

# 从海带渣中提取分离 EPA 的工艺研究<sup>△\*</sup>

张强<sup>1</sup>, 李爱云<sup>2\*</sup>, 冯坤苗<sup>1</sup>, 燕继永<sup>1</sup>, 韩春超<sup>1</sup>

(1. 山东中医药大学 药学院, 山东 济南 250355; 2. 山东中医药大学 第二附属医院药剂科, 山东 济南 250002)

**摘要:**目的 探索海带渣中二十碳五烯酸(EPA)提取纯化及含量测定的方法,为深入研究海带渣中 EPA 提供技术方法。方法 以海带渣为原料,在 45 °C 条件下用 3 倍量无水乙醇提取 2 次得到粗脂,采用氢氧化钾乙醇皂化和盐酸酸化制备游离混合脂肪酸,并以 EPA 含量为指标,用正交试验探讨尿素包合法富集海带渣中 EPA 的工艺条件。高效液相色谱法(HPLC)测定游离 EPA 的含量。结果 皂化后游离 EPA 的相对含量为 5.13 %。尿素包合反应最佳工艺为:95 %乙醇为溶剂,尿脂比 3 : 1,包合温度为 -15 °C 的条件下包合 2 次,每次包合 15 h。尿包后 EPA 的相对含量达 24.46 %。结论 该工艺简单易操作,可用于海带渣中 EPA 的提取纯化及含量测定。

**关键词:**海带渣;游离 EPA;尿素包合法;正交试验;高效液相色谱法

中图分类号:R915 文献标志码:A 文章编号:1002-3461(2016)03-062-05

## The extraction and isolation of EPA from Laminaria residues

ZHANG Qiang<sup>1</sup>, LI Ai-yun<sup>2\*</sup>, FENG Kun-miao<sup>1</sup>, YAN Ji-yong<sup>1</sup>, HAN Chun-chao<sup>1</sup>

(1. Shan Dong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China;

2. The second affiliated hospital pharmacy department of Shan Dong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250002, China)

**Abstract: Objective** To explore the method for extraction, purification and the content measurement of eicosapentaenoic acid (EPA) in Laminaria residues and to offer technical methods for further research on EPA in Laminaria residues. **Methods** Laminaria residues were extracted twice with absolute ethyl alcohol which was three times as medicinal materials under the condition of 45 °C to get crude fatty. Free fatty acids were prepared by saponification of KOH-alcohol and acidification of HCL. The process parameters of concentrating EPA from Laminaria residues were studied by urea complexation with orthogonal test in order to obtain higher content EPA. Determining the content of free EPA by phase high performance liquid chromatography (HPLC). **Results** After saponification the purity of the free EPA was 5.13% and the optimal process parameters of urea complexation were: with 95% ethanol as solvent, the mass ratio of urea to fatty acid was 3 to 1, crystallization temperature of -15 °C, inclusion twice, each time 15 h. The content of EPA was up to 24.46%. **Conclusion** The process was easy to operate and could be used in extraction, purification and the content measurement of EPA in Laminaria residues.

**Key words:** Laminaria residues; free EPA; urea complexation; orthogonal test; HPLC

\* △基金项目:山东省高等学校科技项目计划(J14LK61);济南市科技发展计划(201303055)资助

作者简介:张强(1991-)男,硕士研究生,主要从事中药活性物质与新剂型的研究。Tel:15621896906, E-mail:q972844391@163.com

\* 通讯作者:李爱云,女,药师。Tel:18765804898, E-mail:1084174661@qq.com

收稿日期:2015-07-01

二十碳五烯酸(all-cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid, EPA)(见图 1)是 1 种  $\omega$ -3 系列人体必需的长链多不饱和脂肪酸( $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids PUFA)<sup>[1-2]</sup>。分子式为  $C_{20}H_{30}O_2$ ,分子量约 302.46,熔点 $-54\sim-53\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,具有降血脂、抗血小板聚集、延缓血栓形成等作用<sup>[3-4]</sup>。目前,EPA 的提取主要以深海鱼油为原料,但海洋鱼类并不能合成 EPA,主要是从海洋食物链中获取,而细菌、真菌和藻类等才是真正的 EPA 生产者<sup>[5-7]</sup>。同时海藻体内 EPA 相对含量远高于鱼油中的含量,且从藻细胞中提取的 PUFA 产品不含胆固醇,也没有腥臭味。因此,利用海洋藻类来生产 EPA 是很有前途的研究方向,黄俊辉<sup>[8]</sup>等采用溶剂抽提法与超临界萃取法提取海带中不饱和脂肪酸,EPA 的含量分别为  $234\text{ }\mu\text{g/g}$  和  $442\text{ }\mu\text{g/g}$ 。

脂肪酸的提取常用氯仿、甲醇、石油醚、乙醚、正己烷、乙醇等溶剂<sup>[9-10]</sup>,考虑到有机溶剂的毒性,本文选用乙醇为提取溶剂。EPA 在藻体内以脂肪酸甘油酯形式存在,需采用皂化-酸化的方法制备游离的脂肪酸。EPA 等不饱和脂肪酸的纯化方法有银离子络合法<sup>[11]</sup>、分子蒸馏法<sup>[12]</sup>、低温溶剂结晶法<sup>[13]</sup>、色谱分离法<sup>[14]</sup>、尿素包合法<sup>[15]</sup>、脂肪酶催化浓缩法<sup>[16]</sup>、超临界流体萃取法<sup>[17]</sup>以及以上技术的复合联用法。尿素包合法简单、方便,且适合工业大生产,本实验选用尿素包合法纯化 EPA。脂肪酸含量测定一般采用气相色谱法<sup>[18]</sup>,由于气相检测需在较高的温度下进行<sup>[19-20]</sup>,而高温易使 EPA 双键断裂或异构化,导致分析结果不准确。为避免高温对 EPA 稳定性的影响,HPLC 法亦被引入 EPA 的检测分析,但多采用柱前衍生化法<sup>[21]</sup>,而测定游离 EPA 含量的报道罕见,本实验尝试采用 HPLC 测定游离 EPA 的含量。



图 1 EPA 的分子结构式

Fig. 1 Chemical structure of EPA

## 1 实验材料与仪器

### 1.1 实验材料

水提后海带渣(山东荣成某药厂赠送);EPA

标准品(Fluka 公司 货号与规格 44864-100MG 编号 0071523552);尿素(分析纯,天津市大茂化学试剂厂);无水乙醇(分析纯,天津市富宇精细化工有限公司);正己烷(分析纯,天津市富宇精细化工有限公司);无水硫酸钠(分析纯,苏州通都晟精细化工有限责任公司);氢氧化钾(分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司);盐酸(分析纯,北京化工厂);2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT 抗氧化剂;分析纯,郑州超凡化工有限公司);乙腈(色谱纯,国药集团化学试剂有限公司);甲醇(色谱纯,Tedia 公司)。

### 1.2 实验仪器

电热恒温水浴锅(北京市永光明医疗仪器厂);分析天平(万分之一,上海菁海仪器有限公司);旋转蒸发器(巩义市予华仪器有限责任公司);磁力搅拌器(上海标本模型制造厂);SHB-B95 型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);冰箱(青岛海尔股份有限公司);紫外光栅分光光度计(莱伯泰科 UV9100B);高效液相色谱仪(岛津 LC-20A 型高效液相色谱仪,日本岛津公司)。

## 2 方法

### 2.1 粗脂的提取

称取 400 g 海带渣放入 2 000 mL 圆底烧瓶中,加入 1 200 mL 无水乙醇,于  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下水浴回流提取 4 h,提取 2 次,合并 2 次滤液,减压浓缩除去乙醇,浓缩液用无水乙醇转移至蒸发皿中,于  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴避光浓缩成浸膏,即得粗脂。

### 2.2 游离的混合脂肪酸的制备(皂化反应)

称取上述粗脂 20 g 放入 500 mL 三颈瓶中,加入 120 mL(1 mol/L)的氢氧化钾乙醇溶液,磁力搅拌下,于  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴回流 2 h。冷却至室温后抽滤,滤液加入适量石油醚萃取除去非皂化物。皂化物用 3 mol/L 盐酸酸化至 pH1~2,正己烷萃取皂化物,收集正己烷层,用蒸馏水洗至 pH5~6,加入无水硫酸钠干燥。抽滤除去无水硫酸钠,用旋转蒸发器脱去正己烷即得游离脂肪酸。取样测定 EPA 的含量。

### 2.3 尿素包合法富集 EPA 的工艺优化

#### 2.3.1 尿素包合法富集 EPA 的方法

一定量的 95 %乙醇中加入适量尿素(1 g 尿

素溶于 4 mL 乙醇), 70 °C 水浴加热溶解, 降温至 60 °C, 按一定的比例加入精制的饱和脂肪酸(加样前加入质量分数为 0.05 % 的 BHT), 在 60 °C 下搅拌回流 30 min, 冷却到室温, 密封后放在 -15 °C 的冰箱中包合结晶。一定时间后取出包合物, 迅速抽滤(滤饼用乙醇洗涤 3 次), 滤液减压浓缩挥出一半以上乙醇, 加入 2 倍体积的 0.1 mol/L 盐酸, 用正己烷萃取饱和脂肪酸, 正己烷层用去离子水洗涤至 PH5~6, 加入适量无水硫酸钠, 干燥 5 h, 抽滤, 旋蒸除去正己烷即得到精制的饱和脂肪酸。

### 2.3.2 正交试验设计

在以前实验室单因素实验的基础上, 以 95 % 乙醇为溶剂, 选择 -15 °C 为结晶温度, 重点考察尿素包合反应中尿素与脂肪酸的配比、包合次数、包合时间对 EPA 含量的影响。设计三水平三因素的正交试验, 对 EPA 的纯化工艺进行优化。实验因素水平表见表 1, 选用  $L_9(3^4)$  正交表。其中尿素的相对质量为脂肪酸的相对比值(以脂肪酸量为 1 计)。每次实验平行 3 次。

表 1 实验因素水平表

Table 1 Factors and levels for  $L_9(3^4)$  orthogonal array design

水平	尿素相对质量 A	包合次数 B	包合时间 C/h
1	2	1	9
2	3	2	12
3	4	3	15

按照表 1 进行正交实验, 考察因素 A, B, C 对 EPA 含量的影响主次, 并得到尿素包合反应的最佳工艺。

## 2.4 高效液相含量测定

### 2.4.1 检测波长的选择

将 EPA 标准品甲醇溶液于 190~350 nm 波长内进行紫外扫描。

### 2.4.2 色谱条件

Ultimate 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈:水(含 0.4 % HAC)=80:20; 流速:1.0 mL/min; 2.4.1 中最优检测波长; 柱温:

25 °C; 进样量:20 μL。

### 2.4.3 标准曲线的绘制

精密称取 EPA 标准品 23.5 mg, 置于 50 mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 摇匀, 制成对照品储备溶液。分别吸取一定量的对照品储备溶液并稀释到 10 mL, 使得其中 EPA 浓度为 23.5、47、94、188、282、376、470 μg/mL。用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤。分别取上述溶液 20 μL 进样, 在上述条件下进行分析, 记录峰面积。以对照品溶液的浓度(μg/mL)为横坐标, 峰面积为纵坐标作回归曲线。

### 2.4.4 样品含量测定

分别精密称取 2.2 皂化后游离脂肪酸和 2.3 精制的饱和脂肪酸 5.4 mg, 置 10 mL 的容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 摇匀, 制成样品溶液。用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤, 取 20 μL 进样, 在上述条件下进行分析, 记录峰面积。

## 3 结果与分析

### 3.1 检测波长的选择

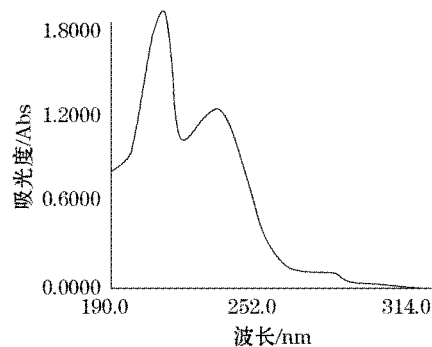


图 2 EPA 标准品全波长扫描

Fig. 2 Full wave scanning of standard EPA

本实验将 EPA 标准品溶液于 190~350 nm 波长内进行紫外扫描, 发现 EPA 在 215 nm 处有最大吸收。

### 3.2 EPA 的 HPLC 图

按 2.4.2 色谱条件进行 HPLC 分析测定, EPA 的保留时间为 14.282 min(见图 3、图 4)。

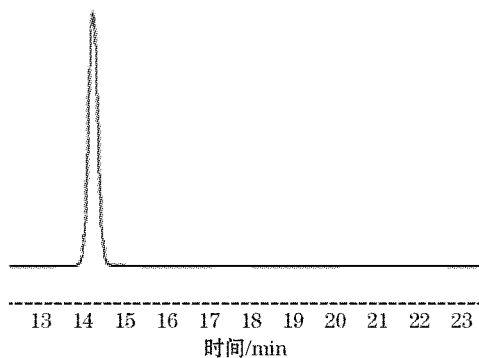


图3 EPA 标准品溶液 HPLC 图  
Fig.3 Standard sample of HPLC

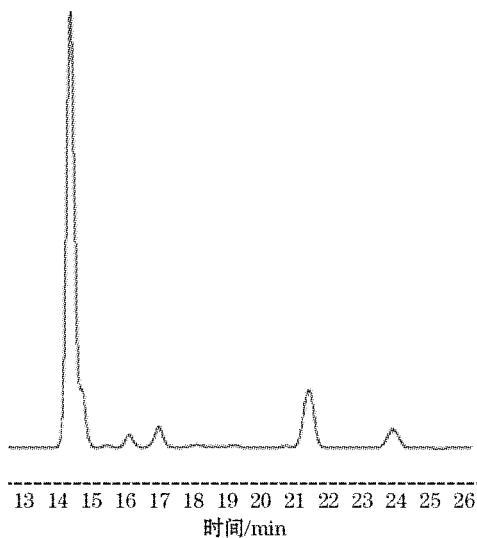


图4 供试品溶液 HPLC 图  
Fig.4 Test sample of HPLC

### 3.2 标准曲线及回归方程

按 2.4.3 中方法配制标准溶液和 2.4.2 色谱条件进行 HPLC 分析测定,求得标准曲线及回归方程,结果见图 5。

结果表明,EPA 在 23.5~470.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度范围内线性关系良好,回归方程为  $Y=9\,669.1X+4.9\times 10^5$ ,  $R^2=0.999\,7$ 。由标准曲线计算得 2.2 中皂化后游离 EPA 的纯度为 5.13 %。

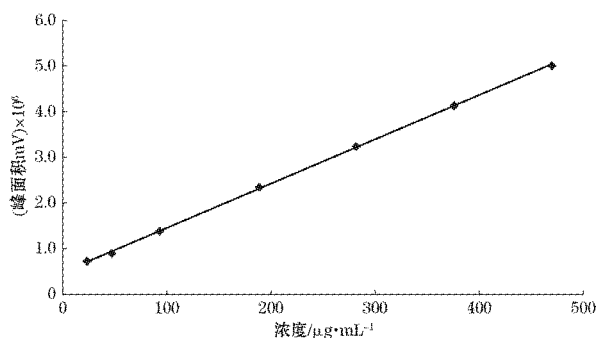


图5 EPA 标准曲线  
Fig.5 Standard curve of EPA

### 3.4 正交试验结果

由表 2 可知,纯化工艺参数对 EPA 含量的影响主次为:尿素的相对质量>包含次数>包含时间。尿素包合反应的最佳条件为  $A_2B_2C_3$ ,即尿脂比 3:1,包含 2 次,每次 15 h。

表 2 尿素包合法富集 EPA 的正交试验结果

Table 2 Result of orthogonal test on enriching EPA

试验号	A	B	C	D	EPA 的含量/%
1	1	1	1	1	17.04
2	1	2	2	2	19.11
3	1	3	3	3	19.27
4	2	1	2	3	21.77
5	2	2	3	1	24.46
6	2	3	1	2	23.82
7	3	1	3	2	22.14
8	3	2	1	3	24.01
9	3	3	2	1	23.89
$\bar{I}_j$	18.473	20.317	21.623	21.797	
$\bar{II}_j$	23.350	22.527	21.590	21.690	
$\bar{III}_j$	23.347	22.327	21.957	21.683	
R	4.877	2.210	0.367	0.114	

表 3 正交试验方差分析表

Table 3 The orthogonal experiment anova table

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
A	47.531	2	2.513	5.140	
B	8.964	2	0.474	5.140	
C	0.247	2	0.013	5.140	
误差	56.74	6			

由表3可知,A,B,C三因素对EPA的纯度影响均不显著。

#### 4 讨论与结论

本实验以山东荣成某药厂水提后海带残渣为原料提取EPA,实现废物再利用。尿素包合反应一般都在溶剂中进行,使用的溶剂不应与尿素发生化学反应,同时对EPA有较大的溶解度。对于EPA等不饱和脂肪酸的包合反应一般在甲醇中进行,考虑到甲醇的毒性,使用乙醇为溶剂。本实验尝试采用HPLC测定游离EPA的含量,实验证明此方法简单、易操作,可用于游离EPA的含量测定。

采用尿素包合法对EPA进行纯化,属于除杂过程,对EPA得率影响不大,得率在120~125 mg/kg之间。理论上讲,尿脂比越大,包合次数越多,EPA的纯度越高。实际包合中,当尿脂比达到3时,EPA的纯度趋于稳定。从经济的角度,选择尿脂比为3作最佳工艺。从肉眼上观察,第二、第三次包合物相对于第一次包合物晶型更加完整,且更大更长。可能是因为第一次包合主要是饱和脂肪酸,第二、第三次主要是低不饱和脂肪酸和第一次剩余的饱和脂肪酸,低不饱和脂肪酸空间结构较饱和脂肪酸大,包合物结晶更大更长。尿素包合的最优结果是以乙醇为溶剂,尿脂比3:1,包合温度为-15℃的条件下包合2次,每次包合15h,使EPA的相对含量由包前5.13%提升至24.46%。

本试验结果EPA的纯度依旧较低,后续试验可选用尿素包合法与其他方法联合进一步对EPA分离纯化。

#### 参考文献

- [1] Pigott G M, Tucker B W. Seafood: effects of technology on nutrition[M]. New York: Marcel Dekker Inc, 1990: 262-268.
- [2] Bajpai P, Bajpai P K. Eicosapentaenoic acid (EPA) production from microorganisms: a review[J]. J Biotechnol, 1993, 30(2): 161-183.
- [3] 陶宁萍, 鲍丹. 鱼油的营养和药用价值及其提取工艺的研究进展[J]. 上海水产大学学报, 2005, 14(2): 197-201.
- [4] 马永钧, 杨博. 海洋鱼油深加工技术研究进展[J]. 中国油脂, 2011, 36(4): 1-6.
- [5] 张羽航, 林炜铁, 鲍时翔, 等. 微生物发酵生产多不饱和脂肪酸的研究进展[J]. 中国油脂, 1998, 23(1): 42-45.
- [6] 徐华顺, 罗玉萍, 李思光, 等. 微生物发酵产油脂的研究进展[J]. 中国油脂, 1999, 24(2): 34-37.
- [7] 徐天宇. 利用生物技术生产廿碳五烯酸和廿二碳六烯酸[J]. 食品与发酵工业, 1995, 1: 56-65.
- [8] 黄俊辉, 曾庆孝, 余纲哲. 超临界萃取法提取海带多不饱和脂肪酸的研究[J]. 华南理工大学学报, 2001, 29(12): 79-83.
- [9] Molina G E, Robles M A, Gimenez G A, et al. Comparison Between Extraction of Lipids and Fatty Acids from Microalgal[J]. Jaocs, 1994, 71(9): 955-959.
- [10] Ibáñez González M J, Robles M A, Molina G E, et al. Optimization of Fatty Acid Extraction from *Phaeodactylum tricornutum* UTEX 640 Biomass[J]. Jaocs, 1998, 75(12): 1735-1740.
- [11] Liu P H, Xue J C, Byung K H. Separation of single component of EPA and DHA from fish oil using silver ion modified molecular sieve 13X under supercritical condition[J]. J Ind Eng Chem, 2008, 14: 639-643.
- [12] Liang J H, Hwang L S. Fraction of squid visceral oil ethyl esters by short-path distillation[J]. Jaocs, 2000, 77(7): 773-777.
- [13] 李和, 李佩文, 杨亦平. 低温结晶富集鱼油中EPA与DHA的方法[J]. 中国海洋药物, 1997, 16(4): 50-52.
- [14] Robles M A, Gimenez A, Garca C F, et al. Concentration and Purification of Stearidonic, Eicosapentaenoic, and Docosahexaenoic Acids from Cod Liver Oil and the Marine Microalga *Isochrysis galbana*[J]. Jaocs, 1995, 72(5): 573-583.
- [15] 刘书成, 李德涛, 欧冠强, 等. 尿素包合法富集蛇鲭鱼油中EPA和DHA的研究[J]. 广东海洋大学学报, 2008, 28(3): 61-65.
- [16] Gudmundur G, Haraldsson, Harald Breivik, et al. The preparation of Concentrations of Eicosapentaenoic Acids and Docosahexaenoic Acids by Lipase-Catalyzed Transesterification of Fish Oil with Ethanol[J]. Jaocs, 1997, 74(11): 1419-1424.
- [17] Michihata T, Matsud Y, Yasuo S, et al. Extraction of lipid from the residue of ika-ishiru using supercritical carbon dioxide[J]. J Jpn Soc Food Sci, 1997, 44(11): 795-800.
- [18] 可成友, 吴晓芳. 不饱和脂肪酸的气相色谱法同时测定[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(5): 528-530.
- [19] 刘爱琴, 罗超杰, 孙晓霞, 等. 气相色谱法测定鱼油微胶囊中EPA和DHA的含量[J]. 中国食品添加剂, 2010, 4: 273-276.
- [20] 郭斌, 孟磊, 彭宏伟, 等. 河豚鱼肝油中EPA、DHA的纯化与含量测定[J]. 中国药房, 2011, 22(11): 1010-1012.
- [21] 彭宏伟, 张博, 杨小川, 等. HPLC法测定虹鱼鱼油中二十碳五烯酸、二十二碳六烯酸的含量[J]. 中国药房, 2010, 21(13): 1228-1230.