



气相色谱法测定植物甾醇发酵液中雄甾烯酮和植物甾醇的含量

陈 滢, 申雁冰, 孟婧垚, 王 敏

(天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 采用气相色谱仪建立了一个同时测定植物甾醇发酵液中雄甾-4-烯-3,17-二酮 (Androst-4-ene-3,17-dione, 4-AD)、雄甾-1,4-二烯-3,17-二酮 (Androst-1,4-diene-3,17-dione, ADD) 和植物甾醇含量的外标分析方法. 发酵液经离心后, 二氯甲烷提取, 可直接进样分析. 气相色谱条件为: FID 检测器, SE-54 型 (15 m×0.25 mm×0.25 μm) 毛细管柱; 柱温 260 °C, 进样口和检测器温度均为 300 °C; 载气为高纯 N₂, 流速 1 mL/min. 在实验条件下, 发酵液中各主要成分和杂质分离良好. 结果表明: 4-AD、ADD 和植物甾醇各组分的浓度与 Ai/As 的线性范围 4-AD 为 0.5~4 g/L ($R=0.9999$); ADD 为 0.5~4 g/L ($R=0.9992$); 菜籽甾醇为 0.09~0.86 g/L ($R=0.9991$); 菜油甾醇为 0.14~1.39 g/L ($R=0.9995$); 豆甾醇为 0.03~0.27 g/L ($R=1$); 谷甾醇为 0.24~2.4 g/L ($R=0.9991$), 平均回收率 4-AD、ADD 和上述植物甾醇依次为 (96.37±0.77)%, (95.64±1.01)%, (99.6±2.78)%, (98.66±2.19)%, (96.85±2.19)%, (97.52±2.9)%. 该方法具有步骤简单、重现性好、准确度和灵敏度高的特点.

关键词: 气相色谱; 雄甾-4-烯-3,17-二酮; 雄甾-1,4-二烯-3,17-二酮; 植物甾醇; 发酵液

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 1672-6510 (2008) 01-0017-04

Determination of 4-AD, ADD and Phytosterols in Culture of Transformable Phytosterol by Gas Chromatographic

CHEN Ying, SHEN Yan-bing, MENG Jing-yao, WANG Min

(Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: A gas chromatography (GC) method for the simultaneous determination of Androst-4-ene-3,17-dione (4-AD), Androst-1,4-diene-3,17-dione (ADD) and phytosterols from a culture of transformable phytosterols is described. The samples were quantitated by external standard method, and they were separated by GC with SE-54 capillary column and detected by FID. The column was operated at 260 °C, with the injector at 300 °C and the carrier gas was nitrogen, flowing at a rate of 1 mL/min. Under the conditions, all contents of culture are well separated and rectilinear responses are obtained in the range of 0.09~0.86 g/L (stigmasterol), 0.14~1.39 g/L (campesterol), 0.03~0.27 g/L (brassicasterol), 0.24~2.4 g/L (β -sitosterol), 0.5~4 g/L (4-AD) and 0.5~4 g/L (ADD). The correlation coefficients (R) are 0.9991, 0.9995, 1, 0.9991, 0.9999 and 0.9992 respectively. Recoveries of 4-AD, ADD and phytosterols added to culture are (96.37±0.77)%, (95.64±1.01)%, (99.6±2.78)%, (98.66±2.19)%, (96.85±2.19)%, (97.52±2.9)%. The method is accurate rapid and suitable for routine analysis.

Keywords: gas chromatography; Androst-4-ene-3,17-dione; Androst-1,4-diene-3,17-dione; phytosterol; fermentation fluid

收稿日期: 2007-06-18; 修回日期: 2007-10-08

基金项目: 天津市应用基础研究重点基金资助项目 (043802511)

作者简介: 陈 滢 (1981—), 女, 天津人, 硕士研究生.

雄甾-4-烯-3, 17-二酮 (Androst-4-ene-3, 17-dione, 4-AD) 和雄甾-1, 4-二烯-3, 17-二酮 (Androst-1, 4-diene-3, 17-dione, ADD) 是合成甾体激素药物的主要医药中间体. 近年来, 由于薯蓣皂素资源的日渐枯竭, 不少学者致力于研究用植物甾醇为原料, 通过生物技术的方法制取 4-AD 和 ADD. 图 1 为植物甾醇为植物甾醇的侧链降解反应式, 植物甾醇为多种甾醇的混合物 (主要成分包括: β -谷甾醇、豆甾醇、菜油甾醇和少量的菜籽甾醇等), 是油料工业的副产物^[1];

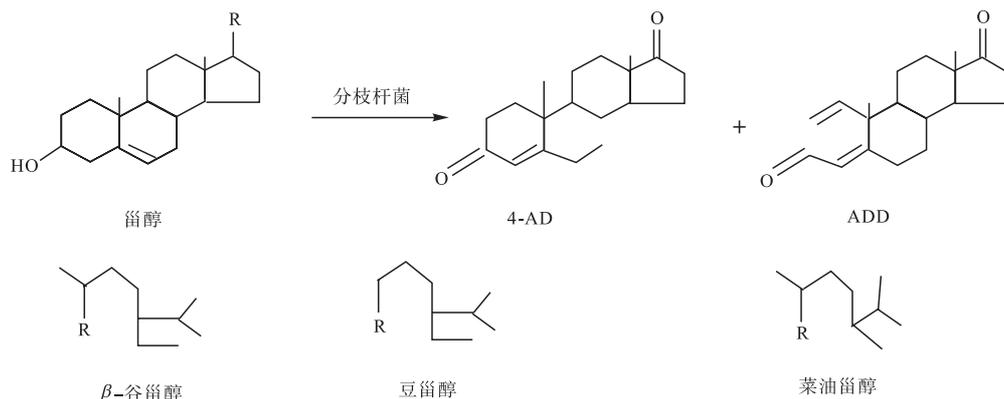


图 1 植物甾醇侧链的生物降解反应

Fig. 1 Side chain degradation reaction of phytosterols by *Mycobacterium sp.*

1 材料与方法

1.1 仪器及色谱条件

1.1.1 仪器

GC-7890II 气相色谱仪, FID 检测器、T2000 色谱工作站, TECHCOMP 公司; Heidolph 旋转蒸发仪.

1.1.2 色谱条件

色谱柱: SE-54 型 (15 m × 0.25 mm × 0.25 μm) 毛细管柱; 载气: 氮气 1 mL/min; 进样口温度: 300 °C; 检测器温度: 300 °C; 柱温: 260 °C; 进样量: 1 μL, 分流比 50 : 1.

1.2 材料及试剂

1.2.1 材料

植物甾醇标准品 (谷甾醇 48.12%、菜油甾醇 27.85%、豆甾醇 5.37%、菜籽甾醇 17.10%), 陕西天维生物制品有限公司; 4-AD 标准品, 天津市津津药业有限公司; ADD 标准品, SIGMA 公司.

1.2.2 试剂

二氯甲烷、乙酸乙酯、环己烷试剂均为分析纯, 天津市元立化工有限公司.

产物 4-AD 与 ADD 仅在 C₁₂ 位上存在单键与双键的差别.

在植物甾醇的分析方法中, 文献报道的主要有薄层层析法^[2]、气相色谱法^[3,4]、高效液相色谱法^[5]及毛细色谱法等^[6], 其中以气相色谱法最为简便与准确. 本文采用气相色谱仪, 试图建立一种可同时测定植物甾醇发酵液中转化产物 4-AD, ADD 和转化底物植物甾醇含量的外标方法, 为植物甾醇微生物发酵工艺的优化和生产过程分析与控制奠定基础.

1.2.3 标准溶液

精确称取植物甾醇标准品 3.750 0 g, 置于 50 mL 容量瓶中, 用二氯甲烷溶解并稀释至刻度, 得到植物甾醇浓度为 75.00 mg/mL 的标准品储备液, 精密吸取标准品储备液 2.00, 3.00, 4.00 mL 于 25 mL 容量瓶中, 用二氯甲烷溶解并稀释至刻度, 得梯度浓度的植物甾醇标准品溶液.

精确称取雄甾烯酮标准品 12.500 0 g (精确到 0.000 1 g), 置于 50 mL 容量瓶中, 用二氯甲烷溶解并稀释至刻度, 得到雄甾烯酮浓度为 250.00 mg/mL 的标准品储备液. 精密吸取标准品储备液 2.00, 5.00, 8.00 mL 于 25 mL 容量瓶中, 用二氯甲烷溶解并稀释至刻度, 得梯度浓度的雄甾烯酮标准品溶液.

1.3 植物甾醇的侧链降解发酵工艺

采用一级转化工艺^[7].

1.4 样品的制备

量取 50 mL 发酵液, 置于 250 mL 圆底烧瓶中, 加入 30 mL 二氯甲烷, 在水浴上回流 30 min. 冷却后移至 250 mL 分液漏斗中, 振荡, 静置后取下层有机相, 上层水相用二氯甲烷重复提取两次, 每次 10 mL, 合并提取液, 于旋转蒸发仪中真空浓缩, 得粗

品. 加入 2 mL 二氯甲烷溶解, 制备得到待测样品.

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择

植物甾醇、雄甾烯酮均系弱极性物质, 常采用 AC-5 型色谱柱^[8]. 本文采用的是 SE-54 型 (15 m × 0.25 mm × 0.25 μm) 毛细管柱, 甾醇和雄甾烯酮等甾体化合物得到有效分离, 色谱图见图 2 和图 3. 由图 2 各种甾体化合物标准品的气相色谱图谱可知, 植物甾醇各组分离甾醇、菜油甾醇、豆甾醇和谷甾醇的保留时间分别为: 7.578、8.654、9.270、10.510 min; 4-AD 和 ADD 的保留时间分别为 2.782、3.061 min.

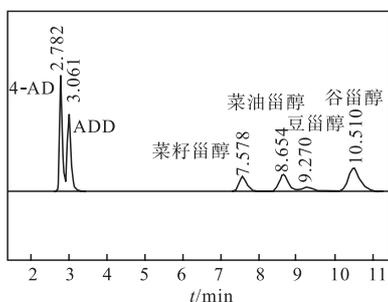


图 2 甾体化合物标准品色谱图

Fig. 2 Chromatogram of the sterol standards

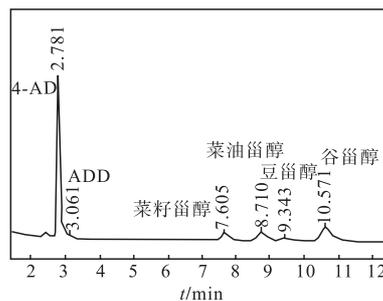


图 3 发酵液样品色谱图

Fig. 3 Chromatogram of the culture fluid sample

2.2 线性关系实验

按照 1.2.3 中标准溶液的制备方法配制溶液, 取 1 μL 进样. 根据峰面积 (Y) 和浓度 (X) 关系绘制标准曲线. 各组分浓度线性范围、回归方程以及相关系数结果见表 1. 从表中看出, 4-AD、ADD 和植物甾醇各组分在其各自线性范围内线性关系良好.

表 1 4-AD、ADD 和植物甾醇各组分的线性关系

Tab. 1 Linear correlation of 4-AD, ADD and Phytosterols

组分	线性范围 /g·L ⁻¹	回归方程	相关系数
菜籽甾醇	0.09~0.86	Y = 392757 X - 939.81	0.999 1
菜油甾醇	0.14~1.39	Y = 313136 X - 1162	0.999 5
豆甾醇	0.03~0.27	Y = 454642 X - 106	1.000 0
谷甾醇	0.24~2.40	Y = 360708 X - 2993.2	0.999 1
4-AD	0.50~4.00	Y = 409774 X - 3394	0.999 9
ADD	0.50~4.00	Y = 454268 X - 7974.2	0.999 2

2.3 回收率实验

取 50mL 空白发酵液, 分别加入 4-AD 和 ADD 各 0.075 g、植物甾醇 0.150 g, 采用与待测样品相同的预处理方法制备样品, 重复测定 6 次. 结果见表 2.

表 2 样品的回收率

Tab. 2 Recovery of the samples

编号	回收率/% (n=6)					
	4-AD	ADD	菜籽甾醇	菜油甾醇	豆甾醇	谷甾醇
1	95.53	95.46	98.15	96.25	98.43	99.27
2	96.06	94.46	95.59	97.12	92.61	95.65
3	97.20	95.36	97.94	99.27	97.62	98.69
4	95.56	95.26	102.60	98.16	96.54	101.88
5	97.23	97.50	101.30	102.56	98.37	95.34
6	96.64	95.79	102.00	98.62	97.53	94.29
平均回收率/%	96.37	95.64	99.6	98.66	96.85	97.52
标准差/%	0.77	1.01	2.78	2.19	2.19	2.90
变异系数/%	0.80	1.06	2.80	2.22	2.26	2.97

2.4 精密度实验

精密吸取标准品溶液 2.00μL, 分别重复进样 5 次, 计算 4-AD、ADD 的 RSD 分别为 4.6% 和 6.3%; 菜籽甾醇、菜油甾醇、豆甾醇、谷甾醇的 RSD 分别为

5.7%、6.1%、7.5%、6.8%.

2.5 检出限

采用上述色谱工作条件, 根据各部分的线性关系, 当进样量为 1 μL 时, 4-AD、ADD、菜籽甾醇、菜

油甾醇、豆甾醇和谷甾醇的最低检出浓度（以3倍噪音比计算）分别为14.64, 1.32, 1.53, 1.92, 1.32和1.67 ng · mL⁻¹。

2.6 重现性实验

取同一个发酵液样品,按1.4节所述方法对样品进行处理,重复测定样品5次,4-AD、ADD平均含量的RSD分别为3.7%和4.8%;菜籽甾醇、菜油甾醇、豆甾醇、谷甾醇的RSD分别为4.1%、2.6%、5.1%、3.9%,说明建立的气相色谱外标分析方法重现性

良好。

2.7 检测方法专属性的评价

取未加入植物甾醇底物的空白发酵液,同法操作进行测定,色谱图显示,基线基本水平,无明显出峰。可见空白发酵液中无其他杂质干扰,此方法专属性较好。

2.8 样品测定

取不同发酵液4批次,按上述方法测试,定量结果见表3。

表3 样品的测定结果

Tab. 3 Determination result of samples in culture solution

编号	ADD/g · L ⁻¹	4-AD/g · L ⁻¹	菜籽甾醇/g · L ⁻¹	菜油甾醇/g · L ⁻¹	豆甾醇/g · L ⁻¹	谷甾醇/g · L ⁻¹
1	0.542 2	0.118 0	0.072 0	0.114 5	0.027 7	0.214 8
2	0.449 1	0.874 9	0.126 1	0.106 3	0.243 9	-
3	0.559 2	-	0.064 4	0.096 3	0.023 0	0.188 1
4	0.806 6	-	0.134 4	0.215 7	0.040 0	0.211 2

3 结 论

采用气相色谱法(GC)测定分枝杆菌发酵液中底物植物甾醇和产物4-AD(ADD)的含量。实验结果表明该方法选择性好,分离效率高,灵敏度高,分析速度快,大大简化了实验操作过程。实验证明该方法可以较好地用于发酵液中植物甾醇和4-AD(ADD)的含量测定。

在以往查阅的文献中,大都使用GC法中的内标法测定含量,但内标法找到合适的内标物很困难,且制样要求很高,给实验操作带来较大不便,因此,本文采用外标法来测定分枝杆菌发酵液中底物植物甾醇和产物雄甾烯酮4-AD(ADD)的含量。对于大量的分析样品,采用外标法是比较合适的。外标曲线的斜率实际就是定量校正因子,所以,在定量时除了计量要准确,样品纯度要高,其他影响色谱峰面积的因素都会直接影响校正因子。因此要求色谱操作条件稳定,并及时对校正因子进行校正。

参 考 文 献:

[1] 今田幸男,新田一诚.甾族化合物的发酵工业[J].发

酵工业,1984,38(12):21.

[2] Marsh A, Clark B, Altria K. Oil-in-Water Microemulsion high performance liquid chromatographic analysis of pharmaceuticals [J]. *Chromatographia*, 2004, 59(9): 531—542.

[3] Liu R, Zhou J L, Wilding A. Simultaneous determination of endocrine disrupting phenolic compounds and steroids in water by solid-phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1022(1): 179—189.

[4] Onuchak L A, Kudryashov S Y, Arutyunov Y I. Influence of flow parameters of the mobile phase on the retention and thermodynamic characteristics of sorption in gas-liquid chromatography [J]. *Russian Journal of Physical Chemistry*, 2006, 80(8): 1315—1320.

[5] Matsuoka C, Nohta H, Kuroda N, et al. Simultaneous determination of cholestanol and cholesterol in human serum by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection [J]. *J Chromatogr Biomed Appl*, 1985, 42(14): 432.

[6] Muskiet F A J. Capillary gas chromatographic profiling of total long chain fatty acids and cholesterol in biological materials [J]. *J Chromatogr Biomed Appl*, 1983, 29(9): 231.

[7] 袁东超,董艳琴,杜连祥.分枝杆菌降解大豆甾醇侧链的发酵研究[J]. *天津科技大学学报*, 2003, 18(4): 11—13.