



紫苏油中 α -亚麻酸的分离纯化

陈新新, 王昌禄, 李凤娟, 王玉荣

(食品营养与安全教育部重点实验室, 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘要: 研究了紫苏油中 α -亚麻酸的分离纯化技术. 采用尿素包合与硝酸银溶液络合萃取相结合的方法, 考察了尿素包合过程中混合脂肪酸、尿素、乙醇的比例以及硝酸银萃取过程中硝酸银浓度对 α -亚麻酸纯化的影响. 结果表明, 在脂肪酸、尿素和95%乙醇质量比为1:1.5:4.8, 包合温度为 -18°C , 包合时间为12 h, 硝酸银浓度为4 mol/L, 0°C 条件下络合, α -亚麻酸纯度达99.08%, 回收率为39.24%, 尿素和硝酸银的回收率分别为60%和90%以上.

关键词: 紫苏油; α -亚麻酸; 尿素包合; 硝酸银络合

中图分类号: TQ645.6 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2012)04-0017-04

Separation and Purification of Alpha Linolenic Acid from Perilla Oil

CHEN Xinxin, WANG Changlu, LI Fengjuan, WANG Yurong

(Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Techniques of separation and purification of alpha linolenic acid (α -LNA) from perilla oil were investigated. By combining the methods of urea adduction fractional and silver ion complexation, the effect ratio of the mixed fatty acid to urea to alcohol in the process of urea adduction fractional and the effect of the concentration of silver nitrate in the process of silver ion complexation on the content of α -LNA were studied. Results indicated that when the ratio of the mixed fatty acid to urea and to 95% alcohol was 1 : 1.5 : 4.8, adduction temperature -18°C , adduction time 12 hours, silver nitrate concentration 4 mol/L and complexation temperature 0°C , the purity of α -LNA was 99.08% and the recovery rate was 39.24%, while the recovery rates of urea and silver nitrate were above 60% and 90% respectively.

Key words: perilla oil; alpha linolenic acid; urea adduction fractional; silver ion complexation

紫苏油为唇形科植物紫苏 (*Perilla frutescens* (L.) Britt) 的干燥叶(或带嫩枝)经水蒸气蒸馏提取的挥发油, 是富含 α -亚麻酸的植物资源. α -亚麻酸是人体必需脂肪酸, 是 ω -3系多不饱和脂肪酸的母体, 为全顺式-9, 12, 15-十八碳三烯酸, 它是维系人类脑进化的核心物质, 其最终代谢产物 EPA 和 DHA 是组成神经细胞膜的重要成分, 此外, α -亚麻酸还具有增强智力、提高记忆力、调节血压、预防心肌梗塞和脑栓塞、降低血脂及抑制糖尿病并发症、降低胆固醇、血脂、预防心血管疾病、保护视力和抑制过敏反应等生理功能^[1].

目前, 常用分离 α -亚麻酸的方法有柱色谱法、分子蒸馏法^[2-3]、超临界流体提取法^[4]以及尿素包合法^[5]

等. 分子蒸馏法的分离过程为物理过程, 可很好地保护被分离物质不被外来物质污染, 操作温度远低于沸点, 且受热时间短, 可连续化生产, 但产品的最终纯度较低; 超临界流体提取法也很难将相对分子质量与 α -亚麻酸相近的脂肪酸及其单烯、二烯酸分离开, 且设备要求比较高; 尿素包合法投资少, 工艺简单, 用此法分离饱和脂肪酸、单不饱和脂肪酸和多不饱和脂肪酸已实现工业化, 缺点是不能将碳链长度不同而饱和度相同或相近的脂肪酸分开. 本文根据尿素包合法的不足, 研究了尿素包合与硝酸银络合^[6]两种方法分离纯化紫苏油中的 α -亚麻酸, 利用气相色谱进行组分分析, 探讨了尿素包合过程中脂肪酸、尿素和乙醇比例与硝酸银浓度对分离富集的影响, 并对尿素

收稿日期: 2012-01-06; 修回日期: 2012-03-01

基金项目: 国家高技术研究发展计划“863计划”资助项目(2007AA100404)

作者简介: 陈新新(1985—), 女, 河北邢台人, 硕士研究生; 通信作者: 王昌禄, 教授, changluwang@yahoo.com.cn.

和硝酸银的回收利用进行了研究,旨在开发高质量的 α -亚麻酸原料.

1 材料与方法

1.1 材料

紫苏油,元华生物科技有限公司;氢氧化钾、95%乙醇、正己烷、尿素、氯化钠、无水甲醇、无水硫酸钠、石油醚(60~90℃),分析纯,天津市北方天医化学试剂厂;硝酸银,上海泰瑞尔化学有限公司;盐酸、硫酸,天津市禹达化学试剂科技发展有限公司.

LC-20A型气相色谱仪,日本岛津公司;AW220型分析天平,奥豪斯上海公司;XMTD-204型超级恒温水浴搅拌器,天津市欧诺仪器仪表有限公司;RE-2000型旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂.

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的配制

1 mol/L的KOH-乙醇溶液:在1 L容量瓶中,加入60.0 g KOH,用95%乙醇进行溶解至完全,定容,溶液为澄清无色透明或浅黄色.

1.2.2 紫苏油的皂化(游离脂肪酸的制备)

准确称取10.0 g紫苏油加入装有100 mL、1 mol/L的KOH-乙醇溶液的磨口圆底烧瓶中,83℃煮沸回流1 h,冷却至室温,加入100 mL蒸馏水,混合均匀,转移至分液漏斗中,分别用100 mL正己烷萃取非皂化物3次,取下层水相.用10%盐酸酸化其pH至2~3,移去水相,留油相,加入适量正己烷进行萃取,留正己烷相,旋转蒸发得到混合脂肪酸.

1.2.3 尿素包合

将尿素和95%乙醇按一定比例混合加入到圆底烧瓶中,83℃回流至尿素全部溶解,加入相应的混合脂肪酸,77℃回流15 min,-18℃下包合12 h以上^[7].对尿素包合物进行抽滤,分离出滤液,加入适量蒸馏水转移至分液漏斗中,用10%盐酸调其pH至2~3,加入适量正己烷进行萃取,蒸馏水反复冲洗正己烷相3次,分离得有机相,用适量的无水硫酸钠干燥,旋转蒸发得到 α -亚麻酸纯度较高的多不饱和脂肪酸.

1.2.4 AgNO₃溶液络合

将1.2.3得到的多不饱和脂肪酸配制成0.2 g/mL石油醚溶液于棕色试剂瓶中,加入等体积一定浓度的AgNO₃-40%甲醇水溶液,在0℃条件下磁力搅拌萃取2 h^[8],静置分层得到萃取相(AgNO₃水相)和萃余相(有机相),分别计算两相体积.将含有不饱和脂肪酸的萃取相与等体积的石油醚溶液混合均匀,50℃

磁力搅拌下萃取30 min,重复上述萃取2次.静置分层,分出石油醚相和含AgNO₃的萃取相,混合2次得到的石油醚相,分别用等体积的饱和NaCl水溶液和蒸馏水洗2次,无水Na₂SO₄干燥,过滤得到含 α -亚麻酸的石油醚相,旋转蒸发得到 α -亚麻酸.

1.2.5 脂肪酸的甲酯化

用气相色谱仪分析油脂的脂肪酸组成,面积归一化方法计算 α -亚麻酸相对含量.

检测条件:岛津LC-20A型气相色谱仪,氢火焰离子化检测器(FID),甲酯化采用硫酸甲醇法;色谱柱为CBP-20毛细管柱(50 m×0.25 mm×0.25 μ m);载气为氮气,纯度 \geq 99.999%,流量30 mL/min,空气流量400 mL/min,氢气流量40 mL/min;进样口温度280℃,柱温180℃,程序升温,初始温度180℃,以6℃/min的升温速度升至240℃,保持40 min;分流进样,分流比20:1,进样量1.0 μ L.

称取上述各步分离出的多不饱和脂肪酸,50 mg于5 mL离心管中,加入1%硫酸-甲醇2 mL,放入70℃水浴锅中加热30 min,加入2 mL正己烷^[9],再加入蒸馏水至管颈处,取上清液,用正己烷萃取,合并2次的上清液,放入小管中待测.

1.2.6 尿素和AgNO₃的回收

尿素的回收:向尿素结晶包合物中加入适量水(约1:5),水浴加热使尿素包合物分解,用10%盐酸调其pH至2~3,加入适量的正己烷,连续萃取2次.正己烷相用蒸馏水洗至无尿素检出,无水Na₂SO₄干燥,旋蒸得到饱和脂肪酸.加热水相浓缩尿素溶液至饱和状态,低温结晶抽滤得到尿素.

AgNO₃的回收:将石油醚萃取后的含银离子残留溶液,水浴避光浓缩至液面形成膜,略成糊状^[10],110℃烘箱中干燥至恒质量,置于干燥器中,避光,冷却,得到AgNO₃固体.

2 结果与讨论

2.1 紫苏油中脂肪酸成分分析

紫苏原油经皂化、甲酯化后进行气相色谱分析,分析紫苏油中脂肪酸组成(表1和图1).

表1 紫苏油中脂肪酸组成成分及含量

Tab. 1 Components and contents of the fatty acid of perilla oil

| 脂肪酸种类 | 棕榈酸 | 硬脂酸 | 油酸 | 亚油酸 | α -亚麻酸 |
|--------|------|------|-------|-------|---------------|
| 相对含量/% | 5.68 | 1.35 | 10.61 | 13.57 | 68.76 |
| 绝对含量/% | 6.02 | 1.37 | 11.88 | 15.72 | 65.01 |

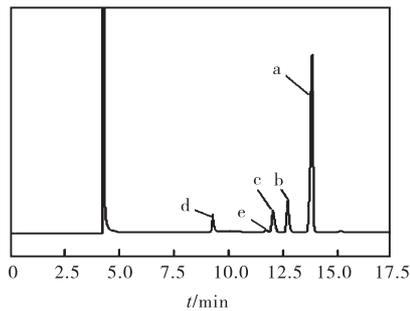
a. α -亚麻酸; b. 亚油酸; c. 油酸; d. 棕榈酸; e. 硬脂酸

图1 紫苏油的气相色谱图

Fig. 1 Gas chromatogram of perilla oil

2.2 脂肪酸、尿素、95%乙醇比例对 α -亚麻酸纯化的影响

按照 1.2.3 的方法,研究了不同脂肪酸、尿素、95%乙醇质量比对包合产物 α -亚麻酸纯度和得率的影响,结果见表 2.

表 2 脂肪酸、尿素、95%乙醇比例对 α -亚麻酸的影响

Tab. 2 Effects of different rates of fatty acid, urea, and alcohol on alpha linolenic acid

| $m_{\text{脂肪酸}} : m_{\text{尿素}} : m_{95\% \text{乙醇}}$ | 得率/% | 纯度/% |
|---|-------|-------|
| 1 : 1.5 : 4.8 | 62.00 | 87.31 |
| 1 : 1.5 : 6 | 56.00 | 86.96 |
| 1 : 1.5 : 8 | 49.00 | 86.81 |
| 1 : 3 : 4.8 | 44.00 | 88.32 |
| 1 : 3 : 6 | 41.00 | 87.16 |
| 1 : 3 : 8 | 39.00 | 86.96 |

溶剂是尿素包合物形成的必要条件^[11],经实验得出 95%乙醇对尿素的溶解性优于无水乙醇和甲醇的效果,考虑到甲醇的副作用,因此,选择 95%乙醇作为溶剂.

由表 2 可知,脂肪酸、尿素、95%乙醇质量比为 1 : 1.5 : 4.8 时包合效果最好, α -亚麻酸纯度和得率分别为 87.31%和 62.00%,比例为 1 : 3 : 4.8 时, α -亚麻酸纯度达到 88.32%,但其得率较低.总体上,脂肪酸、尿素、95%乙醇质量比的变化对 α -亚麻酸的纯度影响较小,主要是对得率有影响.

结果表明:不饱和脂肪酸的得率随尿素的增加而减小,当尿素用量适当时尿素易形成结晶,能够充分地包合其中的饱和脂肪酸和单不饱和脂肪酸,最后得到纯度和得率较高的 α -亚麻酸;当尿素用量较高时,尿素结晶表面吸附较多的多不饱和脂肪酸,影响 α -亚麻酸的得率,损失较大.当尿素用量过高时,整个体系处于黏稠状态,分子之间运动阻力变大,尿素分子形成包结晶过快,不能包含所有的游离脂肪酸;但尿素浓度过低时,形成的结晶较少,包合物形成的相

对也变少,不能充分包含所有的游离脂肪酸,影响 α -亚麻酸的纯度.

2.3 AgNO_3 浓度对 α -亚麻酸纯化的影响

尿素包合后 α -亚麻酸纯度达 87.31%,为进一步提高 α -亚麻酸的纯度,按照 1.2.4 的方法,探讨了 AgNO_3 -40%甲醇水溶液分别为 2、3、4、5 mol/L 浓度条件下对 α -亚麻酸纯度和得率的影响,结果见表 3.

表 3 AgNO_3 浓度对 α -亚麻酸的影响Tab. 3 Effects of AgNO_3 concentration on alpha linolenic acid

| 浓度/(mol·L ⁻¹) | 得率/% | 纯度/% |
|---------------------------|-------|-------|
| 2 | 26.19 | 94.74 |
| 3 | 32.50 | 95.57 |
| 4 | 39.24 | 99.08 |
| 5 | 30.95 | 95.46 |

由表 3 可知,当 AgNO_3 -40%甲醇水溶液浓度为 4 mol/L 时 α -亚麻酸的纯度和得率最高,分别达到 99.04%和 39.24%,随着 AgNO_3 浓度的上升,呈先增加后减少的趋势. AgNO_3 -40%甲醇水溶液中的 Ag^+ 能与具双键的化合物形成 $\text{Ag}^+-\pi$ 络合物,不饱和脂肪酸中的双键数目越多,需要结合的 Ag^+ 就越多,形成络合物的亲水性就越强. α -亚麻酸中含有 3 个双键,当 AgNO_3 浓度较低时,没有足够的 Ag^+ 与双键化合物进行络合, Ag^+ 不能将 α -亚麻酸进行充分络合,得率和纯度较低;当 AgNO_3 浓度适当时, Ag^+ 能与含有双键的化合物形成络合物,同时增加了其亲水性, α -亚麻酸以 $\text{Ag}^+-\pi$ 络合物的形式进入水相,饱和与低不饱和脂肪酸组分仍留在油相中, α -亚麻酸的得率和纯度也有所提高;当 AgNO_3 浓度较高时, Ag^+ 会络合萃取溶液中其他组分,影响 α -亚麻酸的萃取效果.

2.4 尿素包合及 Ag^+ 络合后脂肪酸组分含量分析

对尿素包合及 Ag^+ 络合后脂肪酸组分含量分析,结果如图 2、图 3 所示.

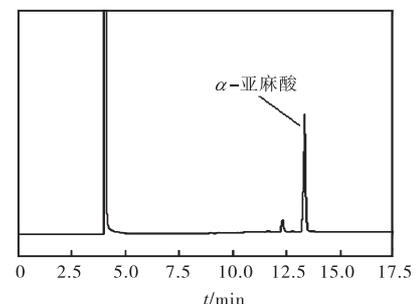


图 2 尿素包合后脂肪酸的气相色谱图

Fig. 2 Gas chromatogram of the fatty acid after urea clathrate

经尿素包合后, α -亚麻酸纯度大大提高, 从 68.76% 提高到了 87.31%; 再经 AgNO_3 络合, α -亚麻酸的纯度明显提高, 从 87.31% 提高至 99.08%, 其他脂肪酸几乎未检出. 因此, 经尿素包合和 Ag^+ 络合后可得到纯度较高的 α -亚麻酸.

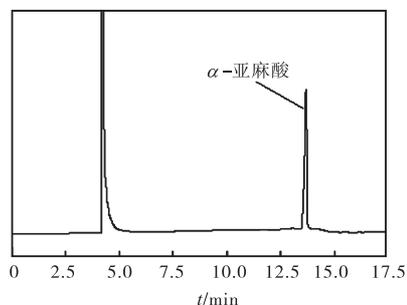


图3 AgNO_3 络合后脂肪酸的气相色谱图

Fig. 3 Gas chromatogram of the fatty acid after AgNO_3 complexation

2.5 尿素及 AgNO_3 的回收

由于被包合的脂肪酸化合物与尿素之间形成化学键, 通过色散力、静电吸引等范德华力结合, 可以通过加热、加水使尿素包合物解离. 本文回收尿素的同时也可将饱和脂肪酸和单烯脂肪酸进行回收, 结晶得到尿素, 有机溶液经干燥浓缩得到脂肪酸, 其中尿素回收率可达 60% 以上.

为避免 Ag^+ 污染环境和降低成本, 本文对含有 Ag^+ 的残液进行了回收, 回收率达 90% 以上, 可重复用于 α -亚麻酸的络合萃取. 因实验需要较纯的硝酸银, 含有 Ag^+ 的回收溶液必须先用石油醚或者其他有机溶剂进行除杂处理; 考虑到硝酸银的回收率, 在浓缩过程中要不断进行搅拌, 防止浓缩液受热不均, 导致局部过热而使硝酸银发生热分解或浓缩液直接飞溅出去.

3 结论

紫苏油中含有丰富的 α -亚麻酸, 可达 68.76%. 对紫苏油中的 α -亚麻酸进行富集纯化, 可得到高纯度的 α -亚麻酸. 实验结果表明, 尿素包合 α -亚麻酸的最佳条件为脂肪酸、尿素、95% 乙醇质量比为 1 : 1.5 : 4.8, 包合温度 -18°C , 包合时间 12 h, α -亚麻酸纯度达 87.31%; Ag^+ 络合最佳条件为 AgNO_3 -40% 甲

醇水溶液浓度为 4 mol/L, 络合温度 0°C , 萃取 2 h, α -亚麻酸纯度达 99.08%. 尿素包合结合 Ag^+ 络合富集紫苏油中的 α -亚麻酸的操作方法简单, 所用试剂可回收再循环利用, 较低温度下进行包合和络合不会对 α -亚麻酸的分子结构和理化性质产生影响, 可以更好地保持 α -亚麻酸的活性.

参考文献:

- [1] Bemelmans W J, Broer J, Feskens E J, et al. Effect of an increased intake of alpha-linolenic acid and group nutritional education on cardiovascular risk factors: The mediterranean alpha-linolenic enriched groningen dietary intervention (MARGARIN) study[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 2002, 75(2): 221-227.
- [2] Liang J H, Hwang L S. Fractionation of squid visceral oil ethyl esters by short-path distillation[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2000, 77(7): 773-777.
- [3] 王昌禄, 吴志建, 郭剑霞, 等. 分子蒸馏纯化亚油酸的工艺条件优化[J]. 天津科技大学学报, 2010, 25(5): 17-20.
- [4] 张镜澄. 超临界流体萃取[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000.
- [5] 继成. α -亚麻酸绿色保健食品[J]. 中国制药信息, 2006, 22(10): 14-17.
- [6] 刘卓华, 刘书成, 田树良, 等. 硝酸银络合法浓缩金枪鱼鱼油多不饱和脂肪酸的研究[J]. 湛江海洋大学学报, 2004, 24(4): 33-37.
- [7] 张余, 阚建全, 陈宗道. 尿素包合法分离花椒籽油中的 α -亚麻酸的正交试验研究[J]. 中国食品添加剂, 2004(2): 28-31.
- [8] 韩喜江, 徐平, 孟祥丽, 等. 尿素包合与柱层析相结合从紫草油中分离高纯度亚麻酸[J]. 中国药学: 英文版, 2004, 13(1): 53-57.
- [9] 闫仲丽, 杨志岩, 降升平, 等. 杏仁油中脂肪酸组成的 GC/MS 分析[J]. 天津科技大学学报, 2007, 22(4): 41-43.
- [10] 马养民, 杜小晖. 硝酸银络合萃取花椒籽油中 α -亚麻酸甲酯[J]. 粮油加工, 2009(5): 66-68.
- [11] 张海满, 刘福桢, 戴玲妹. 尿素包合法纯化 α -亚麻酸工艺研究(I): α -亚麻酸纯化过程单因素实验研究[J]. 中国油脂, 2001, 26(2): 41-44.

责任编辑: 郎婧