

90% 共轭亚油酸合成工艺研究

Research on the Synthetic Process of 90% Conjugated Linoleic Acid

贾楠¹ 蔡森¹ 潘沈洁¹ 张巍² 卢敏^{1*}

Nan Jia¹ Ben Cai¹ Shenjie Pan¹ Wei Zhang² Min Lu^{1*}

1. 浙江永宁药业股份有限公司 中国·浙江台州 318020

2. 裕民县永宁红花科技发展有限公司 中国·新疆 裕民 834800

1. Zhejiang Yongning Pharmaceutical Co., Ltd., Taizhou, Zhejiang, 318020, China

2. Yumin County Yongning Honghua Technology Development Co., Ltd., Yumin, Xinjiang, 834800, China

摘要: 论文以红花籽油为原料, 采用碱法异构—尿素包合法制备含量为 90% 的共轭亚油酸 (CLA), 并通过正交实验确定最佳的优化工艺。结果显示, 碱法异构法最佳工艺为红花籽油与 1,2-丙二醇的质量比为 1:2, 反应温度为 180℃, 反应时间为 2h, 催化剂 (氢氧化钾) 所占比例为红花籽油质量的 40%, 共轭亚油酸的含量可达 77.69%; 尿素包合法最佳工艺为共轭亚油酸、尿素与 95% 乙醇的质量比为 1:2:8, 结晶温度为 25℃, 经此步骤纯化后的共轭亚油酸含量可达 90.85%。论文采用的合成工艺稳定可行、节能环保, 较柱层析法、脂肪酶纯化法、分子蒸馏法等精制工艺显著降低了成本。

Abstract: In this paper, 90% conjugated linoleic acid (CLA) was prepared from safflower seed oil by alkali isomerization urea inclusion method, and the optimal process was determined by orthogonal experiment. The results showed that the optimum process of alkali isomerization was that the mass ratio of safflower seed oil to 1,2-propylene glycol was 1:2, the reaction temperature was 180 °C, the reaction time was 2h, the proportion of catalyst (potassium hydroxide) was 40% of safflower seed oil, and the content of conjugated linoleic acid was 77.69%; the optimum process of urea inclusion method is that the mass ratio of conjugated linoleic acid, urea and 95% ethanol is 1:2:8, the crystallization temperature is 25 °C, and the content of conjugated linoleic acid purified by this step can reach 90.85%. The synthetic process used in this paper is stable and feasible, energy-saving and environmental protection. Compared with column chromatography, lipase purification and molecular distillation, the cost is significantly reduced.

关键词: 红花籽油; 碱法异构法; 尿素包合法; 共轭亚油酸

Keywords: safflower seed oil; alkaline isomerization; urea package method; conjugated linoleic acid

DOI: 10.12346/etr.v3i12.5102

1 引言

共轭亚油酸 (Conjugated linoleic acid, CLA) 是指一系列含有共轭双键的十八碳二烯酸的统称^[1], 是亚油酸 (Linoleic acid, LA) 的同分异构体, 是近年来研究发现最重要的功能性脂肪酸之一^[2]。研究表明, 天然和人工合成的 CLA 有 28 种异构体, 其中 c9, t11 - CLA 及 t10, c12 - CLA 是最主要的活性成分^[3]。CLA 具有抗肿瘤、抗氧化、降血脂、调节血糖血压、提高骨密度、减肥降脂与抑制特异性皮炎等多种生理功能, 受到各界的广泛关注。

自然界中 CLA 主要来源于反刍动物的乳汁和肉制品, 含量较低, 因此人工合成成为生产 CLA 的主要方式。某公司在中国新疆有 12600 亩的红花 GAP 种植基地, 并被评为优质道

地药材 (红花) 种植示范基地, 2019 年度“新疆高品质红花规范化种植示范研究”项目被列入科技部重点研发计划。基地的红花籽油含亚油酸含量可达 81% 以上, 论文以红花籽油为原料制备 CLA, 既能显著提高 CLA 的纯度, 又能有效地提高红花附属产物红花籽油的经济附加值。尽管目前市场上已有 CLA 合成工艺, 但是在纯化过程中会使用到有毒有害的化学物质或是使用特殊的实验设备。论文采用碱法异构化—尿素包合法组合工艺, 旨在使用简单、经济、环保的方法实现这一目标, 且得到的 CLA 含不饱和脂肪酸含量高达 99%。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

红花籽油, 中国新疆裕民县永宁红花科技发展有限公司

【作者简介】贾楠 (1994-), 女, 中国内蒙古乌兰察布人, 硕士, 助理工程师, 从事中药开发研究。

【通讯作者】卢敏 (1961-), 女, 中国浙江台州人, 硕士, 教授级高级工程师, 从事中药与天然药物研究。

公司; 1, 2 - 丙二醇、正己烷、氢氧化钾、尿素、异辛烷、浓盐酸、甲醇、浓硫酸、无水硫酸钠, 分析纯; 95% 乙醇; 纯化水, 自制; 混合共轭亚油酸甲酯标准品, Nu Chek Prep Inc; 十七碳烯酸甲酯标准品, 中国食品药品检定研究院; 单个脂肪酸标准品, 中国食品药品检定研究院。

2.2 仪器与设备

油浴锅, DF-101S, 中国台州市信力电子设备有限公司; 旋转蒸发仪, RE-2000B, 中国上海一科仪器有限公司; 气相色谱仪, 7697A, Agilent Technologies; 电子天平, XS105 Du, METTLER TOLEDO。

2.3 试验方法

2.3.1 CLA 合成工艺流程

第一, 碱法异构化制备 CLA 粗品。

按比例依次将氢氧化钾、1, 2 - 丙二醇、红花籽油依次加入三口烧瓶中, 红花籽油与 1, 2 - 丙二醇的质量比为 1 : 2, 通入氮气并加热搅拌。反应一定时间后停止加热, 冷却至 100℃, 滴加盐酸调 pH 至 1~3, 停止搅拌, 加入 2 倍正己烷萃取, 静置分层, 上层水洗至 pH 为 6~7, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩得 CLA 粗品。

第二, 尿素包合法纯化 CLA 粗品。

按比例将尿素与 95% 乙醇依次加入圆底烧瓶中, 加热搅拌至尿素溶解, 加入 CLA 粗品, 80℃回流 1h, 冷却, 在一定温度下过夜结晶, 取出后快速过滤, 使用旋转蒸发仪除去大量溶剂, 再用 2 倍正己烷萃取, 取上层用饱和食盐水洗涤 1~2 次, 经无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩得到 CLA 样品。

2.3.2 CLA 含量测定

甲酯化: 采用浓硫酸 - 甲醇 (13.3%) 为甲酯化试剂, 精确称取 CLA 样品 0.06g (精确到 0.1mg), 加入 2mL 硫酸甲醇溶液, 混匀, 40℃反应 10min, 冷却至室温, 在加入 2mL 十七碳一烯酸甲酯内标液, 涡旋 3min, 静置 5min, 取上层加入 8mL 水, 涡旋 1min, 静置 5min, 取上层待测。

气相色谱条件: 聚乙二醇硝基苯改性固定相 (50m \times 0.25mm \times 0.2 μ m), 进样口温度为 260℃, 柱温箱温度为 205℃, 检测器温度为 260℃, 气体流量为 1mL/min, 进样体积为 0.6 μ L, 分流比为 50 : 1。采用内标法计算 CLA 含量。

3 结果与分析

3.1 碱法异构法正交设计及结果分析

3.1.1 因素水平的确定

预实验表明反应温度、反应时间、催化剂 (氢氧化钾) 比例是影响 CLA 含量的主要因素, 结合单因素试验结果确定各因素的水平。采用正交试验设计表 L₉(3)⁴ (见表 1) 探讨 CLA 最优制备工艺。

表 1 正交实验设计 L₉(3)⁴

水平	反应温度	反应时间	催化剂比例
	/°C	/h	/%
	A	B	C
1	170	1	30
2	180	2	35
3	190	3	40

3.1.2 试验安排与结果

根据表 1 中各因素水平安排实验, 具有 3 个水平的自变量如下: A (反应温度: 170℃、180℃、190℃), B (反应时间: 1h、2h、3h), C (催化剂比例: 30%、35%、40%), 试验操作方法依据 2.3.1.1, 并以 CLA 含量为优化指标。

正交试验的分析结果见表 2。计算 K (各因素同一水平的平均值) 和 R (各因素的极差) 的值, 根据 K 值, 可以得到碱法异构法最佳制备工艺是 A₃, B₂, C₃, 即反应温度为 190℃, 2h, 40%; 根据 R 值, 影响因素大小排列为 A > C > B, 即影响因素为反应温度 > 催化剂比例 > 反应时间。

CLA 粗品含量的方差分析见表 3。

表 2 CLA 粗品含量

试验号	A	B	C	CLA 粗品含量 /%
1	1	1	1	41.33
2	1	2	2	73.58
3	1	3	3	75.23
4	2	1	2	75.00
5	2	2	3	77.69
6	2	3	1	75.37
7	3	1	3	76.37
8	3	2	1	76.32
9	3	3	2	75.95
K ₁	63.38	64.24	64.34	
K ₂	76.02	75.86	74.84	
K ₃	76.21	75.52	76.43	
R	12.83	11.63	12.09	
最优条件	A ₃	B ₂	C ₃	

表 3 CLA 粗品含量的方差分析

因素	平方和	自由度	F 一值	F _{0.05}	显著性
A	324.513	2	1.522	19.000	
B	262.681	2	1.232	19.000	
C	258.954	2	1.215	19.000	
误差	1.91	2			

3.2 尿素包合法正交设计及结果分析

3.2.1 因素水平的确定

将 CLA 含量划分为以下 5 个等级, 小于 87.00% 为 2 分, 小于 89.00% 为 4 分, 小于 91.00 为 6 分, 小于 93.00 为 8 分, 小于 95.00 为 10 分。在单因素试验的基础上, 以 CLA 含量、CLA 收率及 CLA 含量等级评分为综合指标进行正交试验优化, 以 CLA 粗品与尿素质量比 (1 : 1g·g⁻¹、1 : 1.5g·g⁻¹、

1 : 2g·g⁻¹)、CLA粗品与95%乙醇质量比(1 : 6g·g⁻¹、1 : 8g·g⁻¹、1 : 10g·g⁻¹)及结晶温度(25℃、10℃、-20℃)为考察目标,对CLA纯化工艺进行优化,根据2.3.1.2进行试验操作,见表4。

表4 正交实验设计 L₉(3)⁴

水平	CLA粗品: 尿素	CLA粗品: 95%乙醇	结晶温度
	/g·g ⁻¹	/g·g ⁻¹	/℃
	A	B	C
1	1 : 1	1 : 6	25
2	1 : 1.5	1 : 8	10
3	1 : 2	1 : 10	-20

3.2.2 试验安排与结果

CLA的综合评分见表5。

表5 CLA的综合评分

试验号	A	B	C	CLA含量(%)	CLA收率(%)	CLA含量等级评分	综合评分
1	1	1	1	86.4972	64.94	2	64.78
2	1	2	2	86.4079	58.95	2	62.97
3	1	3	3	88.3616	61.62	4	72.63
4	2	1	2	90.8223	37.18	6	74.12
5	2	2	3	91.6635	39.16	8	75.09
6	2	3	1	87.4909	64.68	4	73.21
7	3	1	3	94.0583	26.04	10	88.05
8	3	2	1	91.0731	39.94	8	83.08
9	3	3	2	91.5867	40.58	8	83.50
K ₁	66.793	75.650	73.690				
K ₂	74.140	73.713	73.530				
K ₃	84.877	76.447	78.590				
R	18.084	2.734	5.060				
最优条件	A ₃	B ₃	C ₃				

注:综合评分=(CLA含量/最大CLA含量)×40+(CLA收率/最大CLA收率)×20+(CLA含量等级评分/最大CLA含量等级评分)×40。

CLA综合评分方差分析见表6。

表6 CLA综合评分方差分析

因素	平方和	自由度	F-值	F _{0.05}	显著性
A	496.256	2	60.497	19.000	*
B	11.856	2	1.445	19.000	
C	49.639	2	6.051	19.000	
误差	8.20	2			

注:*表示p<0.05,具有显著影响。

结果表明,在正交试验中对纯化工艺影响因素按照从大到小排列依次为CLA粗品与尿素的质量比、结晶温度、

CLA粗品与95%乙醇的质量比,其中CLA粗品与尿素的质量比对综合评分有显著影响。从试验结果可以得出最佳优化工艺是A₃,B₃,C₃,即CLA粗品与尿素质量比为1 : 2g·g⁻¹、CLA粗品与95%乙醇质量比1 : 10g·g⁻¹及结晶温度-20℃。考虑到实际生产与成本核算,不考虑-20℃的结晶温度;因为试验8与试验9综合评分相差甚少,但试验8较试验9更节约成本,故在生产中选用试验8,即CLA粗品与尿素质量比为1 : 2g·g⁻¹、CLA粗品与95%乙醇质量比1 : 8g·g⁻¹及结晶温度25℃。

3.2.3 验证试验

按照最佳纯化的工艺合成3批样品,进行验证性试验,结果如表7所示,3批试验结果与优化结果相符,各批间样品的含量比较稳定,说明该合成工艺重复性较好,切实可行。

表7 纯化工艺验证试验(n=3)

编号	CLA含量(%)
1	90.8536
2	90.8519
3	91.0731
平均值	90.9262
RSD(%)	1.4

4 结语

论文以红花籽油为原料,采用碱催化异构化-尿素包合组合工艺可制备含量达90%的共轭亚油酸。采用正交试验优化CLA的合成工艺,结果表明样品含量高,且操作简单可行,为产业化生产提供了理论依据。基地的红花主要用来生产注射用红花黄色素,现以红花籽油为原料合成CLA,不仅可以提高CLA的品质,而且对于红花的深度开发和资源利用具有重要意义。此外,在日常生活中摄入过量的饱和脂肪酸会增加导致动脉粥样化和血栓形成的风险,而不饱和脂肪酸则对心血管系统具有保护作用。本研究制备的样品中不饱和脂肪酸含量可达99%,其中包含约6.5%的单一不饱和脂肪酸和92.5%的双不饱和脂肪酸,是保健食品和功能性食品非常好的原料。

参考文献

- [1] 郭小婧,张东辉.共轭亚油酸酯类衍生物的研究进展[J].中国油脂,2020,45(9):54-61.
- [2] 张艳禾,王春来,刘思国,等.酶法生产共轭亚油酸的研究进展[J].微生物学通报,2011,38(1):105-109.
- [3] 张妞,范亚苇,于化泓,等.Ag~+-SPE/GC测定食物中trans C₁₈(16:1),trans C₁₈(18:1),trans C₁₈(18:2)和共轭亚油酸的含量[J].中国食品学报,2020,20(9):286-295.