

低温结晶法纯化元宝枫籽油中神经酸

葛智勤, 金文华, 黄楠, 周乐濠, 黄雅祺, 高亮, 王小三

(江南大学食品学院, 江苏无锡214122)

摘要: 为了提高从元宝枫籽油中富集神经酸的纯度和收率, 将元宝枫籽油皂化制备混合脂肪酸, 然后用不同溶剂溶解混合脂肪酸并进行低温结晶, 优化结晶溶剂、料液比和结晶时间等工艺参数。结果表明, 当元宝枫籽油混合脂肪酸与乙醇以质量体积比1:3混合, 在-40℃下低温结晶4h后, 得到的结晶中神经酸含量为13.11%, 收率为65.48%, 终产品中神经酸含量比元宝枫籽油中原有神经酸含量提高了1倍多。

关键词: 元宝枫籽油; 神经酸; 低温结晶; 混合脂肪酸

中图分类号: TS225; TQ645.6 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2021)04-0099-04

Purification of nervonic acid in *Acer truncatum* Bunge. seed oil by low temperature crystallization

GE Zhiqin, JIN Wenhua, HUANG Nan, ZHOU Lehao,
HUANG Yaqi, GAO Liang, WANG Xiaosan

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract: In order to improve the purity and yield of the nervonic acid enriched from *Acer truncatum* Bunge. seed oil, the *Acer truncatum* Bunge. seed oil was saponified to prepare mixed fatty acids, and then the mixed fatty acids were dissolved in different solvents and crystallized at low temperature. The conditions of crystallization solvent type, ratio of mixed fatty acids to solvent and crystallization time were optimized. The results showed that when the mixed fatty acids were mixed with ethanol in a mass-volume ratio of 1:3, and crystallized for 4 h at -40℃, the content of nervonic acid in the crystal was 13.11%, the yield was 65.48%, and the content of nervonic acid in the final product was more than twice as high as that in *Acer truncatum* Bunge. seed oil.

Key words: *Acer truncatum* Bunge. seed oil; nervonic acid; low temperature crystallization; mixed fatty acids

神经酸(Nervonic acid)因最早发现于哺乳动物的神经组织中而得名,又名鲨鱼酸,是一种长链单不饱和脂肪酸,分子式为 $C_{24}H_{46}O_2$,化学结构式为 $CH_3-(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_{13}-COOH$ 。神经酸是大脑神经组织和神经细胞的核心天然成分,

对于恢复神经末梢活性,促进神经细胞的生长和发育有很大作用。因此,神经酸对于治疗脑部疾病,减缓脑神经衰老,预防脑血管疾病具有重要意义^[1-2]。神经酸还可以通过促使人体 $\omega-3$ 、 $\omega-6$ 必需脂肪酸正常代谢以及二者协同作用,达到调节血糖血脂的目的^[3]。王熙才等^[4]研究发现,富含神经酸的艾舍尔软胶囊可通过调节机体细胞免疫和体液免疫来提高机体免疫能力。此外,神经酸还可以作为食品添加剂加入到婴幼儿配方食品中,达到促进婴幼儿智力发育和改善记忆的功效^[5]。然而,神经酸在天然油脂中含量较低,限制了其在保健食品和药品行业中的应用。目前,国际市场上的神经酸主要从深海鱼类中提取,但深海鱼油资源稀少且成本较高,因

收稿日期:2020-06-02;修回日期:2020-12-04

基金项目:江南大学大学生创新训练计划资助(201910295084Y);新农科研究与改革实践项目“基于全产业链的食品专业多样化人才培养模式创新实践”“新农科视域下食品专业教育国际化创新模式研究与实践”

作者简介:葛智勤(1999),女,在读本科,专业为食品科学与工程(E-mail)gezhiqin9907@163.com。

通信作者:王小三,副教授(E-mail)wxstongxue@163.com。

此从来源广、成本低的植物原料中提取神经酸成为新的研究方向。王性炎等^[6]分析研究了富含神经酸植物在我国的生长情况,发现以元宝枫为代表的槭属树种,结实量大,籽含油率和油中神经酸含量较高,具有较大的发展潜力^[7]。

目前,神经酸的提纯方法主要有分子蒸馏法、尿素包合法、超临界 CO₂ 萃取法、薄层层析法和低温结晶法等^[8]。徐明辉等^[9]在不同真空度及温度下对乙酯化的元宝枫籽油进行六级分子蒸馏,得到含量为 50% 的神经酸乙酯。张元等^[10]利用二级分子蒸馏提纯神经酸乙酯,产品中神经酸乙酯含量为 48.79%,神经酸乙酯收率为 16.67%;再结合尿素包合法,得到神经酸乙酯含量达到 66.21% 的产品,神经酸乙酯收率为 12.73%。然而,利用多级分子蒸馏法富集神经酸,最终产物收率不高,且产物为乙酯形式,消化吸收效率低,且乙酯形式在消化过程中会产生乙醇,对乙醇耐受性差的人会有不良反应^[11]。王性炎等^[12]采用超临界多元流体精密精馏技术精制元宝枫籽油,首先将元宝枫籽油皂化,利用硅胶柱吸附神经酸,再采用专用洗脱剂进行洗脱,可获得含量大于 90% 的神经酸产品,此方法收率不高且操作复杂。徐文晖等^[13]利用尿素包合法纯化神经酸甲酯,得到纯度为 10.36%、收率为 63% 的神经酸甲酯。尿素包合法简单易操作,但是在包埋过程中会产生氨基甲酸乙酯或氨基甲酸甲酯,因此在应用方面受到一定的限制^[14]。低温结晶法是利用低温下不同脂肪酸在溶剂中溶解度的不同进行富集纯化。一般来说,脂肪酸在有机溶剂中的溶解度随碳链长度的增加而减少,随着双键数目的增加而增加。因此,将混合脂肪酸与有机溶剂混合,在低温下进行结晶可以达到对脂肪酸的富集。低温结晶设备简单、操作方便,对多不饱和脂肪酸的分离条件较温和,产品不易发生氧化变质,易实现工业化生产。目前,关于低温结晶法纯化元宝枫籽油中神经酸的研究较少。本研究将元宝枫籽油皂化制备混合脂肪酸,再采用低温结晶法纯化神经酸,探究了结晶溶剂类型、料液比和结晶时间对结晶产物中神经酸含量和收率的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

元宝枫籽油,江西亿森源植物香料有限公司提供;石油醚(沸程 60~90℃)、氢氧化钾、盐酸、正己烷、乙醇、氯仿、甲醇、无水硫酸钠、95% 乙醇等均为分析纯,上海国药集团化学试剂有限公司;37 种混

合脂肪酸甲酯标准品,美国 Sigma 公司。

R-501 型水浴旋转蒸发器;SHZ-3 型循环水式多用真空泵;MixPlus 型旋涡振荡器;HH-601 超级恒温水浴锅;Agilent 7820A 气相色谱仪(配备氢火焰离子化检测器),美国安捷伦科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 元宝枫籽油混合脂肪酸的制备

向 25 g 元宝枫籽油中加入 50 mL 2 mol/L KOH 乙醇溶液(95% 乙醇)溶液,混合均匀后,在 80℃ 下水浴反应 1.5 h。反应结束后,向产物中加入 60 mL 蒸馏水和 125 mL 正己烷,轻轻摇晃后,静置分层,去除上层有机相,分离得到下层。下层加入 3 mol/L 盐酸溶液调节 pH 至 1~2,加入 20 mL 正己烷萃取 3 次。合并有机相并用少量蒸馏水洗涤至中性,无水硫酸钠干燥过滤后,45℃ 旋转蒸发除去正己烷得到混合脂肪酸。

1.2.2 低温结晶法纯化神经酸

称取 5 g 混合脂肪酸,按一定的料液比加入溶剂混合,将混合液放入 -40℃ 冰箱低温结晶一定时间。结晶结束后,用预冷好的布氏漏斗进行抽滤,将抽滤后得到的结晶称重,滤液置于旋蒸瓶中,于 45℃ 除去溶剂。滤液和结晶置于 -20℃ 冰箱备用。

1.2.3 脂肪酸组成的测定

取 50 mg 待测样品于离心管中,加入 2 mL 25% 的三氟化硼甲醇溶液,70℃ 水浴 5 min。冷却后加入 2 mL 正己烷涡旋振荡 3 min,取上层加入无水硫酸钠除水后,过滤膜,进气相色谱进行检测。气相色谱条件:Trace TR-FAME 毛细管色谱柱(60 m × 0.25 mm × 0.25 μm);载气 N₂,流速 1.0 mL/min;进样口和检测器温度均为 250℃;进样量 1 μL;分流比 100:1;升温程序为 60℃ 保持 3 min,以 5℃/min 升温至 175℃,保持 15 min,再以 2℃/min 升温至 220℃,保持 10 min。采用 37 种混合脂肪酸甲酯标准品进行定性,通过峰面积归一化法进行定量。

2 结果与讨论

2.1 元宝枫籽油混合脂肪酸的组成(见表 1)

表 1 元宝枫籽油混合脂肪酸的组成

| 脂肪酸 | 含量/% |
|----------------|-------|
| C16:0(棕榈酸) | 4.40 |
| C18:0(硬脂酸) | 2.32 |
| C18:1(油酸) | 25.15 |
| C18:2(亚油酸) | 34.55 |
| C18:3n6(γ-亚麻酸) | 0.60 |
| C18:3n3(α-亚麻酸) | 1.74 |
| C20:1(二十碳烯酸) | 8.04 |
| C22:1(芥酸) | 17.19 |
| C24:1(神经酸) | 6.01 |

从表1可以看出:元宝枫籽油中饱和脂肪酸含量较低,含有少量的棕榈酸(4.40%)和硬脂酸(2.32%);单不饱和脂肪酸主要是油酸、二十碳烯酸、芥酸和神经酸,其含量分别为25.15%、8.04%、17.19%和6.01%;多不饱和脂肪酸主要为亚油酸(34.55%),还含有少量的亚麻酸。一般来说,脂肪酸碳链越短,双键数目越多,在溶剂中的溶解度越高。元宝枫籽油混合脂肪酸中有较高含量的亚油酸和亚麻酸等多不饱和脂肪酸,以及十八碳单不饱和脂肪酸(油酸),在低温下这些脂肪酸在溶剂中的溶解度较高而保留在溶剂中,而神经酸等溶解度较低的脂肪酸通过结晶析出,从而可通过低温结晶法达到纯化神经酸的目的。

2.2 低温结晶条件优化

2.2.1 溶剂类型和料液比的优化

低温结晶时,常用的溶剂有甲醇、丙酮和正己烷等。Zhang等^[15]通过低温结晶富集金枪鱼油中的二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA)等多不饱和脂肪酸,在-60℃下达到了最佳的富集效果。亚油酸与EPA和DHA相比,双键数目少,选择较高一些的温度作为结晶温度有利于神经酸等超长链单不饱和脂肪酸与多不饱和脂肪酸的分离。因此,本实验选择-40℃作为结晶温度,探究溶剂类型、料液比和结晶时间对结晶产物中神经酸含量和收率的影响。首先,在结晶温度-40℃、结晶时间4h条件下,研究确定最佳的结晶溶剂和料液比。乙醇、氯仿和甲醇作为溶剂时,在不同料液比下滤液和结晶中的混合脂肪酸组成分别见表2~表4。

表2 乙醇作为溶剂时滤液与结晶中混合脂肪酸组成

| 脂肪酸 | 不同料液比下混合脂肪酸组成/% | | | | | |
|---------------------|-----------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1:2 | | 1:3 | | 1:4 | |
| | 滤液 | 结晶 | 滤液 | 结晶 | 滤液 | 结晶 |
| C16:0 | 0.09 | 12.43 | 0.88 | 12.57 | 0.77 | 11.90 |
| C18:0 | - | 7.32 | 0.10 | 7.46 | 0.09 | 6.95 |
| C18:1 | 28.13 | 19.83 | 28.13 | 18.45 | 27.93 | 19.33 |
| C18:2 | 39.02 | 25.87 | 38.65 | 23.47 | 38.94 | 23.21 |
| C18:3 _{n6} | 0.80 | 0.09 | 0.83 | - | 0.97 | 0.05 |
| C18:3 _{n3} | 2.36 | 0.21 | 2.45 | 0.19 | 2.51 | 0.21 |
| C20:1 | 7.89 | 8.01 | 8.00 | 8.19 | 8.04 | 8.03 |
| C22:1 | 18.03 | 15.84 | 17.36 | 16.56 | 17.49 | 16.87 |
| C24:1 | 3.69 | 10.40 | 3.60 | 13.11 | 3.27 | 13.45 |

注:“-”表示未检测出。下同

从表2可以看出,乙醇作为溶剂时,在料液比为1:2、1:3和1:4时,滤液中的神经酸含量均有所降低,

结晶中的神经酸含量均有所上升,这是因为在低温结晶过程中,神经酸在溶剂中过饱和而析出。当料液比为1:3和1:4时,结晶中的神经酸含量分别为13.11%和13.45%,相差不大,考虑到经济效益问题,选择1:3作为最适料液比。相对于起始原料中6.01%的神经酸含量,在混合脂肪酸与乙醇以1:3的料液比进行低温结晶后,神经酸的含量提高了1倍多。

表3 氯仿作为溶剂时滤液与结晶中混合脂肪酸组成

| 脂肪酸 | 不同料液比下混合脂肪酸组成/% | | | | | |
|---------------------|-----------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1:1 | | 1:2 | | 1:3 | |
| | 滤液 | 结晶 | 滤液 | 结晶 | 滤液 | 结晶 |
| C16:0 | 1.98 | 7.54 | 1.87 | 7.61 | 1.93 | 7.66 |
| C18:0 | - | 6.23 | 0.07 | 6.04 | - | 6.17 |
| C18:1 | 28.07 | 22.36 | 28.41 | 21.35 | 29.03 | 21.24 |
| C18:2 | 37.14 | 30.04 | 37.32 | 30.14 | 37.05 | 30.47 |
| C18:3 _{n6} | 0.85 | 0.24 | 0.79 | 0.22 | 0.83 | 0.27 |
| C18:3 _{n3} | 1.89 | 1.12 | 1.90 | 1.09 | 1.92 | 1.01 |
| C20:1 | 7.95 | 8.06 | 7.89 | 8.70 | 7.99 | 8.21 |
| C22:1 | 16.90 | 17.21 | 16.56 | 17.38 | 16.77 | 17.45 |
| C24:1 | 5.22 | 7.20 | 5.19 | 7.47 | 4.47 | 7.52 |

表4 甲醇作为溶剂时滤液与结晶中混合脂肪酸组成

| 脂肪酸 | 不同料液比下混合脂肪酸组成/% | | | | | |
|---------------------|-----------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1:1 | | 1:2 | | 1:3 | |
| | 滤液 | 结晶 | 滤液 | 结晶 | 滤液 | 结晶 |
| C16:0 | 1.28 | 7.39 | 0.67 | 10.22 | 0.69 | 12.04 |
| C18:0 | 0.32 | 6.13 | 0.17 | 7.90 | 0.09 | 7.70 |
| C18:1 | 28.94 | 23.45 | 28.40 | 18.31 | 28.41 | 18.03 |
| C18:2 | 37.56 | 29.45 | 39.05 | 24.75 | 39.21 | 22.72 |
| C18:3 _{n6} | 0.85 | 0.30 | 0.94 | 0.03 | 0.98 | 0.06 |
| C18:3 _{n3} | 1.93 | 1.09 | 2.57 | 0.65 | 2.54 | 0.23 |
| C20:1 | 8.01 | 8.07 | 7.89 | 8.21 | 7.63 | 8.45 |
| C22:1 | 15.79 | 17.21 | 16.45 | 17.34 | 16.34 | 18.04 |
| C24:1 | 5.32 | 6.91 | 3.86 | 12.59 | 4.11 | 12.73 |

从表3可以看出,氯仿作为溶剂时,在料液比为1:1、1:2和1:3时,滤液和结晶中的神经酸含量变化较小。当料液比为1:1、1:2和1:3时,结晶中的神经酸含量分别为7.20%、7.47%和7.52%。与乙醇作为结晶溶剂相比,氯仿作为溶剂纯化神经酸的效果要差得多。因此,后续不再讨论氯仿作为溶剂时不同结晶时间对神经酸含量的影响。

从表4可以看出,甲醇作为溶剂时,在料液比为1:1、1:2和1:3时,结晶中的神经酸含量分别为6.91%、12.59%和12.73%。当料液比从1:1增加到1:2时,结晶中的神经酸含量显著提高,再继续增加料液比,神经酸含量提高不大。因此,甲醇作为溶剂时,混合脂肪酸与甲醇最适的料液比为1:2。同乙醇作为溶剂时相比,甲醇的纯化效果较差,而且甲醇与乙醇相比,具有一定的毒性。因此,本实验最终选

择乙醇作为溶剂,在料液比 1:3、结晶温度 -40°C 时继续优化结晶时间对神经酸含量的影响。

2.2.2 结晶时间的优化

实验过程中发现,结晶时间在 0.5 h 左右开始出现明显的结晶,因此选择结晶时间为 1、4 h 和 48 h,探究不同结晶时间对神经酸含量和收率的影响,结果见表 5。

表 5 不同结晶时间下结晶中的混合脂肪酸组成

| 脂肪酸 | 不同结晶时间下混合脂肪酸组成/% | | |
|---------|------------------|-------|-------|
| | 1 h | 4 h | 48 h |
| C16:0 | 8.47 | 12.57 | 12.49 |
| C18:0 | 5.32 | 7.46 | 7.57 |
| C18:1 | 20.77 | 18.45 | 18.33 |
| C18:2 | 29.45 | 23.47 | 22.90 |
| C18:3n6 | 0.32 | - | 0.04 |
| C18:3n3 | 0.89 | 0.19 | 0.25 |
| C20:1 | 8.16 | 8.19 | 8.14 |
| C22:1 | 16.94 | 16.56 | 16.54 |
| C24:1 | 9.68 | 13.11 | 13.74 |

从表 5 可以看出,在结晶时间分别为 1、4 h 和 48 h 时,结晶中的神经酸含量分别为 9.68%、13.11% 和 13.74%。当结晶时间从 1 h 延长到 4 h 时,结晶中的神经酸收率从 15.45% 增加到 65.48%,继续延长结晶时间到 48 h,结晶量没有显著提高,且结晶中的神经酸含量也呈现相同的规律。可见,在 1~4 h 时,结晶过程还未进行完全,在 4 h 后,结晶量基本不再增加,结晶过程基本完成,继续延长结晶时间对神经酸纯化效果的提高不显著,且造成了能源的浪费。因此,本实验最终选择乙醇作为结晶溶剂,在料液比 1:3、结晶温度 -40°C 、结晶时间 4 h 下纯化元宝枫籽油混合脂肪酸中的神经酸,在此条件下得到神经酸含量为 13.11%,神经酸收率为 65.48%。

由表 5 还可以看出:与元宝枫籽油混合脂肪酸相比,结晶产物中棕榈酸和硬脂酸的含量有所提高,而油酸和亚油酸含量明显降低;结晶产物中棕榈酸、油酸、亚油酸和芥酸含量比较高,后续可以尝试采用多次结晶的方式去除其中的饱和脂肪酸或多不饱和脂肪酸来进一步对神经酸进行纯化。由于芥酸与神经酸碳原子数相近,结构相似,要想得到高纯度的神经酸,芥酸与神经酸的分离也是一个关键的难点。目前较为有效的神经酸与芥酸分离方法为分子蒸馏法和尿素包合法。但这些纯化工艺普遍存在收率不高和成本过高的问题。

3 结论

元宝枫籽油经皂化后制备混合脂肪酸,混合脂

肪酸与乙醇按质量体积比 1:3 混合后在 -40°C 条件下低温结晶 4 h,抽滤后所得结晶中神经酸含量为 13.11%,神经酸收率为 65.48%。本实验通过低温结晶法纯化神经酸所需设备简单且生产成本低,易于实现工业生产,实验在低温条件下操作,不会影响神经酸的分子结构和理化性质。为了提高神经酸纯度和收率,能否进行多次低温结晶,或将低温结晶法与其他方法结合使用,需要做更进一步的研究。

参考文献:

- [1] FARQUHARSON J, JAMIESON E C, LOGAN R W, et al. Infant cerebral cortex phospholipid fatty - acid composition and diet[J]. Arch Dis Child - Fetal, 1992, 340(8823):810 - 813.
- [2] KATHERINE M, LIVINGSTONE J A, LOVEGROVE D, et al. The impact of substituting SFA in dairy products with MUFA or PUFA on CVD risk: evidence from human intervention studies[J]. Nutr Res Rev, 2012, 25(2):193 - 206.
- [3] 刘速速,周庆礼,孙华,等. 神经酸的功能及提纯工艺研究进展[J]. 中国油脂, 2019, 44(10):142 - 146.
- [4] 王熙才,左曙光,邱宗海,等. 艾舍尔软胶囊增强小鼠免疫力的实验研究[J]. 昆明医学院学报, 2008, 29(6):71 - 75, 89.
- [5] 王建民,黄伟素,冯凤琴,等. 神经酸在婴幼儿母乳化配方奶粉中的应用[J]. 中国乳品工业, 2003(2):26 - 29.
- [6] 王性炎,樊金栓,王姝清. 中国含神经酸植物开发利用研究[J]. 中国油脂, 2006, 31(3):69 - 71.
- [7] 王性炎. 中国元宝枫[M]. 成都:四川民族出版社, 2003.
- [8] 呼晓妹. 元宝枫种仁油的提取及其神经酸分离纯化的研究[D]. 北京:北京林业大学, 2010.
- [9] 徐明辉,张骊,陈东升,等. 元宝枫籽油及神经酸制取工艺[J]. 粮食与食品工业, 2017, 24(1):41 - 43.
- [10] 张元,侯相林. 元宝枫油中神经酸乙酯的分离提纯[J]. 中国油脂, 2010, 35(1):28 - 31.
- [11] 邵佩霞. 富含多不饱和脂肪酸甘油酯的酶法制备[D]. 广州:华南理工大学, 2010.
- [12] 王性炎,马新世,李全新,等. 用元宝枫油提取神经酸的工艺方法:CN1609090 [P]. 2005 - 04 - 27.
- [13] 徐文晖,王俊儒,梁倩. 元宝枫油中神经酸的初步分离[J]. 中国油脂, 2007, 32(11):49 - 51.
- [14] SOLAESA A G, SANZ M T, FALKEBORG M, et al. Production and concentration of monoacylglycerols rich in omega - 3 polyunsaturated fatty acids by enzymatic glycerolysis and molecular distillation[J]. Food Chem, 2016, 190:960 - 967.
- [15] ZHANG Y, WANG X S, XIE D, et al. One - step concentration of highly unsaturated fatty acids from tuna oil by low - temperature crystallization [J]. J Am Oil Chem Soc, 2017, 94(3):475 - 483.