

工业药學

优化制备鱼油多烯脂肪酸的工艺

广州军区军医学校(广州市, 510315) 雷启骏 曹雅槐 吴 舜

提要 本文研究了用盐-溶解度法和尿素包含法制备鱼油多烯脂肪酸的生产工艺, 对单独应用盐-溶解度法或尿素包含法及联合应用两种方法的利弊进行了探讨。

关键词 鱼油; 多烯脂肪酸; 盐-溶解度法; 尿素包含法

鱼油中富含二十碳五烯酸(all cis 5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid, EPA,) 和二十二碳六烯酸(all cis 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid, DHA)。EPA 及 DHA 属 $n-3$ 系多烯脂肪酸(polyunsaturated fatty acids, PUFA), 具有降低血脂、抑制血小板聚集等作用⁽¹⁾。从鱼油分离 PUFA 虽有多种方法, 但适用于大规模工业制备主要是低温结晶法、盐-溶解度法和尿素包含法⁽²⁾。本文研究了盐-溶解度法和尿素包含法两种生产工艺, 并比较其利弊, 以供工业制备 PUFA 参考。

实验材料

1. 原料 鱼油由广西北海市海洋渔业鱼品加工厂提供, 由拟沙丁鱼等下杂鱼经机械半自动生产线路煮压制取。

2. 试剂 乙醇(工业用)、甲醇(工业用)、丙酮(工业用)、氢氧化钠(CP)、氢氧化钾(CP)、石油醚(CP)、盐酸(CP)、尿素(肥料用)。

3. 仪器 岛津 GC-9AM 气相色谱仪、低温冰箱、3650 Å 紫外线分析仪。

方法与结果

1. EPA 及 DHA 含量测定 采用气相

色谱法测定⁽³⁾。

2. 碘值、过氧化值测定 按食品化学植物油分析法测定⁽⁴⁾。

3. 制备 PUFA

3.1. 比较两种方法制备 PUFA

3.1.1. 盐-溶解度法

钾盐乙醇法: 取氢氧化钾25克溶于95%乙醇1200毫升, 加入鱼油100克, 置烧瓶内在氮气流下加热回流20分钟, 使完全皂化。皂化程度检查用硅胶 G 薄层层析法, 以甘油三酯斑点消失判定皂化完全⁽⁶⁾。皂化液于室温静置6~12小时, 待呈糊状时减压抽滤, 除去饱和脂肪酸钾盐结晶。滤液于-35℃静置48小时, 再抽滤, 向滤液加水300毫升, 石油醚400毫升以提取非皂化物, 振摇、静置分层, 除去石油醚层, 下层液加两倍体积水, 以2 mol/L 盐酸调 pH 1~2, 搅拌、静置后, 收集上层液得 PUFAl 48 克(表1、图1)。

钠盐-乙醇法: 以氢氧化钠代替氢氧化钾, 操作同上。得 PUFA II 33 克。

3.1.2. 尿素包含法

制备混合脂肪酸: 鱼油100克加入溶解氢氧化钾25克的95%乙醇800毫升, 充氮、加热回流20分钟, 向皂化液加20~30%水, 以石油醚萃取非皂化物, 摒弃石油醚层, 下层

液加水以盐酸酸化后分离混合脂肪酸。

尿素甲醇法 尿素 200 克加入甲醇1200 毫升，加热使溶解，在不断搅拌下加入混合脂肪酸100克，加热(60~65℃)至溶液澄清，置室温搅拌 3 小时，静置24小时，抽滤除去尿素包含物结晶。另取甲醇300 毫升加入尿素50克，搅拌(必要时稍加热)使溶解，与滤

液合并，搅拌，静置 6 小时，于 -20℃放置 24小时，抽滤，滤液每 100 毫升加水 300 毫升，2 mol/L 盐酸 70毫升，搅拌 2 小时，静置后收集上层油样液，水洗数次以无水硫酸钠干燥得 PUFA III 23克。

尿素乙醇法：以乙醇代替甲醇，操作同上，得 PUFA IV 21克。

Table 1 The purification of EPA and DHA from fish oil with urea inclusion method and salt-solubility method

product	output	iodine	peroxide	EPA	yield	DHA	yield
No	(g)	value	value	(%)	of EPA	(%)	of DHA
			(%)		(%)		(%)
fish oil	100	137	0.02	5.8		14.5	
PUFA I	48	213	0.03	9.2	76.1	27.9	92.3
PUFA II	33	255	0.03	12.5	71.1	31.0	70.6
PUFA III	23	313	0.05	18.9	74.7	55.4	87.9
PUFA IV	21	305	0.04	19.5	70.6	54.2	78.5

表 1 显示尿素包含法制备产品，其 EPA 及 DHA 含量高于盐-溶解度法产品。

醇700毫升，搅拌，室温静置后抽滤，滤液于 -35℃静置48小时，再抽滤，滤液加水加盐酸酸化后分离上层液，得 PUFA V 50克(表 2)。

钠盐丙酮法：取钾盐乙醇法制备 PUFA I 100克，与丙酮400毫升混匀，加入溶解有氢氧化钠25克的水50毫升，搅拌，再加入丙酮450毫升，搅拌15分钟，于 -35℃放置 48 小时，抽滤，滤液减压回收半量丙酮，浓缩液加水以盐酸酸化后制得 PUFA VI 44克。

3.2.2. 用尿素包含法重复纯化PUFA：取钾盐乙醇法制备 PUFA I 100克代替鱼油混合脂肪酸，按上述尿素甲醇法制得 PUFA VII 36克。

3.3. 优化钾盐乙醇法生产工艺

用正交试验考察了两个因子、每个因子两个水平对钾盐乙醇法产品的 EPA 及 DHA 含量及回收率的影响(表 3)。选用 $L_4(2^3)$ 正交表，作四次试验，每次试验再重复一次。

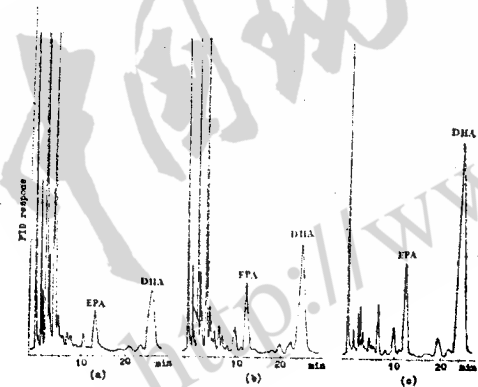


Fig. Gas chromatography of fish oil and PUFA
(a) fish oil (b) PUFA I (c) PUFA III

3.2. 比较两种方法重复纯化 PUFA

3.2.1. 用盐-溶解法重复纯化PUFA

钠盐乙醇法：取钾盐乙醇法制备 PUFA I 100克，加入溶解有氢氧化钠25克的95%乙

Table 2 Comparition of the effect of repetitive purification between salt-solubility method and urea inclusion method

product	output	iodin	peroxide	EPA	yield	DHA	yield
No	(g)	value	value	(%)	of EPA	(%)	of DHA
			(%)		(%)		(%)
PUFA I	100	213	0.03	9.2		27.9	
PUFA V	50	302	0.04	15.6	84.8	49.6	88.9
PUFA VI	44	317	0.05	16.6	79.4	58.4	92.1
PUFA VII	36	359	0.04	20.3	79.4	58.3	75.2

Table 3 Design of square cross trial

factor	level 1	level 2
A(alcohol volumes for the saponification of 100 g. of fish oil)	1200ml	1500ml
B(before the recovery of fatty acids from filtrate, the alcohol volumes recovered in a vaeuum flask)	50% alcohol	no

钾盐乙醇法操作过程如前所述, 选用 A 因子水平 1 B 因子水平 1 试验, 皂化 100 克鱼油用乙醇 1200 毫升, 经低温冷冻、抽滤所得滤液, 先减压回收 50% 乙醇, 再加水加酸分离 PUFA。选用 A 因子水平 1 B 因子水平 2 试验, 皂化时用乙醇 1200 毫升, 最终滤液不回收乙醇, 直接加水加酸分离 PUFA。试

验结果见表 4。方差分析(表 5、表 6)表明, 皂化 100 克鱼油乙醇用量在 1200~1500 毫升范围内, 对产品 EPA 及 DHA 含量及回收率的影响无显著差异($P > 0.05$); B 因子两个水平间则有非常显著差异($P < 0.01$), 最终滤液不回收乙醇, 产品的 EPA 及 DHA 含量及回收率均较高。

Table 4 Result of square cross trial with potassium salt-alcohol method.

rank No.				trial results			
Exp. No.	1	2	3	total yield of EPA and DHA (%)		total concentration of EPA and DHA (%)	
	A	B	(blank rank)	X ₁	X ₂	X ₁	X ₂
1	1	1	1	72.3	74.3	30.0	31.4
2	1	2	2	87.1	86.4	38.4	39.0
3	2	1	2	75.7	73.9	30.8	29.4
4	2	2	1	87.2	85.1	36.8	38.4

Table 5 Analysis of variance of trial result (一) (total yield of EPA and DHA)

origin of variance	I	v	MS	F	P
A	0.405	1	0.405	0.2447	>0.05
B	307.520	1	307.520	185.8127	<0.01
error	8.275	5	1.655		

Table 6 Analysis of variance of trial result (二) (total concentration of EPA and DHA)

origin of variance	I	v	MS	F	P
A	1.445	1	1.445	2.038	>0.05
B	120.125	1	120.125	169.429	<0.01
error	3.545	5	0.709		

讨 论

1. 盐-溶解度法是利用脂肪酸金属盐在一定温度下在溶剂中溶解度的差别分离脂肪酸的方法。经典的盐-溶解度法是锂盐-丙酮法,将油脂在碱性乙醇中皂化,提取总脂肪酸,再在碱性丙酮中成盐并进行分离。当时采用锂盐-丙酮法主要是用于分离植物油中饱和度和较低的脂肪酸,如油酸、亚油酸,其碱金属盐与饱和脂肪酸盐在乙醇中溶解度差别不大,故在乙醇中皂化后需更换溶剂在丙酮中进行分离。EPA 及 DHA 分子中有5~6个双键,其碱金属盐与饱和及饱和度较低的脂肪酸盐在乙醇中溶解度有明显差别,故在碱性乙醇中皂化后可直接进行分离,不必更换溶剂^(8,2),从而节约了丙酮并简化操作过程。

2. 盐-溶解度法制备 PUFA,溶剂比是一个重要问题。皂化100克鱼油,我们曾试用800毫升乙醇,随后的滤过操作较为困难。乙醇量增至1200毫升则过滤顺利。正交试验表明乙醇再增至1500毫升,并不能再增加产品 EPA 及 DHA 含量及回收率。对已制备 PUFA 粗品用盐-溶解度重复纯化时则应减少乙醇用量,使脂肪酸盐在乙醇中浓度增加,低温时有较多的饱和及饱和度较低的脂肪酸盐析出结晶。正交试验结果还表明,从滤液回收脂肪酸,不必先减压回收乙醇可直接加水加酸酸化,由于 EPA 及 DHA 为长链多烯脂肪酸故易与水性基质分离,此外, EPA 及 DHA 在回收乙醇过程中易受热破坏。

3. 脂肪酸钾盐在乙醇溶液的结晶较钠盐疏松,故易于与溶剂分离,过滤操作较易进行,故钾盐乙醇法制备产品,其 EPA 及 DHA 回收率较高⁽³⁾。饱和度不同的脂肪酸钠盐在乙醇中溶解度的差别较钾盐大,故钠盐乙醇法制备的产品,其 EPA 及 DHA 含量较高。从鱼油制备 PUFA 粗品应选用钾

盐乙醇法(乙醇用量宜较多)使操作能顺利进行;PUFA 粗品进一步纯化应选用钠盐乙醇法(乙醇用量宜减少)以提高产品中 EPA 及 DHA 含量。改进过滤方法提高钠盐乙醇法回收率值得进一步探讨。

4. 和盐-溶解度法相比较,尿素包含法制备产品 EPA 及 DHA 含量较高,达70%以上。盐-溶解度法需重复纯化方可达70%左右。尿素包含法是利用碳链长短不一、饱和度不同的脂肪酸与尿素形成包含物稳定性不同的原理来分离脂肪酸^(8,9)。其按饱和度差异分离能力强于按碳链长短差异分离能力。EPA 及 DHA 为含5~6个双键的脂肪酸很难与尿素形成包含物,滤液中残留的 EPA 及 DHA 可达到较高的浓度。盐-溶解度法和尿素包含法除去饱和度较低的脂肪酸机理不同,各有所长,盐-溶解度法除去 C₁₆~C₁₈饱和及饱和度较低的脂肪酸效果较好,尿素包含法除去 C₂₀~C₂₂ 饱和及饱和度较低的脂肪酸较为优越⁽¹⁰⁾,交替应用两种方法进行纯化,可进一步提高产品中 EPA 及 DHA 的含量。

参 考 文 献

- [1] Ackman RG: Food Rev. Internat. 1990; 6(4): 617
- [2] 王唯玮: 中国海洋药物杂志, 1989; (3): 30
- [3] 万新祥等: 中国海洋药物杂志, 1991; (4): 392
- [4] 上海商品检验局, 食品化学分析, 上海科学技术出版社, 第一版, 1979, 327~331页。
- [5] 贺艳丽等: 山东医科大学学报, 1988; 26(2): 73
- [6] JP 公开特许公报, 21641, 1984
- [7] 郭学平等: 海洋药物, 1988; (3): 4
- [8] Haagsman N, et al.: J. Amer. Oil Chem. Soc. 1982; 59(3): 117
- [9] JP 公开特许公报, 164196, 1982
- [10] Silk MH, et al.: J. Biochem. 1954; 57: 574

(下转第162页)

(上接第170页)

Improving the Technology for the Preparation of Polyunsaturated Fatty Acids from Fish Oil

Lei Qijun Chao Yahuai Wu Shun

(Military Medical School of Guangzhou Military Command)

Abstract

The preparation of polyunsaturated fatty acids from fish oil was investigated with salt-solubility method and urea inclusion method. An approach was done to the advantage and disadvantage of the urea inclusion method or salt-solubility method alone, and of these two methods together.

Key words Fish oil Polyunsaturated fatty acids Urea inclusion method Salt-solubility method