

天然高级烷醇混合物的气相色谱分析

(广西大学生命科学与技术学院, 南宁 530005) 卢洁 赵文报 藏宁 李俊芳 张敏 王邕

摘要:报道了天然高级烷醇混合物含量分析的气相色谱方法,并测定了从蜂蜡和蔗蜡中分离提取的天然高级烷醇混合物含量。采用 5%SE-30/Shimalite W(AW-DMCS)-80~100 目固定相填充柱,270℃恒温分离,FID 检测器测定;选择二十六烷作为内标物内标法定量;各组分回收率 95.3%~105.0% 相对标准偏差 2.10%~7.22%。该分析方法操作简单,易于推广应用,适应于产品的常规分析与质量控制研究。

关键词:天然高级烷醇混合物,气相色谱法,测定,二十八烷醇

Abstract:A gas chromatography method for the determination of pilicosanol was investigated and the contents of pilicosanol extracted from beeswax and sugar cane wax were determined. $C_{26}H_{54}$ was selected as internal standard. The operating conditions is as follows: FID detector, 5%SE-30/Shimalite W(AW-DMCS) stationary phase, the temperature of the column and the injector was 270℃ and 290℃ respectively. The recoveries are 95.3%~105.0%, and the relative standard deviations are 2.10%~7.22%. The method is simple, applicable and suitable for routine analysis and quality control.

Key words: pilicosanol; gas chromatography; determination; octacosanol

中图分类号: TS207.3 文献标识码: A
文章编号: 1002-0306(2004)06-0129-03

二十八烷醇是一种天然存在的具有生理活性的高级烷醇,尤其在提高人体耐力、抗疲劳方面功能卓著,已成为新型健康食品添加剂^[1-4]。由于消费者对二十八烷醇的合成仍持怀疑态度,因此,提取以二十八烷醇为主的天然高级烷醇混合物一直是开发热点^[3-6]。据国内外研究报道,蜂蜡、蔗蜡、米糠蜡、虫蜡等天然产物中的二十八烷醇含量较高。国内已报道的烷醇分析方法大都针对一、两个组分的,如二十八烷醇、三十烷醇^[7-9],多组分的天然高级烷醇混合物的分析方法未见报道。国外采用衍生化气相色谱法分析高级烷醇混合物^[5,10],该法虽然精度高,但衍生化试剂昂贵,增加了样品预处理的繁琐操作,不适合工厂质量控

制与常规分析。我们建立的天然高级烷醇混合物气相色谱法采用常规色谱柱分离内标法定量,易于推广应用。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

对照品二十四烷醇、二十六烷醇、二十七烷醇、二十八烷醇、二十九烷醇、三十烷醇 美国 Sigma 公司,纯度均在 98%以上;正二十六烷 上海试剂一厂,纯度 99%;氯仿 为国产分析纯产品。

日本岛津公司 GC-9A 气相色谱仪,日本岛津公司 C-R3A 数据处理机,上海必能信 B2200S 型超声波清洗器。

1.2 溶液配制

混合对照品溶液:精密称取对照品二十四烷醇、二十六烷醇、二十七烷醇、二十八烷醇、二十九烷醇、三十烷醇 0.96、2.00、1.02、18.54、1.00、3.40mg 于 25mL 容量瓶中,氯仿溶解,在超声波清洗器上于 40℃水浴中超声 5min,定容至刻度,摇匀后置于 40℃烘箱中。

对照品溶液:分别精密称取二十四烷醇、二十六烷醇、二十七烷醇、二十八烷醇、二十九烷醇、三十烷醇各 10.0mg 分别置于 10mL 容量瓶中,氯仿溶解,在超声波清洗器上于 40℃水浴中超声 5min,定容至刻度,摇匀后置于 40℃烘箱中。

精密称取正二十六烷 5.0mg 于 10mL 容量瓶中,氯仿定容至刻度,配成内标溶液。

1.3 样品处理

精密称取样品 200.0mg 于 10mL 容量瓶中,氯仿溶解,在超声波清洗器上于 40℃水浴中超声 5min,定容至刻度,摇匀后置 40℃烘箱中。同时将移液管、微量注射器在 40℃烘箱中保温 5min 后使用。精密移取 0.5mL 样液于 2mL 的 EP 管中,同时精密加入内标液 0.2mL、氯仿 1.3mL,轻轻摇匀后取 1 μ L 气相色谱分析。

1.4 色谱条件

收稿日期: 2004-04-07

作者简介: 卢洁(1968-)男,工程师,主要从事仪器分析的教学与科研。

表1 方法工作曲线

| 组分 | 回归方程 | 线性范围(mg/mL) | 相关系数 γ |
|------------------------------------|----------------|---------------|---------------|
| C ₂₄ H ₄₉ OH | Y=0.917X-0.353 | 0.01~0.90 | 0.9990 |
| C ₂₆ H ₅₃ OH | Y=0.672X-0.450 | 0.01~0.90 | 0.9998 |
| C ₂₇ H ₅₅ OH | Y=0.729X-0.333 | 0.05~0.90 | 0.9992 |
| C ₂₈ H ₅₇ OH | Y=0.760X-0.505 | 0.05~0.90 | 0.9998 |
| C ₂₉ H ₅₉ OH | Y=0.698X-0.231 | 0.05~0.90 | 0.9995 |
| C ₃₀ H ₆₁ OH | Y=0.565X-0.369 | 0.05~0.90 | 0.9991 |

表2 烷醇组分和内标物质量比的变化对相对校正因子的影响

| 组分 | X | f | X | f | X | f | X | f | X | f |
|------------------------------------|---|------|---|------|----|------|----|------|----|------|
| C ₂₄ H ₄₉ OH | 1 | 1.96 | 5 | 1.42 | 25 | 1.12 | 50 | 1.05 | 90 | 1.10 |
| C ₂₆ H ₅₃ OH | 1 | 2.49 | 5 | 1.88 | 25 | 1.59 | 50 | 1.50 | 90 | 1.51 |
| C ₂₇ H ₅₅ OH | 1 | 2.77 | 5 | 2.01 | 25 | 1.40 | 50 | 1.38 | 90 | 1.37 |
| C ₂₈ H ₅₇ OH | 1 | 7.15 | 5 | 2.11 | 25 | 1.31 | 50 | 1.32 | 90 | 1.31 |
| C ₂₉ H ₅₉ OH | 1 | 7.99 | 5 | 2.57 | 25 | 1.45 | 50 | 1.44 | 90 | 1.43 |
| C ₃₀ H ₆₁ OH | 1 | 9.76 | 5 | 2.89 | 25 | 1.80 | 50 | 1.77 | 90 | 1.76 |

注：“X”为烷醇组分和内标物质量比；“f”为相对校正因子。

表3 样品测定及精密度与回收率实验结果

| 组分 | C ₂₄ H ₄₉ OH | C ₂₆ H ₅₃ OH | C ₂₇ H ₅₅ OH | C ₂₈ H ₅₇ OH | C ₂₉ H ₅₉ OH | C ₃₀ H ₆₁ OH | 总醇 |
|-----------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-------|
| 蜂蜡提取样(%) | 2.7 | 17.6 | 0.72 | 52.2 | 0.91 | 19.6 | 93.7 |
| 蔗蜡提取样(%) | 0.74 | 4.1 | 0.99 | 68.1 | 0.26 | 4.8 | 79.0 |
| 相对标准偏差(%) | 3.66 | 2.10 | 7.22 | 2.49 | 4.68 | 2.90 | 3.18 |
| 回收率(%) | 102.0 | 100.2 | 105.5 | 95.3 | 103.6 | 96.6 | 101.9 |

色谱柱 3.2mm×2.6m 玻璃柱 ;固定相 5%SE-30/ Shimalite W(AW-DMCS)80~100 目 ;柱温 270℃ ;汽化室和 FID 检测器温度 290℃ ;载气 N₂ 50mL/min ; H₂ 500mL/min ;Air 500mL/min。

2 结果与讨论

2.1 溶剂的选择与温度条件

天然高级烷醇混合物不溶于水和乙醇,常温下在乙醚、苯、甲苯、二氯甲烷、氯仿、石油醚、丙酮中的溶解度也小,影响测定的线性范围和进样准确。在测定糠中二十八烷醇和三十烷醇时用环己烷做溶剂^[6]。苯和甲苯毒性大,醚易挥发,经比较实验,天然高级烷醇混合物在氯仿中溶解度最大,同时溶解度受温度影响也大,当温度大于 40℃,可满足线性范围内测定要求,因此春冬季节须注意 40℃保温样品溶液。

2.2 色谱行为

图 1 为加内标后的天然高级脂肪族伯醇混合物色谱图。A.Laguna 和 Giacometti Jasminka 选择二十烷醇作内标物^[5,10],只适应程序升温操作,分析时间长。本实验条件下,二十烷醇在溶剂拖尾峰上并受国产氯仿杂质干扰。本实验改用二十六烷醇作内标物,峰形更对称,更靠近待测组分,与相邻溶剂杂质峰和相邻组分二十四烷醇峰完全分离,分离度大于 2.0,以二十八烷醇峰计,理论塔板数大于 2900。各组分保留时间对数与对应碳数呈良好线性关系,符合同系物碳数规律,方程式为 $\text{Log}t_r=0.10n-1.74$,可以利用该公

式定性。

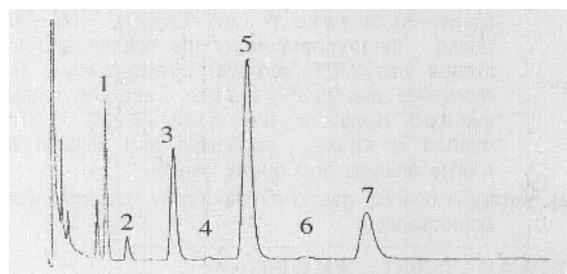


图1 添加内标物后的天然高级脂肪族伯醇混合物色谱图
注:1.C₂₆H₅₃ 内标 internal standard 2.C₂₄H₄₉OH 3.C₂₆H₅₃OH ;
4.C₂₇H₅₅OH 5.C₂₈H₅₇OH 6.C₂₉H₅₉OH 7.C₃₀H₆₁OH。

2.3 定量分析

由于生产质控过程中产品总醇纯度常低于 90%,不宜采用归一法定量。组分沸点高,样品溶解度受温度影响大,因此采用外标法定量时对准确进样操作要求更苛刻。本实验采用内标法定量,适应组分浓度差大的样品。分别从对照品溶液中精密量取二十四烷醇、二十六烷醇、二十七烷醇、二十八烷醇、二十九烷醇、三十烷醇各 0.02、0.1、0.5、1.0、1.80mL 至 2mLEP 管中,分别加入内标液 0.2mL,同时分别依次加入氯仿 1.78、1.7、1.3、0.8、0.0mL,轻轻摇匀后取 1μL 注入气谱仪进行线性分析。以烷醇组分与内标质量比为横坐标(X),以其峰面积比为纵坐标(Y),求标准曲线回归方程,结果见表 1。实验表明,在 0.05~0.9mg/mL 浓度范围内,烷醇和内标质量比与峰面积

比呈良好的线性关系。实验考察了不同烷醇和内标质量比变化对相对校正因子的影响。从表 2 可看出,随着组分与内标物质量比的增加,相对校正因子减小并趋于恒定。因此,对于有低含量组分的样品,应尽可能配制与样品组分浓度相近的混合对照品溶液校正计算含量。直接采用恒定校正因子计算仅适合于定量较高浓度的主要组分。进一步的工作应该是寻找更优的内标物能在组分之间出峰,可考虑从杂环或多芳环物质中寻找^[6]。同时可考虑选择耐高温宽口径毛细柱来提高柱效,减小半峰宽而提高低含量组分的检出限。

2.4 样品测定及精密度与回收率实验

实验测定了分别从甘蔗滤泥和蜂蜡中提取的天然高级烷醇混合物样品各烷醇含量。以甘蔗滤泥提取样品为对象,主组分二十八烷醇按原有量与标准品加入量比近似为 2:1 水平,其他组分烷醇按原有量与标准品加入量比近似为 1:1 水平做标准添加回收实验,考察回收率。平行测定 5 份,计算相对标准偏差,考察精密度,结果见表 3。

参考文献:

- [1] 王兴国,刘元法,倪伯文,罗严贵.二十八醇的分布与功能[J].中国油脂,2002,7(1):54~56.
- [2] Taylor Johanna C, Rapport Lisa, Lockwood, G Brian. Octacosanol in human health[J].Nutrition,2003,19(2):192~195.
- [3] 雷炳福.二十八烷醇的应用与制备[J].西部粮油科技,2003,28(3):41~44.
- [4] 宋建华,陈明德.新型健康食品添加剂二十八烷醇的开发研究[J].厦门大学学报(自然科学版),1998,37(3):414~418.
- [5] A Laguna,等(古巴).高级脂族伯醇混合物、其由甘蔗蜡制取的方法及其药学应用[P].中国专利,申请号 93103165.6,1993.
- [6] 国植,徐莉.天然高级烷醇混合物:来自甘蔗蜡的降胆固醇新药[J].国外医药(植物药分册),2001,16(6):231~236.
- [7] 陈芳,闫红,蔡同一.气相色谱法测定糠蜡提取物中的二十八烷醇和三十烷醇[J].食品科学,2003,24(4):119~121.
- [8] 李如华,舒永华.二十八烷醇与三十烷醇的气相色谱测定[J].现代仪器,2000(4):34~36.
- [9] 刘法锦,孙冬梅,胡成新.GC 法测定蜂蜡总烷醇中两种烷醇的含量[J].时珍国药研究,1998,9(2):128~129.
- [10] Giacometti Jasminka.橄榄油脂肪醇、角鲨烯、 α -生育酚和甾醇的测定:不可皂化部分硅烷化处理后气相色谱分析[J].热带农业工程,2001(4):28~31.

(上接第 133 页)

coli 中表达和纯化,N-末端的 90 个残基被截去时,它仍有完整的活性,这倒是反过来说明 GAD 的 C-端可能在底物的识别中起作用。

6 GAD 的分子生物学研究

基因工程技术使人们有可能生产大量的哺乳动物 GAD 来研究其生物化学特性,或用于医学等其它目的。*E.coli* 系统是蛋白质表达的首选,因为它容易操纵,而且在受体和载体上积累了大量的知识和图文信息,又不乏有大量的成功实例。然而,总的来说,它也存在一些弊病:a. 在 *E.coli* 表达系统中 N-末端氨基酸残基始于 Met,而在高等动物体内 Met 经后翻译(post-translation)而被切除;b. 真核生物系统的后翻译作用并不可能进行,因此高等动物体内 GAD65 表达中的棕榈酰化不可能在 *E.coli* 系统中重现;c. 活性体的形成可能不同于真核生物系统,因此,可能产生不溶性的蛋白质,或使它作为一个包含体而终止了进程。为了克服 *E.coli* 的不足,采用改良的表达

系统,或采用酵母和其它真核生物系统正是如今研究的热点,用于 GAD 的表达也有报道。

采用 *S.cerevisiae* 变种,加入甘油酸酯或乙酸的诱导剂,一起加入生长培养基时,会产生可溶性的 GAD65,Kanai 等建立的表达系统有望进行用于医疗目的的大规模的 GAD65 生产。最近,Raymond 等发展了 *Pichia methanolica* 系统用来表达人类 GAD65。*Pichia* 系统中通过添加甲醇诱导 GAD65 产生,在细胞水解液中的 GAD 比活力是 1.8mU/mg,采用 *Pichia* 系统的优点是将蛋白质分泌到培养液中,从而简化了纯化。另外,值得一提的是,近些年采用昆虫表达系统在 GAD65 和 GAD67 两方面都有所发展。

Ueno 等在 1997 年纯化了 *Lactobacillus brevis* GAD 后,尝试在 *E.coli* 系统中大规模生产 *Lactobacillus brevis* GAD,以便进一步研究用于食品或医药中,但到目前为止,还没有进一步的报道。

参考文献:略

《食品企业采购指南》

投入少、效率高、范围广、影响大!!