

## 高效液相色谱法分离纯化微生物油脂中的花生四烯酸

袁成凌, 张 鉴, 王相勤, 余增亮

(中国科学院离子束生物工程学重点实验室, 安徽 合肥 230031)

**摘要**: 为满足花生四烯酸样品制备的需要, 将微生物油脂中制得的脂肪酸先经尿素包合(脲包法)和甲酯化后, 再利用反相高效液相色谱法分离纯化其中的花生四烯酸。在  $C_{18}$  反相柱上, 以甲醇-水(体积比为 95:5)为流动相, 采用示差折光检测器检测, 流速为 5 mL/min 时, 目标产物的分离度较佳。用气相色谱/质谱法(GC/MS)进行分析的结果表明, 花生四烯酸甲酯在纯化后的样品中的质量分数由 38% 提高到 99% 以上, 基本达到标准物质的质量要求。

**关键词**: 反相高效液相色谱法; 气相色谱/质谱法; 脲包法; 花生四烯酸; 纯化

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-871X(2003)01-0060-03

## Isolation and Purification of Arachidonic Acid in Microbial Lipids by High Performance Liquid Chromatography

YUAN Chengling, ZHANG Jian, WANG Xiangqin, YU Zengliang

(Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering, The Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China)

**Abstract**: A simple isolation and purification method for arachidonic acid (5, 8, 11, 14-eicosatetraenoic acid, AA) from microbial lipids is presented. At first, AA was concentrated by urea inclusion reaction from mixed fatty acids made from microbial lipids, and then esterified with  $BF_3$ -methanol. AA was successfully isolated and purified with reversed-phase high performance liquid chromatography on a  $\mu$ -Bondapak<sup>TM</sup>  $C_{18}$  preparative column (30 mm i.d.  $\times$  300 mm, 15  $\mu$ m), using methanol-water (95:5 in volume ratio) as the mobile phase at a flow rate of 5 mL/min and detected by a 410 Waters differential refractometer. After urea inclusion reaction the sample was refined and the content of AA was greatly increased. Finally, the purity of AA reached 99% from the initial content of 38%. The analysis was carried out by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS).

**Key words**: reversed-phase high performance liquid chromatography; gas chromatography-mass spectrometry; urea inclusion; arachidonic acid; purification

花生四烯酸(arachidonic acid, 简称 AA,  $C_{20}$ :4), 即 5, 8, 11, 14-eicosatetraenoic acid, 是一种重要的人体必需多不饱和脂肪酸(PUFAs)。它对调节血液中的类脂物质及抗血栓、减少胆固醇、抗动脉粥样硬化等有显著效果, 还可预防和治疗高血压、糖尿病、肥胖症等疾病。由于 AA 具有活跃而广泛的生物活性, 其应用前景十分看好, 而且它的纯度越高, 价值就越大, 故目前 AA 产品的研究向微生物油脂和高纯度 AA 制剂两个方向发展。前者用于生产营养强化剂和医疗保健品, 后者则用于药理研究和作为原料用于制药。

富集高碳数的多不饱和脂肪酸的方法很多, 如传统的有机溶剂法、金属盐形成法、高效液相色谱法、分子真空蒸馏法、超临界萃取法、柱色谱法、尿素

包合法(脲包法)、脂肪酶法等<sup>[1, 2]</sup>。每种方法都有其优缺点。采用单一的方法都不能得到高浓度、较纯净的 AA, 但是有些方法具有互补性。在实际工作中, 为了获得高纯度的某种多不饱和脂肪酸, 常常是在考虑成本的基础上取长补短, 利用各种方法的优点, 将多种方法有机地结合起来使用。如将分子真空蒸馏法和高效液相色谱法分别与脲包法结合起来<sup>[3, 4]</sup> 或将超临界萃取技术与银离子(交换)树脂色谱技术结合起来使用<sup>[5]</sup>, 这样可大大提高产品的纯度。

本实验将脲包法与反相高效液相色谱法(RP-HPLC)结合起来, 用于富集微生物油脂中的花生四烯酸。脲包法分离混合脂肪酸, 主要基于脂肪酸的不饱和程度和碳链长度不同的特点<sup>[6]</sup>; 而高效液相

收稿日期: 2002-03-30

作者简介: 袁成凌, 女, 1973年生, 博士研究生, 主要研究方向为生物工程与生物化学, E-mail: clyuan@hotmail.com.

基金项目: 国家“九五”、“十五”重点科技攻关项目(项目编号: 96-538-01, 2001BA302B).

色谱是一种纯化、精制高含量 PUFAs 产品的有效方法,它是采用反相分配色谱柱,利用 PUFAs 与饱和脂肪酸、低不饱和脂肪酸的极性不同导致两相间分配系数的差异来分离的<sup>[5]</sup>。以这两种方法结合分离纯化花生四烯酸还未见报道。本研究取得了满意的结果。

## 1 实验部分

### 1.1 主要仪器与试剂

高效液相色谱仪:Waters LC4000, Rheodyne3725 型进样器,10 mL 进样环,制备柱: $\mu$ -Bondapak<sup>TM</sup> C<sub>18</sub> 色谱柱(30 mm i.d. × 300 mm, 15  $\mu$ m); 色谱工作站:MILLINUIM 32(3.05.01 版);检测器:410 示差折光检测器,灵敏度为 4,柱后分流比为 50:1;BSZ-160 型自动收集器(上海青浦沪西仪器厂);Auto-System XL 气相色谱仪及 Tuto-Mass Spectrograph 质谱仪(美国 Perkin-Elmer 公司)。毛细管色谱柱为 SE-54 型(30 m × 0.25 mm i.d., 0.25  $\mu$ m)(美国 SUPLECO 公司);Wiley 数据谱库;SHB-III 循环水式多用真空泵;RE52CS 旋转蒸发器。

微生物油脂由武汉烯王生物工程有限公司提供,其中  $\omega$ (AA)为 38.29%;花生四烯酸甲酯(GC 99%, Sigma 公司),试剂均为色谱纯或分析纯。

### 1.2 色谱条件

#### 1.2.1 毛细管气相色谱/质谱(GC/MS)检测

色谱分析条件:SE-54 型交联石英毛细管柱,程序升温:80  $^{\circ}\text{C} \xrightarrow{5^{\circ}\text{C}/\text{min}} 250^{\circ}\text{C}$ (10 min),进样量 1.0  $\mu\text{L}$ ,氦气作载气,柱头压力 100 kPa,分流比 30:1,接口温度 250  $^{\circ}\text{C}$ ,进样室温度 250  $^{\circ}\text{C}$ 。

质谱检测条件:电子轰击离子源(EI),70 eV,质谱定性采用扫描方式,扫描范围: $m/z$  45~350。定量分析采用面积归一化法。

#### 1.2.2 制备型 RP-HPLC 纯化 AA

制备色谱柱: $\mu$ -Bondapak<sup>TM</sup> C<sub>18</sub>,流动相:甲醇-水(体积比为 95:5),流速:5 mL/min;柱温:25  $^{\circ}\text{C}$ ;进样量 2 mL;自动收集器步速:1 格/min;检测器:410 示差折光检测器。

### 1.3 实验方法

在微生物油脂中,由于花生四烯酸是与其他脂肪酸一起结合在甘油分子上,所以不同甘油三酯的性质差异不是很大,不可能得到高纯度 AA 的产品。因此一般需要先先将脂肪酸从甘油三酯中解离下来,然后再采用适当的分离方法富集得到高浓度的 AA。本实验采用的方法是:将 AA 油脂先用碱皂化,然后中和,得到含有目的长链不饱和脂肪酸化合

物的混合物,再对该化合物进行尿素包合处理,把产物浓缩,然后对其进行低级烷基酯化处理,得到不饱和脂肪酸酯的混合物,最后对其进行液相色谱分离。具体操作如下。

#### 1.3.1 尿素包合法浓缩 AA

微生物油脂中加入 3.7%(质量分数)NaOH 乙醇溶液,置于标准磨口圆底烧瓶中,在 80  $^{\circ}\text{C}$  水浴中回流皂化 1 h。加适量水使皂化物完全溶解,酸化至 pH 2~3,加乙醚-石油醚(体积比为 1:1)混合溶液萃取,水洗有机相至中性,在旋转蒸发仪上减压蒸出溶剂,得混合脂肪酸。尿素溶于无水甲醇后,加入混合脂肪酸( $m$ (脂肪酸): $m$ (尿素): $m$ (甲醇)=1:2:8)搅拌均匀。热回流 40 min,室温冷却,于 -15  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中放置过夜。次日减压过滤,滤液中加入适量水,酸化至 pH 2~3,再加入适量乙醚-石油醚(体积比为 1:1)混合液,充分萃取,分离有机相,水洗至中性,蒸干溶剂,得富集后的多不饱和脂肪酸。采用气相色谱法检测浓缩物中花生四烯酸的质量分数。

#### 1.3.2 混合脂肪酸甲酯的制备

采用 BF<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH 法<sup>[7]</sup>对脲包法得到的多不饱和脂肪酸进行甲酯化。

#### 1.3.3 高效液相色谱法分离 AA

取经前处理得到的混合脂肪酸甲酯,用适量无水甲醇溶解后,再用 0.2  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤。每次进样 2 mL,按时间分段收集,合并制备柱后流出液,在 60  $^{\circ}\text{C}$  下减压回收近干,得到淡黄色油状物。

#### 1.3.4 气相色谱/质谱法分析目标产物组成

对浓缩物采用气相色谱/质谱法分析,进行总离子流检测,得到总离子流色谱图。对其中每个色谱峰进行扫描,将得到的质谱图用标准质谱图对照法作出定性解释。采用归一化法计算各脂肪酸(甲酯)的含量。

#### 1.3.5 高效液相色谱外标定性法

在相同的液相色谱条件下,检测 AA 标准品的出峰保留时间,定性分析样品中的相关产物。

## 2 结果与讨论

### 2.1 尿素包合法富集结果

经尿素包合法富集后,花生四烯酸甲酯在总脂肪酸甲酯中的质量分数为 78.97%。

### 2.2 RP-HPLC 分离结果

在色谱制备柱过载情况下,花生四烯酸的 RP-HPLC 分离结果见图 1。

在检测实验结果时,我们尝试采用紫外检测器和示差折光检测器两种方法对样品进行检测。结果表明,紫外检测器出峰效果不理想,不能很好地体现

分离效果,所以最终选择检测效果相对较好的示差折光检测器。

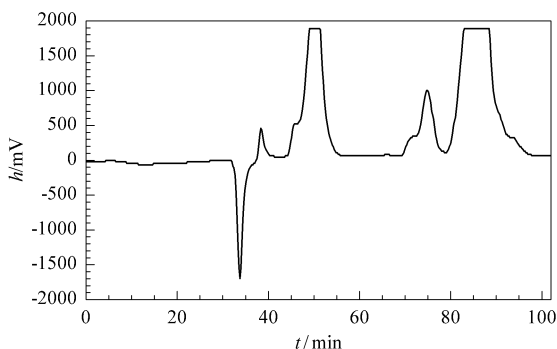


图 1 花生四烯酸甲酯的制备色谱图

Fig.1 Chromatogram of preparative RP-HPLC of methyl ester of arachidonic acid

### 2.3 GC/MS 分析结果

我们对图 1 中 40~100 min 时间段的流出样品分段合并、浓缩后,进行 GC/MS 分析。结果表明,在 83~88 min 时间段的收集物含有高纯度的花生四烯酸,其总离子流图见图 2。

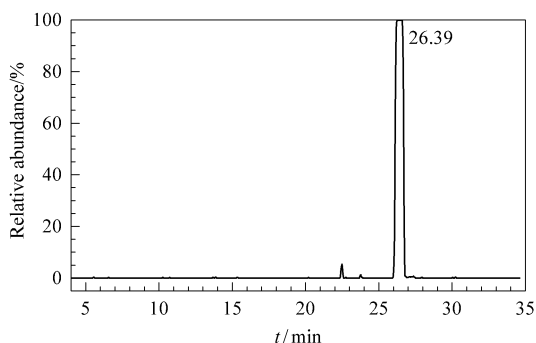


图 2 RP-HPLC 纯化所得样品的总离子流图

Fig.2 Total ion current chromatogram of sample from preparative RP-HPLC

对图 2 中各色谱峰进行扫描。图 3-a 是总离子流图中保留时间为 26.39 min 的色谱峰质谱图,图 3-b 为花生四烯酸甲酯的标准质谱图。通过二者的对比并采用外标定性方法验证,可以确定该峰即为实验研究目标产物 AA 的甲酯。按面积归一化法计算各脂肪酸(甲酯)的质量分数,AA 甲酯达到 99.5%。

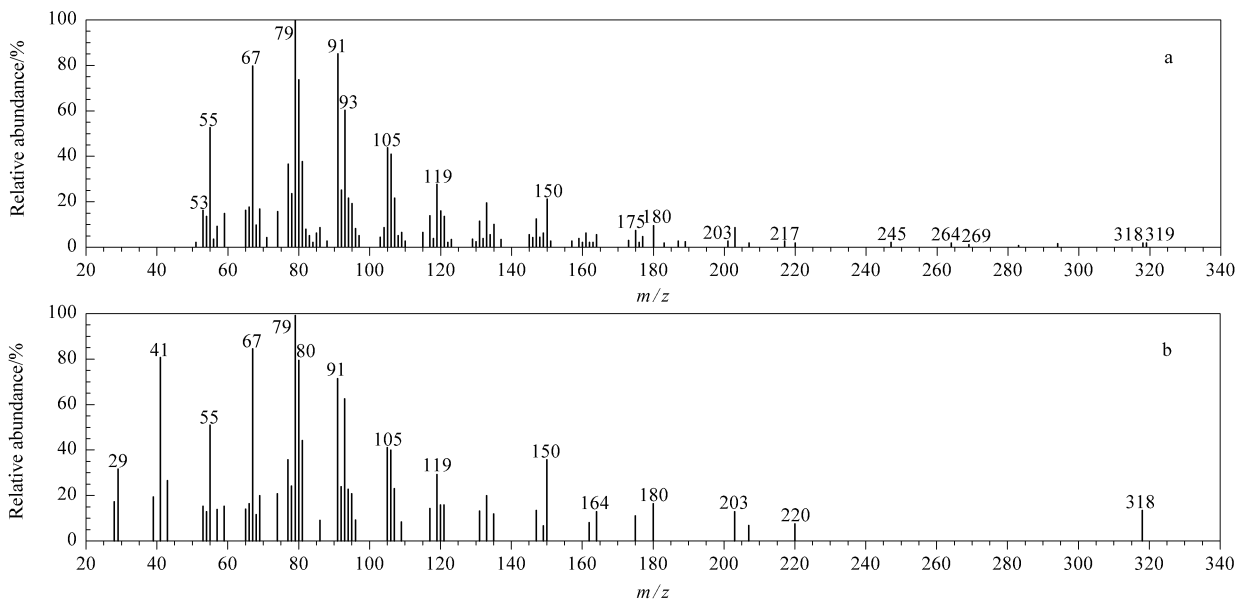


图 3 花生四烯酸甲酯的质谱图

Fig.3 The mass spectra of arachidonic acid methyl ester

a. mass spectrum of peak in Fig.2 with retention time of 26.39 min ; b. standard mass spectrum of arachidonic acid methyl ester in Wiley Library.

致谢 合肥经济技术学院的刘百战老师提供了色/质联用测试帮助,特此致谢。

### 参考文献:

[ 1 ] Zhang Xi , Cao Guofeng . China Oils and Fats , 1998 , 23( 1 ) : 60  
张 汐 , 曹国锋 . 中国油脂 , 1998 , 23( 1 ) : 60

[ 2 ] Yu Jialin , Li Li . Chinese Pharmaceutical Journal , 1990 , 25( 9 ) : 520  
俞加林 , 李 莉 . 中国药学杂志 , 1990 , 25( 9 ) : 520

[ 3 ] Rice R . Lipid Technology , 1992 , ( 1 + 2 ) : 14

[ 4 ] Medina A R . J Am Oil Chem Soc , 1995 , 72 : 575

[ 5 ] Shi Zhixian , Wang Junde . Separation and Preparation of Biomacromolecules by High Performance Liquid Chromatography . 2nd ed . Beijing : Science Press , 1996 . 12  
师治贤 , 王俊德 . 生物大分子的液相色谱分离与制备 . 第 2 版 . 北京 : 科学出版社 , 1996 . 12

[ 6 ] Weng Xinchu , Dong Xinwei , Ren Guopu . China Oils and Fats , 1994 , 19( 6 ) : 40  
翁新楚 , 董新伟 , 任国谱 . 中国油脂 , 1994 , 19( 6 ) : 40

[ 7 ] Li Jingmin , Wang Jingping . China Oils and Fats , 1994 , 19( 2 ) : 32  
李京民 , 王静萍 . 中国油脂 , 1994 , 19( 2 ) : 32