

结晶法精制玉米须中植物甾醇

张海燕, 李黎

(河南大学 生命科学学院, 河南 开封 475004)

摘要:植物甾醇具有重要的食用和药用价值,研究了农业废弃物玉米须中植物甾醇的提取结晶工艺.玉米须经过皂化处理,通过超声波辅助提取,得到的粗品经氯仿萃取后,通过正交试验确定最佳结晶工艺条件:粗品和乙酸乙酯以 1 mL : 1 g 的料液比在 0 °C 处理 12 h,可得到植物甾醇的结晶,再滴加甲醇抽滤后得到植物甾醇重结晶,纯度为 92.36% ± 0.33% (w/w).

关键词:玉米须;植物甾醇;结晶

中图分类号:Q946.48

文献标志码:A

植物甾醇是一种类似环状醇结构的物质,在结构上类似于胆固醇,主要包括谷甾醇、豆甾醇、菜油甾醇和菜籽甾醇等^[1],以游离、酯类、甾基糖苷态和酰化甾基糖苷等形式广泛存在于植物的组织细胞中.国内外药理及临床研究证明:植物甾醇具有明显的降低人体对低密度胆固醇的吸收、降血脂、抗氧化、消炎、抗肿瘤、抗癌等作用^[2-5],在很多行业领域都有广泛应用^[6-7],市场需求量巨大.目前为止,植物甾醇一般都以植物油的脱臭馏出物作为提取原料,但脱臭馏出物来源很有限,不易获得,易氧化,因此,开发新的提取原料是解决其供需矛盾的有效途径.

玉米在我国的种植有着广泛的分布,产量居世界第 2 位,消费量居世界第一位,据测算平均每株玉米可收获 15 g 的干玉米须,那么我国玉米须的年产量在 750 万 t 以上,资源非常巨大.但大部分玉米须都被烧掉或扔掉,并没有得到充分的利用,而实际上玉米须含有多种化学成分,具有重要的生理生化功能^[8-10].本研究利用干玉米须作为原材料,探索了一条合理工艺提取玉米须中的植物甾醇,为植物甾醇提取资源的挖掘和废弃资源的合理开发利用奠定理论基础.

1 材料与方法

1.1 原料与仪器

玉米须来源品种为郑单 958 和先玉 335,在玉米成熟后采收;石油醚、乙醚、无水乙醇、浓硫酸、浓磷酸、六水氯化铁、乙酸乙酯和氢氧化钾均为分析纯.豆甾醇和谷甾醇购于 SIGMA 公司;所用蒸馏水和无离子水由实验室自制,所有化学试剂均为分析纯.

722N 可见分光光度计(上海佑科仪器仪表有限公司);JYD-150 智能型超声波细胞粉碎机(上海之信仪器有限公司);R-1002-VN 旋转蒸发仪(郑州长城仪器有限公司);5810R 离心机(Eppendorf 公司);GC-14B 气相色谱仪(日本岛津);C-R6A 数据处理仪.

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液的配制 配制 0.1 g · L⁻¹ 的 β-谷甾醇标准溶液,以磷硫铁试剂为显色剂,采用分光光度法在 530 nm 处测定吸光度,绘制 β-谷甾醇标准曲线^[11].

1.2.2 玉米须的处理 将玉米须除去杂质后,然后用粉碎机粉碎,60 目筛子过目,100 °C 烘干后封存备用.

收稿日期:2017-05-22;修回日期:2018-01-01.

基金项目:国家自然科学基金(31400108)

作者简介(通信作者):张海燕(1977-),女,黑龙江哈尔滨人,河南大学副教授,博士,主要从事环境生物学研究,E-mail: zhanghy150@sina.com.

1.2.3 玉米须的甾醇提取工艺

称取干燥后的玉米须 1.0 g, 按照 10 mL : 1 g 的液料比, 加入 $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钾乙醇皂化液置于 $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中皂化 2 h. 以乙醇为提取溶剂, 至于超声波细胞破碎仪中破碎后, 用无水乙醇提取. 提取样品经适当稀释后在 530 nm 测定吸光度, 依据如下公式计算样品中甾醇得率, 公式如下:

$$y = \frac{c \times v \times b}{m},$$

式中: y 为玉米须甾醇得率(mg/g); m 为玉米须质量(g); b 为稀释倍数; v 为乙醇定容液体积(mL); c 为提取液吸光度值对应的 β -谷甾醇标准溶液质量浓度($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$).

1.2.4 植物甾醇粗品的结晶

玉米须的无水乙醇甾醇提取液经 $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 减压蒸馏后, 回收乙醇, 圆底烧瓶中的干燥物加入热的去离子水溶解稀释, 倒入萃取瓶中加适量氯仿萃取 2~3 次, 再在 $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 减压蒸馏, 得到的粗甾醇制品中加入适量乙酸乙酯, 在低温下得到植物甾醇制品的初结晶; 初结晶制品再滴加甲醇后降温处理后进行重结晶, 低温低速离心分离后得到白色的植物甾醇结晶制品. 同时检测不同结晶温度(0, 4, 8, 12, 16 $^{\circ}\text{C}$), 时间(8, 12, 16, 20, 24 min)和料液比(2 mL : 1 g, 1 mL : 1 g, 2 mL : 3 g, 1 mL : 2 g, 2 mL : 5 g)对玉米须甾醇得率的影响.

1.2.5 植物甾醇粗品的结晶条件的正交试验

选取液料比、结晶时间和温度三因素为考察对象, 优化甾醇结晶精制条件(表 1).

表 1 植物甾醇结晶正交试验

	液料比/ $(\text{mL} \cdot \text{g}^{-1})$	t/min	$t/^{\circ}\text{C}$
1	1 : 2	8	8
2	1 : 1	12	4
3	2 : 3	16	0

1.2.6 气相色谱检测: 毛细管气相色谱柱: DB-1(30 m \times 0.53 mm \times 0.25 μm); FID 检测器温度 $310 \text{ }^{\circ}\text{C}$; 分流比: 20 : 1; 进样量 2 μL ; 进样口温度 $280 \text{ }^{\circ}\text{C}$; 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 色谱柱采用程序升温: $285 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保持 30 min, $10 \text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升温到 $300 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 保留 5 min.

2 结果与分析

2.1 β -谷甾醇的标准曲线

获得的回归方程为 $y = 3.262 2x + 0.006 4$, 该方程相关系数 $R^2 = 0.999$, 式中 x 为 β -谷甾醇溶液质量浓度($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), y 为吸光度值(OD), 方程线性相关系数良好, 可以用来进行植物甾醇含量的测定(图 1).

2.2 皂化对玉米须中植物甾醇提取率的影响

植物细胞中的甾醇既有游离型, 又有酯化型的, 植物甾醇酯可以通过皂化反应, 生成植物甾醇和脂肪酸盐, 从而使结合的植物甾醇分解, 提高溶液中植物甾醇的得率^[12]. 由图 2 可知, 玉米须提取液经过皂化处理后的植物甾醇得率有了较大的提高(皂化前为 $5.66 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 皂化后为 $7.76 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), 说明皂化法是提高植物甾醇回收率的一种有效方式.

2.3 玉米须中植物甾醇结晶单因素的影响

2.3.1 时间对玉米须中植物甾醇结晶的影响

考察结晶时间、结晶温度和液料比 3 个因素对玉米须植物甾醇的结晶工艺的影响. 不同的温度对结晶的形成有很大影响, 降低温度可以降低溶液的饱和度, 易于晶种的形成, 但晶体生长缓慢, 相应的, 升高温度会加快晶体的生长. 从表 2 中可以看出, 玉米须植物甾醇的回收率随提取时间的延长而逐渐增大, 提取时间在 20 h, 纯度最高, 但随着时间的进一步延长, 纯度有所降低, 可能是因为时间的延长导致更多的杂质析出, 影响了产品的纯度, 因此结晶温度在 $8 \sim 12 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 为宜.

2.3.2 温度对玉米须中植物甾醇结晶的影响

由表 2 中可以看出, 植物甾醇的纯度会随温度的不断升高而逐步增加, 在 $8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 提纯的效果最好, 但随着

温度的进一步升高,纯度降低.根据晶体生长速率理论,温度高会提高晶体表面化学反应速度,提高晶体生长速度,但同时也会加大植物甾醇在溶剂中的溶解度,不利于甾醇晶核的形成.温度偏低,甾醇晶种的形成和晶体的生长速度缓慢,容易导致杂质吸附,影响溶质长入晶体、改变晶体外形、因此要在适当的温度范围内进行结晶.

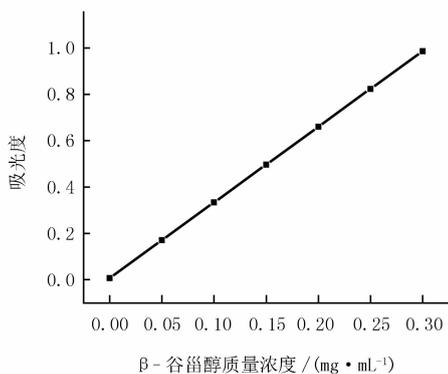


图 1 β-谷甾醇的标准曲线

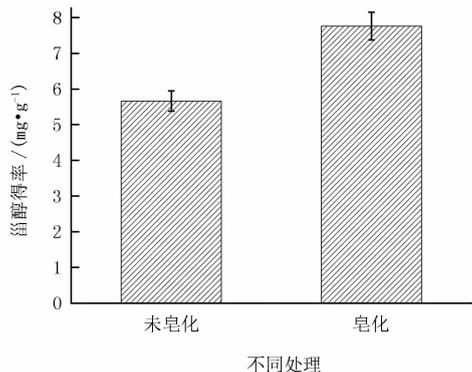


图 2 玉米须中植物甾醇皂化处理比较

2.3.3 液料比对玉米须中植物甾醇结晶的影响

当溶液与物料的比例为 1 : 1 时,玉米须中植物甾醇的纯度达到最大,而液料比例高于 1 : 1 时植物甾醇的纯度会有所下降.(表 2).

表 2 结晶时间、结晶温度和液料比对植物甾醇回收率的影响

结晶时间/h	提取率/%	结晶温度/℃	提取率/%	液料比/(mL · g ⁻¹)	提取率/%
8	77.42	0	77.39	2 : 1	79.06
12	79.51	4	79.25	1 : 1	81.30
16	83.23	8	82.32	2 : 3	77.54
20	83.78	12	80.91	2 : 1	75.39
24	82.05	16	78.01	5 : 2	71.83

2.4 玉米须中植物甾醇结晶条件的正交试验

利用正交试验分析了 3 种结晶条件在 3 个水平上对玉米须植物甾醇结晶效果的影响(表 3).根据表 3 的正交试验结果,三种因素影响程度大小依次为结晶温度、结晶时间、料液比.最佳组合为 1 mL : 1 g 的料液比,在 0 ℃ 养晶 12 h,得到的植物甾醇晶体纯度为 87.61%.初结晶的晶体再加入甲醇(料液比为 1 比 2)后稍微加热至溶液呈悬浊状,降低温度至 10 ℃,在此温度下处理 20 h 得到甾醇晶体,抽滤后得到白色甾醇重结晶制品,根据气相色谱测定,甾醇晶体纯度为 92.36% ± 0.33% (w/w).

2.5 气相色谱检测

利用气相色谱技术分析玉米须中植物甾醇,出峰顺序为:内标物、菜油甾醇、豆甾醇、β-谷甾醇(图 3),其中,β-谷甾醇和豆甾醇的纯度分别为 47.5% ± 0.24% 和 36.7% ± 0.13% (w/w).

3 结论与讨论

植物甾醇是从植物中提取出的具有高生理活性的一种天然物质,因其具有许多重要的生理功能,被誉为生命的钥匙,在各行各业中均有广泛的应用,市场中的需求量也越来越大.本文以农业生产中的废弃物玉米须为原材料,研究了它的结晶纯化工艺,结晶法是一种快速简便、投入成本低、易工厂化的产品纯化方法,在

甾醇提纯中应用也很普遍.如贾蔓箐利用无水乙醇对得到的棉油皂角中甾醇制品进行重结晶精制,甾醇的纯度达到 91.8%^[13].赵一凡使用正己烷和丙酮对大豆油脱臭馏出物进行甾醇的结晶的研究,得到产品纯度为 94.87%的甾醇^[14];本文采用乙酸乙酯和甲醇进行玉米须甾醇的精制,得到纯度大于 92%的植物甾醇制品.

表 3 正交试验分析

Run No.	t/h	液料比/(mL · g ⁻¹)	$t/°C$	提取率/%
1	1(8)	1(2 : 1)	1(8)	82.93
2	1	2(1 : 1)	2(4)	79.33
3	1	3(2 : 3)	3(0)	85.35
4	2(12)	1	2	81.53
5	2	2	3	87.61
6	2	3	1	87.14
7	3(16)	1	3	83.76
8	3	2	1	84.92
9	3	3	2	77.58
k	82.538 0	83.127 1	84.995 9	—
k	85.430 3	83.952 2	79.480 3	—
k	82.086 1	83.359 6	85.578 2	—
R	3.344 2	0.825 1	6.097 9	—

目前为止,植物甾醇的提取原材料大多为各种各样的植物油脱臭馏出物,但脱臭馏出物存在原料来源有限,甾醇含量少,易氧化等问题,而玉米须是农产品加工生产的废弃物,较常容易获得,以它为原料,结合结晶法提取植物甾醇,实验方法简单快捷,成本低、产品工艺可控性好.

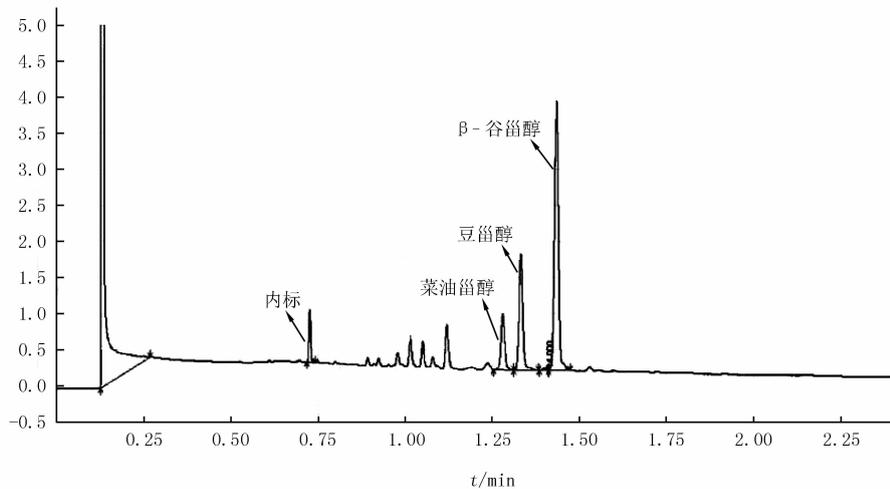


图 3 甾醇制品的气相色谱图

参 考 文 献

- [1] Fernandes P, Cabral J M S. phytosterols: Applications and recovery methods[J]. Bioresource technology, 2007, 98(12): 23-35.
- [2] Seal C J. Whole grains and CVD risk[J]. Proceedings of the Nutrition Society, 2006, 65: 24-34.
- [3] Andersson S W, Skinner J, Ellegard L, et al. Intake of dietary plant sterols is inversely related to serum cholesterol concentration in men and women in the EPIC Norfolk population: a cross-sectional study[J]. European Journal of Clinical Nutrition, 2004, 58: 1378-1385.

- [4] 张蕾.植物甾醇及制品降心脑血管疾病风险的功能性评价[D].天津:天津商业大学,2014.
- [5] Jean M L.Phytosterols and cardiovascular risk [J].*Metabolisme*,2007,1(1):17-27.
- [6] Ari R,Ulla R K, Anne M M,et al. Multigenerational exposure to phytosterols in the mouse [J].*Reproductive Toxicology*,2005,19(4):535-540.
- [7] Mohamed F R,Mohsen M S A, Mounier T.Antiradical and antimicrobial properties of cold-pressed black cumin and cumin oils[J]. *Eur Food Res Technol*,2012,234:833-844.
- [8] 叶盛英,高文.中药玉米须研究进展[J].*中成药*,2008,30(5):745-748.
- [9] 韩萍,李海燕,侯长希.玉米须的化学成分及其应用研究进展[J].*现代农业科技*,2009,(18):17-18.
- [10] Zhao W Z,Yin Y G,Yu Z P,et al.Comparison of anti-diabetic effects of polysaccharides from corn silk on normal and hyperglycemia rats [J].*International Journal of Biological Macromolecules*,2012,50:1133-1137.
- [11] 徐小军,余国珍,陈鉴东.硫磷铁法测定大豆甾醇提取物中总甾醇含量[J].*中国药业*,2010,19(8):35-36.
- [12] 曹智.从天然维生素 E 生产渣油中提取植物甾醇皂化工艺的研究[J].*中国油脂*,2010,35(4):54-56
- [13] 贾蔓箐,唐辉,李翠华,等.棉油皂脚中植物甾醇的提取工艺研究[J].*食品研究与开发*,2015,36(6):45-47.
- [14] 赵一凡,谷克仁,牛付欢.响应面优化枇杷籽甾醇的提取及精制工艺研究[J].*食品科学*,2008,29(7):192-196.

Purification of phytosterol from corn silk

Zhang Haiyan, Li Li

(College of Life Science, Henan University, Kaifeng 475004, China)

Abstract: The purification processes of phytosterols which have significant medicinal and edible value were studied from corn silk by saponification. The highest extraction phytosterols recovery was acquired by the ultrasonic assisted method. The maximum phytosterols crystal was achieved with ethyl acetate as solvent after being extracted by chloroform at 0 °C for 12 h with 1/1 ratio of material-liquid ($\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$). The purity of the crude phytosterols was $92.36\% \pm 0.33\%$ (w/w) after crystallation by methanol.

Keywords: corn silk; phytosterol; crystallation

[责任编辑 王凤产]