

酶法制备2-O- α -D-吡喃葡萄糖基-L-抗坏血酸的分离纯化工艺及抗氧化活性分析

张秋莹¹, 孙晶晶², 王伟², 江承程², 刘莉莉¹, 郝建华^{2*}

(1. 浙江海洋大学水产学院, 浙江舟山 316022) (2. 农业农村部极地渔业可持续利用重点实验室, 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东青岛 266071)

摘要: 该研究以 L-抗坏血酸和 β -环糊精为底物, 在海洋环糊精葡萄糖基转移酶 MY20 的催化下制备了 2-O- α -D-吡喃葡萄糖基-L-抗坏血酸 (AA-2G), 研究了其分离纯化工艺和抗氧化活性。通过使用阳离子离子交换树脂 SK1B 和阴离子离子交换树脂 WA30, 重点优化了阴离子交换树脂 WA30 分离 AA-2G 的工艺参数, 通过响应面实验确定了最佳工艺参数为: 洗脱液浓度 0.15 mol/L、洗脱液流量 3 mL/min、洗脱液 pH 值为 7, 在该条件下纯化 AA-2G 的纯度为 91.23 wt.%, 回收率 89.92 wt.%; 在此基础上, 建立了多步纯化工艺, 使 AA-2G 的纯度由最初的 50.31 wt.% 提高到了 95.62 wt.%, 纯度提高了 1.90 倍, 回收率达到 85.12 wt.%; 对制备的 AA-2G 进行体外抗氧化性分析发现, AA-2G 对超氧阴离子、羟自由基和 DPPH 自由基的清除率分别为 91.63%、90.21% 和 95.20%, 验证了酶法制备的 AA-2G 具有抗氧化活性。该研究可为高纯度 AA-2G 的开发提供理论依据。

关键词: 2-O- α -D-吡喃葡萄糖基-L-抗坏血酸; L-抗坏血酸; 分离纯化; 离子交换树脂; 海洋环糊精葡萄糖基转移酶; 氧化分析

文章编号: 1673-9078(2025)05-68-78

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.5.0373

Separation and Purification Processes of 2-O- α -D-Glucopyranosyl-L-Ascorbic Acid Prepared Enzymatically and Analysis of Its Antioxidant Activity

ZHANG Qiuying¹, SUN Jingjing², WANG Wei², JIANG Chengcheng², LIU Lili¹, HAO Jianhua^{2*}

(1. College of Fisheries, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China)

(2. Key Laboratory of Polar Fishery Sustainable Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: In the study, 2-O- α -D-glucosyl-L-ascorbic acid (AA-2G) was prepared using L-ascorbic acid and β -cyclodextrin as substrates under the catalytic action of marine cyclodextrin glucosyltransferase MY20. The separation and

引文格式:

张秋莹, 孙晶晶, 王伟, 等. 酶法制备 2-O- α -D-吡喃葡萄糖基-L-抗坏血酸的分离纯化工艺及抗氧化活性分析[J]. 现代食品科技, 2025, 41(5): 68-78.

ZHANG Qiuying, SUN Jingjing, WANG Wei, et al. Separation and purification processes of 2-O- α -D-Glucopyranosyl-L-Ascorbic acid prepared enzymatically and analysis of its antioxidant activity [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(5): 68-78.

收稿日期: 2024-03-25

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2022YFC2805101); 青岛市自然科学基金项目 (23-2-1-185-zyyd-jch); 中国水产科学研究院基本科研业务费资助项目 (2023TD71)

作者简介: 张秋莹 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 糖苷类物质的分离制备工艺研究, E-mail: 2655408832@qq.com

通讯作者: 郝建华 (1976-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 海洋产物资源与酶工程, E-mail: haojh@ysfri.ac.cn

purification process and antioxidant activity of AA-2G were examined. By using the cationic ion exchange resin SK1B and the anionic ion exchange resin WA30, the process parameters for separating AA-2G from anion exchange resin WA30 were optimized. The optimal process parameters were determined through response surface experiments: eluent concentration, 0.15 mol/L; eluent flow rate, 3.00 mL/min; eluent pH value 7. Under these conditions, the purity of AA-2G purified was 91.23 wt.%, with a recovery rate of 89.92 wt.%. On this basis, a multi-step purification process was established, in which increased the purity of AA-2G from the initial 50.31 wt.% to 95.62 wt.%, resulting in a 1.90-fold increase of purity and a recovery rate of 85.12 wt.%. *In vitro* antioxidant analysis of the prepared AA-2G revealed that the scavenging rates for superoxide anion, hydroxyl radical and DPPH radical were 91.63%, 90.21% and 95.20%, respectively, indicating that the enzymatically prepared AA-2G possessed antioxidant activities. The study provides a theoretical basis for the development of high-purity AA-2G.

Key words: 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-L-ascorbic acid; L-ascorbic acid; separation and purification; anion-cation ion exchange resin; marine cyclodextrin glucosyltransferase; oxidation analysis

L-抗坏血酸（维生素C）是一种具有良好水溶性的抗氧化物质，在食品行业中被广泛应用^[1]，也是一种电子供体，它参与许多生理生化过程，是一种必需的营养素，需要从食物和补充剂中摄取。然而，L-抗坏血酸在水溶液中稳定性低、易降解食品体系中的花色苷等天然色素等缺陷；因此L-抗坏血酸的应用受到很多限制，制备一种新的具有更高稳定性的替代品，并保留L-抗坏血酸的生物活性一直是学术界和工业界的研究热点^[2]。2-O- α -D吡喃葡萄糖基-L-抗坏血酸（AA-2G）是一种L-抗坏血酸的衍生物，具有类似的溶胶原活性。它是一种增补剂，呈无色成柱状晶体结构。AA-2G的C-2位有一个葡萄糖的掩蔽物，使其不易被氧化，因而具有良好的稳定性。AA-2G不具有直接的还原性，在人体内的各种生物酶的催化下，很容易被降解成葡萄糖和L-抗坏血酸。AA-2G在水解后产生L-抗坏血酸，具有良好的抗氧化活性。突出的热稳定性和抗氧化性，AA-2G在化妆品^[3]、医疗行业^[4]和食品^[5,6]等行业中具有重要价值。

在目前的研究中，AA-2G的合成主要依靠酶介导的生物催化作用，由于化学合成成本太高，且操作步骤不如生物转化法便捷，不适用于AA-2G的工业化生产，而酶法合成反应步骤简单、区域特异性高、生产成本低，因此，酶法生产AA-2G比化学合成更具吸引力。用于生产AA-2G的酶主要有 α -葡萄糖苷酶^[7]，环糊精葡萄糖基转移酶（CGTase）^[8]和蔗糖磷酸化酶（SPase）^[9]。其中CGTase由于其高底物特异性和转化率，是制备AA-2G最深入和最广泛研究的酶。在酶法制备AA-2G的过程中，糖基供体和L-抗坏血酸会有所剩余，需要将这些分离杂

质去除，得到纯度较高的AA-2G。目前，AA-2G的纯化方法研究尚少，主要有电渗析法和离子交换法。Hajime等^[10]使用电渗析法，依据反应液中不同物质的分子量不同的原理，使用不同截留分子量的阴离子交换膜对AA-2G和L-抗坏血酸进行分离，在分离过程中需要加热，此方法操作简单但回收率和纯度较低，不适用于高纯度的AA-2G。Gudimnichi等^[11]使用离子交换法，首先使用阴离子交换树脂，随后使用活性炭与煅烧硅藻土对AA-2G和L-抗坏血酸进行分离，最后得到纯度为98%的AA-2G；在Hiroshi等^[12]的研究中，使用阴离子树脂进行分离制备AA-2G，得到纯度为85%~99%的AA-2G。

海洋环糊精葡萄糖基转移酶MY20是一株来源于马里亚纳海沟宏基因组中的CGTase MY20的重组酶，重组CGTase拥有较好的热稳定及pH稳定性。该重组酶于10~80℃水浴放置2h后，其活性几乎不会发生改变；于pH值4~6缓冲液下放置12h后，其酶活力几乎也不会发生变化。而正是由于该重组酶稳定的酶学性质，使得该重组酶在工业生产方面将会拥有潜在的应用价值。

本文使用离子交换法对CGTase法制备的AA-2G进行分离纯化，采用单因子法和反应曲面法优选了最佳的分离纯化工艺，经过多步纯化步骤，获得高纯度的AA-2G，并研究该工艺下制备的AA-2G的体外抗氧化活性。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

材料：阳离子交换树脂SK1B（苯乙烯骨架上

带有磺酸基交换基团, 在所有 pH 范围内均可使用, 交换容量 ≥ 2.00 mmol/mL, 可耐 100~120 °C 高温)、阴离子交换树脂 WA30 (苯乙烯/二乙烯本共聚基体, 在 pH 值 0~9 内可用, 交换容量 ≥ 1.50 mmol/mL, 可耐温度 ≤ 100 °C), 北京绿百草科技发展有限公司; 氯化钠 (分析纯)、羟自由基能力检测试剂盒和 DPPH 自由基清除能力检测试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司; 超氧阴离子能力检测试剂盒, 北京艾普希隆生物科技有限公司; L-抗坏血酸 (分析纯), 国药集团化学试剂有限公司; β -环糊精 (色谱纯), 国药集团化学试剂有限公司; 2-O- α -D 吡喃葡萄糖基-L-抗坏血酸 (分析纯), 无锡景耀生物科技有限公司; 海洋环糊精葡萄糖基转移酶 MY20: 由作者实验室自制。

仪器: DKZ-450B 型恒温水浴摇床, 上海市森信实验仪器有限公司; Unique20 型纯水仪, 瑞士捷公司; FA1035 型 SOPTOP 电子天平, 舜宇恒平仪器有限公司; AKTA explorer 10S 液相色谱蛋白纯化系统, 美国通用电气公司; IKA RV 10 控制型旋转蒸发仪, 艾卡 (广州) 仪器设备有限公司; LGJ-10D 型冷冻干燥机, 北京四环起航科技有限公司; Waters 2695 型液相色谱仪, 沃特世科技 (上海) 有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 酶法合成 AA-2G

在 15 mL 的离心管中分别添加 0.50 g 的 L-抗坏血酸和 0.50 g 的 β -环糊精, 向终质量浓度为 50 g/L 的反应溶液中添加 $\varphi=10\%$ 1 mol/L 的 NaOH 溶液, 使其 pH 值达到 4, 加入海洋环糊精葡萄糖基转移酶 MY20^[8]使溶液中最终总酶活为 25 U, 最后, 加入亚硫酸钠溶液以防止 L-抗坏血酸的氧化分解。然后使用去离子水将反应体系调至 10 mL。最后, 用锡纸密封离心管以避光, 并将其放入 40 °C 水浴摇床中反应 24 h。

1.2.2 反应液的预处理

反应结束后, 使用 10 ku 超滤离心管除酶, 离心机转速为 4 000 r/min, 10 min, 4 °C, 滤出液经阳离子交换树脂 SK1B 进行脱盐, 纯水作为缓冲液以 0.5 mL/min 进行上样, 用 EP 管接流出液。

1.2.3 阴离子树脂静态吸附解析实验

用 $\varphi=95\%$ 乙醇将该树脂浸渍 24 h, 其体积为阴、

阳离子交换树脂体积的 2 倍。然后, 重复冲洗, 直到酒精含量低于 1% 或者没有显著的酒精味, 备用。

在一个 250 mL 的锥形瓶中加入 0.50 g 处理好的树脂, 然后加入 15 mL 的反应液。将瓶放置在 120 r/min、25 °C 的摇床中震荡, 分别于 10、20、30 min、1、2 h 取样 0.50 mL, 计算吸附率; 去除树脂中的反应液 (将含有反应液的树脂放入烘箱中, 50 °C, 5 h), 然后将 30 mL 的 0.15 mol/L 的 NaCl 溶液加入锥形瓶中, 于 10、20、30 min、1、2 h 时各取出 0.50 mL, 并通过 HPLC 对其中的 AA-2G 含量进行测定, 计算解析率; 计算公式如式 (1)、(2) 所示。

$$I_1 = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100\% \quad (1)$$

$$I_2 = \frac{C_2 \times V_2}{(C_0 - C_1) \times V_1} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

I_1 ——树脂吸附率, wt.%;

I_2 ——树脂解析率, wt.%;

C_0 ——AA-2G 在反应液中的质量浓度, g/L;

C_1 ——经树脂充分吸附后 AA-2G 在反应液中的质量浓度, g/L;

C_2 ——AA-2G 在洗脱液中的质量浓度, g/L;

V_1 ——反应液体积, g;

V_2 ——洗脱液体积, g。

1.2.4 阴离子树脂 WA30 动态吸附单因素试验

将预处理的反应液流经阴离子交换树脂 WA30, 反应液中的 AA-2G 和 L-抗坏血酸会吸附在树脂上, 先用去离子水去除其他糖分, 再用一定浓度的 NaCl 洗脱吸附的 AA-2G 和 L-抗坏血酸。以 AA-2G 的回收率和纯度为指标对阴离子树脂 WA30 吸附条件进行单因素实验。固定阴离子树脂 100 mL 于柱中 (直径 16 mm, 长 1 000 mm), 通过改变单一条件考察反应液体积 (5、8、15、20 mL)、NaCl 浓度 (0.05、0.15、0.25、0.35 mol/L)、洗脱液流量 (0.50、1、2、3、4 mL/min)、洗脱液 pH 值 (5、6、7、8) 对 AA-2G 和 L-抗坏血酸分离效果影响^[12]。

1.2.5 响应面优化实验设计

本研究在 Box-Behnken 中心组合实验的设计原理为指导下^[13], 进行三因素三水平的响应面分析试验, 如表 1。

表 1 响应面因素水平表
Table 1 Factors and levels of independent variables for response surface design

因素	水平		
	-1	0	1
A 洗脱液 pH 值	6	7	8
B 洗脱流速/(mL/min)	2	3	4
C 洗脱浓度/(mol/L)	0.05	0.15	0.25

1.2.6 AA-2G的体外抗氧化活性评价

精密称取一定量的 AA-2G 配制成 10 mg/mL 原液，分别使用超氧阴离子、羟自由基、DPPH 自由基清除能力检测试剂盒提取液至 1、2、3、4、5 mg/mL，对比待测样品和对照溶液的清除作用，使用相同质量浓度梯度的 L-抗坏血酸作为对照。按照试剂盒说明书的步骤方法，依次加入测试试剂，测定吸光度值来测定 AA-2G 和 L-抗坏血酸对超氧阴离子、羟自由基和 DPPH 自由基的清除作用。每个质量浓度下进行 3 次重复实验，最后计算 AA-2G 和 L-抗坏血酸对各自自由基的清除率：

$$D_1 = \frac{A_1 - A_2}{A_0 - A_2} \times 100\% \quad (3)$$

$$D_2 = 1 - \frac{B_1 - B_2}{B_0} \times 100\% \quad (4)$$

$$D_3 = \frac{C_0 - (C_1 - C_2)}{C_0} \times 100\% \quad (5)$$

式中：

D_1 、 D_2 、 D_3 ——分别为超氧阴离子、羟自由基、DPPH 自由基清除率，wt.%；

A_1 、 B_1 、 C_1 ——样品为 AA-2G 的在 570 nm、536 nm、515 nm 波长下的吸光度值；

A_2 、 B_2 、 C_2 ——L-抗坏血酸的吸光度值；

A_0 、 B_0 、 C_0 ——空白对照吸光度值。

以 AA-2G 的质量浓度作为横轴，各种自由基清除速率作为纵轴，利用 Excel 及 Origin 2023 进行数据处理，计算并绘制各自由基清除率。

1.2.7 AA-2G检测方法

收集的流出液可以通过 0.22 μm 的滤膜进行过滤，然后使用 20 μL 的样品进行上样。使用 Waters 高效液相系统 (HPLC) 进行检测，色谱柱为 GL Science C18 (4.60 mm \times 250 mm)，检测器为 Waters 2695 PDA 检测器，流动相为稀磷酸 20 mmol/L，检测波长为 242 nm，流量为 0.8 mL/min，柱温为 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

用最小二乘法经线性回归，得 L-抗坏血酸回归方程为 $Y=1 \times 10^{-8}X+0.0913$ (相关系数 $R^2=0.998$) AA-2G 回归方程 $Y=2 \times 10^{-8}X$ (相关系数 $R^2=0.999$)。

1.2.8 数据处理

所有实验数据取三次重复实验使用 Origin 2023 计算平均值和作图，采用 Design-Expert 13.0 软件对实验结果进行响应面设计和作图。

2 结果与讨论

2.1 酶法合成 AA-2G

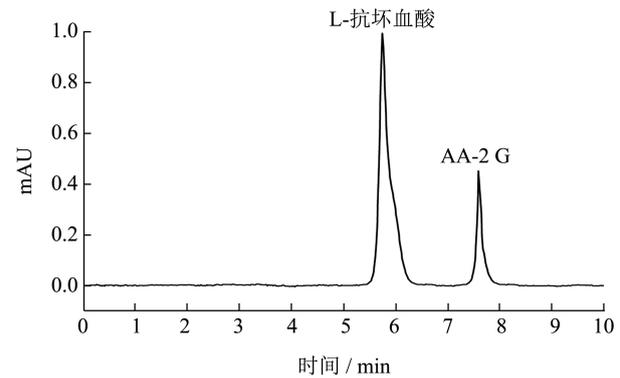


图 1 AA-2G 的合成

Fig.1 Synthesis of AA-2G

如图 1 所示，以 β -环糊精和 L-抗坏血酸为底物，海洋环糊精葡萄糖基转移酶作为底物生成 AA-2G，使用色谱柱 GL Science C18 进行检测。检测结果为 AA-2G 质量浓度 50.52 g/L，L-抗坏血酸质量浓度为 39.63 g/L。Jiang 等^[14]的研究中通过环糊精葡萄糖基转移酶合成 AA-2G，产量为 9.1 g/L；张子臣^[15]使用固定化环糊精葡萄糖基转移酶合成 AA-2G，产量为 21 g/L，是游离酶产量的 2.15 倍。在本研究中，AA-2G 的产量远高于其他研究。

2.2 反应液预处理

反应液为混合物，海洋环糊精葡萄糖基转移酶 MY20、单糖、 β -环糊精、盐、AA-2G 和 L-抗坏血酸，本文所用的环糊精葡萄糖基转移酶 MY20 为耐热酶^[16]，加热难以失去酶活，酶蛋白为大分子，因此通过超滤的方法，除去反应液中的酶。阳离子交换树脂能将反应液中的盐离子与树脂内的氢离子交换，达到脱除盐离子的目的。该工艺在硬水软化，海水淡化以及高纯水的生产中具有广泛的用途^[17]，有效去除多余的盐离子，提高水质的纯度。除酶后的反应液经过强酸性阳离子交换树脂 SK1B 纯化后，大部分盐类被除去，实验结果如图 2 所示。在一些

研究中,使用树脂除盐成为研究热点,例如张继卫等^[18]使用阴离子交换树脂对煤层气产出水除盐的研究,成功地将煤层气产出水的盐浓度降低;以丁二酸钠溶液为例,金浩等^[19]考察了3种不同类型的阳离子交换树脂对钠离子的吸附性能,筛选出对钠离子具有最佳吸附性能的阳离子交换树脂。

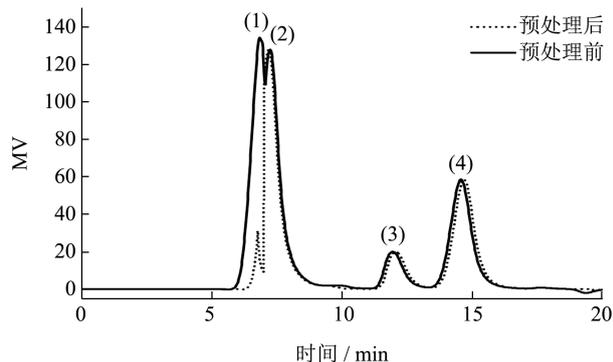


图2 反应液预处理前后色谱图

Fig.2 Chromatographic diagram before and after pretreatment of reaction solution

注: (1) 盐类; (2) α -环糊精; (3、4) 单糖。

2.3 阴离子树脂静态吸附解析

本文选用阴离子交换树脂分离 AA-2G 和 L-抗坏血酸,该树脂对 AA-2G 的静态吸附实验结果如图 3 所示,在最初的 20 min, AA-2G 的静态吸附率快速上升,在这一阶段中阴离子树脂中吸附位点的数量较多,能够对反应液中的 AA-2G 进行快速吸附,随着时间的延长,树脂的活性位点减少,且反应液中 AA-2G 浓度变低,树脂难以继续吸附,吸附率保持稳定,在 30 min 后逐渐达到平衡。因此,选择 30 min 为吸附平衡时间。

由图中解析率曲线可知, AA-2G 的静态解析率先上升后保持平稳,在最初 1 h 内,树脂中含有的 AA-2G 较多,洗脱液中 AA-2G 的浓度较小, AA-2G 容易从树脂上洗脱,所以 AA-2G 的解析率随着时间的增加而急速上升。随着时间的延长,树脂中的绝大多数 AA-2G 已被洗脱到溶剂中,树脂中剩余的 AA-2G 和溶液中的 AA-2G 达到动态平衡扩散, AA-2G 解析率保持稳定。因此,选择 1 h 为解析平衡时间。徐锋等^[20]在阴离子树脂分离橄榄苦苷的过程及性能研究中,使用 LX-68M 阴离子树脂静态吸附解析,7 h 达到吸附平衡,4 h 解析达到平衡,此树脂吸附解析时间较长,而在本研究中使用的阴离子树脂 WA30 吸附解析时间短,可以节约时间成本。

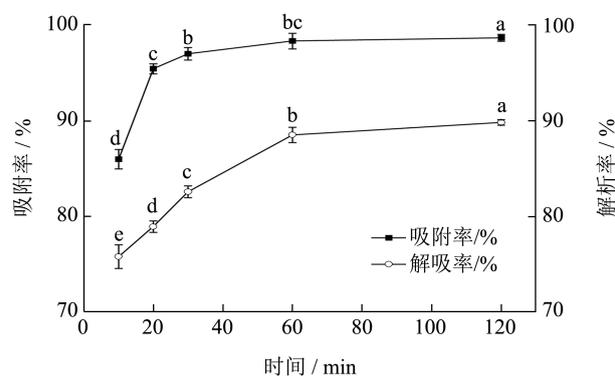


图3 AA-2G 静态吸附解吸曲线

Fig.3 Static adsorption-desorption curve of AA-2G

注: 图中字母不同代表不同时间之间差异显著 ($P < 0.05$)。

2.4 阴离子树脂 WA30 动态吸附单因素和响应面试验

经过阳离子交换树脂 SK1B 对反应液进行除盐后,反应液流经阴离子交换树脂 WA30,带有电荷的 AA-2G 和 L-抗坏血酸和树脂中的 OH^- 进行离子交换, AA-2G 和 L-抗坏血酸会被树脂吸附, OH^- 被交换到穿透液中,不带电荷的糖类会穿透流出,达到除糖目的。

2.4.1 上样体积的优化

树脂有一定的载样量,如图 4a 和 5a 所示,随着上样体积的增加,回收率前三个上样体积在 80.12 wt.% 左右。当上样体积为 20 mL 时,回收率最低,可能是上样体积过大,达到树脂的最大吸附量, AA-2G 和 L-抗坏血酸与 OH^- 的交换位点逐渐减少,反应液就会未被吸附而穿透出来,导致回收率降低。随着上样体积的增加,纯度呈现出先下降后上升再下降的趋势,纯度在 5 mL 的上样体积时最高,其次是 15 mL,考虑到工业化生产的需求,选择 15 mL 为后续实验的上样体积。

2.4.2 洗脱液 NaCl 质量浓度的优化

本文通过对洗脱液的质量浓度进行了优化,上样体积为 15 mL,如图 4b 和 5b 所示,随着盐浓度的增加, AA-2G 和 L-抗坏血酸的解析率增加, Cl^- 与 AA-2G 和 L-抗坏血酸属于竞争性洗脱,随着洗脱液浓度的升高, Cl^- 被吸附在阴离子树脂上越多, AA-2G 和 L-抗坏血酸越容易被洗脱下来,因 AA-2G 和 L-抗坏血酸带有电荷数不同, AA-2G 先被洗脱下来, L-抗坏血酸随后被洗脱。不同浓度的 NaCl 回收率都在 80.4% 左右,而纯度在洗脱液浓度 0.15 mol/L 时最高,其次是 0.50 mol/L。最终

选择 0.15 mol/L 为洗脱液浓度。在阴离子交换树脂纯化硫代葡萄糖苷的研究中, Hebert 等^[21]使用 KCl 和 NaCl 根据其溶解硫代葡萄糖苷的能力, 选择它们在静态模式下对吸附在树脂上的硫代葡萄糖苷进行解析, 研究发现 NaCl 具有较高的离子强度, 其洗脱能力优于 KCl; Hiroshi 等^[12]实验研究中, 使用 0.20~0.30 mol/L 盐酸溶液对 AA-2G 进行洗脱, 盐浓度高于本研究, 后续除盐时间较长。

2.4.3 洗脱液流速的优化

本实验通过改变洗脱液 NaCl 的流速, 对 AA-2G 反应液进行分离优化。上样体积为 15 mL, 0.15 mol/L 的 NaCl 洗脱液, 如图 4c 和 5c 所示, 随着流速增加, 回收率逐渐增加, 最大回收率达到了 84.22 wt.%。而纯度在 3 mL/min 时达到最高 82.40 wt.%。随着流速的增加, 洗脱液中 CL⁻ 与 AA-2G 和 L-抗坏血酸进行竞争性洗脱, 在图 5 中, AA-2G 首先被洗脱, L-抗坏血酸随后被洗脱。由于洗脱流速过低, 不能充分洗脱吸附在树脂内部的 AA-2G 和 L-抗坏血酸, 而当洗脱流速过大时会导致部分 AA-2G 和 L-抗坏血酸未能及时被分离而导致纯度低; 因此, 选择流量 3 mL/min 进行洗脱。Hiroshi 等^[12]使用 SV 0.50 的流量 (8.33 mL/min) 进行洗脱, 在色谱柱承受压力范围之内。

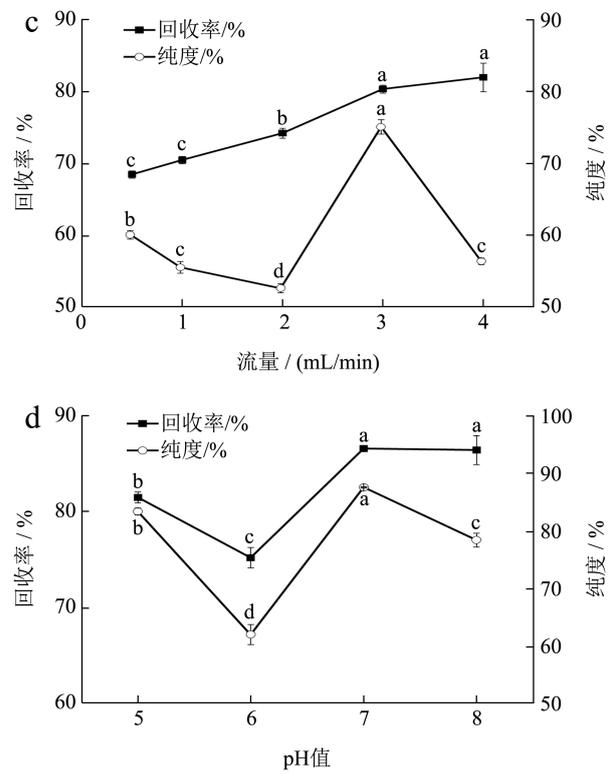
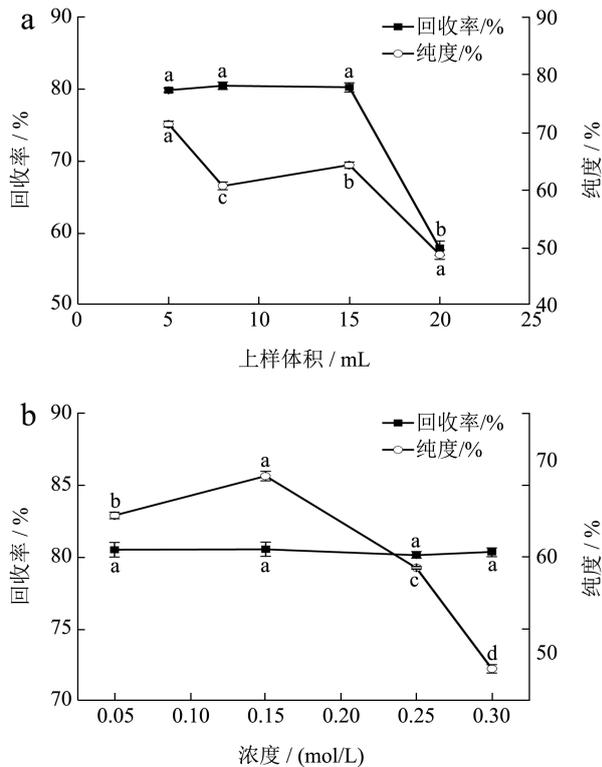


图 4 单因素试验

Fig.4 Single factor test

注: (a) 上样体积优化; (b) 洗脱液 NaCl 浓度优化; (c) 洗脱流速的优化; (d) 洗脱 pH 值的优化。图中字母不同代表不同上样时间、浓度、流量和 pH 值之间差异显著 ($P < 0.05$)。

2.4.4 洗脱液 pH 值的优化

由于 pH 值决定了化合物电离的程度并影响吸附亲和力, 因此有必要探索不同 pH 值洗脱液进行洗脱分离^[22]。上样体积为 15 mL, 0.15 mol/L NaCl 洗脱液, 洗脱流量为 3 mL/min, 选择不同的 pH 值的洗脱液进行洗脱, 考虑到实验室仪器耐酸碱程度, 我们选择了四个不同的 pH。如图 4d 和 5d 所示, pH 值为 7 的回收率达到 87.41 wt.% 左右, 而 pH 值为 5 的回收率最低, 是由于在这个 pH 下, AA-2G 和 L-抗坏血酸不容易洗脱, 从而导致回收率降低。纯度在 pH 值为 7 时最大, 达到 86.62 wt.% 左右, 最终选择洗脱液 pH 值为 7。在刘阳雪^[23]的研究中, 为探究 pH 对于树脂吸附腐殖酸过程的吸附效能的影响, 使用不同的 pH 进行吸附实验。在 pH 值为 7 时, 吸附性能最好, 当 pH 过高时, 溶液中 OH⁻ 较高, 由于树脂表面带负电荷会抑制离子交换反应的发生。

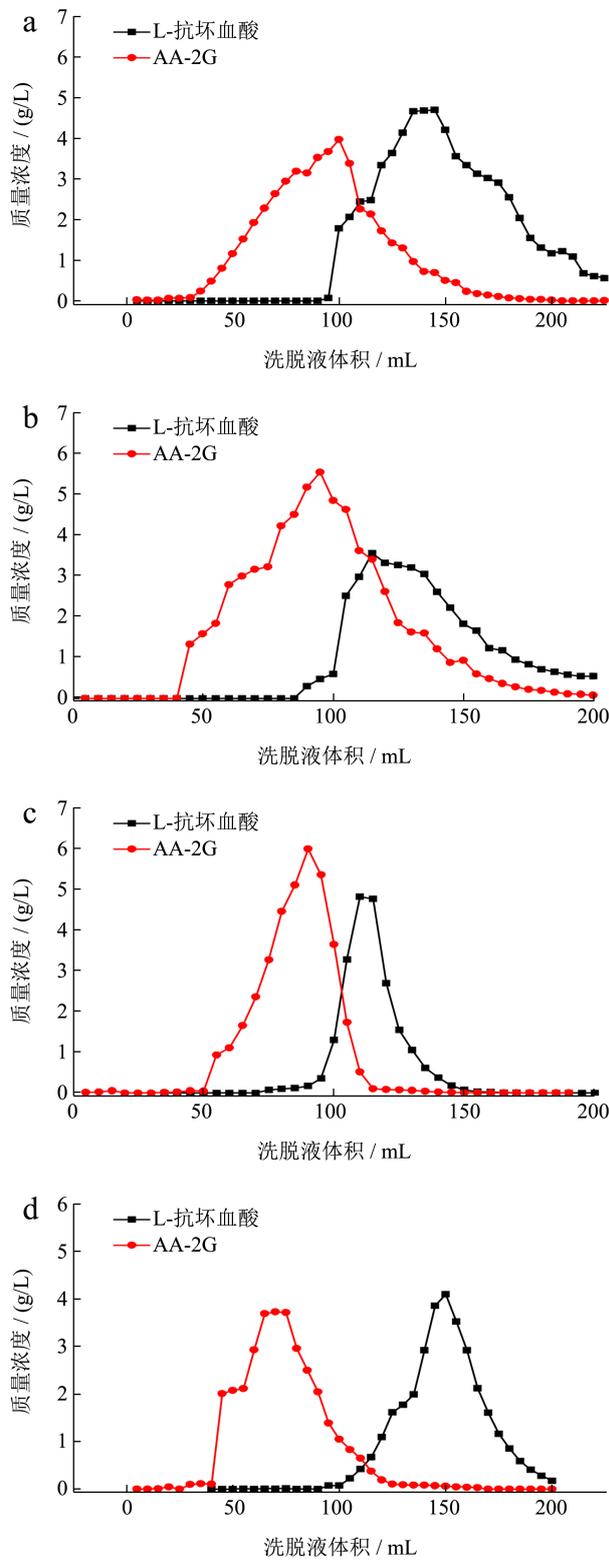


图5 最优条件分离色谱图

Fig.5 Separation chromatograms under optimal conditions

注：(a) 最优上样体积；(b) 最优洗脱液浓度；(c) 最优洗脱流量；(d) 最优洗脱 pH 值。

2.4.5 响应面结果

通过单因素实验，采用三因素三水平的响

应面进行实验设计，得到 17 个不同的试验数据。利用设计 Expert 13.0 对试验资料的二次多项回归拟合，得模型方程为：纯度 (wt.%) = 90.02 + 2.01A + 3.80B + 7.09C + 5.82AB + 4.55AC - 1.83BC - 15.41A² - 12.54B² - 10.56C²。对两种模型回归进行方差分析及显著性检验，结果如表 2 和表 3 所示。可知回归模型极显著 ($P < 0.0001$)，说明模型稳定性较高；而回归方程的失拟项 $P = 0.0782 > 0.05$ 检验结果不具有显著性差异，预测 R^2 值为 0.9966，说明该模型可靠；变异系数 $CV = 1.73$ ，表明除模式之外的其它因素对模型响应值纯度影响较小，以上各项数据都表明，此模型是可以应用于实际实验。由方差分析表可知，洗脱液浓度 (A)、洗脱液流速 (B) 和洗脱液 pH 值 (C) 三个因素对 AA-2G 的分离纯化效果具有极显著性差异 ($P < 0.01$)，根据三个因素的 F 值可知洗脱液 pH 值 (C) 对 AA-2G 的纯度影响较大，其次是洗脱液流速 (B)，最后是洗脱液浓度 (A)。

表 2 响应面实验设计与实验结果

Table 2 Experimental design and results for response surface

	A: 洗脱液浓度/(mol/L)	B: 洗脱液流量/(mL/min)	C: 洗脱液 pH 值	纯度/(wt.%)	回收率/(wt.%)
1	0.15	3	7	89.50	91.53
2	0.25	4	7	74.60	58.82
3	0.05	2	7	61.20	74.02
4	0.15	4	8	74.60	75.03
5	0.15	2	6	55.61	72.54
6	0.15	3	7	89.11	89.03
7	0.25	3	8	78.21	79.31
8	0.05	4	7	59.03	80.52
9	0.25	3	6	54.01	65.01
10	0.15	2	8	72.52	85.92
11	0.25	2	7	53.54	87.02
12	0.15	4	6	65.02	72.62
13	0.15	3	7	90.50	92.04
14	0.15	3	7	90.00	91.51
15	0.05	3	6	59.00	75.02
16	0.15	3	7	91.01	90.72
17	0.05	3	8	65.01	75.61

2.4.6 各因素响应面分析

响应面图中曲面越陡峭，等高线越密集近似于椭圆形，则说明各因素间有较强的交互作用；当等高线趋向于圆时，说明这些因素间的交互作用不显

著。如图 6a 所示,洗脱液浓度 (A) 与洗脱液流量 (B) 的等高线接近于椭圆形,说明两因素的交互作用显著,与表中 AB 的 P ($P < 0.000 1$) 值相一致。如图 6b 所示,洗脱液浓度 (A) 和洗脱液 pH 值 (C) 等高线也接近于椭圆形,说明两因素的交互作用显著,与表中的 AC 的 P ($P = 0.000 2$) 值相一致。同样的,如图 6c 所示,洗脱液流量 (B) 和洗脱液 pH 值 (C) 等高线图接近于椭圆形,说明洗脱液流速和洗脱液 pH 值的交互作用显著。由此可知,AB 交互 > AC 交互 > BC 交互。

表 3 回归模型的方差分析及显著性检验

Table 3 Variance analysis and significance test of regression model

来源	平方和	自由度	均值	F 值	P 值	显著性
Model	3 154.92	9	350.55	225.63	<0.000 1	**
A-洗脱液浓度	32.40	1	32.40	20.86	0.002 6	**
B-洗脱液流速	115.52	1	115.52	74.35	<0.000 1	**
C-洗脱液 pH	401.86	1	401.86	258.66	<0.000 1	**
AB	135.72	1	135.72	87.36	<0.000 1	**
AC	82.81	1	82.81	53.30	0.000 2	**
BC	13.32	1	13.32	8.58	0.022 1	*
A ²	999.87	1	999.87	643.56	<0.000 1	**
B ²	661.58	1	661.58	425.82	<0.000 1	**
C ²	469.53	1	469.53	302.21	<0.000 1	**
残差	10.88	7	1.55			
失拟项	8.57	3	2.86	4.95	0.078 2	
误差项	2.31	4	0.577 0			
总变异	3165.8	16				

注: * 差异显著 ($P < 0.05$); ** 差异极显著 ($P < 0.01$)。

2.4.7 最佳纯化工艺验证

利用 Design expert 13.0 软件,以 AA-2G 的纯度作为响应值,得出了最优的制备条件:洗脱液浓度 0.16 mol/L、洗脱液流量 3.15 mL/min、洗脱液 pH 值 7.37,在该条件下预测 AA-2G 纯度为 91.70 wt%。根据实际操作可行性,将工艺参数优化为洗脱液浓度 0.15 mol/L、洗脱液流量 3 mL/min、洗脱液 pH 值为 7,在此条件下重复实验三次,测得 AA-2G 纯度 91.23 wt% (误差为 0.27 wt%),回收率 89.92 wt%,与预测值差距较小,证明优化工艺具有准确性。

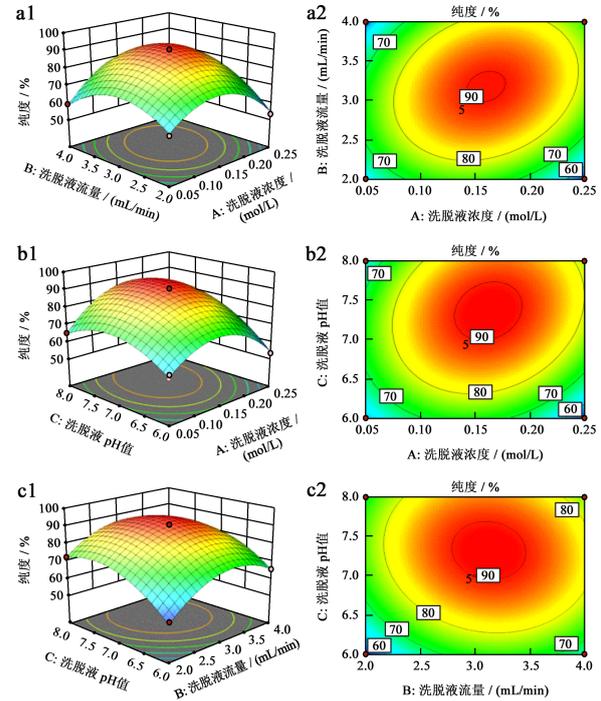


图 6 各因素交互作用对 AA-2G 纯化的响应面图和等高线图
Fig.6 Response surface and contour plots of the interaction of various factors on AA-2G purification

2.5 制备工艺研究

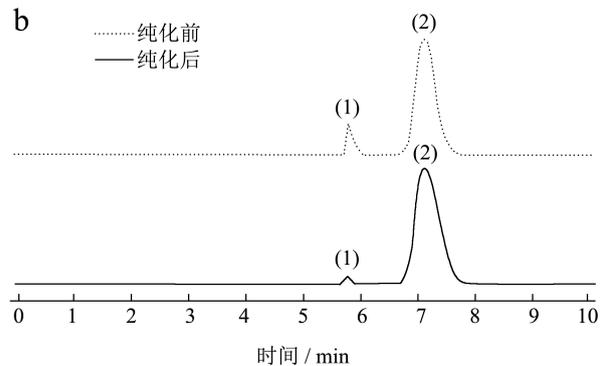


图 7 冻干粉末和纯化前后色谱图

Fig.7 Lyophilized powder and chromatogram before and after purification

注: (a) AA-2G 粉末; (b) 纯化前后色谱。(1): L-抗坏血酸; (2): AA-2G。

表 4 纯化AA-2G的方法比较

Table 4 Comparison of purification methods of AA-2G

合成 AA-2G 方法	纯化方法	洗脱液	纯度	固体制备	
酶法合成	离子交换树脂 WA30/SK1B	0.15 mol/L NaCl	95.62%	冻干	本实验
酶法合成	离子交换树脂和活性炭、硅藻土结合	0.15、0.25、0.5 mol/L NaCl 三步洗脱	98%	冻干	[11]
酶法合成	离子交换树脂 WA30/SK1B	0.25 mol/L HCl	93%	结晶罐	[12]

将收集到的分离液进行旋蒸处理发现,成品呈现出粘稠状的固体,水分没有完全除去,经过高效液相检测,结果显示 AA-2G 的回收率为 86.50 wt.%,纯度为 90.63 wt.%.为了提高 AA-2G 的品质,又尝试了冷冻干燥工艺,得到成品脱水彻底呈现出粉末状,图 7a 为分离液冻干后粉末,冻干后,AA-2G 的回收率为 85.12 wt.%,纯度为 95.62 wt.%.冻干后 AA-2G 的纯度有所提高,可能是由于 L-抗坏血酸氧化分解。如表 4 中,在 Hiroshi 等^[12]的研究中,将阴阳离子树脂纯化后的 AA-2G 浓缩至一定浓度,控制其温度和湿度,使用结晶罐对分离后的反应液进行结晶,纯度达到 99%,结晶前需加入 1% 的晶种,此方法较为复杂且成本高;在涩谷孝等^[24]的研究中,将分离过后的 AA-2G 进行浓缩,浓缩至 AA-2G 浓度的约 65%~85%,浓缩液的温度通常调节至大约 30~45 °C,将 AA-2G 达到一定纯度、温度和湿度加入到结晶罐中,结果显示,结晶度在 90% 以上与本研究接近,但本研究操作方法简便,更满足于工业化生产。

在分离纯化 AA-2G 的研究中,对酶法合成的 AA-2G 大多是用离子交换法进行纯化。在表 4 中,Hiroshi 等^[12]使用与本实验相同的方法进行纯化,纯度达到 93%,低于本研究的纯度,而洗脱液使用盐酸容易降低仪器的使用寿命,且不利于环保。Gudiminchi 等^[11]的研究中使用阴离子交换树脂的同时添加活性炭和硅藻土,存在成本高和过程复杂的缺点。

2.6 体外抗氧化试验结果

2.6.1 清除超氧阴离子自由基能力

在测定样品 1~5 mg/mL 的范围内,AA-2G 与 L-抗坏血酸的质量浓度与其清除率呈明显的正相关关系。如图 8a 所示,在这个质量浓度范围内,L-抗坏血酸对超氧阴离子自由基的清除强度高于 AA-2G,但随着质量浓度的增加,它们的清除率逐渐接近。这表明在一定质量浓度范围内,L-抗坏血酸对超氧

阴离子自由基有更好的清除效果,但随着质量浓度增加,AA-2G 的清除效果也逐渐接近 L-抗坏血酸,清除率达到 91.63%。

2.6.2 清除羟自由基能力

Fenton 反应中将 Fe^{2+} 氧化为 Fe^{3+} ,这个过程导致在 536 nm 波长处的吸光度下降^[25]。在这种情况下,样品 536 nm 波长处吸光度下降的速率抑制程度可以反映样品清除羟自由基的能力,即其抗氧化能力。因此,测定了样品在 536 nm 处的吸光度降低时,表明样品对羟基自由基的清除能力较强,表明其抗氧化性能较好。实验设计可以帮助评估样品在清除羟自由基方面的功效,从而揭示其抗氧化活性的强弱。由图 8b 可知,AA-2G 在测定的质量浓度内,随着质量浓度的升高,对羟自由基的清除率逐渐升高。在 L-抗坏血酸的对照实验中,随着质量浓度的增加,对羟自由基的清除能力也逐渐增加,最后两者的清除率逐渐接近,AA-2G 的清除率达到 90.21%。

2.6.3 清除 DPPH 自由基能力

DPPH 自由基具有一个未成对电子,因此属于单电子自由基。DPPH 自由基在乙醇中呈紫色,在 515 nm 附近有较强的吸收;在有抗氧化剂的情况下,可与 DPPH 自由基作用,从而消除 DPPH 自由基^[26]。DPPH 自由基在 515 nm 波长处的吸光度明显降低。该方法可用于评价抗氧化剂清除 DPPH 自由基的能力及抗氧化能力。以吸光度降低程度作为评价样品清除 DPPH 自由基能力的指标。如图 8c 所示,AA-2G 清除 DPPH 自由基的能力随其质量浓度的增大而增强,而 L-抗坏血酸的清除率始终保持稳定。当质量浓度为 5 mg/mL 时,两者对 DPPH 自由基的清除率都达到 95% 以上,AA-2G 的清除率达到 95.20%。在 Tai 等^[27]的研究中,探讨了 AA-2G 的 DPPH 自由基清除活性机制,首次发现了缓慢而持久的自由基清除反应。首先,对 AA-2G 和 DPPH 自由基的反应混合物进行了高效液相色谱 (HPLC)

分析,并鉴定了AA-2G自由基清除反应中的反应中间体。然后,对中间体AA-2G和L-抗坏血酸的自由基清除活性进行时间研究,确定了AA-2G与DPPH自由基的反应速率和化学计量,并提出了AA-2G对DPPH自由基的自由基清除活性的机制。

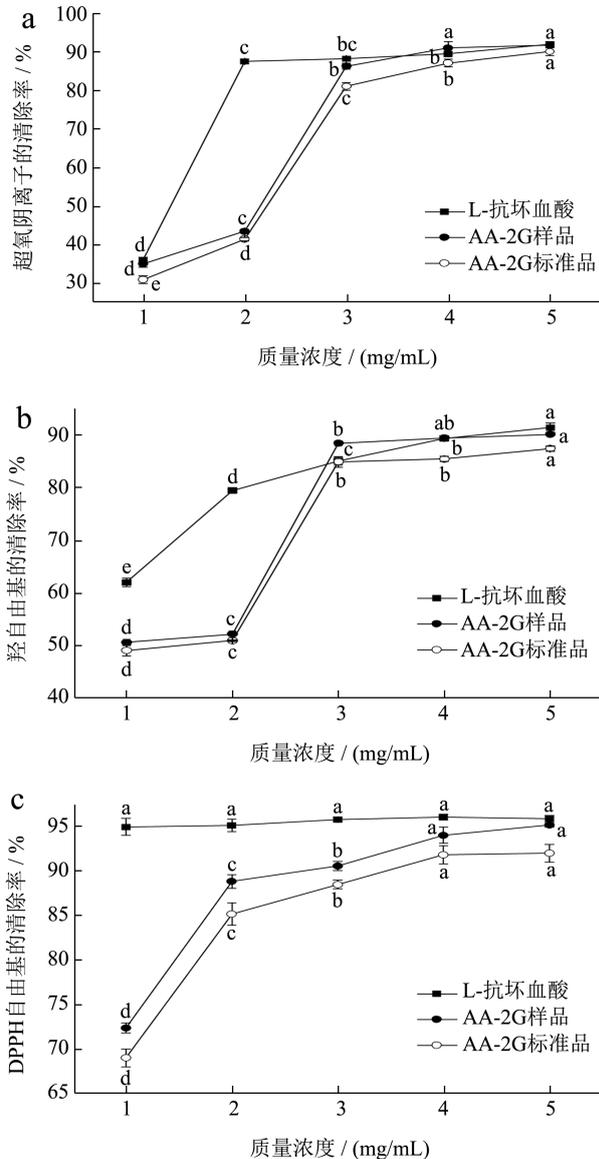


图8 自由基清除能力

Fig.8 Free radical scavenging ability

注:(a)超氧阴离子自由基清除能力图;(b)羟基自由基清除能力;(c)DPPH自由基清除能力。不同小写字母代表不同质量浓度之间差异显著($P < 0.05$)。

3 结论

通过离子交换法对酶法制备AA-2G的反应液进行了分离纯化,除去了多余的盐分、糖类以及未反应L-抗坏血酸,制备了高纯度的AA-2G。通过响应面试验对分离纯化条件进行了优化,最终确定

合适的上样体积为15 mL、洗脱液浓度0.15 mol/L、洗脱pH值7、洗脱流量3 mL/min;回收率达到了89.92 wt.%,纯度91.23 wt.%。冻干后AA-2G纯度达到95.6%,回收率85.1%,相比于最初的反应液纯度提高了1.9倍。体外抗氧化性分析表明,纯化后的AA-2G保持了较高的抗氧化活性,对超氧阴离子自由基、羟自由基和DPPH自由基清除率分别为91.61%、90.21%和95.20%。本研究的开展为海洋环糊精糖基转移酶法高效制备AA-2G提供了理论依据,为AA-2G工业化应用提供了条件。

参考文献

- [1] CHENG H J, LI L J, ZHANG M N, et al. Recent advances on *in vivo* analysis of ascorbic acid in brain functions [J]. *Trac Trends in Analytical Chemistry*, 2018, 109: 247-259.
- [2] GERARD V, AY E, GRAFF B, et al. Ascorbic acid derivatives as potential substitutes for ascorbic acid to reduce color degradation of drinks containing ascorbic acid and anthocyanins from natural extracts [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(43): 12061-12071.
- [3] MELO G S, CARDOSO R, PAIVA J C, et al. Efficient dermal delivery of ascorbic acid 2-glycoside with photoacoustic waves [J]. *International Journal of Cosmetic Science*, 2022, 44(4): 453-463.
- [4] LEE S, LIM J, LEE J H, et al. Ascorbic acid 2-glycoside stably promotes the primitiveness of embryonic and mesenchymal stem cells through ten-eleven translocation- and cAMP-responsive element-binding protein-1-dependent mechanisms [J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2020, 32(1): 35-59.
- [5] GERARD V, AY E, GRAFF B, et al. Ascorbic acid derivatives as potential substitutes for ascorbic acid to reduce color degradation of drinks containing ascorbic acid and anthocyanins from natural extracts [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(43): 12061-12071.
- [6] DONG W, PENG Y, CHEN G, et al. 2-o- β -d-glucopyranosyl-L-L-ascorbic acid, an ascorbic acid derivative isolated from the fruits of *Lycium barbarum* L, ameliorates high fructose-induced neuroinflammation in mice: involvement of gut microbiota and leaky gut [J]. *Food Science and Human Wellness*, 2024, 13(1): 241-253.
- [7] QI X, SHAO J, CHENG Y, et al. Biocatalytic synthesis of 2-o- α -d-glucopyranosyl-L-L-ascorbic acid using an extracellular expressed α -glucosidase from *Oryza sativa* [J]. *Biotechnology Journal*, 2021, 16(11): 2100199.
- [8] 宋凯.海洋环糊精葡萄糖基转移酶的表达、酶学性质及

- AA-2G制备的研究[D].上海:上海海洋大学,2022.
- [9] GUDIMINCHI R K, NIDETZKY B. Walking a fine line with sucrose phosphorylase: efficient single-step biocatalytic production of L-ascorbic acid 2-glucoside from sucrose [J]. *Chembiochem*, 2017, 18(14): 1387-1390.
- [10] AGA H, YONEYAMA M, SAKAI S. Process for preparing high alpha-glycosyl-L-ascorbic acid, and separation system for said process: Japan,07/990081 [P]. 1993-01-28.
- [11] GUDIMINCHI R K, TOWNS A, VARALWAR S, et al. Enhanced synthesis of 2-o- α -d-glucopyranosyl-L-ascorbic acid from α -cyclodextrin by a highly disproportionating CGTase [J]. *Acs Catalysis*, 2016, 6(3): 1606-1615.
- [12] HIROSHI Y, KOICHI N, TOSHIO M. Process for producing 2-o-alpha-d-glucopyranosyl-L-ascorbic acid in high content: China, EP20010305024 [P]. 2001-07-07.
- [13] 张珊,任传英,程建军,等.基于主成分和响应面分析三种改良剂对发酵玉米面条品质的影响[J].*现代食品科技*, 2024,40(1):214-223.
- [14] JIANG Y J, ZHOU J, WU R, et al. Heterologous expression of cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus macerans* in *Escherichia coli* and its application in 2-o- α -d-glucopyranosyl-L-ascorbic acid production [J]. *Bmc Biotechnology*, 2018, 18(1): 53
- [15] 张子臣.酶法转化合成2-氧- α -D-吡喃葡萄糖基抗坏血酸[D].无锡:江南大学,2010.
- [16] 郑洋.海洋环糊精葡萄糖基转移酶的分子改造及其应用的研究[D].上海:上海海洋大学,2023.
- [17] VERGILI I, GÖNDER Z B, KAYA Y, et al. Sorption of Pb (II) from battery industry wastewater using a weak acid cation exchange resin [J]. *Process Safety and Environmental Protection*, 2017, 107: 498-507.
- [18] 张继卫,范奇,李俊旗,等.阳离子交换树脂对煤层气产出水除盐的研究[J].*应用化工*,2021,50(4):874-877,882.
- [19] 金浩,占主星,李奉才,等.阳离子树脂对丁二酸钠溶液中钠离子的交换吸附性能[J].*化学工程*,2016,44(5):27-31.
- [20] 徐锋,曾小成,吴学文,等.阴离子树脂分离橄榄苦苷的过程及性能研究[J].*天然产物研究与开发*,2024,36(3):512-519,477.
- [21] HEBERT M, SERRA E, VOROBIEV E, et al. Isolation and purification of mustard glucosinolates by macroporous anion-exchange resin: process optimization and kinetics' modeling [J]. *Processes*, 2022, 10(2): 191.
- [22] IANG H, LIU Y, WANG C, et al. Decoloration and alkaloid enrichment of dactylicapnos scandens extracts based on the use of strong anion-exchange resins in tandem with strong cation-exchange silica-based materials [J]. *Journal of Chromatography B*, 2023, 1218: 123637.
- [23] 刘阳雪.大孔碱性阴离子树脂对水中天然有机物的吸附效能研究[D].哈尔滨:哈尔滨工业大学,2022.
- [24] 涩谷孝,伊泽精祐,西本友之,等.含有2-O- α -D-葡萄糖基-L-抗坏血酸无水结晶的粉末及其制造方法和用途:中国,CN201010571709.9 [P]. 2011-06-15.
- [25] 岳奕含,严铭铭,邵帅,等.葛根蛋白酶解物大孔树脂吸附工艺优化及其体外抗氧化活性研究[J].*食品与机械*, 2024,40(1):167-174.
- [26] 余远,陶飞燕,纪雪莹,等.藜麦麸皮皂苷的抗氧化活性及基于代谢组学探究其改善非酒精性脂肪肝的作用机制[J].*现代食品科技*,2023,39(12):70-77.
- [27] TAI A, IOMORI A, ITO H. Structural evidence for the DPPH radical-scavenging mechanism of 2-o- α -d-glucopyranosyl-L-ascorbic acid [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2017, 25(20): 5303-5310.