

香菇中麦角甾醇生成维生素 D₂ 的光化反应实验设计

白 晨¹, 张 翼^{2a}, 黄铮宇^{2b}, 李晓萍^{2a}, 江培翊^{2a}, 陆 红^{2a}

(1. 上海商学院 食品学院, 上海 200235; 2 复旦大学 a 生物科学教学实验中心, b 计算机学院, 上海 200433)

摘 要: 蘑菇中的麦角甾醇经紫外线照射后可产生维生素 D₂, 能被人体吸收利用, 是天然维生素 D 的重要来源之一。为了增进本科生对脂溶性维生素代谢的认识和理解, 设计了从香菇中提取麦角甾醇, 再经光化反应将麦角甾醇转化为维生素 D₂ 的生物化学教学实验。为简化实验步骤、方便教学, 试验筛选出了样品预处理、光反应及热反应的最佳条件, 确定了不经皂化处理, 提取物先后用 254、365 nm 的紫外光照射 1 h 后, 置于 85 ℃ 水浴下处理 15 min 实验流程。经高效液相色谱分析, 测得产物收率为 4.5%。

关键词: 麦角甾醇; 维生素 D₂; 光化反应

中图分类号: Q 56-33 文献标识码: A 文章编号: 1006-7167(2010)02-0016-04

A Teaching Experiment on Photolysis Transformation from Ergosterol to Vitamin D₂

BAI Chen¹, ZHANG Yi^{2a}, HUANG Zhang-yu^{2b}, LI Xiaoping^{2a}, JIANG Pei-hong^{2a}, LU Hong^{2a}

(1. Department of Food Science, Shanghai Business School, Shanghai 200235, China;

a Teaching Center of Biology, b School of Information Science and Engineering,

Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract: Vitamin D₂ made from ergosterol in mushrooms when it reacts with ultraviolet light, can be absorbed and utilized by the human body and is one of natural sources of vitamin D. In order to equip undergraduates with a solid understanding of metabolism of fat-soluble vitamins, a teaching experiment of biochemistry was designed where ergosterol was extracted from shiitake mushrooms, and then was transformed to vitamin D₂ by photolysis and thermal rearrangement. Optimized experimental procedure was established, which contains the non-saponified pretreatment of samples, extracts exposing to UV radiation at 254 nm and 365 nm for 1 h, and keeping at 85 ℃ in water bath for 15 min. The yield of vitamin D₂ analyzed by HPLC turned out to be 4.5%.

Key words: ergosterol; vitamin D₂; photolysis reaction

1 引言

维生素代谢与人的日常生活和身体健康密切相关, 其结构、稳定性、化学反应及体内代谢过程是生物化学教学中的重要组成部分。在现有的高等院校生物

化学教学中, 以维生素 C 为主的提取、定量方法相关的教学实验较多, 与脂溶性维生素的化学变化、体内代谢相关的教学实验未见报道^[1-2]。这可能是由于这类维生素稳定性差、提取困难、合成方法复杂, 利用实验教学再现其相关性质具有较大的难度。

维生素 D 为类固醇衍生物, 主要包括维生素 D₂、D₃, 与人及动物体内钙磷代谢有密切关系, 是人和家畜、家禽生长发育不可缺少的一种重要维生素。食物中缺乏维生素 D 可致小儿佝偻病、婴儿手足搐搦症、

收稿日期: 2009-05-27

作者简介: 白 晨 (1969-), 女, 上海人, 教授, 现主要从事食品营养学研究。Tel: 021-64681091; E-mail: baichen@fudan.edu.cn

成人骨软化症及老年骨质疏松症。与其他维生素比较,维生素 D 的理化性质较为特殊,首先,人体对其需要量极低,国际营养学专业机构推荐人体的维生素 D 的日需要量为 5 μg,仅为维生素 C 的 2 万分之一;其次,人体获得维生素 D 分食物摄取和通过紫外线照射转化 2 种途径。光照是人体获得维生素 D 的最佳途径,口服过量维生素 D 是发生临床过量中毒事件的主要原因^[3]。

无论动植物体内,天然维生素 D 的存在量都非常少,很难通过直接提取纯化方法获得。本文通过简单实验操作提取获得香菇中含量丰富的麦角甾醇(维生素 D₂ 原),进而通过紫外线照射、热处理反应光转化成为维生素 D₂,并通过 HPLC 检测了反应的得率。

2 实验部分

2.1 实验材料

香菇:购自上海市农贸市场。

2.2 仪器与试剂

(1) 仪器。ZF-2 型四用紫外分析仪(海门市其林医用仪器厂),Agilent 1100 LC 高效液相仪,ZORBAX 300SB-C₁₈ 高效液相柱,精密电子天平,电热恒温干燥箱,电热恒温水浴锅。

(2) 试剂。麦角甾醇标准品:色谱醇(上海晶纯试剂有限公司);维生素 D₂ 标准品:色谱醇(SIGMA);乙腈:色谱纯;无水乙醇:分析纯;石油醚:分析纯;焦性没食子酸:分析纯;KOH:分析纯;无水硫酸钠:分析纯;双蒸水。

2.3 实验步骤

(1) 标准曲线的制作。精确称取麦角甾醇标准品用乙醇溶解使浓度为 10 mg/mL。用乙醇将其稀释成一定浓度的标准系列溶液:0、0.5、1.0、2.0、4.0、6.0 mg/mL。将标准系列溶液进样 10 μL 进行测定,用峰面积比对浓度绘制标准曲线。

精确称取维生素 D₂ 标准品用乙醇溶解使浓度为 1 mg/mL。用乙醇将其稀释成一定浓度的标准系列溶液:0、25、50、100、200、400 μg/mL。测定方法同上。

HPLC 条件:流动相为 85%~93% 乙腈水溶液,梯度洗脱 30 min,流速 0.8 mL/min,柱温 25,检测波长为 265 nm^[4-5]。

(2) 麦角甾醇的提取。将新鲜香菇烘干,加液氮于研钵中磨成粉末。准确称取 2 份 6.0 g 的香菇粉末样品。

不经皂化处理:香菇样品加入 90 mL 无水乙醇进行抽提,95 水浴回流 30 min。冷却后将样品转移到分液漏斗中,用石油醚振荡萃取静置分层,收集石油醚层。水层再用石油醚萃取一次,合并石油醚层。无水硫酸钠干燥、过滤后 45 减压浓缩蒸干。用流动相溶

解定容至 1.0 mL,过 0.45 μm 微孔滤膜后,稀释 1 倍,HPLC 进样 10 μL 进行测定。

皂化处理:香菇样品加入 90 mL 含 16 g/L 焦性没食子酸的无水乙醇溶液,搅拌均匀后,加入 30 mL 2.0 mol/L KOH 溶液,95 水浴回流 30 min。萃取方法同上,石油醚层经反复水洗,直至用 pH 试纸检查水层不显碱性。其余步骤同上。

(3) 提取物的光化反应。不经皂化处理得到的提取物用 254 nm 的紫外光照射 1 h 后,用 365 nm 的紫外光再照射 1 h,HPLC 进样 10 μL 进行测定。

光反应后,将样品置于 85 水浴下处理 15 min,HPLC 进样 10 μL 进行测定。

(4) 计算维生素 D₂ 的收率。根据样品测定的色谱峰面积,在相应标准曲线查出对应的含量,按下式计算维生素 D₂ 收率,

$$\text{维生素 D}_2 \text{ 收率} = \frac{\text{维生素 D}_2 \text{ 的量}}{\text{投入麦角甾醇量} - \text{剩余麦角甾醇量}} \times 100\%$$

3 实验结果

3.1 麦角甾醇与维生素 D₂ 的标准曲线

麦角甾醇标准品和维生素 D₂ 标准品的洗脱峰如图 1 所示。麦角甾醇峰出现在 29 min 左右,维生素 D₂ 峰出现在 26 min 左右。

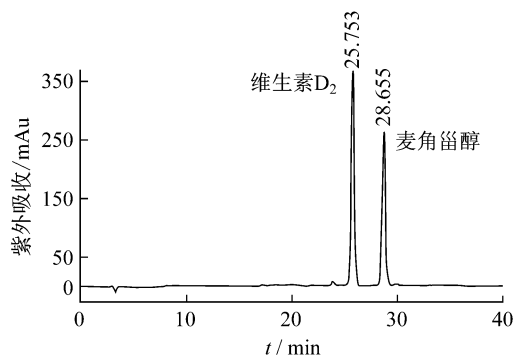


图 1 麦角甾醇标准品和维生素 D₂ 标准品的色谱图

以进样浓度 (X , mg/mL) 对相应的峰面积 (Y) 进行线性回归,麦角甾醇标准曲线的回归方程为:

$$Y = 12\,621.982\,1 X - 42\,225\,72, \quad r = 0.999\,82$$

以进样浓度 (X , μg/mL) 对相应的峰面积 (Y) 进行线性回归,维生素 D₂ 标准曲线的回归方程为:

$$Y = 30\,588\,861\,7 X + 167.056\,91, \quad r = 0.999\,33$$

3.2 麦角甾醇的提取

样品不经皂化,其提取物的洗脱峰如图 2(a) 所示。样品经皂化,其提取物的洗脱峰如图 2(b) 所示。不经皂化的处理方法,提取物乙醇溶液中麦角甾醇的浓度为 3.15 mg/mL;皂化处理方法,提取物乙醇溶液中麦角甾醇的浓度为 2.34 mg/mL。两者的结果相差不大。

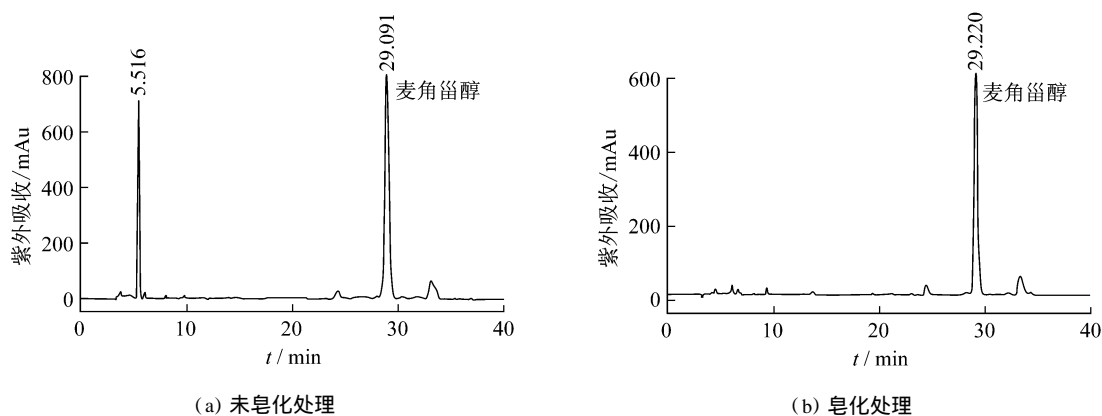


图 2 提取液的色谱图

3.3 光化反应结果

经两步光照反应,产物的洗脱峰如图 3(a)所示。由图可知,紫外光照射后,伴随副产物的生成,麦角甾醇的量明显减少,但是维生素 D₂ 生成未能检出。

经热反应,产物洗脱峰如图 3(b)所示。由图可知,热反应后,生成了维生素 D₂,浓度为 84.42 μg/mL,麦角甾醇的浓度为 1.27 mg/mL。

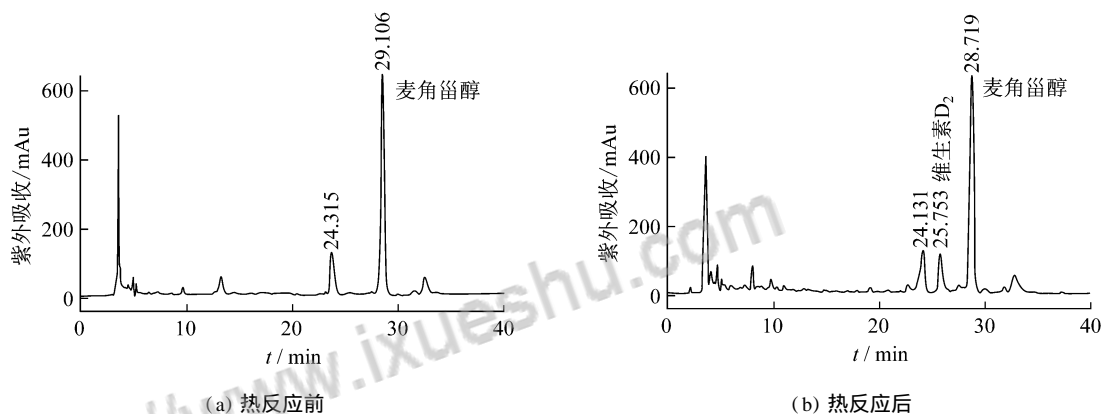


图 3 光反应前、后产物的色谱图

3.4 维生素 D₂ 收率

经计算,维生素 D₂ 收率为 4.5%。

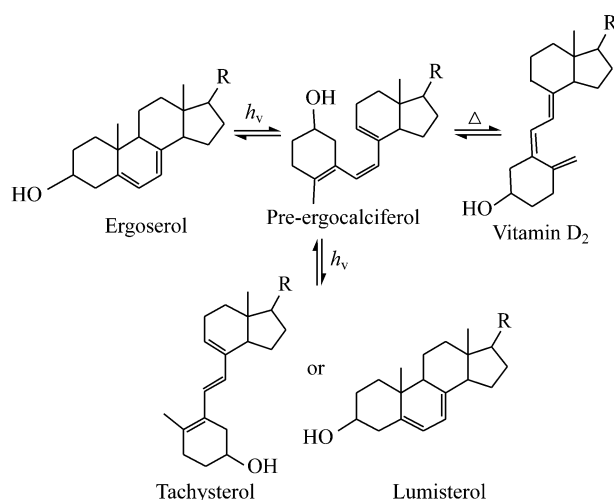
4 讨论

4.1 样品的预处理

食用真菌中含有大量麦角甾醇,是提取麦角甾醇的重要原料^[6,8]。文献报道,提取麦角甾醇时需先皂化样品,以除去一些脂溶性杂质^[8-10]。本文比较了皂化和不皂化 2 种提取方法,HPLC 测定结果表明,不皂化处理的样品提取液在 5.5 min 左右有一个明显的杂质峰,而皂化处理后这个杂质峰消失。然而,这个杂质峰并不影响麦角甾醇的分配行为和检测结果,且不皂化可以一定程度提高麦角甾醇的收率,因此为了简化提取过程,将实验方案确定为不经皂化直接提取麦角甾醇的方法。

4.2 光化反应条件

麦角甾醇经光化反应可转化为维生素 D₂,同时生成一些如速甾醇、光甾醇等副产物,转化过程见图 4。光化反应的关键步骤是紫外光照射,主要有两步光异构法和一步光异构法。前者多采用 250、350 nm 左右

图 4 光化反应生成维生素 D₂ 的反应方程式

的紫外光先后照射^[11],后者则需要 280 nm 左右的紫外光进行照射^[12]。由于实验室常用的紫外分析仪具有 245、365 nm 2 个波长,所以采用这 2 个波长经两步异构获得维生素 D₂ 的前体。该前体经热效应重排进一步生成维生素 D₂,该过程可以自然发生,但需要较长时间。本实验光照后的 HPLC 图谱中没有检测到维

生素 D₂。考虑到学生实验的时间要求,采用加热的方式加快反应速度,在加热后的反应液中很快检测到了维生素 D₂。

4.3 热反应条件及维生素 D₂的收率

光反应后,尝试通过适当延长热反应时间和提高反应温度的方法增加维生素 D₂的得率,发现效果不明显,同时引发反应副产物得增加。实验发现 85 , 15 min 为较稳定的热处理条件,这一反应条件下,维生素 D₂得率虽然较低(4.5%),但是反应结果可重复性高,HPLC分析得到完整的产物峰,可以完整地再现维生素 D₂原经光反应转化为维生素 D₂反应过程,达到实验的预期目的,非常符合学生实验的设计要求。

参考文献 (References):

- [1] 韦平和. 生物化学实验与指导 [M]. 北京:中国医药科技出版社,2003:133-135.
- [2] 萧能庚. 生物化学实验原理和方法 [M]. 北京:北京大学出版社,2005:215-218.
- [3] 瞿平,刘友学,黎海芪. HPLC检测 209列维生素 D过量结果

(上接第 7 页)



单分子分解反应加强,能够迅速引发大量的活性自由基参与链传播反应,这是引起正丁醇着火延迟缩短的主要原因。

5 结 语

本文在 Dagaut提出的正丁醇详细氧化反应机理基础上,利用 Chemkin气相反应程序中的零维、均质模型模拟计算了定容绝热条件下正丁醇理论着火延迟时间,研究不同边界条件对着火延迟的影响,并对不同的温度条件下进行着火延迟敏感度分析。计算结果表明,相同边界条件下正丁醇着火延迟时间要长于乙醇,在低温(小于 1 300 K)时着火延迟随温度、压力、当量比的增加而明显缩短,温度对着火延迟的影响较压力、当量比大。1 100 K时着火延迟最敏感反应表明,相同条件下正丁醇的链引发反应中缺少碳碳键断裂反应,链传播反应主要通过 C₃H₅氧化反应来扩大链式反应,链反应路径相对较长。1 300 K时正丁醇着火延迟缩短的主要原因是高温促使的碳碳键断裂反应的增加,加速了着火所需活性基的增长。链引发反应中 C—C键的断裂反应是影响燃料着火延迟特性的根本原因。

参考文献 (References):

- [1] 刘 娅,刘宏娟,张建安,等. 新型生物燃料——丁醇 [J]. 现代

分析 [J]. 临床检验杂志, 2003, 21: 19-19.

- [4] 刘红河,尹江伟,仲岳桐,等. HPLC-DAD同时测定食品中维生素 A、D、E研究 [J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15 (9): 1047-1049.
 - [5] 梁晓艳. 高效液相色谱法同时测定钙镁 D片中维生素 D₂和维生素 D₃的含量 [J]. 广西中医学院学报, 2007, 10 (2): 58-61.
 - [6] 邓玉清,王 纪,虞 龙. 微生物麦角甾醇的研究进展 [J]. 微生物学杂志, 2001, 21 (3): 45-47.
 - [7] 张 萱,陈海霞,高文远. 灵芝中麦角甾醇的提取工艺 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32 (4): 353-354.
 - [8] 夏晓明,王金凤,王开运,等. 反相高效液相色谱法分析禾谷丝菌菌丝中麦角甾醇和羊毛甾醇的含量 [J]. 分析化学, 2007, 35 (2): 255-258.
 - [9] 薛冬华,李亚丽,李秀萍,等. 酿酒酵母中提取麦角甾醇的研究 [J]. 食品科学, 2007, 28 (5): 93-96.
 - [10] 郑力行,周晓瑜,施 玮. 高效液相色谱法测定室内屋尘麦角甾醇的含量 [J]. 复旦学报(医学版), 2005, 32 (6): 691-694.
 - [11] 苗景濛,邓 利,谭天伟. 麦角甾醇连续光转化生产维生素 D₂新工艺 [J]. 北京化工大学学报, 2003, 30 (3): 40-41.
 - [12] 褚明辉,郭建强,高殿昆,等. 用新的紫外荧光光源对维生素 D₂的最佳光合成 [J]. 发光学报, 2000, 21 (1): 65-67.
- 化工, 2008, 28 (6): 28-33.
 - [2] Charles S McEnally, Lisa D Pfefferle. Fuel decomposition and hydrocarbon growth processes for oxygenated hydrocarbons: butyl alcohols [J]. Proceedings of the Combustion Institute, 2005, 30 (1): 1363-1370.
 - [3] Bin Yang, Patrick O wald, Yuyang Li. Identification of combustion intermediates in isomeric fuel-rich premixed butanol/oxygen flames at low pressure [J]. Combustion and Flame, 2007, 148 (4): 198-209.
 - [4] Philippe Dagaut, Casimir Togbé. Oxidation kinetics of butanol-gasoline surrogate mixtures in a jet-stirred reactor: Experimental and modeling study [J]. Fuel, 2008, 87 (15-16): 3313-3321.
 - [5] Sarathy SM, Thomson M J, Togbé C. An experimental and kinetic modeling study of n-butanol combustion [J]. Combustion and Flame, 2009, 156 (4): 852-864.
 - [6] 李会芬,李双定,黄锦成. 室温下正丁醇作为乙醇-柴油混合燃料助溶剂的实验研究 [J]. 装备制造技术, 2007, 11: 4-5.
 - [7] 刘学军,马婕,朴香兰,等. 叔丁醇共溶剂用于制备生物柴油的研究 [J]. 化学工程, 2008, 36 (1): 41-43.
 - [8] Nick M Marion. Detailed chemical kinetic model for high temperature ethanol oxidation [J]. International Journal of Chemical Kinetics, 1999, 31 (3): 183-220.
 - [9] Andrew E Lutz, Robert J Kee, James A Miller. SENKIN: A fortran program for predicting homogeneous gas phase chemical kinetics with sensitivity analysis [J]. Sandia National Laboratory Report, CA 94551-0969.
 - [10] 黄佐华,蒋德明,王锡斌. 内燃机燃烧研究及面临的挑战 [J]. 内燃机学报, 2008, 26 (增刊): 101-106.
 - [11] 解茂昭. 内燃机计算燃烧学 [M]. 大连:大连理工大学出版社, 2005: 289-291.