

金枪鱼油精制及低温结晶法富集甘油三酯型 EPA、DHA

郑飞洋¹, 戴志远^{1,2*}, 崔益玮¹, 郑振霄^{1,2}, 朱凯¹, 郭丽平¹

(¹浙江工商大学海洋食品研究院 杭州 310012

²浙江省水产品加工技术研究联合重点实验室 杭州 310012)

摘要 采用脱胶、脱酸、脱色、脱臭工艺精制金枪鱼油,探究低温结晶法对精制鱼油中甘油三酯型二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA)的富集效果。结果表明:精制鱼油各项指标均达到一级质量标准。其饱和脂肪酸含量下降,单不饱和脂肪酸和多不饱和脂肪酸含量有所上升,EPA和DHA含量分别为6.69%和16.46%;甘油三酯的含量为97.62%。低温结晶法最佳富集条件是:溶剂为乙腈与丙酮,结晶温度-50℃,乙腈与丙酮复配比1:12(V/V),鱼油与复合溶剂(乙腈与丙酮)比7:40(V/V),结晶时间150min。在此条件下,多不饱和脂肪酸含量达51.61%,其中EPA与DHA含量分别为(12.83±0.34)%和(28.70±0.48)%,得率分别为(40.10±1.07)%和(36.52±2.53)%。

关键词 金枪鱼油;甘油三酯;EPA;DHA;低温结晶

文章编号 1009-7848(2022)03-0147-12 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2022.03.018

金枪鱼油中含有丰富的 ω -3系列多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acids, PUFA),主要包括二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)和二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)。EPA和DHA具有广泛的生理作用,其中EPA作为“血管清除剂”,可以降低血脂和胆固醇,预防心血管疾病,还可以抑制血小板凝聚,防止血栓形成^[1-2]。DHA作为“脑保护剂”,有增强记忆力,改善大脑的功能,还可以促进婴幼儿大脑和视觉系统发育,提高婴儿认知能力、语言能力、眼手协调能力^[3-6]。此外,EPA和DHA在炎症、癌症、抑郁症治疗方面也有显著效果,被广泛应用于医药和功能食品领域^[7-11]。研究表明,人体中的 α -亚麻酸(ALA)可通过脱氢、碳链延长反应转化为EPA或DHA,然而参与转化的ALA通常低于10%,不能满足人体正常所需,需要从外界摄入EPA和DHA^[12-13]。目前市场上售卖的EPA和DHA产品大多为甲酯或乙酯型,临床实验表明,相较前两者,甘油酯型的EPA和DHA更易被人体吸收转化^[14-15]。

目前,鱼油中多不饱和脂肪酸富集分离方法主要有分子蒸馏法、尿素包合法、脂肪酶法、色谱

法、超临界流体萃取法等^[16-20]。低温结晶法是一种有效富集多不饱和脂肪酸的方法,其原理是根据不同结构的脂肪酸在不同温度和有机溶剂中溶解度的差异进行分离^[21]。该方法操作简便,设备要求低,有机试剂可回收利用且低温降低了PUFA变性的风险,常用于富集植物油中甘油酯型PUFA或鱼油中游离型PUFA。有关低温结晶法富集鱼油中甘油酯型EPA和DHA报道较少。

本文采用低温结晶法富集精制鱼油中甘油酯型EPA和DHA,从多个方面优化富集方法,测定脂肪酸组成的变化,旨在为甘油酯型多不饱和脂肪酸的生产提供试验参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

金枪鱼油,舟山丰宇海洋生物制品有限公司;活性白土,济南建辉化工有限公司;37种脂肪酸混标,上海安普科学仪器有限公司;十六烷酸甘油一酯标准品、十七碳烯酸甘油二酯标准品、十八碳二烯酸甘油三酯标准品,上海安普实验科技有限公司。氢氧化钠、氯化钠、无水硫酸钠、三氟化硼-甲醇、正己烷、异丙醇、乙醇、丙酮、乙腈、甲醇等均为分析纯,国药试剂有限公司;正己烷、异丙醇、乙腈均为色谱纯,常青化工有限公司。

1.2 设备与仪器

MS-H380-Pro 磁力搅拌器,浙江简然仪器设

收稿日期:2021-03-14

基金项目:国家重点研发计划项目(2018YFC0311204)

作者简介:郑飞洋(1996—),男,硕士生

通信作者:戴志远 E-mail: dzy@zjgsu.edu.cn

备有限公司;SHB-Ⅲ循环水式多用真空泵,郑州长城科工贸有限公司;Thermosorvall LYNX4000高速落地离心机,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;Thermo 900 超低温冰箱,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂;HH-11-2 恒温水浴锅,上海奥旗仪器设备有限公司;2695 型高效液相色谱仪,美国 Waters 公司;7890B 气相色谱仪,美国 Agilent 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 金枪鱼油的精制 鱼油的脱胶、脱酸、脱色、脱臭工艺参考 Chakraborty 等^[22]、Simat 等^[23]。

1.3.2 鱼油理化指标的测定 水分及挥发物:参照 GB/T 5528-2008 测定;酸价:参照 GB/T 5530-2005 测定;过氧化值:参照 GB/T 5538-2005 测定;碘值:参照 GB/T 5532-2008 测定;不溶性杂质:参考 GB/T 15688-2008。

1.3.3 高效液相色谱条件 色谱柱:Sunfire C18 柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相 A:乙腈,流动相 B:含有 10 mmol/L 甲酸铵的异丙醇溶液(异丙醇与甲酸铵体积比为 98:2);流速为 0.6 mL/min;检测波长 210 nm;柱温为 25 ℃;进样量 10 μL。梯度洗脱程序:0~25 min,90%A;25~30 min,40%A;30~50 min,0%A;50 min 之后,90%A。

1.3.4 鱼油甲酯化 将 100 mg 鱼油于具塞试管中,加入 2 mL 的 NaOH-CH₃OH 溶液(0.5 mol/L),充分振荡摇匀。在 65 ℃的水浴锅中加热 30 min,取出后冷却至室温。继续加入 2 mL 的 BF₃-CH₃OH 溶液(10%),充分振荡混匀。在 65 ℃水浴锅中继续加热 3 min,取出并自然冷却加入 2 mL 正己烷,接着加入 2 mL 饱和 NaCl 溶液,取出上清液后在其中加入适量无水 Na₂SO₄,过有机滤膜后用气相色谱分析。

1.3.5 气相色谱条件 色谱柱:HP-88 毛细管色谱柱(30 m×0.25 mm,0.2 μm);柱箱温度:70 ℃;前进样口温度:250 ℃;前检测器温度:220 ℃;尾吹气:高纯氮气;恒定燃气:高纯氢气;恒流:0.65 mL/min;进样量:1 μL;升温程序:初始温度 50 ℃,保持 2 min,以 4 ℃/min 升至 220 ℃维持 15 min。

1.3.6 精制鱼油的低温结晶 称取一定量的精制后的金枪鱼油,加入不同比例与种类的有机溶剂,在玻璃棒的搅拌下形成均匀混合层。将样品置于

不同温度中低温结晶,一段时间后在低温环境下进行真空抽滤,分离得固态的结晶物和滤液。分离收集得固态结晶物和滤液,并将二者于 60 ℃条件下旋转蒸发除去溶剂。

1.3.7 计算 EPA 或 DHA 得率

$$Y_{\text{EPA or DHA}} = \frac{m_{1 \text{ or } s} \cdot A_{\text{EPA}_n \text{ or DHA}_n}}{m_0 \cdot A_{\text{EPA}_0 \text{ or DHA}_0}} \times 100\%$$

式中: $Y_{\text{EPA or DHA}}$ ——EPA 或 DHA 得率,%; $m_{1 \text{ or } s}$ ——滤液或固相中鱼油的质量,mg; $A_{\text{EPA}_n \text{ or DHA}_n}$ ——冷冻结晶一段时间后滤液或固相鱼油中 EPA 或 DHA 所占百分比,%; m_0 ——初始添加鱼油的质量,mg; $A_{\text{EPA}_0 \text{ or DHA}_0}$ ——初始鱼油中 EPA 或 DHA 所占百分比,%。

1.4 数据处理

液相色谱数据采集与分析采用美国 Waters 公司 Empower 软件;气相色谱数据采集与分析采用美国 Agilent 公司 OpenLab 软件,并用归一化法进行定量分析。采用 SPSS 22.0 软件对数据进行处理分析,所有试验均重复 3 次,相关测定数据用平均值±标准偏差来表示, $P < 0.05$ 表示有显著性差异;采用 Origin 9.1 软件作图分析。

2 结果与讨论

2.1 金枪鱼油品质及脂肪酸组成

粗鱼油和精制鱼油的理化指标如表 1 所示,粗鱼油经脱胶、脱酸、脱色、脱臭工艺后各项理化指标都有所改善,其中精制后的鱼油外观呈浅黄色且无沉淀,酸败味消失,酸值、过氧化值、水分及挥发物、不溶性杂质 4 项指标均下降,碘值上升,达到了水产行业一级鱼油的质量标准。

粗鱼油与精制鱼油主要脂肪酸组成如表 2 所示,金枪鱼油中脂肪酸种类丰富,含有 16 种脂肪酸。精制过程中饱和脂肪酸(saturated fatty acids, SFA)、单不饱和脂肪酸(monounsaturated fatty acids, MUFA)、PUFA 的含量各有变化,其中 SFA 含量呈下降趋势,降至 30.97%,这表明了精制工艺可以有效降低 SFA 的含量;精制过后 MUFA 所占比例最高,达到 36.26%,有研究指出油脂的脱臭工艺是反式异构体的主要来源,但精制过后 C18:1 trans 的含量略有下降,而 C18:1 cis 的含量有所上升,此结果表明此精制方法一定程度

上降低了反式脂肪酸的生成^[24]; MUFA 含量呈上升趋势, 升至 32.26%, 并且目标产物 EPA 和 DHA 含量都有所上升, 分别达到了 6.69% 和 16.46%。

精制鱼油的液相色谱图如图 1 所示, 精制后的鱼油中只有 1.14% 的甘油一酯 (出峰时间在 0~

10 min) 和 1.24% 的甘油二酯 (出峰时间在 15~20 min), 与前两者相比, 占比 97.62% 的甘油三酯 (出峰时间在 20 min 之后) 才是甘油酯型鱼油的主要成分。此结果表明, 精制后的金枪鱼油符合试验材料的要求。

表 1 粗鱼油与精制鱼油理化指标

Table 1 The physicochemical indexes of the crude and refined fish oil

项目	粗鱼油	精制鱼油	SC/T 3502—2016	
			一级	二级
外观	橙红色, 浑浊有分层	浅黄色, 澄清无沉淀	浅黄色或橙红色, 澄清透明, 无沉淀物	
气味	具有酸败味和鱼腥味	无酸败味, 微腥	稍有鱼油特有的腥味, 无酸败味	
水分及挥发物/%	0.02	0.00	≤0.1	≤0.2
酸值(KOH)/mg·kg ⁻¹	3.19	0.76	≤1.0	≤3.0
过氧化值/meq·kg ⁻¹	3.15	2.37	≤5.0	≤10.0
碘值/g·(100g) ⁻¹	167.42	174.19	≥140	
不溶性杂质/%	0.13	0.00	≤0.1	

表 2 粗鱼油与精制鱼油主要脂肪酸组成

Table 2 Main fatty acids composition of the crude and refined fish oil

脂肪酸	中文名称	粗鱼油	精制鱼油	脂肪酸	中文名称	粗鱼油	精制鱼油
C14:0	肉豆蔻酸	5.56	5.48	C20:3	花生三烯酸	1.25	1.44
C16:0	棕榈酸	23.83	22.21	C20:4	花生四烯酸	2.09	2.25
C16:1	棕榈油酸	5.38	5.58	EPA	EPA	6.33	6.69
C17:0	十七烷酸	1.74	1.66	C24:1	二十四碳烯酸	1.04	1.24
C17:1	十七碳烯酸	0.97	0.98	DPA	二十二碳五烯酸	1.41	1.47
C18:1 trans	反式油酸	4.99	4.53	DHA	DHA	15.96	16.46
C18:1 cis	顺式油酸	20.13	20.59	SFA		32.78	30.97
C18:2	亚油酸	2.39	2.39	MUFA		36.26	36.78
C18:3	亚麻酸	1.52	1.56	PUFA		30.95	32.26
C20:1	二十碳烯酸	3.22	3.32				

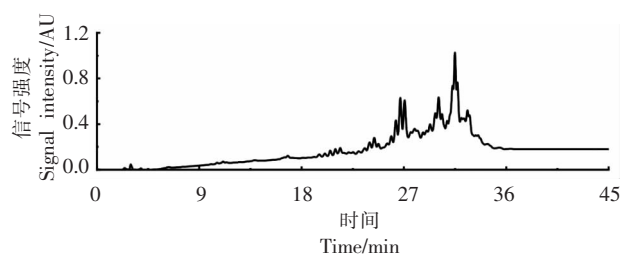


图 1 精制鱼油的高效液相色谱图

Fig.1 HPLC chromatography of refined fish oil

2.2 低温结晶法富集甘油三酯型 EPA 和 DHA

2.2.1 不同溶剂对富集效果的影响 本研究首先考察了无溶剂条件下鱼油低温结晶的可行性。精制鱼油在温度-10℃下, 低温结晶 12 h 后发现容器内的鱼油都凝结成固体, 真空抽滤后难以实现固体结晶物与滤液有效分离。因此, 为保证甘油三酯型 EPA 和 DHA 能有效富集, 应在低温结晶试验中添加合适的有机溶剂。

正己烷、二氯甲烷、丙酮、乙腈、甲醇等是低温

结晶法富集游离型 PUFA 时常用的溶剂, 其中乙腈的富集效果最佳^[25]。但由于甘油三酯的极性小于游离型脂肪酸, 导致甘油三酯与乙腈、甲醇等极性较大的溶剂混溶时难以形成均匀混合层, 在前人富集甘油酯型 PUFA 的研究中, 正己烷与丙酮是较为理想的溶剂^[26]。因此, 试验首先使用单一溶剂正己烷、乙醚、异丙醇、丙酮作为低温结晶溶剂, 在结晶温度 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 鱼油与溶剂比 7:40(V/V)的条件下, 冷冻结晶 12 h, 考察不同溶剂类型对甘油酯型 EPA 和 DHA 含量和得率的影响。如图 2a 和 2b 所示, 丙酮对 EPA 和 DHA 富集效果较好, 富集后 EPA 和 DHA 的含量分别达到了 $(8.65\pm 0.13)\%$ 和 $(20.55\pm 0.03)\%$, 此结论与 Yokochi 等^[27]的研究相似。但当使用异丙醇富集时, EPA 和 DHA 的得率较低, 原因可能是异丙醇黏度大, 低温结晶时大量液态的甘油三酯滞留在结晶物中, 导致固液分离

不完全。在其它试验条件相同的情况下, 考察了正己烷、乙醇、乙腈、甲醇分别与丙酮复配后(复合溶剂体积比均为 1:11), 对 EPA 和 DHA 含量及得率的影响。如图 2c 和 2d 所示, 当丙酮通过与正己烷复配降低混合物体系极性时, 正己烷与丙酮组的 EPA 和 DHA 含量低于单一溶剂丙酮组, 此结论与 Mu 等^[28]一致; 当丙酮通过分别与乙醇、乙腈、甲醇复配增大混合物体系极性时, 各组 EPA 和 DHA 的含量均高于单一溶剂丙酮组, 其中乙腈与丙酮组富集效果最佳, EPA 和 DHA 的含量分别达到了 $(9.89\pm 0.02)\%$ 和 $(22.23\pm 0.58)\%$, 但其 EPA 和 DHA 的得率比丙酮组分别低了 $(16.88\pm 0.10)\%$ 和 $(18.95\pm 1.15)\%$ 。因此, 分别选择单一溶剂中的丙酮和复合溶剂中的乙腈与丙酮作为低温结晶的溶剂继续试验。

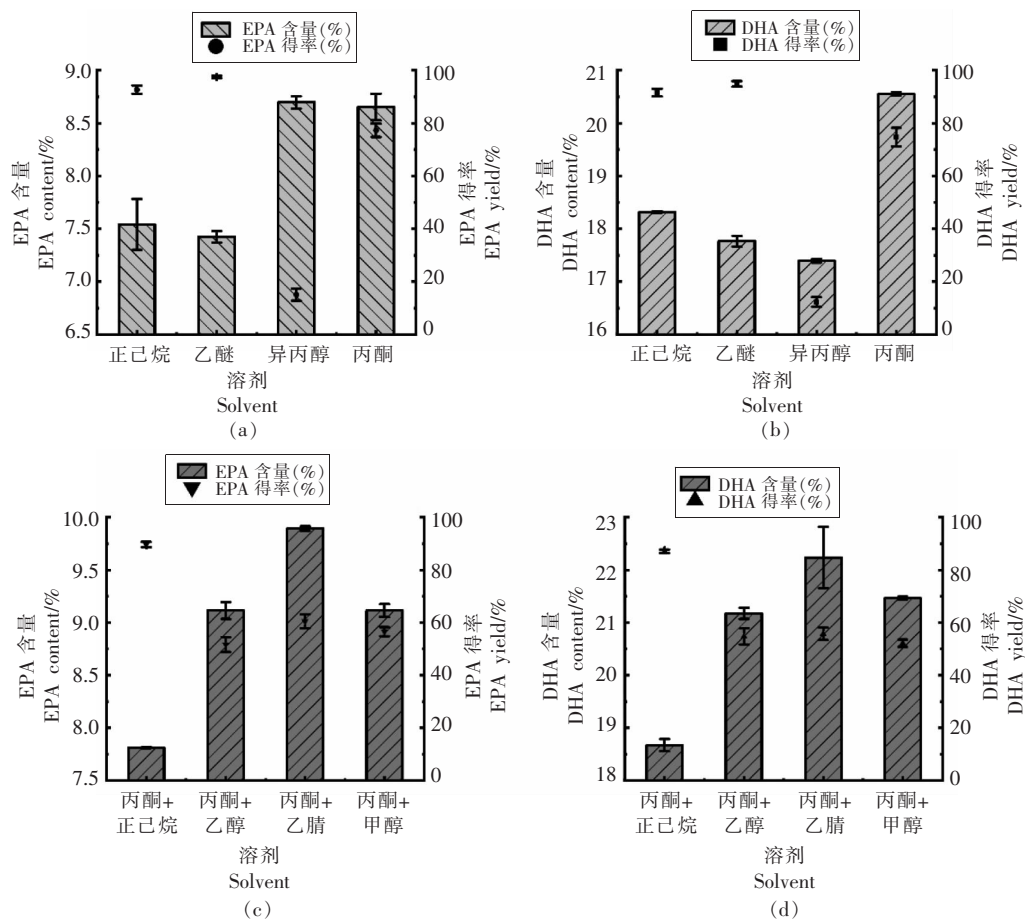
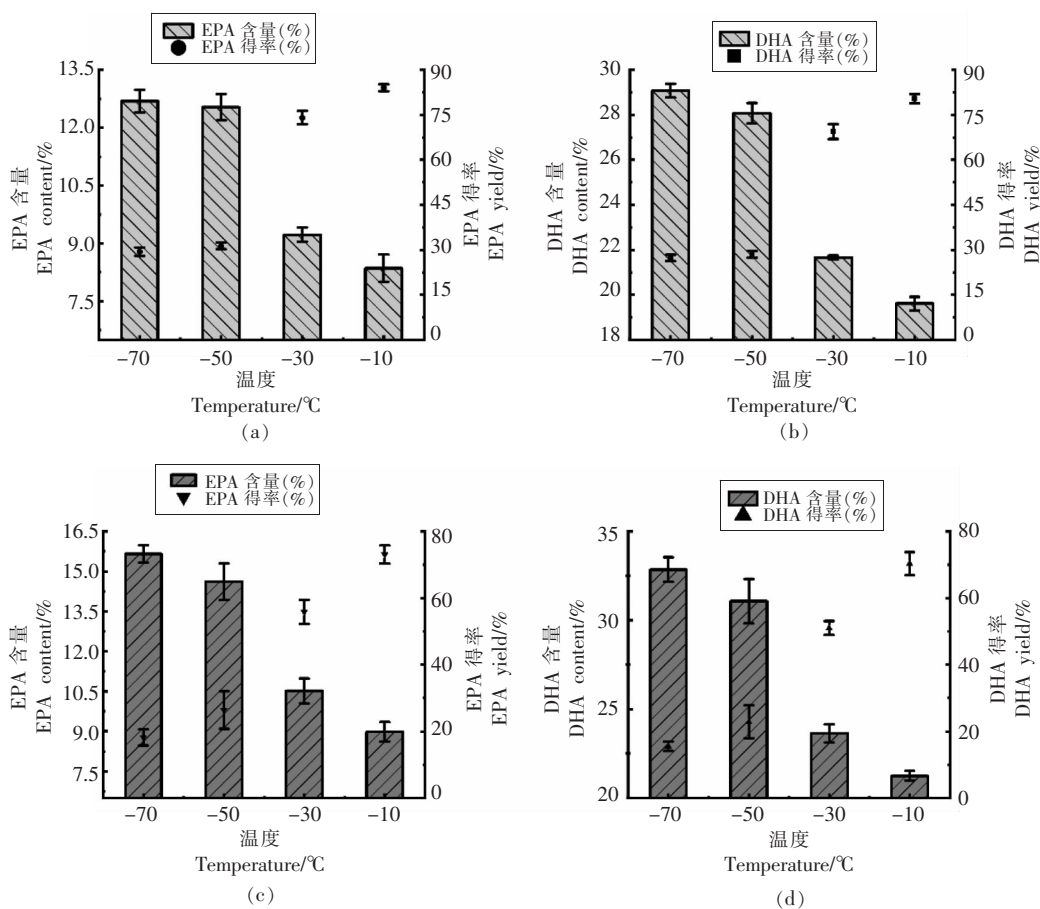


图 2 不同溶剂对 EPA 和 DHA 含量和得率的影响

Fig.2 Effects of different solvents on the content and yield of EPA and DHA

2.2.2 结晶温度对富集效果的影响 温度是低温结晶法富集 PUFA 重要的工艺参数之一, Morales 等^[29]构建了低温结晶法温度-时间传质模型, 在相同结晶时间条件下, 随着温度降低 PUFA 含量逐渐升高, 并且在 $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$ 结晶 24 h 后液相油中 PUFA 达到了 83.4%, 与原油相比提高了 37.9%。本研究中使用单一溶剂丙酮和复合溶剂乙腈与丙酮作为低温结晶溶剂, 鱼油与溶剂比 7:40(V/V), 乙腈与丙酮复配比 1:11(V/V), 依次在结晶温度 -10 , -30 , -50 , $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的条件下, 冷冻结晶 12 h, 考察不同温度对甘油三酯型 EPA 和 DHA 含量和得率的影响。如图 3 所示, EPA 和 DHA 含量都随着温度降低而增加, EPA 和 DHA 得率都随温度降低而减

小。在 4 个温度梯度中, 复合溶剂乙腈与丙酮对 EPA 和 DHA 含量的提升均高于单一溶剂丙酮。当温度从 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 降至 $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, EPA 和 DHA 的含量增长最多。当温度降低至 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, EPA 和 DHA 的含量虽然继续增长, 但其增长量下降。并且, 当温度为 $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时, 复合溶剂乙腈与丙酮的 EPA 和 DHA 的含量分别达到了 $(14.62\pm 0.69)\%$ 和 $(31.07\pm 1.25)\%$, 相较于单一溶剂, EPA 和 DHA 得率虽然下降 $(6.30\pm 3.17)\%$ 和 $(5.08\pm 4.56)\%$, 但其含量却上升了 $(2.09\pm 0.32)\%$ 和 $(3.00\pm 0.79)\%$ 。因此综合考虑, 结晶温度选择 $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 低温结晶溶剂选择复合溶剂乙腈与丙酮。



注: 图 a 和 b 所用溶剂为单一溶剂丙酮, 图 c 和 d 所用溶剂为复合溶剂乙腈与丙酮。

图 3 不同结晶温度对 EPA 和 DHA 含量和得率的影响

Fig.3 Effects of different crystallization temperatures on the content and yield of EPA and DHA

2.2.3 乙腈与丙酮复配比例和鱼油与该复合溶剂之比对富集效果的影响 前人研究表明, 低温结晶法富集 PUFA 时, 合适的复合溶剂复配比和鱼

油与溶剂比会产生亚稳溶液, 有助于晶体自然生长, 而过高的鱼油与溶剂比可能会产生过饱和溶液, 降低目标产物的得率^[30]。因此, 本研究在鱼油

与溶剂体积比为 7:40、7:80、7:120, 其中乙腈与丙酮复配比例(体积比)为 1:3、1:6、1:9、1:12 的条件下,以乙腈与丙酮作为低温结晶溶剂,结晶温度 $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$,低温结晶 12 h,考察不同乙腈与丙酮复配比和油溶比对甘油三酯型 EPA 和 DHA 含量和得率的影响。如图 4 所示,通过降低乙腈与丙酮复配比或油溶比,都能达到提高 EPA 和 DHA 的得率和降低 EPA 和 DHA 的含量的效果。原因在于降低乙腈与丙酮复配比或鱼油与溶剂比会使混合体系的极性逐渐减小,导致了一些 SFA 和 MUFA 不易结晶析出,从而留在液相油中。该结论与 Mu 等^[28]、Fabritius 等^[31]、Vázquez 等^[30]的结果相似。当鱼油与溶剂比为 7:40(V/V),乙腈与丙酮复配比为 1:3(V/V)时,EPA 和 DHA 含量达到最大,分别为 $(16.62\pm 0.47)\%$ 、 $(34.13\pm 0.62)\%$,但在此时 EPA 和 DHA 的得率降至最低,分别为 $(10.68\pm 3.33)\%$ 、 $(8.92\pm 4.53)\%$ 。在此鱼油与溶剂比下,虽然通过降

低乙腈与丙酮复配比可以提高 EPA 和 DHA 的得率,但在 4 组复配比中 EPA 和 DHA 得率均低于 20%。当鱼油与溶剂比为 7:120(V/V)时,乙腈与丙酮复配比为 1:12(V/V),EPA 和 DHA 得率上升至最高,分别为 $(35.65\pm 0.90)\%$ 、 $(33.07\pm 1.07)\%$,但在此时 EPA 和 DHA 的含量降至最低,分别为 $(28.80\pm 0.09)\%$ 、 $(12.62\pm 0.06)\%$ 。并且,从经济性角度来看,鱼油与溶剂比为 7:120(V/V)时,溶剂消耗量过大。较前两种鱼油与溶剂比,7:80(V/V)的鱼油与溶剂比既减少了溶剂使用量,又在一定程度上保证了 EPA 和 DHA 含量与得率。其中,当乙腈与丙酮复配比 1:12(V/V)时,EPA 和 DHA 的富集效果最佳,两者含量和得率分别为 $(13.36\pm 0.23)\%$ 、 $(30.24\pm 0.72)\%$ 和 $(28.96\pm 1.97)\%$ 、 $(26.64\pm 2.77)\%$ 。因此综合考虑,乙腈与丙酮复配比例选择 1:12(V/V),鱼油与溶剂比选择 7:80(V/V)。

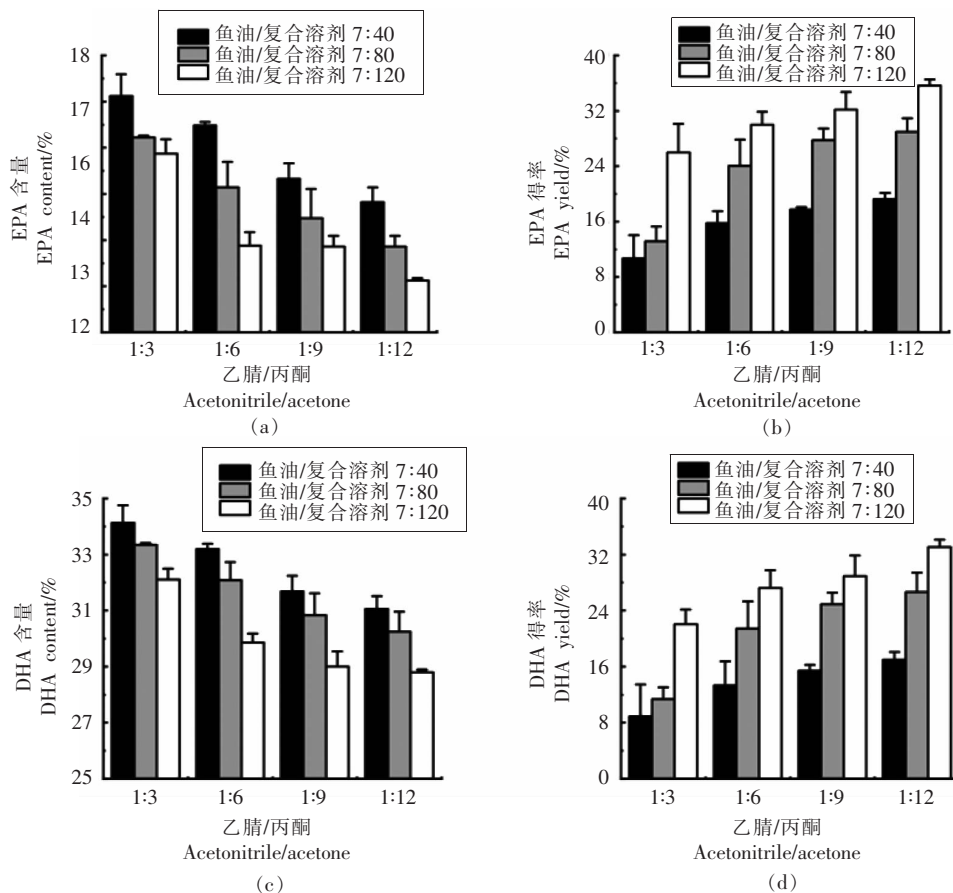


图 4 不同复配溶剂比(V/V)和鱼油与溶剂比(V/V)对 EPA 和 DHA 含量和得率的影响

Fig.4 Effects of different mixed solvent ratio (V/V) and fish oil solvent ratio (V/V) on the content and yield of EPA and DHA

2.2.4 结晶时间对富集效果的影响 分别从低温结晶时间为 30, 90, 150, 210, 270, 330 min 考察了鱼油在不同结晶时间后固液两相中脂肪酸的变化以及不同结晶时间对甘油三酯型 EPA 和 DHA 含量和得率的影响, 其中以乙腈与丙酮作为低温结晶溶剂, 结晶温度 $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 鱼油与溶剂比 7:80 (V/V), 乙腈与丙酮比为 1:12 (V/V)。如表 3 和图 5a 所示, 随着结晶时间的延长, 液相的鱼油中 SFA 含量逐渐减少, MUFA 含量在 30 min 时略有上升, 之后又逐渐减小, PUFA 含量逐渐升高。其中, 虽然 PUFA 含量随着结晶时间变长而增多, 但随着结晶时间的延长, 其富集难度越来越大。结晶时间在 150 min 之前, PUFA 含量增长了 $(19.35\pm 0.47)\%$, 而 150 min 之后其增长量仅有 $(2.24\pm 0.20)\%$ 。如图 6 所示, EPA 和 DHA 的含量的增长趋势与 PUFA 的增长趋势类似, 并且当结晶时间为 150 min 时, EPA 和 DHA 的得率显著 ($P<0.05$) 高于结晶时间

210, 270, 330 min 的得率。如表 4 和图 5b 所示, 固相的鱼油中 SFA 含量逐渐减少, 而 MUFA、PUFA 含量虽都低于精制鱼油, 但两者含量的总体趋势逐渐上升。这可能与鱼油中脂肪酸的组成含量有关, 精制鱼油的 PUFA 含量只有 $(32.26\pm 0.61)\%$, 而前人研究中藻油、沙丁鱼油中所含 PUFA 含量分别高达 61.00% , 45.50% ^[28-29]。由于甘油三酯的结晶行为通常反映出脂肪酸的组成, 相同条件下, 原料油中较低含量的 PUFA 会在低温下更易结晶而且会形成更多的结晶物, 且随着结晶时间延长, 低温会使更多液相的甘油三酯留在结晶物的空隙中, 导致了固液分离不完全, 从而降低了目标产物的得率^[32]。虽然缩短结晶时间会减少留在结晶物空隙中的液态甘油酯含量, 但此措施会导致大量 SFA 和 MUFA 结晶不完全, 从而留在液相油中。因此综合考虑, 选择 150 min 为最佳结晶时间。

表 3 鱼油在不同结晶时间后液相中主要脂肪酸含量变化

Table 3 Changes of main fatty acids content in liquid phase of fish oil after different crystallization time

脂肪酸	精制鱼油	30 min	90 min	150 min	210 min	270 min	330 min
C14:0	5.48 ± 0.06^a	4.03 ± 0.03^b	3.32 ± 0.02^c	3.09 ± 0.01^d	2.89 ± 0.02^e	2.78 ± 0.15^e	2.78 ± 0.02^e
C16:0	22.21 ± 0.55^a	13.26 ± 0.12^b	9.26 ± 0.03^c	7.28 ± 0.03^d	6.38 ± 0.03^e	5.33 ± 0.22^f	5.37 ± 0.01^f
C16:1	5.58 ± 0.11^e	7.76 ± 0.03^c	7.79 ± 0.00^c	7.96 ± 0.02^b	7.52 ± 0.01^d	7.79 ± 0.02^c	8.13 ± 0.13^a
C17:0	1.66 ± 0.06^a	1.29 ± 0.00^b	1.21 ± 0.01^{bc}	1.15 ± 0.00^{nb}	1.11 ± 0.00^{dc}	1.18 ± 0.01^{cd}	1.08 ± 0.10^e
C17:1	0.98 ± 0.02^c	1.05 ± 0.10^{bc}	1.13 ± 0.01^{ab}	1.16 ± 0.02^{ab}	1.23 ± 0.02^{ab}	1.12 ± 0.00^{ab}	1.16 ± 0.12^{ab}
C18:1 trans	4.53 ± 0.19^a	1.64 ± 0.02^b	0.98 ± 0.03^c	0.62 ± 0.02^d	0.51 ± 0.00^d	0.55 ± 0.02^d	0.50 ± 0.00^d
C18:1 cis	20.59 ± 0.05^b	21.58 ± 0.09^a	20.20 ± 0.16^c	19.69 ± 0.13^d	19.74 ± 0.20^d	19.46 ± 0.05^e	19.23 ± 0.14^f
C18:2	2.39 ± 0.01^a	1.80 ± 0.05^{bc}	1.85 ± 0.03^{cd}	1.89 ± 0.00^c	2.01 ± 0.05^b	1.78 ± 0.02^e	1.89 ± 0.05^c
C18:3	1.56 ± 0.05^b	1.65 ± 0.02^{ab}	1.53 ± 0.10^b	1.58 ± 0.04^{ab}	1.72 ± 0.01^a	1.64 ± 0.03^{ab}	1.51 ± 0.17^b
C20:1	3.32 ± 0.04^f	3.85 ± 0.03^e	3.94 ± 0.01^d	4.07 ± 0.03^c	4.40 ± 0.04^a	4.31 ± 0.00^b	4.26 ± 0.02^b
C20:3	1.44 ± 0.11^d	1.80 ± 0.05^c	2.02 ± 0.00^b	2.11 ± 0.01^{ab}	2.13 ± 0.12^{ab}	2.19 ± 0.06^a	2.16 ± 0.02^a
C20:4	2.25 ± 0.09^a	2.28 ± 0.00^a	2.28 ± 0.02^a	2.25 ± 0.02^a	1.90 ± 0.02^c	2.25 ± 0.04^a	2.17 ± 0.00^b
EPA	6.69 ± 0.21^e	9.95 ± 0.20^d	11.84 ± 0.09^c	12.83 ± 0.34^b	13.33 ± 0.06^a	13.43 ± 0.18^a	13.70 ± 0.34^a
C24:1	1.24 ± 0.01^b	1.17 ± 0.01^c	1.35 ± 0.05^a	1.35 ± 0.01^a	1.37 ± 0.02^a	1.40 ± 0.07^a	1.35 ± 0.04^a
DPA	1.47 ± 0.03^c	1.89 ± 0.07^c	2.18 ± 0.01^b	2.25 ± 0.03^a	1.81 ± 0.00^a	2.32 ± 0.05^a	2.28 ± 0.02^a
DHA	16.46 ± 0.30^f	22.92 ± 0.23^e	27.03 ± 0.04^d	28.70 ± 0.48^c	29.26 ± 0.19^b	29.71 ± 0.04^a	30.14 ± 0.19^a
EPA 产率		65.63 ± 1.83^a	46.95 ± 2.75^b	40.10 ± 1.07^c	32.94 ± 1.20^d	32.58 ± 0.36^d	32.34 ± 0.23^d
DHA 产率		61.44 ± 2.32^a	43.58 ± 2.95^b	36.52 ± 2.53^c	29.38 ± 0.88^d	29.30 ± 0.11^d	28.92 ± 0.67^d

注: 同行上标不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

2.2.5 精制鱼油与低温结晶最优条件下富集鱼油主要脂肪酸含量比较 精制鱼油与最优条件下富集后的鱼油气相图及其主要脂肪酸如图7和表5所示,SFA、MUFA含量下降,PUFA含量上升。其中,C16:0含量下降和DHA含量上升最为明显,分别下降了13.85%和上升了12.18%,但富集后的鱼

油中仍含有大量的C14:0、C16:0、C18:1cis。出现此结果的原因可能与甘油三酯的结构有关,一些C14:0、C16:0、C18:1cis和EPA、DHA连在同一个甘油骨架上,当富集EPA与DHA时,C14:0、C16:0、C18:1cis也会与EPA和DHA保留在同一个甘油骨架上,在不改变甘油三酯结构的前提下,难以

表4 鱼油在不同结晶时间后固相中主要脂肪酸含量变化

Table 4 Changes of main fatty acids content in solid phase of fish oil after different crystallization time

脂肪酸	30 min	90 min	150 min	210 min	270 min	330 min
C14:0	6.59 ± 0.05 ^a	6.20 ± 0.04 ^a	6.32 ± 0.53 ^a	6.35 ± 0.12 ^a	6.03 ± 0.02 ^b	6.14 ± 0.01 ^b
C16:0	30.10 ± 0.10 ^a	29.71 ± 0.20 ^a	27.40 ± 0.40 ^b	26.81 ± 0.03 ^c	26.87 ± 0.12 ^{bc}	26.49 ± 0.58 ^c
C16:1	5.15 ± 0.01 ^d	5.37 ± 0.01 ^c	5.92 ± 0.07 ^b	6.13 ± 0.03 ^a	6.12 ± 0.05 ^a	6.16 ± 0.10 ^a
C17:0	1.62 ± 0.03 ^b	1.69 ± 0.00 ^a	1.61 ± 0.01 ^b	1.58 ± 0.04 ^b	1.59 ± 0.03 ^b	1.58 ± 0.02 ^b
C17:1	0.67 ± 0.01 ^a	0.69 ± 0.13 ^a	0.77 ± 0.03 ^a	0.79 ± 0.04 ^a	0.78 ± 0.00 ^a	0.78 ± 0.05 ^a
C18:1 trans	6.14 ± 0.07 ^a	6.06 ± 0.06 ^a	5.50 ± 0.05 ^b	4.98 ± 0.14 ^d	5.22 ± 0.06 ^c	5.26 ± 0.03 ^c
C18:1 cis	20.25 ± 0.12 ^b	21.04 ± 0.05 ^a	20.94 ± 0.03 ^a	21.41 ± 0.02 ^a	21.50 ± 0.68 ^a	21.60 ± 0.52 ^a
C18:2	2.04 ± 0.02 ^a	1.47 ± 0.02 ^c	1.49 ± 0.01 ^c	1.65 ± 0.04 ^b	1.52 ± 0.01 ^c	1.52 ± 0.12 ^c
C18:3	1.38 ± 0.08 ^{ab}	1.17 ± 0.02 ^d	1.40 ± 0.00 ^{ab}	1.43 ± 0.00 ^a	1.31 ± 0.10 ^{bc}	1.23 ± 0.02 ^{cd}
C20:1	2.97 ± 0.01 ^a	2.67 ± 0.10 ^b	3.04 ± 0.11 ^a	3.10 ± 0.02 ^a	2.75 ± 0.09 ^b	2.78 ± 0.17 ^b
C20:3	0.86 ± 0.00 ^e	1.00 ± 0.00 ^d	1.27 ± 0.03 ^a	1.19 ± 0.03 ^b	1.18 ± 0.02 ^{bc}	1.14 ± 0.03 ^c
C20:4	2.00 ± 0.03 ^e	2.08 ± 0.01 ^c	2.30 ± 0.13 ^b	2.57 ± 0.10 ^a	2.10 ± 0.01 ^c	2.03 ± 0.03 ^c
EPA	4.55 ± 0.39 ^b	4.63 ± 0.06 ^b	5.21 ± 0.02 ^a	5.20 ± 0.00 ^a	5.34 ± 0.08 ^a	5.45 ± 0.13 ^a
C24:1	0.32 ± 0.00 ^e	1.00 ± 0.01 ^{ab}	1.01 ± 0.02 ^{ab}	0.95 ± 0.02 ^b	1.01 ± 0.00 ^{ab}	1.04 ± 0.08 ^a
DPA	0.95 ± 0.04 ^a	1.06 ± 0.03 ^a	1.14 ± 0.03 ^a	0.80 ± 0.61 ^a	1.18 ± 0.00 ^a	1.17 ± 0.03 ^a
DHA	11.65 ± 0.30 ^c	12.22 ± 0.09 ^d	13.10 ± 0.02 ^c	13.32 ± 0.01 ^{bc}	13.55 ± 0.12 ^{ab}	13.71 ± 0.10 ^a
EPA 产率	33.80 ± 0.05 ^d	48.15 ± 2.07 ^c	56.82 ± 0.32 ^b	62.60 ± 2.10 ^a	64.57 ± 1.07 ^a	64.74 ± 1.23 ^a
DHA 产率	35.26 ± 0.10 ^d	51.64 ± 1.74 ^c	58.02 ± 0.66 ^b	65.11 ± 2.25 ^a	66.57 ± 0.26 ^a	67.32 ± 1.55 ^a

注:同行上标不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

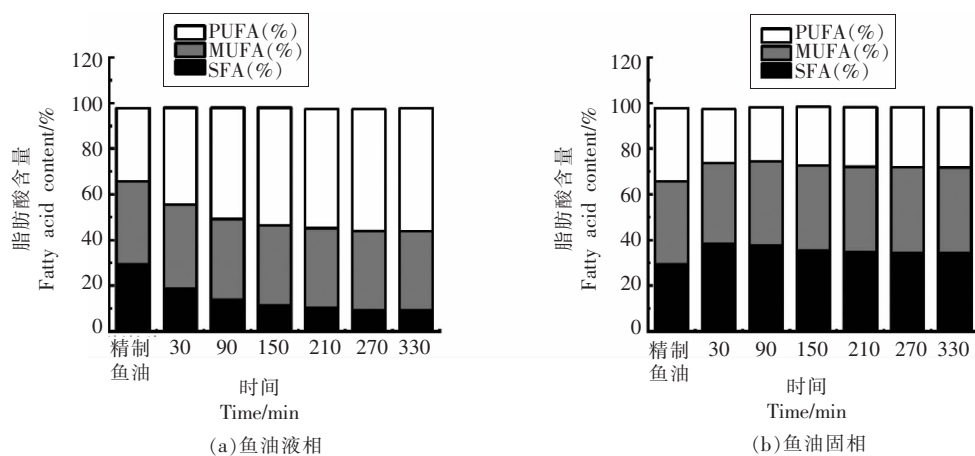


图5 不同结晶时间后鱼油液固两相中脂肪酸含量变化

Fig.5 Changes of fatty acid content in liquid and solid phases of fish oil after different crystallization time

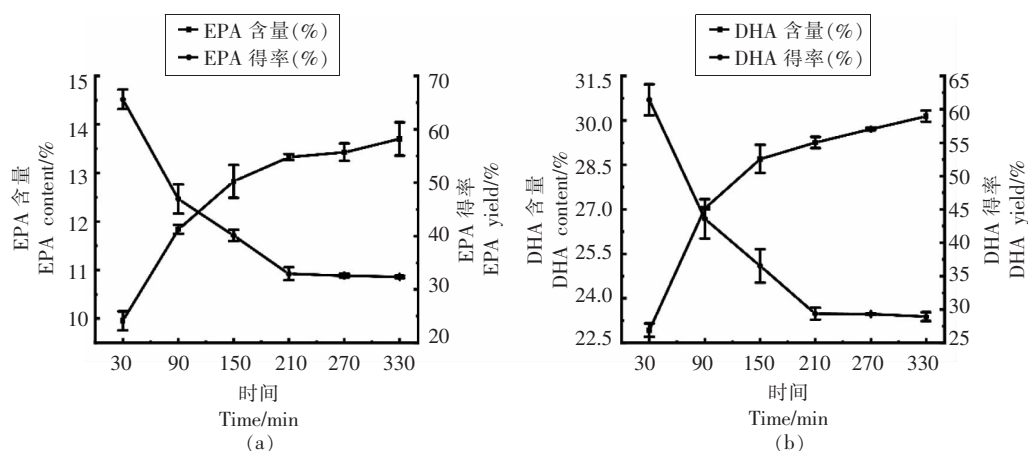


图6 不同结晶时间对 EPA 和 DHA 含量和得率的影响

Fig.6 Effect of different crystallization time on the content and yield of EPA and DHA

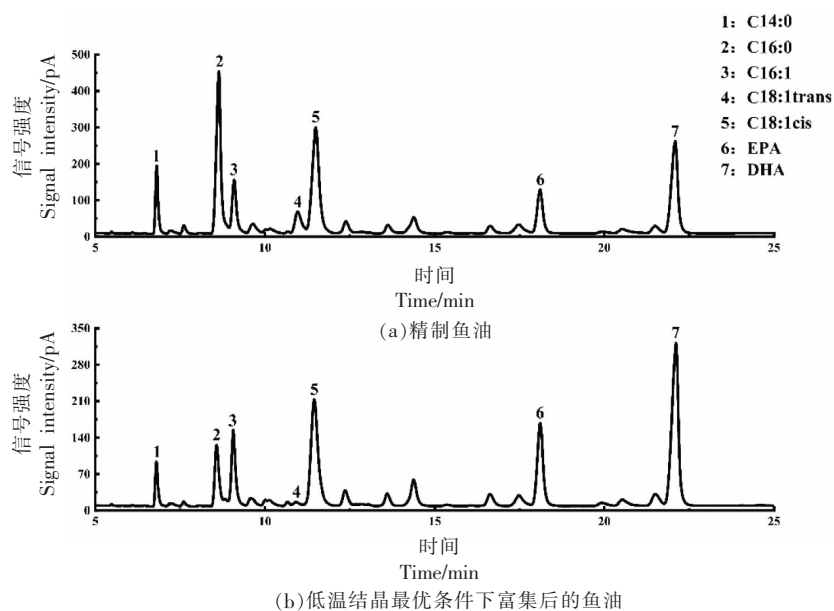


图7 精制鱼油与富集鱼油气相色谱图

Fig.7 Gas chromatography of refined and enriched fish oil

表5 精制鱼油与富集鱼油气相色谱图中

主要脂肪酸峰面积比

Table 5 Peak area ratio of main fatty acids in gas chromatograms of refined fish oil and enriched fish oil

序号	脂肪酸	精制鱼油 峰面积/%	富集鱼油 峰面积/%
1	C14:0	5.33	3.22
2	C16:0	21.17	7.32
3	C16:1	6.66	8.05
4	C18:1trans	3.75	0.63
5	C18:1cis	21.00	19.78
6	EPA	7.18	12.59
7	DHA	16.53	28.71

将 C14:0、C16:0、C18:1cis 等脂肪酸与 EPA 和 DHA 完全分离^[33]。因此,单一的富集方法难以将 EPA 和 DHA 的含量进一步提高,后续可结合其它富集分离技术,以获得更高纯度的甘油三酯型 EPA 和 DHA。

3 结论

精制过后的金枪鱼油各项理化指标都有所改善,达到了水产行业一级鱼油的质量标准。饱和脂肪酸含量下降,单不饱和脂肪酸与多不饱和脂肪酸上升,EPA 和 DHA 的含量上升至 6.69%

和 16.46%。

以精制金枪鱼油为原料,采用低温结晶法富集甘油三酯 EPA 和 DHA,确定最佳工艺条件为:低温结晶溶剂为乙腈与丙酮,结晶温度 $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$,乙腈与丙酮复配比 1:12(V/V),鱼油与溶剂比 7:80(V/V,结晶时间 150 min。在此条件下,EPA 与 DHA 含量分别为 $(12.83\pm 0.34)\%$ 和 $(28.70\pm 0.48)\%$,得率分别为 $(40.10\pm 1.07)\%$ 和 $(36.52\pm 2.53)\%$ 。

虽然,低温结晶后的金枪鱼油中 EPA 和 DHA 含量与原油相比有了显著提高($P<0.05$),但两者得率都未超过 50%,而且固相中还残留着较多 EPA 和 DHA。因此,可将低温结晶法与其它脂肪酸分离纯化的方法结合起来,进一步提高鱼油中 EPA 和 DHA 含量、产率及其利用率。

参 考 文 献

- [1] WEI B, WANG S. Separation of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid by three-zone simulated moving bed chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2020, 1625(16): 461326.
- [2] SPECTOR A A, KIM H Y. Emergence of omega-3 fatty acids in biomedical research[J]. Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 2019, 140(1): 47-50.
- [3] DUNSTAN J A, SIMMER K, DIXON G, et al. Cognitive assessment of children at age 2(1/2) years after maternal fish oil supplementation in pregnancy: a randomised controlled trial[J]. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2008, 93(1): F45.
- [4] OLSEN S F, SALVIG J D, WEBER T, et al. Duration of pregnancy in relation to fish oil supplementation and habitual fish intake: a randomised clinical trial with fish oil[J]. European Journal of Clinical Nutrition, 2007, 61(8): 976.
- [5] MAKRIDES M, GIBSON R A, MCPHEE A J, et al. Effect of DHA supplementation during pregnancy on maternal depression and neurodevelopment of young children a randomized controlled trial[J]. JA MA-J Am Med Assoc, 2010, 304(15): 1675-1683.
- [6] SWANSON D, BLOCK R, MOUSA S A. Omega-3 fatty acids EPA and DHA: Health benefits throughout life[J]. Advances in Nutrition, 2012, 3(1): 1.
- [7] HERAS-SANDOVAL D, PEDRAZA-CHAVERRI J, PEREZ-ROJAS J M. Role of docosahexaenoic acid in the modulation of glial cells in Alzheimer's disease[J]. J Neuroinflamm, 2016, 13(1): 61.
- [8] INNES J K, CALDER P C. Marine omega-3 (N-3) fatty acids for cardiovascular health: An update for 2020[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(4): 21.
- [9] DASILVA G, PAZOS M, GARCIA-EGIDO E, et al. Healthy effect of different proportions of marine omega-3 PUFAs EPA and DHA supplementation in Wistar rats: Lipidomic biomarkers of oxidative stress and inflammation [J]. J Nutr Biochem, 2015, 26(11): 1385-1392.
- [10] ASHFAQ W, REHMAN K, SIDDIQUE M I, et al. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid from fish oil and their role in cancer research[J]. Food Rev Int, 2020, 36(8): 795-814.
- [11] YALAGALA P C R, SUGASINI D, DASARATHI S, et al. Dietary lysophosphatidylcholine-EPA enriches both EPA and DHA in the brain: potential treatment for depression[J]. J Lipid Res, 2019, 60(3): 566-578.
- [12] GARG P, PEJAVER R K, SUKHIJA M, et al. Role of DHA, ARA, & phospholipids in brain development: An Indian perspective [J]. Clinical Epidemiology and Global Health, 2017, 5(4): 155-162.
- [13] CHIU C C, SU K P, CHENG T C, et al. The effects of omega-3 fatty acids monotherapy in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: A preliminary randomized double-blind placebo-controlled study [J]. Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry, 2008, 32(6): 1538-1544.
- [14] NEUBRONNER J, SCHUCHARDT J P, KRESSEL G, et al. Enhanced increase of omega-3 index in response to long-term n-3 fatty acid supplementation from triacylglycerides versus ethyl esters[J]. European Journal of Clinical Nutrition, 2011, 65(2): 247-254.
- [15] IKEDA I, SASAKI E, YASUNAMI H, et al. Digestion and lymphatic transport of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids given in the form of triacylglycerol, free acid and ethyl ester in rats [J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 1995, 1259(3): 297-304.
- [16] TENGKU-ROZAINA T M, BIRCH E J. Enrichment of omega-3 fatty acids of refined hoki oil[J]. Journal

- of the American Oil Chemists Society, 2013, 90 (8): 1111-1119.
- [17] BABEANU N E, NITA S, POPA O, et al. Optimisation of squalene recovery from amaranth oil by short path distillation[J]. *Rev Chim*, 2018, 69(2): 291-296.
- [18] LI Z G, CHEN H, SU J F, et al. Highly efficient and enzyme-recoverable method for enzymatic concentrating omega-3 fatty acids generated by hydrolysis of fish oil in a substrate-constituted three-liquid-phase system[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(9): 2570-2580.
- [19] DILLON J T, APONTE J C, TAROZO R, et al. Purification of omega-3 polyunsaturated fatty acids from fish oil using silver-thiolate chromatographic material and high performance liquid chromatography [J]. *Journal of Chromatography A*, 2013, 1312(18): 18-25.
- [20] LETISSE M, COMEAU L. Enrichment of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid from sardine by-products by supercritical fluid fractionation [J]. *Journal of Separation Science*, 2008, 31(8): 1374-1380.
- [21] LOPEZ-MARTINEZ J C, CAMPRA-MADRID P, GUIL-GUERRERO J L. Gamma-linolenic acid enrichment from *Borago officinalis* and *Echium fastuosum* seed oils and fatty acids by low temperature crystallization[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2004, 97(5): 294-298.
- [22] CHAKRABORTY K, JOSEPH D. Production and characterization of refined oils obtained from Indian oil sardine (*Sardinella longiceps*)[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2015, 63(3): 998.
- [23] SIMAT V, VLAHOVIC J, SOLDI B, et al. Production and refinement of omega-3 rich oils from processing by-products of farmed fish species [J]. *Foods*, 2019, 8(4): 125.
- [24] SCIOTTO C, MJS S A. Trans isomers of EPA and DHA in Omega-3 products on the European market [J]. *Lipids*, 2012, 47(7): 659-667.
- [25] ZHANG Y, WANG X, XIE D, et al. One-step concentration of highly unsaturated fatty acids from tuna oil by low-temperature crystallization[J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2017, 94 (3): 475-483.
- [26] LEI Q, BA S, ZHANG H, et al. Enrichment of omega-3 fatty acids in cod liver oil via alternate solvent winterization and enzymatic interesterification [J]. *Food Chem*, 2016, 199(3): 364-371.
- [27] YOKOCHI T, USITA M T, KAMISAKA Y, et al. Increase in the γ -linolenic acid content by solvent winterization of fungal oil extracted from *Mortierella* genus[J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1990, 67(11): 846-851.
- [28] MU H, ZHANG H, LI Y, et al. Enrichment of DPA_n-6 and DHA from *Schizochytrium* sp. oil by low-temperature solvent crystallization[J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2016, 55(3): 737-746.
- [29] MORALES-MEDINA R, DE LEON G, MUNIO M M, et al. Mass transfer modeling of sardine oil polyunsaturated fatty acid (PUFA) concentration by low temperature crystallization [J]. *Journal of Food Engineering*, 2016, 183(4): 16-23.
- [30] VÁZQUEZ L, AKOH C C. Enrichment of stearidonic acid in modified soybean oil by low temperature crystallisation[J]. *Food Chem*, 2012, 130(1): 147-155.
- [31] FABRITIUS D. Mixtures of triglycerides of natural polyunsaturated fatty acids with high polyunsaturated fatty acid content, method for producing same and use thereof; US, US7588791[P]. 2009-09-15.
- [32] HIMAWAN C, STAROV V, STAPLEY A G F. Thermodynamic and kinetic aspects of fat crystallization[J]. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2006, 122(1): 3-33.
- [33] JAYASINGHE C, GOTOH N, WADA S. Regiospecific analysis of shark liver triacylglycerols[J]. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 2012, 89 (10): 1873-1884.

Refinement of Tuna Oil and Enrichment of EPA and DHA as Triacylglycerols by Low Temperature Crystallization

Zheng Feiyang¹, Dai Zhiyuan^{1,2*}, Cui Yiwei¹, Zheng Zhenxiao^{1,2}, Zhu Kai¹, Guo Liping¹

(¹Institute of Seafood, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310012

²Key Laboratory of Aquatic Products Processing of Zhejiang Province, Hangzhou 310012)

Abstract The tuna oil was refined by degumming, neutralization, bleaching and deodorization, and exploring the enrichment effect of low temperature crystallization method on triacylglycerols eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) in refined fish oil. The results showed that after the treatment of refining process, all physicochemical indexes of fish oil reached the quality criterion of first grade refined fish oil; the content of saturated fatty acids decreased, but the contents of monounsaturated fatty acids and polyunsaturated fatty acids increased, EPA and DHA were 6.69% and 16.46%, respectively; the content of triacylglycerols in refined fish oil were 97.62%; the optimum conditions of enrichment were determined: the solvent was acetonitrile and acetone, the crystallization temperature was $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, the ratio of acetonitrile to acetone was 1:12 (V/V), the ratio of fish oil to compound solvent (acetonitrile and acetone) was 7:40 (V/V), the crystallization time was 150 min. Under these conditions, the contents of EPA and DHA were $(12.83\pm 0.34)\%$ and $(28.70\pm 0.48)\%$, respectively, with corresponding yields of $(40.10\pm 1.07)\%$ and $(36.52\pm 2.53)\%$.

Keywords tuna oil; triacylglycerol; EPA; DHA; low temperature crystallization