

几种海洋生物高度不饱和脂肪酸的 比较研究

李烈英 于富才 李光友

(中国科学院海洋研究所, 青岛)

摘 要 采用修改的Stumpf法研究了两种海洋动物(灰凹貽贝*Crenomythilus graianus*和中间球海胆*Strongylocentrotus intermedius*)和两种海洋植物(内枝多管藻*Polysiphonia morrowii*、角托马尾藻*Sargassum aemulum*)的脂肪酸组成, 其结果如下。

1. 灰凹貽贝的肝脏中含有大量的DHA(占总脂的14.26%);
2. 中间球海胆的总脂中含有15.69%的EPA;
3. 内枝多管藻脂中的主要脂肪酸为EPA, 占总脂的45.03%;
4. 角托马尾藻中的AA含量为其总脂的19.34%。

因此, 上述4种海洋生物, 是提取EPA、AA和DHA的好材料。

关键词 多聚不饱和脂肪酸(PUFAS) 花生四烯酸(AA) 二十碳五烯酸(EPA)
二十二碳六烯酸(DHA)

前 言

多聚不饱和脂肪酸(Polyunsaturated Fatty Acid, PUFA), 又叫高度不饱和脂肪酸(High Polyunsaturated Fatty Acid, HPUFA)系指含多个双键的长链脂肪酸。这些化合物如二十碳五烯酸(20: 5 ω 3, eicosapentaenoic acid, EPA), 花生四烯酸(20: 4 ω 6, arachidonic acid, AA)和二十二碳六烯酸(22: 6 ω 3, docosahexaenoic acid, DHA)等, 特别是 ω 3系列的多烯酸, 具有很强的生理活性, 是人及动物生长发育所必需的物质, 能够抗血栓, 防止血小板聚结, 舒张血管, 降低胆固醇和甘油三脂的综合作用, 增高高密度蛋白胆固醇, 降低低密度蛋白胆固醇, 从而降低血液粘度, 使血压下降。所以, 高度不饱和脂肪酸可用于治疗心肌梗塞、冠心病、脉管炎、脑动脉硬化等多种疾病。同时, 这些化合物也是更好的营养品, 特别值得提及的DHA, 它能促进脑细胞的生长发育, 经常吃海洋动植物, 多吸收DHA, 就会活化大脑神经细胞, 改善大脑机能。如果幼鱼、贝类等的种苗缺少某些高度不饱和脂肪酸, 就会大量死亡, 发育障碍, 并产生畸形^[1, 2]。因此, 对高度不饱和脂肪酸的分布、组成、性质和利用进行深入的研究, 具有重要的现实意义。

最早研究海洋藻类不饱和脂肪酸的是I.overn (1936)^[3]。1955年Murray采用分部蒸馏的方法测出海洋动物脂肪酸的组成^[4]。同年, Kaufmann和Nitsch首次利用纸层析将油酸和亚油酸分离^[5]。之后, 不饱和脂肪酸的研究有较大的发展, 柱层析^[6]、薄层层析^[7]、气相色谱和液相色谱^[8]的出现, 为提纯、分离和制备高度不饱和脂肪酸提供了可能。80年代以来, 日本已开始用EPA治疗动脉粥样硬化和脑血栓, 并将其掺与饵料中饲养斑节对虾, 获得良好结果^[9]。近几年, 苏联脂化学家Vaskovsky等^[10], 除对海洋动植物不饱和脂肪酸进行了较全面的理论研究外, 还用更先进的碘内酯法将EPA、DHA和AA分离成单体, 供作生物活性物质, 研究其在人及动物体内的代谢效果。我国在这一领域里的理论研究工作刚刚起步, 尚未见这方面的详细报道。

我国有丰富的海洋动植物资源, 在北方海域有许多种红藻和棘皮动物的分布, 如多管藻、贻贝、海胆和马尾藻等。这些海洋动植物不但含高度不饱和脂肪酸多, 而且容易采集, 是提取高度不饱和脂肪酸的好材料。

从海洋动植物中提取高度不饱和脂肪酸, 进而研究其结构和在生物体内的代谢功能, 并进一步开发利用, 这不仅会丰富脂化学知识, 而且更可对水产和医药、保健事业的发展起到积极的促进作用。

1 实验方法

1.1 材料

灰凹贻贝 (*Crenomytilus grayanus*)、中间球海胆 (*Strongylocentrotus intermedius*)、内枝多管藻 (*Polysiphonia morrowii*)和角托马尾藻 (*Sargassum aemulum*), 于1990年冬天, 采自苏联远东海域, 并养于活水槽中, 使用前, 用过滤海水和蒸馏水洗干净。

1.2 药品

甲醇、氯仿、己烷、异丙醇、苯、氨水、乙醚、丙酮、 H_2SO_4 、硅胶-G(100 μm 左右)、硅胶-H(2~7 μm)和硝酸银等。所用药品均为分析纯。所有有机溶剂使用前全部重蒸。

1.3 仪器

旋转蒸发器、组织捣碎机、低速离心机、磁力搅拌器、水平仪、玻璃层析柱、烘烤炉、层析缸、气相色谱仪 (Shimadzu C-R₃A Chromatopac Japan)。

1.4 总脂的萃取

用改进的Folch (1957)法^[11]提取动物总脂, 而以改进的Blish和Dyer (1959)法^[12]提取植物总脂。

1.5 脂肪酸的皂化和脂化^[13]

取10mg总脂提取物, 加入0.5cm³ 1% (W/V) CH_3ONa/CH_3OH 溶液, 于55 $^{\circ}C$ 水浴加

热20分钟,接着再加入 0.5cm^3 5% HCl/CH₃OH溶液,在55°C水浴加热20分钟,再取 2cm^3 己烷加进上述反应体系内,混均匀,静止分层,吸取上层有机相,再向下层水相中加入 2cm^3 己烷,轻轻摇动,静止分层,吸取有机相,合并两次吸取液,于旋转蒸发器内蒸干,加入几滴己烷,使甲酯化的脂肪酸(MeFA)溶解,并置于冰箱内备用。

1.6 薄板层析(TLC)

用特制的毛细玻璃管吸取上述甲酯化的样品,点在层析板(6cm×6cm的玻璃板)下沿以上1/3cm处,于溶剂系统为甲苯:己烷(1:1, V/V)中展层,当溶液到达距层析板上沿1/4cm处时,取出玻片,透过光,肉眼可见脂肪酸甲酯集中于玻板的上部,然后将全部MeFA刮下,用氯仿洗脱过滤,滤液于旋转蒸发器内蒸干,再加入 0.5cm^3 氯仿,即可进行气相色谱(GLC)分析。

1.7 不饱和脂肪酸甲酯的分析(GLC)

先将硅胶薄板在饱和AgNO₃/CH₃OH溶剂中层析,取出吹干,然后将脂肪酸甲酯混合物点样,在以苯为溶剂的系统中层析,取出吹干后,用一块干净的玻璃板盖住TLC板的样品的大部分,只将右边一侧的小部分露出,然后喷撒显色液,在110°C烘烤后,便出现各呈色点或带,自上而下分别为饱和脂肪酸甲酯,单烯酸甲酯和多烯酸甲酯,根据呈色点的位置,将未喷显色剂的各区带的样品(饱和MeFA,单烯MeFA和PUFAMEFA)分别刮下来,并如前法洗脱、过滤、蒸干,最后进行GIC分析鉴定。

1.8 不饱和脂肪酸甲酯GLC分析

将标准不饱和脂肪酸甲酯配成一定比例的混合液,根据标准混合液中各不饱和脂肪酸甲酯色谱峰的保留时间鉴定待测样品色谱峰。通常的做法是,样品在 $25\text{m}\times 0.2\text{mm}$ 毛细管柱内,以Carbonwax为固定相,氦(He)为载体,在195°C下分离出样品色谱峰。在这样的条件下,每一种脂肪酸甲酯的保留值都是固定不变的,因为保留值是物质的特征,可以用作定性的依据。在Shimadzu C-R3A Chromatopac色谱仪上,由计算机自动完成峰面积的测量,求出每种脂肪酸的百分含量。

2 结果与讨论

海洋动植物总脂,经皂化甲酯化后,便得到脂肪酸甲酯(MeFA)的混合物。甲酯化混合物经TLC处理,大部分饱和脂肪酸甲酯被除去,剩下的单烯酸甲酯,双烯酸甲酯和多烯酸甲酯分别进行GLC分析,得出每种海洋生物不饱和脂肪酸甲酯各组分不饱和脂肪酸的种类和百分含量。

2.1 灰凹贻贝不饱和脂肪酸的分析结果

灰凹贻贝不饱和脂肪酸的组成(图1和表1)表明,该动物肝脏内含有19种不饱和脂肪酸,其主要高度不饱和脂肪酸有18:3 ω 3、18:4 ω 3、20:3 ω 6、20:4 ω 6、20:5 ω 3、22:3 ω 6、22:5 ω 3

和22:6 ω 3等.

表1 灰凹貽贝总PUFA中各组分的含量 (%)

峰号	名称	含量	峰号	名称	含量
4	14:0	1.5	40	20:2 ω 6	3.74
9	16:0	3.75	41	20:3 ω 6	4.76
10	16:1	1.43	44	20:4 ω 6	4.51
26	18:2 ω 6	12.75	50	20:5 ω 3	5.72
27	18:2 ω 4	1.15	52	22:2 Δ 5,7	2.47
31	18:3 ω 3	2.47	53	22:2 Δ 5,13	15.15
33	18:4 ω 3	2.71	54	22:3 ω 6	1.4
37	20:1 ω 9	1.94	55	22:4 ω 6	0.26
38	20:1 ω 7	1.03	56	22:5 ω 6	0.21
39	20:2 Δ 5,11	22.2	57	22:5 ω 3	0.22
			58	22:6 ω 3	1.27

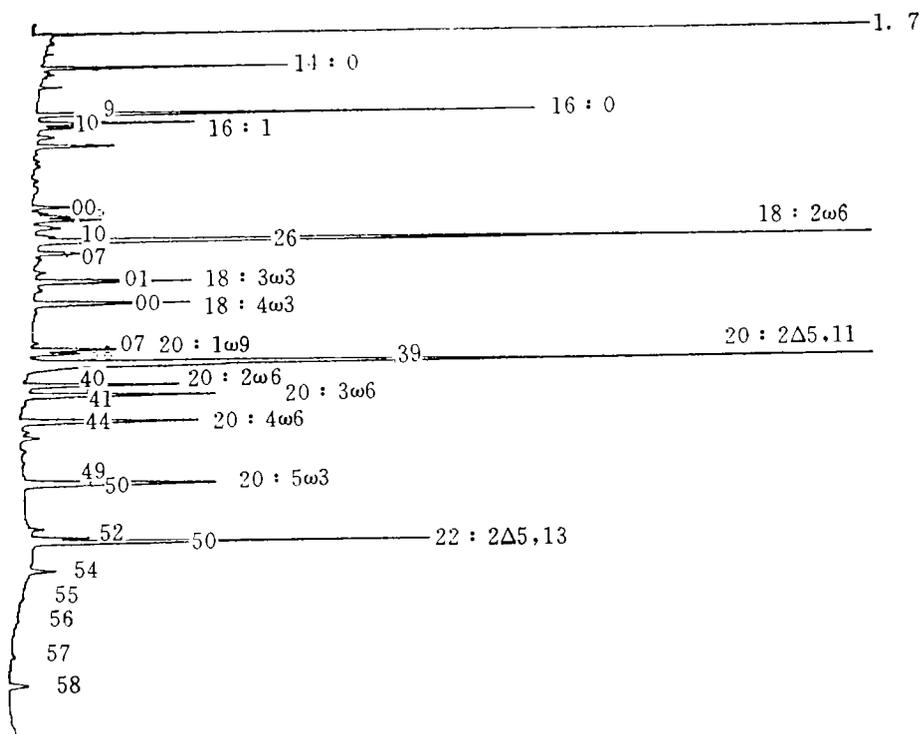


图1 灰凹貽贝多聚不饱和脂肪酸GLC图谱 (4和9号峰为加入的标准样)

(图下方“57”应为“57 22:5 ω 3”, “58”应为“58 22:6 ω 3”)

在灰凹貽贝肝中还含有多种特殊的PUFA,即UMID (unmethyl interrupted dien-
eic acid)如20:2 Δ 5,11、22:2 Δ 5,11和22:2 Δ 5,13. 这种结构的不饱和脂肪酸在海洋动植物中
出现,其产生的机理和功能还不清楚. 通常的PUFA都是两个双键之间隔一个碳原子:
-C=C-C-C=C-, 因此,20:5 ω 3就表示双键的位置 Δ =4,8,12,15,18,而UMID不

同, 20:2 Δ 5,11中双键的位置为 $\Delta=5,11$. 不是有规律的二个双键之间隔一个碳原子.

有一点需要解释的是, 在灰凹贻贝肝抽提液总脂肪酸分析中, EPA和DHA的含量均相当高, 分别为10.61%和14.26%, 但经TLC分离纯化之后, 在PUFA的GLC图谱中, DHA和EPA大都消失了, 同时, 如花生四烯酸等高度不饱和脂酸的含量也没有相对增多. 这种现象的出现可能有3个原因: (1) 在TLC层析中, DHA和EPA由于含5~6个双键, 且碳链又长, 化合物迁移的距离短, 几乎靠近原点, 在取样的时候, 大都没有刮下来; (2) 含双键越多, 与胶结合越紧密, 需要洗脱力较强的洗脱液才能将其全部洗下来. 实验过程中, 洗脱液一直用的氯仿, 如果改用氯仿/甲醇(3:1, V/V), 增强洗脱液的极性, 则有可能保证DHA和EPA等HPUFA全部洗脱下来; (3) HPUFA双键多, 极易氧化破坏, 实验时未加抗氧化剂, 也未充分保护, DHA和EPA等HPUFA可能在处理过程被氧化了.

2.2 中间球海胆不饱和脂肪酸的分析结果

表2和图2的GLC测试结果表明, 中间球海胆生殖腺中PUFA的种类相当多, 计有20多种

表2 中间球海胆总PUFA中各组分的含量(%)

峰号	名称	含量	峰号	名称	含量
11	16:2 ω 4	0.81	37	20:2 Δ 5,11	11.07
13	16:3 ω 3	0.32	38	20:2 Δ 5,13	3.65
17	16:4 ω 3	0.91	42	20:2 ω 6	5.45
18	18:0	2.46	44	20:3 ω 6	1.22
22	18:2 Δ 5,9	1.42	46	22:4 ω 6	15.26
23	18:2 ω 6	3.64	47	22:3 ω 3	3.79
24	18:2 ω 4	0.67	50	22:4 ω 3	1.79
25	20:3 ω 6	0.75	51	22:5 ω 3	21.83
28	20:3 ω 3	4.01	55	22:2 Δ 5,11	0.52
30	20:4 ω 3	7.19	56	22:2 Δ 5,13	2.79
31	18:4 ω 1	0.24			

注: 18号峰为加入的标准样.

不同种类的不饱和脂肪酸, 除5种特殊结构的不饱和脂肪酸(18:2 Δ 5,9、20:2 Δ 5,11、20:2 Δ 5,13、22:2 Δ 2,11和22:2 Δ 5,13)外, 有16碳烯酸3种(16:2 ω 4、16:3 ω 3和16:4 ω 3), 18碳烯酸6种(18:2 ω 6、18:5 ω 6、18:2 ω 4、18:3 ω 3、18:4 ω 3和18:4 ω 1), 20碳烯酸6种(20:2 ω 6、20:3 ω 6、20:4 ω 6、20:3 ω 3、20:4 ω 3和20:5 ω 3), 其中, 20:5 ω 3和20:4 ω 6含量最高, 分别为21.83%和15.56%.

2.3 角托马尾藻PUFA的GLC检测结果

角托马尾藻总脂肪酸甲酯混合物, 经TLC纯化分离, 所得不饱和脂肪酸甲酯GLC分析结果如图3和表3所示.

从以上数据可以看出, 在角托马尾藻的不饱和脂肪酸中, 多烯酸的种类比海胆和贻贝的少, 单烯和双烯酸只有4种, 但18:2 ω 6的百分含量却相当高, 为总不饱和脂肪酸的17.97%.

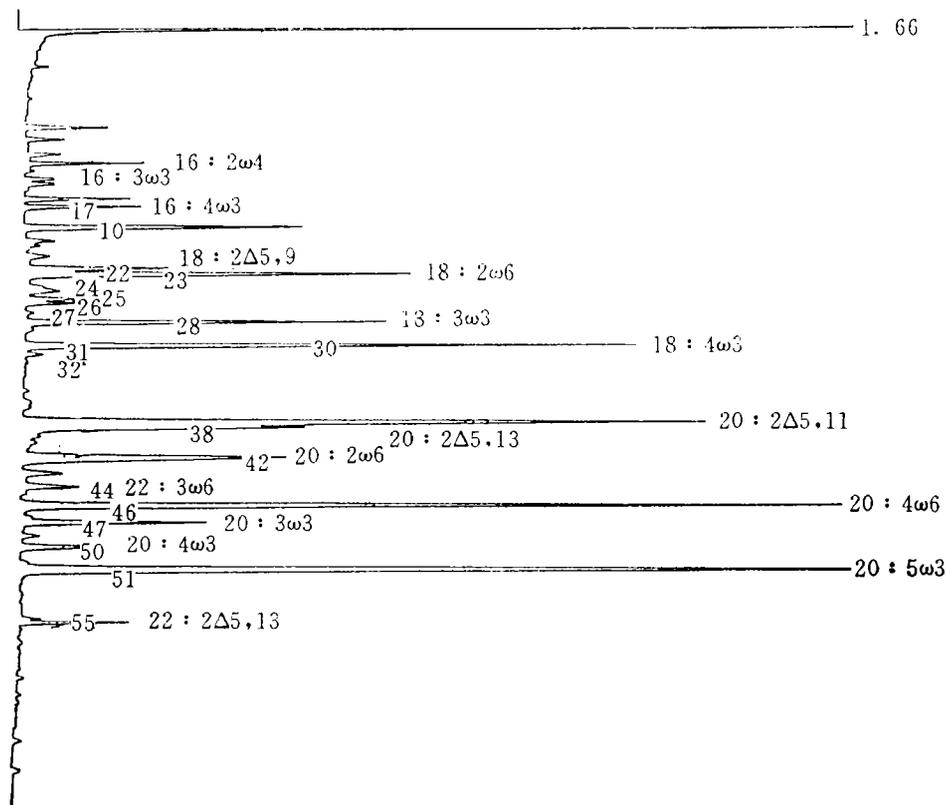


图2 中间球海胆PUFA、GLC图谱

高度不饱和脂肪酸有6种(18:3 ω 6、18:4 ω 3、20:3 ω 6、20:4 ω 6和20:5 ω 3)。其中18碳烯酸和20碳烯酸各3种,含量最高的是花生四烯酸(20:4 ω 6),为26.5%。

表3 角托马尾藻纯化后总PUFA中各组分含量(%)

峰号	名称	含量	峰号	名称	含量
5	14:0	0.56	25	18:2 ω 6	17.97
11	16:0	0.11	27	18:3 ω 6	3.57
12	16:1 ω 7	8.1	29	18:3 ω 3	8.01
15	16:2 ω 1	1.74	30	18:4 ω 3	10.76
21	18:0	0.06	43	22:3 ω 6	7.05
22	18:1 ω 9	1.79	44	20:4 ω 6	26.5
			49	20:5 ω 3	5.87

2.4 内枝多管藻脂肪酸的组成

内枝多管藻总脂肪酸甲酯未经TLC纯化,直接进行GLC分析,其结果如图4和表4所示。从图中可以清楚地看出,内枝多管藻的脂肪酸组成十分简单,主要成分为饱和脂肪酸16:0和高度不饱和酸EPA,其含量前者为25.32%,后者为45.03%,其他成分如20:3 ω 6、20:4 ω 6、20:3 ω 3和20:4 ω 3等含量极少,所以这种藻类是提取EPA的极好材料,因其杂质少,很容易

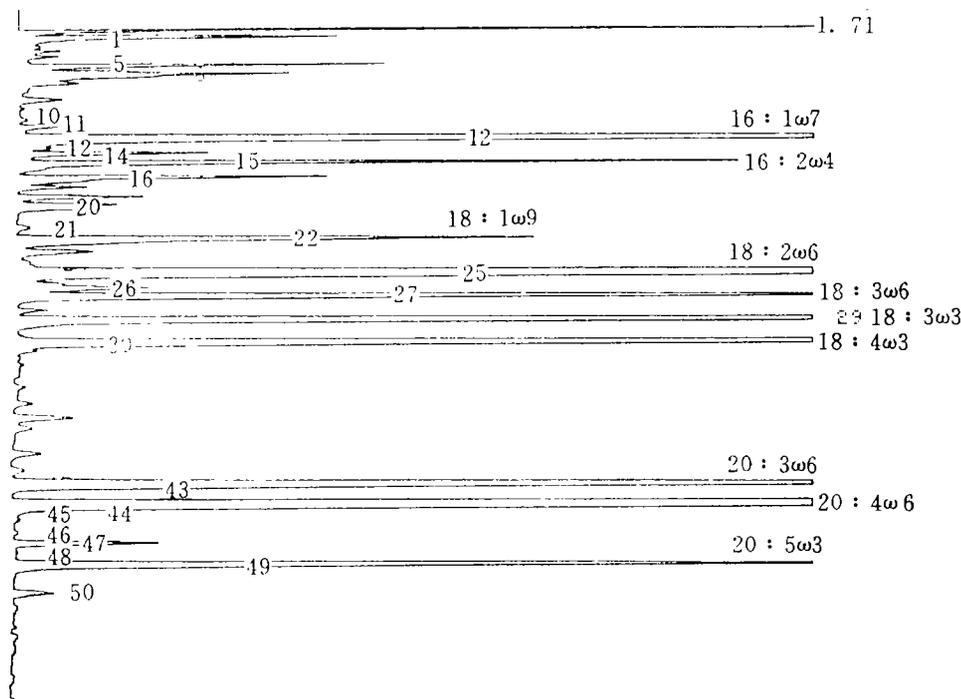


图3 角托马尾藻总脂肪酸经纯化后的GLC图谱

分离提纯。

从上述4个海洋动植物不饱和脂肪酸甲酯GLC分析测定结果看，海洋生物中含有丰富的不饱和脂肪酸，共有31种，其中16碳烯酸4种，18碳烯酸9种，20碳烯酸11种，22碳烯酸7种；若以双键数目分，计有单烯酸5种：16:1 ω 7、18:1 ω 9、18:1 ω 7、20:1 ω 9、20:1 ω 7；双烯酸4种：16:2 ω 4、18:2 ω 6、18:2 ω 4、20:2 ω 6，三烯酸7种：16:3 ω 3、18:3 ω 3、18:3 ω 1、20:3 ω 3、18:3 ω 6、20:3 ω 6、22:3 ω 6；四烯酸6种：16:4 ω 3、18:4 ω 3、18:4 ω 3、18:4 ω 1、20:4 ω 6、22:4 ω 6；五烯酸3种：20:5 ω 3、22:5 ω 6、22:5 ω 3和22碳六烯酸1种。另外双键排列不规则的特殊结构不饱和脂肪酸5种：18:2 Δ 5,9、20:2 Δ 5,11、20:2 Δ 5,13、22:2 Δ 5,11、22:2 Δ 5,13，从百分组成上看，内枝多管藻的HPUFA的主要成分为EPA，占总脂肪酸的45.30%，角托马尾藻主要高度不饱和脂肪酸为20:4 ω 6、18:4 ω 3和18:3 ω 3，为不饱和脂肪酸总量的45.3%，中间球海胆生殖腺中HPUFA是总脂的52.14%，其中EPA和AA又占总HPUFA的37.1%，而灰凹貽贝肝脏中含高度不饱和脂肪酸成分最多的是DHA和EPA两种，各占总脂的14.26和10.61%。若以双键的位置分类，则高度不饱和脂肪酸中， ω 3的位有16:3 ω 3、16:4 ω 3、18:3 ω 3、18:4 ω 3、20:3 ω 3、20:4 ω 3、20:5 ω 3、22:5 ω 3和22:6 ω 3； ω 6位的有18:3 ω 6、20:4 ω 6、20:3 ω 6和22:3 ω 6。 ω 3系列高度不饱和脂肪酸都具有生物活性，是当前脂化学家、医学家和水产学家研究的热门课题，尤其DHA和EPA已被生物化学家公认为具有高度生物活性的物质，至于 ω 6一类脂化合物，有的科学家认为它们的生理作用同 ω 3高度不饱和脂肪一样。但最近几年，有的生理学家和医学家，则提出了完全相反的看法，他们认为 ω 6类高度不饱和脂肪酸能抵销 ω 3的生理效力。

综上所述，海洋动植物中含有种类繁多的高度不饱和脂肪酸，若从不同海洋动植物中提

表4 内枝多管藻总脂中各种脂肪酸组成(%)

峰号	名称	含量	峰号	名称	含量
3	14:0	2.09	27	18:3 ω 6	0.31
5	iso15:0	1.41	31	18:3 ω 1	0.12
10	16:1	25.32	32	20:1 ω 9	0.17
11	16:1 ω 7	9.52	36	20:2 Δ 5,11	0.11
19	18:0	0.43	38	20:3 ω 6	0.1
20	18:1 ω 9	1.75	40	20:4 ω 6	2.43
21	18:1 ω 7	1.9	41	20:3 ω 3	4.97
24	18:2 ω 6	0.4	43	20:4 ω 3	0.62
25	18:2 ω 4	0.31	44	20:5 ω 3	45.03

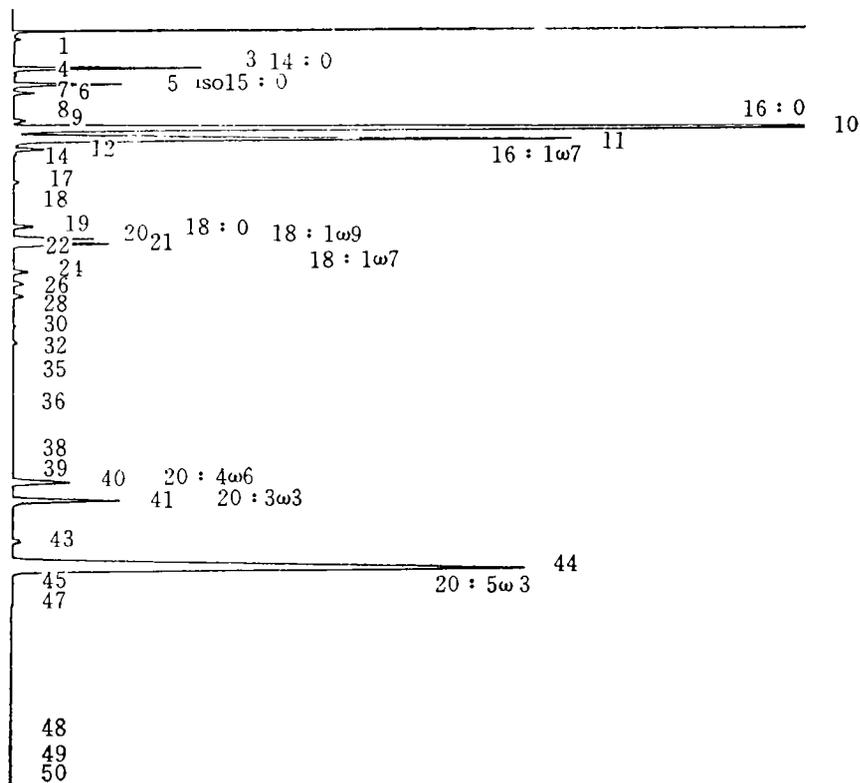


图4 内枝多管藻总脂肪酸GLC图谱

取含量多且有生物活性的高度不饱和脂肪酸,配成高级复合营养品或药品,必将促进医药卫生和保健事业的更大发展.

参考文献

- 1 Kanazawa A *et al.* Effect of EPA on growth and fatty acid composition of the prawn, *Penaeus japonicus*. Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ., 1978, 27(1):35~40
- 2 Lalonde R T *et al.* Response of aedes *Triseriatus* larvae to fatty acids of cladophora. J. Chem. Ecol., 1979, 5(3):371~381

- 3 Lovern J A. Fat metabolism in fishes. 9. The Fats of some aquatic plant. *Biochim. J.*, 1936, 30 (2):387~390
- 4 Murray K E. *Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids*, Pergamon Press, London, 1955, I, 243~274
- 5 Kaufmann H P and W H Nitsch. *Fette Seifen Anstrichmittel*, 1955, 57, 473
- 6 Click D. *Methods of Biochemical Analysis*, edited by DAVID GLICK, 1960, 1~60
- 7 Pohl P, H Wagner and T Passigg. "Inhaltsstoffe von algen. 2. Uber die unterschiedliche Fett saure-zusammensetzung von salz-und süsswasseralgen", *Phytochemistry*, 1965, 9, 1565~1572
- 8 Kato M and Nariga. Studies on Lipids of marine algae. I. Sterol and fatty acid composition of Marine algae. *Kyoyoku Kenkyu Hokoku (Kifu Daigaku)*, 1982, 18(1):53~62
- 9 Pohl P and F Zurheide. Fat production in Freshwater and marine algae. In "Marine Algae in Pharmaceutical science", Waeter de Gruyer, Berlin, New York, 1982, (2):65~80
- 10 Vaskovsky V E and S V Khotionchenko. HPTLC of polar lipids of algae and other plants, J. Resolution. *Chrom & Chrom. Communications*. 1982, 5(5)
- 11 Folch J, M Less and G H Sloane-Stanley. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol Chem.*, 1957, (226):497
- 12 Blish E G and W J Dyer. A rapid method of total lipid extractin and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 1959, 37, 911~917
- 13 Carrean J P and J P Dubaco. Adaptation of a macroscale method for fatty acid methyl Tran- sesterification of Biological Lipid extracts. *J. Chromatogr*, 1978, 151, 384~390