

鲳鱼肝脏鱼油的提纯及 EPA 和 DHA 的检测

郭斌¹, 彭宏伟¹, 张博²(1.辽宁医学院药学院, 辽宁 锦州 121001; 2.滕州中和医药有限公司, 山东 滕州 277500)

摘要: **目的** 研究从鲳鱼肝脏中提取、精炼、纯化鱼油的方法, 并测定其 EPA 和 DHA 含量。**方法** 采用正己烷超声提取, 磷酸脱胶, 氢氧化钠脱酸, 活性碳脱色, 旋转蒸发脱臭和脱腥, 盐析法提取总脂肪酸, 尿素乙醇包含获得高纯度的不饱和脂肪酸, 然后用 HPLC 测定 EPA 和 DHA 含量。**结果** 精炼后的鱼油为浅黄色澄清透明, 有略淡的鱼腥味, 其各项指标均达到了 SC/T3502-2000 标准的一级要求; 纯化后的鱼油质量为肝脏质量的 16.1%, 其中 EPA 和 DHA 的含量分别为 19.54%和 57.62%。**结论** 鲳鱼肝脏中提取、精炼、纯化鱼油的方法可行, 检测方法可靠。

关键词: 鲳鱼肝脏; 鱼油; EPA; DHA; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.2

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2010)07-0645-04

Purification of Ray Fish Liver Oil and Determination of EPA and DHA

GUO Bin¹, PENG Hongwei¹, ZHANG Bo²(1.Liaoning Medical College, Jinzhou 121001, China; 2.Tengzhou Zhonghe Medicine Limited Company, Tengzhou 277500, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the method of extraction, refinement and purification for fish oil from ray fish liver, and to develop a analytical method for the determination of the content of EPA and DHA. **METHODS** Highly purified

基金项目: 辽宁省教育厅 2008 年高等学校科研项目(2008393)

作者简介: 郭斌, 男, 博士, 主任药师

Tel: (0416)4140066

E-mail: jyguobin@126.com

中国现代应用药学 2010 年 7 月第 27 卷第 7 期

Chin JMAP, 2010 July, Vol.27 No.7

• 645 •

unsaturated fatty acids were purified by *N*-hexane ultrasound extraction, H₃PO₄ degumming, NaOH depickling, active carbon decolor, rotary evaporation deodorization, salt fractionation extraction total fatty acids, urea complexation. The content of EPA and DHA was detected by HPLC. **RESULTS** The results showed that refined fish oil was yellow, transparent with light traing flavour and each index reached the requirement of SC/T3502-2000. The total mass fraction of refined fish oil in liver was up to 16.1%, and the content of EPA and DHA was 19.54% and 57.62%, respectively. **CONCLUSION** This is a feasible method for extraction, refinement and purification of fish oil in the liver of the ray. The method for detection is reliability.

KEY WORDS: ray liver; fish oil; eicosapentaenoic acid; docosahexaenoic acid; HPLC

二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA)统属于 *n*-3 系列不饱和脂肪酸, 医学和营养学研究表明: EPA, DHA 具有治疗和防治心血管疾病的功效, 对糖尿病、肾病以及癌症也有较好的疗效^[1]。此外, DHA 还具有促进大脑、视网膜的形成及延缓脑衰老的作用^[2]。因其具有极高的营养保健和临床医学价值^[3], 药品、保健品中的需求量也越来越多。

国外对鲑鱼肝脏中脂质和不饱和脂肪酸的研究已有报道^[4-5], 试验证明鲑鱼肝脏中含有相当高的 *n*-3 类不饱和脂肪酸。目前, 国内关于鲑鱼肝脏中鱼油的系统研究尚未见报道。为此, 笔者系统地研究了鲑鱼肝脏中鱼油的提取、精炼、纯化方法, 并对其理化性质及 EPA 和 DHA 的含量进行了分析, 为鲑鱼鱼油的开发利用提供科学依据。

1 仪器和材料

1.1 仪器

DS-1 高速组织捣碎机(上海标本模型厂); SKQ-2200 超声波清洗器(上海生析超声仪器有限公司); 数显恒温水浴锅(金坛市科析仪器有限公司); RE-5298A 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); YJ03-043 型电动离心沉淀机(天津工农兵医疗设备厂); FL-2000 紫外检测器(浙江温岭福立分析仪器有限公司); 戴安高效液相色谱仪(P680 泵, UVD 170U 检测器, 戴安中国有限公司); YP202N 电子天平(上海精密科学仪器有限公司)。

1.2 材料

鲑鱼肝脏(辽宁省锦州海洋药业开发中心); 正己烷、氢氧化钾、30%三氟化硼乙醚、尿素等均为国产分析纯; 乙腈为色谱纯; EPA 甲酯(GC≥97%, Sigma 公司); DHA 甲酯(98%, Sigma 公司); 氮气(纯度: 99.99%, 锦州市鞍锦气体厂)。

2 方法与结果

2.1 鱼油的提取^[6]

称取一定量捣碎后的鲑鱼肝脏, 置入锥形瓶中, 加维生素 E(质量分数 0.02%), 并通入 N₂, 加

入 4 倍体积的正己烷, 置于超声波振荡器中超声 30 min, 趁热以 4 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 分离上层用旋转蒸发法除去溶剂, 得粗鱼油, 计算鱼油提取率, 结果为 45.9%。

2.2 鱼油的精炼^[7-8]

以下每步均在 N₂ 保护下进行。

2.2.1 脱胶 称取一定量粗鱼油倒入烧杯中, 在水浴中搅拌加热至 70 °C, 缓慢加入占鱼油体积 1% 的磷酸(体积分数 80%)搅拌均匀, 在 70 °C 下加热 1 min, 再以 4 500 r·min⁻¹ 离心 15 min, 吸出上层油样即为脱胶鱼油。称量鱼油重量, 计算回收率, 结果见表 1。

2.2.2 脱酸 向脱胶鱼油中加入 2%(体积分数)的 300 g·L⁻¹ 的 NaOH 溶液均匀搅拌后, 加热至 65 °C, 保温 30 min, 然后冷却至室温, 静置分层, 以 4 500 r·min⁻¹ 离心 10 min, 除去沉淀, 然后再加入占鱼油重量 10% 左右的热蒸馏水(90~95 °C), 洗去残留的皂脚, 反复 3 次。残留的水以 4 500 r·min⁻¹ 离心 10 min, 倾出上层油即为脱酸鱼油。称量鱼油重量, 计算回收率, 结果见表 1。

2.2.3 脱色 将上述处理好的鱼油在水浴中加热至 60 °C。加入占鱼油重 10% 的活性碳, 经混合均匀, 不断搅拌维持 30 min 后, 以 4 500 r·min⁻¹ 离心 10 min, 分离出油层, 即为脱色鱼油。称量鱼油重量, 计算回收率, 结果见表 1。

2.2.4 脱臭和脱腥 将鱼油放入圆底烧瓶, 利用旋转蒸发仪加热至 80 °C, 脱臭 15 min。即得脱臭鱼油。称量鱼油重量, 计算回收率, 结果见表 1。

表 1 精炼过程中鱼油的回收率

Tab 1 The recovery in refinement procedure

鱼油	回收率/%	损失率/%	色泽	外观	气味
粗鱼油	100	0	橙红色	浑浊	浓鱼腥味
脱胶鱼油	90.45	9.55	橙红色	略澄清	浓鱼腥味
脱酸鱼油	78.71	11.74	橙色	澄清	浓鱼腥味
脱色鱼油	68.19	10.52	浅黄色	澄清	鱼腥味
脱臭鱼油	67.71	0.48	浅黄色	澄清	淡鱼腥味

2.3 理化指标的测定^[9]

感官指标参照中华人民共和国水产标准 SC/T3502-2000, 酸值的测定参照 GB/T5530-1998, 碘值的测定参照 GB/T5532-1995, 过氧化值的测定参照 GB/T5538-1995, 皂化值的测定参照 GB/T5534-1995, 水分及挥发物的测定参照 GB/T5528-1995。鱼油精炼前后理化性质的变化, 结果见表 2。

表 2 鱼油精炼后理化性质的变化及与标准的比较

Tab 2 The physicochemical property of squid liver oil compared with standard

项 目	粗鱼油	精炼鱼油	一级标准	二级标准
酸价/mgKOH·g ⁻¹)	5.69	0.54	≤8	≤15
碘价/I ₂ ·100g ⁻¹)	171.58	189.97	≥120	≥120
过氧化值/mmol·kg ⁻¹)	6.97	1.23	≤6	≤10
皂化值/mgKOH·kg ⁻¹)	185.8	194.5	—	—
水分及挥发物/%	0.5	0.12	≤0.3	≤0.5

注: 参考标准为 SC/T3502-2000; 过氧化值单位 mmol·kg⁻¹ 是以 1/2(I₂) 为基本单位。

Note: Reference standards SC/T 3502-2000; 1/2(I₂) is the basic unit of the peroxide value units mmol·kg⁻¹

2.4 盐析法提取总脂肪酸

将 2.5 g KOH 溶于 95%乙醇 80 mL 中, 加入鱼油 10 g 于烧瓶内, 在氮气流下加热回流 20~90 min, 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皂化完全。皂化液于室温静置 4~12 h 减压抽滤, 除去饱和脂肪酸钾盐结晶。滤液于一定温度下静置 24 h, 再抽滤向滤液加鱼油量 3~5 倍量石油醚提取不皂化物, 振摇、静置分层, 除去石油醚层, 下层液以 4 mol·L⁻¹ 盐酸调 pH 至 1~2, 搅拌, 静置后, 收集上层液, 得粗总脂肪酸, 脱水后减压蒸馏(或通 N₂, 蒸馏)乙醇后得总脂肪酸。计算得率, 结果为 64.23%。

2.5 尿素乙醇包合

20 g 尿素加入乙醇 120 mL, 加热, 搅拌使溶解; 另取混合脂肪酸 10 g 混合, 在不断搅拌下加入尿素乙醇溶液, 于 40 °C 加热反应 20 min 至溶液澄清, 置室温持续搅拌 3 h, 于 -20 °C 静置 24 h, 抽滤以除去尿素包合物结晶。抽滤时以少量饱和尿素乙醇溶液洗包合物; 另取 10 g 尿素加入乙醇 60 mL 溶解与滤液合并, 室温搅拌进行二次包合。于 -20 °C 静置 24 h, 抽滤, 滤出的尿素包合物以

2 mol·L⁻¹ 盐酸酸化至 pH 2~3 的水中, 静置后收集上层液, 水洗, 以无水硫酸钠干燥得不饱和脂肪酸。计算得率, 结果为 80.71%。

2.6 EPA, DHA 薄层层析分析

样品的配制: 用正己烷溶解配制 20 mg·mL⁻¹; 展开剂: 石油醚-乙醚-醋酸(80:20:1); 显色剂: 碘蒸气; 采用硅胶 G 薄层板, 使用前在 105~110 °C 恒温干燥箱中活化 2 h, 毛细管点样, 置于层析缸中上行展开。晾干, 放入碘缸中显色。

2.7 检测波长的确立

以正己烷为参比, 将用正己烷稀释后的鱼油用 FL-2000 双光束紫外可见分光光度计在 190~300 nm 波长内进行扫描。结果: EPA 甲酯和 DHA 甲酯在 195 nm 和 234 nm 处有最大吸收, 在 223 nm 处有最小吸收。

2.8 EPA, DHA 的检测

2.8.1 对照品溶液的配制 精密称取 EPA 甲酯对照品, 用正己烷溶解制成 0.25 mg·mL⁻¹ 的对照品溶液。精密称取 DHA 甲酯对照品, 用正己烷溶解制成 0.5 mg·mL⁻¹ 的对照品溶液。

2.8.2 鱼油甲酯化 精密称取所得的多烯脂肪酸 60 mg 置于 10 mL 磨口离心管中, 加 3 mL 0.5 mol·L⁻¹ KOH-甲醇溶液, 混匀充 N₂。于 60 °C 水浴加热, 中间振摇 3 次, 20 min 内油滴完全消失呈透明液。室温冷却。加入三氟化硼甲醇(1:3)溶液 3 mL。混匀充 N₂, 于 60 °C 水浴加热 5 min, 室温冷却, 再加入 2 mL 饱和 NaCl 溶液, 2 mL 正己烷充分混匀。振摇 1 min。离心(4 000 r·min⁻¹)10 min 分层, 取上清液充入 N₂, 置于 4 °C 冰箱中待 HPLC 分析。

2.8.3 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水(95:5); 检测波长为 220 nm; 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 柱温为 25 °C, 进样量为 10 μL。理论板数按 EPA 甲酯、DHA 甲酯计应≥5 000。见图 1。

2.8.4 样品含量测定 分别精密吸取 EPA 甲酯、DHA 甲酯对照品溶液与供试品溶液各 10 μL, 平行进样, 按上述色谱条件测定峰面积, 外标法计算样品中 EPA 甲酯、DHA 甲酯的含量, 结果 EPA 甲酯的平均含量为 0.195 4 g·g⁻¹、DHA 甲酯的平均含量为 0.576 5 g·g⁻¹, RSD 分别为 0.82%和 0.73%。

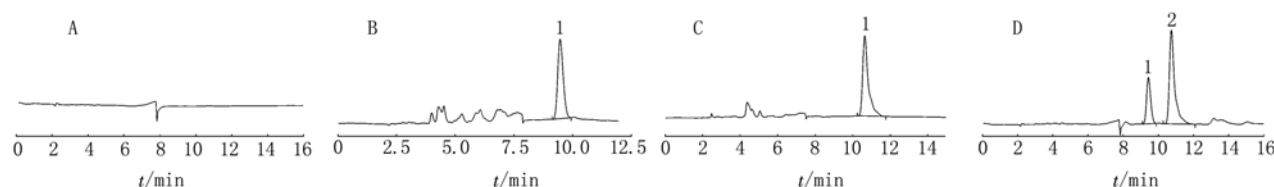


图1 高效液相色谱图

A-空白; B-EPA 甲酯对照品; C-DHA 甲酯对照品; D-供试品

Fig 1 HPLC chromatograms

A-blank; B-reference substance of EPA methyl ester; C-reference substance of DHA methyl ester; D-sample

3 讨论

本试验提取过程中加入质量分数 0.02% 的维生素 E 并充入 N_2 , 防止鱼油的不饱和脂肪酸氧化, 同时严格控制好精炼的温度、时间等条件, 与传统的淡碱水解法比较, 改善了不饱和脂肪酸的氧化程度, 取得了一定的成效。粗鱼油的理化指标均符合鱼油 SC/T3502-2000 标准的二级要求, 经过精炼后各项指标均达到了一级要求。

利用戴安高效液相色谱仪 UVD 170U 检测器在波长 210^[10], 220^[11], 223, 234 nm 处进行分离分析, 结果波长为 220 nm 时 EPA 甲酯和 DHA 甲酯的吸收峰最高, 无干扰。参照有关文献, 以甲醇-水(75:25)1%乙酸为流动相^[12], 检测波长 220 nm, 在该条件下 EPA 甲酯和 DHA 甲酯在 55 min 后出峰, 且 EPA 甲酯和 DHA 甲酯的峰形对称性太差, 无法分离。以乙腈-水(97.5:2.5)为流动相^[11], 虽然 EPA 甲酯和 DHA 甲酯对照品的出峰时间短, 但样品的分离不好, 个别样品在保留时间处有吸收峰干扰; 且基线噪音大, 样品峰无法落到基线。采用本试验方法, 样品能得到较好的分离, 提高了理论板数。该法操作简便、准确、重复性、稳定性好, 是一种可行的含量测定方法。

本试验选用鲢鱼废弃物肝脏为研究材料, 探讨其加工与利用的可行新途径, 变废为宝。结果显示, 鲢鱼肝脏中含有丰富的 EPA 和 DHA。为鲢鱼鱼油的综合开发利用提供了科学依据。

REFERENCES

[1] TAPIERO H, BA G N, COUVREUR P, et al. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies [J]. Biomed Pharmacother, 2002, 56(5): 215-222.

[2] LOMBARDO Y B, CHICCO A G. Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and human: A review [J]. J Nutr Biochem, 2006, 17(1): 1-13.

[3] SCHACKY C, HARRIS W S. Harris cardiovascular benefits of omega-3 fatty acids [J]. Cardiovasc Res, 2007, 73(2): 310-315.

[4] PAL D, BANERJEE D, PATRA T K, et al. Liver lipids and fatty acids of the sting ray *Dasyatis bleekeri* (Blyth) [J]. J Am Oil Chem Soc, 1998, 75(10): 1373-1378.

[5] KEBIR M V, BARNATHAN G, EMILE M, et al. Fatty acids in liver, muscle and gonad of three tropical rays including non-methylene-interrupted dienoic fatty acids [J]. J Am Oil Chem Soc, 2007, 84(6): 525-535.

[6] MENG L, GUO B. Puffer fish liver oil extraction and detection of EPA and DHA [J]. Liaoning J Tradit Chin Med(辽宁中医杂志), 2009, 36(3): 438-440.

[7] LIU S C, ZHANG C H, HONG P Z, et al. Refining process of tuna oil its effect on fatty acid composition [J]. J Guangdong Ocean Univ(广东海洋大学学报), 2006, 26(1): 40-44.

[8] GUO W X, HU J E, WANG X W, et al. Preparation and fatty acid compositions of squid liver oil [J]. J Dalian Fisheries Univ(大连水产学院学报), 2007, 22(1): 77-80.

[9] WANG Z H. Aquatic Products Processing Technology and Utilization(水产品加工与利用)[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2003: 256-262.

[10] HORII N, ARATO S, NARAYAN B, et al. Occurrence of conjugated cyclopropanoid acid in purified fish oil [J]. J Am Oil Chem Soc, 2007, 84(8): 749-754.

[11] YAMAMURA R, SHIMOMURA Y. Industrial high-performance liquid chromatography purification of docosahexaenoic acid ethyl ester and docosapentaenoic acid ethyl ester from single-cell oil [J]. J Am Oil Chem Soc, 1997, 74(11): 1435-1440.

[12] GONZLEZ M, ROBLES A. Adsorption equilibria of fatty acids between methanol/water and reversed-phase chromatographic adsorbents [J]. J Am Oil Chem Soc, 2001, 78(3): 277-283.

收稿日期: 2009-09-07