

硅胶柱层析精制中长链结构甘油三酯

陆燕婷¹, 黄健花¹, 宋志华¹, 唐俊军²

(1. 江南大学食品学院, 江苏无锡 214122; 2. 江苏幸福门粮油有限公司, 江苏泰州 225400)

摘要:为探究硅胶柱层析在中长链结构甘油三酯(MLCT)精制方面的应用,以亚麻籽油和中链脂肪酸甘油三酯为原料合成 MLCT 粗产品,采用硅胶柱层析进行精制,优化精制工艺条件并对硅胶柱层析精制前后 MLCT 的质量指标进行了测定。通过硅胶薄层层析确定硅胶柱层析的洗脱剂,通过洗脱曲线确定洗脱液收集体积,以甘二酯脱除率和产品回收率为评价指标,确定洗脱流速和上样量。结果表明:以正己烷-无水乙醚(体积比 5:1)为洗脱剂,等梯度洗脱,洗脱流速 2.0 mL/min,上样量 4 g,硅胶 40 g,收集洗脱液 500 mL 条件下对 MLCT 粗产品进行精制,所得产品甘二酯脱除率达到 99.40%,MLCT 回收率为 95.07%。精制后产品酸值(KOH)和过氧化值显著降低,分别为 0.04 mg/g 和 0.00 g/100 g,色泽变浅,色值为 R0.0, Y0.1。硅胶柱层析具有同时脱除副产物,降低酸值、过氧化值、脱色等综合效果,在 MLCT 精制方面有良好的应用前景。

关键词: 中长链结构甘油三酯; 硅胶柱层析; 甘二酯; 精制

中图分类号: O658.1; TS201.4 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2021)12-0104-04

Purification of medium and long chain triacylglycerols by silica gel column chromatography

LU Yanting¹, HUANG Jianhua¹, SONG Zhihua¹, TANG Junjun²

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China;

2. Jiangsu Xingfumen Grain and Oil Co., Ltd., Taizhou 225400, Jiangsu, China)

Abstract: To explore the application of silica gel column chromatography (SGCC) in the purification of medium and long chain triacylglycerols (MLCT), crude MLCT was prepared with flaxseed oil and medium chain triacylglyceride as materials, and then was purified with SGCC. The purification process was optimized, and the quality indexes of MLCT before and after purification were determined. The eluent was determined by silica gel thin layer chromatography and elution curve was used to determine the collection volume of elute, and the flow rate and sample loading were determined by investigating the removal rate of diacylglycerides and product recovery rate as indexes. The results showed that the optimal purification conditions were obtained as follows: binary solvent system (*n*-hexane-anhydrous ether (volume ratio 5:1)), equal gradient elution, flow rate 2.0 mL/min, sample loading 4 g, silica dosage 40 g, collection volume of elute 500 mL. Under the optimal conditions, the removal rate of the diacylglycerols reached 99.40% and the recovery rate of MLCT was 95.07%. After purification, the acid value and peroxide value of the product decreased significantly, which were 0.04 mgKOH/g and 0.00 g/100 g, respectively. The color of the product became lighter, and the color value was R0.0, Y0.1.

Silica gel column chromatography could achieve the comprehensive effect of removing by-products, reducing acid value, peroxide value and bleaching, which had a good application prospect in the purification of MLCT.

Key words: medium and long chain triacylglycerols; silica gel column chromatography; diacylglycerides; purification

收稿日期: 2021-03-18; 修回日期: 2021-08-25

基金项目: 江苏省科技计划项目 (BE2018376); 高等学校学科创新引智计划 (111 计划) 项目 (B90719028)

作者简介: 陆燕婷 (1996), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品工程 (E-mail) c_gery@163.com。

通信作者: 黄健花, 副教授 (E-mail) huangjianhua1124@126.com。

中长链结构甘油三酯(MLCT)是一种人工合成的特殊甘油三酯,具有特别的营养特性和优异的理化性质,在食品、医药、化工等行业具有广泛的应用前景^[1]。MLCT制备过程会产生游离脂肪酸、甘二酯等副产物,产品酸值、过氧化值等升高,因而制备得到的MLCT粗产品需要进行精制以脱除副产物,降低酸值和过氧化值,改善色泽,优化产品质量。

硅胶柱层析是利用硅胶对不同极性物质吸附作用的差异进行物质分离。传统结构脂生产多采用高蒸发温度和高真空度的多级分子蒸馏进行精制,可能会对产品质量产生不利影响,且存在工艺复杂、产品损失率高、生产成本高等缺点。而硅胶柱层析操作温度低、精制后产品纯度高、回收率高,还具有降低产品过氧化值、酸值,提高产品质量等潜在效果,可用于结构脂粗产品精制。

本研究以亚麻籽油和中链甘油三酯为原料制备MLCT,采用硅胶柱层析脱除产品中甘二酯。首先通过薄层层析和洗脱曲线确定洗脱体系,然后以产品回收率和甘二酯脱除率为评价指标,探究洗脱流速和上样量等因素的影响,同时对精制前后产品的酸值、过氧化值、色泽等指标进行了测定,以期探究硅胶柱层析在MLCT精制方面的应用潜力。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

一级精炼冷榨亚麻籽油(未添加外源抗氧化剂),宁夏君星坊食品科技有限公司;精炼中链脂肪酸甘油三酯,浙江建德岛化工有限公司;正己烷、石油醚、无水乙醇、硫代硫酸钠、氢氧化钾、冰乙酸、无水乙醚、异丙醇、三氯甲烷、碘化钾、可溶性淀粉、酚酞等,均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司上海分公司;薄层层析硅胶板、柱层析硅胶;正己烷、乙腈、异丙醇等,均为色谱纯,北京百灵威科技有限公司;30% 甲醇钠甲醇溶液,化学纯,上海麦克林生化科技有限公司。

1.1.2 仪器与设备

沃特世 1525 高效液相色谱仪、示差检测器,美国沃特世公司;GA-3000 低噪声空气泵,北京中兴汇利科技有限公司;R5002D(K) 旋转蒸发器,上海申顺生物科技有限公司;DBS-100 自动部分收集器,上海沪西分析仪器青浦分公司;Q-Grad 制备级恒流泵,天津市兰博实验仪器设备有限公司;MS205DU/A 电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 中长链结构甘油三酯(MLCT)的制备

亚麻籽油和中链脂肪酸甘油三酯以质量比 6:4 混匀后,添加 0.3% 的甲醇钠催化,在 60℃ 下搅拌反应 30 min,加入热水,终止反应,洗涤至中性,于 5 000 r/min 离心后,干燥,得到 MLCT 粗产品。

1.2.2 MLCT 的硅胶薄层层析分离

用毛细管取少量样品(MLCT 粗产品)点样于硅胶板上,置于层析缸中,选择不同溶剂作为展开剂,采用碘蒸气显色,测定各组分斑点半径及其到中心点的距离,按下式计算分离度(R)。

$$R = \frac{d_{\text{DAG}} - d_{\text{TAG}}}{r_{\text{TAG}} + r_{\text{DAG}}} \quad (1)$$

式中: d_{TAG} 为甘三酯(TAG)组分斑点中心到原点的距离; d_{DAG} 为甘二酯(DAG)组分斑点中心到原点的距离; r_{TAG} 为甘三酯组分斑点半径; r_{DAG} 为甘二酯组分斑点半径。

1.2.3 MLCT 的硅胶柱层析精制

参考李鹤^[2]的方法进行硅胶柱层析,略作修改。具体方法:称取 40 g 0.48~0.75 mm(200~300 目)硅胶于 120℃ 烘箱活化 2 h,干燥器中冷却至室温;固定层析柱($\Phi 25$ mm \times 300 mm,柱体积 100 mL),下端与自动部分收集器相连;采用湿法装柱,湿法上样;上样后用洗脱剂洗脱,恒流泵控制洗脱流速,收集器收集洗脱液,每 20 mL 为一管;洗脱液旋转蒸发去除溶剂,干燥后得 MLCT 精制产品。

MLCT 回收率(y_1)及甘二酯(DAG)脱除率(y_2)按下式计算。

$$y_1 = \frac{m}{m_0} \times 100\% \quad (2)$$

$$y_2 = \frac{c_0 - c}{c_0} \times 100\% \quad (3)$$

式中: m_0 为吸附前 MLCT 的质量; m 为吸附后 MLCT 的质量; c_0 为吸附前样品中甘二酯含量; c 为吸附后样品中甘二酯含量。

1.2.4 甘油酯组成测定

参照文献[3],采用正相高效液相色谱法测定样品甘油酯组成。

1.2.5 质量指标的测定

酸值测定参照 GB 5009.229—2016,过氧化值测定参照 GB 5009.227—2016,色泽测定参照 GB/T 22460—2008。

2 结果与讨论

2.1 硅胶柱层析精制工艺的优化

2.1.1 洗脱剂的确定

硅胶柱层析的填料硅胶和洗脱剂之间存在极性

差异,根据极性相似相溶原理,待分离混合物中不同物质依据极性不同被硅胶吸附或者溶于洗脱剂被洗脱,从而实现物质分离。因此,筛选出合适的洗脱剂是实现混合物分离的基础^[2]。硅胶柱层析与硅胶薄层层析具有相似的分层原理,都是通过极性差异将物质进行分离。硅胶薄层层析处理量小,不适宜于大量物质的分离纯化,但其分离效率高,实现物质分离所需时间短,可以直观显示各物质的分离情况,常用于筛选硅胶柱层析操作的洗脱剂。本研究通过硅胶薄层层析对不同的洗脱剂进行筛选,并测定其分离度,结果如表1所示。

表1 不同洗脱剂分离甘二酯和甘三酯效果比较

洗脱剂	洗脱剂配比(体积比)	R
石油醚-无水乙醚	1:1	1.88
	5:1	1.75
	15:1	1.06
石油醚-异丙醇	1:1	-
	5:1	-
	15:1	2.04
正己烷-无水乙醚	1:1	1.66
	5:1	2.78
	15:1	1.12
正己烷-异丙醇	1:1	-
	5:1	-
	15:1	2.91

注:“-”表示未分离。

由表1可知,正己烷-无水乙醚(体积比5:1)及正己烷-异丙醇(体积比15:1)均能取得较好的分离效果。但是正己烷-异丙醇(体积比15:1)在后期进行柱层析分离时效果不佳,这可能是由于柱层析硅胶颗粒较薄层层析大,分离效率低于薄层层析,且异丙醇黏度较高,常压条件下难以取得较好的分离效果。因此,选择正己烷-无水乙醚(体积比5:1)作为硅胶柱层析洗脱剂。

2.1.2 洗脱液体积的确定

洗脱曲线可以直观呈现洗脱剂的洗脱效果,确定样品收集体积^[2]。以正己烷-无水乙醚(体积比5:1)为洗脱剂,在室温、硅胶质量40 g、洗脱流速2 mL/min、上样量2 g和等梯度洗脱条件下对MLCT粗产品进行硅胶柱层析精制,收集洗脱液并按1.2.4方法测定洗脱液中TAG和DAG的峰面积,对应洗脱液体积作图、绘制洗脱曲线,结果见图1。从图1可以看出,正己烷-无水乙醚(体积比5:1)能够实现TAG和DAG的完全分离,两峰之间无重叠,分离度好。因此,实验确定以正己烷-无水乙醚(体积比5:1)为洗脱剂,等梯度洗脱,收集前500

mL洗脱液。

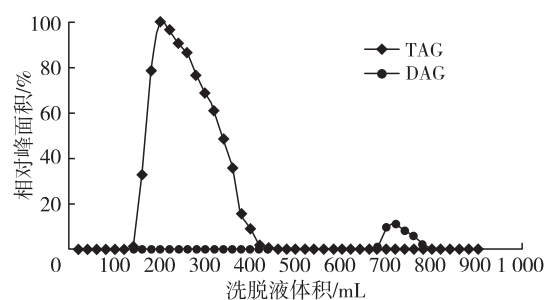


图1 正己烷-无水乙醚(体积比5:1)体系下的洗脱曲线

2.1.3 洗脱流速的确定

在室温、硅胶质量40 g、上样量2 g、正己烷-无水乙醚(体积比5:1)为洗脱剂、等梯度洗脱条件下,考察洗脱流速对MLCT精制效果的影响,结果如图2所示。

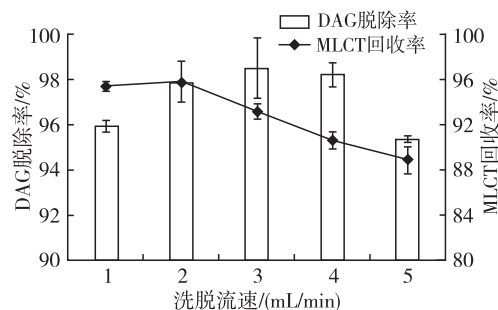


图2 洗脱流速对甘二酯脱除率和MLCT回收率的影响

由图2可知,当洗脱流速较小时,甘二酯脱除率较低,这是因为组分向轴向扩散效应加剧,组分分离效果差所致^[4]。洗脱流速为2 mL/min时,甘二酯脱除率及MLCT回收率均较高。洗脱流速过高时,甘二酯脱除率及MLCT回收率都有所下降,这是因为洗脱剂与硅胶接触不充分,固液两相未达到较好的分配平衡,部分甘三酯被硅胶吸附所致^[5]。综合考虑,洗脱流速应控制为2.0 mL/min。

2.1.4 上样量的确定

在室温、硅胶质量40 g、洗脱流速2.0 mL/min、正己烷-无水乙醚(体积比5:1)为洗脱剂、等梯度洗脱条件下,考察上样量对MLCT精制效果的影响,结果如图3所示。

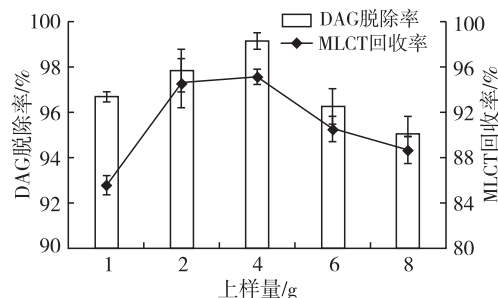


图3 上样量对甘二酯脱除率和MLCT回收率的影响

由图3可知,甘二酯脱除率和MLCT回收率随着上样量的增加均呈现先增加后减少的趋势,在上样量为4 g时,甘二酯脱除率和MLCT回收率分别为99.40%和95.07%。上样量超过4 g时,硅胶吸附达到饱和,精制效果下降。而上样量较少时,由于硅胶会吸附一部分样品,产品回收率较低。综合考虑,优选上样量为4 g。

2.2 硅胶柱层析精制效果

2.2.1 甘油酯组成

甘油酯组成是MLCT的重要质量指标之一。在优化的硅胶柱层析条件下,对MLCT粗产品进行精制,测定精制前后MLCT的甘油酯组成,结果如表2所示。

表2 精制前后MLCT的甘油酯组成 %

甘油酯	精制前	精制后
甘二酯	11.71 ± 0.06 ^a	0.07 ± 0.04 ^b
甘三酯	88.29 ± 0.06 ^b	99.93 ± 0.04 ^a

注:同行不同字母表示具有显著性差异($p < 0.05$)。下同

由表2可知,通过硅胶柱层析,产品中甘二酯含量显著降低($p < 0.05$),从11.71%降低至0.07%,相应的甘三酯含量显著上升($p < 0.05$),这一结果要优于分子蒸馏工艺所能达到的效果^[6]。经硅胶柱层析后,产品中甘二酯含量达到药用MLCT标准(JX 20070100)要求(4.0%以下)。

2.2.2 酸值、过氧化值和色泽

在MLCT合成过程中,常伴随产生游离脂肪酸,造成产品酸值升高。同时,MLCT的合成需要添加催化剂,催化剂在50℃以上条件下才能发挥较好的催化效果,而油脂受热容易发生氧化,生成氢过氧化物,导致产品过氧化值升高。色泽在一定程度上可以直观地显示产品质量的变化,一般而言,色泽加深尤其是R值的升高与油脂氧化产生的小分子氧化产物有关,一些小分子氧化产物是呈色物质,氧化产物越多,颜色越深^[7]。另外,结构脂合成常采用的催化剂甲醇钠对油脂色泽有一定影响,水洗后残留的少量催化剂依旧能使油样明显呈色,R值升高^[8]。因此,本研究对硅胶柱层析精制前后MLCT的酸值、过氧化值和色泽进行了测定,结果如表3所示。

表3 精制前后MLCT的酸值、过氧化值和色泽

项目	精制前	精制后
酸值(KOH)/(mg/g)	0.87 ± 0.01 ^a	0.04 ± 0.01 ^b
过氧化值/(g/100 g)	0.06 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^b
色泽	R1.2, Y4.2	R0.0, Y0.1

由表3可知,硅胶柱层析精制后MLCT的酸值(KOH)和过氧化值都显著降低($p < 0.05$),分别从0.87 mg/g和0.06 g/100 g降低至0.04 mg/g和0.00 g/100 g,不仅满足食用油脂制品国家标准(GB 15196—2015)要求,还达到了药用MLCT标准(JX 20070100)要求。硅胶柱层析精制后,样品色泽发生了显著变化,R值从1.2降低至0.0,Y值从4.2降低至0.1,最终产品近似无色透明。结果表明,硅胶柱层析除了可以降低产品甘二酯含量、酸值、过氧化值外,还能起到脱色的效果,后期无需脱色处理。

3 结论

对硅胶柱层析精制MLCT的工艺进行了优化。结果表明,在正己烷-无水乙醚(体积比5:1)为洗脱剂、等梯度洗脱、洗脱流速2.0 mL/min、上样量4 g(硅胶40 g)条件下对MLCT进行精制,所得产品甘二酯脱除率达到99.40%,MLCT回收率为95.07%。精制后产品酸值和过氧化值显著降低,色泽变浅。硅胶柱层析在MLCT精制方面有着良好的应用效果,可以同时实现脱除甘二酯、降酸值、降过氧化值、脱色等效果,不仅适用于食品级产品的精制,还可应用于医药级中长链脂肪乳剂原料的生产。如何将硅胶柱层析应用于结构脂的实际生产,提高结构脂生产效率,生产高质量、高产量的MLCT产品,还有待进一步的深入研究。

参考文献:

- [1] 宋志华,黄健花,彭亮,等. 酶法酯交换催化合成中/长链结构甘三酯原料药工艺研究[J]. 粮食与油脂, 2015, 28(10): 31-34.
- [2] 李鹤. 辛酸甘油二酯酶法合成及其纯化工艺的研究[D]. 武汉:华中科技大学, 2011.
- [3] ZENG C X, QI S J, XIN R P, et al. Enzymatic selective synthesis of 1,3-DAG based on deep eutectic solvent acting as substrate and solvent[J]. Bioprocess Biosyst Eng, 2015, 38(11): 2053-2061.
- [4] 宋志华,鲁珊,黄健花,等. 硅胶柱色谱制备高纯1,3-二油酸甘油二酯的研究[J]. 中国油脂, 2015, 40(12): 70-73.
- [5] 胡士恒. 玉米油酶法合成甘油二酯研究[D]. 长春:吉林大学, 2013.
- [6] 合肥工业大学. 一种中长链脂肪酸甘油三酯的分离纯化方法: CN102586014B[P]. 2013-06-19.
- [7] 彭亮. 中长链结构甘三酯的制备及稳定性研究[D]. 江苏无锡:江南大学, 2010.
- [8] LIU L S. How is chemical interesterification initiated: nucleophilic substitution or α -proton abstraction? [J]. J Am Oil Chem Soc, 2004, 81(4): 331-337.