,衍生物具有挥发性,有利于用气相色谱法分离和定量测定^[2,3]。

1.2.2 主要试剂

硫酸酯酶(AR, Sigma, H-1型)

烯丙基硫苷(AR, Sigma)

MSHFBA(N-甲基-N-三甲基硅烷基-七氟丁酰胺)色谱纯

MATFA(N-甲基-N-三甲基硅烷基-三氟乙酰胺)色谱纯

TMCS(三甲基氯硅烷)色谱纯

醋酸钡(AR)

醋酸铅(AR)

吡啶(硅烷化级)

吡啶(AR)。

收稿日期: 1995-07-11

1.2.3 前处理

1) 醋酸型和醋酸吡啶型的 DEAE Sephadex A-25 的制备(二乙基氨基葡聚糖凝胶 A-25 型) 称取 10g DEAE Sephadex A-25 放入 250ml 的烧杯中,加约 150ml 水,浸泡过夜(约 8~10h)完全膨胀后,将凝胶与水一并倾入 20×400mm 的玻璃层析柱,待水大部分流完后加入 300ml 的 0.5mol/L 氢氧化钠溶液,让其流干后,再用约 250ml 水洗涤层析柱,使流出液的 pH 值约为 7,凝胶备用;醋酸型葡聚糖凝胶。取上述经过处理后的葡聚糖凝胶约 1/10,放入适量水中,混合以后,倾入 15×200mm 的层析柱,待水流尽后,再从柱口处加入约 100ml 0.5mol/L 醋酸溶液,再用约 250ml 水洗至中性,并将凝胶转移至一个适当的带盖容器中,加适量水浸泡备用;醋酸吡啶盐型葡聚糖凝胶。取剩余的 9/10 葡聚糖凝胶,放入适量水中,混合以后,倾入层析柱中,再从柱口处加入 0.5mol/L 吡啶醋酸盐(取 19.8ml 吡啶,加入 15ml 冰醋酸,再用水稀释至 500ml)400ml,待其流尽后,用约 250ml 水洗涤后,将凝胶转移至一个带盖的适当容器中,加适当的水浸泡,备用。

2) 钠型的 SP Sephadex C-25 型葡聚糖凝胶的制备 称取约 1g 的 SP Sephadex C-25 型葡聚糖凝胶,放入烧杯中,用约 80ml 水浸泡过夜(约 8~10h)后,将水连同凝胶一并倾入层析柱中,并用约 250ml 水洗涤之,将凝胶转移至带盖容器中加适当水浸泡,备用。

3) 硫酸酯酶的精制 称取约 70mg 硫酸酯酶放入 10ml 离心管中,加 3ml 水溶解后,再加入等体积乙醇,离心约 10min(2000r/min),将上清液倾入另一个 25ml 的离心管(或其他适当试管),弃去沉淀,加入 9ml 的乙醇,再在相同转速下离心 10min,弃去上清液,再用 2ml 水溶解之;取两个下端开有一小孔的筒型塑料尖头管,在其尖端分别塞以一小束玻璃棉;在其中一个塑料管中,加入约 100 μ l 浸泡醋酸型葡聚糖凝胶(A-25)上面的水,再加入适量的该凝胶,制成一个高约 15mm 的层析柱(相当于 20mg 干凝胶);在另一个塑料管中,加入约 100 μ l 浸泡钠型的 SP Sephadex C-25 型葡聚糖凝胶上面的水溶液,再加入适量的该凝胶,制成一个高约 15mm 的层析柱(相当于 20mg 干凝胶);将 2ml 的硫酸酯酶水溶液先通过 A-25 层析柱,再通过 C-25 层析柱。装入带盖小瓶中,贮入-4℃冰箱中,备用。

1.2.4 内标制备 1 μ mol/L 浓度的烯丙基硫苷的配制。称取(准确至 0.01mg)烯丙基硫苷 20.75mg,加水溶解后,定容至 50ml。

1.2.5 样品处理 准确称取 0.1g 菜籽饼粕置于 15×100mm 试管中,再放入 90℃热水浴中预热 5min,然后加入 1ml 沸水。适当混合后(不能让其降温),再在热水浴上浸提 4min;冷却后,加入 1.0ml 内标混合后离心 10min;将上清液倾入另一个试管中,加入 125 μ l 1:1(V:V)的 0.5mol/L Ba(AC)₂ 和 0.5mol/L Pb(AC)₂ 的混合溶液,适当混合后,离心 10min,备用;将一笔型尖头塑料管的尖端处塞一小束玻璃棉,加入醋酸吡啶型凝胶,制成一个 15mm 高的层析柱,用少量的水洗涤之;将处理过的备用上清液 0.4ml 小心加入到制好的层析柱中,当柱子滤干后,用 1ml 0.02mol/L 醋酸吡啶盐溶液洗涤之(4ml 0.5mol/L 醋酸吡啶盐溶液,用水稀释至 100ml);在此柱上,加入约 50 μ l 精制的硫酸酯酶溶液,用一适当盖子盖紧,以减缓蒸发,放置过夜(约 8~10h);用约 0.5ml 水将脱硫酸的硫苷洗脱于 5ml 具塞试管中(可用其他适当容器)真空干燥或用氮气吹干,依次加入 100 μ l 无水吡啶(甲基烷化规格),100 μ l MSHFBA 以及 10 μ l TMCS 试剂,立即塞上玻璃塞,在 120℃下加热 20min。取约 2.5 μ l 溶液注入色谱仪。(注:进行上述衍生反应操作时,其用具应是干燥的,药品应是不含水的,室内相对湿度也应小于 70%)。

1.2.6 质谱分析 仪器 Finnigan4515型四极质谱仪;色谱柱 SCOT OV-101 石英毛细管柱, L=25m, ID=0.24mm;分流比 1:10;载气 He;柱温 起始 200℃, 恒定 2min, 再以 10℃/min 升至 270℃, 恒定 20min;离子源 EI;电子轰击能量 70eV;质量范围 40~750;进样量 1μl.

1.2.7 色谱分析 仪器 美国 Varian 公司 3700 型气相色谱仪;色谱柱 SCOT OV-1 石英毛细管柱, L=25m, ID=0.22mm;分流比 1:20;柱温 起始 200℃, 恒定 2min, 然后以 10℃/min 升至 280℃, 恒定 20min;汽化室温度 280℃;检验器温度 280℃;氮气流速 30ml/min;氢气流速 45ml/min;空气流速 450ml/min.

1.2.8 计算结果(用烯丙基硫苷作内标)

1) 风干样品

$$\frac{\text{某一硫苷}(\mu\text{mol/L})}{\text{脱脂风干饼粕}(\text{g})} = \frac{\text{某一硫苷的 TMS 峰面积}}{\text{烯丙基硫苷的 TMS 峰面积}} \times \frac{\text{烯丙基硫苷的 TMS 碳原子数}}{\text{某一硫苷的 TMS 碳原子数}} \times \frac{\text{加入的烯丙基硫苷}(\mu\text{mol/L})}{\text{脱脂风干饼粕}(\text{g})}$$

2) 烘干样品

$$\text{风干样品的某一硫苷含量} \times \frac{100}{100 - \text{样品含水百分率}}$$

表 1 有关硫苷降解产物碳原子数表

硫苷	碳原子数	硫苷	碳原子数	硫苷	碳原子数
烯丙基-(内标)	25	2-羟基-3-丁烯基-	29	苜蓿基-(内标)	29
3-丁烯基-	26	2-羟基-4-戊烯基-	30	4-羟基-苜蓿基-	32
4-戊烯基-	27				

关于色质联用测定硫苷降解产物的种类与含量, 请参阅参考文献[4].

2 结果与讨论

2.1 硫苷的降解规律

实验设计 油菜籽脱壳(减少壳中色素、多酚类化合物等成分对分析过程的干扰)→钝化硫苷酶→轧胚→室温脱脂→低温真空脱溶→调至一定含水量→不同条件下加压热处理→低温真空干燥→准确称取 5g 样品用氯仿回流 8h 以提取其中的硫苷分解产物, 提取液定容至 1ml, 待用→回流后样品低温真空干燥, 待测其中各种硫苷含量。

2.1.1 菜籽粕中硫苷组成 采用色-质联用测定样品中硫苷组成与含量, 实验结果见表 2.

表 2 菜籽粕中硫苷的组成(两次结果平均值)

名称	简称	含量(μmol/g 粕)	名称	简称	含量(μmol/g 粕)
3-丁烯基硫苷	GN	35.1	3-吲哚-甲基硫苷	GB	1.2
4-戊烯基硫苷	GBC	3.2	甲氧基-3-吲哚甲基硫苷	MGB	1.0
2-羟基-3-丁烯基硫苷	PRO	68.7	其它	OTHERS	2.7
2-羟基-4-戊烯基硫苷	GNI.	4.4			

表 2 可知, 样品中硫苷以 3-丁烯基硫苷和 2-羟基-3-丁烯基硫苷为主。

2.1.2 各种硫苷的降解规律 各种硫苷在加压热处理过程中的变化情况见图 1(压力为 0.12MPa).

实验结果表明,各硫苷的降解速率存在一定差别,当硫苷总降解率达到90%以上时,粕中残留硫苷主要是3-丁烯基硫苷,2-羟基-3-丁烯基硫苷,少量4-戊烯基硫苷和极少量未鉴定硫苷。M. Vermorel^[5]等进行的动物试验表明,2-羟基-3-丁烯基硫苷,3-丁烯基硫苷是引起抗营养性和毒性的主要硫苷,进一步动物试验表明,残留硫苷 $\leq 1\text{mg/g}$ 粕,对动物没有显著不良影响。因此,对双高品种菜籽粕而言,总硫苷降解率达到90%~95%时,粕中残留硫苷的毒性作用基本可忽略不计。

2.2 硫苷降解产物的测定

采用色-质联用法对硫苷降解产物进行分离和鉴定。发现3个令人感兴趣的组分:2-羟基-3-丁烯腈,苯乙腈,吲哚腈。用2-羟基-3-丁烯腈标准样品进一步确证了它的存在,未检出硫氰酸酯及异硫氰酸酯的存在。腈的含量随着热处理时间的增加而增加;加压热处理20min时开始出现吲哚腈;2-羟基-3-丁烯基腈是菜籽粕中存在的主要腈,其在加压热处理过程中生成趋势的详细分析见表3。由表3可知,加压热处理时间越长,2-羟基-3-丁烯基硫苷分解成相应的腈的百分率越高。

表3 热处理过程中形成腈的趋势

热处理时间(min)	PRO($\mu\text{mol/g}$ 粕)	已分解 PRO($\mu\text{mol/g}$ 粕)	CHB($\mu\text{mol/g}$ 粕)	PRO \rightarrow 腈(%) [*]
0	68.7			
10	35.8	32.9	12.1	36.8
20	22.7	46.0	21.5	46.7
40	14.6	54.1	35.3	65.2
60	1.8	66.9	42.9	64.2

CHB 2-羟基-3-丁烯基腈 * CHB($\mu\text{mol/g}$ 粕) \div 已分解 PRO($\mu\text{mol/g}$ 粕)

2.3 硫苷非酶降解反应机理的探讨

2.3.1 硫苷的分子结构 1956年,Ettinger和Lundeen^[6,7]采用X-射线结晶法证实了硫苷的分子结构(图2),并于1957年又人工合成了苜蓿基硫苷,进一步确证了硫苷的上述结构。基团R是硫苷分子中的可变基团。所有硫苷可视为由两部分组成,一为非糖部分,另一为 β -D-葡萄糖部分或简称葡萄糖部分,二者通过硫苷键联接起来。

对硫苷分子结构的进一步研究,证实了硫苷中的一些原子,围绕着碳氮双键均近乎处于同一平面上。也就是说O原子、N原子、C原子(与N原子直接相连的C原子,称零号碳原子),以及S原子和1号C原子(基团R中与零号碳原子直接相连接的C原子)均围绕着碳氮双键共处于同一平面上。硫酸根与基团R围绕着碳氮双键呈反式构型(anticonfiguration)^[8,9]。

2.3.2 硫苷非酶降解产物 硫苷非酶降解产物相当复杂,长期以来一直有所争议。刘多敏等^[10,11]认为硫苷非酶降解产物主要是腈类化合物,但J. Alexander报道^[12],将烯丙基硫苷、苯甲基硫苷、苯乙基硫苷在色谱柱上进行热降解,其降解产物与一般酶解产物相似,主要是

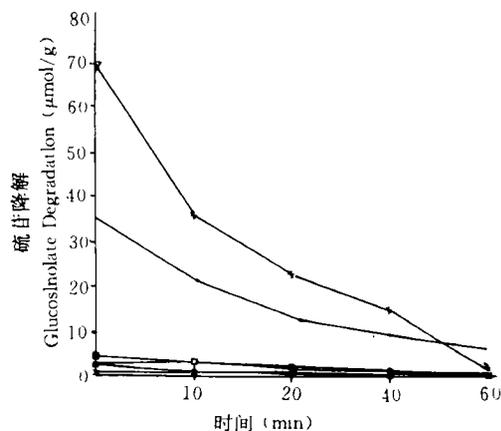


图1 加压热处理过程中各种硫苷降解情况

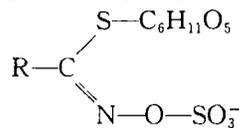


图2 硫苷的分子结构

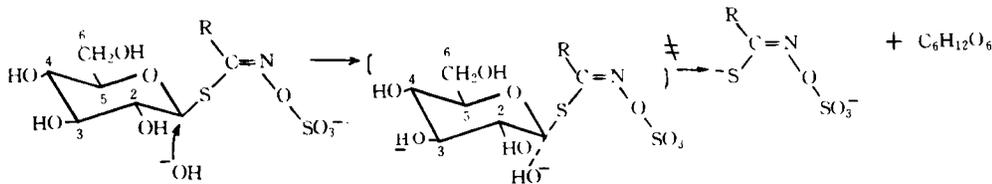
腈和异硫氰酸酯,在125℃更容易生成腈。异硫氰酸酯的形成与硫苷的种类有关,在150℃时苯乙基硫苷更易生成异硫氰酸酯。作者对加压条件下硫苷热降解产物的研究结果只鉴定出3种腈:2-羟基-3-丁烯基腈、吡啶腈和苯乙腈,未发现异硫氰酸酯和硫氰酸酯,但通过对2-羟基-3-丁烯基硫苷以及2-羟基-3-丁烯基腈在热降解过程中变化情况的综合比较与分析可知(表3),2-羟基-3-丁烯基硫苷并不是100%降解成相应的腈,遗憾的是由于体系过于复杂,未能检出其它相应的降解产物,不过若不考虑基团R对硫苷降解产物的影响,可认为硫苷降解产物主要有三类:腈类化合物、异硫氰酸酯及硫氰酸酯。

2.3.3 硫苷非酶降解反应的性质 综合文献报道及前文研究结果,硫苷非酶降解性质如下:温度越高,降解反应速度越快,生成腈的趋势越大;硫苷降解反应速度与体系含水量有关,体系含水量低,硫苷降解反应速度很慢,要求的温度较高;体系含水量高,硫苷降解反应速度随之增加;硫苷降解反应速度随碱性化学试剂浓度的增加而增加;过渡金属的盐类可催化硫苷降解反应;加压热处理过程中,硫苷降解反应速度高于常压热处理过程。

2.4 硫苷非酶降解反应机理

2.4.1 SN₂亲核取代 1) 化学反应机理指由反应物转化到产物时所经历各个步骤,迄今尚无直接的方法可以观察到真实的反应过程,只能从间接的实验结果来推导反应机理^[13~15]。

作者根据硫苷的结构、降解性质及产物推断,在硫苷非酶降解反应过程中,首先发生典型的双分子亲核取代反应,生成葡萄糖及非糖部分中间体。其过程如下:



反应中硫苷键受相邻官能团的影响而极化,结果硫带部分负电荷,而碳带部分正电荷。碱性亲核试剂—氢氧根离子从硫原子的背面攻击带正电荷的部分,形成过渡状态。在过渡状态中,氢氧根离子引起电子密度转移,使氧的电荷减少,而硫的电荷增多。键的形成和断裂同时发生^[16~18]。

对这类双分子亲核取代反应,其反应速度在很大程度上决定于亲核试剂的“亲核性”,即亲核试剂取代饱和碳原子上一个离去基团的相对能力。根据碘甲烷与不同亲核试剂在甲醇溶液中反应速度的快慢,可以推测试剂亲核性的强弱,其结果见表4^[19]。

作者认为,根据亲核取代反应机理,可解释以下几个问题:

1) 温度及样品含水量与硫苷降解反应的关系 由于作为亲核试剂进攻硫苷键的亲核基团是OH⁻而不是H₂O,通常H₂O离解生成OH⁻的比例极低, [K_w(0℃) = 14.944, K_w(20℃) = 14.167, K_w(25℃) = 13.996, K_w(60℃) = 13.017, K_w(100℃) = 12.26],但随着温度升高,水的电离度很快增大,100℃时电离度比20℃时增大了近100倍;因此,硫苷的降解反应速率随温度和含水量的增加而迅速增加。

表4 亲核试剂的亲核性

亲核试剂	相对速度*	
I ⁻ , HS ⁻ , RS ⁻	>10 ⁵	亲核性很强
Br ⁻ , HO ⁻ , RO ⁻ , CN ⁻ , Na ⁻	10 ⁴	亲核性强
NH ₃ , Cl ⁻ , F ⁻ , RCO ₂ ⁻	10 ¹ ~10 ²	亲核性中等
H ₂ O, ROH	1	亲核性弱
RCOOH	10 ⁻²	亲核性很弱

* 以甲醇为标准

2) 相同条件下加压热处理过程中硫苷降解率更高 对相同含水量的样品, 由于加压热处理过程中水分子的活度高于常压热处理过程中水分子的活度, 相应的 OH^- 的活度亦高, 因此加压热处理可增加硫苷降解反应速度, 提高硫苷降解率。

3) 碱在硫苷降解反应中的作用 碱是比 H_2O 更强的亲核试剂(表 4), 因此碱性体系中硫苷降解反应速度高于中性体系。由于 OH^- 参与形成过渡态, 最终成为产物葡萄糖分子中的一个官能团, 因此, OH^- 是反应物, 而不是催化剂。长期以来将 NaOH 、 CaO 等碱性试剂说成催化硫苷降解的催化剂是不确切的。

2.4.2 中间体非糖配基的重排反应 作者根据有机化学理论推测, 非糖配基中间体存在图 3 所示的共振式

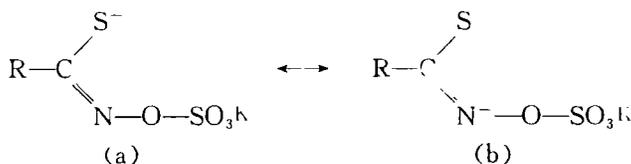
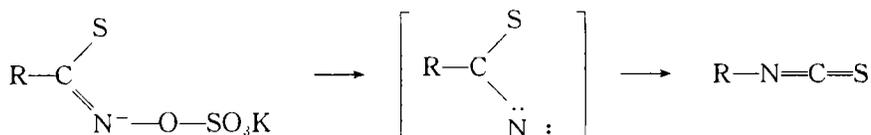
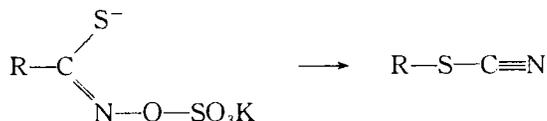


图 3 非糖配基中间体共振式

由于 N 的电负性大于硫(N 3.0, S 2.5), 故上述共振结构式中应以(b)式为主; (b)再继续发生 Hoffmann 重排(或 Lossen 重排)首先生成酰基氮烯, 然后基团 R 带一对电子重排到氮上生成异硫氰酸酯($\text{R}-\text{N}=\text{C}=\text{S}$)



对(a)式而言, R 基团则以正碳离子形式重排到硫上生成硫氰酸酯($\text{R}-\text{S}-\text{C}\equiv\text{N}$)



硫氰酸酯为有大蒜气味的液体, 是一类不稳定的化合物, 在加热条件下很快转化成异硫氰酸酯^[19]



油菜籽加工过程主要是湿热处理过程, 因此, 上述重排机理可解释在硫苷热降解产物中很少检出硫氰酸酯的原因。

2.4.3 E2 消去反应 从有机化学的角度分析, 作者认为脞是通过顺式消去反应生成的, 其反应形式一种可能是硫苷在加热条件下直接发生顺式消去反应, 生成脞。根据 E2 消去反应理论, 发生这种顺式消去反应的机率较小。另一种形式可能是非糖配基中间体发生顺式消去反应, 生成脞和单质 S。由于温度升高有利于消去反应, 因此在硫苷热降解过程中生成相应脞的机率随温度的升高而增加。



参 考 文 献

- 1 钱 和等. 加压条件下油菜籽中非酶降解性质的研究. 无锡轻工大学学报, 1996, 15(1)
- 2 Sosulski F W, et al. J. Agric. Fd Chem. 1984, 32: 1172~1175
- 3 Slominski B A, et al. J. Sci. Fd Agric, 1987, 40: 131~143
- 4 华欲飞等. 无锡轻工业学院学报, 1986, 5(2): 12~20
- 5 Vermorel M, et al. J. Sci. Fd Agric. 1986, 37: 1197~1202
- 6 Ettlinger M G, et al. J. Am. Chem. Soc, 1956, 78: 4172~4173
- 7 Ettlinger M G, et al. J. Am Chem. Soc, 1957, 79: 1764~1765
- 8 Ettlinger M G. Recent Adv. Phytochem. 1968, 1: 59~144
- 9 Marsh R E, et al. Acta Crystalogr, Sect. B 1970, 26: 1030~1037
- 10 刘多敏等. 中国油脂, 1990, (6): 10~15
- 11 刘多敏等. 中国油脂, 1991, (6): 2~6
- 12 Alexander J, et al. Phytachenistry, 1981, 20: 777~980
- 13 梅斯利奇 H[美]著. 有机化学的理论和问题. 胡建平译. 高等教育出版社, 1988
- 14 马奇 J[美]著. 高等有机化学. 陶慎熹等译. 人民教育出版社, 1981
- 15 道格拉斯 C 奈克[美]著. 有机化学. 金奇春等译. 化学工业出版社, 1985
- 16 Richard A Y Jones [英]著. 物理和机理有机化学. 欧育湘等译. 北京理工大学出版社, 1992
- 17 陈子雅. 基础有机化学. 科学出版社, 1986
- 18 井本埴[日]著. 理论有机化学解说. 孙登甲译. 高等教育出版社, 1978
- 19 胡宏纹. 有机化学. 高等教育出版社, 1978

Non-enzymatic Degradation of Glucosinolate in Rapeseed and the Mechanism under Pressure Thermal Treatment

Qian He Diao Hongsun Shen Beiyong

(School of Food Science & Technology)

Abstract The non-enzymatic degradation profile of glucosinolate in rapeseed under pressure thermal treatment was studied, and the related mechanisms were discussed.

Subject-words Bird rape; Glucosinolate; Non-enzymatic Degradation