

结晶法分离精制混合植物甾醇中 β -谷甾醇和豆甾醇

许文林, 黄一波, 钱俊红, 沙鸥

(扬州大学化学化工学院, 江苏 扬州 225002)

摘要: 利用豆甾醇和 β -谷甾醇在正戊醇和环己酮中的溶解性差异以及两种甾醇在环己酮中溶解度对温度的依赖性不同, 研究了以正戊醇和环己酮为溶剂, 用结晶法从精制植物甾醇中分离豆甾醇和 β -谷甾醇的工艺方法. 实验结果表明, 以环己酮为溶剂, 混合植物甾醇经过3次分级结晶后, β -谷甾醇含量达到87%; 以环己酮或正戊醇为溶剂, 通过5次重结晶后, 豆甾醇含量达到92%.

关键词: 豆甾醇; β -谷甾醇; 分离; 结晶

中图分类号: TQ654.9⁺8 文献标识码: A 文章编号: 1009-606X(2003)01-0073-07

1 前言

天然植物甾醇是植物中的一种活性成份, 广泛存在于各种植物油中^[1-4]. 植物甾醇及其衍生物由于其特有的生物活性和物理化学性质, 广泛用于医药、食品和化妆品等行业^[5-7]. 从植物油中分离出来的甾醇是一类结构相似、物性差别小的甾类化合物, 主要包括豆甾醇、 β -谷甾醇、菜油甾醇和菜籽甾醇, 它们在结构上的主要区别在于侧链基团不同^[8]. 对混合植物甾醇进行分离精制, 可以为甾体激素的生产提供原料, 而混合植物甾醇的有效分离是实现单组份高纯度植物甾醇规模化生产过程中的一个重要环节. 目前, 在我国豆甾醇和 β -谷甾醇的分离提纯的研究工作几乎还是空白, 因而研究植物甾醇单组份分离的工艺可以为豆甾醇和 β -谷甾醇的生产提供理论指导^[9].

目前, 国外对混合植物甾醇分离精制以获得单组份的方法主要有:

(1) 化学法: 利用化学反应制备植物甾醇的衍生物, 增加各种植物甾醇的物性差异, 再用物理法分离. 通常利用豆甾醇乙酯的四溴化物和 β -谷甾醇乙酯的二溴化物溶解度的差异, 首先将混合植物甾醇用乙酸酐进行酯化反应, 然后将酯化产物用过量溴进行溴化, 选用合适的溶剂分离出四溴化物和二溴化物. 分离后的产物分别用锌粉还原脱溴、碱性水解, 最后在丙酮中重结晶得到纯的豆甾醇和 β -谷甾醇^[3]. 这种工艺长久以来作为传统的分离方法被采用, 但在大规模的工业化生产中存在反应步骤多、成本高、操作困难、环境污染大、溶剂回收率低等缺点.

(2) 物理法: 溶剂结晶法可用于直接分离混合甾醇, 操作较为简单. 所用的溶剂主要有: 甲醇、乙醇、异丙醇、丙酮和乙酸乙酯等, 但使用单一溶剂分离混合甾醇时, 产品的纯度通常不高, 需进一步精制, 甾醇收率也偏低^[9]. 其原因主要是由于植物甾醇类化合物之间的溶解性差异较小, 因而选择合适的溶剂和操作条件是有效分离的瓶颈.

用结晶法分离混合植物甾醇具有操作简便、工艺流程短、溶剂易回收、环境污染小等优点. 因此, 本工作根据混合植物甾醇中的主要成份豆甾醇和 β -谷甾醇在有机溶剂中溶解度的差异以及溶

收稿日期: 2002-07-17, 修回日期: 2002-11-19

基金项目: 江苏省教育厅自然科学基金资助项目(99KJB150007); 江苏省“青蓝工程”跨世纪学术带头人基金资助项目

作者简介: 许文林(1963-), 男, 江苏省苏州市人, 博士, 教授, 化学工程与工艺专业, E-mail: wxu@mail.yzu.edu.cn.

解度随温度变化的差异,选择正戊醇、环己酮为溶剂,利用结晶法提纯豆甾醇和 β -谷甾醇,可以为植物甾醇单组份结晶法分离精制的工业化提供一定的理论依据。

2 实验

2.1 试剂和仪器

环己酮(AR, 上海华东试剂公司),正戊醇(AR, 上海华东试剂公司), β -谷甾醇(95%, SIGMA),豆甾醇(95%, Acros Organics),混合植物甾醇(江苏泰兴生物制品厂,总甾醇含量约为95%,本研究中用紫外光谱法测得 β -谷甾醇含量为62%、豆甾醇含量为28%)。

UV-2501PC 紫外可见分光光度计(日本岛津公司),740 型傅立叶变换红外分光光度计(美国 Nicolet 公司),X-4 数字显示显微熔点测定仪(北京泰克仪器有限公司),GT33A 电子天平(上海天平仪器厂),501 型超级恒温水浴(上海市实验仪器厂)。

2.2 实验方法

2.2.1 β -谷甾醇和豆甾醇溶解度曲线的测定

在一定量 β -谷甾醇或豆甾醇样品中滴加溶剂,在一定温度下平衡2 h 以上,根据体系的清浊变化确定试样在相应温度下的溶解度。以溶解度对温度作图,即得 β -谷甾醇和豆甾醇在不同溶剂中的溶解度曲线。

2.2.2 豆甾醇/ β -谷甾醇/溶剂三组份相图

在不同质量比的豆甾醇和 β -谷甾醇混合试样中,滴加环己酮或正戊醇,根据体系的清、浊变化确定各向同性区域。实验温度分别为 $(25 \pm 0.1)^\circ\text{C}$ 和 $(60 \pm 0.1)^\circ\text{C}$ 。

2.2.3 结晶实验

(1) β -谷甾醇的分级结晶精制

根据 β -谷甾醇在环己酮中 55°C 时的溶解度和原料中 β -谷甾醇的含量,在250 ml 三口烧瓶中,加入过量的混合植物甾醇或上次分离出的结晶物,配制成 55°C 下 β -谷甾醇的环己酮饱和溶液,将混合试样加热并在 55°C 温度下搅拌20 min,趁热过滤。母液冷却至 25°C ,结晶、抽滤。将所得固体用上述方法反复处理,可实现 β -谷甾醇的提纯。

(2) 豆甾醇的重结晶精制

将30 g 混合植物甾醇与正戊醇或环己酮按1:3 (g/ml)配比加入到250 ml 三口烧瓶中,在水浴中加热至 60°C ,待所有固体溶解后,使其随水浴自然冷却至 25°C ,并在此温度下恒温过滤,所得滤饼置于 60°C 真空干燥箱中干燥。将干燥后的滤饼按上述步骤反复处理可实现豆甾醇的提纯。

2.2.4 分析方法

混合甾醇中 β -谷甾醇和豆甾醇含量的测定采用红外光谱(KBr 压片)法和以磺酸基醋酸汞试剂作为显色剂,利用紫外可见光谱法进行定量测定^[10]。

3 结果与讨论

3.1 豆甾醇和 β -谷甾醇的红外和紫外光谱

图1是豆甾醇和 β -谷甾醇的红外光谱图。由图可知,豆甾醇在指纹区 970 cm^{-1} 和 960 cm^{-1} 附

近有 2 个吸收峰, 而 β -谷甾醇只在 960 cm^{-1} 附近有 1 个吸收峰, 利用两吸收峰强度比(峰面积比 A_{960}/A_{970})与两种甾醇含量(谷甾醇/豆甾醇 c_2/c_1)之比的关系曲线(图 2)^[11], 可定量分析混合甾醇中豆甾醇和 β -谷甾醇的含量。

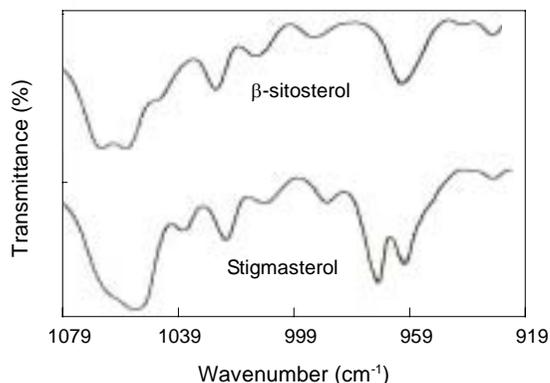


图 1 β -谷甾醇和豆甾醇的红外光谱
Fig.1 The IR spectra of β -sitosterol and stigmasterol

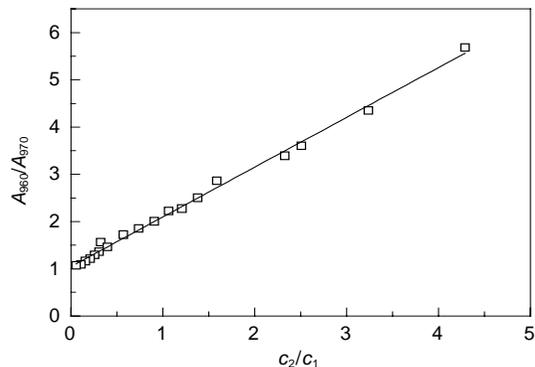


图 2 峰面积比与两种甾醇相对含量的关系曲线
Fig.2 The curve of A_{960}/A_{970} vs. c_2/c_1

图 3 是豆甾醇和 β -谷甾醇络合物的紫外可见光谱。由图可知, 在相同浓度下豆甾醇和 β -谷甾醇在 310 和 410 nm 处的吸光度不同, 根据吸光度的加和性原理^[12], 可对混合甾醇中的豆甾醇和 β -谷甾醇进行定量分析。

3.2 分级结晶提纯 β -谷甾醇

图 4 是豆甾醇和 β -谷甾醇在环己酮[图 4(a)]和正戊醇[图 4(b)]中溶解度随温度的变化曲线。由图可知 β -谷甾醇(曲线 2)在环己酮和正戊醇中的溶解度都比豆甾醇(曲线 1)在相应溶剂中的大。在环己酮中, β -谷甾醇的溶解度随温度升高急剧

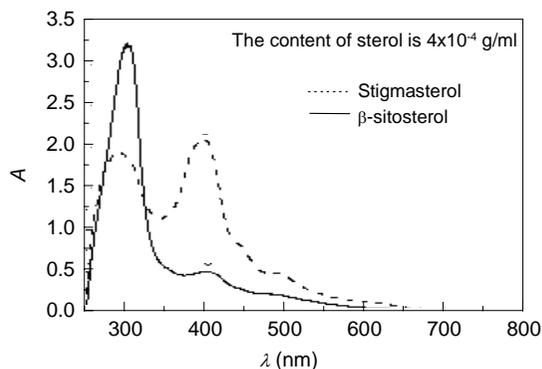


图 3 豆甾醇和 β -谷甾醇络合物的紫外光谱
Fig.3 The UV spectra of the complex compound of stigmasterol and β -sitosterol

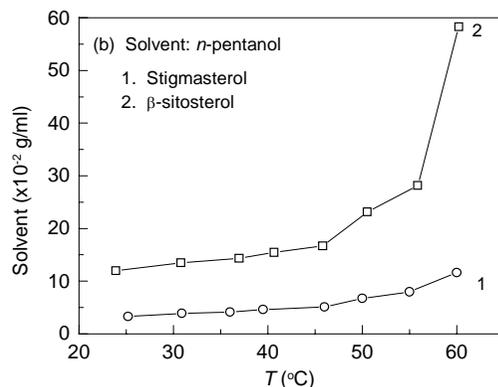
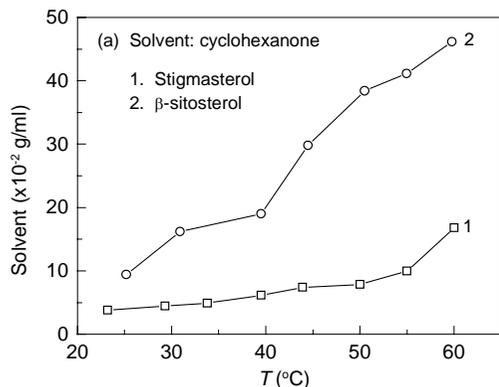


图 4 豆甾醇和 β -谷甾醇在不同溶剂中溶解度随温度的变化曲线

Fig.4 The change of solubilities of stigmasterol and β -sitosterol with temperature in different solvents

增加, 而豆甾醇的溶解度随温度的升高缓慢增加. 在正戊醇中, 这两种物质的溶解度随温度变化的趋势相似, 都随温度升高而缓慢增加. 因而可利用两种甾醇在环己酮中的溶解度随温度变化的差异, 以环己酮为溶剂, 利用分级结晶法, 对混合甾醇中豆甾醇和 β -谷甾醇进行分离提纯. 结晶产品中 β -谷甾醇含量的理论值由式(1)计算得到(由于混合甾醇中杂质含量较少, 且杂质在溶剂中具有较大的溶解度^[8], 在计算时可不考虑杂质对结果的影响).

$$x = \frac{S_A^{55} - S_A^{25}}{(S_A^{55} - S_A^{25}) + (A_B^{55} - S_B^{25})} \times 100\%, \quad (1)$$

式中 S_A^{55} , S_A^{25} 分别表示 β -谷甾醇在环己酮中 55°C 和 25°C 时的溶解度, A_B^{55} 表示 55°C 时豆甾醇在环己酮溶液中的含量, S_B^{25} 表示豆甾醇在环己酮中 25°C 时的溶解度. 当 $A_B^{55} \leq S_B^{25}$ 时, β -谷甾醇的理论含量为 100%.

以环己酮为溶剂对混合甾醇分级结晶处理后, 产品中 β -谷甾醇含量的变化结果见表 1. 由表可知, 随着结晶次数增加, 结晶产品中 β -谷甾醇的含量增加, 产物的熔点降低; 经过 3 次重结晶后, β -谷甾醇的含量达 87%, 产物的熔点(136~139°C)接近 β -谷甾醇的熔点(140°C). 在结晶产品中, β -谷甾醇的含量低于理论计算值 x , 可能在冷却结晶过程中, 豆甾醇的结晶速率比 β -谷甾醇快, 导致 β -谷甾醇的含量低于理论计算值.

表 1 以环己酮为溶剂用分级结晶法精制 β -谷甾醇的实验结果

Table 1 The experimental results of purifying β -sitosterol by fraction crystallization using cyclohexanone as solvent

No. of re-crystallization	Cyclohexanone/phytosterols (ml/g)	Melting point (°C)	β -sitosterol (%)		Theoretical x (%)	Yield (%)
			by IR	by UV		
1	2.50	141~145	75.1	75.6	86.5	53.68
2	2.40	136~140	81.7	82.3	91.5	49.53
3	2.35	136~139	87.5	88.4	98.8	38.65

3.3 重结晶提纯豆甾醇

图 5 和 6 是 β -谷甾醇/豆甾醇/环己酮或正戊醇在 25°C 和 60°C 时的三组份部分相图.

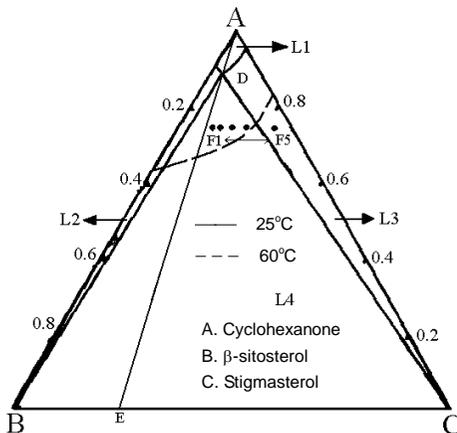


图 5 β -谷甾醇/豆甾醇/环己酮体系相图

Fig.5 The phase diagram of β -sitosterol/stigmasterol/cyclohexanone system

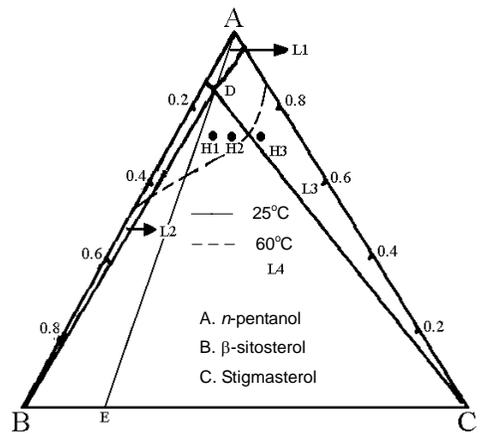


图 6 β -谷甾醇/豆甾醇/正戊醇体系相图

Fig.6 The phase diagram of β -sitosterol/stigmasterol/ n -pentanol system

由图可知,该相图可分为 4 个区域:单相区 L1,三相区 L4(液相+豆甾醇+ β -谷甾醇), β -谷甾醇结晶区 L2(液相+ β -谷甾醇),豆甾醇结晶区 L3(液相+豆甾醇).由于精制植物甾醇中主要含豆甾醇和 β -谷甾醇,可将精制甾醇与溶剂组成的体系看成是二元固相一元液相组成的三组份体系.若起始物系点落在 AE 连线的左侧,则经过重结晶后可得到纯的 β -谷甾醇;若物系点落在 AE 连线的右侧,则经过重结晶后可得到纯的豆甾醇.本实验所用混合甾醇的组成位于 AE 连线的右侧,用不同的溶剂进行重结晶,理论上物系点的变化分别如图 5(由 F1→F5)和图 6(由 H1→H3)所示.

结晶产品中豆甾醇的实际含量见表 2 和 3,分别是以环己酮和正戊醇为溶剂对混合植物甾醇进行重结晶的实验结果.由表 2 和 3 可知,随着重结晶次数的增加,提纯产物的熔点升高,豆甾醇的含量增加,经过 5 次重结晶,产品中豆甾醇含量大于 92%.

表 2 以环己酮为溶剂用重结晶法精制豆甾醇的实验结果

Table 2 The experimental results of purifying stigmasterol by recrystallization using cyclohexanone as solvent

No. of re-crystallization	Cyclohexanone/purified stigmasterol (ml/g)	Melting point (°C)	Stigmasterol (%)		Theoretical x (%)	Current yield (%)	Overall yield (%)
			by IR	by UV			
1	3.05	141~143	54.0	52.3	36.4	47.7	47.7
2	3.08	147~150	68.7	65.6	47.2	52.4	25.8
3	3.04	151~154	80.9	79.8	60.7	61.4	16.7
4	3.06	154~157	87.6	84.2	84.6	70.0	11.7
5	3.02	161~164	96.9	95.1	100.0	68.9	8.1

表 3 以正戊醇为溶剂用重结晶法精制豆甾醇的实验结果

Table 3 The experimental results of purifying stigmasterol by recrystallization using *n*-pentanol as solvent

No. of re-crystallization	<i>n</i> -Pentanol/purified stigmasterol (ml/g)	Melting point (°C)	Stigmasterol (%)		Theoretical x (%)	Current yield (%)	Overall yield (%)
			by IR	by UV			
1	3.07	137~142	53.3	50.9	43.7	48.8	48.8
2	3.05	146~150	66.6	64.1	65.6	56.8	27.9
3	3.04	147~150	74.7	71.8	100.0	60.2	16.9
4	3.02	154~157	86.5	83.4		60.9	10.6
5	3.10	161~164	95.3	92.7		57.5	6.1

表 2 和 3 的分析数据表明,用环己酮和正戊醇为溶剂,第 1 次重结晶的产品中豆甾醇的含量远大于理论计算值.其原因可能是在理论计算时只考虑了结晶过程的热力学平衡,而未考虑结晶过程的动力学,如结晶速率、晶体之间的包裹等因素^[13].第 1 次重结晶产品中的豆甾醇含量明显偏高,可能是豆甾醇的结晶速率比 β -谷甾醇的快,导致在第 1 次重结晶产品中,豆甾醇的含量高于理论计算值.根据第 1 次重结晶的产品进行计算,后 4 次重结晶产品中豆甾醇的实际含量均较理论计算值低,可能在豆甾醇含量较高时,其晶体中包裹的 β -谷甾醇量增加,从而使得结晶产品中豆甾醇的含量低于理论计算值.

3.4 结晶滤液中 β -谷甾醇和豆甾醇的含量

以正戊醇或环己酮为溶剂的结晶滤液中 β -谷甾醇(A)和豆甾醇(B)的含量见表 4.由表可知,由于杂质在溶剂中具有较大的溶解度,第 1 次结晶滤液中总甾醇含量降低,滤饼中含量降低的组份在第 1 次滤液中的含量明显提高.在第 2~5 次结晶时,由于用提纯之后的产品作为结晶的原料,

故滤液中总甾醇的含量提高, 滤饼中含量增加的组份在滤液中的含量也增加, 滤液的组成较原料混合植物甾醇有了明显的变化. 因此, 亦可以选择合适的溶剂对从滤液中得到的混合甾醇进行结晶, 以提高甾醇的总收率.

表 4 以正戊醇或环己酮为溶剂的结晶滤液中 β -谷甾醇(A)和豆甾醇(B)的含量
Table 4 The contents of β -sitosterol (A) and stigmasterol (B) in the filter liquors using cyclohexanone or *n*-pentanol as solvent (%)

		Samples of Table 1			Samples of Table 2					Samples of Table 3				
		1	2	3	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
A	IR	45.1	62.6	70.9	67.3	59.4	54.6	29.8	34.8	66.2	60.3	46.2	43.5	26.8
	UV	46.9	63.8	71.6	68.5	60.5	55.4	30.5	35.8	66.9	61.3	45.9	44.8	28.1
B	IR	34.8	29.2	23.2	10.1	33.6	39.4	65.3	60.8	10.6	31.8	47.3	51.1	68.3
	UV	33.6	27.9	22.1	9.6	32.8	38.9	64.7	60.1	10.2	31.2	47.5	52.4	66.8

4 结论

(1) 利用 β -谷甾醇和豆甾醇在环己酮中的溶解度随温度变化的差异, 用分级结晶法提纯 β -谷甾醇, 经过 3 次结晶操作, β -谷甾醇的含量大于 87%.

(2) 利用 25°C 下 β -谷甾醇和豆甾醇在正戊醇或环己酮中溶解度的差异, 经过 5 次重结晶, 结晶产品中豆甾醇的含量达到 92% 以上.

(3) 结晶法与化学法分离提纯豆甾醇和 β -谷甾醇相比, 具有操作步骤少、工艺过程简便、溶剂容易回收以及对环境的污染较小等优点, 该法可为植物甾醇单组分分离精制的工业化生产提供数据.

参考文献:

- [1] 谢文磊. 粮油化工产品化学与工艺学 [M]. 北京: 科学出版社, 1998. 180.
- [2] Swern D. Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Vol.1, 4th ed. [M]. New York: John Wiley & Sons, 1979. 53-69.
- [3] Holman R T, Lundberg W O, Malkin T. Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids, Vol.1 [M]. London: Pergamon Press Ltd, 1952. 18-69.
- [4] Abidi S L, List G R, Rennick K A. Effect of Genetic Modification on the Distribution of Minor Constituents in Canola Oil [J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1999, 76(4): 463-467.
- [5] Ling W H, Jones P J H. Minireview Dietary Phytosterols: A Review of Metabolism, Benefits and Side Effects [J]. Life Science, 1995, 57(3): 195-206.
- [6] Moghadasian M H, Frohlich J J. Effects of Dietary Phytosterols on Cholesterol Metabolism and Atherosclerosis: Clinical and Experimental Evidence [J]. Am. J. Med., 1999, 107(6): 588-594.
- [7] 许文林, 王雅琼, 鲁萍. 脱臭馏出物中植物甾醇的回收与精制 [J]. 过程工程学报, 2002, 2(2): 167-170.
- [8] 许文林, 王雅琼, 黄一波, 等. 重结晶法精制植物甾醇的溶剂选择 [J]. 扬州大学学报, 2002, 5(1): 58-61.
- [9] 彭莹, 刘福祯, 高欣. 天然植物甾醇的应用与提取工艺 [J]. 化工进展, 2002, 21(1): 49-53.
- [10] 佩塞兹 M, 巴托斯 J. 有机化合物及药物的比色法和荧光分析法 [M]. 夏锦尧译. 北京: 中国人民公安大学出版社, 1989. 452.
- [11] 吴瑾光. 近代傅立叶红外光谱技术及应用 [M]. 北京: 科学技术文献出版社, 1994. 677.
- [12] 常建华, 董绮功. 波谱原理及解析 [M]. 北京: 科学出版社, 2001. 55.
- [13] Botsaris G D, Toyokura K. Separation and Purification by Crystallization [M]. Washington, DC: ACS Books Department, 1997. 59.

Separation and Purification of Stigmasterol and β -Sitosterol from Phytosterol by the Crystallization Method

XU Wen-lin, HUANG Yi-bo, QIAN Jun-hong, SHA Ou

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225002, China)

Abstract: The separation and purification of β -sitosterol and stigmasterol from phytosterol by the crystallization method using *n*-pentanol and cyclohexanone as solvents were studied based on the difference of the solubilities of stigmasterol and β -sitosterol and the variation of solubility with temperature. The experimental results show that the content of β -sitosterol is more than 87% after the third fractional crystallization in cyclohexanone and the content of stigmasterol is more than 92% after the fifth crystallization in *n*-pentanol or cyclohexanone.

Key words: stigmasterol; β -sitosterol; separation; crystallization