

Optimization of the Extraction and Purification of Nervonic Acid from Seeds of *Malania oleifera* Using Orthogonal Design

Yixiao Fu, Yongjie Liang, Yingzhuo Gu, Yuhong Zhang*

Key Laboratory of Forest Plant Ecology of Ministry of Education, College of Chemistry, Chemical Engineering and Resource Utilization, Northeast Forestry University, Harbin Heilongjiang
Email: *pzhangyh@126.com

Received: Jul. 1st, 2020; accepted: Jul. 17th, 2020; published: Jul. 24th, 2020

Abstract

Nervonic acid, a long-chain monounsaturated fatty acid with 24 carbon atoms, is a special substance found in the world that can promote the repair and regeneration of damaged nerve cells. It is abundant in the seed of *Malania oleifera*, and has been attracted much attention at home and abroad. In this paper, the seeds of *M. oleifera* are used as the research materials, and the seed oil is obtained by the Soxhlet extraction method using petroleum ether as the solvent. The number of crystallization, the ratio of extraction material to liquid and the number of extraction are factors. Using the orthogonal experiment design method, the HPLC method for determination of nervonic acid content as evaluation index, optimization of the purification method of nervonic acid in seeds oil of *M. oleifera*, the optimal condition is that the crystallization times are 2 times, the extraction material-liquid ratio is 1:100, and the extraction time is 1 time. Under the optimal conditions, the content of nervonic acid was 70.19%. This method has good stability and simple operation, and provides reference data for the industrial production of nervonic acid from the seed oil of *M. oleifera*.

Keywords

Malania oleifera, Nervonic Acid, Orthogonal Array Design, Extraction and Purification

正交设计优化蒜头果种子中神经酸提取纯化工艺

付一笑, 梁永洁, 谷颖卓, 张玉红*

*通讯作者。

东北林业大学森林植物生态学教育部重点实验室、化学化工与资源利用学院, 黑龙江 哈尔滨
Email: pzhangyh@126.com

收稿日期: 2020年7月1日; 录用日期: 2020年7月17日; 发布日期: 2020年7月24日

摘要

神经酸是一种含有24个碳原子的长链单不饱和脂肪酸,是迄今为止世界上发现的能促进受损神经细胞组织修复和再生的特效物质,其在蒜头果的种子中含量丰富而广为国内外关注。本文以蒜头果(*Malania oleifera*)种子为研究材料,以石油醚为溶剂索氏提取法获得种子油,以结晶次数、萃取料液比和萃取次数为因素,采用正交试验设计法,以HPLC法测定的神经酸含量为评价指标,对蒜头果种子油中的神经酸的纯化方法进行优化,最优条件为结晶次数为2次,萃取料液比为1:100,萃取次数为1次。最优条件下所得产物的神经酸的含量为70.19%。该方法稳定性好,操作简单,为从蒜头果种子油中制备神经酸产品的产业化生产提供参考数据。

关键词

蒜头果, 神经酸, 正交设计, 提取纯化

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

蒜头果(*Malania oleifera*)为铁青树科(Olacaceae)蒜头果属(*Malania*)常绿乔木,别名猴子果、马兰后、唛厚、山桐果(子)等,是我国特有的单种属植物[1],被《中国植物红皮书-稀有濒危植物》列入中国珍稀濒危植物名录,被世界自然保护联盟(IUCN)评估为易危(VU)特种[2],蒜头果也是国家 II 级重点保护野生植物(第一批) [3]。蒜头果主要生长在广西西部和云南东南部的石灰岩山地混交林内或稀树灌丛林中,因种子中含有丰富的神经酸而日益受到重视[4]。神经酸(Nervonic acid, NA),又名鲨鱼酸(Selacholeic acid),化学名为顺-15-二十四碳单烯酸(*cis*-15-tetracosenic acid),是一种长链单不饱和脂肪酸,分子式为 $C_{24}H_{46}O_2$,相对分子质量为 366.6 [5]。神经酸是脑神经细胞核心天然成分,是迄今为止世界上发现的能促进受损神经细胞组织修复和再生的特效物质,是神经细胞,特别是大脑细胞,视神经细胞,周围神经细胞生长,再发育和维持的必需“高级营养素”,神经酸是世界科学家公认的、唯一能修复疏通受损大脑神经通路经纤维并促使神经细胞再生的双效物质[6];但神经酸的来源过去主要依靠在海洋中捕杀鲨鱼获得,资源有限,成本较高。随着国际社会禁捕鲨鱼,神经酸的来源陷入困境,从植物中发掘神经酸已成为各国政府和科学家的重视。目前,已在 10 余种植物中发现含有神经酸,其中蒜头果是含有神经酸最高的植物[7]。蒜头果种仁含油脂 50%~60%,其中神经酸含量达 40%~60% [8]。

在蒜头果油制得神经酸产品过程中,如何提取纯化有效物质神经酸,分离出混合脂肪酸粗产物中的油酸、烷酸、烯酸等从而提高神经酸产品的纯度,目前还没有形成一套完整成熟的提纯工艺流程。本文在结合重结晶提取方法和分液萃取方法基础上,进行单因素试验和正交试验设计优化了神经酸提纯工艺,提高了游离神经酸的富集度,去除了产品因混合脂肪酸皂化酸化后产生的无机盐杂质,显著提高了神经

酸产品的纯度，并且提纯工艺流程操作简单，无毒无害，清洁环保，为蒜头果和神经酸产业发展，提供基础数据。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料与仪器

实验材料：蒜头果种子采自云南广南。

试剂：石油醚和无水乙醇为分析，三氯甲烷、冰乙酸、乙腈、甲醇、四氢呋喃均为色谱纯。实验用水为自制超纯水，神经酸标准品：Sigma-Aldrich 有限公司

仪器：Waters2695 高效液相色谱仪，2489-UV 紫外检测器

SYG-2 数显恒温水浴锅：常州朗越仪器有限公司

SG-5402B 四联磁力加热搅拌器：上海硕光电子科技有限公司

RE-52AA 旋转蒸发器：上海青浦沪西仪器厂

TGL-20M 高速离心机：湖南湘仪实验室仪器开发有限公司

BSA124S-CW 电子天平：北京 Sartorius 科学仪器有限公司

2.2. 蒜头果中神经酸粗提物制备

2.2.1. 蒜头果种子油的提取

取蒜头果种仁于 50℃ 的恒温烘箱中烘干 24 h，干燥完毕后用微型粉碎机对种仁粉碎过 10 目筛得到蒜头果种仁粉末，种仁粉末置于 60℃ 恒温烘箱中二次烘干，含水率低于 5%，使用索氏提取法使用得到蒜头果油。索氏提取条件：石油醚；料液比为 1:15 (mg:mL)；提取时间：8 h；提取温度：80℃。提取后的液体经过旋转蒸发除石油醚制得浅黄棕色透明蒜头果油，油状质地粘稠易拉丝，具坚果香味。

2.2.2. 神经酸粗提物的制备

将 2.2.1 中得到的蒜头果种仁油称取 20 g，加入 40 mL 10% NaOH 皂化液，90℃ 水浴加热搅拌 4 h，搅拌转速 500 r/min；而后向皂化溶液中加入 10% 硫酸，调节溶液 pH = 2，90℃ 继续水浴加热搅拌 2 h。酸化结束分离油脂层，80℃ 水洗多次至溶液中性。冷却后得到混合脂肪酸的固体，干燥得到含神经酸的粗品。

2.3. 单因素实验

将 2.2.2 中得到的神经酸粗产物按 1:2 (g:mL) 加入无水乙醇，充分搅拌适度加热后使其充分溶解，待溶液冷却至常温后，将其置于 4℃ 冰箱中静置 6 h，取出溶液进行减压抽滤，即获得的神经酸结晶产物，以三氯甲烷为溶剂，按一定的料液比进行萃取，所得产物利用 HPLC 法进行神经酸含量测定。以结晶 2 次、萃取料液比 1:100 (g:mL) 和萃取 1 次为试验条件，其中一个因素发生改变而其它 2 个因素不变，选取不同对结晶次数(1 次结晶、2 次结晶、3 次结晶和 4 次结晶)、萃取料液比(1:50、1:75、1:100、1:150、1:200) 和萃取次数(萃取 1 次、萃取 2 次、萃取 4 次和萃取 4 次)进行单因素试验。

2.4. 正交设计优化实验

以结晶次数(A)、萃取料液比(B)、萃取次数(C)进行 3 因素 3 水平正交试验设计(表 1)，以神经酸产品含量(%)的作为综合评价指标，优化提取神经酸的最佳参数。

2.5. 色谱条件[9]

色谱柱：Agilent C-18 ODS 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)。

流动相：甲醇 - 乙腈 - 四氢呋喃 - 0.4%乙酸水溶液，其体积比为 10:80:5:5。

流速 1.0 mL/min；柱温：25℃；检测波长：205 nm；进样量 10 μL。神经酸标准品和样品的高效液相色谱图见图 1 所示。

Table 1. Factor and level table

表 1. 因子水平表

水平 Level	因素 Factor		
	结晶次数 A/次	萃取料液比 B/g:ml	萃取次数 C/次
1	1	1:75	1
2	2	1:100	2
3	3	1:150	3

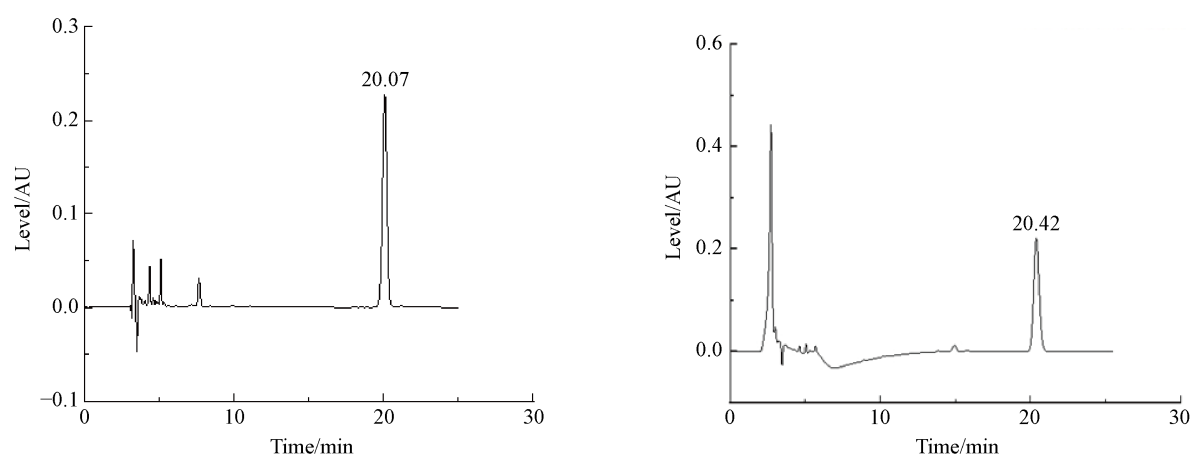


Figure 1. HPLC chromatogram of nervonic acid standard (left) and samples (right)

图 1. 神经酸标准品(左)和样品(右) HPLC 色谱图

2.6. 数据分析

采用 Microsoft Office Excel 2016 软件对数据进行统计分析和相对标准偏差计算，使用 SPSS 22.0 统计软件进行方差分析。

3. 结果与分析

3.1. 单因素试验

3.1.1. 结晶次数对纯化的影响

不同结晶次数对神经酸纯化效果影响如图 2 所示。结果表明，结晶 2 次时所得产物中神经酸含量显著增加，比结晶 1 次时的神经酸含量增加 50%以上；而随着结晶次数增加，所得产物的神经酸含量呈降低趋势。因此结晶 2 次为最优结晶次数。

3.1.2. 萃取料液比对纯化的影响

不同萃取料液比对神经酸纯化效果影响如图 3 所示，结果表明：随着料液比的变化，从 1:50 到 1:100，所得产物中神经酸的含量呈缓幅上升趋势，从 1:100 到 1:200，所得产物中神经酸的含量急速持续下降，并且料液比 1:200 (46.54%)所得产物中神经酸含量远小于 1:50 (60.78%)。因此最优萃取料液比确定为 1:100。

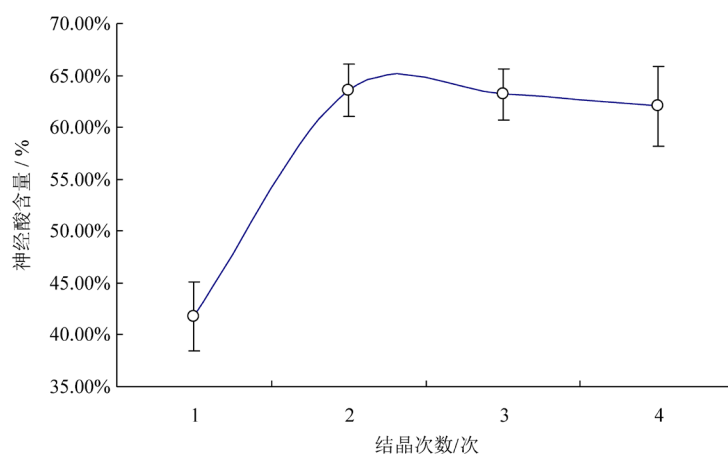


Figure 2. Effect of crystallization times on purification of nervonic acid

图 2. 结晶次数对神经酸纯化影响

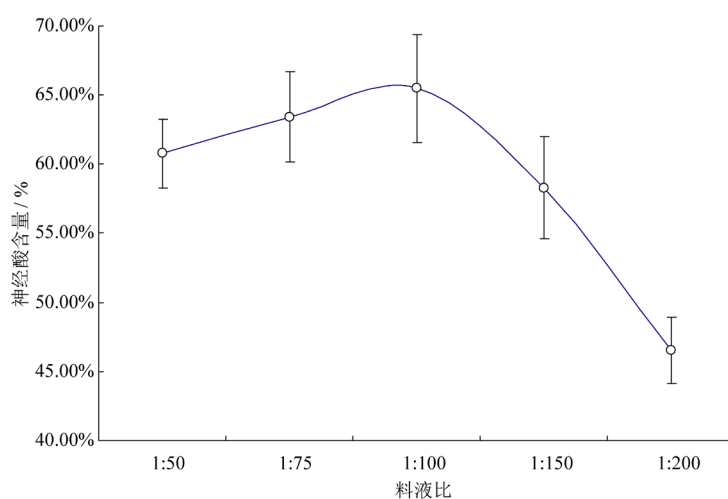


Figure 3. Effect of extraction material-liquid ratio on purification of nervonic acid

图 3. 萃取料液比对神经酸纯化影响

3.1.3. 萃取次数对纯化效果的影响

分液萃取过程中发现水相与有机相中间存在一定程度的乳化层，且萃取一次后由于技术限制无法分离全部三氯甲烷有机相溶液，造成产品损失。因此在萃取过程中设定不同萃取次数来研究对神经酸产品的纯化效果。实验结果表明(图 4)：萃取次数对神经酸纯化效果的影响明显，随着萃取次数增多，萃取所得到的产物中神经酸含量随萃取次数的增加而下降。萃取 2 次(神经酸含量为 64.37%)虽然比萃取 1 次(神经酸含量为 63.30%)所得产物中神经酸含量略高，经方差分析，差异不显著($p < 0.05$)，而产物的富集得率(另文发表)由第 1 次萃取的 27.40%降为第 2 次萃取的 3.69%，并且差异极显著($p < 0.01$)。而随着萃取次数的增加，所得产物的神经酸含量呈下降趋势。本实验选定萃取次数为 1 次作为最优条件。

3.2. 正交试验结果与分析

根据单因素实验结果，以结晶次数、萃取料液比、萃取次数三个因素为自变量，分别以 A、B、C 表示，以神经酸含量为评价指标，进行 $L_9(3^3)$ 正交实验设计(表 1)，实验方案及结果见表 2。

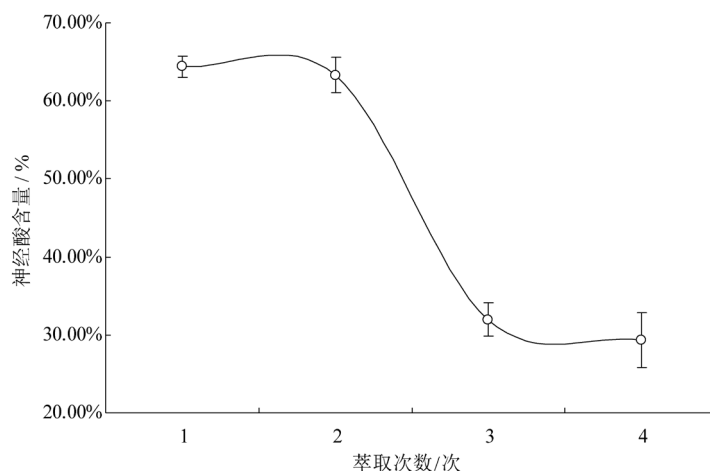


Figure 4. Effect of extraction times on purification of nervonic acid
图 4. 萃取次数对神经酸纯化的影响

Table 2. Orthogonal test design and results

表 2. 正交试验设计及结果

实验号	因素			神经酸含量/%
	结晶次数 A/次	料液比 B/g:mL	萃取次数 C/次	
1	1	1	1	44.23
2	1	2	2	52.46
3	1	3	3	33.75
4	2	1	2	58.33
5	2	2	3	65.64
6	2	3	1	60.71
7	3	1	3	49.29
8	3	2	1	68.02
9	3	3	2	62.87
K_1	130.44	151.85	172.96	
K_2	184.68	186.12	173.66	
K_3	180.18	157.33	148.68	
\bar{k}_1	43.48	50.62	57.65	
\bar{k}_2	61.56	62.04	57.89	
\bar{k}_3	60.06	52.44	49.56	
R	54.24	34.27	24.28	

注: K 值表示各因素同一水平的神经酸含量之和; k 值表示各因素同一水平的神经酸含量的平均值; R 值决定各因素对试验结果影响的大小。

由表 2 可得到, 极差 R 是 $A > B > C$, 神经酸含量受各因素的影响, 结晶次数(A)对神经酸的含量影响最为显著, 其次是萃取料液比(B), 最后是萃取次数(C)。从表 2 中看, 结晶次数的 $K_2 > K_3 > K_1$, 选择 A_2 为最优水平; 萃取料液比的 $K_2 > K_3 > K_1$, 选择 B_2 为最优水平; 萃取次数的 $K_2 > K_1 > K_3$, 考虑到富集得率 $K_1 (74.97) > K_2 (28.49)$, 并且差异极显示($p < 0.01$) (另文发表), 而神经酸的含量的 K_1 和 K_2 的值差异

不显著($p > 0.05$), 综合考虑, 选择 C_1 为最优水平。

因此综合各方面考量, 确定三种因素的最优提取组合为 $A_2B_2C_1$, 即结晶次数为 2 次, 萃取料液比为 1:100, 萃取次数为 1 次。

3.3. 正交最优条件验证

为验证得到的工艺条件的优劣, 选取同一批次经皂化酸化后得到的神经酸粗品(H) 3 份, 按照 $A_2B_2C_1$ 纯化方案, 开展试验, 所得到的神经酸产品的质量(Q)和神经酸的含量见表 3。结果表明, 纯化后所得到的产物中神经酸含量的平均值为 70.19%, 高于正交实验表中的 9 个实验, 并且 RSD 为 1.23%, 从而表明利用 A_2 、 B_2 、 C_1 工艺条件从蒜头果种子油纯化神经酸具有较好的稳定性。

Table 3. Optimization test results
表 3. 优化试验结果

	神经酸粗品 H/g	纯化后产品质量 Q/g	神经酸含量/%
T ₁	20.00	5.6620	69.87
T ₂	20.08	5.1465	71.17
T ₃	20.02	5.3353	69.53
均值	/	/	70.19
RSD	/	/	1.23%

4. 结论

本实验以蒜头果种仁为原料提取其种子油, 以神经酸的含量为评价指标, 通过正交试验考察了结晶次数、萃取料液比和萃取次数对提取种子油中神经酸纯化的影响。对神经酸纯化影响最大的是结晶次数, 其次为萃取料液比, 影响最小的为萃取次数, 同时确定了其最优水平为 A_2 、 B_2 和 C_1 , 即结晶次数为 2 次, 萃取料液比为 1:100, 萃取次数为 1 次。并利用最优工艺进行 3 组重复验证实验, 神经酸的平均含量为 70.19%, 均高于正交实验表中的实验, 纯化率高, 工艺稳定。

基金项目

国家林业公益性行业专项[This Work Was Supported by the Special Fund for Forestry-Scientific Research in the Public Interest] (No. 2012BAD21B050107)资助。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1988, 24: 33-35.
- [2] 傅立国. 中国植物红皮书-稀有濒危植物(第一卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1991: 480-481.
- [3] 国家林业和草原局. 国家重点保护野生植物名录(第一批) [EB/OL]. <http://www.forestry.gov.cn/yemian/minglu1.htm>, 1999-08-04.
- [4] 郭方斌, 王四海, 王娟, 等. 珍稀植物蒜头果野生植株结实量及果实特征研究[J]. 广西植物, 2018, 38(1): 57-64.
- [5] Li, Q., Chen, J., Yu, X.Z., et al. (2019) A Mini Review of Nervonic Acid: Source, Production, and Biological Functions. *Food Chemistry*, **301**, Article ID: 125286. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125286>
- [6] 玛依乐·艾海提, 侯晨, 孟永宏, 等. 神经酸的来源与功能研究进展[J]. 中国油脂, 2019, 44(10): 105-109.
- [7] 马柏林, 梁淑芳, 赵德义. 含神经酸植物的研究[J]. 西北植物学报, 2004, 24(12): 2362-2365.
- [8] 王性炎, 樊金栓, 王姝清. 中国含神经酸植物开发利用研究[J]. 中国油脂, 2006, 31(3): 69-71.
- [9] 谷颖卓, 付一笑, 张玉红. 蒜头果中神经酸的高效液相色谱法检测[J]. 植物学研究, 2020, 9(4): 307-313.