

文章编号 :1009-038X(2002)06-0630-04

β -谷甾醇异构体的分离和初步鉴定

盛 漪 , 谷文英

(江南大学 食品学院 江苏 无锡 214036)

摘 要 :采用 HPLC 对植物甾醇标准品和甾醇样品进行分离 ,发现一未知组分 .该未知组分随着 β -谷甾醇的富集而增多 .通过 GC-MS 分析鉴定并检索 Wiley 和 Nist 谱库 ,可初步确定该未知组分是 β -谷甾醇的异构体 .

关键词 : β -谷甾醇 ; γ -谷甾醇 ;异构体 ;色谱

中图分类号 :O 629.21

文献标识码 :A

Isolation and Identification of An Isomer of β -Sitosterol

SHENG Yi , GU Wen-ying

(School of Food Science and Technology , Southern Yangtze University , Wuxi 214036 , China)

Abstract : An unknown compound in phytosterol samples and phytosterol standard samples was isolated by HPLC using Symmetry C_{18} column. The quantity of the compound was increased with the enrichment of β -sitosterol. The compound was analyzed by GC-MS and compared with standard diagram from Wiley and Nist standard chart library , it probably was an isomer of β -sitosterol.

Key words : β -sitosterol ; γ -sitosterol ; isomer ; chromatography

甾醇是甾核上 3 位碳原子连接有羟基的甾体化合物 ,它的主体是环戊烷并多氢菲的核 ,在 17 位碳上连接着一条侧链 .由于甾核和侧链上双键数和位置的不同 ,侧链 24 位碳连接的支链的长短、立体位置的差别 ,使甾醇的结构千变万化 ,种数极为繁多 .现在鉴定出来的甾醇有 250 种之多 ,植物油中存在的 128 种得到了明确的鉴定 ,其中有 24 种是最常见的^[1] .在植物甾醇分离提取的工艺研究中 ,最常见的也就是 4 种甾醇 ,其结构式见图 1 .当主环和侧链各有一个双键时 : $R = CH_3$ 时为菜籽甾醇 , $R = C_2H_5$ 时为豆甾醇 ;侧链全氢化无双键时 : $R = CH_3$ 时为菜油甾醇 , $R = C_2H_5$ 时为 β -谷甾醇 .

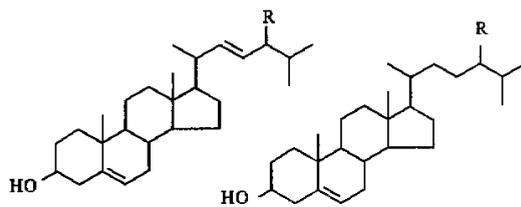


图 1 4 种常见植物甾醇的结构式

Fig.1 The structures of phytosterols

β -谷甾醇在许多植物中已经得到分离和鉴定 ,是一种结构比较明确的谷甾醇 . γ -谷甾醇是 β -谷甾醇的异构体 , C_{24} 的空间排列属于 α 型 , C_{20} 也与 β -谷甾醇不同 ,它是大豆油中主要的一种甾醇^[2] .可是很多研究大豆油甾醇的报导中 ,均未提到发现并鉴

收稿日期 2002-07-08 ; 修订日期 2002-09-12 .

作者简介 :盛漪 (1975-) ,女 ,浙江杭州人 ,粮食、油脂与植物蛋白工程博士研究生 .

万方数据

定出 γ -谷甾醇,而主要的大豆油甾醇只有常见的4种(如图1)。因此作者认为“ γ -谷甾醇是大豆油中主要的一种甾醇”的结论是缺乏实验支持的。

Thompson 研究后指出,人们通常所认为的 γ -谷甾醇是熔点在 $145\sim 147\text{ }^{\circ}\text{C}$ 之间 [$\alpha^{\text{D}} - 36\sim -42\text{ }^{\circ}\text{C}$, C_{24} 的空间排列和 β -谷甾醇异构的甾醇。但经过分离得到的 γ -谷甾醇实际上是菜油甾醇和 β -谷甾醇的混合物,其质量比例在 50:50 到 75:25 之间^[3]。

Nishioka 从大麦胚芽中提取得到的 γ -谷甾醇,熔点在 $143\sim 144\text{ }^{\circ}\text{C}$ 之间 [$\alpha^{\text{D}} - 41\sim -45\text{ }^{\circ}\text{C}$],但经过气相色谱和红外光谱分析,它也是菜油甾醇和 β -谷甾醇的混合物^[4]。

随着分析测试手段的进步,国外对谷甾醇异构体的分离和鉴定已经获得成功,且在标准谱库中可以找到该信息。国内在这方面的研究还很少,作者在研究过程中,发现了 β -谷甾醇异构体的存在,而且很有可能就是 γ -谷甾醇^[5]。

1 材料与方法

1.1 实验材料

植物甾醇原料(甾醇纯度为 87.1%):市售;纯化的 β -谷甾醇产品:作者所在实验室制备;豆甾醇标样(纯度 97.3%) λ -谷甾醇标样(纯度 95.7%)和混合 β -谷甾醇标样(纯度 92.7%) Sigma 公司产品;所用试剂均为分析纯。

1.2 仪器条件

1.2.1 高效液相色谱条件 Waters 600 液相色谱仪, Symmetry C_{18} ($5\text{ }\mu\text{m}$, $3.9\text{ mm}\times 150\text{ mm}$) 色谱柱,柱温 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$,流动相:V(乙腈):V(异丙醇)=75:25,体积流量 $1.0\text{ mL}/\text{min}$;紫外检测器,波长 210 nm ^[6]。

1.2.2 GC-MS 色谱条件 TRAC-MS 气质联用仪;ov-1701 $0.25\text{ mm}\times 30\text{ m}$ 色谱柱;载气:高纯氦气,体积流量 $0.8\text{ mL}/\text{min}$;进样温度 $280\text{ }^{\circ}\text{C}$;柱温 $240\text{ }^{\circ}\text{C}$,每分钟升高 $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ $265\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保持 40 min ;电离方式 EI+;电子能量 70 eV ;接口温度 $250\text{ }^{\circ}\text{C}$;离子源温度 $200\text{ }^{\circ}\text{C}$;检测电压 350 V ;进样量: $0.5\text{ }\mu\text{L}$ 。

1.3 样品配制

将植物甾醇原料和经实验室纯化得到的 β -谷甾醇,准确称取一定的量,用乙醇溶解后定容,市售植物甾醇的质量浓度为 $0.7563\text{ mg}/\text{mL}$,纯化的甾醇样品质量浓度为 $0.8322\text{ mg}/\text{mL}$ 。

标准品也用乙醇溶解后定容,豆甾醇标样的质

量浓度为 $0.7520\text{ mg}/\text{mL}$,混合 β -谷甾醇标样的质量浓度为 $1.360\text{ mg}/\text{mL}$ 。

2 结果与讨论

2.1 HPLC 对甾醇样品的分离

本研究运用 1.2.1 的方法,取得了较好的分离效果。由于色谱柱分离能力较强,发现了 β -谷甾醇异构体的存在。应用该法对 1.3 中的 4 种甾醇样品进行分析,色谱图见图 2~5。

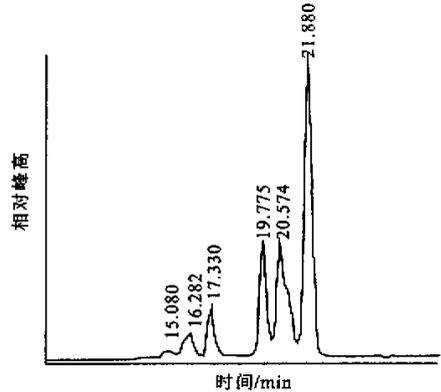


图2 混合 β -谷甾醇标样色谱图

Fig.2 HPLC of blend β -sitosterol standard sample

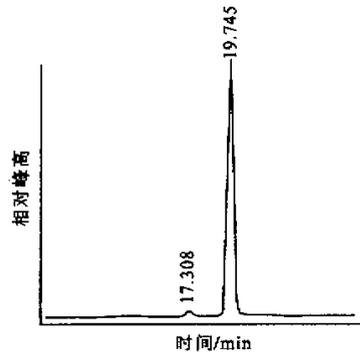


图3 豆甾醇标样色谱图

Fig.3 HPLC of stigmasterol standard sample

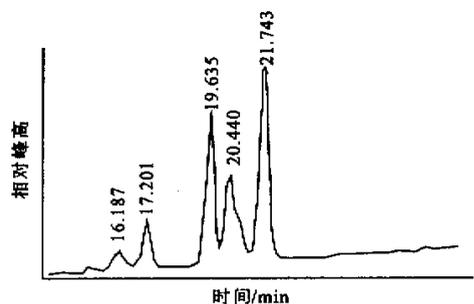
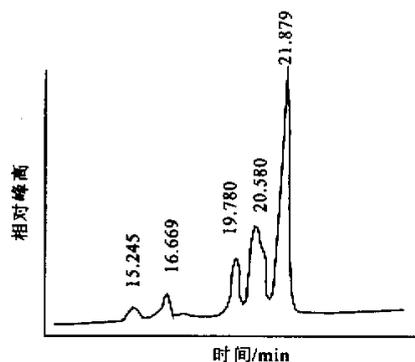


图4 市售甾醇色谱图

Fig.4 HPLC of phytoosterol raw material

图5 β -谷甾醇纯化品色谱图Fig. 5 HPLC of β -sitosterol purified product

标准品中的各个组分可以利用 GC-MS 得到鉴定和确认. 豆甾醇标样中 19.745 min 的峰是豆甾醇 (占 97.36%), 17.308 min 的峰是菜籽甾醇 (收集组分再通过质谱得到确认, 另有纯度较高的 β -谷甾醇标样作参照). 可以据此分析图 2 中的各峰: 最先出峰的两个组分 (15.080 min 和 16.282 min) 因为含量少, 在 GC-MS 中很难检出, 暂时命名为未知峰 1 和 2. 混合 β -谷甾醇标样中的其它组分见表 [7].

未知峰 1 经过收集, 通过 GC-MS 的分析检测, 是带有硅氧基的长链烷烃, 初步确定为色谱柱的柱

流失, 在此不作进一步的研究.

根据标样中各个甾醇的出峰时间, 可以比较容易地确定市售甾醇原料和纯化甾醇中的各峰. 其保留时间比较一致, 对应关系比较清楚 (见表 1). 实验室纯化的产品和原料相比, β -谷甾醇的质量分数有了明显提高, 从 46.21% 提高到 56.46% (用标样定量). 菜油甾醇的含量略有降低, 豆甾醇和菜籽甾醇的含量明显降低. 这些结果和实验目的是一致的. 未知峰 2 的含量相对提高, 它的变化规律与 β -谷甾醇一致, 和其他 3 种甾醇相反. 在所有的实验处理当中, 都呈现出这种规律, 这说明如果未知峰 2 是甾醇的话, 它的性质应该接近 β -谷甾醇.

2.2 β -谷甾醇异构体的初步确定

在 2.1 的分析基础上, 将纯化产品中的未知峰 2 收集起来, 用氮气将溶剂吹干, 得到大约 50 μ g 的未知组分, 加入 2~3 滴的环己酮溶解, 然后根据 1.2.2 的方法对其进行分析. GC-MS 不仅可以给出组分的质谱信息, 而且还可以自动 (或手动) 检索 Wiley、Nist 谱库, 确定化合物的名称、结构和分子式, 并给出相应的匹配度和反匹配度.

未知峰 2 和 β -谷甾醇的质谱信息见图 6 和图 7.

表 1 高效液相色谱图中甾醇组分的保留时间

Tab.1 Retention time of compositions in HPLC

出峰顺序	峰的名称	图 2 各峰 RT/min	图 3 各峰 RT/min	图 4 各峰 RT/min	图 5 各峰 RT/min
1	未知峰 1	15.080			15.245
2	未知峰 2	16.282		16.187	16.669
3	菜籽甾醇	17.330	17.308	17.201	17.605
4	豆甾醇	19.775	19.745	19.635	19.780
5	菜油甾醇	20.574		20.440	20.580
6	β -谷甾醇	21.880		21.743	21.879

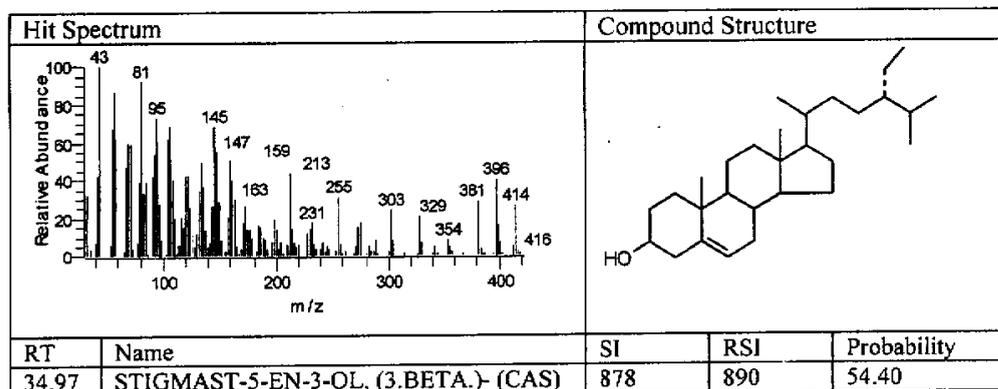
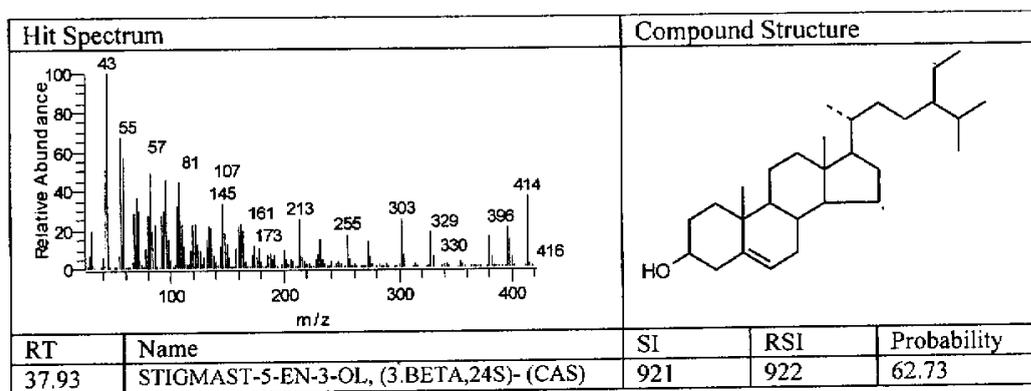


图 6 未知组分的质谱图

Fig.6 MS information of unknown peak two

图 7 β -谷甾醇的质谱图Fig.7 MS information of β -sitosterol

从图 6 和图 7 可以看出,未知峰 2 和 β -谷甾醇的质谱信息和碎片是有差异的.从化合物的标准命名及结构可以基本确定,未知组分是 β -谷甾醇的 C_{24} 位异构体,两者具有相同的相对分子质量和非常相似的结构.差异存在于甾醇侧链的 24 位碳(即连接着乙基的碳原子)出现立体异构.已知 β -谷甾醇的 24 位碳是 β 构型的,即取代基在纸平面的前方.而异构体的 24 位碳是 α 构型的,取代基处在纸平面的背面,即为 γ -谷甾醇.从匹配度和反匹配度来看,样品和谱库中的标准谱图具有相当好的吻合度,这也说明,作者的推测是合理的.

4 结 论

植物甾醇样品中的未知组分经收集制备,GC-MS 检测并检索谱库,初步可以断定其为 γ -谷甾醇.采用 Symmetry C_{18} 色谱柱,柱温 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$,以乙腈-异丙醇 ($V(\text{乙腈}):V(\text{异丙醇})=75:25$) 为流动相,体积流量为 1.0 mL/min , 210 nm 紫外检测,RT 值约为 16.2 min 的组分是 γ -谷甾醇.

致谢 论文研究过程中得到江南大学测试中心诸位老师的帮助.戴军老师在研究思路 and 具体操作方面给予了指导.王利平、袁身淑老师,在一些难点上给予指导.在此一并表示衷心感谢.

参考文献:

- [1] 秋久俊博. 植物油脂中的甾醇成分的研究[J]. 油化学, 1986, 35(9):716-724.
- [2] 肖崇厚. 中药化学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1997. 528-529.
- [3] THOMPSON J, ROBBINS E, BAKER L. The Nonhomogeneity of Soybean- α Gamma-Sitosterol[J]. *Steroids*, 1997, 62(5): 505-512.
- [4] ITSUO NISHIOKA, NOBUO IKEKAWA, AKIRA YAGI. Studies on the plant sterols and triterpenes[J]. *Chem Pharm Bull*, 1998, 48(3): 379-384.
- [5] AKIHISA T, KOKKE W, TAMURA T. Physiology and Biochemistry of Sterols[M]. US: American Oil Chemists' Society, 1991. 172-228.
- [6] JOHN L, TOSHIHIRO A. Analysis of Stero[M]. London: Blackie Academic & Professional Co Ltd, 1997.
- [7] 方涛. 超临界二氧化碳萃取浓缩天然生育酚的研究[D]. 无锡:无锡轻工大学, 2001.

(责任编辑 朱明)