

大豆油脱臭馏分重相组分中甾醇酯的柱层析法分离提取

张沁强, 陈竞男, 姚双燕, 窦伟国, 彭丹, 毕艳兰

(河南工业大学粮油食品学院, 郑州 450001)

摘要:为减少甾醇酯的生产工序, 提高大豆油脱臭馏分重相组分中总甾醇得率, 采用柱层析法直接分离提取甾醇酯, 通过单因素试验考察吸附剂种类、上样量、洗脱剂比例和柱长直比(填料高度与直径比)对甾醇酯产品纯度和得率的影响, 确定最佳工艺条件, 并对最佳工艺条件下分离提取的甾醇酯产品进行傅里叶红外光谱表征, 以及甾醇组成和脂肪酸组成测定。结果表明, 柱层析法分离提取甾醇酯的最佳工艺条件为吸附剂为硅胶(粒径 50~75 μm), 上样量 0.5 g, 洗脱剂比例为正己烷、乙醚、冰乙酸体积比 95:5:1, 柱长直比 16:1。在最佳工艺条件下, 甾醇酯产品纯度为(89.90 \pm 0.94)%, 得率为(96.15 \pm 1.49)%; 傅里叶红外光谱分析证实提取的产品中含甾醇酯, 甾醇酯上的甾醇组成主要为 β -谷甾醇、豆甾醇、菜油甾醇, 脂肪酸组成主要为亚油酸、油酸、棕榈酸、硬脂酸和亚麻酸。综上, 柱层析法无需复杂工序, 即可实现大豆油脱臭馏分重相组分中甾醇酯的有效回收。

关键词:大豆油脱臭馏分; 重相组分; 甾醇酯; 柱层析

中图分类号: TS229; TS218

文献标识码: A

文章编号: 1003-7969(2024)02-0108-06

Separation and extraction of sterol esters by column chromatography from the waste residue of soybean oil deodorizer distillate

ZHANG Qinqiang, CHEN Jingnan, YAO Shuangyan,

DOU Weiguo, PENG Dan, BI Yanlan

(College of Food Science and Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: In order to reduce the process of sterol ester production and increase the yield of total sterols in the waste residue of soybean oil deodorizer distillate (WRSODD), column chromatography was used to extract the sterol esters from WRSODD. The influence of absorbent type, sample loading amount, eluent ratio and ratio of column material height to diameter on the recovery rate and purity of sterol esters were examined by single factor experiment, and the optimum process conditions were selected. The sterol esters obtained under the optimum process conditions was analyzed by Fourier-infrared spectroscopy, and its sterols and fatty acid compositions were analyzed. The results showed that the optimum conditions were as follows: with silica gel powder (particle size 50-75 μm) as absorbent, sample loading amount 0.5 g, volume ratio of a mixture of *n*-hexane, diethyl ether and glacial acetic acid 95:5:1, and ratio of column material height to diameter 16:1. Under these conditions, the purity and recovery rate of sterol esters were (89.90 \pm 0.94)% and (96.15 \pm 1.49)%, respectively. Fourier-infrared spectroscopy results verified that the product contained sterol esters. The sterol compositions of sterol esters were mainly β -sitosterol, stigmasterol and campesterol. The fatty acid compositions were palmitic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid and linolenic acid. In conclusion, effective recovery of sterol esters from the waste residue of soybean oil deodorizer distillate can be achieved through column chromatography without complex process.

Key words: soybean oil deodorizer distillate; waste residue; sterol esters; column chromatography

收稿日期: 2022-11-07; 修回日期: 2023-09-27

作者简介: 张沁强(1997), 男, 在读硕士, 研究方向为脂质化学与品质(E-mail) zhangqinqiang1111@163.com。

通信作者: 毕艳兰, 教授(E-mail) bylzry@126.com。

植物甾醇是一类以环戊烷全氢菲为基本骨架的天然活性物质^[1], 通常以游离态、酯态、糖苷等形式存在于种子、谷物、坚果、蔬菜、水果、植物油等植物

性食品中^[2]。植物甾醇具有降低血清中总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇的浓度、预防心脑血管疾病、抗氧化、抗炎、免疫调节等生理功能^[3-6],被广泛应用于医药、食品等行业^[7-8]。

植物甾醇的主要来源有植物油脂精炼脱臭工段的脱臭馏分^[7,9]、工业生产的下脚料浮油^[10]及酿酒工业中的发酵废弃物^[11]等。工业上利用大豆油脱臭馏分提取活性成分主要是将大豆油脱臭馏分经甲酯化处理后,采用分子蒸馏法蒸馏出脂肪酸甲酯、生育酚和游离甾醇等相对挥发度较大的物质,而未蒸馏出的组分称之为重相组分。甾醇酯因其相对分子质量大、沸点高、相对挥发度小而流失于重相组分中^[12],造成甾醇酯资源的严重损失。

目前工业上对重相组分中的甾醇酯回收主要采用皂化处理后得到游离态甾醇,再通过重结晶的方法回收^[13]。由于C-7位羟基的存在,游离态甾醇溶解性较差,生物利用度不高,极大地限制了其应用。因此,工业上常将游离甾醇与脂肪酸通过化学法、酶法等方法酯化合成甾醇酯^[14-15],再对甾醇酯进行纯化处理。这种皂化、再酯化合成、纯化的方法不仅加工工艺烦琐,而且增加生产成本与工业废水排放。目前,柱层析法多用于合成甾醇酯的分离纯化及油脂中甾醇酯的分离提取^[16-18],而直接采用柱层析对大豆油脱臭馏分重相组分中的甾醇酯进行回收尚未有研究报道。

本文采用柱层析法对大豆油脱臭馏分重相组分中的甾醇酯进行分离提取,旨在找到一种从大豆油脱臭馏分重相组分中直接分离提取甾醇酯的工艺,以减少甾醇酯的生产工序,提高总甾醇得率,避免资源浪费。

1 材料与方法

1.1 试验材料

大豆油脱臭馏分重相组分,河南阳光油脂有限公司;大豆甾醇标准品(纯度95%,其中 β -谷甾醇45%、菜油甾醇26%、豆甾醇24%、菜籽甾醇4%),武汉远成共创科技有限公司;胆固醇油酸酯标准品,阿拉丁试剂(上海)有限公司;正己烷、氢氧化钾、冰乙酸、无水乙醇,均为分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司;乙醚,分析纯,四川西陇科学股份有限公司;中性氧化铝(粒径75~150 μm 、50~75 μm)、硅胶粉(粒径75~150 μm 、50~75 μm),青岛海洋化工有限公司;正己烷、乙腈、异丙醇,均为色谱纯,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;丙酮,色谱纯,四川西陇科学股份有限公司。

层析柱(60 cm \times Φ 3 cm),郑州创新玻璃厂;电

子天平,赛多利斯科学仪器有限公司;IKA 旋转蒸发器,艾卡(广州)仪器设备有限公司;DZ-1BC II 真空干燥箱,天津泰斯特仪器有限公司;2695 高效液相色谱(HPLC)仪,美国 Waters 公司;GC7890 气相色谱仪,安捷伦科技有限公司;傅里叶红外光谱仪,美国 Nicolet 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 大豆油脱臭馏分重相组分薄层色谱(TLC)分析

参照文献[19],以大豆甾醇和胆固醇油酸酯标准品为对照,硅胶为固定相,正己烷-乙醚-冰乙酸混合溶液(体积比80:20:2)为展开剂,三氯化锑为显色剂,对重相组分进行 TLC 分析。

1.2.2 柱层析法分离提取甾醇酯及其定性定量分析

1.2.2.1 柱层析法分离提取甾醇酯工艺

称取一定质量的重相组分置于圆底烧瓶中,加入适量正己烷溶解后,加入吸附剂(重相组分与吸附剂质量比为1:4),混合均匀,旋蒸脱溶后,使重相组分均匀吸附在吸附剂上。采用湿法装柱,待吸附剂柱面平整且柱高不变时,用一定比例洗脱剂(正己烷-乙醚-冰乙酸混合溶液)平衡柱子至柱床均匀、透明、无气泡。将吸附重相组分的吸附剂缓慢加入层析柱,保持柱面平整,以洗脱剂洗脱,收集洗脱液。以胆固醇油酸酯标准品作对照,对洗脱液进行 TLC 分析,合并与对照组分相同的洗脱液至已恒重的圆底烧瓶中,旋蒸脱溶,真空干燥至恒重,得到甾醇酯产品。

1.2.2.2 甾醇酯产品的定性分析

将胆固醇油酸酯标准品和1.2.2.1得到的甾醇酯产品分别用色谱级正己烷定容至10 mL,经0.45 μm 微孔滤膜过滤,进高效液相色谱仪分析,以保留时间定性。HPLC 条件:硅胶色谱柱(5 μm \times 4.6 mm \times 250 mm);流动相为正己烷-异丙醇(体积比20:1),等度洗脱,流速0.8 mL/min;进样量10 μL ;柱温30 $^{\circ}\text{C}$;紫外检测波长210 nm。

1.2.2.3 甾醇酯产品的定量分析

大豆甾醇标准曲线绘制:准确称取0.010 0 g 大豆甾醇,用丙酮配制成质量浓度分别为5、10、25、50、100、250、500、1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准溶液,经0.45 μm 微孔滤膜过滤,反相 HPLC 分析。以大豆甾醇质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制大豆甾醇的标准曲线。反相 HPLC 条件:C18 色谱柱(5 μm \times 6 mm \times 250 mm);进样量10 μL ;柱温30 $^{\circ}\text{C}$;采用等度洗脱,流动相为丙酮-乙腈溶液(体积比3:1),流速

1.0 mL/min;紫外检测波长 210 nm。

样品的测定:精确称取 0.100 0 g 甾醇酯产品至圆底烧瓶中,加入 10 mL 1 mol/L 氢氧化钾-乙醇溶液皂化反应 1.5 h 后,加蒸馏水终止反应。正己烷萃取 3 次,旋蒸脱溶后,加入丙酮复溶,定容于 25 mL 容量瓶中,待反相 HPLC 检测。通过大豆甾醇标准曲线,计算甾醇酯产品中甾醇的质量浓度。甾醇各组分通过保留时间定性、峰面积归一法定量。按式(1)、式(2)计算甾醇酯产品的纯度(P)和得率(R)。

$$P = \frac{CV \times 10^{-6} \times M_2}{M_1 W} \times 100\% \quad (1)$$

$$R = \frac{WP}{LB} \times 100\% \quad (2)$$

式中: C 为根据标准曲线计算的甾醇的质量浓度, $\mu\text{g/mL}$; V 为定容体积, mL; M_1 为游离甾醇平均摩尔质量, g/mol; M_2 为甾醇酯平均摩尔质量, g/mol; W 为称取的甾醇酯产品的质量, g; L 为上样量, g; B 为大豆脱臭馏分重相组分中甾醇酯的含量。

1.2.3 甾醇酯产品的红外光谱分析

采用傅里叶红外光谱仪,全反射光谱测定法(ATR)对甾醇酯产品进行分析。分析条件:采样 32 次,扫描范围 400 ~ 4 500 cm^{-1} 。

1.2.4 甾醇酯产品的脂肪酸组成分析

按照陈帅等^[20]的方法,对甾醇酯产品进行皂化,向皂化液中加入过量浓盐酸,使用乙醚萃取 3 次,萃取液浓缩后进行 TLC 分离,得到游离脂肪酸色谱带,采用乙醚萃取 3 次,得到脂肪酸。再按照 GB 5009.168—2016 进行甲酯化处理后,采用气相色谱检测脂肪酸组成。

气相色谱条件:SGEBPX-70 色谱柱(30 m \times 250 μm \times 0.25 μm);进样口温度 250 $^{\circ}\text{C}$;分流比 50:1;FID 检测器温度 250 $^{\circ}\text{C}$;氢气流量 40 mL/min;空气流量 400 mL/min;升温程序为柱箱初始温度

170 $^{\circ}\text{C}$,以 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 210 $^{\circ}\text{C}$,保持 20 min;载气为氮气,流速 1.0 mL/min;进样量 1.0 μL 。

1.2.5 数据处理

所有试验重复 3 次。采用 SPSS 数据处理软件进行统计分析,数据结果用“平均值 \pm 标准偏差($\bar{x} \pm s$)”表示。使用 Origin 软件绘图。

2 结果与讨论

2.1 大豆油脱臭馏分重相组分 TLC 分析

大豆油脱臭馏分重相组分的 TLC 分析结果如图 1 所示。

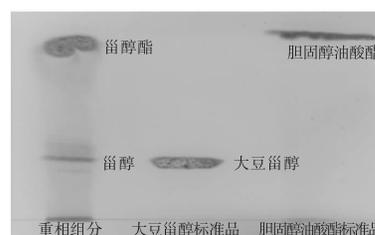


图 1 大豆油脱臭馏分重相组分的 TLC 图

由图 1 可知,大豆油脱臭馏分重相组分主要呈现 2 条清晰的色带。参考吴敦汉等^[19]的研究结果可知,甾体类物质经三氯化锑显色后呈红紫色,综合对照胆固醇油酸酯、大豆甾醇标准品在 TLC 中的位置和颜色后,可判断重相组分的 2 条色带为甾醇酯($R_f = 0.75$)和甾醇($R_f = 0.15$)。从图 1 还可以看出,甾醇酯和甾醇与杂质的分离效果好,因此可以通过柱层析法对甾醇酯进行分离。刮下甾醇酯和甾醇条带,分别用正己烷和乙醚提取,再按照 1.2.2.3 的方法对甾醇酯及游离甾醇含量进行测定,最终确定重相组分中甾醇酯含量约为 51%,游离甾醇含量约为 8%。

2.2 甾醇酯产品的定性分析

按照 1.2.2.2 的方法,以胆固醇油酸酯作为标准品,将柱层析法分离得到的甾醇酯产品进行 HPLC 分析,结果如图 2 所示。

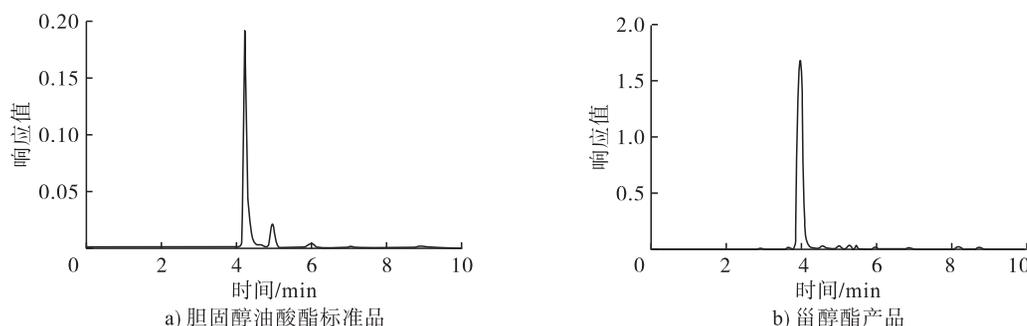


图 2 胆固醇油酸酯标准品和甾醇酯产品的 HPLC 图

由图 2 可知,甾醇酯产品出峰时间与胆固醇油

酸酯标准品出峰时间均在 4 min 左右,说明分离的

产品为甾醇酯。

2.3 甾醇酯产品的定量分析

按照 1.2.2.3 的方法,所得大豆甾醇标准曲线回归方程为 $y = 3\,042.6x + 10\,012$, $R^2 = 0.999\,9$,说明方程拟合效果好,可用于游离甾醇的定量分析。大豆甾

醇标准品和甾醇酯产品的 HPLC 分析如图 3 所示。

由图 3 可知,甾醇酯产品中甾醇的组成主要为 β -谷甾醇、豆甾醇、菜油甾醇,其相对含量分别为 $(55.36 \pm 0.16)\%$ 、 $(25.95 \pm 0.12)\%$ 、 $(18.59 \pm 0.26)\%$ 。

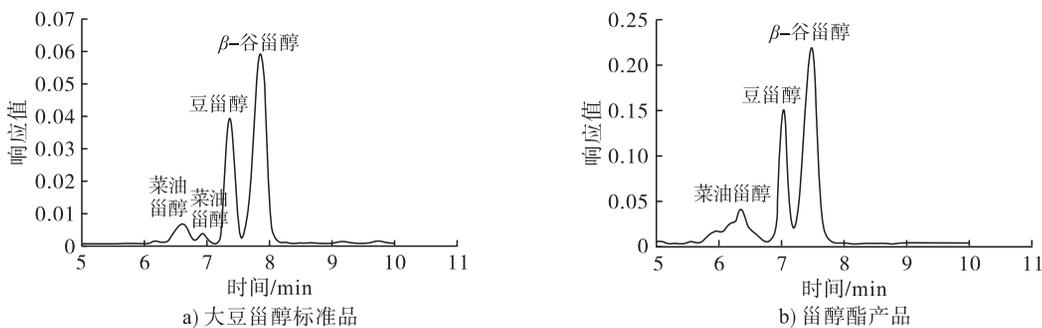
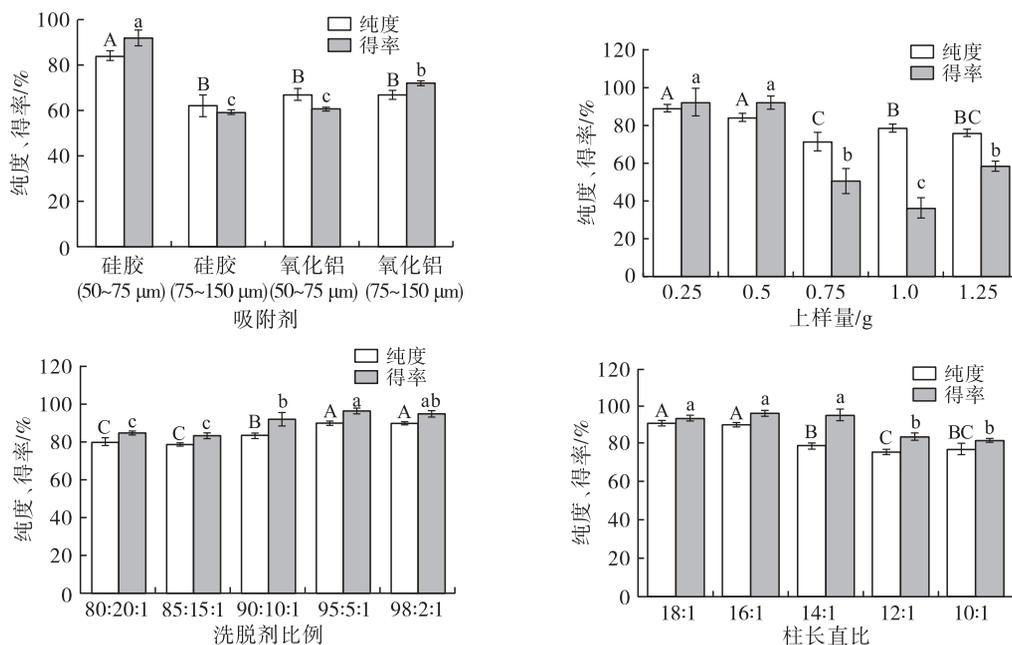


图 3 大豆甾醇标准品和甾醇酯产品的 HPLC 图

2.4 柱层析法分离提取甾醇酯工艺的单因素试验优化

柱层析法分离提取甾醇酯过程中吸附剂种类、

上样量、柱长直比(填料高度与直径比)、洗脱剂比例对甾醇酯分离效果影响较大,因此考察以上各因素对甾醇酯分离提取效果的影响,结果见图 4。



注:基础条件为吸附剂为硅胶(50~75 μm),样品上样量 0.5 g,柱长直比 16:1,洗脱剂比例为正己烷、乙醚、冰乙酸体积比 90:10:1,采用步步优化的方法优化工艺条件。同一指标不同字母表示具有显著性差异($p < 0.05$)

图 4 各因素对甾醇酯分离提取效果的影响

由图 4 可知,吸附剂为硅胶(50~75 μm)时甾醇酯产品的纯度和得率分别为 $(84.41 \pm 1.82)\%$ 、 $(92.15 \pm 3.51)\%$,均优于其他吸附剂,这可能是因为硅胶(50~75 μm)的极性和粒径更适合甾醇酯在分离时达到吸附与解吸的平衡^[21]。

由图 4 可知,上样量为 0.25 g 和 0.5 g 时,甾醇酯的纯度和得率分别为 $(89.07 \pm 1.81)\%$ 、 $(92.58 \pm 7.25)\%$ 和 $(84.41 \pm 1.82)\%$ 、 $(92.15 \pm 3.51)\%$,均

无显著性差异。当上样量超过 0.5 g 时,甾醇酯产品的纯度和得率均下降。这是由于当柱层析其他条件一定时,层析柱中硅胶对样品的吸附能力是一定的,当上样量超过硅胶的吸附能力,导致在提取过程中各组分色谱带重叠,提取效果变差。在保证层析柱不过载的情况下,上样量越大越好^[22]。因此,选择 0.5 g 作为最佳上样量。

由图 4 可知,随着洗脱剂中正己烷比例的增加、

乙醚比例的减少,洗脱剂极性逐渐减弱,甾醇酯产品的纯度和得率均呈现先增大后平缓的趋势。当正己烷、乙醚、冰乙酸体积比为 95:5:1 时达到最佳分离效果,甾醇酯产品的纯度和得率分别为 $(89.90 \pm 0.94)\%$ 和 $(96.15 \pm 1.49)\%$ 。这是由于随着洗脱剂极性的减小,分离时间延长,甾醇酯色谱带在洗脱过程中不易与杂质发生交叉,分离效果提高^[18]。当达到最佳分离效果时,再降低洗脱剂极性分离效果并未提高,这是由于甾醇酯色谱带已与其他杂质分离,并不能继续提高分离效果。因此,最佳洗脱剂比例为正己烷、乙醚、冰乙酸体积比 95:5:1。

由图 4 可知,当柱长直比为 18:1 和 16:1 时,甾醇酯产品纯度和得率分别为 $(91.02 \pm 0.84)\%$ 、 $(93.57 \pm 0.94)\%$ 和 $(89.90 \pm 0.94)\%$ 、 $(96.15 \pm 1.49)\%$,均无显著性差异。当柱长直比小于 16:1 时,随着柱长直比的减小,甾醇酯的纯度和得率均呈下降趋势。这可能是由于柱子直径固定,随着柱长直比的减小,填料高度降低,吸附剂用量减少,样品在层析柱中分离时间缩短,吸附和解吸未能达到平衡,导致分离效果差^[23-24]。因此,选择 16:1 作为最佳柱长直比。

综上所述,柱层析法分离提取甾醇酯的最佳工艺条件为吸附剂为硅胶(50~75 μm),上样量 0.5 g,洗脱剂比例为正己烷、乙醚、冰乙酸体积比 95:5:1,柱长直比 16:1,在此条件下甾醇酯产品纯度为 $(89.90 \pm 0.94)\%$,得率为 $(96.15 \pm 1.49)\%$,甾醇酯从大豆油脱臭馏分的重相组分中得到有效回收,避免了资源浪费。

2.5 甾醇酯产品的红外光谱分析

采用傅里叶红外光谱仪对最佳条件下得到的甾醇酯产品进行分析,结果如图 5 所示。

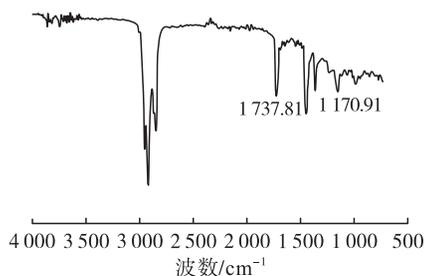


图 5 甾醇酯产品的红外光谱图

由图 5 可知,甾醇酯产品在 1737.81 cm^{-1} 和 1170.91 cm^{-1} 有吸收峰,为典型的 C=O 和 O—C—O 的特征吸收峰,结合 2.2 结果,进一步说明分离的产品含有甾醇酯。

2.6 甾醇酯产品的脂肪酸组成分析

按 1.2.4 的方法分析最佳条件下得到的甾醇酯

产品的脂肪酸组成。结果发现,甾醇酯产品的脂肪酸组成主要为亚油酸、油酸、棕榈酸、硬脂酸、亚麻酸,其相对含量分别为 $(48.85 \pm 0.14)\%$ 、 $(22.25 \pm 0.06)\%$ 、 $(19.09 \pm 0.05)\%$ 、 $(4.78 \pm 0.01)\%$ 、 $(4.72 \pm 0.01)\%$,与大豆油主要脂肪酸组成一致^[25]。

3 结论

采用柱层析法从大豆油脱臭馏分重相组分中分离提取甾醇酯,通过单因素试验优化得到最佳的甾醇酯分离提取工艺条件为吸附剂为硅胶(50~75 μm),上样量 0.5 g,洗脱剂比例为正己烷、乙醚、冰乙酸体积比 95:5:1,柱长直比 16:1。在最佳工艺条件下分离得到的甾醇酯产品的纯度为 $(89.90 \pm 0.94)\%$,得率为 $(96.15 \pm 1.49)\%$ 。经傅里叶红外光谱分析分离提取的产品为甾醇酯,甾醇酯上的脂肪酸主要由亚油酸、油酸、棕榈酸、硬脂酸和亚麻酸组成。柱层析法可以实现大豆油脱臭馏分重相组分中甾醇酯的有效回收。

参考文献:

- [1] 代广辉,王敏. 植物甾醇性质、功能及其在食品中的应用[J]. 开封教育学院学报, 2016, 36(2):261-262.
- [2] NURMI T, LAMPI A M, NYSTRÖM L, et al. Distribution and composition of phytosterols and steryl ferulates in wheat grain and bran fractions [J]. J Cereal Sci, 2012, 56(2): 379-388.
- [3] 刘雅谦,李琳,孙万成,等. 植物甾醇的抗炎性研究进展[J]. 中国油脂, 2022, 47(5): 93-99.
- [4] 张沙,邓圣庭,方成堃,等. 植物甾醇的性质、生理功能及其在动物生产中的应用研究[J]. 湖南饲料, 2022(1): 43-48.
- [5] PLAT J, MENSINK R P. Plant stanol and sterol esters in the control of blood cholesterol levels: Mechanism and safety aspects [J]. Am J Cardiol, 2005, 96(1A): 15D-22D.
- [6] FERNANDES P, CABRAL J J B T. Phytosterols: Applications and recovery methods [J]. Bioresour Technol, 2007, 98(12): 2335-2350.
- [7] 李辉,郭霞凌. 分枝杆菌转化植物甾醇定向积累甾药中间体的代谢工程研究进展 [J]. 中国油脂, 2022, 47(4): 125-132.
- [8] YUN X, PANGZHEN Z, DOROTHY W R, et al. Cereal grain-based functional beverages: From cereal grain bioactive phytochemicals to beverage processing technologies, health benefits and product features [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2020, 62(9): 2404-2431.
- [9] PANPIPAT W, XU X, GUO Z J P B. Towards a commercially potential process: Enzymatic recovery of

