

超临界 CO₂ 流体萃取法与干法熬制 提取暹罗鳄鱼油的比较

林珈好¹, 潘思羽², 李耀武³, 于继平¹, 马长华^{1*}

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102;

2. 浙江大学附属第一医院, 杭州 310003;

3. 北京洪源澳达生物技术发展有限公司, 北京 100019)

[摘要] **目的:** 分别采用超临界 CO₂ 萃取法及干法熬制提取暹罗鳄鱼油脂, 并进行油脂得率、脂肪酸得率及油脂主要成分的比较研究。**方法:** 分别采用超临界 CO₂ 萃取法及干法熬制提取暹罗鳄鱼油脂, 比较油脂及脂肪酸得率, 并对 2 种工艺提取的鳄鱼油脂进行 GC-MS 分析, 面积归一化法测定计算各主要成分的相对百分含量。**结果:** 超临界 CO₂ 萃取法、干法熬制油脂得率分别为 32.6%、60.0%, 脂肪酸得率分别为 73.06%、76.78%, 两种提取方法所得油脂的主要化学成分含量不完全相同。**结论:** 干法熬制提取暹罗鳄鱼油在油脂得率方面有显著优势, 超临界 CO₂ 萃取暹罗鳄鱼油脂的方法仍待进一步研究与优化。

[关键词] 超临界 CO₂ 萃取; 干法熬制; 暹罗鳄; 气相色谱; 不饱和脂肪酸

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)14-0105-03

Analysis of CO₂ Supercritical Fluid Extraction and Decoction Methods to Extract *Crocodylus siamensis* Oil

LIN Jia-hao¹, PAN Si-yu², LI Yao-wu³, YU Ji-ping¹, MA Chang-hua^{1*}

(1. Traditional Chinese Medicine School, Beijing University of Traditional Chinese Medicine,

Beijing 100102, China; 2. First Affiliated Hospital, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China;

3. Beijing Hongyuan Aoda Biological Technology Development Co., Ltd, Beijing 100019, China)

[Abstract] **Objective:** CO₂ supercritical fluid extraction and decoction methods were used to extract *Crocodylus siamensis* oil, respectively. The oil yield, fatty acid yield and main oil compositions were set to be the investigation index. **Method:** *C. siamensis* oil was extracted by CO₂ supercritical fluid extraction and decoction methods respectively. The oil yield and fatty acid yield were compared. The relative percentage of the components was determined by the area normalization method using gas chromatography (GC) / electron impact (EI) mass spectrometric (MS). **Result:** The oil yields were 32.6%, 60%, respectively, while the fatty acid yields were 73.06%, 76.78%. Mainly compositions extracted by the two methods were not identical. **Conclusion:** Decoction method has certain advantage over CO₂ supercritical fluid extraction method at the aspect of oil yield. The way of extracting *C. siamensis* oil by CO₂ supercritical fluid extraction method still needs further study and optimization.

[Key words] CO₂ supercritical fluid extraction; decoction method; *Crocodylus siamensis*; GC-MS; unsaturated fatty acid

[收稿日期] 20111205(020)

[第一作者] 林珈好, 硕士研究生, 从事现代仪器分析方法在中药质量控制方面的应用研究, Tel: 010-84739445, E-mail: missing319@163.com

[通讯作者] *马长华, 教授, 从事现代仪器分析方法在中药质量控制方面的应用研究, Tel: 010-84738603, E-mail: machanghua60@sina.com

暹罗鳄,也称暹罗淡水鳄、新加坡小型鳄,属爬行纲、鳄目,主要分布于东南亚的婆罗洲、印尼、马来西亚、泰国以及越南等地。现代医学证明,鳄鱼具有很高的药用价值,鳄鱼肉、骨、甲及内脏含有丰富的优质蛋白和人体必需的氨基酸、不饱和脂肪酸、维生素和多种微量元素^[1]。研究表明^[2-3],暹罗鳄鱼鳞胶原蛋白多肽具有正向调节小鼠免疫功能的能力;暹罗鳄多肽粉具有较强的抗氧化、清除自由基作用。其中,鳄鱼的脂肪类成分具有一定的医疗及营养价值,配制成的防冻膏对预防皮肤冻伤有明显疗效。鳄鱼肉经测试,含脂肪量 6.4%,有 24 种脂肪酸,不饱和脂肪酸占 71.3%。鳄鱼白肌中含有只存在于海洋鱼类中的不饱和脂肪酸 DHA^[4]。DHA 俗称脑黄金,是神经系统细胞生长及维持的主要元素,是大脑和视网膜的重要构成成分。目前尚未见采用超临界 CO₂ 萃取技术提取暹罗鳄油脂化学成分的文摘报道。本文分别采用超临界 CO₂ 萃取法和干法熬制提取了人工养殖暹罗鳄油脂,并用 GC-MS 联用技术鉴定了人工养殖暹罗鳄鱼油的化学成分。

1 材料

鳄鱼油(北京洪源澳达生物技术有限公司提供,本实验室制备),TRACE DSQ GC-MS 仪(美国 Thermo Finnigan 公司),NIST2.0 版谱库,DB5-MS 毛细色谱柱(0.25 μm×0.25 mm, 30 m, J&W 公司),HH-4 型数显恒温水浴锅(金坛市华降仪器有限公司),DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限公司),50 mL 三颈烧瓶,2-氨基-2-甲基丙醇(进口分装),所用试剂皆为分析纯。

2 方法

2.1 鳄鱼油脂的提取

2.1.1 超临界 CO₂ 萃取法 萃取条件:压力 25 MPa,温度 50 ℃,分离压力 5 MPa,温度 40 ℃,萃取时间 5 h,分 3 次放样。

2.1.2 干法熬制 取一定量鳄鱼脂肪,洗净,放于不锈钢锅中,加热到 100 ℃,慢熬,加入白土脱色,使油液出完全,去渣,得初油,放冷,用白棉纱过滤,即得。

2.2 鳄鱼油的皂化 分别取 2.2.1 和 2.2.2 项下制得的鳄鱼油约 5 g 于 50 mL 三颈烧瓶中,加入 1.2 g KOH,2.5 mL 水和 15 mL 无水乙醇,于 60 ℃ 水浴中,在 N₂ 保护下搅拌并回流 1 h。皂化完全后,冰浴中迅速冷却,再加入 5 mL 水和 20 mL 石油醚(沸程 30~60 ℃)萃取 2 次,除去石油醚层,萃取液的下层即水层用 3 mol 的 HCl 酸化至 pH 1~2,再用

10 mL 石油醚萃取 2 次。石油醚层用无水硫酸钠干燥、过滤。滤液置坩埚中,在 60 ℃ 水浴上蒸干,得游离脂肪酸。游离脂肪酸先用 N₂ 吹去残余的有机溶剂,在 N₂ 保护下,于 -20 ℃ 冰箱中冷冻贮存,待用,计算脂肪酸得率。

2.3 鳄鱼油的杂环化预处理 取游离脂肪酸约 0.2 g 于具塞 3 mL 小试管中,加入约 1.0 g 2-氨基-2-甲基丙醇,充满 N₂ 后旋紧试管塞,在 170 ℃ 油浴中反应 1 h,冷却至室温后,加适量水及石油醚萃取杂环化产物,取石油醚层,旋蒸去石油醚,再用无水 Na₂SO₄ 干燥进 GC-MS。

2.4 GC-MS 分析条件

2.4.1 GC 条件 进样口温度 250 ℃,载气氦气,流速 1 mL·min⁻¹,分流比 50:1,起始柱温 180 ℃,保留 5 min,以 4 ℃·min⁻¹ 升至 210 ℃,保留 0 min,再以 3.0 ℃·min⁻¹ 升至 255 ℃,保留 15 min。

2.4.2 质谱条件 EI 源,电子能量 70 eV,离子源温度 260 ℃,传输线温度 260 ℃,扫描质量范围 *m/z* 33~450。

3 结果

3.1 超临界 CO₂ 萃取法和干法熬制油脂得率及脂肪酸得率比较 将超临界 CO₂ 萃取法与干法熬制进行油脂率及脂肪酸得率比较,结果见表 1。从表 1 可知,超临界 CO₂ 萃取法油脂得率及脂肪酸得率均低于干法熬制,与文献[5]结果较为一致。

表 1 超临界 CO₂ 萃取法和干法熬制
油脂得率及脂肪酸得率比较 %

方法	油脂得率	脂肪酸得率
超临界 CO ₂ 萃取	32.6	73.06
干法熬制	60	76.78

3.2 GC-MS 结果分析 参考 NIST2.0 版谱库鉴定鳄鱼油脂肪酸各组分,并采用峰面积归一化法测得各组分的相对百分含量。按 GC-MS 条件对鳄鱼油脂肪酸进行分析,得其总离子流图(图 1,2)。经分析鉴定,2 种提取方法所得油脂的脂肪酸中均以不饱和脂肪酸为主,含量分别为超临界 CO₂ 萃取法 62.93%,干法熬制 64.47%。不饱和脂肪酸成分比较见表 2。

比较图 1,2 并结合表 2 可知超临界 CO₂ 萃取法与干法熬制提取鳄鱼脂肪中的不饱和脂肪酸成分除 9,12-十六碳二烯酸外,其他各成分种类无差异。两种方法均能提取出 DHA,与许东晖^[2]报道一致。但是,鳄鱼脂肪中所提取出的不饱和脂肪酸含量有一

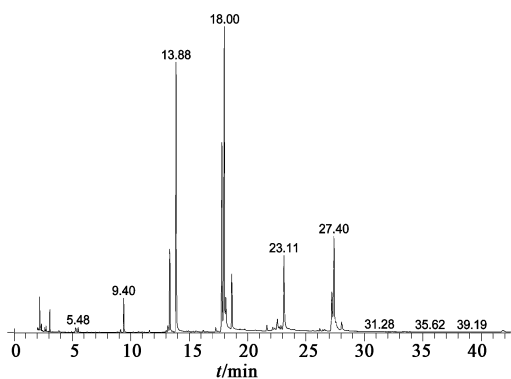


图1 鳄鱼油脂肪酸 APM 衍生物
GC/MS 总离子流图(超临界 CO₂ 萃取法)

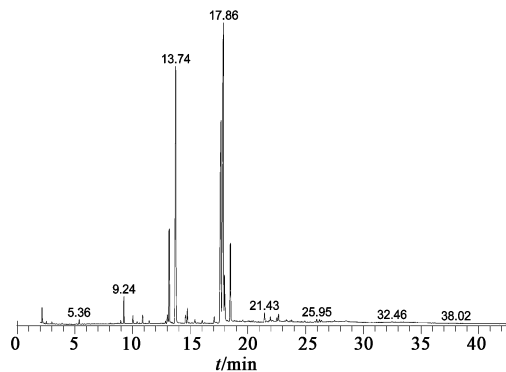


图2 鳄鱼油脂肪酸 APM 衍生物
GC/MS 总离子流图(干法熬制)

表2 不同提取方法测得鳄鱼脂肪中不饱和脂肪酸成分及含量比较

提取方法	不饱和脂肪酸相对含量									
	9-十四 碳烯酸	9,12-十六 碳二烯酸	9-十六 碳烯酸	6,9,12-十八 碳三烯酸	亚油酸	油酸	花生 四烯酸	8,11,14-二十 碳三烯酸	11-二十 碳烯酸	DHA
超临界 CO ₂ 萃取法	0.17	0.11	5.62	0.32	14.56	40.57	0.54	0.50	0.26	0.19
干法熬制	0.20	0	6.68	0.46	19.15	35.34	0.80	0.77	0.84	0.23

定差异,超临界 CO₂ 萃取法取得的鳄鱼油中除油酸和 9,12-十六碳二烯酸外,其他 8 种不饱和脂肪酸含量均比干法熬制法低。其中亚油酸和 11-二十碳烯酸两种成分含量差异 >4.0%。

4 讨论

熬制法分为湿法和干法两种,前者脂肪组织是在水分存在的条件下被加热,后者在加工过程中不加水或者水蒸气,可在常压、真空和压力下进行。目前熬制工艺得到了长足发展,并且通过低温连续熬制与精制,可得优质油脂^[6]。本实验采用干法熬制,所得鳄鱼油脂色泽浅,质地均匀,且产率高。但熬制法在提取油脂的同时,极有可能将游离脂肪酸、色素、磷脂等杂质一同提取出来,故所得油脂质量仍需进一步评价。超临界 CO₂ 萃取技术操作条件温和、工艺简单、效率高、对有效成分破坏少、无污染。本实验采用超临界 CO₂ 萃取法在分离器中又弃出一部分杂质,可能造成油脂的损失,故超临界 CO₂ 萃取法油脂得率低于熬制法。

本实验初步探究表明,超临界 CO₂ 萃取法与熬制法提取鳄鱼脂肪中的不饱和脂肪酸种类大致相同,但含量有一定差异,分析原因为油脂的提取条件对各成分含量有影响。温度升高时,会使饱和脂肪酸的含量降低,而使不饱和脂肪酸的含量有所升高。高温使饱和脂肪酸结构发生变化,部分脂肪酸脱氢

生成相应的不饱和脂肪酸。超临界 CO₂ 萃取法是近年发展起来的一项新型分离技术,且在鳄鱼油提取方面的应用尚未见报道,其最佳提取条件仍待进一步研究。

实验证明暹罗鳄鱼油富含油酸、亚油酸、花生四烯酸等对人体有益的不饱和脂肪酸,并能检测到有脑黄金之称的 DHA,具有一定的开发应用潜能。

[参考文献]

- [1] 李鹏翔. 食疗佳品鳄鱼肉[J]. 医药经纬. 48.
- [2] 王凤林, 万林春, 李谨谨, 等. 暹罗鳄鱼鳞胶原蛋白多肽对小鼠免疫功能的影响[J]. 中国医药科学, 2011, 24:34.
- [3] 李华亮, 张剑, 林齐帆, 等. 暹罗鳄多肽粉的生物效应研究[J]. 厦门大学学报:自然科学版, 2011, 6:1076.
- [4] 许东晖, 马海洋, 梅雪婷, 等. 鳄鱼的活性物质及其药理作用、保健功效研究进展[J]. 中国海洋药物杂志, 2007, 26(6):44.
- [5] 杨倩, 王四旺, 王剑波, 等. 椒目中提取仁油的 3 种方法比较研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(3):20.
- [6] 张佰帅, 王宝维. 动物油脂提取及加工技术研究进展[J]. 中国油脂, 2010, 35(12):8.

[责任编辑 顾雪竹]