

# 硅胶柱色谱和反相高效液相色谱结合分离 制备亚油酸海藻糖单酯\*

孙月娥, 夏文水

(江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡, 214122)

**摘 要** 采用固定化脂肪酶作生物催化剂在叔丁醇体系中成功的合成了亚油酸海藻糖单酯。通过硅胶柱色谱和反相高效液相色谱(RPLC)相结合的方法,得到了高纯度的亚油酸海藻糖单酯样品。将洗脱液经过旋转蒸发浓缩、冷冻干燥后,得到白色晶体,用电喷雾电离质谱(ESI-MS)和核磁共振氢谱( $^1\text{H}$  NMR)以及碳谱( $^{13}\text{C}$  NMR)对目标产物进行了确认,鉴定为亚油酸海藻糖单酯。该法具有制备量大和分离效率高的特点。

**关键词** 亚油酸海藻糖单酯, 固定化脂肪酶, 高效液相色谱, 硅胶柱色谱, 核磁共振

糖酯是一种广泛用于食品、化妆品和药品中的非离子型表面活性剂,相对于其他类型的表面活性剂,糖酯具有无毒、无味、易生物降解等优点<sup>[1~3]</sup>。糖基表面活性剂原料来自天然可再生资源,环境相容性好,已被广泛应用于日用化工、生物制药和食品工业中<sup>[4,5]</sup>。亚油酸是含有2个双键的 $\omega$ -6长链不饱和脂肪酸,为人体必需脂肪酸,它具有调节 PAI-1 基因表达<sup>[6]</sup>,预防动脉硬化、高胆固醇血症和高血脂症<sup>[7]</sup>,延缓细胞凋亡<sup>[8]</sup>,降低肿瘤细胞增殖<sup>[9]</sup>等作用。但是亚油酸很容易氧化,且不溶于水。海藻糖是天然双糖中最稳定的功能性低聚糖<sup>[10,11]</sup>,具有在水溶液中不解离的多个亲水性羟基,可与亚油酸进行酯化,得到既有营养价值,又有新的表面性质的水溶性糖酯。尽管市场上已有工业化的饱和脂肪酸糖酯<sup>[12]</sup>,但是亚油酸糖酯的相关文献却鲜有报道。因此本文用固定化脂肪酶作为生物催化剂在非水体系中合成亚油酸海藻糖单酯,并采用硅胶柱层析色谱进行初步分离,除去大部分杂质,以减小对 HPLC 制备柱的损伤,随后采用半制备型反相高效液相色谱法对目标产物进一步纯化,以提高产品纯度,并利用质谱和核磁共振对目标产物的组成和结构进行鉴定,获得了非常重要的结构信息。该方法上样量大、产品纯度较高,可用于亚油酸海藻糖单酯的大量制备。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器和试剂

第一作者: 博士研究生。

收稿日期: 2008-08-20, 改回日期: 2008-11-23

Waters 1525 半制备型高效液相色谱仪, 2487 双通道紫外检测器(美国 Waters 公司); 岛津 LC20A 分析型高效液相色谱仪, PDA 检测器(日本岛津公司); Bruker 500 核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司); Waters ZMD 4000 质谱仪(美国 Waters 公司); Sea-star 旋转蒸发器(无锡市星海王生化设备有限公司); 水浴恒温振荡器(上海精宏实验设备有限公司)。

硅胶(200~300 目, 青岛海洋化工有限公司); 海藻糖(食品级, 日本林原公司); 亚油酸(含量>90%, 日本化成工业发展有限公司); 固定化脂肪酶 Novozym 435(诺维信中国生物技术有限公司); 分子筛(上海国药集团化学试剂有限公司); 甲醇(色谱纯, 江苏汉邦科技有限公司); 叔丁醇(分析纯, 上海国药集团化学试剂有限公司); 超纯水(实验室自制)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 亚油酸海藻糖酯的合成

分别称取 2.27 g 海藻糖、1.68 g 亚油酸、0.6 g 固定化脂肪酶 Novozym 435 和 4 g 分子筛置于 100 mL 具塞磨口三角瓶中, 加入 60 mL 预脱水的叔丁醇、将锥形瓶置于恒温水浴振荡器中, 50  $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 避光振荡反应 48 h。

#### 1.2.2 硅胶柱色谱预分离

反应混合液过滤除去分子筛和酶, 进行硅胶柱色谱分离。依次用正己烷/异丙醇/甲醇体积比 5:4:1, 4:4:2, 3:4:3 进行梯度洗脱, 分段收集。采用薄层色谱(TLC)对洗脱液进行检验, 展开剂为 V(乙酸乙酯): V(甲醇): V(水)=8.5:1:0.5, 碘蒸气显色 10 min, 斑点相同者为同一种物质。用分析型 HPLC 进一步检测, 合并杂质较少的收集管中的流出物, 减压浓缩后用半制备高效液相色谱进行纯化。

### 1.2.3 HPLC 分析

岛津 LC-20A 分析型 HPLC: YMC C<sub>18</sub> 反相色谱柱(250 mm×4.6 mm i.d., 5 μm), 流动相为 V(甲醇): V(水)=90:10, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 205 nm, 进样体积 5 μL, 柱温 30 ℃。

Waters 半制备型反相高效液相色谱(RPLC): 色谱柱为 Sunfire C<sub>18</sub> (150 mm×19 mm i.d., 10 μm), 流动相为 V(甲醇): V(水)=85:15, 流速 8.0 mL/min, 检测波长 205 nm, 进样体积 1 mL。柱温 30 ℃。

### 1.2.4 纯品制备

取减压浓缩后的粗品, 经 0.45 μm 尼龙膜微滤后进行高效液相制备色谱分离, 按 1.2.3 制备色谱条件洗脱, 收集 17.5~19 min 流出液, 旋转蒸发浓缩去除溶剂后, 最终产品用分析型 HPLC 进行纯度检测, MS 和 NMR 进行结构鉴定。

实验中改变流动相各组分的配比, 使得相邻 2 组分间的分离度增加, 优化色谱柱的分离效果。通过调节色谱泵寻求最佳的洗脱液流速, 保证较高的分离效率以及较快的操作周期, 改变上样量寻求最佳的处理能力。

### 1.2.5 结构鉴定

质谱条件(MS): 在 Waters Platform ZMD 4 000 上进行 MS 分析。使用电喷雾离子化源, 正离子模式 ES<sup>+</sup>; 毛细管电压 4.20 kV, 锥孔电压 36 V, 离子源温度 100 ℃, 脱溶剂气温度 250 ℃, 质量范围 200~1400 m/z, 光电倍增器电压 650 V, Analyser 真空度 1.75 Pa, 气体流速 4.3 L/h。负离子模式 ES<sup>-</sup>; 毛细管电压 4.23 kV, 锥孔电压 36 V, 离子源温度 100 ℃, 脱溶剂气温度 250 ℃, 质量范围 200~1400 m/z, 光电倍增器电压 650 V, Analyser 真空度 1.75 Pa, 气体流速 4.3 L/h。

核磁共振(NMR) 条件: 采用 BRUKER 500 MHz 核磁共振仪, 溶剂使用氘代甲醇。

## 2 结果与分析

### 2.1 亚油酸海藻糖酯的合成

亚油酸与海藻糖的酯合成反应在固定化脂肪酶生物催化剂作用下进行。海藻糖在有机溶剂中的溶解度很小, 随着反应进行, 产物中有水生成, 不溶于叔丁醇中的海藻糖逐渐溶解。由于脂肪酶既能催化酯合成反应又能催化酯水解反应, 因此在反应体系中添加分子筛不断除去副产物水, 有利于反应向合成方向进行。反应历程见图 1。

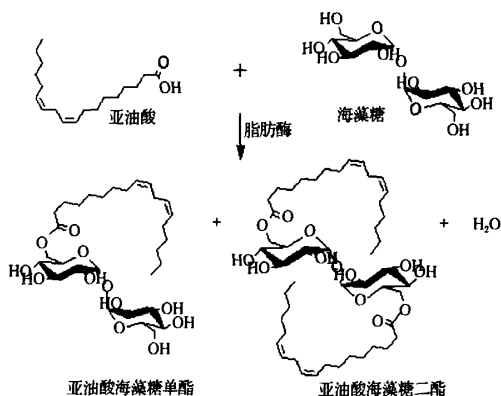


图 1 亚油酸海藻糖酯的合成路线

### 2.2 硅胶柱所得组分的 HPLC 分析

本研究采用非水相酶法制备亚油酸海藻糖单酯, 由于合成后的反应液成分较为复杂, 既含有目标产物单酯和副产物二酯, 又可能含有未反应的底物亚油酸, 且亚油酸本身的纯度又非 100%, 因此首先通过硅胶柱层析对合成后的反应液进行预处理, 以除去大部分杂质, 使目标产物的含量进一步提高, 可以减少对后续色谱柱的损伤, 然后再通过半制备型 HPLC 对粗分离液进一步纯化, 可以得到纯度较高的目标产物。采用 HPLC 对纯化过程进行监测, 图 2 的分析型 HPLC 色谱图显示, 流出组分中色谱峰较少, 且主峰分离较为理想, 适合于 RPLC 进一步分离纯化。

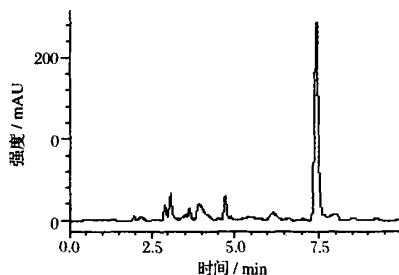


图 2 硅胶柱后样品收集液的分析液相色谱分离图

### 2.3 流动相组成对分离度的影响

在 RPLC 分离制备中, 流动相成分及流速, 样品液浓度和进样体积等都会影响分离效果。本研究首先依据半制备 HPLC 分析条件考察了不同流动相比比对分离效果的影响。选择甲醇和水的体积比分别为 70:30、80:20、85:15、90:10, 从峰的分离情况和洗脱时间等综合分析, 甲醇:水体积比为 85:15 时, 相邻 2 组分间的分离度较高, 效果最好。所得的色谱分离图见图 3。

### 2.4 流速对分离度的影响

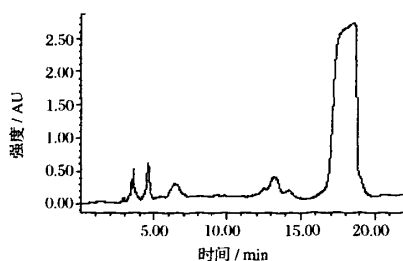


图3 待纯化样品的制备色谱分离图

以甲醇-水为流动相,考察了不同流速对亚油酸海藻糖单酯分离效果的影响。结果表明,随着流速的增大,亚油酸海藻糖单酯的保留时间逐渐减小,分离度降低,柱压升高。随着流速减小,保留时间延长,分离度增大。但流速太小时,保留时间过长,色谱峰变宽,增加制备成本。为缩短分离时间,且保证良好的分辨率,选择流速为 8 mL/min。与分析柱 1 mL/min 的流速相比,流动相在制备色谱柱中的线速度显然要低,这是由半制备柱的柱压限定的。

## 2.5 进样体积对色谱分辨率的影响

对于制备色谱,在色谱柱、流动相、流速等条件确定后,上样量是最重要的参数,它不仅影响容量因子( $k'$ )、相对保留值( $\alpha$ )和分辨率( $R_s$ ),而且直接决定生产量的大小和制备的目标产物的纯度。在实际应用中,为了保证一定的生产能力,制备色谱通常在超载条件下进行分离,这将使样品中各种组分在流动相和固定相中的浓度呈非线性分配,使分离度变差。为了确定合适的上样量,当样品浓度一定时,考察了不同进样体积对分离效果的影响。图4是不同上样量时制备亚油酸海藻糖单酯的色谱图。从图4中可以看出,随着进样体积增大,亚油酸海藻糖单酯的保留时间不断减少,与前面杂质色谱峰的距离不断靠近,色谱分辨率逐渐降低,色谱峰发生扩散,当上样体积大于 1 mL 后,色谱分辨率急剧下降,且出现峰形不对称,甚至不同组分散谱峰重叠,亚油酸海藻糖单酯的纯度降低。另外,上样体积越大,目标物的纯度越低。因此,为了既提高处理能力又制备高纯度的产品,选择进样体积为 1 mL。

## 2.6 结构鉴定

**HPLC 分析:**将用半制备液相得到的纯品减压浓缩除去溶剂后,按 1.2.3 中方法进行纯度检测,以面积归一化法测得产物纯度 > 97 % (图 5)。

**MS 鉴定:**用质谱对上述产物进行初步鉴定,质谱图(图 6)中显示出强烈的分子离子峰和相应的特

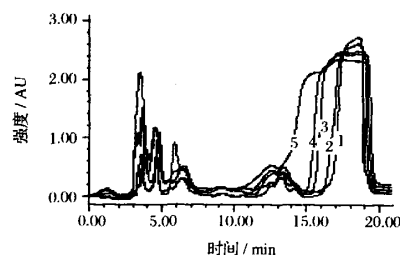
(1-300  $\mu$ L, 2-400  $\mu$ L, 3-800  $\mu$ L, 4-1000  $\mu$ L, 5-1500  $\mu$ L)

图4 不同进样体积下亚油酸海藻糖单酯的半制备色谱图

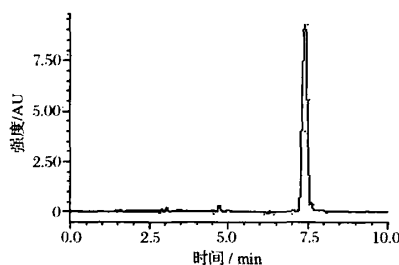


图5 亚油酸海藻糖单酯的高效液相色谱图

征碎片离子峰:  $m/z$  603.5  $[M-H]^-$ ,  $m/z$  649.5  $[M + HCOO]^-$ ,  $m/z$  323.1  $[M - C_{18}H_{31}O_2]^-$ ,  $m/z$  1208.0  $[2M-1]^-$ ,  $m/z$  627.6  $[M + Na]^+$ ,  $m/z$  643.6  $[M + K]^+$ ,  $m/z$  1232.1  $[2M + Na]^+$ 。

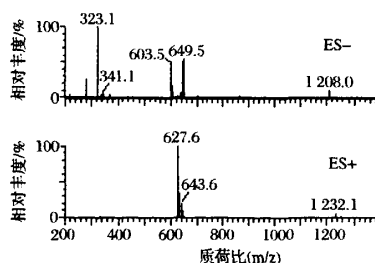


图6 亚油酸海藻糖单酯的 ESI-MS 图谱

**NMR 鉴定:**利用核磁共振(NMR)波谱仪对分离得到的纯品进行测试,不仅方法简单,而且可以获得非常重要的结构信息。在 MS 确定产物为亚油酸海藻糖单酯后,采用 NMR 进一步确定其分子结构。图 7 为亚油酸海藻糖单酯的结构图。 $^1H$ -NMR 中  $\delta = 5.31$  ppm 的 4 个峰是双键上的氢,  $\delta = 0.90$  ppm 附近的 3 个峰是端基- $CH_3$  上的氢,  $\delta = 2 \sim 3$  ppm 是酸链上的氢,  $\delta = 3 \sim 4$  ppm 是糖环上的氢; $^{13}C$ -NMR 中  $\delta = 175.75$  ppm 表示羰基碳,  $\delta = 129.36, 129.51$ 、

131.26、131.23 ppm 表示双键上 4 个碳,  $\delta=60\sim 100$  ppm 表示糖环上碳,  $\delta=14.694$  ppm 表示链上端基碳,  $\delta=10\sim 40$  ppm 表示酸链上的其它碳, 1.3.5 中得到纯品的核磁共振氢谱( $^1\text{H-NMR}$ )和核磁共振碳谱( $^{13}\text{C-NMR}$ )的具体分析见表 1 和表 2, 鉴定结果表明, 与亚油酸分子的羧基发生酯化反应的是海藻糖分子上的第 6 位羟基, 产物是 6-O-亚油酸海藻糖单酯。

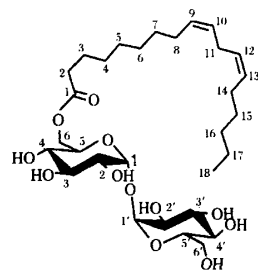


图 7 亚油酸海藻糖单酯的分子结构

表 1 亚油酸海藻糖单酯的 $^1\text{H}$ -NMR 和 $^{13}\text{C}$ -NMR 光谱数据

Tre-			Lin-		
$^1\text{H-NMR}(\delta_{\text{ppm}})$	1-H 5.09	1'-H 5.07	7-H 1.37	13-H 5.3	
	2-H 3.82	2'-H 3.79	8-H 2.06	14-H 2.04	
	3-H 3.67	3'-H 3.66	9-H 5.31	15-H 1.36	
	4-H 3.48	4'-H 3.46	10-H 5.34	16-H 1.33	
	5-H 4.2	5'-H 4.18	11-H 2.77	17-H 1.35	
	6-H 4.37, 4.2	6'-H 4.35, 4.01	12-H 5.38	18-H 0.9	
$^{13}\text{C-NMR}(\delta_{\text{ppm}})$	1-C 95.581	1'-C 95.451	1-C 175.746	7-C 31.008	13-C 131.196
	2-C 73.529	2'-C 73.529	2-C 35.32	8-C 28.455	14-C 28.455
	3-C 72.228	3'-C 72.228	3-C 26.331	9-C 131.257	15-C 30.749
	4-C 71.738	4'-C 71.738	4-C 30.492	10-C 129.514	16-C 32.944
	5-C 74.818	5'-C 74.976	5-C 30.576	11-C 26.841	17-C 23.893
	6-C 64.706	6'-C 62.986	6-C 30.749	12-C 129.364	18-C 14.694

### 3 结 论

在采用高效液相制备色谱纯化前, 先将提取的样品通过硅胶柱色谱预处理, 可以除去样品中大量的杂质, 使目标产物的含量进一步提高, 减少对色谱柱污染。在 RPLC 分离制备中, 流动相及流速, 样品液浓度和进样体积等都会影响分离效果。本研究中依据半制备型 HPLC 分析条件考察了不同流动相比对分离效果的影响并优选了最佳的流动相流速和进样体积。研究表明: 制备用流动相  $V(\text{甲醇}): V(\text{水})=85:15$ , 进样量为 1 mL, 流动相流速为 8.0 mL/min 时能达到良好分离。通过对 RPLC 的重复性进行考察, 发现重复进样多次对产物的纯度影响较小, 说明在此制备条件下 RPLC 的重复性良好。通过分析型高效液相可以检测产物的纯度, MS 和 NMR 鉴定的该纯品为 6-O-亚油酸海藻糖单酯。

### 参 考 文 献

- 1 Arcos J A, Bernabé M, Otero C. Quantitative enzymatic production of 1, 6-diacyl sorbitol esters[J]. Biotechnol Bioeng, 1998, 60(1): 53~60
- 2 Cameotra S S, Makkar R S. Recent application of biosurfactants as biological and immunological molecules[J]. Curr Opin Microbiol, 2004, 7: 262~266
- 3 Mulligan C N. Environmental applications for biosurfactants[J]. Environ Pollut, 2005, 133: 183~198
- 4 Klibanov A M. Enzymes that work in organic solvents[J]. Chem Tech, 1986, 6: 354~359
- 5 金 欣, 张淑芬, 杨锦宗, 等. 聚乙二醇葡萄糖苷脂肪酸酯合成及性质研究[J]. 大连理工大学学报, 2003(1): 37~41
- 6 胡晓晖, 叶 平, 刘永学. 脂肪酸影响血管内皮细胞纤溶酶原激活物抑制剂-1 表达的机制初探[J]. 中华心血管病杂志, 2002, 30(11): 684~686
- 7 赵景联. 华山松籽油的制取及性质研究[J]. 天然产物研究与开发, 1996, 8(2): 74~77
- 8 Beeharry N, Chambers J A, Green IC. Fatty acid protection from palmitic acid-induced apoptosis is lost following PI3-kinase inhibition[J]. Apoptosis, 2004, 9: 599~607
- 9 Ramesh G, Das U N. Effect of cis-unsaturated fatty acids on meth-A ascitic tumour cells *in vitro* and *in vivo*[J]. Cancer Lett, 1998, 123(2): 207~214
- 10 Tang M, Waring A J, Hong M. Trehalose-protected lipid membranes for determining membrane protein structure and insertion[J]. J Magn Reson, 2007, 184(2): 222~227
- 11 Chen L, Cao L, Zhou L, et al. Trehalose as a good candidate for enriching full-length cDNAs in cDNA library construction[J]. J Biotechnol, 2007, 127(3): 402~407
- 12 Vulfson E N. Enzymatic synthesis of food ingredients in low-water media[J]. Trends Food Sci Technol, 1993(4): 209~215

(下转第 190 页)

## PPO Activity Determination and Anti-browning Measure for Wild Rice Stem

Ma Wenjin<sup>1,2</sup>, Liu Shuxing<sup>1</sup>, LingJiangang<sup>2</sup>, Pan Juzhong<sup>2</sup>

1(Shanxi University of Science & Technology, Xi'an 710021, China)

2(Ningbo Academy of Agricultural Sciences Research, Ningbo 315040, China)

**ABSTRACT** Enzymatic browning normally occurs during procession of Wild rice stem and its quality was affected. In this study, the effect of temperature, PH on PPO(Polyphenol oxidase) activity were investigated. The results showed that PPO activity in wild rice stem was highest at 36°C and pH 5.6. When Wild Rice Stem soaked in mixed solution of L-Cys 0.1%, Citric acid 0.7%, Vc 0.07%, CaCl<sub>2</sub> 0.02% for 20min, no browning was found during the storage period.

**Key words** wild rice stem, polyphenol oxidase, anti-browning

(上接第 186 页)

## Separation of Linoleoyl Trehalose by HPLC Combined With Silica Gel Column Chromatography

Sun Yuee, Xia Wenshui

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**ABSTRACT** Linoleoyl trehalose was synthesized by enzymatic esterification in tert-butanol solvent system. Reverse High performance liquid chromatography (rHPLC) combined with silica gel column chromatography was developed for the separation of the linoleoyl trehalose. The eluted solution was evaporated and vacuum freeze-dried to obtain linoleoyl trehalose. Electrospray ionization mass spectrometry (MS), <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H NMR) and <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance (<sup>13</sup>C NMR) were applied for structure conformation. The results showed that the sample identical to linoleoyl trehalose. The method was of high in capacity and efficiency in separation.

**Key words** linoleoyl trehalose, immobilized lipase, high performance liquid chromatography (HPLC), silica gel column chromatography, nuclear magnetic resonance

市场动态

### 中国多项食品产量列世界第一 产值比 1978 年增加 68.3 倍

改革开放 30 年,中国已从一个食品供应短缺的国家发展成为世界食品工业生产大国。在武汉举行的第十七届中国食品博览暨交易会上,中国食品工业协会会长王文哲表示,2007 年中国食品工业实现产值 32 665.80 亿元,比 1978 年的 471.70 亿元增长 68.3 倍,取得了每 10 年双倍增长的可喜成就。

在过去的 30 年中,中国食品工业成就辉煌,从供应短缺到世界食品工业生产大国,从半封闭状态到全方位多层次宽领域的对外开放,中国食品工业整体面貌发生了历史性巨变。到 2007 年,中国大米、小麦粉、食用植物油、鲜冷藏冻肉、饼干、果汁及果汁饮料、啤酒、方便面等产品产量已位居世界第一或世界前列。

全国食品工业去年的销售收入同比增长 30.11%,2008 年前 3 季度,同比增长 32.51%,2008 年全年全国食品工业销售总收入总量有望达到 40 000 亿元。

改革开放 30 年,中国食品行业的生产力得到了极大的解放和发展,已形成门类齐全的生产体系和较为完整的产业链,竞争力和综合实力显著增强。2007 年全国食品行业实现利税 5 482 亿元,其中利润 2 355 亿元,分别比效益较好的 1983 年增长 34 倍和 45 倍。