

高效液相色谱法测定酵母中麦角固醇含量

谢和金 卢毅 邱咏梅

(江西赣南制药厂 赣南 314000)

肖毅

(吉林省妇幼保健院 长春 130021)

郭建强 褚明辉 孙淑兰

(中科院长春光学精密机械与物理研究所 长春 130021)

摘要 本文建立了酵母中麦角固醇含量高效液相色谱测定方法。其色谱条件为,色谱柱 HY Persil BDS C18 5u 反相柱,流动相为甲醇:水(97:3),紫外检测波长为 283nm。酵母样加碱乙醇皂化、提取、洗涤、蒸干、定量测定。结果表明:标准曲线范围是 0.02—0.8mg/ml 线性良好,最低限量为 0.01mg/ml;日内及日间 RSD(n=4) 分别在 2.1~4.0% 和 2.4~4.8%,回收率为 96.0~98.0%。本方法操作简便、准确、可靠。

关键词 麦角固醇 酵母 高效液相色谱 含量测定

1 引言

麦角固醇是化学合成维生素 D₂ 的前体,大量地存在于酵母细胞中,是酵母中最重要的甾体化合物。目前,世界上工业生产所需的麦角固醇几乎全部是从酵母中提取获得。因此,研究建立简便、准确、可靠的酵母中麦角固醇含量测定方法,对研究高含量麦角固醇酵母的发酵生产工艺,及研究从酵母中提取麦角固醇的生产工艺具有十分重要的意义。

2 材料与方法

2.1 仪器:高效液相色谱仪 Waters 515HPLC Pump, Rheodyne 7725i 进样器,486 紫外检测器, HSP 色谱工作站,旋转蒸发器。

2.2 试剂:甲醇(色谱级),双蒸水(自制)乙醇和正庚烷为分析纯,麦角固醇对照品(日本住友公司生产)

2.3 色谱条件:色谱柱 HYPersil BDS C18 5u;流动相甲醇—水(97:3);流速 1.8ml/min;检测波长 283nm;灵敏度 0.02AUFS;衰减=5。采用外标法按峰面积进行定量。

2.4 样品处理:精密称取 100mg 干酵母粉(或 300mg 鲜酵母),加 16ml 碱乙醇(25%),85~90 皂化 2.5 小时,冷却至室温,加 20ml 正庚烷,提取、水洗至中性,将正庚烷全部真空蒸干,用乙醇定溶于

50ml 容量瓶中,待测。

3 结果和讨论

在上述提取条件和色谱条件下,麦角固醇的色谱峰与酵母提取物中杂质峰有很好的分离,见图 1。

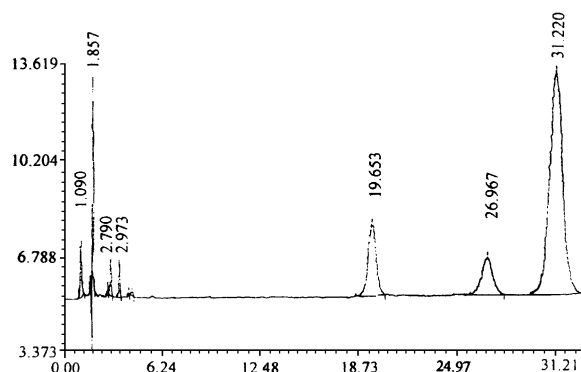


图 1 (注:麦角固醇保留时间为 31.220min)

3.1 标准曲线:精密称取 100mg 麦角固醇对照品,用无水乙醇溶解并稀至刻度,作标准贮备液。用标准贮备液分别配制 0.02mg/ml, 0.04mg/ml, 0.1mg/ml, 0.2mg/ml, 0.4mg/ml, 0.8mg/ml 六份标准液,在已建立的色谱条件下进样 10μl,每个样品进样 3 次,以峰面积的均值 A 为纵坐标,样品浓度 C 为横坐标,作标准曲线,回归处理,麦角固醇在 0.02~0.8mg/ml 范围内的线性回归方程为 $A = -15744$

+148753 * C (r = 0.9999 , n = 6) 最低检测浓度为 : 0.01mg/ ml。

3.2 精密度:在本试验条件下,将 0.04mg/ ml , 0.1mg/ ml ,0.4mg/ ml 的标准溶液分别于日内及日间进样,测定日内相对标准差。日间相对标准差,其 RSD 分别在 2.1 % ~ 4.0 % ,2.4 % ~ 4.8 %。结果见表 1

表 1 HPLC 测定麦角固醇的精密度(n = 5)

浓度 mg/ ml	日内		日间	
	实测值	RSD %	实测值	RSD %
0.04	0.0390 ±0.0016	4.0	0.3740 ±0.0018	4.8
0.10	0.0994 ±0.0020	2.1	0.0964 ±0.0023	2.4
0.40	0.3974 ±0.0100	2.4	0.3872 ±0.0125	3.2

3.3 回收率:精密吸取含麦角固醇 0.5mg , 1.0mg ,2.0mg 的样液,每个样液各 5 份,按“2.4”项操作,其峰面积以等量标准品的峰面积为标准,计算绝对回收率,结果见表 2。

表 2 麦角固醇的绝对回收率(n = 5)

加标量 mg	测得量 mg	回收率	RSD
0.5	0.48	96.0 %	3.4 %
1.0	0.96	98.0 %	2.7 %
2.0	1.95	97.3 %	3.1 %

3.4 讨论

3.4.1 文献(3)报道采用 210nm 紫外检测麦角固醇,我们在实验时发现 210nm 紫外检测时基线不平,麦角固醇在 210nm 处吸收系数小,测定误差大,因此我们改用在 283nm 紫外检测,实验结果很理想。

3.4.2 麦角固醇对光、热和氧较不稳定,标样溶液应避光、冷藏。样品处理过程也应该注意避光,尽快测定。标准溶液在避光 4 冰箱中保存数日是可行的,通过大量麦角固醇提取物的测定分析表明,本法测定麦角固醇含量的重现性在 5 % 以内。

参考文献

[1] Shaw , W. H. C. and Jefferies , J. P. Analyst , 1953 , 78 , 514 ~ 519.
[2] R. J. Rodriguez High-Performance Liquid Chromatography of sterols yeast sterols. Methods Enzymd 1985 ,page200 ~ 204.
[3] Delareau Jean. Rapid determination of ergosterol by HPLC Specta 2000 1984 12(91) :29 ~ 31.

Determination of ergosterol in yeast by HPLC

Xie Hejing Lu Yi Qiu Yongmei

(Jiangxi Gannan Pharmaceutical Factory ,Ganzhou 314000)

Xiao Yi

(Health Center for Women and Children of Jilin Province ,Changchun 130021)

Guo Jianqiang Chu Minghui Sun Shulan

(Changchun Institute of Optics ,Fine Mechanics and Physcics ,Chinese Academy of Sciences ,Changchun ,Changchun 130021 ,China)

Abstract A HPLC assay for the determination of ergosterol in yeast was established. A reversed phase C18 column and methanolwater (97 3) as mobile phase were used ,with UV detection at 283nm. The yeast was saponified and then extracted by heptanol. After evaportintg heptanol by vacum the residues were dissolved by ethanol and injected into the system. The results show the calibration curve was linear with the range of 0.02mg/ ml ~ 0.8mg/ ml. The limit of quantitation was 0.01mg/ ml. The average relative deviations (RSD) of within day and between day variation were 2.1 % ~ 4.0 % and 2.4 % ~ 4.8 % (n = 5) respectively. The recoveries of ergosterol were 96.0 % ~ 98.0 % . So ,this method in a simple ,sensitive and accurate method.

Key words ergosterol yeast HPLC determination