

大豆甾醇及其异构体的分离与鉴定

戴 军^{*1,2} 陈尚卫¹ 方 涛³ 王利平¹ 顾小红¹ 汤 坚^{1,2}

¹(江南大学分析测试中心¹, 食品科学与安全教育部重点实验室², 无锡 214036)

³(Kumamoto University Department of Applied Chemistry and Biochemistry, Kumamoto Japan, 860-8555)

摘 要 筛选出适合分离大豆甾醇的最佳反相色谱柱 Waters symmetry C₁₈ (4.6mm ×250mm)和流动相 (乙腈-异丙醇, 95/5, V/V), 考察了流动相比和柱温对大豆甾醇分离的影响。从大豆甾醇产品中基线分离出豆甾醇、谷甾醇和菜油甾醇及菜籽甾醇这 4 种主要甾醇, 还通过对分离出的其它多个未知峰馏分收集制备后作 GC/MS 分析, 鉴定为 谷甾醇、24- 菜油甾醇、表菜籽甾醇和豆甾醇异构体。在优化的色谱条件下, 利用 HPLC 测定了大豆油和脱臭馏出物及大豆甾醇产品的部分样品中各甾醇组分的含量, 豆甾醇和 谷甾醇的检测限为 14.4 ng 和 10.6 ng, HPLC 测定大豆油样品中这 2 种甾醇的平均回收率为 97.3% 和 96.9%。

关键词 大豆甾醇, 差向异构体, 高效液相色谱, 气相色谱-质谱

1 引 言

植物甾醇具有免疫调节、消炎退热、抗肿瘤、降低血脂和胆固醇、清除自由基及护养皮肤等多种生理功效^[1], 在医药、食品和化妆品及饲料等行业中的应用日益广泛^[2]。对于植物甾醇的分析方法目前主要有气相色谱法 (GC)^[3]、气相色谱-质谱联用法 (GC/MS)^[4]和高效液相色谱法 (HPLC)^[5,6]。但对于大豆甾醇 (即大豆油或其脱臭馏出物或大豆甾醇产品中甾醇组分) 的分析, 因所含甾醇组分及其立体异构较多较复杂, 故已报道的非衍生化 GC 和 HPLC 直接分离效果均不理想, 且 HPLC 一般仅检出豆甾醇、谷甾醇和菜油甾醇^[5-7]。本实验使用多种反相色谱柱和不同流动相在不同柱温条件下, 对从大豆油脱臭馏出物提取精制的混合甾醇产品中的主要甾醇及其异构体进行分离优化, 筛选确定了大豆甾醇的最佳分离柱系统及其它色谱条件, 且检出大豆甾醇产品和大豆油中均含有菜籽甾醇。谷甾醇、豆甾醇、菜油甾醇和菜籽甾醇完全基线分离。通过对分离出的其它多个未知峰馏分收集制备后作 GC/EIMS 分析, 鉴定为 谷甾醇、24- 菜油甾醇、表菜籽甾醇、豆甾醇异构体和 2 个 C₃₀胆甾醇二烯醇异构体及胆甾醇。此结果在以往有关大豆甾醇的 HPLC 分析文献中尚未见报道。本方法较准确地测定了大豆油和脱臭馏出物及精制大豆甾醇产品中各甾醇组分的含量。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Waters 600 高效液相色谱仪, 配 2487 双通道紫外可见光检测器和 M32 色谱工作站 (美国 Waters 公司); Finnigan FRAC-MS 气质联用仪 (美国 Finnigan 公司); R201 真空旋转蒸发器 (上海申科机械研究所产)。豆甾醇和 谷甾醇标准品, 纯度均为 95% (Sigma 公司); 乙腈和异丙醇, 色谱纯 (德国 Merck 公司和江苏汉邦科技有限公司)。其它试剂均为分析纯; 大豆油脱臭馏出物样品 (武汉凯迪精细化工有限公司); 大豆油样为金龙鱼牌大豆色拉油 (上海嘉里粮油工业有限公司); 大豆甾醇产品 1[#]和 2[#]均由本实验室用大豆油脱臭馏出物为原料, 以溶剂结晶法^[8]精制得到。

2.2 实验方法

2.2.1 精制大豆甾醇、大豆油和大豆油脱臭馏出物样品制备 准确称取由大豆油脱臭馏出物精制而成的大豆甾醇样品 50 mg 左右于 50 mL 容量瓶中, 用无水乙醇定容至刻度, 放超声波中振荡 5 min, 使其溶解, 再摇匀, 用 0.45 μm 微孔膜过滤。大豆油 2 g (或脱臭馏出物 1 g) 加 100 mL 浓度为 0.8 mol/L 的

2005-05-22 收稿; 2005-08-23 接受

本文系无锡市 2002 年度科技攻关项目 (No. CG20021013)

NaOH乙醇溶液于 250 mL 烧瓶中, 90 °C 水浴回流 1 h 冷却, 转移至 500 mL 分液漏斗中 乙醚萃取 3 次 (每次 100 mL) 醚相合并 饱和 NaCl 水溶液洗至中性 醚相用无水 Na_2SO_4 干燥后真空蒸发至干 无水乙醇溶解残渣定容 (大豆油 5 mL, 馏出物 25 mL) 0.45 μm 微孔膜过滤。

2.2.2 分离分析条件 液相色谱柱: Waters Symmetry C_{18} , 4.6 mm \times 250 mm (美国 Waters 公司); 流动相: 乙腈/异丙醇 (95/5, V/V); 流速: 1 mL/min; 柱温: 25 ~ 45 °C; 检测波长: 210 nm; 进样体积: 10 μL 。质谱离子化方式: 电子轰击 (EI+); 电子能量: 70 eV; 灯丝发射电流: 150 μA ; 接口温度: 270 °C; 离子源温度: 200 °C; 检测电压: 350 V; 质量范围 (m/z): 33 ~ 640 amu; 气相色谱柱: OV1701, 30 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μm ; 载气 (He) 流量: 0.8 mL/min; 分流比: 12:1; 进样温度: 280 °C; 起始温度: 240 °C; 升温速率: 10 °C/min; 终点温度: 265 °C, 保持 48 min。

3 结果与讨论

3.1 HPLC 柱系统的选择

分别用 $\mu\text{Bondapak C}_{18}$ (3.9 mm \times 300 mm, 10 μm)、Zorbax ODS (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm)、Lichrosphere C_{18} (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm)、Dikma Diamonsil C_{18} (4.6 mm \times 150 mm, 5 μm)、Hypersil ODS (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm)、BDS (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm)、Inertsil ODS-3 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm)、Symmetry C_{18} (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm) 及 Lichrocart $\mu\text{spher STAR RP-18}$ (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm) 多种反相色谱柱, 并分别以甲醇/水、乙腈/水、乙腈/异丙醇为流动相, 分离大豆甾醇产品中各甾醇组分, 结果表明: 在 Symmetry C_{18} 上, 采用乙腈/异丙醇为流动相分离效果最好 (图 1), 且分离度远好于文献^[5,6]报道的类似样品的分离。其它几种反相柱或甾醇与菜油甾醇分不开, 或菜籽甾醇和豆甾醇峰重叠, 或者是菜籽甾醇与表菜籽甾醇重叠, 分离效果均不理想。

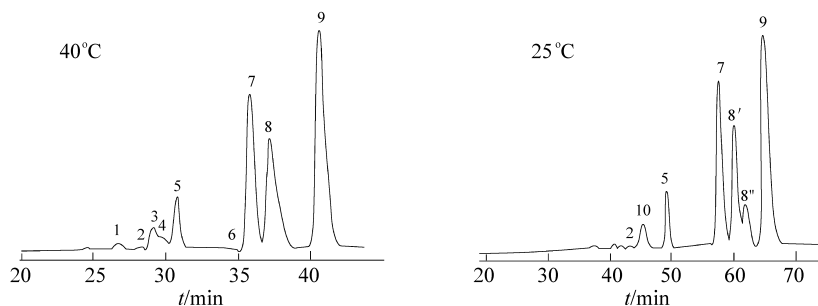


图 1 甾醇样品在 Symmetry C_{18} 柱上 40 和 25 °C 的色谱分离图

Fig 1 Chromatogram of soyasterol sample on Symmetry C_{18} column at 40 °C and 25 °C

流动相 (mobile phase): 乙腈/异丙醇 (acetonitrile/isopropanol) 90/5 (V/V); 流速 (flow rate) 1 mL/min; 进样体积 (injection volume): 10 μL ; 检测波长 (λ): 210 nm。1. 24-异丙基-5 α , 23-胆甾二烯醇 + 24-亚丙基-5 α , 24-胆甾烯醇 ((M) 24-isopropyl-5 α , 23-cholestadien-3 α -ol + (R) cholest-5-en-3 α -ol, 24-propylidene, (3 α)-); 2. 豆甾醇异构体 (isomer of stigmasterol); 3. 表菜籽甾醇 (epibrassicasterol); 4. 谷甾醇 (β -sitosterol); 5. 菜籽甾醇 (brassicasterol); 6. 胆固醇 (cholesterol); 7. 豆甾醇 (stigmasterol); 8. 菜油甾醇 + 24-表菜油甾醇 (campesterol + 24-epimer of campesterol); 9. 谷甾醇 (β -sitosterol); 10. 表菜籽甾醇 + 谷甾醇 (epibrassicasterol + β -sitosterol); 8. 菜油甾醇 (campesterol); 8. 24-表菜油甾醇 (24-epimer of campesterol)。

3.2 流动相溶剂比和柱温对分离的影响

在 Symmetry C_{18} (4.6 mm \times 250 mm) 柱上实验了柱温 40 °C 条件下不同流动相溶剂比 (乙腈/异丙醇) 对上述 5 种甾醇及其异构体的保留值及分离的影响 (见图 2); 还在乙腈/异丙醇的体积比为 95/5 条件下, 考察了不同柱温与甾醇保留值之间的关系 (见图 3)。结果表明: 乙腈/异丙醇溶剂比和柱温均对分离有较大影响。乙腈/异丙醇的最佳体积比为 90/10 或 95/5 (图 2)。在乙腈/异丙醇体积比为 95/5, 柱温为 25 ~ 37 °C 时, 菜油甾醇能分出两个差向异构体 (见图 1 和图 3); 而在同样流动相配比情况下柱温为 40 ~ 45 °C 时, 前一个菜籽甾醇异构体峰 (即表菜籽甾醇, 其定性见 3.3) 可与 谷甾醇部分分离 (见图 1 和图 3, 谷甾醇的定性见 3.3), 在其它柱温条件下均不能分离。

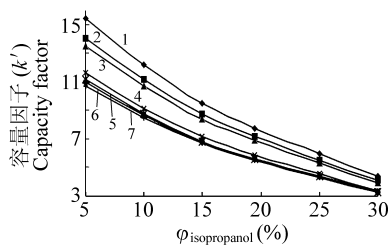


图 2 流动相对比对甾醇分离的影响

Fig 2 Effect of volume proportion of isopropanol in mobile on capacity factor of sterols

1. 谷甾醇 (-sitosterol); 2. 菜油甾醇 (campesterol); 3. 豆甾醇 (stigmaterol); 4. 菜籽甾醇 (brassicasterol); 5. 谷甾醇 (-sitosterol); 6. 表菜籽甾醇 (epibrassicasterol); 7. 豆甾醇异构体 (isomer of stigmaterol)。

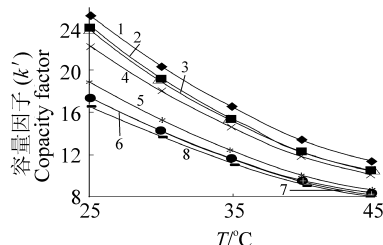


图 3 柱温与甾醇保留值之间的关系

Fig 3 Effect of column temperature on capacity factor of sterols

1. 谷甾醇 (-sitosterol); 2. 24 表菜油甾醇 (24-epimer of campesterol); 3. 菜油甾醇 (campesterol); 4. 豆甾醇 (stigmaterol); 5. 菜籽甾醇 (brassicasterol); 6. 谷甾醇 (-sitosterol); 7. 表菜籽甾醇 (epibrassicasterol); 8. 豆甾醇异构体 (isomer of stigmaterol)。

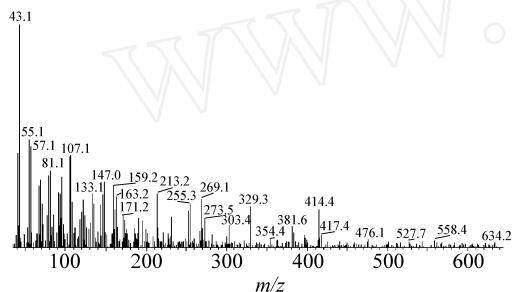


图 4 HPLC制备馏分 4# (谷甾醇)的质谱图

Fig 4 Mass spectrum (MS) of fractions 4# (-sitosterol) obtained with high performance liquid chromatography (HPLC) preparation

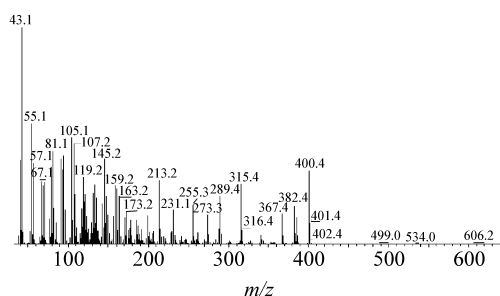


图 5 HPLC制备馏分 8 (24 表菜油甾醇)质谱图

Fig 5 Mass spectrum of fraction 8 (24-epimer of campesterol) obtained with HPLC preparation

3.3 定性分析

1[#]大豆甾醇样是经纯化精制的混合甾醇样品,本实验对该样中各甾醇组分峰进行定性鉴定,其它样品均根据 1[#]样保留时间对照定性。1[#]样品色谱图中 谷甾醇和豆甾醇均据标准品的保留时间对照定性,并收集两色谱峰馏分作 GC/MS分析验证,其结果一致。对于菜油甾醇和菜籽甾醇以及 4种甾醇异构体的峰定性因无标样,故在上述 HPLC分离条件下,多次收集有关馏分,在 70℃水浴上用氮气吹干,加少量无水乙醇溶解残留物,再作 GC/MS分析,并对其总离子流色谱图中有关峰作质谱扫描得到质谱图,并根据 Wiley 6和 Nist 98谱库检索定性,其结果是:(1) HPLC馏分号为 4、5、6的 3个组分分别为 谷甾醇、菜籽甾醇及胆甾醇(见表 1)。其中 谷甾醇的质谱图见图 4。谷甾醇是 谷甾醇的差向异构体, C₂₄的空间排列为 型, C₂₀空间取向也与 谷甾醇不同^[9]。(2) HPLC馏分号为 8, 8的两个组分检索结果均为菜油甾醇,即一对异构体,质谱图相似。根据 Chitwood^[10]和 Ikekawa等^[11]的研究,大多数高等植物甾醇均有 C-24烷基取代基,且 C-24乙基化甾醇大多数为 型差向异构, C-24甲基化甾醇通常为 和 型差向异构体的混合物。文献 [10~12]对人工合成和海洋藻类提取的 C-24烷基化甾醇差向异构体的 HPLC分析结果还表明:在反相柱上 [TSK-GEL ODS, 4.6 mm ×25 cm, 5 μm, 流动相为甲醇/异丙醇], 型异构体出峰在前, 型异构体出峰在后。因此,馏分 8应为 24 菜油甾醇 (campesterol);馏分 8应为 24 表菜油甾醇 (24-epimer of campesterol或 dihydrobrassicasterol),该异构体在大豆甾醇的 HPLC分析文献中未见报道,质谱图见图 5。两者的峰面积比为 65:35,此比例与 Sigma手册^[13]上的来源于大豆的菜油甾醇标准品中 和 异构体标示比例(由 NMR测得)相吻合;(3) HPLC馏分号为 3和 5的两个馏分经 GC/MS分析和谱库检索,结果均为菜籽甾醇,也为一对异构体,质谱图相似。同理由,根据文献 [10~12], 馏分 5应为菜籽甾醇 (brassicasterol, C₂₄为 型);馏分 3应为表菜籽甾醇 (epibrassicasterol, C₂₄为 型),此异构体在大豆甾醇的 HPLC分析文献中也未见报道,质谱图(略)中分

子离子峰 m/z 为 398.4。2[#]馏分的质谱图与豆甾醇相似(图谱略),分子离子峰 m/z 为 412.4,质谱检索结果为豆甾醇(C₂₄为型)的异构体。因为豆甾醇为 C-24 乙基化甾醇,且 2[#]馏分的 HPLC 保留时间在豆甾醇之前(图 1),故根据文献[10~12]推测,2[#]馏分不可能是 24-豆甾醇(stigmasterol),从豆甾醇的立体结构看,它有可能为豆甾醇的 C-22(23)双键的顺式异构体^[10,13]即:24-ethylcholesta-5,22(Z)-dien-3-ol(简称为 22Z-豆甾醇)或豆甾醇的 C-20 差向异构体。1[#]馏分经 GC/MS 分析,呈现 2 个色谱峰,谱库检索的定性结果为:其馏分是一对异构体,即 24-异丙基-5,23-胆甾二烯醇((M)24-isopropyl-5,23-cholestadien-3-ol)和 24-亚丙基-5,24-胆甾二烯醇((R)cholest-5-en-3-ol,24-propylidene,(3)-)。上述谱库检索结果的匹配度均在 850 以上。

表 1 1[#]大豆甾醇样品中未知甾醇组分定性分析结果

Table 1 Qualitative analysis results of unknown compounds in the HPLC fractions of soyaster sample 1[#] by gas chromatography (GC)/MS

液相色谱馏分号 HPLC fraction No *	液相色谱保留时间 HPLC R _T (min)	气质联用保留时间 GC/MS R _T (min)	定性结果 Identification results of EIMS from Wiley 6 and Nist 98 Databases	分子量 MW, Da
1	26.631	35.01	24-异丙基-5,23-胆甾二烯醇 (M)24-isopropyl-5,23-cholestadien-3-ol	426.7
		40.96	24-亚丙基-5,24-胆甾二烯醇 (R)cholest-5-en-3-ol,24-propylidene,(3)-	426.7
2	28.419	42.35	豆甾醇异构体 24-Z-stigmasterol or C-20 epimer of stigmasterol	412.7
3	29.097	30.66	表菜籽甾醇 Epibrassicasterol	398.7
4	29.661	42.70	谷甾醇 -sitosterol	414.7
5	30.715	31.08	菜籽甾醇 Brassicasterol	398.7
6	34.373	27.91	胆甾醇 Cholesterol	386.7
8	59.888	35.96	菜油甾醇 Campesterol	400.7
8	61.807	35.83	24-表菜油甾醇 (24-epimer of campesterol)	400.7

* HPLC 分离制备的色谱条件和馏分号同图 1 (chromatographic conditions and fraction No. of HPLC preparation are the same as in Fig 1)

3.4 甾醇的定量测定

采用外标法定量。标准品只有谷甾醇和豆甾醇。因在化学结构上菜油甾醇和谷甾醇的差异仅在于 C-24 位上前者连接一个甲基,后者连接一个乙基,其它基本骨架和双键的位置及个数均完全相同,即紫外摩尔吸光系数可认为基本相等,因而菜油甾醇和 24-表菜油甾醇可用谷甾醇标样的定量校正因子乘以 0.9662 (菜油甾醇与谷甾醇分子量之比)计算其含量。同理,菜籽甾醇和表菜籽甾醇均可用豆甾醇标样的定量校正因子乘以 0.9660 (菜籽甾醇与豆甾醇的分子量之比)计算含量。谷甾醇和豆甾醇异构体分别按谷甾醇和豆甾醇标样的定量校正因子定量。按此方法测定了部分样品中甾醇组分含量见于表 2。对大豆油样品中的豆甾醇和谷甾醇进行了测定方法的加标回收实验,其平均回收率 ($n=3$) 分别为 97.3% 和 96.9%; 相对标准偏差 (RSD) 分别为 4.7% 和 5.2%。测得豆甾醇和谷甾醇的检出限分别为 14.4 ng 和 10.6 ng。

表 2 部分样品中甾醇组分测定结果 ($n=3$)

Table 2 The determination results of phytosterol components in 4 samples ($n=3$)

组分 Compound (%)	大豆甾醇产品 1 [#] Soyasterol product 1 [#]	大豆甾醇产品 2 [#] Soyasterol product 2 [#]	大豆油 Soybean oil	脱臭馏出物 Deodorizer distillate of soybean oil
谷甾醇 -Sitosterol	25.68	21.4	0.060	1.13
24-表菜油甾醇 24-Epimer of campesterol	5.01	7.4	0.0073	0.21
菜油甾醇 Campesterol	9.31	13.72	0.013	0.39
豆甾醇 Stigmasterol	16.4	19.92	0.023	0.79
菜籽甾醇 Brassicasterol	4.92	2.22	0.013	0.062
表菜籽甾醇 Epibrassicasterol	2.41	2.8	0.0044	0.20
谷甾醇 -Sitosterol	1.25	0.33	0.0010	0.14
豆甾醇异构体 Isomer of stigmasterol	0.22	0.27	0.0028	0.044

4 结 论

应用优化的反相色谱条件从大豆甾醇产品中基线分离出豆甾醇、谷甾醇和油菜甾醇和菜籽甾醇,并对分离出的其它多个未知组分进行 GC/MS 分析,鉴定出大豆甾醇中还含有谷甾醇、24-表菜油甾醇、表菜籽甾醇及豆甾醇异构体等多种甾醇组分。利用 HPLC 定量测定了大豆油和脱臭馏出物及大豆甾醇产品的部分样品中上述甾醇组分的含量。结果表明,样品中均含有多种具有生物活性的植物甾醇成分,本研究建立的 HPLC 方法,分离度较高,定量较准确灵敏。

References

- 1 Bouic P J, Lamprecht J H. *Altern Med Rev*, **1999**, 4: 170
- 2 Wu Shimin (吴时敏), Wu Moucheng (吴谋成). *China Oils and Fats (中国油脂)*, **2002**, 27(3): 60~63
- 3 Lechner M, Reiter B, Lorbeer E. *J. Chromatogr A*, **1999**, 857: 231
- 4 Ng L K, Hupe M. *J. Sci Food Agric*, **1998**, 76: 617
- 5 Wamer K, Mounts T L. *JAOCS*, **1990**, 67(11): 827~831
- 6 Careri M, Elviri L, Mangia A. *J. Chromatogr A*, **2001**, 935: 249~257
- 7 Wu Shiming (吴时敏), Qiu Aiyong (裘爱泳). *Journal of Cereals & Oils (粮食与油脂)*, **1999**, (3): 41~44
- 8 Qiu Aiyong (裘爱泳), Wu Shimin (吴时敏). *China Oils and Fats (中国油脂)*, **1997**, 22(3): 49~50
- 9 Xiao Chonghou (肖崇厚), Yang Songsong (杨松松), Hong Xiaokun (洪筱坤). *Chinese Traditional Drugs Chemistry (中药化学)*, Shanghai (上海): Shanghai Scientific & Technical Publishers (上海科学技术出版社), **1997**: 551~552
- 10 Chitwood D, Patterson G. *J. Liq Chromatogr*, **1991**, 14(1): 151~163
- 11 Ikekawa N, Fujimoto Y, Kadota S, Kikuchi T. *J. Chromatogr*, **1989**, 468: 91~98
- 12 Thompson R H, Patterson G W, Thompson M J, Slover H. *Lipids*, **1981**, 16: 694
- 13 Sigma-Aldrich Co. *Biochemicals and Reagents*, **2002-2003**: 360, 1911

Determination of Soybean Phytosterols by Reversed Phase Chromatography and Gas Chromatography-Mass Spectrometry

Dai Jun^{*1,2}, Chen Shangwei¹, Fang Tao³, Wang Liping¹, Gu Xiaohong¹, Tang Jian^{1,2}

(Testing & Analysis Center of Southern Yangtze University¹, Key Laboratory of Food Science and Safety, Ministry of Education², Wuxi 214036)

³ (Department of Applied Chemistry and Biochemistry, Kumamoto University, Kumamoto, Japan 860-8555)

Abstract The reversed phase chromatographic column Waters symmetry C₁₈ (4.6 mm × 250 mm) and mobile phase consist of acetonitrile-isopropanol (95/5, V/V), suitable to separate soybean phytosterols, was screened out. Effects of solvent ratio of mobile phase and column temperature on the retention behaviors and resolutions of soybean phytosterols were investigated. Four predominant phytosterols in soyasterol products extracted from soybean deodorizer distillate including sitosterol and stigmasterol, campesterol and brassicasterol were baseline resolved, and other unknown components were purified by high performance liquid chromatography and then initially identified by gas chromatography-mass spectrometry as β -sitosterol, epibrassicasterol, dihydrobrassicasterol (24- β -epimer of campesterol) and isomer of stigmasterol. The sterol contents of soybean oil, deodorizer distillate and extracted soyasterol products were determined under optimum chromatographic condition. The detection limits for stigmasterol and β -sitosterol were 14.4 ng and 10.6 ng, and the average quantitative recoveries of the two phytosterols for soybean oil sample were 97.3% and 96.9%, respectively.

Keywords Soyasterol, epimer, high performance liquid chromatography, gas chromatography-mass spectrometry

(Received 22 May 2005; accepted 23 August 2005)