

低温溶剂结晶法富集鸦胆子油不饱和脂肪酸乙酯

杜彦鹏, 李进伟, 刘元法

(江南大学 食品学院, 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要:以鸦胆子油为原料,经醇解制得脂肪酸乙酯,采用低温溶剂结晶法富集不饱和脂肪酸乙酯,以不饱和脂肪酸乙酯含量、得率为评价指标,分别考察溶剂种类、结晶温度、结晶时间、溶剂与脂肪酸乙酯体积比以及结晶次数对分离效果的影响。结果表明,低温溶剂结晶法富集鸦胆子油不饱和脂肪酸乙酯的最佳条件为:乙醇作为溶剂,溶剂与脂肪酸乙酯体积比3:1,结晶温度-20℃,结晶时间7 d,结晶次数2次。在最佳条件下,鸦胆子油脂肪酸乙酯中不饱和脂肪酸乙酯含量由86.49%升高至95.32%,得率为85.4%。

关键词:鸦胆子油; 不饱和脂肪酸乙酯; 低温溶剂结晶法; 富集

中图分类号: TS225.1; O513

文献标识码: A

文章编号: 1003-7969(2020)11-0058-05

Enrichment of unsaturated fatty acid ethyl ester of *Brucea javanica* oil by low – temperature solvent crystallization

DU Yanpeng, LI Jinwei, LIU Yuanfa

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

Abstract: Fatty acid ethyl ester of *Brucea javanica* oil was prepared by alcoholysis with *Brucea javanica* oil, and the unsaturated fatty acid ethyl ester was enriched by low – temperature solvent crystallization. The content and yield of unsaturated fatty acid ethyl ester were used as evaluation indicators, the effects of solvent type, crystallization temperature, crystallization time, volume ratio of solvent to fatty acid ethyl ester and crystallization times on the separation effect were investigated. The results showed that the optimal conditions for enriching unsaturated fatty acid ethyl ester of *Brucea javanica* oil by low – temperature solvent crystallization were obtained as follows: with ethanol as solvent, volume ratio of solvent to fatty acid ethyl ester 3:1, crystallization temperature -20℃, crystallization time 7 d and crystallization times twice. Under these conditions, the content of unsaturated fatty acid ethyl ester in fatty acids ethyl ester of *Brucea javanica* oil increased from 86.49% to 95.32% with a yield of 85.4%.

Key words: *Brucea javanica* oil; unsaturated fatty acid ethyl ester; low – temperature solvent crystallization; enrichment

鸦胆子为苦木科鸦胆子属植物,是一种传统的中药,被用于治疗疟疾、痢疾、炎症以及多种癌症,多产于我国南方沿海的热带和亚热带地区^[1-2]。

鸦胆子油是鸦胆子的干燥成熟果实经石油醚萃取后得到的^[3]。研究显示,鸦胆子油具有抗癌活

性,已广泛用于肺癌、食管癌、肝癌、膀胱癌、胃癌、卵巢癌、前列腺癌等的治疗中^[4-6]。鸦胆子油的主要成分为不饱和脂肪酸,其中以油酸、亚油酸为主,含量约为86%,除此之外还含有约13%的饱和脂肪酸以及少量三萜类化合物^[1,7]。

碘化油是肝癌治疗手段肝动脉栓塞化疗术(TACE)中常用的栓塞剂,由碘加成不饱和脂肪酸乙酯而得,常用原料为罂粟籽油和核桃油等^[8-9]。但传统的碘化油并没有抗癌活性,因此将鸦胆子油

收稿日期:2020-01-07;修回日期:2020-02-13

作者简介:杜彦鹏(1994),男,硕士研究生,研究方向为油脂及植物蛋白工程(E-mail)duyanpeng1994@163.com。

通信作者:刘元法,教授(E-mail)foodscilyf@163.com。

乙酯碘化制备具有抗癌活性的碘化油具有重要意义^[10]。由于鸭胆子油乙酯直接碘化所制的碘化油碘含量低并且质量不稳定,为了提高碘化鸭胆子油的碘含量以及质量稳定性,需要将鸭胆子油乙酯中的饱和脂肪酸乙酯去除。

目前,国内针对脂肪酸的分离与富集研究较多,而对于脂肪酸乙酯的分离、富集研究却相对较少,且主要研究对象为鱼油^[11-12],对于鸭胆子油脂肪酸乙酯的分离未见报道。本文利用在低温条件下,饱和脂肪酸乙酯和不饱和脂肪酸乙酯在某些有机溶剂中的溶解度差异,去除鸭胆子油脂肪酸乙酯中的饱和脂肪酸乙酯,富集其不饱和脂肪酸乙酯,主要考察溶剂种类、结晶温度、结晶时间、溶剂与脂肪酸乙酯体积比以及结晶次数等因素对低温溶剂结晶过程中脂肪酸乙酯分离效果的影响,以期在不饱和脂肪酸乙酯的富集和分离提供一条新途径。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 原料与试剂

鸭胆子购买于亳州中药材市场,采用石油醚(60~90℃)浸提法从鸭胆子中提取得到鸭胆子油。乙醇、石油醚、甲醇钠、异丙醇、丙酮均为分析纯,由国药试剂公司提供。

1.1.2 仪器与设备

RE-3000 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;GA-5000A 低噪声空气泵,北京中兴汇利科技发展有限公司;RW20DS025 搅拌器,上海翼控机电有限公司;HH-02 恒温水浴锅,金坛市精达仪器厂;XW80-A 旋涡混匀器,江苏秉宏生物科技有限公司;ME204E 电子天平,梅特勒-托利多仪器有限公司;GC-2030Plus 气相色谱仪,日本岛津公司;低温反应釜,德国 LAUDA。

1.2 试验方法

1.2.1 鸭胆子油理化性质及脂肪酸组成的测定

过氧化值的测定参考 GB 5009.227—2016《食品安全国家标准 食品中过氧化值的测定》;酸价的测定参考 GB 5009.229—2016《食品安全国家标准 食品中酸价的测定》;碘值的测定参考 GB/T 5532—2008《动植物油脂 碘值的测定》;水分及挥发物含量的测定参考 GB 5009.3—2016《食品安全国家标准

食品中水分的测定》;相对密度的测定参考 GB 5009.2—2016《食品安全国家标准 食品相对密度的测定》;脂肪酸组成的测定参考 GB 5009.168—2016《食品安全国家标准 食品中脂肪酸的测定》。

1.2.2 脂肪酸乙酯的制备^[7]

称取 100 g 鸭胆子油于夹层反应器中,预热至 75℃,添加 40 mL 无水乙醇和 0.6 g 甲醇钠,75℃ 恒温反应 2 h,将反应液转移至分液漏斗,充分静置分层,取上层液体减压蒸馏回收没有反应的无水乙醇,并用蒸馏水洗至中性并干燥,得到鸭胆子油脂肪酸乙酯。

1.2.3 低温溶剂结晶法富集不饱和脂肪酸乙酯

将鸭胆子油脂肪酸乙酯与相应溶剂按照一定比例混合均匀,转移至低温反应釜中,低温结晶一定时间后,于低温下快速抽滤,取滤液于 65℃ 旋转蒸发,得富集后鸭胆子油脂肪酸乙酯。按下式计算不饱和脂肪酸乙酯得率。

$$X = \frac{m_1 \times \omega_1}{m_0 \times \omega_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中: X 为不饱和脂肪酸乙酯得率; m_1 为产品质量,g; ω_1 为产品中不饱和脂肪酸乙酯含量,%; m_0 为鸭胆子油脂肪酸乙酯质量,g; ω_0 为鸭胆子油脂肪酸乙酯中不饱和脂肪酸乙酯含量,%。

1.2.4 脂肪酸乙酯组成分析

参照文献[13]采用气相色谱法测定鸭胆子油脂肪酸乙酯组成。

气相色谱分析条件:岛津 GC-2030Plus 气相色谱仪;FID 检测器;TR-FAME 毛细管色谱柱(60 m × 0.25 mm × 0.25 μm);进样口温度 250℃;检测器温度 260℃;升温程序为初始温度 180℃,保持 2 min,以 3℃/min 速率升温至 220℃,保持 15 min;进样量 1 μL;分流比 20:1。根据各脂肪酸标准品保留时间与鸭胆子油脂肪酸乙酯样品比较,确定各脂肪酸乙酯的组成,并根据峰面积归一化法计算各脂肪酸乙酯的相对含量。

2 结果与讨论

2.1 鸭胆子油的基本性质(见表1、表2)

鸭胆子油的酸价、碘值、过氧化值、相对密度、水分及挥发物含量如表1所示。鸭胆子油脂肪酸组成及含量见表2。

表1 鸭胆子油的基本性质

酸价(KOH)/(mg/g)	碘值(I)/(g/100 g)	过氧化值/(g/100 g)	水分及挥发物含量/%	相对密度
0.96	97.32	1.59	1.89	0.92

由表1可知,鸭胆子油酸价(KOH)、碘值(I)、过氧化值分别为0.96 mg/g、97.32 g/100 g 和 1.59 g/100 g。

由表2可知, 鸭胆子油脂肪酸主要由棕榈酸、硬脂酸、油酸和亚油酸组成, 含量分别为7.22%、5.65%、66.16%和18.19%, 不饱和脂肪酸含量为86.3%。

表2 鸭胆子油脂肪酸组成及含量

脂肪酸	含量/%
肉豆蔻酸	0.19
棕榈酸	7.22
硬脂酸	5.65
油酸	66.16
亚油酸	18.19
花生一烯酸	1.02
亚麻酸	0.62
芥酸	0.31
其他	0.31

2.2 鸭胆子油脂肪酸乙酯组成(见表3)

表3 鸭胆子油脂肪酸乙酯组成及含量

脂肪酸乙酯	含量/%
肉豆蔻酸乙酯	0.18
棕榈酸乙酯	7.32
硬脂酸乙酯	5.68
油酸乙酯	66.52
亚油酸乙酯	18.08
花生一烯酸乙酯	0.94
亚麻酸乙酯	0.66
芥酸乙酯	0.29
其他	0.33

参考仲晗实等^[7]的方法, 采用碱法催化进行乙酯化, 经测定鸭胆子油脂肪酸乙酯得率为91.78%。由表3可知, 鸭胆子油脂肪酸乙酯中饱和脂肪酸乙酯主要为棕榈酸乙酯和硬脂酸乙酯, 含量分别为7.32%、5.68%, 不饱和脂肪酸乙酯主要为油酸乙酯和亚油酸乙酯, 含量分别为66.52%、18.08%。饱和脂肪酸乙酯含量为13.18%, 不饱和脂肪酸乙酯含量为86.49%。

2.3 低温溶剂结晶法富集鸭胆子油不饱和脂肪酸乙酯工艺条件优化

2.3.1 溶剂种类对分离效果的影响

在溶剂与鸭胆子油脂肪酸乙酯体积比3:1、结晶温度-20℃、结晶时间6d、结晶次数1次条件下, 考察溶剂种类对分离效果的影响, 结果如图1所示。

由图1可知, 不同溶剂种类对脂肪酸乙酯分离效果的影响较大, 石油醚分离效果最差, 乙醇分离效果最好, 这由饱和、不饱和脂肪酸乙酯于低温条件下, 在不同溶剂中的溶解度差异导致^[14], 不饱和脂肪酸乙酯的极性相对大于饱和脂肪酸乙酯的极性, 因此适度增加溶剂的极性, 将有利于提高分离效果。

虽然以乙醇为溶剂时, 不饱和脂肪酸乙酯的得率较其他溶剂稍低, 但其不饱和脂肪酸乙酯含量较高, 超过92%, 并且乙醇毒性较低, 价格低廉, 所以综合考虑, 选取乙醇为溶剂。

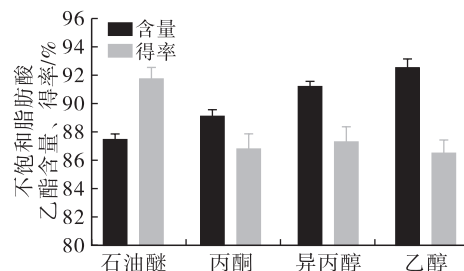


图1 溶剂种类对分离效果的影响

2.3.2 结晶温度对分离效果的影响

以乙醇为溶剂, 在溶剂与鸭胆子油脂肪酸乙酯体积比3:1、结晶时间6d、结晶次数1次条件下, 考察结晶温度对分离效果的影响, 结果如图2所示。

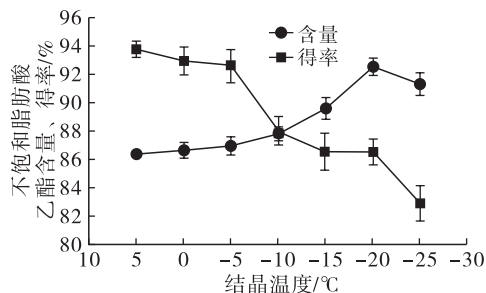


图2 结晶温度对分离效果的影响

由图2可知, 随着结晶温度的降低, 鸭胆子油不饱和脂肪酸乙酯的含量逐渐增高随后降低, 在-20℃时为最高值。尽管得率持续下降, 但是结晶温度的降低有利于饱和脂肪酸乙酯的结晶沉淀, 然而如果结晶温度太低, 则在体系中倾向于产生更多细小晶核, 形成细软、不稳定的晶体, 导致体系变成黏稠状, 致使分子难以移动, 不利于晶体的成长, 影响结晶度, 并且大量细小晶体的存在会使过滤效果变差, 导致得率的降低。因此, 选取-20℃作为结晶温度。

2.3.3 结晶时间对分离效果的影响

以乙醇为溶剂, 在溶剂与鸭胆子油脂肪酸乙酯体积比3:1、结晶温度-20℃、结晶次数1次条件下, 考察结晶时间对分离效果的影响, 结果如图3所示。

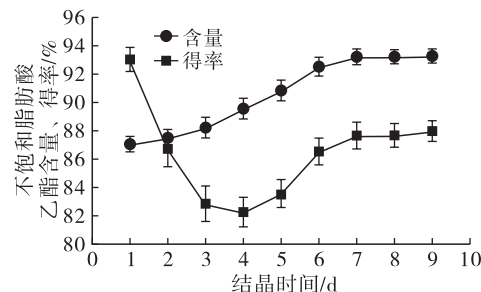


图3 结晶时间对分离效果的影响

由图3可知,随着结晶时间的延长,不饱和脂肪酸乙酯含量逐渐增加,并在7 d之后趋于稳定,为93%以上,而得率先降低后增加,这是由于结晶时间不足时,体系中存在较多的细小晶体,其还未来得及形成较大稳定晶体,在抽滤过程中,细小晶体可能再次融化,导致不饱和脂肪酸含量的降低,除此之外,细小晶体的存在还会导致体系黏度的增加,影响过滤效果,致使得率下降。当结晶时间达到7 d以上时,不饱和脂肪酸乙酯含量和得率都趋于稳定,所以选取结晶时间为7 d。

2.3.4 溶剂与脂肪酸乙酯体积比对分离效果的影响

以乙醇为溶剂,在结晶温度 -20°C 、结晶时间7 d、结晶次数1次条件下,考察溶剂与脂肪酸乙酯体积比对分离效果的影响,结果如图4所示。

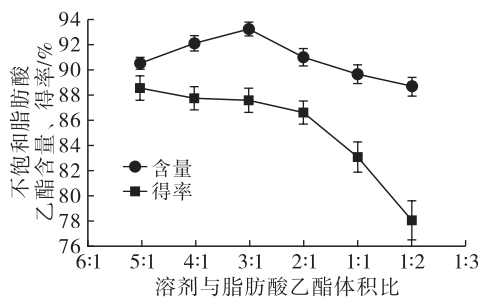


图4 溶剂与脂肪酸乙酯体积比对分离效果的影响

由图4可知,不饱和脂肪酸乙酯含量随着溶剂与脂肪酸乙酯体积比的降低先增加后降低,当溶剂与脂肪酸乙酯体积比为3:1时,不饱和脂肪酸乙酯含量最高,为93.2%,而不饱和脂肪酸乙酯得率先缓慢降低,然后迅速降低。当溶剂用量较多时,尽管有利于分离,但会增加饱和脂肪酸乙酯的溶解,导致体系中饱和脂肪酸乙酯的残留增加,从而降低产品中不饱和脂肪酸乙酯含量,而当溶剂用量较少时,又会增加体系的黏度,造成分离困难,影响结晶效果和产品得率。因此,综合考虑,选取溶剂与脂肪酸乙酯体积比3:1为宜。

2.3.5 结晶次数对分离效果的影响

以乙醇为溶剂,在溶剂与鸡胆子油脂脂肪酸乙酯体积比3:1、结晶温度 -20°C 、结晶时间7 d条件下,考察结晶次数对分离效果的影响,结果如图5所示。

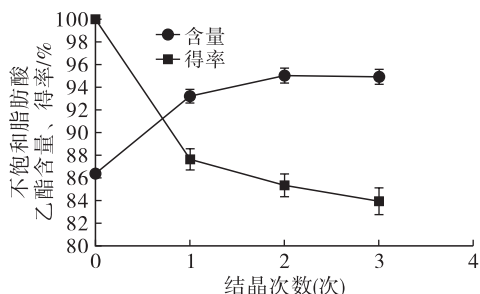


图5 结晶次数对分离效果的影响

由图5可知,增加结晶次数有利于不饱和脂肪酸乙酯的富集,结晶2次时,不饱和脂肪酸乙酯含量可达95%左右,但再增加结晶次数,不饱和脂肪酸乙酯含量基本不会产生太大变化,反而会降低不饱和脂肪酸乙酯的得率,还会导致成本的增加。因此,适宜的结晶次数为2次。

2.3.6 验证试验

综合上述结果,即以乙醇为溶剂,在溶剂与鸡胆子油脂脂肪酸乙酯体积比3:1、结晶温度 -20°C 、结晶时间7 d、结晶2次的条件下,对鸡胆子油不饱和脂肪酸乙酯进行富集,产品中脂肪酸乙酯组成及含量见表4。

表4 产品中脂肪酸乙酯组成及含量

脂肪酸乙酯	含量/%
肉豆蔻酸乙酯	0.11
棕榈酸乙酯	3.46
硬脂酸乙酯	0.73
油酸乙酯	74.27
亚油酸乙酯	20.13
花生一烯酸乙酯	0.20
亚麻酸乙酯	0.70
芥酸乙酯	0.02
其他	0.38

对比表3、表4可知,采用低温溶剂法富集后,鸡胆子油脂脂肪酸乙酯中饱和脂肪酸乙酯含量由13.18%降至4.30%,不饱和脂肪酸乙酯含量由86.49%升至95.32%。其中,主要饱和脂肪酸乙酯棕榈酸乙酯和硬脂酸乙酯含量分别由7.32%、5.68%降至3.46%、0.73%,主要不饱和脂肪酸乙酯油酸乙酯和亚油酸乙酯含量分别由66.52%、18.08%升至74.27%、20.13%。经计算,富集后鸡胆子油脂脂肪酸乙酯得率为85.4%,符合预期水平。

3 结论

本研究采用低温溶剂结晶法对鸡胆子油脂脂肪酸乙酯中的不饱和脂肪酸乙酯进行富集,得到低温溶剂结晶法富集鸡胆子油不饱和脂肪酸乙酯的最佳条件为:以乙醇为溶剂,溶剂与鸡胆子油脂脂肪酸乙酯体积比3:1,结晶温度 -20°C ,结晶时间7 d,结晶次数2次。在最佳条件下,鸡胆子油脂脂肪酸乙酯中不饱和脂肪酸乙酯含量由86.49%升高至95.32%,得率为85.4%。采用低温溶剂结晶法富集不饱和脂肪酸乙酯是一种行之有效的方法。本研究可为不饱和脂肪酸乙酯的富集和分离提供一定的理论基础,也为其工业化生产提供了可能。

(下转第76页)

由表4可知:相对于国标方法,本方法增大了取样量,降低了可能由取样带来的随机误差;在前处理上耗时短,有机溶剂使用量小,且无需过柱净化,大大降低检测成本。本方法在检出限及定量限上均低于国标方法,灵敏度满足检测要求。由表5可知,10份样品中,两种方法相对误差小于等于6.35%,符合标准中不得高于20%的要求。说明本方法适用于植物油中苯并(a)芘含量的测定。

3 结论

本研究采用直接萃取法,对植物油中苯并(a)芘含量进行测定。本方法在苯并(a)芘质量浓度0.1~20 ng/mL范围内线性关系良好,相关系数(R^2)为0.999 9,检出限为0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$,样品加标回收率在93.5%~102.5%之间。与国标方法(GB 5009.27—2016)比较,本方法快速简便,低消耗低成本,在回收率和精密度上均满足要求,可用于植物油中苯并(a)芘的高通量检测,具有较强实际应用价值。

参考文献:

[1] ZHANG J, CHANG L, JIN H, et al. Benzopyrene promotes lung cancer A549 cell migration and invasion through up -

regulating cytokine IL8 and chemokines CCL2 and CCL3 expression[J]. *Exp Biol Med*, 2016, 241(14): 1516 - 1523.

- [2] CHEN Y, HUANG Y, HUANG C, et al. Benzo[a]pyrene repressed DNA mismatch repair in human breast cancer cells[J]. *Toxicology*, 2013, 304: 167 - 172.
- [3] MARTORELL I, PERELL G, MARTICID R, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in foods and estimated PAH intake by the population of Catalonia, Spain; temporal trend [J]. *Environ Int*, 2010, 36(5): 424 - 432.
- [4] Commission regulation (EU) No 835/2011 of 19 August 2011. Amending regulation(EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in foodstuffs [EB/OL]. [2020 - 02 - 04]. <http://down.foodmate.net/standard/sort/44/28363.html>.
- [5] 食品安全国家标准 食品中污染物限量: GB 2762—2017 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- [6] 江露, 汪善良. 反相高效液相色谱法测定植物油中苯并(a)芘的研究[J]. *食品科学技术学报*, 2017, 35(5): 91 - 94.
- [7] 彭小东, 王欢, 李红洲, 等. 液相萃取 - 反相高效液相色谱法联用测定植物油中的苯并(a)芘[J]. *中国油脂*, 2018, 43(10): 112 - 114.

(上接第61页)

参考文献:

[1] 石修璞, 赵浩如. 鸦胆子油的研究进展[J]. *西北药学杂志*, 2010, 25(3): 240 - 242.

[2] HUANG Y F, ZHOU J T, QU C, et al. Anti-inflammatory effects of *Brucea javanica* oil emulsion by suppressing NF- κ B activation on dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice[J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 198: 389 - 398.

[3] 中华人民共和国卫生部药品标准 中药成方制剂[S]. 北京: 中华人民共和国卫生部药典委员会, 1997.

[4] 赵楠, 韩凤娟, 王桂媛, 等. 鸦胆子油乳抗肿瘤机制及其临床应用研究进展[J]. *生物技术通讯*, 2014, 25(5): 738 - 741.

[5] SHI W R, LIU Y, WANG X T, et al. Antitumor efficacy and mechanism in hepatoma H22-bearing mice of *Brucea javanica* oil[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015(4): 217494 [2020 - 02 - 11]. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/217494>.

[6] WANG D, QU X, ZHUANG X, et al. Seed oil of *Brucea javanica* induces cell cycle arrest and apoptosis via reactive

oxygen species-mediated mitochondrial dysfunction in human lung cancer cells[J]. *Nutr Cancer*, 2016, 68(8): 1394 - 1403.

- [7] 仲晗实, 康宇, 刘元法, 等. 鸦胆子油的乙酯化工艺研究[J]. *中国油脂*, 2018, 43(9): 112 - 115.
- [8] 韩珂, 叶丽卡, 吴传斌. X线造影剂碘化油的性能评价[J]. *广东药学院学报*, 2013, 29(6): 620 - 624.
- [9] 程红岩. 肝癌介入治疗的现状与展望[J]. *临床肝胆病杂志*, 2016, 32(1): 3 - 8.
- [10] 杨兆琪, 仲晗实, 康宇. 一种具有抗癌效果的鸦胆子碘化油及其制备和应用: CN107308191A[P]. 2017 - 11 - 03.
- [11] 刘润哲, 彭桦, 梅连平, 等. 脂肪酸乙酯的制备与纯化[J]. *粮食与食品工业*, 2010, 17(5): 22 - 25.
- [12] 程楠. 鱼油脂肪酸乙酯制备及分离纯化研究[D]. 天津: 天津大学, 2013.
- [13] 姚宏燕. 奇亚籽油制备多不饱和脂肪酸乙酯的工艺研究[D]. 江苏 无锡: 江南大学, 2019.
- [14] 赵德华. 量子化学在同系物萃取分离机理研究中的应用[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2017.