

分子蒸馏联用制备液相色谱法制备高纯度 DHA 乙酯

周晓娇^{1,2}, 谢枫才^{1,3}, 陈敏嫣^{1,2}, 李志鹏¹, 张 宾¹, 孙继鹏²

(1. 浙江海洋大学 食品与药学院, 浙江 舟山 316022; 2. 浙江省海洋开发研究院, 浙江 舟山 316021; 3. 厦门汇盛生物有限公司, 福建 厦门 361100)

摘要:探讨藻油中二十二碳六烯酸(DHA)分离纯化工艺,通过改进工艺条件获得高纯度DHA乙酯(DHA-EE)。以乙酯化藻油为原料,采用分子蒸馏联用制备液相色谱法制备高纯度DHA-EE,通过单因素实验优化工艺条件。结果表明:最优分子蒸馏条件为蒸发温度105℃、内冷凝温度55℃、外冷凝温度30℃、物料温度30℃、刮膜速率160 r/min、真空度1 Pa、进料速度1 g/min,在此条件下DHA-EE纯度为72.1%,回收率为71.6%;最优制备液相色谱条件为采用YMC-PACK ODS-A制备柱(5 μm, 21.1 mm × 250 mm)、流动相甲醇-水(体积比95:5)、流速20 mL/min、上样量0.2 g、检测波长204 nm,在此条件下DHA-EE纯度达到96%以上,平均回收率为79.66%。

关键词:DHA乙酯;高纯度;分子蒸馏;制备液相色谱

中图分类号:TS225.6;TQ664 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2021)05-0028-05

Preparation of high purity DHA ethyl ester by molecular distillation and preparative liquid chromatography

ZHOU Xiaojiao^{1,2}, XIE Fengcai^{1,3}, CHEN Minyan^{1,2}, LI Zhipeng¹, ZHANG Bin¹, SUN Jipeng²

(1. College of Food Science and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, Zhejiang, China; 2. Zhejiang Institute of Marine Development, Zhoushan 316021, Zhejiang, China; 3. Xiamen Huisheng Biology Co., Ltd., Xiamen 361100, Fujian, China)

Abstract: The separation and purification process of decosahexaenoic acid (DHA) in algae oil were discussed, and high purity DHA ethyl ester (DHA-EE) was obtained by improving the process conditions. Using ethylated algae oil as the raw material, high purity DHA-EE was prepared by molecular distillation and preparative liquid chromatography, and the process conditions were optimized by single factor experiment. The results showed that the optimal molecular distillation conditions were obtained as follows: evaporation temperature 105 °C, internal condensation temperature 55 °C, external condensation temperature 30 °C, material temperature 30 °C, rotation speed 160 r/min, vacuum degree 1 Pa, and feed rate 1 g/min. Under these conditions, the purity of DHA-EE was 72.1%, and the recovery rate was 71.6%.

The optimal preparative liquid chromatography conditions were obtained as follows: using YMC-PACK ODS-A preparation column(5 μm, 21.1 mm × 250 mm), with methanol-water (volume ratio 95:5) as mobile phase, flow rate 20 mL/min, loading amount 0.2 g and detection wavelength 204 nm. Under these conditions, the DHA-EE purity reached more than 96%, and the average

收稿日期:2020-08-07;修回日期:2021-02-28

基金项目:厦门市海洋经济创新发展区域示范项目(16CZP012SF04);国家自然科学基金项目(31871871);浙江省自然科学基金项目(LY18C200008);温州市重大科技创新攻关项目(N20180011,ZD202003)

作者简介:周晓娇(1996),女,在读硕士,研究方向为水产品加工及贮藏(E-mail)1659049088@qq.com。

通信作者:张 宾,教授,博士(E-mail)zhangbin_ouc@163.com;孙继鹏,博士(E-mail)jipengsun@yeah.net。

recovery rate was 79.66%.

Key words: DHA-EE; high purity; molecular distillation; preparative liquid chromatograph

二十二碳六烯酸(DHA)除了能阻止胆固醇在血管壁上的沉积、预防或减轻动脉粥样硬化和冠心病外,还是大脑营养必不可少的高度不饱和脂肪酸,对大脑细胞有极其重要的作用^[1-3]。国内外公认EPA、DHA产品纯度在80%以上时对一些病症才具有显著的治疗效果,美国FDA药品数据库收录6个 $\omega-3$ 多不饱和脂肪酸乙酯处方药物,其中英国制药公司史克必成LAVOZA的DHA纯度达90%,已经获得了药物审批,加拿大奥贝泰克制药有限公司、美国帕尔制药公司、以色列梯瓦制药工业有限公司和特里格制药公司、美国Amneal pharmaceutical相关产品DHA纯度均达90%,因此获得高纯度的DHA成为该产业研究的热点^[4-6]。

分子蒸馏是目前工业生产高纯度DHA与EPA的方法之一^[7-8]。制备液相色谱技术是一种基于组分在固定相和流动相中分配系数的差异,当二者做相对运动时,样品中各组分将形成不同迁移速度的谱带而实现分离的新型高效分离技术^[9-10]。本研究以乙酯化藻油为原料,选用分子蒸馏和制备液相色谱技术联合,通过优化影响两种分离纯化方法的各种因素,获得最优DHA乙酯(DHA-EE)制备条件,为高纯度DHA-EE产业化制备工艺提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

乙酯化藻油(DHA-EE纯度50%),厦门汇盛生物有限公司。无水甲醇(分析纯),汕头达濠精细化学品有限公司;甲醇、正己烷,均为色谱纯,美国天地有限公司。

7890B型气相色谱仪,美国安捷伦科技有限公司;QUIKSepP0050D-II型制备液相色谱仪,北京慧得易科技有限公司;N-1200B型旋转蒸发器,杭州庚雨仪器有限公司;Milli-Q型超纯水仪,密理博中国有限公司;KDL-2分子蒸馏仪,德国UIC公司。

1.2 实验方法

1.2.1 分子蒸馏法联用制备液相色谱法制备高纯度DHA-EE

分子蒸馏法:打开分子蒸馏冷却水系统,设定冷却水温度为25℃,打开真空系统,在冷阱中加入液氮,打开加热器电源进行加热;待真空度和蒸发温度达到实验所需条件时,加入乙酯化藻油,在不同的蒸发温度、真空度、进料速度下进行蒸馏分离。

制备液相色谱法:设置实验条件(色谱柱、流动相比及流速、上样量),色谱柱先用100%甲醇冲洗,之后用初始浓度的流动相平衡。进样后,色谱工作站在线检测,根据色谱图出现的信号峰,收集各个信号峰(从出峰开始收集,当峰回到基线时停止。若两个峰没有基线分离,则收集到第一个峰拐点停止收集,并开始收集第二个峰)。对收集的样品进行气相色谱、液相色谱检测,判断,若收集的是DHA-EE,对其浓缩蒸干,离心除水。

1.2.2 DHA-EE纯度测定

气相色谱法(GC):SUPELCO SP-2560石英毛细管柱(100 m × 0.25 mm × 0.2 μm),载气为高纯氦气,采用恒压模式,压力216.5 kPa,分流比10:1;进样口温度270℃,检测器温度280℃;柱温120℃保持3 min,以3℃/min升至210℃,保持1 min,以0.5℃/min升至219℃,保持1 min,以10℃/min升至240℃,保持13.5 min;分析时间68.6 min。

高效液相色谱法(HPLC):参照文献[11]方法进行测定。

2 结果与讨论

2.1 分子蒸馏法纯化DHA-EE条件优化

2.1.1 蒸发温度选择

在真空度1 Pa、进料速度1 g/min、刮膜速率160 r/min、物料温度30℃、外冷凝温度30℃、内冷凝温度比蒸发温度低50℃条件下,分别选取蒸发温度90、100、105、110、120℃和130℃进行分子蒸馏,通过气相色谱法分析DHA-EE纯度,计算DHA-EE回收率,考察蒸发温度对藻油DHA-EE纯度和DHA-EE回收率的影响,结果见图1。

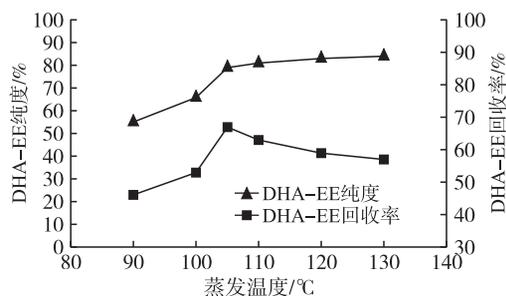


图1 蒸发温度对藻油DHA-EE纯度及DHA-EE回收率的影响

从图1可以看出:随着蒸发温度升高,DHA-EE纯度不断提高;DHA-EE回收率在105℃达到峰值,随后逐渐降低。蒸发温度升高,大部分

DHA-EE 从轻组分逸出,因此蒸发温度升高,DHA-EE 的纯度不断提高^[12-13]。当蒸发温度高于 105 °C 时,少部分 DHA-EE 从轻组分逸出,使 DHA-EE 回收率降低^[14]。因此,从产品回收率和纯度两方面考虑,选用 105 °C 作为后续实验的蒸发温度。

2.1.2 真空度选择

在进料速度 1 g/min、刮膜速率 160 r/min、蒸发温度 105 °C、物料温度 30 °C、外冷凝温度 30 °C、内冷凝温度 55 °C 条件下,选取真空度 0.1、1、10、100 Pa 和 1 000 Pa 进行分子蒸馏,通过气相色谱法分析 DHA-EE 纯度,计算 DHA-EE 回收率,考察真空度对藻油 DHA-EE 纯度和 DHA-EE 回收率的影响,结果见图 2。

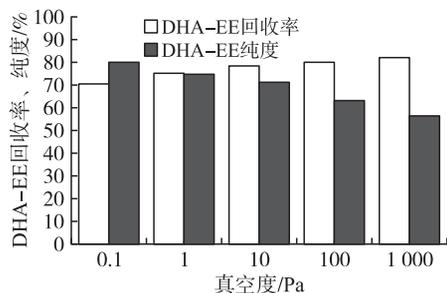


图2 真空度对藻油 DHA-EE 纯度及 DHA-EE 回收率的影响

从图 2 可以看出,当真空度从 0.1 Pa 上升到 1 000 Pa 时,DHA-EE 回收率不断上升,DHA-EE 纯度不同程度地下降,这是由于真空度增加,低沸点脂肪酸杂质及 DHA-EE 均难以蒸馏,多以重组分形式保留。因此,分子蒸馏的真空度越低,越有利于 DHA-EE 与其他脂肪酸乙酯分离。由于工业化生产真空度最低能到 1 Pa,因此综合产品回收率和纯度两方面考虑,选用 1 Pa 作为后续分子蒸馏实验的真空度。

2.1.3 进料速度选择

在真空度 1 Pa、刮膜速率 160 r/min、蒸发温度 105 °C、物料温度 30 °C、外冷凝温度 30 °C、内冷凝温度 55 °C 条件下,选取进料速度分别为 0.5、1、1.5、2、2.5 g/min 进行分子蒸馏,通过气相色谱法分析 DHA-EE 纯度,计算 DHA-EE 回收率,考察进料速度对藻油 DHA-EE 纯度和 DHA-EE 回收率的影响,结果见图 3。从图 3 可以看出:在进料速度为 1 g/min 时,藻油中 DHA-EE 回收率达到最大值,为 71.6%;在进料速度从 0.5 g/min 增加到 1 g/min 时,DHA-EE 纯度缓慢下降,在进料速度从 1 g/min 增加到 2.5 g/min 时,DHA-EE 纯度下降速度较

快,进料速度为 1 g/min 时,DHA-EE 纯度为 72.1%。综合考虑实验效率、DHA-EE 纯度和 DHA-EE 回收率,选择 1 g/min 作为分子蒸馏进料速度。

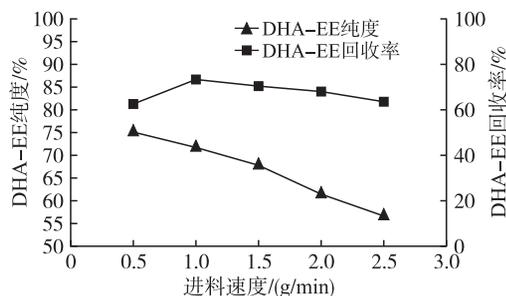


图3 进料速度对藻油 DHA-EE 纯度及 DHA-EE 回收率的影响

2.2 制备液相色谱法分离纯化 DHA-EE 条件优化

2.2.1 色谱柱筛选

通过分析 HPLC 目标峰与其他杂质峰分离效果,从而确定色谱柱填料类型。HPLC 条件:波长 204 nm,流动相甲醇-水(体积比 95:5),流速 1 mL/min,上样量 10 μL。通过比较筛选出 3 种分析色谱柱,分别为纳微 C8(5 μm,4.6 mm×250 mm)、Hypersil GOLD(5 μm,4.6 mm×250 mm)、YMC-PACK ODS-A(5 μm,4.6 mm×250 mm)。

对分析柱配套的制备柱进行测试,发现纳微 C8(5 μm,21.5 mm×250 mm)无法将 DHA-EE 与其他峰分离,而 Hypersil GOLD(5 μm,21.2 mm×250 mm)与 YMC-PACK ODS-A(5 μm,21.1 mm×250 mm)均能将 DHA-EE 与其他杂质峰分离,但 YMC-PACK ODS-A(5 μm,21.1 mm×250 mm)制备柱保留时间小于 Hypersil GOLD 制备柱,所以选用 YMC-PACK ODS-A(5 μm,21.1 mm×250 mm)作为后续研究制备色谱柱。

2.2.2 流动相选择

在波长 204 nm、流速 20 mL/min、上样量 0.5 mL 条件下,选取流动相分别为甲醇-水(体积比 100:0)、甲醇-水(体积比 98:2)、甲醇-水(体积比 95:5)、甲醇-水(体积比 92:8),选用 YMC-PACK ODS-A 制备柱(5 μm,21.1 mm×250 mm)进行藻油 DHA-EE 分离,考察流动相对藻油中 DHA-EE 分离效果的影响,结果见图 4。从图 4 可以看出,当流动相为甲醇-水(体积比 95:5)时,DHA-EE 峰与 DPA-EE 及其他杂峰达到基线分离,可满足纯化制备要求。在该流动相条件下,其分离运行时间显著短于甲醇-水(体积比 92:8),从而可提高实验效率。综合考虑分离时间及效果,选择甲醇-水(体积比 95:5)作为流动相。

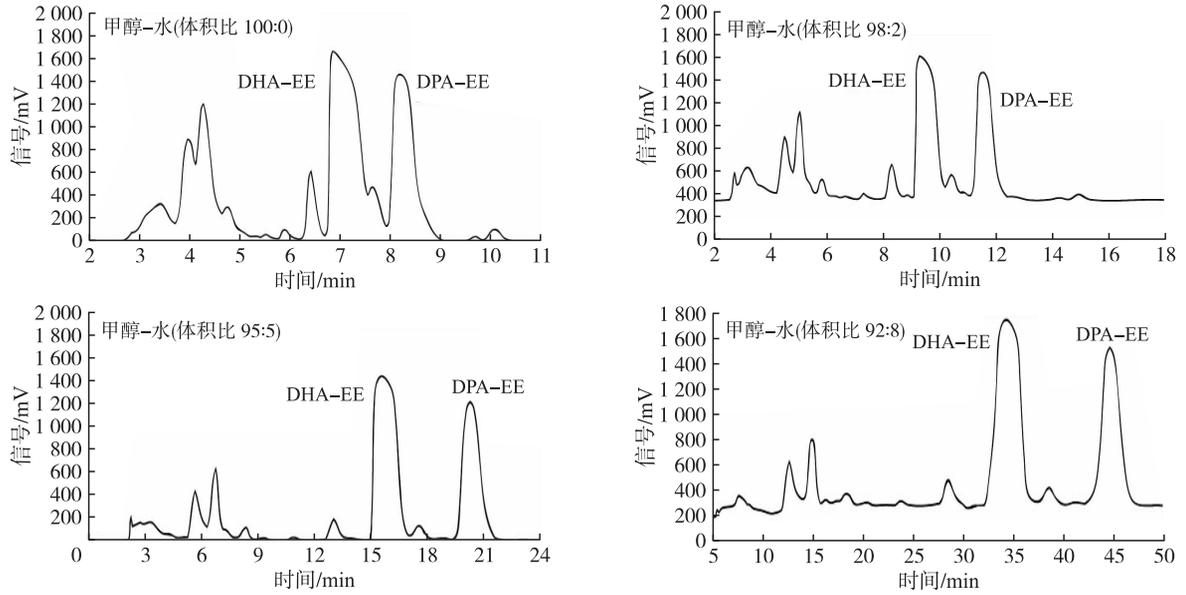


图4 不同流动相下藻油 DHA-EE 制备色谱图

2.2.3 流速选择

在波长 204 nm、流动相为甲醇-水(体积比 95:5)、上样量 0.5 mL 条件下,选取流速分别为 10、15、20 mL/min,选用 YMC-PACK ODS-A 制备柱(5 μm,21.1 mm×250 mm)进行藻油 DHA-EE 分离,考察流速对藻油中 DHA-EE 分离效果的影响,结果见图 5。从图 5 可以看出,流速为 20 mL/min 时,DHA-EE 保留时间较合理,且色谱峰峰形对称,与其他峰达到基线分离,满足制备要求。

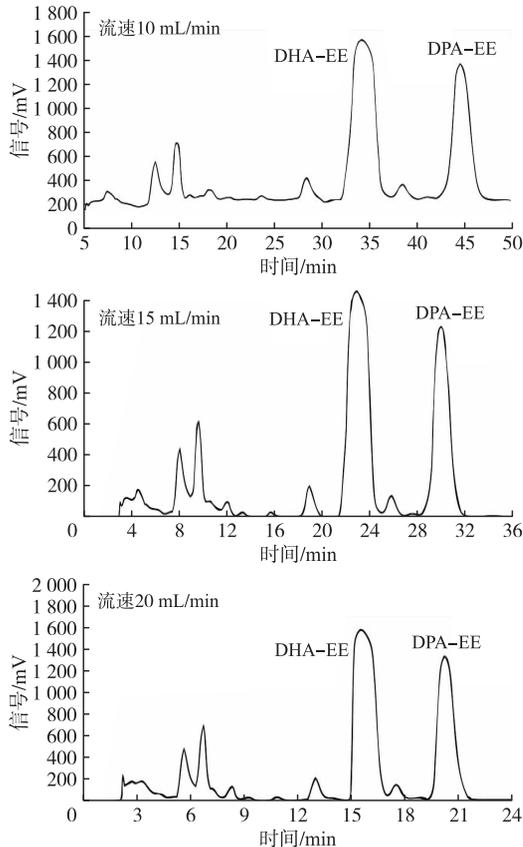


图5 不同流速下藻油 DHA-EE 制备色谱图

2.2.4 上样量确定

在波长 204 nm、流动相为甲醇-水(体积比 95:5)、流速 20 mL/min 条件下,选取上样量分别为 0.1、0.2、0.3 g,选用 YMC-PACK ODS-A 制备柱(5 μm,21.1 mm×250 mm)进行藻油 DHA-EE 分离,考察上样量对藻油中 DHA-EE 分离效果的影响,结果见图 6。从图 6 可以看出,当上样量为 0.3 g 时 DHA-EE 峰与杂峰重叠,无法达到制备要求,因此确定本方法的上样量为 0.2 g。

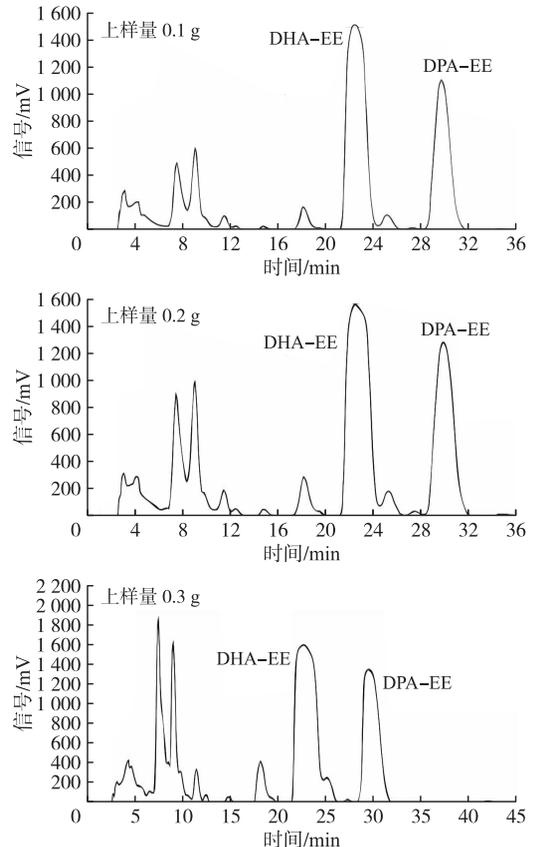


图6 不同上样量下藻油 DHA-EE 制备色谱图

2.2.5 连续进样稳定性分析

在最优制备条件进样,每次收集完 DHA-EE 馏分后连续进样,共进样 3 次,采用 HPLC 测定 DHA-EE 馏分中 DHA-EE 纯度,确定连续进样稳定性,结果见表 1 和图 7。

表 1 连续进样测定结果 %

序号	DHA-EE 纯度	DHA-EE 回收率
1	96.71	75.63
2	96.18	82.42
3	96.31	85.71
平均值	96.40	81.25

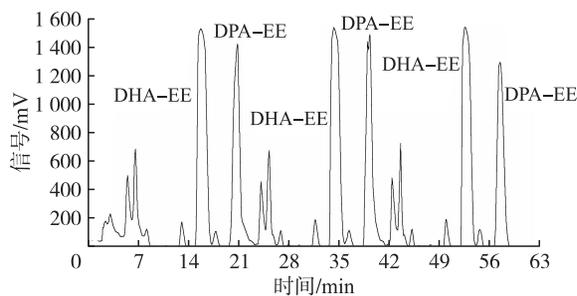


图 7 连续进样制备色谱图

从表 1 和图 7 可以看出,收集到的 DHA-EE 纯度差别不大,且都大于 96%,确定连续进样稳定性良好。

2.2.6 实际样品分离纯化

取 3 份质量均为 3.0 g 的分子蒸馏后乙酯化藻油样品,在上述最优制备条件下制备 DHA-EE,采用 HPLC 和 GC 检测 DHA-EE 纯度,并根据 HPLC 的结果计算 DHA-EE 回收率,结果见表 2。

表 2 实际样品分离纯化结果 %

序号	DHA-EE 纯度		DHA-EE 回收率
	HPLC	GC	
1	96.30	96.40	79.96
2	96.69	96.73	82.32
3	96.01	96.09	76.70
平均值	96.33	96.41	79.66

从表 2 可以看出,不同制备批次,藻油 DHA-EE 纯度变化不大,且 HPLC 和 GC 测得的 DHA-EE 纯度差别不大,都大于 96%,达到生产要求,平均回收率达到了 79.66%。

3 结论

通过单因素实验优化,得到分子蒸馏法分离纯化 DHA-EE 最优工艺条件为蒸发温度 105℃、内冷凝温度 55℃、外冷凝温度 30℃、物料温度 30℃、刮膜速率 160 r/min、真空度 1 Pa、进料速度 1 g/min,

在此条件下 DHA-EE 回收率为 71.6%,纯度为 72.1%。以分子蒸馏后乙酯化藻油中 DHA-EE 为分析对象,建立了制备液相色谱法分离纯化藻油中 DHA-EE 的方法,得到最优条件为采用 YMC-PACK ODS-A 制备柱(5 μm, 21.1 mm × 250 mm)、流动相为甲醇-水(体积比 95:5)、流速 20 mL/min、检测波长 204 nm、上样量 0.2 g,在此条件下 DHA-EE 纯度均达到 96% 以上,平均回收率为 79.66%。制备液相色谱法适用于分离纯化高纯微藻油中的 DHA-EE(DHA-EE 含量 70% 以上),分离效果好,操作简单,可连续进样制备。

参考文献:

- [1] 孔欣欣,郭楠楠. DHA 藻油生产技术及其在食品中的应用进展[J]. 食品与发酵科技, 2015(4): 88-91.
- [2] 黄茜,王淑慧,崔婧,等. DHA 藻油脂质体制备及性质的研究[J]. 中国粮油学报, 2019, 34(7): 84-89.
- [3] 郝颖,汪之和. EPA、DHA 的营养功能及其产品安全性分析[J]. 现代食品科技, 2006, 22(3): 180-183.
- [4] 代荣阳. DHA 和 EPA 的抗炎及免疫调节功能[J]. 泸州医学院学报, 2004, 27(1): 83-84.
- [5] 许友卿,张海柱,丁兆坤. 二十二碳六烯酸和二十碳五烯酸研究进展(1)[J]. 生物学通报, 2007, 42(12): 13-15.
- [6] 古绍彬,虞龙,向砥,等. 利用海洋微藻生产 DHA 和 EPA 的研究现状及前景[J]. 中国水产科学, 2001, 8(3): 90-93.
- [7] 方旭波,龚馥芳,蒋雅美,等. 分子蒸馏和尿包结合法富集乙酯化 EPA/DHA[J]. 中国食品学报, 2013, 13(4): 101-106.
- [8] 王亚男,徐茂琴,季晓敏,等. 分子蒸馏富集金枪鱼油 ω-3 脂肪酸的研究[J]. 中国食品学报, 2014, 14(7): 52-58.
- [9] 魏莉,张焜,方岩雄,等. 制备型高效液相色谱技术的研究进展[J]. 广东化工, 2005, 32(11): 5-7.
- [10] 王华,韩金玉,常贺英. 新型分离技术:工业高效制备色谱[J]. 现代化工, 2004, 24(10): 63-65.
- [11] 谢枫才,张宾,孙继鹏. 藻油中 DHA-EE 的 HPLC 快速定量方法的建立[J]. 集美大学学报, 2018, 23(3): 187-194.
- [12] 吴琼,邹险峰,陈丽娜,等. 分子蒸馏法富集葵花油中的亚油酸[J]. 粮食与油脂, 2015, 28(10): 28-30.
- [13] 傅红,裘爱泳. 分子蒸馏法富集鱼油 ω-3 脂肪酸[J]. 中国粮油学报, 2006, 21(3): 156-159.
- [14] 刘辉,董家和,张莹,等. 分子蒸馏法富集椰子油中月桂酸工艺条件的优化研究[J]. 中国油脂, 2019, 44(4): 50-53.