

海洋微藻中 C3 羟基甾醇 TMS 衍生物 EI 源质谱规律研究

缪 妙, 严小军, 徐继林, 侯云丹

(宁波大学, 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要:通过推测甾醇 TMS 衍生物特殊碎片的质谱裂解规律, 结合标准品 TMS 衍生物的质谱图进行分析。根据质谱特征离子确定甾核的双键数, 甲基化程度和侧链上双键数, 烷基化程度以及相关的位置。用 Bligh-Dyer 法提取总脂, $V(\text{氯仿}) : V(\text{正己烷}) = 1 : 4$ 的混合溶液提取甾醇, BSTFA 衍生化, 进行气相色谱-质谱分析。应用此研究规律对 4 种甲藻: 共生藻属甲藻(*Symbodinium* sp.)、锥状斯克里普藻(*Scrippsiella trochoidea*)、海洋原甲藻(*Prorocentrum micans*)、无纹环沟藻(*Gyrodinium instriatum*) 的甾醇组成进行鉴定。

关键词:甾醇 TMS 衍生物; EI 质谱; 甲藻

中图分类号: O 657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997(2009)03-139-09

Study on the Regular Mass Spectrometry Pattern of the TMS Derivatives of Sterols from Microalgae

MIAO Miao, YAN Xiao-jun, XU Ji-lin, HOU Yun-dan

(Key Laboratory of Application Marine Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: The regular mass spectrometric pattern of the TMS derivatives of sterols was studied using mass spectrometry and some TMS derivatives standards. The number of double bonds, methylizes, alkylizes and their related position in the sterol nuclear and the side chains were confirmed by the characteristic ions. Total lipids were extracted using Bligh-Dyer method, sterols were isolated by solvent partition with $V(\text{chloroform}) : V(\text{hexane}) = 1 : 4$, derivated by BSTFA, and analyzed by GC/MS. The regular pattern was used for identifying the sterols in four dinoflagellates from the *Symbodinium* sp., *Scrippsiella trochoidea*, *Prorocentrum micans* and *Gyrodinium instriatum*.

Key words: TMS derivatives of sterols; EI mass spectrometry; dinoflagellates

甾醇是广泛存在于动植物界的一类重要的天然产物, 作为微藻的生化组成, 具有一些特殊的意义: (1) 海洋微藻中甾醇的种类和含量直接影响海洋双壳类生物的生长发育^[1-2], 因此决定

了微藻的营养价值; (2) 甾醇是所有真核生物细胞膜的基本组成, 它们能调控膜的流动性和渗透性, 在一些微藻和真核生物中具有细胞增殖信号转导, 调节一些细胞膜结合酶活性的特殊功

收稿日期: 2008-11-19; 修回日期: 2008-02-14

基金项目: 教育部长江学者与创新团队项目 (IRT0734)、国家海洋公益项目 (200805067)、浙江省自然科学基金 (Y506131) 资助

作者简介: 缪 妙 (1984~), 女 (汉族), 浙江桐庐人, 硕士研究生, 从事藻类生物代谢及环境效应研究。

E-mail: miaomaio041455@126.com

通信作者: 严小军 (1968~), 男 (汉族), 江苏苏州人, 研究员, 从事微型藻类的生物化学研究。E-mail: yanxiaojun@nbu.edu.cn

能^[3-5]; (3)在脂类物质中,甾醇由于结构丰富,具有很好的稳定性,不易被降解,是沉积物中具有一些物源指示作用的生化标志物^[6],也是最好的生物标志物之一^[7-8]。海洋微藻中 C3 羟基甾醇的结构多样,主要体现在 4 位有无甲基存在,甾核上的双键数目和位置,侧链上烷基化程度和位置及双键位置。Galli,Knights,Robert 等^[9-11]早在 20 世纪 60 年代就对有些甾醇乙酸酯质谱特殊碎片进行了报道。曾志等^[12-14]在前人的基础上对甾醇乙酸酯的质谱规律进行较全面的研究。三甲基硅醚化衍生物具有较高的热稳定性和挥发性,目前对甾醇进行 GC/MS 分析多采用三甲基硅醚化衍生,而在 Nist 和 Wiley 库中收录的甾醇三甲基硅醚衍生物的数据非常有限。由于衍生基团的不同,其质谱特征和乙酸酯衍生物存在一定区别。本研究在甾醇乙酸酯质谱规律的基础上,对甾醇三甲基硅醚(TMS)衍生物的质谱裂解规律进行推测鉴定,根据甾核和侧链两部分烷基化和双键数的推测,结合质谱特征离子确定甾醇 TMS 衍生物的结构,为甾醇的进一步深入研究提供技术手段。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

QP2010 气相色谱-质谱分析仪,配有 AOC-20 自动进样器;日本 Shimadzu 公司产品;30 m×0.25 mm×0.25 μm SPB-5 色谱柱;美国 Supelco 公司产品;国产旋转蒸发仪,旋涡混合仪,水浴锅等。

β-cholestanol(胆甾烷醇)(C27:0);美国 Sigma-Aldrich 公司产品;cholest-8(14)-en-3β-ol(C27:1 Δ⁸⁽¹⁴⁾, Nist 库);cholest-7-en-3β-ol(C27:1 Δ⁷, Nist 库);desmosterol(C27:2 Δ^{5,24});美国 Avanti Polar Lipids 公司产品;campesterol(菜油甾醇)(C28:1 Δ⁵/24Me);美国 Sigma-Aldrich 公司产品;ergost-8(14)-en-3β-ol(C28:1 Δ⁸⁽¹⁴⁾/24Me, Nist 库);4-methylcholest-7-en-3β-ol;C28:1 Δ⁷/4Me, Nist 库;ergosterol(麦角甾醇)(C28:3 Δ^{5,7,22}/24Me);美国 Sigma-Aldrich 公司产品;dehydroergosterol(C28:4 Δ^{5,7,9,22}/24Me);美国 Avanti Polar Lipids 公司产品;β-sitosterol(谷甾醇)(C29:1 Δ⁵/24 Ethyl);美国 Sigma-Aldrich 公司产品;24ethylcholest-5, 24(28)-dien-3β-ol(C29:

2 Δ^{5,8(14)}/24 Ethyl),藻类样品;stigmasterol(豆甾醇)(C29:2 Δ^{5,22}/24 Ethyl);美国 Sigma-Aldrich 公司产品;8-lanosten-3β-ol(C30:1 Δ⁸/4,4,14-triMe);美国 Avanti Polar Lipids 公司产品;8,24-lanostadien-3β-ol(羊毛甾醇)(C30:2 Δ⁸,24/4,4,14triMe);美国 Avanti Polar Lipids 公司产品;三氟双(三甲基硅烷基)乙酰胺(BSTFA);美国 Sigma-Aldrich 公司产品;正己烷、氯仿(色谱纯);美国 Tedia 公司产品。

1.2 标准品处理

甾醇标准品用氯仿定容至 1 g·L⁻¹,移取 20 μL, N₂ 吹干,加入 100 μL 过量 BSTFA,密封,在 60 °C 水浴中恒定 2 h, N₂ 吹干,用己烷定容,进行 GC/MS 分析。

1.3 样品处理

称取 20 mg 左右的微藻干品,参考改进后的 Bligh-Dyer 法^[15]提取总脂。总脂提取后加入 2 mL 5%~6% 的 V(氢氧化钾):V(甲醇)=4:1 的水溶液,充氮气 1 min,密封,在 60 °C 水浴皂化 2 h,冷却,用 6 mL V(氯仿):V(正己烷)=1:4 的混合溶液分 3 次提取,加入 1 g 无水硫酸钠吸水 12 h,旋转蒸发仪真空干燥,加入 100 μL 过量 BSTFA,密封,在 60 °C 水浴中恒定 2 h, N₂ 吹干,用正己烷定容,进行 GC/MS 分析。

1.4 分析条件

GC 条件:进样口温度 250 °C;载气为高纯氮;柱流速 0.81 L·min⁻¹;柱起始温度 150 °C,保持 3.5 min,以 20 °C·min⁻¹升至 200 °C,保持 5 min,再以 5 °C·min⁻¹升至 280 °C,保持 30 min;分流进样 5 μL;分流比 10:1。

MS 条件:用 EI 源分析时电子能量为 70 eV,离子源温度 200 °C,接口温度 250 °C,Scan 扫描模式,质量扫描范围 *m/z* 40~600,溶剂延迟 3.5 min;用 CI 电离源分析时,反应气为甲烷。

2 结果与讨论

2.1 甾醇碳数和双键在甾核和侧链上分布状况推测

甾醇 TMS 衍生物 EI 质谱中,都出现其所对应的分子离子峰 M⁺, 8-lanosten-3β-ol 和 8,24-lanostadien-3β-ol 出现失去 1 个甲基的特征峰[M-CH₃]⁺及对应的特征峰[M-CH₃-

TMSOH]⁺,其他甾醇 TMS 衍生物都出现对应分子离子失去一分子 TMSOH 的特征峰[M-TMSOH]⁺,列于表 1。这是由于在甾醇 TMS 衍生物发生裂解时,C4 位的 H 重排到杂原子 O 上后,杂原子 O 上的电荷中心诱导其与碳相连的键的一对电子通过 i 断裂,产生中性碎片 TMSOH 及碎片离子[M-TMSOH]⁺,示于图 1。甾醇 TMS 衍生物的 GC-EI-MS 图谱通常能够得到分子离子峰,这相对于乙酰化而言是一个优点,多数情况下,也可以获得[M-TMSOH]⁺碎片离子。根据此规律,加上对应 CI 源质谱的辅助,CI 电离源质谱中[M-H]⁺,[M+H]⁺离子都很明显,基本可以确定出甾醇的相对分子质量。

C17 位上连有侧链,C17-C20 键可以通过简单的 δ 断裂方式,侧链以游离基的形式离去,电荷中心留在甾核上,形成甾核离子[M-TMSOH-SC]⁺。由于共轭体系中分子的一端受到的影响能通过共轭链传递到另一端,所以具有共轭键的离子十分稳定^[16],于是当甾核上存在多双键时,裂解得到的共轭离子稳定性较高,甾核离子相对丰度较高(如表 1 所示)。甾核离子可进一步通过 i 和 α 断裂将 D 环打开,形成与甾核离子对应的 D 环开裂碎片离子(如图 1 所示)。对应以上原理,甾醇 TMS 衍生物 EI 质谱中, β -cholestanol, desmosterol, campesterol, stigmaterol, ergosterol, dehydroergosterol 的 TMS 衍生化合物质谱中都出现了[M-TMSOH-SC]⁺碎片峰和对应的 D 环开裂的碎片峰; β -sitosterol 的 TMS 衍生化合物质谱中只出现[M-TMSOH-SC]⁺碎片峰;8-lanosten-3 β -ol 和 8,24-lanostadien-3 β -ol 则都只出现了 D 环开裂的碎片峰(示于表 1)。

从分子离子的质荷比中可以推断出甾醇的碳数和双键数,结合甾核碎片峰及相对应的 D 环开裂的碎片峰推测出甾核上的碳数和双键数,从而可以推测出侧链上的碳数和双键数,确定甾醇碳数和双键在甾核和侧链上的分布状况。

2.2 甾核结构的分析

2.2.1 C5 位双键(4 位无甲基)形成 m/z 129 和[M-129]⁺碎片离子

甾核上双键位置一般多在 5,7,8,9 位,以 5,7 位居多,侧链上则以 22 和 24 位最常见^[17]。当甾核上存在 C5 双键时,

与杂原子 O 相连的碳外侧键 C3-C4 键易通过 α 断裂,C2 位的 H 重排到 C5 位上,C1-C10 键通过 α 方式断开,形成具有共轭键的稳定碎片离子 m/z 129,以及另一个碎片[M-129]⁺,示于图 2。desmosterol, campesterol, β -sitosterol 和 stigmaterol 的 TMS 衍生物 EI 质谱都出现 m/z 129 碎片峰和对应的碎片峰[M-129]⁺,同时峰的丰度较高。 β -cholestanol, ergosterol, dehydroergosterol, 8-lanosten-3 β -ol 和 8,24-lanostadien-3 β -ol 中出现微弱的 m/z 129 碎片峰,与甾核的结构有关:高的不饱和度和甾环上的甲基提高了甾核的稳定性,从而降低了 A 环裂解的可能;甾核饱和或甾核上非 C5 位存在双键时会使甾核上的氢重排和键断裂的方式有差异,从而降低了 m/z 129 碎片峰的丰度。

王培荣等^[18]在研究马尾藻属海黍子种(sargassum muticum)抽提物中所鉴定的甾醇化合物时发现,所有甾醇类化合物 TMS 衍生物质谱图中,都有 m/z 129 碎片峰,且多数为基峰,它们均有 m/z 73, M-15, M-90, M-105, M-129, M-90-SC 等关键离子碎片,认为它们均属于在 C5 位有 1 个烯键的甾醇类化合物。本实验的研究认为, m/z 129 碎片峰的丰度高,同时出现相应的[M-129]⁺特征碎片才是确定 Δ^5 甾核的关键。

2.2.2 与 C8 相连的双键($\Delta^{7(8)}$, $\Delta^{8(9)}$, $\Delta^{8(14)}$)形成离子碎片 m/z 229 的机理

特征离子碎片 m/z 255 和 m/z 213 是甾核具有一个双键且无甲基甾醇所共有的。当双键在甾核的 C8 位时,甾核碎片在 C13-C17 通过 δ 断裂,C14-C15 键旋转后,使得 C16 位上的 H 重排到 C8 游离基中心上,C15-C16 位出现 α 断裂,形成离子碎片 m/z 229,示于图 3。Nist 库中的 cholest-8(14)-en-3 β -ol 和 cholest-7-en-3 β -ol 的 2 张质谱图,出现特征离子碎片 m/z 255, m/z 213 以及 m/z 229,可以看出 C8 位附近存在双键。

2.2.3 4 位甲基结构形成的特征碎片的机理

胆甾烷醇的甾核离子 m/z 257 具有饱和结构,相应的 D 环开裂碎片为 m/z 215。当甾核 C4 上多 1 个甲基时,出现特征碎片 m/z 271 和 m/z 229。根据碳同系物的特征性,推测当 C4 位多 1 个甲基(或 2 个)时,相应的甾核离子和 D 环开裂的碎片离子多 14(或 28)单位的质荷比,

表 1 甾醇标准品 TMS 衍生化合物的特殊碎片离子

Table 1 Special fragments of sterols standards TMS derivatives

甾醇	基峰	特殊碎片离子 m/z (相对丰度)					D 环开裂离子	D 环开裂离子	m/z 129	$[M-129]^+$	m/z 69	m/z 83
		M^+	$[M-CH_3]^+$	$[M-TMSOH]^+$	$[M-CH_3-TMSOH]^+$	$[M-TMSOH-SC]^+$	(C15-16 断裂)	(C14-15 断裂)				
1	75	460(37)	445(44)	370(20)	355(30)	257(4)		215(65)	129(9)			
2	458	458(100)	443(24)	368(7)	353(20)	255(58)	229(18)	213(22)				
3	458	458(100)	443(19)	368(8)	353(12)	255(20)	229(33)	213(20)				
4	69	456(18)	441(14)	366(18)	351(17)	253(255-2H)(40)		213(10)	129(90)	343(54)	69(100)	
5	129	472(35)	457(12)	382(66)	367(40)	255(17)		213(9)	129(100)	343(57)		
6	472	472(100)	457(15)	382(5)	367(15)	269(64)	243(14)	227(15)				
7	472	472(100)	457(24)	382(10)	367(23)	255(27)	229(43)	213(40)				
8	253	468(9)		378(5)		253(100)		211(7)	129(6)		69(58)	83(9)
9	251	466(10)	451(4)	376(34)	361(10)	251(100)		209(15)	129(6)		69(59)	83(12)
10	129	486(34)	471(12)	396(71)	381(18)	255(14)	129(100)	357(57)				83(9)
11	129	484(13)		394(11)		255(16)		213(12)	129(100)	355(18)		
12	83	484(43)		394(43)	379(11)	255(31)		213(11)	129(58)	355(15)	69(56)	83(100)
13	395	500(13)	485(21)		395(100)			255(2)	129(8)			
14	393	498(33)	483(31)		393(100)			255(2)	129(15)			

注：括号中的数字为特殊碎片离子的相对丰度；11 中另外 2 个特征碎片 m/z 296(74) m/z 386(98)

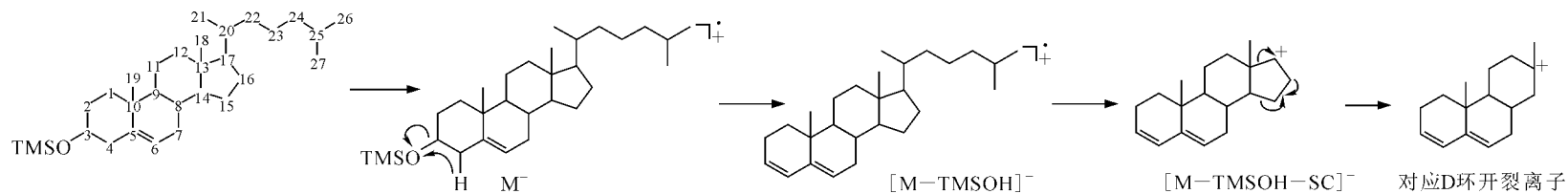


图 1 $[M-TMSOH-SC]^+$ 和对应 D 环开裂的离子形成的机理

Fig. 1 The mechanism of $[M-TMSOH-SC]^+$ and D ring opened ions fragments

示于图 4。例如, Nist 库中 ergost-8(14)-en-3 β -ol 由于甾核 C4 位无甲基, 质谱图中出现甾核形成的碎片离子 m/z 213, m/z 229 和 m/z 255。4-methylcholest-7-en-3 β -ol 由于甾核 C4 多 1 个甲基, 质谱图中出现甾核形成的碎片离子 m/z 227 ($213 + \text{CH}_2$), m/z 243 ($229 + \text{CH}_2$), m/z 269 ($255 + \text{CH}_2$)。这 2 个化合物的相对分子质量相同, 前者的甾核比后者少 1 个碳, 则侧链上比后者多 1 个碳, ergost-8(14)-en-3 β -ol 在侧链

C24 位上出现 1 个甲基。

2.3 侧链结构的分析

侧链的结构分析应该和化合物的相对分子质量及甾核的结构分析相联系。从甾醇 TMS 衍生物的相对分子质量中可推测出甾醇的总碳数和总双键数, 从甾核离子或 D 环碎裂的碎片离子可推断出甾核上的双键数和甲基分布状况, 从而可以判断出侧链上的双键数和烷基化程度。结合特殊的碎片离子, 即可推定侧链的结构。

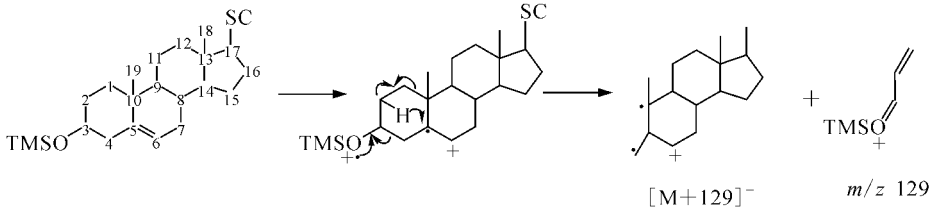


图 2 m/z 129 和 $[M-129]^+$ 碎片离子形成机理

Fig. 2 The mechanism of ions fragment m/z 129 and $[M-129]^+$

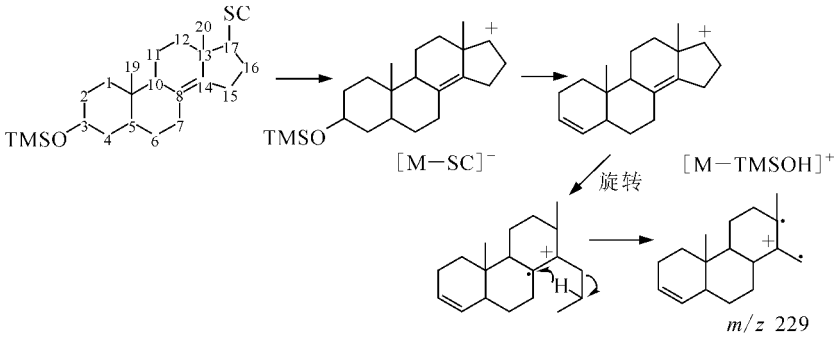


图 3 与 C8 相连的双键 ($\Delta^{7(8)}$, $\Delta^{8(9)}$, $\Delta^{8(14)}$) 形成离子碎片 m/z 229 的机理

Fig. 3 The mechanism of ions fragments m/z 229 caused by unsaturated bonds conjoint C8

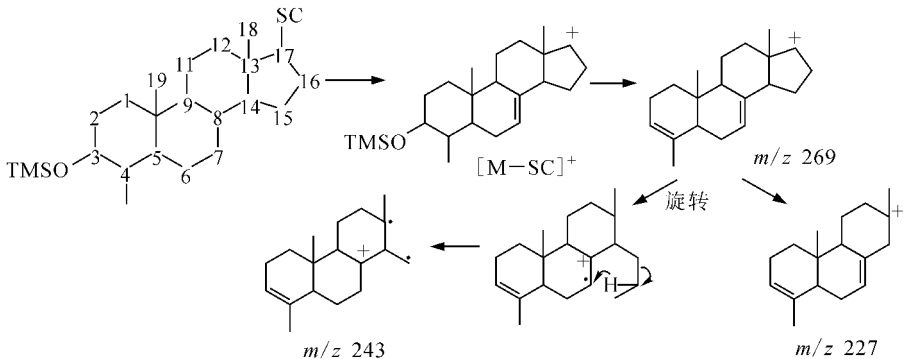


图 4 4 位甲基结构形成的甾核特征碎片机理

Fig. 4 The mechanism of sterol nucleus fragments caused by C4-methyl structure

2.3.1 C22 双键和 C24 烷基共同引起的高丰度特征碎片的机理 曾志等^[13]认为在 Δ^5 -甾醇乙酸盐的质谱中,C22 位双键的存在可以通过烯丙基断裂,并伴随着 1 个 H 转移的特征碎片峰 m/z 282 来确定。Stigmasterol, ergosterol 和 dehydroergosterol 的 TMS 衍生物质谱中都未出现碎片峰 m/z 282,可能与侧链上的烷基化有关。分子离子的 C17—C20 键断裂后,产生侧链游离基碎片,基于这类碎片,可根据质谱规律来推测侧链裂解的方式与其上的双键位置和分支结构的关系。若 C22 位存在双键,当 C24 位上存在乙基时,乙基上的 H 可通过碳链形成的六元环重排到 C20 和 C23 的游离基位置上,C22 位的正电荷吸引 C23—C24 键的一对电子,形成 i 断裂,同时,正电荷转移到 C24 上,形成具有共轭特征,稳定性强的 m/z 83 碎片,示于图 5;当 C24 位上是甲基时,也可能通过 H 的重排, i 断裂后形成稳定的共轭碎片 m/z 69,但是具体机理不明。在 stigmasterol 的质谱中出现了特殊碎片 m/z 83 离子峰,且为基峰,而 sitosterol 侧链上 C22 位饱和,C24 位上有乙基,不出现高丰度的 m/z 83 碎片峰;ergosterol 和 dehydroergosterol 侧链上 C24 位上为甲基,也没有出现高丰度的 m/z 83 碎片峰,但是出现较高丰度的 m/z 69 碎片离子峰。

2.3.2 C24 位双键引起高丰度 m/z 69 碎片离子峰的机理 曾志等^[14]在甾醇乙酸盐质谱研究中指出,强峰 m/z 69 的存在支持了 C24 位双键的结构。C24 位双键电离后形成游离基中心诱导 C22—C23 键产生 α 断裂,生成共振稳定特性

强的烯异丁基离子 m/z 69,示于图 6。desmosterol, 8, 24-lanostadien-3 β -ol, stigmasterol 的 TMS 衍生物质谱中都出现丰度较高的 m/z 69 碎片离子峰。其中 8,24-lanostadien-3 β -ol 和 8-lanosten-3 β -ol 结构上只相差 C24 位双键,但前者的质谱中 m/z 69 的丰度达到 92,而后者 m/z 69 的丰度只有 26,较大的丰度差有力地支持了 C24 位双键的结构。

2.3.3 C24(28) 引起的麦氏重排效应 在甾醇乙酸酯质谱研究中,特征峰 m/z 296 表示 C24(28)位双键^[14]。C24(28)位双键产生的麦氏重排效应同样可以应用到甾醇 TMS 衍生物质谱研究中,C20 位上的 H 通过六元环转移到不饱和基团 C28 上,接着 C22—C23 发生 i 断裂,转移一对电子,正电荷转移到 C22 上,形成特征碎片离子。特征碎片离子可进一步失去 TMSOH 中性碎片,形成相应少 90 单位的特征碎片离子,示于图 7。

从质谱图中推测甾醇的结构时,首先要确定甾醇的相对分子质量,推算甾醇的总碳数和总的双键数;其次通过甾核离子和(或)D 环碎裂离子推测甾核上的烷基化程度和双键数,以胆甾醇为例,C4 位无甲基饱和的甾核离子 m/z 257 和 D 环碎裂离子 m/z 215,对应每多 1 个碳的同系物的特征碎片各多 14 单位的质荷比,每多 1 个双键则相应各少 2 单位的质荷比;再次可以通过前两部分的推测,了解侧链上的烷基化程度和双键数;最后结合特征碎片离子,判断烷基和双键在甾核和侧链上的具体分布位置。

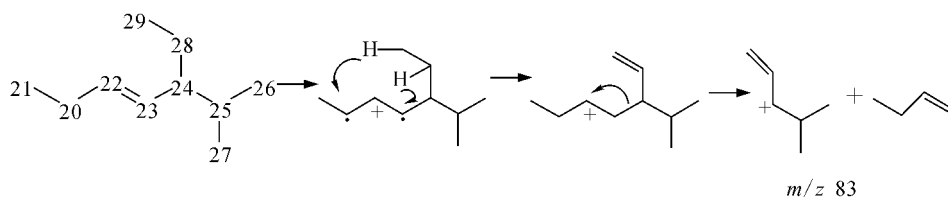


图 5 C22 双键和 C24 乙基共同引起的高丰度 m/z 83 碎片离子峰的机理

Fig. 5 The mechanism of high relative abundances fragment m/z 83 caused by C22 unsaturated bond and C24 ethyl

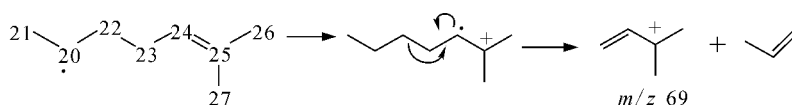


图 6 C24 位引起高丰度 m/z 69 碎片离子峰的机理

Fig. 6 The mechanism of ions m/z 69 showing high relative abundances caused by C24 unsaturated bond

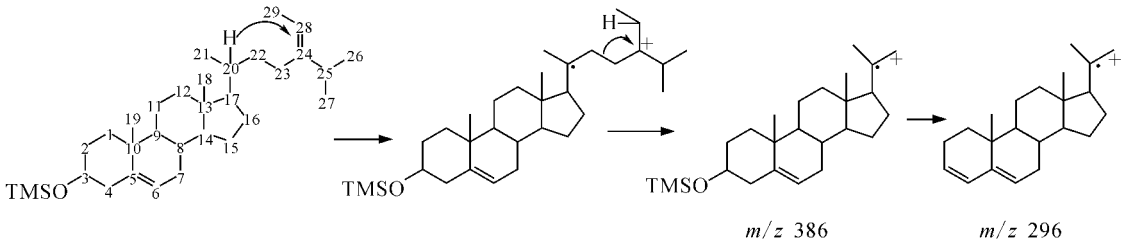


图 7 C24(28) 引起的麦氏重排效应

Fig. 7 McLafferty rearrangements caused by C24(28) unsaturated bond

3 应用实例

3.1 微藻甾醇结构解析实例

在锥状斯克里普藻的甾醇分布研究中,锥状斯克里普藻甾醇检测总离子流色谱示于图 8,甾醇的出峰时间主要由甾醇的碳数决定,碳数少的较快流脱出来。发现化合物 A 的质谱图中(图 9)显示最高质荷比特征峰 m/z 484 和对应失去 m/z 90 的特征峰 m/z 394,表明该化合物的相对分子质量是 484,具有 29 个碳原子和 2 个不饱和键。特征峰 m/z 227 ($213+14$), m/z 269 ($255+14$) 的存在表明甾核部分具有 1 个不饱和键,同时 C4 位出现 1 个甲基,可见侧链上具有 1 个双键,同时比胆甾醇侧链多 1 个甲基。不出现 m/z 129 特征峰,但是出现特征峰 m/z 243 ($229+14$),表明甾核上的双键与 C8 相连,由 m/z 243 的丰度较高推测,不饱和键位置靠近 C14 位,可能是 C8(14) 双键。 m/z 69 基峰提示,侧链上可能具有 C24 不饱和键,或是 C22 不饱和键和 C24 甲基,由前面侧链部分双键和碳数的推测:侧链上具有 1 个双键,同时比胆甾醇侧链多 1 个甲基,所以后者的可能性比较大。

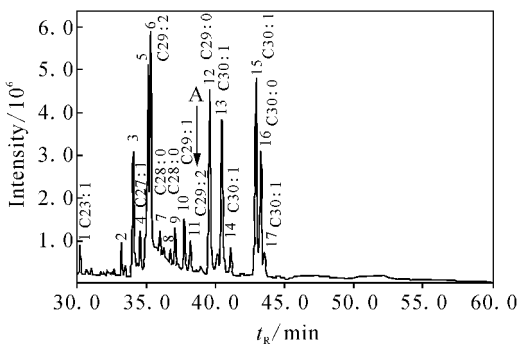


图 8 锥状斯克里普藻甾醇检测总离子流色谱图

Fig. 8 Total ion current chromatogram of the sterols in *Scrippsiella trochoidea*

由此,该化合物可能是 4α -methyl- 5α -ergosta-8(14),22-dien- 3β -ol。 4α -methyl- 5α -ergosta-8(14),22-dien- 3β -ol 是卡罗藻种属间的生化分类标志物,在其他的甲藻中很少发现。Jeffrey^[19] 分析了 40 多种甲藻的甾醇组成,发现这 2 种甾醇存在于 *Karenia mikimotoi*, *Karlodinium micrum* (formerly named *Gymnodinium mikimotoi*, *Gymnodinium galatheanum*), 它们也在其他的无甲甲藻中发现,但含量很少。本次实验在锥状斯克里普藻和海洋原甲藻中都发现了微量的 4α -methyl- 5α -ergosta-8(14),22-dien- 3β -ol。

3.2 4 种微藻甾醇定性分析

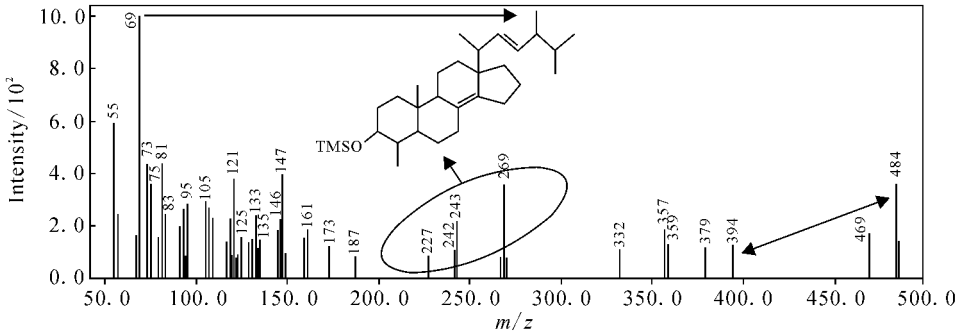
应用以上研究规律对 4 种甲藻:共生藻属甲藻 (*Symbodinium* sp.) / Xing; 锥状斯克里普藻 (*Scrippsiella trochoidea*) / Sk1; 海洋原甲藻 (*Prorocentrum micans*) / Pm⁻¹; 无纹环沟藻 (*Gyrodinium instriatum*) / Gs 的甾醇组成进行鉴定,共检测到 24 种甾醇化合物,示于表 2(甾醇化合物编号在文中用黑体字标明)。

S. trochoidea 中具有一个短链甾醇(1),基于特征碎片 m/z 73,269,359,312,402 推测为甾核 4 位具有甲基,侧链只有 3 个碳的短链甾醇。出现特殊的 C27:1 甾醇(4),基于特征离子碎片 m/z 213,219,229,255,353,368,443,458 推测为 C27:1(Δ^7),这种甾醇在其他甲藻中未报道过。甲藻甾醇(19)和甲藻甾烷醇(23)的含量比较丰富,出现了单不饱和 C30 4-甲基甾醇异构体,基于特征碎片 m/z 229,243,269,297,387,485,500 出峰在甲藻甾烷前,推测为 4α ,23,24-trimethyl- 5α -cholest-8(14)-en- 3β -ol(21), Δ^7 同分异构物(24)的质谱特征和前者相似,根据它在甲藻甾烷后被先提出确定。Harvey^[20] 在 *S. trochoidea* 中也检测到 4α ,23,24-trimethyl- 5α -cholest-8(14)-en- 3β -ol。

P. micans 中甲藻甾醇(19)和甲藻甾烷醇(23)分别占 11.64%和 19.36%,胆固醇(3)含量最高,达 44.17%。除甲藻甾醇和甲藻甾烷醇外,其他 4-甲基甾醇种类和含量都比较少。

G. instriatum 中发现一个 C28:1 甾醇(10),基于特征碎片 m/z 227, 243, 269, 382, 457, 472 推测为 C28:1 ($\Delta^{8(14)}/4\text{Me}$)。Jeffrey^[19]和 Withers^[21]在 *Amphidinium* 中也检测到含有(10)而且含量高。*G. instriatum* 中发现

含量很低,只占 0.81%。甲藻甾醇(19)含量十分丰富,高达 50.84%,其所有的甾醇几乎都是 4-甲基甾醇。*Symbodinium* sp. 中发现一个 C28:2 甾醇,含量达 9.67%,特殊离子碎片为 m/z 69, 213, 228, 243, 255, 282, 455, 470 推测为 stellersterol C28:2($\Delta^{7,22}/24\text{Me}$) (5),这种甾醇在 *Akashiwo sanguinea* 和 *Gymnodinium* sp. 中都有报道^[19]。



注:特征碎片离子以标明,指示了化合物 A 可能是 4 α -methyl-5 α -ergosta-8(14), 22-dien-3 β -ol

图 9 化合物 A 质谱图

Fig. 9 Mass spectra of component A

表 2 4 种甲藻中甾醇的分布

Table 2 Sterols distribution in four dinoflagellas

编号	保留时间 /min	甾醇名称	Xing (百分含量)	Sk1 (百分含量)	Pm ⁻¹ (百分含量)	Gs (百分含量)
1	30.19	C23:1($\Delta^5/4\text{me}$)		1.33		1.02
2	33.42	C27:2 ($\Delta^{5,22}/27\text{Nor}, 24\text{Me}$)	11.8			
3	34.05	C27:1(Δ^5)	21.85		44.17	
4	34.52	C27:1(Δ^7)		2.2		
5	34.78	C28:2($\Delta^{7,22}/24\text{Me}$)	9.67			
6	35.28	C28:2($\Delta^{8(14),22}/24, 4\text{-dime}, 27\text{-nor}$)		16.09		
7	35.53	C28:2($\Delta^{5,22}/24\text{Me}$) 硅藻甾醇	5.36			
8	35.96	C28:0		1.3		
9	35.98	C28:0(5 $\alpha/4\text{Me}$)	0.6		2.16	3.22
10	36.50	C28:1($\Delta^{8(14)}/4\text{Me}$)				0.81
11	37.05	C28:0(5 $\alpha/24\text{Me}$)		2.56		
12	37.10	C28:1($\Delta^5/24\text{Me}$)	1.41			
13	37.76	C29:1($\Delta^{22}/4, 24\text{diMe}$)	21.04	4.13		
14	38.13	C29:2($\Delta^8(14), 22/4, 24\text{dime}$)		2.34	1.42	
15	38.16	C29:2($\Delta^{5,22}/24\text{Ethyl}$)	0.57			
16	38.51	C29:2($\Delta^{5,22}/23, 24\text{dime}$)			17.53	
17	39.60	C29:0($\Delta^5\alpha/4, 24\text{diMe}$)	13.54	17.01		5.63
18	40.05	C29:1($\Delta^5/24\text{ethyl}$)			3.72	
19	40.47	C30:1($\Delta^{22}/4, 23, 24\text{triMe}$) 甲藻甾醇	14.16	14.21	11.64	50.84
20	41.09	C30:1 ($\Delta^{8(14)}/4\text{me}, 24\text{ethyl}$)		1.86		
21	42.87	C30:1($\Delta^{8(14)}/4, 23, 24\text{trime}$)		21.57		
22	42.96	C30:0($\Delta^5\alpha/4\text{me}, 24\text{ethyl}$)				17.55
23	43.26	C30:0($\Delta^5\alpha/4, 23, 24\text{trime}$)		13.28	19.36	7.74
24	43.54	C30:1($\Delta^7/4, 23, 24\text{trime}$)		2.12		13.19

参考文献:

- [1] WIKFORS G H, GLADU P K, PATTERSON G W. In search of the ideal diet for oysters: recent progress with emphasis on sterols[J]. J Shellfish Research, 1991, 10(3): 292-301.
- [2] SOUDANT P, SANLES M V, QUERE C, et al. The use of lipid emulsions for sterol supplementation of spat of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* [J]. Aquaculture, 2000, 184(3/4): 315-326.
- [3] HARTMANN M A. Plant sterols and the membrane environment[J]. Trends in Plant Science, 1998, 3(5):170-175.
- [4] PIORONEN V, LINDSAY D G, MIETTINEN T A, et al. Plant sterols: biosynthesis, biological functions and their importance to human nutrition [J]. Science Food Agriculture, 2000, 80: 939-966.
- [5] VOLKMAN J K. Sterols in microorganisms[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2003, 60 (5): 495-506.
- [6] VOLKMAN J K, BARRETT S M, BLACKBURN S I, et al. Microalgal biomarkers: a review of recent research development[J]. Organic Geochemistry, 1998, 29(5/6/7):1 163-1 179.
- [7] SALIOT A, LAUREILLARD J, SCRIBE P, et al. Evolutionary trends in the lipid biomarker approach for investigating the biogeochemistry of organic matter in the marine environment[J]. Marine Chemistry, 1991, 36(1/2/3/4): 233-248.
- [8] QUEMENEUR M, MARTY Y. Sewage influence in a macrotidal estuary; fatty acid and sterol distributions[J]. Estuarine Coastal Shelf Science, 1992, 34(4):347-363.
- [9] GALLI G, MARONI S. Mass spectrometric investigations of some unsaturated sterols biosynthetically related to cholesterol [J]. Steroids, 1967, 10(3): 189-197.
- [10] KNIGHTS B A, LAURIE W. Application of combined gas-liquid chromatography-mass spectrometry to the identification of sterols in oat seed [J]. Phytochemistry, 1967, 6(3): 407-416.
- [11] ROBERT M K, CARLSON, SIMEON P, et al. Minor and trace sterols in marine invertebrates: VI. Occurrence and possible origins of sterols possessing unusually short hydrocarbon side chains[J]. Bioorganic Chemistry, 1978, 7(4): 453-479.
- [12] 曾 志, 曾陇梅. 甾醇及其衍生物的质谱学规律 I[J]. 质谱学报, 1994, 15(2):11-16.
- [13] 曾 志, 曾陇梅. 甾醇及其衍生物的质谱学规律 II[J]. 质谱学报, 1996, 17(3):25-30.
- [14] 曾 志, 曾陇梅. 甾醇及其衍生物的质谱学规律 III[J]. 质谱学报, 1996, 17(4):13-17.
- [15] BLIGH E G, DYER W J. A rapid method of total lipid extraction and purification[J]. Can J Biochemistry Physiology, 1959, 37(5):911-923.
- [16] 王光辉, 熊少祥. 有机质谱解析[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [17] 徐继林, 严小军, 周成旭, 等. 甾醇在海洋微藻中的分布研究[J]. 海洋学报, 2007, 29(5):1-8.
- [18] 王培荣, 徐冠军, 边立曾, 等. 海黍子马尾藻 (*Sargassum muticum*) 中甾醇类化合物的研究[J]. 科学通报, 2006, 51(14):1 702-1 709.
- [19] JEFFREY D L, PETER J C. A survey of the composition of the marine dinoflagellates *Karenia brevis*, *Karenia mikimotoi*, and *Karlodinium micrum*: distribution of sterols within other members of the class dinophyceae [J]. J Phycology, 2002, 38(4):670-682.
- [20] HARVEY H R, BRADSHAW S A, O'HARA S C M, et al. Lipid composition of the marine dinoflagellate *Scrippsiella trochoidea* [J]. Phytochemistry, 1988, 27(6): 1 732-1 739.
- [21] WITHERS N W, GOAD L J, GOODWIN T W. A new sterol, 4 α -methyl-5 α -ergosta-8(14), 24(28)-dien-3 β -ol, from the marine dinoflagellate *Amphidinium carterae* [J]. Phytochemistry, 1979, 18: 899-901.