

共轭亚油酸酯类衍生物的研究进展

郭小婧, 张东辉

(长江大学 生命科学学院, 湖北 荆州 434025)

摘要: 共轭亚油酸酯类衍生物具有抗氧化、抗癌、降低胆固醇、减肥、降血糖血脂等多种生理功能, 在食品、化妆品、医药及饲料行业中均具有广阔的应用前景。为了推动共轭亚油酸酯类衍生物的生产应用, 综述了共轭亚油酸酯类衍生物的种类及合成方法、分离纯化方法、检测方法、储存稳定性及其应用。指出推动酶法合成共轭亚油酸酯类衍生物工业化、多种分离纯化方法结合以及进一步提高共轭亚油酸酯类衍生物的储存稳定性是今后的重点研究方向。

关键词: 共轭亚油酸; 共轭亚油酸酯类衍生物; 合成方法; 分离纯化; 检测; 储存稳定性; 应用

中图分类号: TS221; TQ225 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2020)09-0054-08

Advance in conjugated linoleic acid esters derivatives

GUO Xiaojing, ZHANG Donghui

(School of Life Sciences, Yangtze University, Jingzhou 434025, Hubei, China)

Abstract: Conjugated linoleic acid esters derivatives have many physiological functions, such as antioxidation, anticancer, cholesterol-lowering, weight loss and blood glucose-lowering and lipids-lowering ect., and have broad application prospects in food, cosmetic, medicine and feed industries. The type, synthesis, separation and purification, detection, storage stability and application of conjugated linoleic acid esters derivatives were summarized so as to promote its production and application. Furthermore, it was proposed that the industrialization of enzymatic synthesis of conjugated linoleic acid esters derivatives, combination of multiple of separation and purification methods and enhancing the storage stability of conjugated linoleic acid esters derivatives were the key research direction in future.

Key words: conjugated linoleic acid; conjugated linoleic acid esters derivatives; synthesis method; separation and purification; detection; storage stability; application

共轭亚油酸 (Conjugated linoleic acid, CLA) 是含有共轭双键的十八碳二烯酸在不同位置和立体构型上形成的异构体的总称。天然和人工合成的 CLA 有 28 种异构体, 其中以 *c*9, *t*11-CLA 及 *t*10, *c*12-CLA 为研究最多、发挥生理功能较好的 2 种主要异构体。大量的研究表明, *c*9, *t*11-CLA 和 *t*10, *c*12-CLA 具有抗癌、降血脂、抗动脉粥样硬化、提高

免疫力、防治糖尿病、减肥等多种生理功能^[1], 这使得 CLA 作为营养保健品逐渐被广大消费者所喜爱。但是, 目前国内外销售的 CLA 制品主要以游离脂肪酸形态存在, 其口感不佳、稳定性差、易氧化变质, 氧化酸败产生的某些小分子物质对人体健康不利, 从而限制了应用。为了提高 CLA 的稳定性, 可对 CLA 的结构进行改造, 而合成 CLA 酯类衍生物就是一种很好的选择。CLA 酯类衍生物是指 CLA 发生酯化反应后生成的 CLA 酯, 主要包括共轭亚油酸乙酯、共轭亚油酸甘油酯、共轭亚油酸植物甾醇酯以及其他酯类衍生物。与 CLA 相比, CLA 酯类衍生物具有优异的亲脂性, 更易于被人体吸收, 其稳定性和口感均能大幅度提高, 且具有与 CLA 同等或更优的生理功能。CLA 酯类衍生物具有抗氧化、减肥、降低血脂血糖、降低胆固醇、抗癌等多种作用, 对 CLA 酯类

收稿日期: 2020-06-03; 修回日期: 2020-06-22

基金项目: 湖北省自然科学基金青年基金项目(2019CFB222); 长江大学湿地生态与农业利用教育部工程研究中心开放基金项目(KF201916)

作者简介: 郭小婧(1987), 女, 助理实验师, 硕士, 研究方向为微生物脂质代谢(E-mail) xiaojing_8806@163.com。

通信作者: 张东辉, 讲师, 博士(E-mail) zdhbio159@163.com。

衍生物的开发,将增加 CLA 产品的种类,拓宽 CLA 的应用领域,提高 CLA 产品的附加值。CLA 酯类衍生物可作为多功能添加剂,在化妆品、食品、医药以及饲料行业中均有广阔的应用前景。本文介绍了 CLA 酯类衍生物的种类及合成方法、分离纯化方法、检测方法、储存稳定性及其应用,以期对 CLA 酯类衍生物的深入研究和开发利用提供参考依据。

1 共轭亚油酸酯类衍生物的种类及合成方法

1.1 共轭亚油酸乙酯及其合成方法

共轭亚油酸乙酯(Conjugated linoleic acid ethyl ester, CLAEE)是 CLA 与乙醇酯化而成。CLAEE 的合成方法包括化学合成法和酶催化法。化学合成法是利用硫酸、对甲苯磺酸等催化 CLA 与乙醇直接酯化或利用乙醇钾、乙醇钠等催化高含亚油酸油脂(如红花籽油)的乙酯转化成 CLAEE。Niezgoda 等^[2]利用硫酸催化 *t*10, *c*12 - CLA 与乙醇酯化生成 CLAEE,将 1.12 mmol *t*10, *c*12 - CLA 加入 10 mL 4% 硫酸溶液中,于磁力搅拌器中 50 °C 反应 4 h 条件下,得到 *t*10, *c*12 - CLAEE,气相色谱检测其转化率为 98%。毕艳兰等^[3]以乙醇钾为催化剂催化红花籽油乙酯制备 CLAEE,在真空度 -0.1 MPa、乙醇钾添加量 5%、110 °C 下反应 3 h,制得 CLAEE 相对含量为(75.44 ± 1.18)%,得率为(69.50 ± 3.09)% 的产物,主要成分为 *c*9, *t*11 - CLAEE 及 *t*10, *c*12 - CLAEE。酶催化法是利用酶催化 CLA 与乙醇发生酯化反应,常用的脂肪酶有 Novozyme 435、AY30、*Candida rugosa* lipase (CRL)、Lipase from *Candida cylindracea*。Yu 等^[4]利用 MSU-H 为载体固定 CRL 催化 CLA 与乙醇合成 CLAEE,在 CLA 4.7 mmol、乙醇 4.7 mmol、80 mg 固定在 MSU-H(13.3)的 CRL、反应温度 45 °C、反应时间 8 h、转速 120 r/min 条件下,反应总酯化率为 67.8%,其中 *c*9, *t*11 - CLA 的酯化率为 95.2%, *t*10, *c*12 - CLA 的酯化率为 48.6%。将 CRL 固定于 15% NH₂-Si(p) 后催化 CLA 与乙醇酯化,总酯化率为 27.8%,其中 *c*9, *t*11 - CLA 的酯化率为 55.5%,而 *t*10, *c*12 - CLA 的酯化率为 17.9%^[5]。由此可见,固定化的 CRL 优先利用 *c*9, *t*11 - CLA 合成 CLAEE,且 *c*9, *t*11 - CLA 的酯化率是 *t*10, *c*12 - CLA 的 2~3 倍,适合用于工业生产 *c*9, *t*11 - CLAEE 或从 CLA 混合物中分离 *c*9, *t*11 - CLA。

1.2 共轭亚油酸甘油酯及其合成方法

共轭亚油酸甘油酯(Conjugated linoleic acid glycerides, CLAG)是指 CLA 与甘油发生酯化后的产物,有共轭亚油酸甘油单酯(Conjugated linoleic acid

monoglycerides, CLA - MG)、共轭亚油酸甘油二酯(Conjugated linoleic acid diglycerides, CLA - DG)和共轭亚油酸甘油三酯(Conjugated linoleic acid triglycerides, CLA - TG)。其中 CLA - MG 包含 α -甘油单酯和 β -甘油单酯,CLA - DG 包含 1,3-甘油二酯和 1,2-甘油二酯。目前 CLAG 主要通过以下两种方式获得:化学合成和酶催化法。化学合成 CLAG 是指 CLA 与甘油直接酯化或含亚油酸油脂(如红花籽油)经共轭化后与甘油酯发生酯交换反应生成 CLAG。王雪等^[6]在亚临界水的状态下,将 CLA 和甘油直接酯化合成 CLAG,在 CLA 和甘油物质的量比 2:1、反应压力 13 MPa、反应温度 250 °C 和反应时间 40 min 条件下得到 CLAG,其中 CLA 转化率为 96.3%。大连医诺生物股份有限公司^[7]先将红花籽油甲酯共轭化反应制得 CLA 甲酯,再用甲醇钠催化 CLA 甲酯与三醋酸甘油酯发生酯交换反应生成 CLA - TG,可以得到纯度为 95% 以上的 CLA - TG。酶法合成 CLAG 是指在脂肪酶的作用下,CLA 与甘油发生酯化反应或 CLA(酯)与甘油(酯)发生酯醇、酯酸和酯酯交换反应所得,常用于制备 CLAG 的脂肪酶有 Lipozyme TL IM、Novozyme 435、Lipases B from *Candida Antarctica*、*Rhizomucor miehei* (RML)、*Thermomyces lanuginosus* (TLL)、Lipozyme RM IM 等。黄楚楚等^[8]通过固定化脂肪酶 Lipozyme TL IM 催化 CLA 乙酯与单油酸甘油酯(GMO)发生反应生成 1,3-DAG,在 20% (质量分数) Lipozyme TL IM、CLA 乙酯与 GMO 物质的量比 3:1、220 r/min、50 °C 水浴摇床中反应 2 h 条件下生成 1,3-DAG,其中 CLA 含量为 66.39%。Lian 等^[9]利用固定在 ECR1030 树脂上的脂肪酶 MAS1-H108A 催化 CLA 与甘油酯化反应,在酶用量 50 U/g、CLA 与甘油物质的量比 3:1、反应温度 55 °C 和反应时间 24 h 条件下,合成了富含 CLA 的甘油三酯(TAG),其中 CLA 含量高达 69.19%,TAG 含量为 95.21%,DAG 含量为 4.39%。此外,固定化的 MAS1-H108A 使用 10 次后催化活性仍保持初始活性的 95.11%,说明固定化的 MAS1-H108A 具有很好的催化活性和可重复利用性,有望利用其在工业中生产 CLAG。

1.3 共轭亚油酸植物甾醇酯及其合成方法

植物甾醇是由 1 个五元环和 3 个六元环组成的三萜类物质,最常见的有 β -谷甾醇、大豆甾醇及菜油甾醇等。游离型植物甾醇不溶于水,脂溶性也很差,不易被人体吸收利用。共轭亚油酸植物甾醇酯(Conjugated linoleic acid phytosterol ester, CLAPE)既可以改善甾醇的脂溶性,又兼具两者的生物学功能。

CLAPE 是由 CLA 与植物甾醇直接酯化或 CLA 甲酯(或乙酯)与植物甾醇通过酯交换得到,反应过程一般需要使用催化剂,可分为化学催化剂和酶。常用的化学催化剂有十二烷基硫酸钠、甲醇钠等。董涛^[10]以十二烷基硫酸钠催化 CLA 与植物甾醇合成 CLAPE,在 N₂ 保护下,当 CLA 与植物甾醇物质的量比为 1.2:1 时,添加 2% 十二烷基硫酸钠,于 110 °C 反应 3 h,制得 CLAPE,该条件下酯化率达 77.1%。李春荣等^[11]利用甲醇钠催化 CLA 甲酯与植物甾醇通过酯交换反应合成 CLAPE,在 CLA 甲酯 150 g、植物甾醇 90 g、甲醇钠 1.0 g、真空度 1.330 ~ 2.67 kPa、120 °C 条件下反应 2 h,CLAPE 产率为 94%,其中 CLAPE 含量为 96%。化学催化剂虽反应迅速,但反应能耗过高,对设备要求高。常用的酶催化剂有 CRL、Novozym 435、*Pseudomonas*、Chirazyme L-2 c.-f. C2 等。Li 等^[12]通过固定化 Chirazyme L-2 c.-f. C2 催化 β -谷甾醇与 CLA 酯化合成共轭亚油酸 β -谷甾醇酯,在 β -谷甾醇浓度 50 $\mu\text{mol/mL}$ 、底物物质的量比 1:1、Chirazyme L-2 c.-f. C2 用量 20 mg/mL、转速 150 r/min、反应温度 50 °C、反应时间 72 h 条件下,得到产率为 72.6% 的共轭亚油酸 β -谷甾醇酯。汤桂云等^[13]使用脂肪酶 CRL 催化合成共轭亚油酸大豆甾醇酯,通过正交试验优化的反应条件为大豆甾醇与 CLA 物质的量比 1:3、脂肪酶 CRL 添加量 6%、反应温度 50 °C 和反应时间 48 h,在优化条件下共轭亚油酸大豆甾醇酯产率为 98.94%。由此可见,CRL 能高效催化 CLAPE 的合成,后续可采用固定化技术提高其催化效率,同时保持其重复利用率,加快其在 CLAPE 合成的工业化应用。

1.4 共轭亚油酸薄荷醇酯及其合成方法

共轭亚油酸薄荷醇酯(Conjugated linoleic acid 1-menthyl ester, CLAME)是由 CLA 与 *L*-薄荷醇发生酯化反应所生成的物质,多用于分离纯化 CLA 异构体 *c9,t11*-CLA 和 *t10,c12*-CLA。CLAME 的合成多用酶作为催化剂,常用的酶为褶皱假丝酵母脂肪酶 AY30 与 OF。Jafari 等^[14]优化了无溶剂体系中 CLA(*c9,t11*-CLA + *t10,c12*-CLA)与 *L*-薄荷醇酯化的条件,当反应时间 23.12 h、反应温度 32.65 °C、脂肪酶 AY30 用量 135.40 U、CLA 与 *L*-薄荷醇物质的量比 1:1.7、体系 pH 7.7 时,*c9,t11*-CLA 的转化率为 93.6%。Giua 等^[15]检测了 CLA 4 种不同异构体在褶皱假丝酵母脂肪酶催化下与 *L*-薄荷醇酯化后的含量,将脂肪酶 250 μg 、CLA 10 mg、*L*-薄荷醇 5.7 mg 混合溶于 100 μL 正己烷中反

应 10 min 后,N₂ 吹干正己烷,加入 3 μL 水,然后在磁力搅拌器中 30 °C 分别反应 8、16、24、32、48 h,发现反应 16 h 的总酯化率最高,为 48%,产物含 *c9,t11*-CLA(40.99 \pm 3.69)%、*c11,t13*-CLA(28.66 \pm 2.48)%、*t10,c12*-CLA(17.66 \pm 4.13)%、*t8,c10*-CLA(12.70 \pm 2.00)%,反应 8 h 生成的 CLAME 中 *c9,t11*-CLA 含量最高,为(50.16 \pm 3.12)%。由此可见,褶皱假丝酵母脂肪酶在催化 CLA 与 *L*-薄荷醇酯化反应过程中,对底物 CLA 异构体具有选择性,催化 *c,t*-CLA 合成 CLAME 的反应选择性优于 *t,c*-CLA,且对 *c9,t11*-CLA 的选择利用性高于 *c11,t13*-CLA,所以 CLAME 的制备反应可以用于分离 CLA 的 4 种异构体。

1.5 共轭亚油酸其他酯类衍生物及其合成方法

共轭亚油酸维生素 C 酯是 CLA 与维生素 C(*L*-抗坏血酸)反应合成的产物。Yang 等^[16]利用脂肪酶 Novozym 435 催化合成共轭亚油酸维生素 C 酯,将 2.11 mmol/mL *L*-抗坏血酸、2 mmol/mL CLA、15% Novozym 435 加入三氟乙酸甲酯中于 70 °C 反应 32 h,合成共轭亚油酸维生素 C 酯的产率约为 200 g/L。

共轭亚油酸左旋肉碱酯是 CLA 与左旋肉碱(*L*-肉碱)反应合成的产物。Li 等^[17]研究了无溶剂体系中 CLA 与 *L*-肉碱生成共轭亚油酸左旋肉碱酯的条件,在 1 mmol CLA、1 mmol *L*-肉碱、150 mg 脂肪酶 AY30、50% 水、150 mg 4 Å 分子筛、45 °C 反应 24 h 条件下合成了共轭亚油酸左旋肉碱酯,最大转化率为 60.9%。

共轭亚油酸蔗糖酯是 CLA 或 CLAEE 与蔗糖反应合成的物质。杨国龙^[18]用 K₂CO₃ 催化蔗糖与 CLAEE 合成共轭亚油酸蔗糖酯,在反应时间 3.5 h、CLAEE 与蔗糖物质的量比 3:1 或 4:1、反应温度 125 °C、催化剂 K₂CO₃ 用量 7% (以底物总物质的量为基准)、相转移催化剂四丁基溴化铵用量 16% (以底物总物质的量为基准)、促进剂亚油酸钾用量 16% (以底物总物质的量为基准)、反应压力小于 0.004 MPa、搅拌速度不小于 400 r/min 条件下,最终产率为 80% 左右。

共轭亚油酸冰片酯是 CLA 与冰片酯化合成的物质。王羽伦^[19]以脂肪酶 AYS 为催化剂,在无溶剂体系中合成共轭亚油酸冰片酯,优化的反应条件为:2.5 mmol CLA 与 1 mmol 冰片混匀,脂肪酶 AYS 用量为冰片质量的 40%,pH 7.0 缓冲液用量为 30%,180 r/min,40 °C 反应 48 h。在优化的反应条件下,酯化率为(79.2 \pm 0.5)%。

随着化学合成技术的提升以及酶法催化效率的提高,CLA酯类衍生物的合成已越来越多,除上述所述CLA酯类衍生物外,还包括共轭亚油酸甲酯、共轭亚油酸葡萄糖酯、共轭亚油酸乳糖酯等,种类繁多。CLA酯类衍生物的合成方法中,传统化学合成法因操作简单、技术成熟、成本低等优点更易应用于工业生产,但存在产物复杂、纯化困难、环境污染等缺点需要改进。酶法具有反应条件温和、能耗低、副产物少、环境友好的优点,但存在反应时间长、酶活性不稳定、成本高等问题,亟待解决。

2 共轭亚油酸酯类衍生物的分选纯化方法

CLAEE、CLAPE、CLAME等由于酯化反应产物相对简单,所以其分离和分析相对容易。但是CLAG的反应底物甘油有3个—OH,可以与CLA生成甘油单酯、甘油二酯和甘油三酯,产物复杂,因此CLAG的分选纯化相对复杂。CLA酯类衍生物的分选纯化方法主要有超临界CO₂萃取技术,分子蒸馏法,硅胶柱层析法,柱层析、薄层色谱和液相色谱结合法,模拟移动床色谱系统等。分选纯化方法的选择需要根据样品所需纯度而定,对纯度要求高的样品可选择多种纯化方法组合使用。

2.1 超临界CO₂萃取技术

超临界CO₂萃取技术是指在超临界状态下,待分离的物质与CO₂充分接触后,根据其沸点高低、极性大小而依次溶解,然后通过节流膨胀、减压、升温等操作使CO₂和萃取物分离,从而实现提纯的目的。许鹏^[20]利用超临界CO₂分别萃取纯化了CLAEE和CLAG,发现当压力为10 MPa、温度梯度为35~56℃时,CLAEE的含量由67.2%提高到93.6%。利用超临界CO₂萃取CLAG时发现^[21],当分离塔内无温度梯度时,产物分离速率最快,但效果较差,分离塔温度梯度为10℃、压力为12.75~16 MPa时,脱酸效果最好,且超临界CO₂萃取技术对CLAG中各组分具有选择性萃取的效果,其中对转化率为90.64%的CLAG(CLA-MG、CLA-DG、CLA-TG的含量分别为35.34%、54.41%、10.19%)进行萃取后,CLA-MG、CLA-DG、CLA-TG的最高含量分别可达40.35%、67.08%、18.99%,可见超临界CO₂萃取技术对CLA-DG的萃取效果最好。

2.2 分子蒸馏法

分子蒸馏法是由于待分离物中各组分分子平均自由程的不同而实现分离的方法,适用于沸点高、黏度高、热稳定性差的物质分离。Cao等^[22]采用分子

蒸馏法获得了高纯度的CLA-TG,先使用脂肪酶SMG1将CLAG中的CLA-MG和CLA-DG水解成游离脂肪酸,再通过分子蒸馏法获得高纯CLA-TG,在分子蒸馏塔温度150℃、进料温度60℃、物料流速2.7 g/min、冷凝温度25℃、薄膜蒸馏刮板转速250 r/min、蒸馏压力8.1 Pa时,可得到纯度为99.8%的CLA-TG。

2.3 硅胶柱层析法

硅胶柱层析法是依据待分离物中各组分在硅胶上的吸附力不同而使其分离的方法。孙慧娟^[23]先采用薄层色谱法对酯化产物CLAPE进行定性分析,然后使用硅胶柱层析法对其进行分离纯化,结果表明,当以石油醚(沸程60~70℃)-乙醚-乙酸(体积比80:20:1)为展开剂,硅胶柱中流动相流速为1.5 mL/min,填充高度为65 cm,样品最大上样量为5 g时,样品中各组分均能得到较好的分离,CLAPE纯度可达到90%。

2.4 柱层析、薄层色谱和液相色谱结合法

柱层析、薄层色谱和液相色谱结合法主要用来分离纯化CLAG,先利用柱层析法把CLAG混合样品中的几种不同组分分离,再用薄层色谱法初步鉴定各种馏分的成分,最后使用液相色谱对分段收集产物进一步分离纯化。刘珍珠^[24]使用柱层析、薄层色谱和液相色谱结合法实现了CLAG的分离纯化,柱层析法中用10%乙醚石油醚溶液洗脱得到馏分1,30%乙醚石油醚溶液洗脱得到馏分2,100%乙醚溶液洗脱得到馏分3。再使用薄层色谱法对比标样初步鉴定馏分1、2、3分别为CLA-TG、CLA-DG、CLA-MG,使用的展开剂为石油醚-乙醚-冰醋酸(体积比30:70:1)。液相色谱法中用正己烷-异丙醇(体积比为9:1)分别溶解馏分1、2、3,流动相A为正己烷,流动相B为异丙醇,当正己烷-异丙醇体积比为95:5时,CLA-TG、1,3-CLA-DG和1,2-CLA-DG能依次得到分离,当正己烷-异丙醇体积比为90:10时,可分离出CLA-MG。

2.5 模拟移动床色谱系统

模拟移动床色谱系统是多个色谱柱串联而成的装置。自然资源部第一海洋研究所^[25]发明了一种利用模拟移动床色谱系统纯化高浓度CLAEE的方法。该色谱系统为四区模拟移动床,每区均串联2根色谱柱,色谱柱固定相为C18硅胶,洗脱液为甲醇-水(或乙醇-水或乙腈-水)(质量比80:20),该法使纯度80%的CLAEE纯化为纯度97%以上的高纯品。

总之,超临界 CO₂ 萃取技术具有绿色环保、无溶剂残留等优点,但维持超临界状态需要很高的操作压力,设备昂贵,分离 CLA 酯类衍生物的成本相对较高。分子蒸馏法蒸馏压力低、受热时间短、工艺简单、分离效率高、不污染环境、且能回收利用未反应的 CLA,是分离纯化 CLA 酯类衍生物的一种经济合理的方法,但分离相对分子质量相近的物质效果较差。柱层析法成本低廉、分辨率高、选择性好、速度快,因此适用于杂质多、含量少的复杂样品分析,同时由于其耗时长、溶剂用量大、处理能力小,现多用于实验室阶段。模拟移动床色谱系统产品纯度高、溶剂消耗少、可连续操作、可自动控制,适用于工业化生产,但对后续产品需要脱除溶剂,同时设备投资高。

3 共轭亚油酸酯类衍生物的检测方法

3.1 气相色谱法

气相色谱法(GC)是根据样品中各组分在固定相中吸附力和溶解力的不同而实现各成分的分离检测。GC 法检测 CLA 酯类衍生物应选用强极性的长石英毛细管色谱柱,常用的色谱柱有 CP-Sil 88 (100 m × 0.25 mm × 0.2 μm)、DB-23(60 m × 0.25 mm × 0.15 μm)、SP-2560(100 m × 0.25 mm × 0.2 μm)等,检测器常选用氢离子火焰检测器(FID)、质谱检测器(MS)等,采用程序升温方式。惠菊^[26]使用 GC 法测定了 CLAG 中 CLA 的含量,检测条件为:CP-Sil 88 毛细管色谱柱(100 m × 0.25 mm × 0.2 μm);FID 检测器;进样口温度 250 °C;检测器温度 250 °C;空气压力 50 kPa;氢气压力 60 kPa;氮气压力 220 kPa;程序升温为 70 °C 保持 4 min, 13 °C/min 升温至 175 °C 保持 27 min, 4 °C/min 升温至 215 °C 保持 31 min。检测结果显示,CLAG 中 CLA 含量为 17.1%,其中含 *c*9, *t*11-CLA (8.12 ± 0.28)%, *t*10, *c*12-CLA (9.01 ± 0.21)%。

3.2 高效液相色谱-蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)检测方法

由于 CLA 异构体较多,人们常用银离子高效液相色谱法(Ag⁺-HPLC)检测 CLA 及其酯类衍生物(尤其是甘油酯),检测器一般采用紫外检测器(UV)、示差折光检测器(RID)和蒸发光散射检测器(ELSD),检测方法选择正相色谱法和反相色谱法均可。刘珍珠等^[27]使用反相高效液相色谱配 ELSD 测定了 CLAG 中各组分含量,实验中流动相 A 为正己烷,流动相 B 为正己烷-异丙醇-乙酸乙酯-甲酸(体积比 80:10:10:0.1),上样量 10 μL,流量 1 mL/min,梯度洗脱,氮气流量 1.5 mL/min,漂移管温度 40 °C。检测结果显示,共轭亚油酸甘油酯样品中

CLA-TG、1,3-CLA-DG、1,2-CLA-DG 和 CLA-MG 含量分别为 79.49%、10.08%、9.22%、0.55%,各甘油酯的相对标准偏差(RSD)分别为 1.5%、4.7%、4.5%、3.5%,检出限分别为 0.06、0.2、0.2、0.25 mg/L。

3.3 高效液相色谱-傅里叶红外光谱分析

傅里叶红外光谱分析法(FTIR)是根据样品中不同官能团在红外中具有不同的吸收峰而实现对样品的检测,FTIR 中,利用 CLA 酯类衍生物结构中的羟基、碳碳双键、碳氧双键发生振动时会吸收特定波长的红外光,表现出特定的吸收峰,可以定性分析样品中物质结构组成,常用于对 CLA 酯类衍生物的结构进行表征。汤桂云等^[13]合成共轭亚油酸大豆甾醇酯后,先用高效液相色谱对产物进行定量,后用 FTIR 进行表征,高效液相色谱条件为:硅胶色谱柱(5 μm × 4.6 mm × 250 mm);等度洗脱,流动相中 B 相为正己烷-异丙醇(体积比 20:1),流动相 D 相为正己烷;紫外检测波长 232 nm。在此条件下,共轭亚油酸大豆甾醇酯的出峰时间约为 4 min,大豆甾醇的出峰时间约为 8 min,两者能得到分离。采用 FTIR 对纯化后的共轭亚油酸大豆甾醇酯进行扫描分析,从光谱图可知产物中无—OH 吸收峰,有典型的 O—C—O 和 C=O 红外光谱吸收峰,说明酯化产物为共轭亚油酸大豆甾醇酯。

以上 3 种检测方法是 CLA 酯类衍生物的常用方法。气相色谱法具有样品用量少、前处理简单、检测速度快、选择性高、灵敏度高和分离效率高等优点,适用于 CLAE、CLAPE、CLAME 等的检测,但 CLAG 的沸点很高,难以汽化,GC 检测 CLAG 重现性较差,且 GC 测定需对样品先进行甲酯化,检测结果无法确定 CLA 的酯型。高效液相色谱法具有操作简单、便于自动化、高效快速、保护样品不被破坏等优点,适用于大分子物质和热不稳定物质,可用于 CLA 酯类衍生物的检测。FTIR 具有分辨率高、对样品无破坏性、操作简便快捷等优点,多用于 CLA 酯类衍生物的结构分析鉴定。除以上介绍的检测方法外,还包括常用的紫外光谱法、气质联用法以及核磁共振法等。上述方法在分析不同物质时,应根据样品的性质和各分析方法的特点合理选择,也可将多种方法结合使用。

4 共轭亚油酸酯类衍生物的储存稳定性

CLA 酯类衍生物在储存和应用加工过程中会发生氧化反应,生成的过氧化脂质对人体健康不利,为了防止 CLA 酯类衍生物的氧化并维持其稳定性,常通过添加抗氧化剂、微胶囊化或加工成胶丸等方

式增强其稳定性。

刘美玉等^[28]研究了 CLAEE 和 CLAG 的氧化稳定性,结果显示 CLAG 的稳定性强于 CLAEE,当添加 0.02% 的维生素 E 时二者的氧化稳定性提高。

罗文静^[29]对内容物为 CLAEE 的 CLA 软胶囊进行质量评估,发现 CLAEE 在高温、高湿和强光环境下均具有较强的稳定性,而其囊壳则稳定性相对较差。这表明将 CLAEE 制成软胶囊后可以增强其氧化稳定性。

刘明^[30]比较了塑料瓶和铝听 2 种包装形式下 CLAG 的稳定性,并研究了不同形态下的 CLAG 应用于烘焙时对产品感官的影响,检测了 2 种不同形态的 CLAG 的稳定性,实验结果表明:塑料瓶和铝听包装的 CLAG 的颜色、脂肪酸组成及过氧化值均十分稳定,且塑料瓶包装的 CLAG 的气味稳定,但铝听包装的 CLAG 保存 2 个月后便有哈喇味;相同 CLA 含量的 CLAG 及 CLAG 微囊粉烘焙制备的面包,在气味、口味及外观上无明显差异,但用 CLAG (CLA 含量 3%) 烘焙制备的饼干有明显的哈喇味,同时 CLAG 及 CLAG 微囊粉对 200℃ 以上短暂(6~9 min)的高温均具有一定的耐受性,但 CLAG 微囊粉较 CLAG 的耐高温性更强。由此可看出,CLAG 的塑料包装优于铝听包装,将 CLAG 制成微囊粉有利于保持 CLAG 的稳定性。

孙慧娟^[23]考察了 CLAPE 在油脂中的溶解度及过氧化值,CLAPE 相比植物甾醇在植物油中的溶解度提高了 20~30 倍,且 CLAPE 的抗氧化效果较植物甾醇强,当 CLAPE 的添加量为 0.10 mg/g 时,显著提高了猪油和花生油的氧化稳定性。另外,0.02% 的维生素 E 可以提高 CLAPE 的抗氧化效果,而维生素 C 对维生素 E 和 CLAPE 的氧化稳定性没有增效作用。这表明 CLAPE 具有一定的抗氧化性,且 0.02% 的维生素 E 可作为 CLAPE 的抗氧化剂。

5 共轭亚油酸酯类衍生物的应用

CLA 酯类衍生物较 CLA 性质稳定、口感好、易于储存,且易被人体消化吸收,同时也具有 CLA 的各项生理功能,可作为功能添加剂加入药品、食品、化妆品和饲料中,具有广泛的应用前景。

5.1 在医药行业中的应用

CLA 酯类衍生物具有抗氧化、减肥、降低血脂、降低胆固醇、抗癌等多种作用。CLAEE、CLAG、CLAPE 均具有抗氧化作用,且抗氧化效果较 CLA 强。共轭亚油酸左旋肉碱酯、CLAG 均具有减肥功能,且 CLAG 比 CLA 更易被淋巴细胞吸收,1% 的 CLAG 能显著减少小鼠体内血清甘油三酯含量,

并抑制高脂血症的发生^[31]。赵树法^[32]以小鼠为模型比较了游离 CLA 与 CLAG 在降血脂及减肥活性上的差异,结果显示两者均具减肥功能,减肥效果无显著差异,但 CLAG 在降低血脂、血糖方面优于 CLA,CLAG 对血糖、瘦素、TNF-肿瘤坏死因子、胰岛素均有降低作用,而 CLA 仅能降低瘦素、TNF-肿瘤坏死因子,对血糖有增高作用。CLAG、CLA 对肝脏甘油三酯、总胆固醇均有降低作用,两者效果无显著差异。体外实验证明,CLAPE 可以通过抑制胆固醇在小肠内的吸收,从而有效降低胆固醇含量^[33]。CLAG、CLAPE 均具有抗癌功能^[34-35],许浮萍^[34]证明了 CLAG (CLA 含量 47%) 对人体前列腺淋巴结癌细胞 LNCaP 的增殖有抑制作用,且 CLAG 与 CLA 标样 (CLA 含量 80%) 具有同等的抗癌功能。共轭亚油酸冰片酯具有抗肿瘤的作用,对人肝癌细胞 HepG2 的增殖抑制作用强于 CLA^[19]。鉴于 CLA 酯类衍生物的上述生理功效,可将其作为药品或药品辅料应用于医药行业中。

5.2 在食品行业中的应用

CLA 酯类衍生物可作为营养强化剂或抗氧化剂应用于食品行业中。CLAG、CLAPE 均已被我国卫生部批准为脂类新资源食品,可直接食用或添加至乳制品、饮料、烘焙食品、食用油等产品中。如将 CLAG 作为膳食补充剂直接添加到乳制品(尤其是液态制品)中,得到具有优良口感的功能性乳制品^[36];利用 CLAPE 的抗氧化性制备富含复配型天然抗氧化剂的玉米油,可延长玉米油的货架期^[37]。

5.3 在化妆品行业中的应用

CLAEE 能够美白皮肤、防止皮肤细胞脂质过氧化及紫外线引起的自由基损伤,可作为功能化妆品的助剂使用。CLAEE 是一种高效低毒的抗氧化剂,抗氧化性较 CLA 强,细胞毒性较 CLA 弱,两者的乳膏体外透皮吸收实验证明,CLA 的摄取量在 3 h 内几乎达到饱和,而 CLAEE 的摄取量在 24 h 内持续增加,且摄取量远大于 CLA^[38]。共轭亚油酸维生素 C 酯能清除自由基、抗氧化、消炎、减少紫外线对皮肤的损伤、平滑皱纹,可用于制作洗面奶、洗涤剂、口红、保湿霜、防晒霜等多种日用护肤品和化妆品^[39]。

另外,CLA 酯类衍生物还可以用于动物饲料添加剂,促进动物生长,预防动物疾病,提高动物产品的品质。

6 结束语

CLA 酯类衍生物因具有众多的生理功能,且稳定性和口感较 CLA 好,已受到研究者的广泛关注。目前已有部分 CLA 酯类衍生物投入生产,但工业生

产方法主要是化学合成法,其对设备要求高、产物难分离,且生产有“三废”排放。酶法合成 CLA 酯类衍生物反应条件温和、特异性强、无污染废弃物,是未来极具前景的生产方法,后续需提高酶的热稳定性及使用率,降低生产成本,加速酶法生产 CLA 酯类衍生物的工业化。CLA 酯类衍生物的分选检测需要根据样品量、纯度要求、经济成本等选择最合适的方法,结合工业生产实际条件,对于纯度要求较高的产品,建议选择两种或多种分离纯化方法组合。另外,模拟移动床色谱系统上样量大,可以连续操作,产物纯化率高,应加大研究力度,推动其在工业生产中的应用。CLA 酯类衍生物虽已广泛应用于食品、化妆品、医药和饲料行业,但如何进一步提高其稳定性,延长其货架期还值得深入研究,以提升 CLA 酯类衍生物的应用价值和经济价值。

参考文献:

- [1] DEN HARTIGH L J. Conjugated linoleic acid effects on cancer, obesity, and atherosclerosis: a review of pre-clinical and human trials with current perspectives [J/OL]. *Nutrients*, 2019, 11(2):370 [2020-06-03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30754681>.
- [2] NIEZGODA N, GLISZCZYŃSKA A, KEMPIŃSKA K, et al. Synthesis and evaluation of cytotoxic activity of conjugated linoleic acid derivatives (esters, alcohols and their acetates) towards cancer cell lines [J/OL]. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2017, 119(10):1600470 [2020-06-03]. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201600470>.
- [3] 毕艳兰, 张飞鸿, 徐广维, 等. 乙醇钾催化红花籽油乙酯制备共轭亚油酸乙酯及其产品结构表征[J]. *食品科学*, 2020, 41(8): 262-269.
- [4] YU W H, TONG D S, FANG M, et al. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on MSU-H type mesoporous silica for selective esterification of conjugated linoleic acid isomers with ethanol[J]. *J Mol Catal B - Enzym*, 2015, 111:43-50.
- [5] YU W H, ZHAO H B, TONG D S, et al. Immobilization of lipase onto aminopropyl-functionalized MSU-H type mesoporous silica and esterification[J]. *Korean J Chem Eng*, 2015, 32(8):1694-1700.
- [6] 王雪, 李万振, 宋鹏, 等. 亚临界水状态下制备共轭亚油酸甘油酯[J]. *食品科学*, 2013, 34(8):12-15.
- [7] 大连医诺生物股份有限公司. 一种高含量共轭亚油酸甘油三酯及其制备方法: CN110857270 A [P]. 2020-03-03.
- [8] 黄楚楚, 熊辉煌, 龚斌, 等. 脂肪酶催化单油酸甘油酯制备功能性 1,3-甘油二酯[J]. *食品科学*, 2015, 36(22): 1-5.
- [9] LIAN W S, LI D M, ZHANG L, et al. Synthesis of conjugated linoleic acid-rich triacylglycerols by immobilized mutant lipase with excellent capability and recyclability [J]. *Enzyme Microb Tech*, 2018, 117:56-63.
- [10] 董涛. 植物甾醇酯的化学合成及其抗氧化性研究[D]. 江苏 无锡: 江南大学, 2008.
- [11] 李春荣, 王三永, 谢志桥. 植物甾醇共轭亚油酸的制备及其血脂调节作用的研究[J]. *中国食品添加剂*, 2007(3):69-72.
- [12] LI R, JIA C S, YUE L, et al. Lipase-catalyzed synthesis of conjugated linoleyl β -sitosterol and its cholesterol-lowering properties in mice [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(3):1898-1902.
- [13] 汤桂云, 郑玄, 陈竞男. 脂肪酶催化合成大豆甾醇共轭亚油酸酯的工艺研究[J]. *河南工业大学学报(自然科学版)*, 2020, 41(2):72-77.
- [14] JAFARI M, KADIVAR M, GOLI S A H, et al. Optimization of lipase-catalyzed fractionation of two conjugated linoleic acid (CLA) isomers[J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2014, 91(4):571-578.
- [15] GIUA L, COSSIGNANI L, SIMONETTI M S, et al. *Candida rugosa* lipase selectivity toward *trans*, *cis*- and *cis*, *trans*-conjugated linoleic acid isomers[J]. *Eur Food Res Technol*, 2012, 235(1):53-59.
- [16] YANG Z, SCHULTZ L, GUO Z, et al. System development from organic solvents to ionic liquids for synthesizing ascorbyl esters with conjugated linoleic acids[J]. *Open Biotechnol J*, 2012, 6:5-12.
- [17] LI Z, YANG D, JIANG L, et al. Lipase-catalyzed esterification of conjugated linoleic acid with *L*-carnitine in solvent-free system and acetonitrile [J]. *Bioproc Biosyst Eng*, 2007, 30(5):331-336.
- [18] 杨国龙. 共轭亚油酸蔗糖酯的合成[D]. 郑州: 郑州工程学院, 2002.
- [19] 王羽伦. 共轭亚油酸冰片酯的合成、分离、纯化及抗肿瘤活性研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2010.
- [20] 许鹏. 超临界 CO₂ 萃取共轭亚油酸酯类及其相平衡研究[D]. 武汉: 武汉工程大学, 2009.
- [21] 许鹏, 陈颖婧, 左兰娇, 等. 超临界 CO₂ 萃取共轭亚油酸甘油酯的研究[J]. *化学与生物工程*, 2008(4):36-38.
- [22] CAO Y, WANG W F, XU Y, et al. Enzymatic synthesis of extremely pure triacylglycerols enriched in conjugated linoleic acids[J]. *Molecules*, 2013, 18:9704-9716.
- [23] 孙慧娟. 共轭亚油酸植物甾醇酯的合成及氧化稳定性的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2014.
- [24] 刘珍珠. 共轭亚油酸甘油酯检测技术标准研究[D]. 山东 青岛: 青岛大学, 2017.
- [25] 自然资源部第一海洋研究所. 一种利用模拟移动床制备高纯度共轭亚油酸酯的方法: CN110256250 A [P].

- 2019-09-20.
- [26] 惠菊. 共轭亚油酸甘油酯的酶法制备及其降脂功能的研究[D]. 江苏 无锡:江南大学,2009.
- [27] 刘珍珠,张辉珍,孙云飞,等. 高效液相色谱法测定共轭亚油酸甘油酯[J]. 理化检验(化学分册),2017,53(12):1447-1449.
- [28] 刘美玉,任发政. 共轭亚油酸酯类的氧化稳定性研究[J]. 食品科学,2006(3):37-40.
- [29] 罗文静. 共轭亚油酸抗疲劳药理活性及其产品质量评价[D]. 广州:中山大学,2009.
- [30] 刘明. 共轭亚油酸甘油酯的储存及应用稳定性研究[D]. 长春:吉林大学,2014.
- [31] WOO H, CHUNG M Y, KIM J, et al. Conjugated linoleic triacylglycerols exhibit superior lymphatic absorption than free conjugate linoleic acids and have antiobesity properties[J]. J Med Food, 2016,19(5): 1-9.
- [32] 赵树法. CLA 混合物、异构体活性及 FFA 型与 TG 型 CLA 活性的差异比较研究[D]. 山东 青岛:中国海洋大学, 2009.
- [33] MORAN - VALERO M I, MARTIN D, TORRELO G, et al. Phytosterols esterified with conjugated linoleic acid. In vitro intestinal digestion and interaction on cholesterol bioaccessibility[J]. J Agric Food Chem, 2012, 60(45): 11323 - 11330.
- [34] 许浮萍. 驴油性质及酶法定向酯交换制备功能性油脂的研究[D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学,2014.
- [35] 田莉莉,王际辉,叶淑红,等. 植物甾醇-共轭亚油酸酯对结肠癌细胞增殖的抑制作用[J]. 大连工业大学学报,2012,31(2):88-90.
- [36] 内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司. 一种含有共轭亚油酸甘油酯的乳制品及其制备方法:CN110786382 A [P]. 2020-02-14.
- [37] 东北农业大学. 一种制备富含复配型天然抗氧化剂玉米油的方法:CN107418738 A [P]. 2017-12-01.
- [38] 李珍. 共轭亚油酸及其衍生物皮肤药理与制剂设计[D]. 广州:中山大学,2005.
- [39] MILLIS J R . CLA esters and uses thereof:US6136985 [P].2000-10-24.

讣告

雷金丰同志于2020年8月12日下午在西安病逝,享年80岁。

雷金丰同志1940年8月出生于陕西省大荔县朝邑镇,1960年9月—1965年7月,在西北大学物理系光学专业学习,并获得学士学位;1965年7月,分配至粮食部西安油脂设备研究所工作,先后从事油料油脂理化实验、实验仪器采购、科技情报研究、科研管理、行政管理等工作;1985年10月,参与筹备创办“中国粮油学会油脂专业学会”,并担任中国粮油学会油脂专业学会办公室主任;1985—1990年,任国内贸易部西安油脂科学研究所情报室主任,负责《中国油脂》杂志的编辑、出版工作;1990年4月,任商业部西安生漆研究所党委书记、常务副所长(法定代表人、主持工作);1996年10月,调回国内贸易部西安油脂科学研究设计院,从事中国粮油学会油脂专业学会技术咨询和技术培训等工作;2000年8月,正式退休。

中国粮油学会首席专家、中国粮油学会油脂分会名誉会长王瑞元同志评价:“他一生勤奋忠诚,为我国油脂工业和油脂科技的发展,为油脂分会的发展作出了贡献!”

《中国油脂》杂志社

2020-08-13