

海星甾醇的分离精制与测定*

文震 党志** 朱志鑫 李琼

(华南理工大学应用化学系 广州 510640)

提要 采取甲醇多步结晶法,从海星(*Asterias amurensis*)中分离精制了海星甾醇。利用高效液相色谱,对海星甾醇中的胆甾醇含量进行了测定。研究表明,在选定的色谱条件下,胆甾醇测定结果线性良好,精密度好,准确度高。这为制定海星甾醇的质量标准提供了参考依据。

关键词 甾醇,胆甾醇,海星(*Asterias amurensis*),分离,高效液相色谱

中图分类号 Q548+.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3096(2003)09-0061-04

海星是我国近海常见的海洋生物,具有活化血管,抗菌消炎,安神镇静,抗疲劳之功效^[1-2]。现代生物化学与药理学的研究表明,海星的药效与所含的甾醇类成分密切相关^[3-4]。经 GC-MS 分析,海星甾醇主要由胆甾醇组成,其结构见图 1。

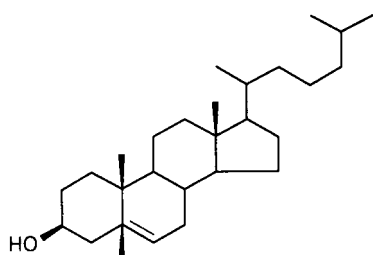


图 1 胆甾醇结构

Fig.1 Structure of cholesterol

因此,从海星中分离精制甾醇类化合物,并对其中的胆甾醇进行定量测定,可以为探索海星甾醇的物质基础提供理论依据。

测定胆甾醇含量的方法主要有分光光度法、气相色谱法与高效液相色谱法。分光光度法只能测定总甾体的含量,误差较大,重现性较差^[5]。气相色谱法一般要将甾醇衍生化后再进行测定,前处理比较繁琐^[6]。液相色谱测定胆甾醇具有简单、快速、重现性好的特点^[7],目前已有 HPLC 测定鸡蛋中胆甾醇的报道^[8],而对海星甾醇的测定还未见报道。在本文研究中,作者拟提取精制海星总甾醇,并采用外标法,用 HPLC 测定其中胆甾醇的含量。

1 材料与方法

1.1 实验材料

海星来源:购自广州清平药材市场,经鉴定为多棘海星 *Starfish* (*Asterias amurensis*)。药材干燥后粉碎至 40 目备用。

1.2 试剂与仪器

试剂:正己烷、乙醚、无水乙醇、甲醇、乙腈、异丙醇、氢氧化钾、氯化钠、无水硫酸钠,广州化学试剂厂,均为分析纯。标准胆甾醇:美国 Sigma 公司。

仪器:旋转蒸发器、超级恒温水浴锅、HP1100 高效液相色谱系统。

1.3 实验方法

海星非皂化物与总甾醇的制备:取海星粗粉 10 g,置索氏提取器中,加正己烷 150 mL 冷浸过夜,回流提取 12 h。提取物中加入 20 mL 10% KOH 甲醇溶液皂化,皂化完全后,乙醚萃取 3 次,饱和 NaCl 溶液洗涤。合并乙醚萃取液,过无水 Na₂SO₄ 柱脱水干燥,回收溶剂,即得非皂化物。往非皂化物加入甲醇,加热至溶,放冷后析出晶体,用甲醇重结晶 3 次,滤集后得到

* 教育部高等院校博士点基金项目 20020561026 号与广东省自然科学基金联合资助。

第一作者:文震,出生于 1977 年,博士研究生,从事海洋生物技术研究。E-mail: wenzhen@china.com.cn

** 通讯联系人。

收稿日期:2003-01-23;修回日期:2003-06-29

白色粉末状海星甾醇。

1.4 分析方法

分析样品制备：分别取所得非皂化物与海星总甾醇于小烧杯中，加入乙醇，在 60℃ 水浴中加热至溶，定容于 10 mL 容量瓶中，稍冷，立即用 0.45 μm 滤膜过滤，采用时间窗法定性，外标法定量。分别计算海星中胆甾醇与海星总甾醇中的胆甾醇含量。

胆甾醇标准溶液配制：准确称取胆甾醇 500 mg，溶于 50 mL 的无水乙醇中，制成标准胆甾醇储备液 (10 mg/mL)。取标准胆甾醇储备液 0.1、2.3、4.5 mL，分别以无水乙醇稀释至 10 mL，使其浓度分别为 0.1、2.3、4.5 mg/mL。

色谱条件：色谱柱为 Hewlett-Packard C18 柱 (0.4 cm×12.5 cm, 5 μm)，流动相：乙腈-异丙醇 (2:1, V/V)，流速：1 mL/min，检测波长：220 nm，进样量：20 μL，柱温：40℃。

2 实验结果与讨论

2.1 分析方法的确定

2.1.1 仪器条件的选择 测定波长：对胆甾醇的标准溶液进行扫描，在 220 nm 处有最大吸收。

流动相：考虑到胆甾醇的极性，选择极性较小的乙腈-异丙醇 (2:1, V/V)，此时胆甾醇的响应最大，出峰时间短，可得到较好的分离 (见图 2)。

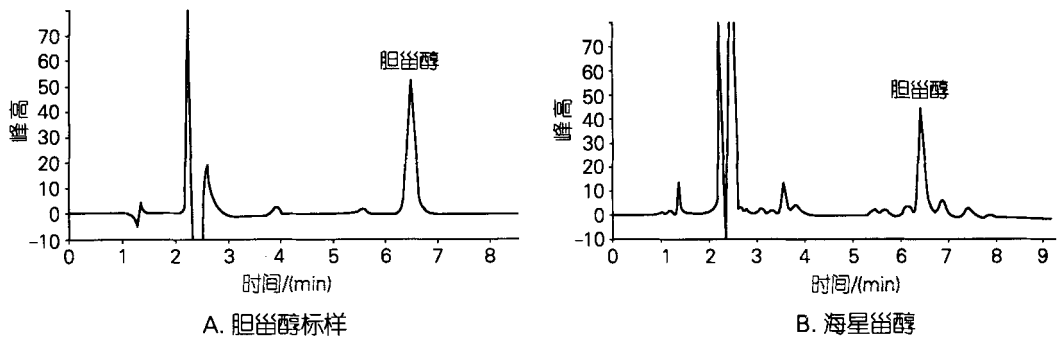


图 2 胆甾醇标样与海星甾醇色谱图

Fig. 2 The chromatography for standard cholesterol (A) and sterols from starfish (B)

2.1.2 标准曲线和检测限 取不同浓度胆甾醇标准溶液进样，重复 3 次，测得峰面积，以峰面积均值为纵坐标 Y，与胆甾醇浓度 C 为横坐标 X 作图，绘制标准曲线。通过回归计算，求得回归方程为：Y = -3.28 + 126.21 X，相关系数 r = 0.9993，并测得胆甾醇最小检测限在 μg 级。

2.1.3 精密度试验 标样测定重复性：取浓度

为 3 mg/mL 胆甾醇溶液，每次进样 20 μL，测峰面积，共 5 次，测得日内 RSD = 0.25%，日间 RSD = 0.46%。

样品测定重复性：称取 5 份海星样品，皂化后按方法 1.4 测定其中胆甾醇的含量 (mg/100 g 海星原料)，并计算 RSD。结果见表 1，RSD < 5%，说明方法有较高的精密度。

表 1 海星中胆甾醇含量测定与精密度

Tab.1 The content of cholesterol from starfish and degree of precision

海星中胆甾醇含量 (mg/100g)					平均含量	S	RSD (%)
1	2	3	4	5	(mg/100g)		
477	486	505	492	496	491	10.52	2.14

2.1.4 回收率实验 准确称取不同质量的海星样品 6 份，测定其中胆甾醇，同时取等量样品，加入一定量胆甾醇标样，同法测定。计算胆甾醇的回收率。

表 2 结果显示回收率在 96.43% ~ 102.52%，平均回收率为 99.03%，说明方法具有较高的准确度。

2.2 海星总甾醇的测定

由于甾醇在甲醇中溶解度较小，受温度影响较

表 2 胆甾醇回收率测定结果

Tab.2 Recovery rate of cholesterol from starfish

称样量 (g)	样品中含量 (mg)	加入量 (mg)	测得总量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
2.5000	13.56	15.00	27.54	96.43		
2.5000	12.27	15.00	26.67	97.80		
5.0000	22.96	25.00	49.17	102.52		
5.0000	23.45	25.00	49.08	101.30	99.03	2.39
10.0000	48.52	50.00	97.10	98.56		
10.0000	49.35	50.00	96.94	97.57		

表 3 海星总甾醇与胆甾醇分析结果

Tab.3 The content of whole sterols and cholesterol from starfish

产率(%) ¹⁾			胆甾醇的含量(%)		胆甾醇回收率
正己烷提取物	非皂化物	海星总甾醇	海星中	总甾醇中	(%) ²⁾
3.38	0.86	0.53	0.49	63.96	69.04

1) 产率(%) = $\frac{\text{提取物质量}}{\text{海星原料质量}} \times 100\%$; 2) 胆甾醇的回收率(%) = $\frac{\text{海星总甾醇中的胆甾醇含量}}{\text{海星中胆甾醇的含量}} \times 100\%$

大,采取甲醇分步结晶的方法,可以从海星不皂化物中获得较高纯度的海星总甾醇(见图 2B)。经测定,海星总甾醇的产率与胆甾醇的含量以及收率如表 3。

由实验结果可知,胆甾醇是海星甾醇的主要成分,这对于探索海星总甾醇这一有效部位群的活血补益物质基础具有一定的理论意义。

3 结论

(1) 采取甲醇多步结晶法,从海星不皂化物分离精制了海星总甾醇。经检测,海星总甾醇的产率为 0.53%。海星体内胆甾醇的含量为 0.49%,总甾醇中胆甾醇的回收率为 69.04%。

(2) 利用高效液相色谱测定海星中胆甾醇含量,方法简单,出峰时间快,结果线性,精密度试验、回收率试验均较满意,为把甾醇作为海星的质量控制指标之一,并将海星开发成新药提供了参考依据。

致谢:广东省中药研究所王玉生副主任药师鉴定海星药材,在此感谢。

参考文献

1 刘红兵,展翔天,顾谦群.近三年我国海洋中药研究进展.中国海洋药物,1999,72:29-32

2 Shahidi Nasrollah T. A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. Clinical Therapeutics, 2001, 23(9):1355-1390

3 Kicha A A,Ivanchina N V, Gorshkova I A, et al. The distribution of free sterols, polyhydroxysteroids and steroid glycosides in various body components of the starfish Patiria (= Asterina) pectinifera. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, 2001, 128:43-52

4 Iorizzi M, De Marino S, Mnale L, et al. Investigation of the polar steroids from an Antarctic Starfish of the family Echinasteridae: isolation of twenty seven polyhydroxysteroids and steroidal oligoglycosides, structures and biological activities. Tetrahedron, 1996, 52(33):10997-11012

5 高瑜莹,裘爱泳,潘秋琴.植物甾醇的分析方法.中国油脂,2001,26(1):25-28

6 Abidi S L. Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils, Chromatography A, 2001, 935:173-201

7 Shimada K, Matsumura K, Higashi T. Gas chromatography and high-performance liquid chromatography of natural steroids. Journal of Chromatography A, 2001, 935:141-172

8 张蓉真,李珑,刘树滔.测定鸡蛋胆甾醇的高效液相色谱新方法.色谱,1998,16(2):91-94

THE SEPARATION AND DETERMINATION OF STEROLS IN STARFISH (*Asterias amurensis*)

WEN Zhen DANG Zhi ZHU Zhi Xin LI Qiong
(Department of Applied Chemistry , The South China University of Technology , Guangzhou , 510640)

Received : Jan., 23 , 2003

Key Words : Sterols , Cholesterol , Starfish (*Asterias amurensis*) , HPLC , Separation

Abstract

Multilevel fractional crystallization was used to separate sterols from Starfish (*Asterias amurensis*) , and the content of cholesterol was determined by HPLC . Under selected chromatography conditions , the cholesterol can be determined accurately and rapidly . The result shows this proposed method has provided a reference basis for making the quality control standards for cholesterol from Starfish (*Asterias amurensis*) .
(本文编辑 : 张培新)