

油脂化学

木糖醇月桂酸单酯的分离纯化及其性质表征

任娜娜,章云霄,赵晨伟,唐年初

(江南大学食品学院,江苏无锡214122)

摘要:以木糖醇和月桂酸为原料,在固定化脂肪酶的催化下合成木糖醇月桂酸单酯。分别采用硅胶柱层析法、溶剂萃取法对产物进行分离纯化,并采用高效液相色谱法进行纯度分析,核磁共振法(NMR)鉴定目标产物结构。对纯化后的木糖醇月桂酸单酯进行表面性质和抑菌性质表征。结果表明:采用硅胶柱层析法及溶剂萃取法分离纯化后得到的木糖醇月桂酸单酯纯度均达到95%以上,经NMR检测目标产物为1-O-木糖醇月桂酸单酯;其HLB值为9.87,为O/W型乳化剂,对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度(MIC)分别为1.0 mg/mL和0.25 mg/mL。

关键词:木糖醇月桂酸单酯;分离纯化;结构鉴定;表面性质;抑菌性质

中图分类号:TQ423.2;TS201.2 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2018)02-0037-05

Purification and characterization of xylitol monolaurate

REN Nana, ZHANG Yunxiao, ZHAO Chenwei, TANG Nianchu

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract: Xylitol monolaurate was synthesized from xylitol and lauric acid with immobilized lipase as catalyst. The products were isolated and purified by silica gel column chromatography and solvent extraction respectively. The purity of the target product was determined by HPLC, and the structure was identified by NMR. The surface property and antimicrobial property of the purified xylitol monolaurate were characterized. The results showed that the purities of xylitol monolaurate obtained by silica gel column chromatography and solvent extraction both were above 95%, the target product was 1-O-xylitol monolaurate, and its HLB value was 9.87, belonging to the O/W emulsifier. The minimum inhibitory concentrations of xylitol monolaurate against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were 1.0 mg/mL and 0.25 mg/mL respectively.

Key words: xylitol monolaurate; isolation and purification; structure identification; surface property; antimicrobial property

糖脂肪酸酯和糖醇脂肪酸酯(以下简称糖(醇)酯)是一类天然、环保、性质优良的表面活性剂。目前国内商业化且已用作乳化剂的食品添加剂共有近40种,其中糖(醇)酯型有山梨醇酐脂肪酸酯(Span系列)、聚氧乙烯山梨醇酐脂肪酸酯(Tween系列)、木糖醇酐单硬脂酸酯和蔗糖脂肪酸酯。同时,国内外研究较多的糖(醇)酯还有甘露糖(醇)酯^[1-2]、麦芽糖(醇)酯^[3-5]和果糖酯^[6]等,而木糖醇酯少有报

道。然而,木糖醇来源广泛、生产量大。月桂酸是中链脂肪酸(8≤碳链长度≤12),在自然界中分布广,不仅是构成生物体的基本组分,同时具有其他生理活性^[7]。

目前商业化的糖(醇)酯仍是化学合成法,但是国内外糖(醇)酯的合成研究已慢慢趋于酶法合成。酶法选择性强,催化副产物少,反应条件温和,产品易分离纯化。

一般情况下,低酯化度的糖(醇)酯通常用作乳化剂和表面活性剂^[8],而高酯化度的可用作凝胶剂制备凝胶油,作为食品专用油脂^[2],也多用作相变材料使用^[9]。相关文献指出^[4],低酯化度的糖(醇)酯中,单酯的表面性质及抑菌性质明显高于二酯。

收稿日期:2017-05-09;修回日期:2017-11-01

作者简介:任娜娜(1991),女,硕士研究生,主要从事油脂方面的研究工作(E-mail)15505296883@163.com。

通信作者:唐年初,副教授,博士(E-mail)tangnc@126.com。

Kontiokari^[10]、Trahan^[11]等提出了木糖醇抑制细菌代谢和生长的机制。比较不同中长链脂肪酸的抑菌活性发现,月桂酸的抑菌性最强,而当碳链长度超过12个碳原子后,抑菌活性下降^[12]。因此,无论是作为木糖醇衍生物还是月桂酸衍生物,木糖醇月桂酸单酯都具有很好的开发前景。

本实验研究了以木糖醇和月桂酸为原料,在固定化脂肪酶的催化下合成木糖醇月桂酸单酯。通过硅胶柱层析法、溶剂萃取法对产物进行分离纯化,并采用高效液相色谱法(HPLC)进行纯度分析,核磁共振法鉴定目标产物结构。对纯化后的木糖醇月桂酸单酯进行表面性质和抑菌性质表征。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

固定化脂肪酶 Lipozym 435 (7 000 PLU/g): 购于诺维信(中国)生物技术有限公司;4 Å 分子筛: 购于中国医药集团上海化学试剂有限公司;木糖醇、氯化钠、叔丁醇、甲醇、正己烷、甲苯、乙酸乙酯、苯、N,N-二甲基甲酰胺、无水硫酸钠均为分析纯;月桂酸为化学纯;甲醇为色谱纯;蛋白胨、牛肉膏: 购于北京力高业科技有限公司;金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*): 江南大学食品学院提供。

1.1.2 仪器与设备

RV06-ML型旋转蒸发仪;GF-H57离心机: 辽阳鸿基机械有限公司;ODS-2 Agilent 1200 高效液相色谱仪: 美国 Agilent 公司;ELSD 3300 蒸发光散射检测器: 美国 Alltech 公司;Avance III 400 MHz 全数字化核磁共振波谱仪: 德国布鲁克 AXS 有限公司;DCAT21 型全自动表面张力仪: 德国德菲公司;LDZX 灭菌锅。

1.2 实验方法

1.2.1 木糖醇月桂酸单酯的合成

参照任娜娜等^[13]的合成方法。称取一定量的木糖醇和月桂酸溶于叔丁醇溶剂中,置于50℃的恒温水浴中振荡(300 r/min)预热30 min,然后加入固定化脂肪酶和4 Å 分子筛,于85℃下恒温反应4 h。

1.2.2 硅胶柱层析分离纯化

硅胶柱层析分离前,先进行薄层层析(TLC)分析,确定是否有产物合成,并检测展开剂的展开效果。方法如下:取适量的样品粉末,经甲醇溶解后配制成1 g/mL的样品溶液,用毛细管蘸取溶液进行点样。展开剂为甲苯-乙酸乙酯-甲醇-水(体积比10:5:4.5:0.2),用10%硫酸乙醇溶液进行显色,

115℃下烘干10 min,观察显色斑点,并计算比移值(R_f)。

分离纯化:将反应液过滤除去分子筛和酶(回收),旋转蒸发溶剂后,将浓缩液20 mL上硅胶层析柱(20 mm×600 mm,硅胶100~200目)。洗脱剂为TLC的展开剂,流速2 mL/min,按1管/5 min,收集洗出液,并用TLC检测产物,再收集产物。

1.2.3 溶剂萃取分离纯化

将反应液过滤除去脂肪酶、分子筛,采用饱和氯化钠溶液洗去未反应的木糖醇,旋转蒸发除去溶剂,通过正己烷离心(6 500 r/min,10 min)除去产物中剩余的月桂酸,以上操作重复3次,于40℃真空干燥得样品,备用。

1.2.4 HPLC 分析

色谱柱为 sunfire C18 反相柱(5 μm,4.6 mm×250 mm),流动相采用甲醇-水(体积比90:10),流速1.0 mL/min,进样量10 μL,柱温30℃。

ELSD 设定参数:增益为1,氮气压力0.172 MPa,载气流速1.8 L/min,漂移管和喷雾管温度分别为60℃和45℃。

1.2.5 核磁共振(NMR)分析

称取20 mg纯化后的样品溶于氘代甲醇中,于30℃条件下进行NMR检测。实验采用 Avance III 400 MHz 全数字化核磁共振波谱仪,以氘代甲醇峰作为位移峰值基准。

1.2.6 性质表征

1.2.6.1 表面性质

HLB值的测定:采用水数法对木糖醇月桂酸单酯进行HLB值测定。分别称取 Span 系列和 Tween 系列样品各0.05 g于25 mL比色管中,加入10 mL N,N-二甲基甲酰胺苯混合液,充分振荡至溶液澄清。向其中滴加蒸馏水,使其变浑浊,记录滴加的蒸馏水的体积。作HLB值-水数的标准曲线,样品测定按上述方法操作,通过标准曲线可查出木糖醇月桂酸单酯的HLB值。

临界胶束浓度(CMC)的测定:采用DCAT21型全自动表面张力仪进行测定。以木糖醇月桂酸单酯浓度的对数值($\lg C$)作为横坐标,测定的各浓度相对应的表面张力(γ)为纵坐标,作 $\gamma - \lg C$ 图。 γ 会随 $\lg C$ 的变化而出现转折点,转折点所对应的浓度即为CMC。

1.2.6.2 抑菌性质

将木糖醇月桂酸单酯与牛肉膏蛋白胨培养液配制成8 mg/mL的溶液,再依次稀释,得到最终木糖醇月桂酸单酯质量浓度为4.0、2.0、1.0、0.5、0.25、

0.125、0.062 5 mg/mL 的溶液。在无菌操作环境下,挑取大肠杆菌和金黄色葡萄球菌接种到不同质量浓度的含木糖醇月桂酸单酯培养液中,37℃下培养 18 h 后,观察培养液的浑浊程度,测定最低抑菌浓度(MIC)。

2 结果与讨论

2.1 TLC 分析(见图 1)

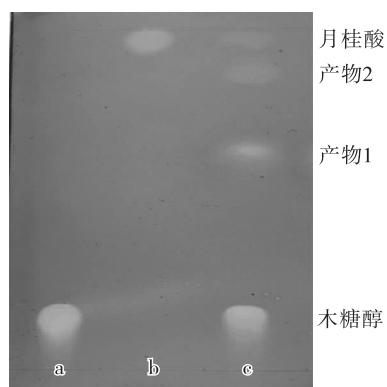


图 1 TLC 分析图谱

由图 1 可看出,初产物在薄层层析板上得到了较为理想的分离。除木糖醇和月桂酸的原料斑点外,还有 2 个产物斑点,说明此反应有新物质生成。其中 a、b 为原料展开、显色后的斑点,c 为产物展开、显色后的斑点。

木糖醇月桂酸产物 1 的 R_f 值为 0.59,产物 2 的 R_f 值为 0.82。经 HPLC 定量分析,产物含量为 70.27%。

2.2 硅胶柱层析分离纯化

利用 TLC 对洗脱产物进行跟踪,反应产物的硅胶柱层析分离结果如表 1 所示。

表 1 反应产物的硅胶柱层析分离结果

管数	月桂酸	木糖醇月桂酸二酯	木糖醇月桂酸单酯	木糖醇
1~5	+	-	-	-
6	+	+	-	-
7~10	-	+	-	-
11	-	+	+	-
12~28	-	-	+	-
29	-	-	+	+
30~36	-	-	-	+

注:“+”代表有该物质,“-”代表无该物质。

从表 1 可以看出,根据各个物质的极性差异,其在层析柱的洗脱顺序不同。在反应底物和产物中,按极性大小排序为:月桂酸 < 木糖醇月桂酸二酯 < 木糖醇月桂酸单酯 < 木糖醇。因此,按照洗脱顺序,依次被洗脱的是月桂酸、木糖醇月桂酸二酯、木糖醇月桂酸单酯、木糖醇。将 12~28 管中的物质

进行收集并旋蒸除去溶剂,以 HPLC 进行纯度检测,结果纯度达到 97.9%。

2.3 溶剂萃取分离纯化

采用 1.2.3 方法进行木糖醇月桂酸单酯的分离纯化,对反应底物和产物进行 HPLC 分析,结果如图 2 所示。

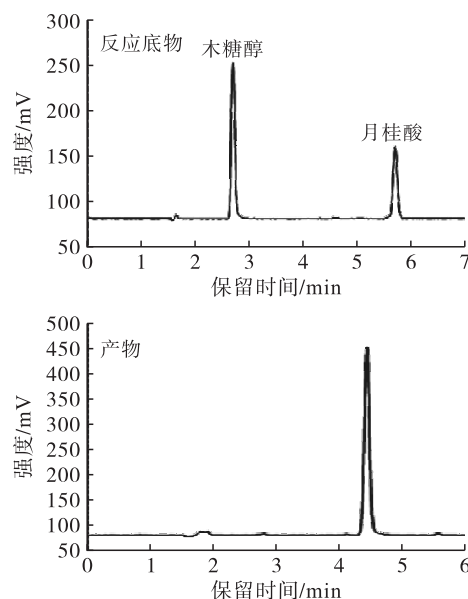


图 2 反应底物和溶剂萃取分离后产物的 HPLC 图谱

从图 2 可以看出,反应底物木糖醇和月桂酸的保留时间分别为 (2.72 ± 0.05) min 和 (5.69 ± 0.05) min;产物的保留时间为 (4.45 ± 0.05) min。根据文献[14]报道,不同物质极性不同,出峰顺序不同,月桂酸单酯先于月桂酸出峰。故初步判定纯化产物为木糖醇月桂酸单酯。以面积归一化法进行定量分析得出,该产物的纯度达 98.5%。

综上,利用硅胶柱层析法、溶剂萃取法皆达到了产物分离纯化的效果。两种方法得到的产物纯度均达到 95% 以上。

2.4 核磁共振(NMR)分析

由于木糖醇多羟基结构,所以合成的木糖醇月桂酸单酯可能有多个同分异构体。为进一步确定木糖醇月桂酸单酯的结构,进行 NMR 鉴定,结果如下:

^1H NMR (100 MHz, δ , ppm, CD_3OD): 4.21 ~ 4.19 (dd, 2H, H 1a - 1b), 3.98 (s, 4H, OH), 3.74 ~ 3.66 (dd, 2H, H 5a - 5b), 2.37 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, CH_2CO), 1.64 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1.34 ~ 1.31 (m, 16H, $(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$), 0.90 (t, 3H, $J = 6.8$ Hz, CH_3)。

^{13}C NMR (100 MHz, δ , ppm, CD_3OD): 174.17 ($\text{C}=\text{O}$), 72.32 (C_3), 70.45 (C_2), 69.52 (C_4), 65.37 (C_1), 62.82 (C_5), 33.61 (CH_2CO), 31.68

($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 26.05 ~ 29.35 ($(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 24.61 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 22.35 (CH_2CH_3), 13.07 (CH_3)。

上述结果可确定产物为 1-O-木糖醇月桂酸单酯。本实验结果与相关研究报道一致^[15]。

2.5 木糖醇月桂酸单酯的表面性质

2.5.1 HLB 值

HLB 表示分子的亲水部分和疏水部分的相对强度,并且表征了表面活性剂对水相和油相的相对亲和力。本实验采用水数法测定木糖醇月桂酸单酯的 HLB 值,Span 系列和 Tween 系列乳化剂 HLB 值-水数的标准曲线如图 3 所示。

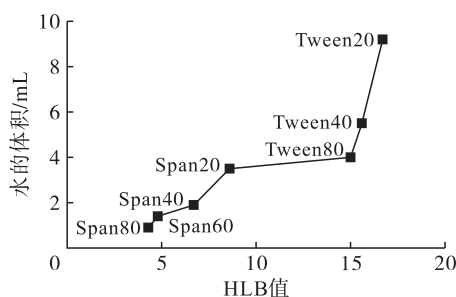


图 3 Span 系列和 Tween 系列乳化剂的水数标准曲线

经实验测得,木糖醇月桂酸单酯的 HLB 值为 9.87,属水包油型乳化剂,可用作润湿剂、铺展剂。

2.5.2 临界胶束浓度(CMC)

表面活性剂在溶液中开始形成胶束的浓度称为临界胶束浓度(CMC)。图 4 为室温(25℃)下木糖醇月桂酸单酯水溶液表面张力与浓度对数的关系。

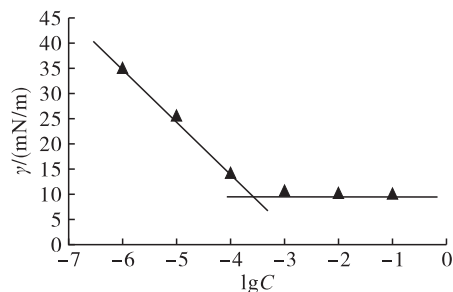


图 4 25℃时木糖醇月桂酸单酯水溶液表面张力与浓度对数关系

从图 4 可以看出,当木糖醇月桂酸单酯浓度较低时,其表面张力随木糖醇月桂酸单酯浓度的增加而急速下降,当增加到一定浓度时,溶液的表面张力趋于不变。这可能是由于当木糖醇月桂酸单酯浓度较低时,其在水溶液中以单分子形式处于分散状态,随着浓度增加,木糖醇月桂酸单酯分子的亲水基与疏水基定向排列,在水溶液表面形成紧密的单分子层,界面达到饱和,而过多的木糖醇月桂酸单酯在溶液内形成胶束,因此水溶液的表面张力

不再变化。通过计算得出,木糖醇月桂酸单酯的 CMC 为 1.58×10^{-4} mol/L,此时对应的表面张力为 9.08 mN/m。

2.6 木糖醇月桂酸单酯的抑菌性质

美国疾病控制中心报告指出,由大肠杆菌和金黄色葡萄球菌引起的感染分别占第一、二位^[16]。本实验以金黄色葡萄球菌、大肠杆菌为研究对象,考察质量浓度为 0.062 5 ~ 4.0 mg/L 木糖醇月桂酸单酯的抑菌效果,结果见表 2。

表 2 木糖醇月桂酸单酯对金黄色葡萄球菌及大肠杆菌的抑菌效果

木糖醇月桂酸单酯质量浓度/(mg/mL)	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌
0.062 5	+	+
0.125	+	+
0.25	-	+
0.5	-	+
1.0	-	-
2.0	-	-
4.0	-	-

注:“+”表示培养液浑浊;“-”表示培养液澄清。

由表 2 可以看出,木糖醇月桂酸单酯对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的 MIC 分别为 0.25 mg/mL 和 1.0 mg/mL。Kabara 等^[12]研究报道称,在中长链脂肪酸中,抑菌活性最强的是月桂酸,当碳链长度超过 12 个碳原子后,抑菌活性下降。这为木糖醇月桂酸单酯的抑菌性质提供了依据。

3 结论

本实验研究了木糖醇月桂酸单酯的分离纯化及性质表征。结果表明,采用溶剂萃取法和硅胶柱层析法对产物进行分离纯化,两种方法均具有较好的分离效果,纯度达到 95% 以上,经 NMR 鉴定产物为 1-O-木糖醇月桂酸单酯。对产物性质进行研究发现,HLB 值为 9.87,属于 O/W 型乳化剂,CMC 值为 1.58×10^{-4} mol/L,对应的表面张力为 9.08 mN/m。产物对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌均有抑菌效果。该产品可以作为一种新型的水包油型乳化剂和保鲜剂应用于牛奶、冰激凌、面包等食品中,以改善其品质和口感,同时可延长食品的货架期;也可以作为抑菌剂应用于医药和日化产品中,以提高人们的生活质量。

参考文献:

- [1] CROITORU R, FITIGĂU F, BROEK L, et al. Biocatalytic acylation of sugar alcohols by 3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid [J]. Process Biochem, 2012, 47(12): 1894-1902.

(下转第 54 页)

3 结论

对橄榄油、亚麻籽油、文冠果油和猪油的烘箱加速氧化试验结果表明,富勒烯[C60]在植物油中的抗氧化性能与TBHQ相当;在动物油中的抗氧化性能与BHT相当。在加热试验中,未发现其导致析出物出现的可能,且耐热稳定,色值保持不变,但其会改变油体颜色,虽然不会影响油品质量,但在对色泽有严格要求的油品中添加会有一定障碍,有待于进一步研究。富勒烯[C60]在延长油脂的保质期方面具有很好的效果,且其安全无毒,可对人体具有一定的保健作用,其溶于油脂及“自由基海绵”的吸收特性可以开发作为油脂抗氧化剂进行研发推广。

参考文献:

- [1] 凌关庭,唐述潮,陶民强. 食品添加剂手册[M]. 北京:化学工业出版社,2003:766-770.
- [2] 丛玲美. 茶油品质控制过程中主要质量指标变化规律的研究[D]. 北京:中国林业科学研究院,2007.
- [3] 孙丽芹,董新伟,刘玉鹏. 脂类自动氧化机理[J]. 中国油脂,1998,23(5):56-57.
- [4] 刘一军,俞晔. 进口油脂游离脂肪酸产生及影响测定因素分析[J]. 粮食与油脂,2001(12):43.
- [5] 郝利平,夏延斌,陈永泉,等. 食品添加剂[M]. 北京:中国农业大学出版社,2005:15-23.
- [6] 李新明,乐国伟,施用晖. 麦麸膳食纤维的提取和油脂氧化的研究[J]. 食品工业,2006(3):3-5.
- [7] 祝水兰,冯健雄,雷颂,等. 花生制品中抗氧化剂的应用现状及发展趋势[J]. 食品研究与开发,2010,31(11):209-212.

(上接第40页)

- [2] 张晓慧. 甘露醇辛酸二酯的酶法合成及应用[D]. 江苏无锡:江南大学,2016.
- [3] 赵佳. 有机相脂肪酶催化合成麦芽糖月桂酸二酯的研究[D]. 江苏无锡:江南大学,2009.
- [4] 王洁,曾茂茂,何志勇,等. 麦芽糖醇脂肪酸单酯表面性质的研究[J]. 食品工业科技,2013,34(11):65-68.
- [5] 张灏,鞠兴荣,彭冬酶. 麦芽糖醇硬脂酸酯的合成研究[J]. 食品科学,2007,28(3):163-165.
- [6] 寇秀芬,徐家立. 酶法合成糖及糖醇酯[J]. 微生物学报,2000,40(2):193-197.
- [7] 张希. 中链脂肪酸糖单酯的酶法合成以及理化性质和抑菌活性研究[D]. 杭州:浙江大学,2014.
- [8] 陈薇,莫恩青,梁晶. 蔗糖聚酯的合成及分离研究[J]. 中小企业科技,2007(2):50-51.
- [9] SAR A, BIER A, LAF Ö, et al. Galactitol hexa stearate and galactitol hexa palmitate as novel solid-liquid phase change materials for thermal energy storage[J]. Sol Energy, 2011, 85(9):2061-2071.

- [8] KROTO H W, HEATH J R, OBLEN S C, et al. C60: buckminsterfullerene[J]. Nature, 1985, 318:162-163.
- [9] 孙涛,巢骏,周冬香,等. C60及其衍生物生物活性研究进展[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(11):4846-4847, 4850.
- [10] 丁焰,康旭. C60化学的研究概况[J]. 化学世界,2003, 44(9):500-502.
- [11] EHRICH M, VAN TASSELL R, IL Y, et al. Fullerene antioxidants decrease organophosphate induced acetylcholinesterase inhibition in vitro[J]. Toxicol Vitro, 2011, 25(1):301-307.
- [12] TONG J, ZIMMERMAN M C, LI S M, et al. Neuronal uptake and intracellular superoxide scavenging of a fullerene (C60)-poly(2-oxazoline) nanoformulation[J]. Biomaterials, 2011, 32(14):3654-3665.
- [13] TAKAHASHI M, KATO H, DOI Y, et al. Sub-acute oral toxicity study with fullerene C60 in rats[J]. J Toxicol Sci, 2012, 37:353.
- [14] MOR T, TAKADA H, ITO S, et al. Preclinical studies on safety of fullerene upon acute oral administration and evaluation for no mutagenesis[J]. Toxicology, 2006, 225(1):48-54.
- [15] BOBYLEVA G, MARSAGISHVILI L G, PODLUBNAYA Z A, et al. Fluorescence analysis of the action of soluble derivatives of fullerene C60 on amyloid fibrils of the brain peptide A β (1-42)[J]. Biophysics, 2010, 55(5):699-702.
- [16] MARSAGISHVILI L G, BOBYLEVA G, SHPAGINA M D, et al. Effect of fullerenes C60 on the X-protein amyloids[J]. Biofizika, 2009, 54(2):202-205.
- [10] KONTIOKARI T, UHARI M, KOSKELA M. Effect of xylitol on growth of nasopharyngeal bacteria in vitro[J]. Antimicrob Agents Ch, 1995, 39(8):1820-1823.
- [11] TRAHAN L, BAREIL M, GAUTHIER L, et al. Transport and phosphorylation of xylitol by a fructose phosphotransferase system in *Streptococcus* mutants[J]. Caries Res, 1985, 19(1):53-63.
- [12] KABARA J, SWIECZKOWSKI D M, CONLEY A J, et al. Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents[J]. Antimicrob Agents Ch, 1972, 2(1):23-28.
- [13] 任娜娜,赵晨伟,唐年初. 木糖醇月桂酸单酯的酶法制备工艺研究[J]. 中国油脂,2017,42(10):39-42.
- [14] 冯广莉,李晓凤,张奔,等. 混合溶剂中酶法催化合成木糖酯及其结构鉴定研究[J]. 现代食品科技,2013(6):1222-1226.
- [15] 王吟佼. 甘露糖月桂酸酯的酶法合成及其性质研究[D]. 江苏无锡:江南大学,2008.
- [16] 宋志超. 可聚合聚氨酯型表面活性剂的制备及性能研究[D]. 山东青岛:中国海洋大学,2006.