

生物柴油中甾醇糖苷的富集、纯化及含量测定

魏婷婷, 杨虹*, 王伟, 杨天奎

(丰益(上海)生物技术研发中心有限公司, 上海 200137)

摘要: 研究了生物柴油中甾醇糖苷(Sterol Glycosides, SG)富集、纯化及气相色谱定量测定的方法。通过皂化、液液萃取及固相萃取(SPE), 富集和纯化甾醇糖苷, 采用 β -胆甾烷醇作为内标, 对其进行气相分析并定量。讨论了生物柴油及其副产物乳化生物柴油和生物柴油残渣的不同前处理, 考察了皂化强度对甾醇糖苷含量测定的影响。结果表明: 生物柴油样品不需皂化, 生物柴油副产物乳化生物柴油和生物柴油残渣皂化条件为: 皂化溶液: 0.1 mol/L KOH-乙醇, 皂化温度为 60 °C, 皂化时间: 40 min。

关键词: 生物柴油; 甾醇糖苷; 气相色谱仪; 固相萃取; 皂化

中图分类号: TE 667 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2012)08-0879-06

Enrichment, Purification and Determination of Sterol Glycosides in Biodiesel

WEI Ting-ting, YANG Hong*, WANG Wei, YANG Tian-kui

(Wilmar (Shanghai) Biotechnology Research & Development Center Co., Ltd., Shanghai 200137, China)

Abstract: The method for enrichment, purification and determination of glycosides in biodiesel by GC was developed in this manuscript. Sterol glycosides was purified and enriched by saponification, liquid-liquid extraction, SPE(Solid Phase Extraction), and quantified using β -cholestanol as internal standard by GC. The different pre-treatments methods for biodiesel, emulsified biodiesel and biodiesel residue and effect of strength of saponification on determination of sterol glycosides were discussed. The results showed that: biodiesel was treated without saponification, and the optimum conditions for emulsified biodiesel and biodiesel residue listed as follows: that t 0.1 mol/L KOH-ethanol solution, 60°C saponifying temperature, 40min saponifying time. The results suggested that were helpful to improve the control of biodiesel quality and the utilization of by-products in biodiesel.

Key words: biodiesel, sterol glycosides, gas chromatography, solid phase extraction, saponification

生物柴油主要是植物油脂和短链醇类如甲醇发生酯交换反应而形成的脂肪酸短链一元醇酯^[1]。生产生物柴油主要以植物油或废弃油脂为原料, 其

加工及储存过程中, 易形成胶状沉淀物堵塞过滤装置以及残留在储存罐底部, 这些沉淀物中含有较高含量的甾醇糖苷^[2]。生物柴油中的甾醇糖苷会严

收稿日期: 2011-07-13

* 通信作者: 杨虹(1982-), 女, 河南湘潭人, 工程师, 主要从事油脂分析研究。E-mail: yanghksf@wlmav-intl.com.

重影响生物柴油的品质,当甾醇糖苷的量较多时,会使生物柴油结块,影响其正常使用。但是甾醇糖苷是一种具有生物活性的物质,降低胆固醇和提高免疫力的功效显著^[3-4],也是一种新颖的帮助肽类药物通过鼻粘膜和肠粘膜的吸收促进剂^[5],Liang-cai Peng^[6]等人发现甾醇糖苷作为底物,在植物中合成纤维素。甾醇糖苷的应用范围十分宽广,具有较大的利用价值。

生物柴油中的甾醇糖苷含量较低,通过检测其含量可以有效控制生物柴油中甾醇糖苷含量,有助于生产出性能优良的生物柴油;生物柴油储存桶沉淀物中甾醇糖苷含量很高,提取、纯化和利用甾醇糖苷,提高原料利用率,增加产品附加值,降低生物柴油综合生产成本。所以,生物柴油中甾醇糖苷分析及分析方法的建立,非常具有实际意义。生物柴油中的甾醇糖苷有使用 ASTM D 6584 测定生物柴油中甘油的方法进行分析检测^[7-8],面临分析生物柴油时因未经过富集,峰面积较小给定量带来困难以及无法检测乳化生物柴油和生物柴油残渣等生物柴油中的甾醇糖苷等问题。也有采用 HPLC 方法对油脂或生物柴油中的甾醇糖苷进行测定^[9-10],但是经过前处理之后,杂质仍然很多,不容易定出峰位置。不同样品类型,对甾醇糖苷提取、含量测定影响较大,作者对不同类型样品的前处理进行摸索,采用皂化,液液萃取,固相萃取等多种方式对其甾醇糖苷进行了分析。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂

石油醚,乙醚,叔丁基甲醚,氯仿,丙酮,无水甲醇,乙醇,氢氧化钾,无水硫酸钠,硅烷化试剂 BSTFA+TMCS(99:1),所用试剂均为分析纯; β -胆甾醇标准品(纯度 96%);原料来自马来西亚生物柴油工厂生物柴油样品以及乳化生物柴油和生物柴油残渣。

1.2 主要仪器设备

GC 6890N 型气相色谱仪, HP-5 色谱柱(填料为 95% dimethyl-5% diphenyl-polysiloxane) 30 m $\times$ 0.32 mm $\times$ 0.25 μ m。

1.3 实验方法

1.3.1 色谱条件 升温程序见表 1。

表 1 气相升温程序

Tab. 1 Temperature program for gas chromatography

升温速度/ ($^{\circ}$ C/min)	起始 温度/ $^{\circ}$ C	保持 时间/min
	275	0
2	320	70
后运行	320	2

进样口温度 300 $^{\circ}$ C, 检测器温度 360 $^{\circ}$ C, 分流模式, 分流比 5:1, 载气: He, 柱流量: 1 mL/min, H_2 : 40 mL/min, 空气: 400 mL/min。

1.3.2 预处理方法

1) 生物柴油样品预处理 准确称取生物柴油 3.5 g, 精确至 0.000 1 g 至烧杯中。用 3 mL 石油醚/乙醚(体积比为 87:13)溶解后, 完全转移至 SPE 柱中。分别使用 12 mL 石油醚/乙醚(体积比为 87:13)、12 mL 无水乙醚、12 mL 氯仿洗涤 SPE 硅胶柱, 丢弃流出液。使用 24 mL 丙酮进行洗脱, 再使用无水甲醇 20 mL 洗脱, 收集流出液至 100 mL 旋转蒸发瓶中, 加入内标(β -胆甾醇)溶液 50 μ L, 60 $^{\circ}$ C 下水浴旋转蒸发除去溶剂。残渣全部转移至 8 mL 反应瓶中, 氮吹挥去溶剂, 加入硅烷化试剂 BSTFA+TMCS(99:1) 100 μ L, 105 $^{\circ}$ C 下加热 15 min。进样 1 μ L。

2) 生物柴油副产物(乳化生物柴油和生物柴油残渣)样品预处理 准确称取样品(生物柴油残渣 0.6 g, 乳化生物柴油 0.3 g), 精确至 0.000 1 g, 加入 5 mL 0.1 mol/L 的氢氧化钾-乙醇溶液皂化(60 $^{\circ}$ C, 40 min)后, 加入 4 mol/L 的盐酸溶液至中性终止反应并冷却(乳化生物柴油中含有较多蜡质, 冷却时避免骤冷, 以防凝聚)。全部转移至 100 mL 分液漏斗中, 加入蒸馏水和氯仿溶液各 25 mL, 轻微摇匀, 静置, 收集氯仿层至 50 mL 离心管中, 加入无水硫酸钠至溶液为透亮状(无水硫酸钠不得结块)。离心, 转移上清液至 100 mL 旋转蒸发瓶中, 氯仿洗涤无水硫酸钠固体 3~4 次(10 mL/次), 合并洗涤液并转至旋转蒸发瓶中, 60 $^{\circ}$ C 水浴下旋转蒸发溶剂至 1~2 mL 后, 用 3 mL 氯仿转移至已活化的 SPE 柱中, 分别用 18 mL 氯仿, 12 mL 叔丁基甲醚洗涤, 流出液丢弃。用 24 mL 氯仿/甲醇(体积比 9:1)和 12 mL 无水甲醇洗脱, 收集流出液至旋转蒸发瓶中, 加入内标(β -胆甾醇)溶液 100 μ L, 60 $^{\circ}$ C 水浴

蒸发溶剂后,残渣转移至 8 mL 反应瓶中,氮吹挥干溶剂后,加入硅烷化试剂 BSTFA+TMCS(99:1) 100 μ L,105 $^{\circ}$ C 下加热 15 min。进样 1 μ L。

2 结果与分析

2.1 实验结果

甾醇糖苷是有多种组分的,甾醇和糖苷种类的不同,组合出多种甾醇糖苷类型,在 GC 图谱上出现的是一个甾醇糖苷带,图 1 是甾醇糖苷(SG)标准品谱图,40~70 min 之间出现一组甾醇糖苷。图 2

是生物柴油样品中的甾醇糖苷(SG),在 10 min 出现的峰是 β -胆甾烷醇内标物,在计算其含量时,将所有甾醇糖苷积分,使用 β -胆甾烷醇作为内标物,得到甾醇糖苷总量。

表 2 为 3 种不同的样品类型的平行测定情况。可以看出,生物柴油中含有 13 μ g/g 左右,生物柴油残渣中含有 500 μ g/g 左右,而乳化生物柴油中含有 4 000 μ g/g 左右,从相对标准偏差来看,生物柴油和乳化生物柴油的平行性比较好,生物柴油残渣受到样品均匀性影响,平行性较差。

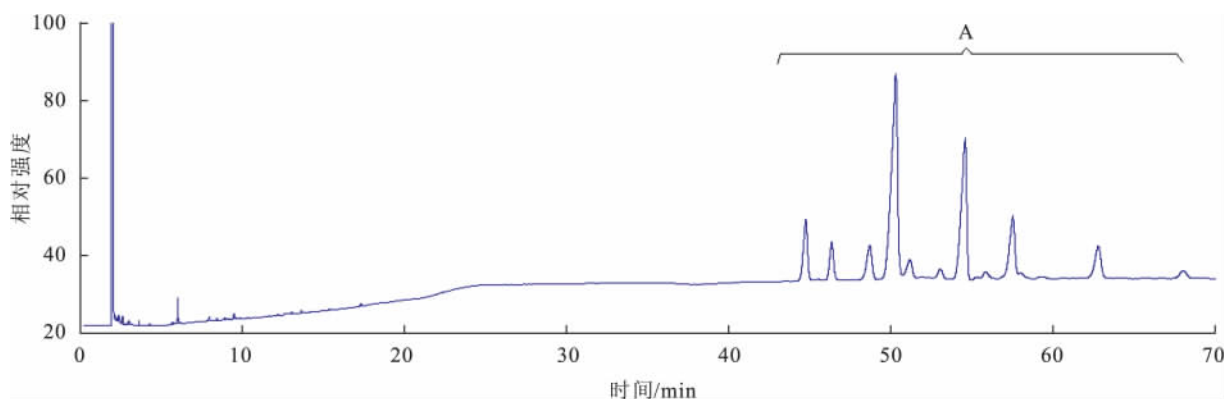


图 1 甾醇糖苷标准品 GC-FID 图谱

Fig. 1 GC-FID profile of sterol glycosides standard

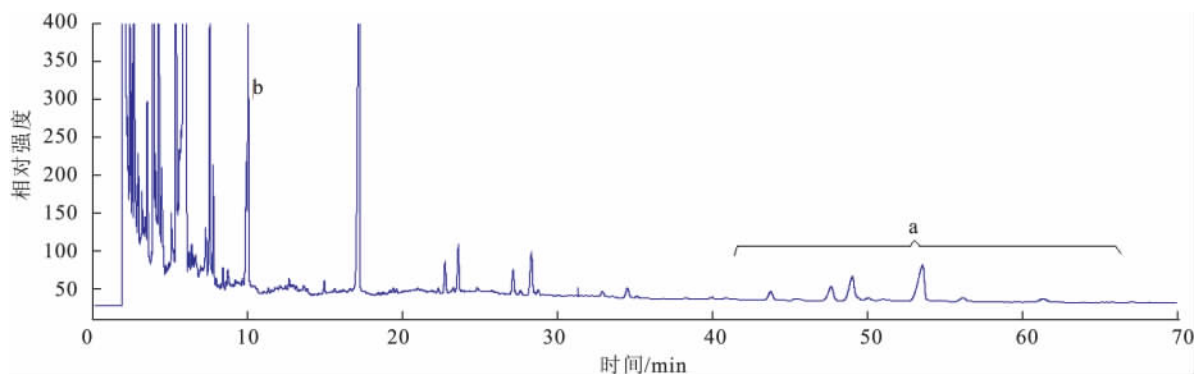


图 2 生物柴油样品甾醇糖苷 GC-FID 图谱

Fig. 2 GC-FID profile of sterol glycosides in biodiesel

2.2 实验讨论

2.2.1 皂化对实验结果的影响 生物柴油副产物乳化生物柴油样品和生物柴油残渣样品必须经过皂化,不经过皂化或皂化不足会导致样品结块,然而皂化强度会影响甾醇糖苷含量测定,为了防止甾醇糖苷分解,皂化条件应尽可能温和。

乳化生物柴油样品和生物柴油残渣样品分别在 0.01, 0.05, 0.10 mol/L 的 KOH-乙醇溶液在 60

$^{\circ}$ C 下皂化 40 min,结果表明:使用 0.10 mol/L 的 KOH-乙醇溶液,样品溶液清亮未结块,使用 0.01, 0.05 mol/L 的 KOH-乙醇溶液,样品结块严重。

乳化生物柴油样品和生物柴油残渣样品在 0.10 mol/L 的 KOH-乙醇溶液,60 $^{\circ}$ C 条件下,分别皂化 10, 20, 30, 40 min,结果表明:皂化 10, 20, 30 min 时,样品结块;皂化 40 min 时,样品溶液清亮未结块。

表 2 3 类样品中甾醇糖苷质量分数

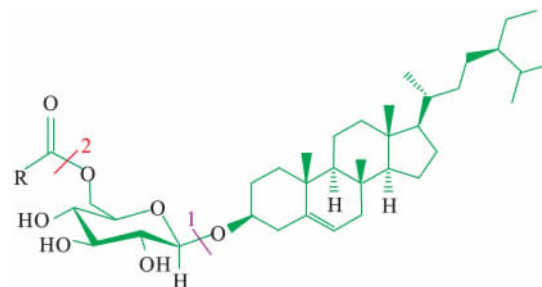
Tab. 2 The content of sterol glycosides in three kinds of samples

样品种类	序号	甾醇糖苷质量分数/($\mu\text{g/g}$)	RSD/%
生物柴油	1	13.6	0.52
	2	13.7	
生物柴油残渣	1	502	6.07
	2	547	
乳化生物柴油	1	4 077	1.24
	2	4 006	

因此,温和皂化条件确认为 KOH-乙醇溶液在 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下皂化 40 min。为验证温和皂化是否会对甾醇糖苷含量产生影响,对生物柴油样品进行未皂化和温和皂化对比试验。实验表明:温和皂化后的生物柴油甾醇糖苷含量为 $13.4\text{ }\mu\text{g/g}$, 未经过皂化处理的生物柴油甾醇糖苷含量为 $13.7\text{ }\mu\text{g/g}$, 结果比较接近,温和皂化时甾醇糖苷基本未损失,说明温和皂化对甾醇糖苷结构影响较小,可以应用于乳化生物柴油和生物柴油残渣中。

在文献报道中,在温和皂化的条件下,酰化甾醇糖苷很容易从 2 处断裂,从酰化甾醇糖苷转化为游离甾醇糖苷^[12]。如图 3 示意图中所示,温和皂化时,糖苷上的羟基与脂肪酸形成的酯键容易水解,

形成游离甾醇糖苷,强烈皂化时,甾醇和糖苷之间的醚键水解,形成甾醇。对乳化生物柴油分别采用 2 mol/L 的 KOH-乙醇溶液皂化 2 h 的强烈皂化和 0.1 mol/L KOH-乙醇溶液皂化 40 min 的温和皂化做比较。结果表明:强烈的皂化会使得甾醇和糖苷之间的键断裂,而直接形成甾醇。图 4 是乳化生物柴油样品强烈皂化所得到的谱图,在 11~14 min 时候出现了甾醇的 3 个峰,40~70 min 的甾醇糖苷带没有出峰,说明在强烈皂化的时候,甾醇糖苷分解,甾醇生成。图 5 是乳化生物柴油温和皂化所得到的谱图,11~14 min 时是没有甾醇峰出现的,40~70 min 的甾醇糖苷带出现了一组甾醇糖苷峰,得到推论,在经过强烈皂化之后,甾醇糖苷转化为甾醇。



1. 在强烈皂化条件下,酰化甾醇糖苷皂化形成游离甾醇; 2. 在温和皂化条件下,酰化甾醇糖苷皂化形成游离甾醇糖苷

图 3 甾醇糖苷不同条件下水解示意图

Fig. 3 Different hydrolysis conditions of sterol glycosides

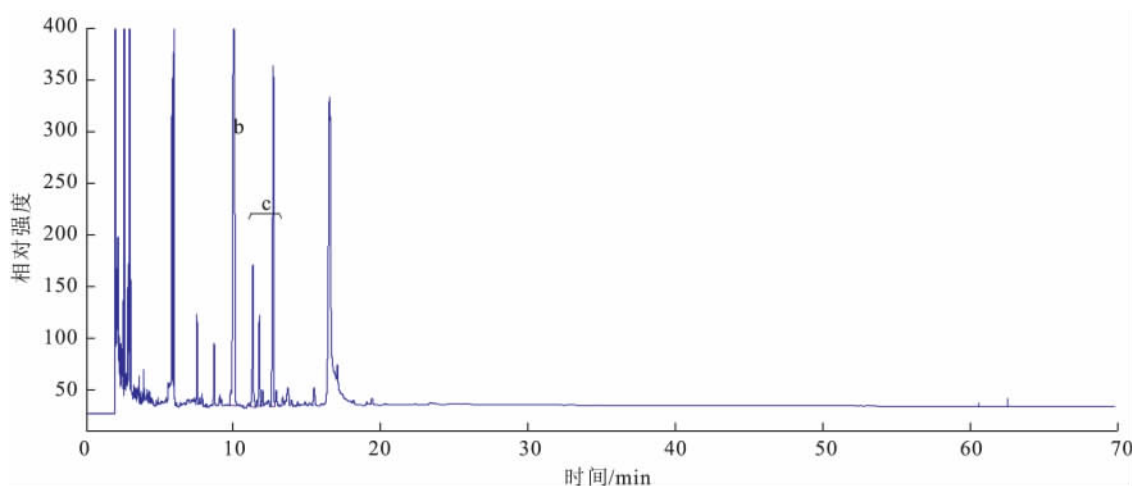


图 4 乳化生物柴油强烈皂化后 GC-FID 图谱

Fig. 4 GC-FID profile of emulsified biodiesel with strong saponification

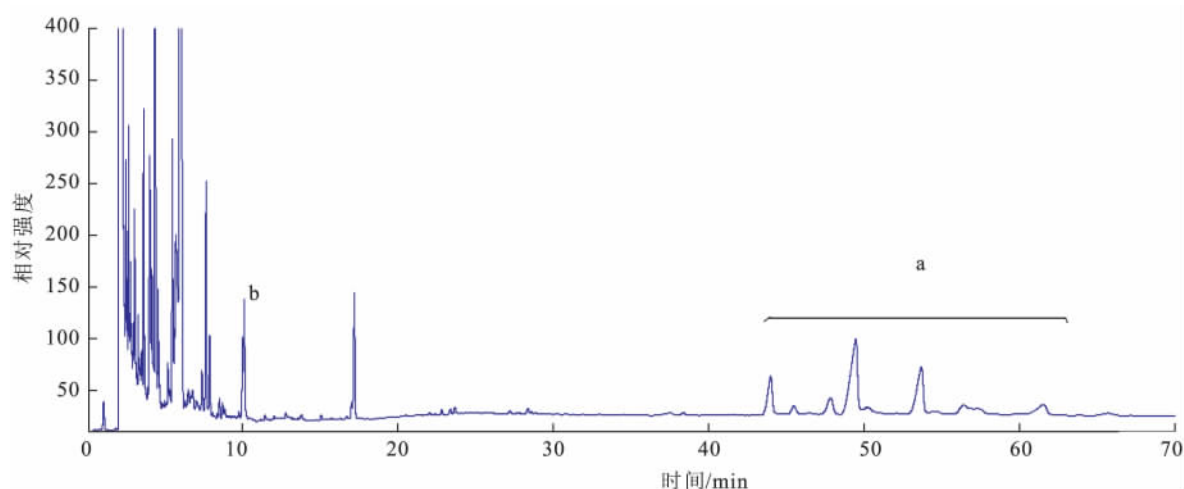


图5 乳化生物柴油温和皂化后 GC-FID 图谱

Fig. 5 GC-FID profile of emulsified biodiesel by mild saponification

从以上的实验可以得到以下的推论:在进行生物柴油及其副产物中甾醇糖苷的检测中,为了能够准确定量,前处理步骤中的皂化一步是相当关键的,掌握好皂化的条件,才能够不让样品结块或乳化,或者由于皂化过度使被检测物质分解。

2.2.2 3种不同样品结果分析 经过分析生物柴油及副产物等样品,乳化生物柴油中含有大量的甾醇糖苷,质量分数在 $4\,000\ \mu\text{g/g}$ 左右,生物柴油质量分数在 $13\ \mu\text{g/g}$ 左右,生物柴油残渣质量分数在 $500\ \mu\text{g/g}$ 左右。对于副产物提取甾醇糖苷再次回收利用来说,乳化生物柴油是更适合进行提取的,效率和收益都比生物柴油残渣要大。

3 结 语

由于生物柴油中含有甾醇糖苷,在天气较为寒冷的情况下,就会出现结块等诸多使用问题。通过实际的检测,可以检测生物柴油中的甾醇糖苷来监测生物柴油的品质。

对温和皂化和未皂化的生物柴油进行比较,实验结果表明:温和皂化对生物柴油中甾醇糖苷的测定影响不大,生物柴油可以直接提取出甾醇糖苷,不用进行皂化即可。而对于生物柴油副产物(生物柴油残渣和乳化生物柴油)来说必须要经过皂化之

后才能够进行甾醇糖苷提取,通过对强烈皂化和温和皂化进行对比,强烈皂化会使甾醇糖苷转化为甾醇,严重影响甾醇糖苷含量的检测。乳化生物柴油样品和生物柴油残渣样品分别在 $0.01, 0.05, 0.10\ \text{mol/L}$ 的 KOH-乙醇溶液在 $60\ ^\circ\text{C}$ 下皂化 $40\ \text{min}$,结果使用 $0.10\ \text{mol/L}$ 的 KOH-乙醇溶液,样品溶液清亮未结块,而使用小于 $0.1\ \text{mol/L}$ 的 KOH-乙醇溶液,样品结块严重。使用 $0.1\ \text{mol/L}$ 的 KOH-乙醇, $60\ ^\circ\text{C}$ 下皂化 $10, 20, 30\ \text{min}$,乳化生物柴油和生物柴油残渣样品结块,导致甾醇糖苷无法提取。在 $40\ \text{min}$ 的情况下,样品溶解,能够将甾醇糖苷提取出来,使用该皂化方法测定生物柴油中的甾醇糖苷,其含量基本和未皂化生物柴油中含量相同,所以选择皂化条件为 $0.1\ \text{mol/L}$ KOH-乙醇 $60\ ^\circ\text{C}$ 皂化 $40\ \text{min}$ 。

经过分析生物柴油及副产物等样品,发现乳化生物柴油中含有大量的甾醇糖苷,含量在 $4\,000\ \mu\text{g/g}$ 左右,生物柴油含量在 $13\ \mu\text{g/g}$ 左右,生物柴油残渣含量在 $500\ \mu\text{g/g}$ 左右。此方法可以通过检测生物柴油中甾醇糖苷来对生物柴油的品质进行监控,从而帮助选择副产物甾醇糖苷进行回收利用,提高产品附加值,对甾醇糖苷功能及应用方面进行更为深入的研究。

参考文献(References):

- [1] 曾淑华,周位,杨科,等. 固定化脂肪催化大豆油制备生物柴油[J]. 食品与生物技术学报,2007,26(3):75-79.
ZENG Shu-hua,ZHOU Wei,YANG Jiang-ke,et al. Immobilized lipase catalyzing production of biodiesel[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2007,26(3):75-79. (in Chinese)
- [2] 张春辉,张晶,忻耀年. 甾基糖苷对生物柴油品质的影响[J]. 中国油脂,2010,35(3):51-53.
ZHANG Chun-hui,ZHANG Jing,XIN Yao-nian. Impact of sterol glycosides on biodiesel quality[J]. *China Oils and Fats*, 2010,35(3):51-53. (in Chinese)
- [3] Grunwald C. Effects of Free Sterols, Steryl Ester, and Steryl Glycoside on Membrane Permeability[J]. *Plant Physiol*, 1971(48):653-655.
- [4] Vipin D P, Nair K. Sterols and sterolins in *Hypoxis hemerocallidea* (African potato)[J]. *South African Journal of Science*, 2008(104):322-324.
- [5] Maitani Yoshiey, Nakamura Koji. Application of sterol glucoside containing particles for drug delivery[J]. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2005(6):81-93.
- [6] Peng Liangcai, Yasushi Kawagee. Sitosterol- β -glucoside as primer for cellulose synthesis in plants[J]. *Science*, 2002,295(4):47-150.
- [7] Standard test method for determination of free and total glycerin in B 100 biodiesel methyl ester by gas chromatography(D 6584)[S]. ASTM,2005.
- [8] Timothy Ruppel, Gerald Hall. Free and total glycerin in B 100 biodiesel by gas chromatography[J]. *Lc Gc Europe*, 2007.
- [9] Wang Huali, Tang Haiying, Salley Steven, et al. Analysis of sterol glycosides biodiesel and biodiesel precipitates [J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2010,87(2):215-221.
- [10] Robert A, Scott K, Michael H. The identification and quantification of sterol glucosides in precipitates from commercial biodiesel[J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2008(85):761-770.
- [11] Bondioli Paolo, Cortesi Nicoletta, Mariani Carlo. Identification and quantification of sterol glucosides in biodiesel [J]. *Proteomics*, 2008(110):120-126.
- [12] Florence L, Franck D, Hugues G, et al. Quantification of free and esterified sterol glucosides in vegetable oils and biodiesel [J]. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2009(111):822-828.

会议信息

会议名称(中文): 2012 年国际生物工程前沿论坛

会议名称(英文): 2012 International Symposium on Advanced Biological Engineering (ISABE 2012)

所属学科: 生物技术与生物工程

开始日期: 2012-10-25

结束日期: 2012-10-29

所在国家: 中华人民共和国

所在城市: 广西壮族自治区 桂林市

主办单位: 清华大学、日本东京工业大学和广西科学院

联系人: 张翀

联系电话: 86-10-6277-2294-901

传真: 86-10-6277-0304

E-MAIL: isabe2012@gmail.com

会议网站: <http://www.isabe2012.com/>

会议背景介绍: 生物工程和生物工艺技术正在成为实现绿色、低碳、健康、环保社会的技术平台。为促进以上领域的国际交流与合作, 2012 年国际生物工程前沿论坛 (ISABE 2012) 将于 2012 年 10 月 25 日到 29 日在美丽的中国城市桂林召开。ISABE 2012 由清华大学、日本东京工业大学和广西科学院联合举办, 会议涵盖生物工程领域的学术研究和工业实践, 包括工业生物技术、纳米生物技术、生物医药技术、环境生物技术、生物燃料和生物能源技术及食品生物技术。