

从鳀鱼油中提取高不饱和脂肪酸 (EPA 和 DHA) 的研究

薛长湖 陈修白 李兆杰 王长云 林 洪

(青岛海洋大学水产学院, 266003)

提 要 分别用尿素附加法和分子蒸馏法从鳀鱼油中提取出高不饱和脂肪酸 (EPA 和 DHA)。用尿素附加法, 以相对于原料油 1:1.5、1:2、1:2.5 倍量的尿素处理而得到的产品中 EPA 和 DHA 的含量分别为 35.1%、61.0% 和 70.0%。分子蒸馏法所得到的产品中 EPA + DHA 含量达到 70.1%, 碘价达到 320。尿素附加法工艺复杂, 成本高。分子蒸馏法结合低温处理是提取浓缩 EPA + DHA 的理想方法。

关键词 鳀鱼, EPA, DHA, 尿素附加法, 分子蒸馏法

鱼油是指鱼类油脂, 所含脂肪酸种类多, 且不饱和程度高。其中, $\omega-3$ 型高不饱和脂肪酸对人类健康具有重要意义。其特征性多烯酸有二十碳五烯酸 (Eicosapentaenoic acid, EPA) 和二十二碳六烯酸 (Docosahexaenoic acid, DHA)。这类高不饱和脂肪酸具有抗血栓、抗炎症、抗癌症以及促进大脑发育、增强记忆力等功能。在国内外的临床研究中, 高不饱和脂肪酸已被用于治疗 and 预防血栓、动脉硬化、高血压、糖尿病等病患以及人体自身免疫系统的疾病^[1-4,12,13]。

80 年代以来, 欧、美、日等国许多公司已生产出多种鱼油产品^[5,6]。这些产品按其化学形式可分为三类: 第一类是用天然鱼油精制后制成的胶丸, 即甘油酯型; 第二类是鱼油经水解后制成的游离脂肪酸型; 第三类是鱼油经酯-酯交换制成的脂肪酸甲酯或乙酯, 即酯型。国外产品以第一类为最多, 占 70% 以上, 经精制而得的天然鱼油中的 EPA 和 DHA 含量不可能太高; 而高不饱和脂肪酸又特别容易被氧化, 游离态的脂肪酸产品最不稳定; 比较而言, 乙酯型是较为稳定的化学形式。脂肪酸乙酯在体内被水解成脂肪酸和乙醇^[7]。脂肪酸甲酯在体内则被水解成脂肪酸和甲醇, 而甲醇对人体有害。所以, 制造脂肪酸乙酯最为理想^[8]。

目前, 从鱼体中提取鱼油一般用蒸煮法。从鱼油中提取高不饱和脂肪酸的方法有低温冷滤法、低温分别结晶法、成盐法、尿素附加法、分子蒸馏法、超临界气体提取法、渗气法、选择性吸附法、甲酸甲酯分离法等^[9]。本文采用尿素附加法和分子蒸馏法从鳀鱼油中提取 EPA 和 DHA。

尿素附加法是通过尿素与脂肪族化合物, 特别是饱和脂肪酸及其酯形成稳定的包合物, 包合物在低温下形成结晶, 经过滤而除去, 从而除去饱和及低不饱和脂肪酸及其

酯^[10]。分子蒸馏法 (Molecular Distillation) 是根据不同脂肪酸在真空条件下沸点不同 (即操作温度的差异) 来分离提取 EPA 和 DHA。

鳀鱼体内脂肪含量高, 内脏酶活性强, 极易腐败变质; 又因个体小, 国内消费量很少。但鳀鱼资源丰富, 且蛋白质与脂肪含量较高, 是提供蛋白质与油脂的良好来源。特别是油脂, 不仅含量高, 而且鱼油中高不饱和脂肪酸如 EPA、DHA 含量也较高。到 12 月中旬, 鱼肉中脂肪含量高达 20%, 内脏脂肪含量高达 40%。从以鳀鱼制取水解蛋白时的副产物鱼油中提取 EPA 和 DHA 具有很高的开发应用价值。

材料与方法

(一) 材料与试剂

鳀鱼原料由青岛海洋渔业公司提供, 捕获后在渔船上速冻冷藏。所用试剂 NaOH、HCl、乙醇和尿素均为 A. R.。

(二) 方法

1. 鱼油的提取与精制

取新鲜鳀鱼原料, 切碎后加 1 倍量水, 通入蒸汽 (同时充 N_2) 蒸煮 (80~90℃) 1 小时, 离心分离得粗鱼油。粗鱼油经盐水和稀酸脱胶, 根据鱼油的酸价加入需要量的 1.2~1.5 倍的 20% NaOH 溶液脱酸, 40~60℃ 下保温 8~10 小时, 用水洗至中性后脱水得精油。

2. EPA 和 DHA 的提取

(1) 尿素附加法

提取工艺流程为: 鱼油 → 皂化 → 酸化 → 酯化 $\xrightarrow[70^\circ\text{C}]{\text{尿素}}$ 溶解 → 冷却结晶 → 过滤 → 水洗 → 分离 → 干制 → 脱色 → 成品。

取一份鳀鱼鱼油, 加 1.5 倍乙醇和 0.5 倍水, 加 20% NaOH 回流 0.5 小时进行皂化, 继以 12% 盐酸酸化, 加入 1.2 倍乙醇和近一倍的盐酸酯化 0.5 小时, 水洗至中性得混合乙酯。取 1 份混合乙酯加 8 份乙醇和 1:1.5、1:2、1:2.5 倍量的尿素加热到 70℃, 搅拌均匀成透明溶液, 然后将溶液冷却到 35℃ 以下, 沉淀出饱和脂肪酸和低不饱和脂肪酸。滤去溶液的结晶物, 滤液在真空条件下蒸去乙醇。然后, 以 40℃ 的盐水洗 5 次, 移去水层, 即得浓缩高不饱和脂肪酸乙酯。经脱水、脱色处理, 即得成品。

(2) 分子蒸馏法

工艺流程为: 鱼油 → 乙酯化 → 分子蒸馏 →

┌ 饱和馏分(A)
└ 残留物(B) → 分子蒸馏 → 馏出物(C)。

鱼油在加催化剂条件下进行酯交换反应, 将脂肪酸的甘油三酯置换成脂肪酸乙酯, 经脱水干燥后, 以柴田 (SIBATA) 分子蒸馏装置 (MS-300 型) 进行分子蒸馏。该装置为降膜式, 转子转速 0~400rpm。加热温度 0~400℃, 预热温度 80℃。经两阶段的分子蒸馏后得产品 A 和产品 C。产品 A 是饱和脂肪酸组分, 产品 C 则是浓缩高不饱和脂肪酸制

品。

3. 分析测定方法

碘价按常规方法测定。色度以 Model-1001DP 型色度与色差仪测定。鱼油中脂肪酸含量,则按下述方法测定:取 50mg 鱼油或脂肪酸乙酯,加 1ml NaOH-CH₃OH 皂化后加 1ml HCl-CH₃OH 酯化;以石油醚萃取脂肪酸甲酯;以气相色谱分析;根据面积归一化法计算各种脂肪酸含量。气相色谱条件同文献^[11]。

结果与讨论

在提取鱼油过程中,因鱼油中多烯酸含量高,且极易被氧化,在原料处理时,特别是用水煮法提取鱼油时,应充以 N₂。在最终产品的形式上,应改变原来的三甘油酯形式,使之转变为较稳定的乙酯形式。

(一) 尿素法提取 EPA 和 DHA

EPA 和 DHA 是从精制后的鱼油中提取的。将鱼油以浓碱皂化,继以酸处理,然后用乙醇进行酯化。皂化时乙醇用量一般为 1:2 或 1:3。本文在研究中发现,最少量的乙醇(1:1.5)也能在较短的时间内反应完全。皂化后整个体系呈固体状,加入适量水便可使之溶解。继而用盐酸酸化时,油溶性的脂肪酸便和水溶液自动分层,省去了有机溶剂提取步骤。混合酸在酸性条件下与乙醇反应生成混合脂肪酸乙酯。每份混合乙酯中加入 8 份乙醇,分别以 1:1.5、1:2、1:2.5 倍量的尿素进行处理,蒸去乙醇,得到尿素和浓缩混合酯。前人一般采用正己烷进行提取分离,使用有机溶剂增加了操作的复杂性,如正己烷易燃,同时也增加了浓缩鱼油的成本。本文采用温水多次洗涤的方法除去尿素,虽然洗涤次数较多,但工艺简单,且成本低。最终样品中脂肪酸含量和样品得率见表 1。

表 1 用尿素附加法处理的样品分析结果(%)

Table 1 Analytical result of samples by using urea addition method (%)

样品 (Sample) 脂肪酸 (Fatty acid)	原 料 (Raw material)	原料:尿素 (Raw material: urea) 1:1.5	原料:尿素 (Raw material: urea) 1:2	原料:尿素 (Raw material: urea) 1:2.5
C _{14:0}	7.1	0.8	0.7	0.9
C _{16:0}	18.6	/	/	/
C _{16:1}	6.9	8.2	6.3	0.8
C _{18:0}	3.7	/	/	/
C _{18:1}	12.3	14.6	3.8	0.8
C _{18:2}	3.6	10.6	8.1	1.9
C _{18:3}	1.7	4.8	3.8	1.5
C _{20:1}	2.3	0.8	/	/
C _{20:4}	1.1	2.0	3.0	3.2
C _{20:5}	9.5	16.7	26.4	30.7
C _{20:6}	17.2	18.4	34.6	39.3
EPA+DHA	26.7	35.1	61.0	70.0
产率(%) (Yield)		25	22	19

表 1 显示, 以 1:1.5、1:2、1:2.5 倍量的尿素处理后的样品 EPA+DHA 的含量分别为 35.1%、61.0% 和 70.0%。可见, 所用尿素量越大, 鱼油中高不饱和脂肪酸的浓度就越高, 但产率越低, 依次为 25%、22% 和 19%。

(二) 分子蒸馏法提取 EPA 和 DHA

尿素法工艺中用强酸强碱处理, 并消耗大量的乙醇和尿素。为避免尿素法的不足, 本文对分子蒸馏法提取 EPA+DHA 的工艺作了研究, 并与尿素法进行了比较分析。

在酯化方法上, 尿素法采用先皂化, 后酸化, 再酯化的方法; 而分子蒸馏法则是催化剂作用下的直接酯交换法。酯交换中乙醇用量为鱼油的 40% (W/W), 得率为 80%。分子蒸馏结果显示酯化效果良好。分子蒸馏得到的产品分析结果见表 2。

表 2 经分子蒸馏处理后样品中的脂肪酸含量 (%)

Table 2 Fatty acids contents of samples after molecular distillation (%)

样品 (Sample) 脂肪酸 (Fatty acid)	原料油 (Raw fish oil)	饱和馏分 (A) (Saturated distillate)	残留物 (B) (Residue)	馏出物 (C) (Distillate)
C _{14:0}	7.1	15.5	/	/
C _{16:0}	18.6	31.4	1.5	1.2
C _{18:1}	6.9	12.1	0.7	0.5
C _{18:0}	3.7	3.5	2.3	2.0
C _{18:1} ✓	12.3	12.0	5.9	6.0
C _{18:2}	3.6	3.5	1.6	1.6
C _{18:3}	1.7	1.5	1.6	1.0
C _{20:1}	2.3	1.0	4.9	4.4
C _{20:4}	1.1	0.5	1.2	1.6
C _{20:5}	9.5	4.2	9.8	15.8
C _{22:1}	2.8	0.3	10.6	10.4
C _{22:6}	17.2	3.5	38.3	54.3
(EPA+DHA)	26.7	7.7	48.1	70.1

分子蒸馏法得到的产品 A 为饱和脂肪酸和低不饱和脂肪酸馏分。从表 2 可以看出, 与原料油相比, 产品 A 中 C_{14:0} 和 C_{16:0} 等饱和脂肪酸含量增加了一倍, 而 C_{18:3} 以后的高不饱和脂肪酸含量只有原料量的 1/4。产品 B (分子蒸馏残留物) 中的饱和脂肪酸含量大大降低, 而高不饱和脂肪酸含量大大增加, 其中 DHA 含量高达 38.3%, 比原料油中 DHA 增加了一倍多。为得到 EPA 和 DHA 含量更高的浓缩油, 方法一是将产品 B 以低温沉淀法除去 C_{20:1} 和 C_{22:1}, 从而达到浓缩目的; 方法二是将产品 B 继续以分子蒸馏法处理, 从而浓缩 EPA 和 DHA。表 2 列出了产品 B 继续用分子蒸馏法处理得到的产品 C 的分析结果。可见, 产品 C 中的 EPA+DHA 含量达到 70.1%。

样品经酯化和分子蒸馏后碘价变化见表 3。

表 3 鳀鱼鱼油分子蒸馏处理后碘价变化

Table 3 Changes of iodine value of anchovy fish oil after molecular distillation

样品 (Sample)	原样 (Raw material)	A	B	C
碘价 (Iodine value)	120	86	220	320

由表 3 可以看出，鳀鱼鱼油经分子蒸馏处理后，碘价从 120 增加到 320。碘价越高，显示其脂肪酸不饱和程度越高。

以色度和色差计测定色度值，结果见表 4。

表 4 不同馏分的色度值

Table 4 The color value of different distillates

	L	a	b
原混合乙酯 (Raw fish oil ethylester)	38.2	8.9	3.2
饱和脂肪酸部分(A) (Saturated fatty acids part)	85	-14.1	5.6
浓缩 EPA、DHA 部分(C) (Concentrated EPA、DHA part)	72	-9.4	7.9

L 值越高表示样品透明度越高。表 4 显示，饱和脂肪酸组分 (A) 的 L 值最大，表明其透明度最大；浓缩 EPA+DHA 组分 (C) 次之，而原混合乙酯最低，即颜色最深。a 值越高表示样品越红，而 b 值越高则表明样品越黄。原料油经酯化后呈红棕色，所以 a 值最高，b 值最低；而浓缩 EPA+DHA 的 a 值最低，b 值最高。感官鉴定与色度和色差计测得的 L、a、b 值结果相一致。

综上所述，用尿素附加法和分子蒸馏法都能将鳀鱼鱼油中的 EPA+DHA 浓缩到 70%。但是，比较两个提取工艺可知，尿素法须经结晶过滤、溶媒分离、尿素回收等步骤，工艺较为复杂，生产成本也较高；而分子蒸馏法的工艺是在高真空条件下的蒸馏操作，工艺步骤简单，勿须浪费尿素法中的有机溶剂等，工艺成本较低。同时，样品在真空条件下不易氧化，产品质量高，得到的副产品纯度高，也可直接应用于工业生产。可以说，分子蒸馏法是提取浓缩鱼油的一种理想方法。

参 考 文 献

- [1] 刘兆平、吴葆杰，1984。二十碳五烯酸代谢和生理作用。海洋药物，(4)：9-14。
- [2] 吴越、吴葆杰，1987。二十二碳六烯酸的生理作用。海洋药物，(4)：26-27。
- [3] 王建中等，1988。鱼油多不饱和脂肪酸抗血栓的研究。医药工业，19(3)：109-112。
- [4] 王建中等，1990。服用鱼油多不饱和脂肪酸对血液中脂肪酸组成的影响。中国医药工业杂志，21(3)：124-127。
- [5] 赵荣兴，1991。日本研究二十二碳六烯酸 (DHA) 机制的现状。现代渔业信息，6(8)：12-14。
- [6] 王建中、邱红芳，1993。鱼油研究的现状和发展趋势。中国海洋药物，(2)：34-42。
- [7] 贺艳丽、张天民、张子刚，1988。鱼油多不饱和脂肪酸乙酯的制备和生物活性。山东医科大学学报，26(2)：73-76。
- [8] 郭凤仙、张天民、张子刚，1991。鱼油多不饱和脂肪酸乙酯胶丸的制备及其药物动力学。中国海洋药物，(1)：7-

- 10。
- [9] 王唯玮, 1989。海产油脂中心血管活性物质——高度不饱和脂肪酸的提取分离技术和应用。中国海洋药物, (3): 30—40。
- [10] 张耀武等, 1991。二十碳五烯酸和二十二碳六烯酸及其酯类的分离制备方法。中国专利, CN 1013858B。
- [11] 薛长湖等, 1993。养殖对虾与海捕对虾鉴别方法初探。青岛海洋大学学报, 23(1): 101—106。
- [12] Harris, W. S. *et al.*, 1983. The comparative reductions of the plasma lipids and lipoproteins by dietary polyunsaturated fats. *Metabolism*, 32(2): 179.
- [13] Singer, P. *et al.*, 1983. lipid and blood pressure—lowering effect of mackerel diet in man. *Atherosclerosis*, (49): 99.

STUDIES ON PREPARATION OF POLYUNSATURATED FATTY ACIDS (EPA&DHA) FROM ANCHOVY FISH OIL

Xue Changhu Chen Xiubai Li Zhaojie Wang Changyun Lin Hong

(Ocean University of Qingdao, 266003)

ABSTRACT Preparation of polyunsaturated fatty acids (EPA&DHA) from anchovy fish oil by using urea addition method and molecular distillation method was studied. The products contain 35.1%, 61.0% and 70.0% of EPA&DHA respectively by treatment of 1.5, 2, 2.5 times urea addition. The final product by the molecular distillation contains 70.1% of EPA&DHA. The iodine value is 320. Compared with the urea addition method, the preparation of polyunsaturated fatty acids by the molecular distillation with low temperature treatment is desirable.

KEYWORDS Anchovy fish, EPA, DHA, Urea addition method, Molecular distillation method