

响应面法优化月见草籽油中 γ -亚麻酸的富集工艺参数

欧阳辉, 张永康, 陈功锡, 田启建

(吉首大学/植物资源保护与利用湖南省高校重点实验室, 湖南吉首 416000)

摘要: 利用响应面法对月见草籽油中 γ -亚麻酸的富集工艺参数进行优化。在单因素实验基础上选取实验因素与水平, 根据中心组合 (Box-Behnken) 实验设计原理采用四因素三水平的响应面分析法, 依据回归分析确定各工艺条件的影响因素, 以富集产物的 γ -亚麻酸含量和 γ -亚麻酸的回收率为响应值作响应面分析, 得出最佳工艺条件为: 包含温度为 -10°C 、尿素/混合脂肪酸 (w/w) 为 3:1、95% 乙醇/混合脂肪酸 (v/w) 为 8:1, 包含时间为 15.6h, 此工艺条件下产品中 γ -亚麻酸含量可达 53.60%, γ -亚麻酸回收率达 94.48%。

关键词: 月见草, γ -亚麻酸, 尿素包合法, 富集, 响应面

Study on optimization of γ -linolenic acid enrichment from evening primrose seeds oil by response surface methodology

OUYANG Hui, ZHANG Yong-kang, CHEN Gong-xi, TIAN Qi-jian

(Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Utilization of Hunan Province/Jishou University, Jishou 416000, China)

Abstract: Based on single factor tests, the optimum enriching condition of γ -linolenic acid from evening primrose seeds oil with urea adduct method was obtained through Box-Behnken central combination design and RSM. The results showed that the optimum enriching condition of polysaccharides were as follows: inclusion temperature -10°C , ratio of urea adduct to fatty acid (w/w) was 3:1, ratio of 95% ethanol to fatty acid (v/w) was 8:1, inclusion time 15.6h. Under such condition, the purity of γ -linolenic acid was 53.60%, the rate of γ -linolenic acid recovery was 94.48%.

Key words: evening primrose; γ -linolenic acid; urea adduct method; enrichment; response surface methodology

中图分类号: TS225.1⁺4

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2010)12-0243-04

月见草 (*Oenothera biennis* L.) 系柳叶菜科 1 年或 2 年生草本植物, 俗名山芝麻, 由于夜间开花, 花朵黄色, 淡香幽雅, 又名夜来香。据文献资料记录, 月见草种子含油 20%~30%, 其中 γ -亚麻酸约 7%~14% 左右^[1]。 γ -亚麻酸是人体必需的不饱和脂肪酸, 是人体内具有重要的生理活性的组成物质^[2]。尿素包合法是不饱和脂肪酸的常用富集方法, 其基本特点是可将混合物脂肪酸按饱和度的差异进行分离。其优势在于: 设备简单, 工艺简便, 不在高温下进行反应, 脲包物形成后, 还可有效地保护双键不受氧化, 不会对不饱和脂肪酸的分子结构和理化性质产生影响, 能较完全地保留其营养与生理活性^[3]。响应面分析法 (response surface methodology, RSM) 是一种优化反应条件和加工工艺参数的有效方法, 广泛

应用于化学化工、生物工程、食品工业等方面^[4]。它与正交实验设计法不同, 具有实验周期短, 求得的回归方程精度高, 能研究几种因素间交互作用等优点^[5]。本研究以富集产物的 γ -亚麻酸含量和 γ -亚麻酸的回收率为评价指标, 以包含温度、尿素/混合脂肪酸比例、95% 乙醇/混合脂肪酸比例和包含时间四个因素为自变量, 利用响应面分析法优化尿素包合法富集月见草籽油中 γ -亚麻酸的工艺条件, 得到最佳富集参数, 为更好地利用我国月见草资源, 为实现工业化生产提供实验基础和技术依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

超临界萃取月见草籽油 吉首大学超临界流体萃取实验室提供; 无水硫酸钠、石油醚、无水乙醇、尿素等 均为分析纯。

GC-2010 型气相色谱仪、GCMS-QP2010 质谱仪 (NIST05.LIB 标准库) 日本岛津公司; FA2004 电子天平 上海精密科学仪器有限公司天平仪器厂; HH-2 数显恒温水浴锅 国华电器有限公司; RE52-99 旋

收稿日期: 2009-11-13

作者简介: 欧阳辉 (1979-), 男, 理学学士, 实验师, 主要从事天然生物活性成分研究。

基金项目: 湖南省教育厅重点资助项目 (02A037)。

转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂;SHB-III循环水式多用真空泵 郑州长城科工贸有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 脂肪酸组成及含量测定

1.2.1.1 实验条件 GC 条件:GC-2010 型气相色谱仪,色谱柱 2m×4mm,填充 80~100 目 ChromosorbW,涂以 8% (W/W) 二乙二醇琥珀酸酯 (DEGS) (3mm×2.5m),柱温 210℃,进样器温度 260℃,氮气流速 40mL/min。MS 条件:GCMS-QP2010, EI 离子源,源温 200℃,电子能量 70eV,连接器温度 280℃,运行时间 35.5min,质量扫描范围 (m/z):29~600。

1.2.1.2 操作步骤 称取 30~100mg (约 2~6 滴) 油脂,置入 10mL 量瓶内,加入 1~2mL 正己烷和苯的混合溶剂 (1:1),摇动使油脂溶解。加入 1~2mL 氢氧化钾 (0.4mol·L⁻¹) - 甲醇溶液,混匀。在室温静置 5~10min 后,加蒸馏水使全部苯甲酯溶液升至瓶颈上部,放置待澄清 (如上清液浑浊而又急待分析时,可滴入数滴无水乙醇,1~2min 内即澄清)。吸取上清液,在室温下吹入氮气使其浓缩,所得浓缩液即可用于气相色谱分析。

1.2.2 混合脂肪酸的制备 超临界萃取月见草油按一定比例加入 3% 的 NaOH-乙醇溶液,置于锥形瓶中,在 60℃ 的水浴中加热回流 (N₂ 保护),磁力搅拌 1h,得皂化液。冷却至室温后,加入适量水使生成的少量皂完全溶解,用 10% 的 HCl 溶液酸化混合液至 pH2~3,加正己烷萃取,分层,去下层的水层。有机相水洗至中性,加入无水硫酸钠脱水,抽滤,用旋转蒸发器蒸出溶剂,得到混合脂肪酸。

1.2.3 尿素包合法富集 γ -亚麻酸响应面法实验设计

称取混合脂肪酸 40g,按照相应比例依次加入乙醇、尿素,其中尿素分 3 次加入,加入量递减。60~70℃ 加热搅拌 1h 至溶液透明澄清。室温冷却 30min 后,于不同温度下进行包合反应,析出尿素包合结晶物,一定包合时间后取出,迅速减压抽滤除去结晶,滤液经回收乙醇、稀酸及饱和盐水洗后得到富集 γ -亚麻酸产物,称重后取样测定 γ -亚麻酸含量。

γ -亚麻酸回收率 (%) = (富集产物质量 × 富集产物中 γ -亚麻酸含量 / 混合脂肪酸质量) × 100%

根据前期预备单因素实验,采用 Design Expert 7.16 统计软件,利用响应面方法 (RSM) 中的 Box-Behnken 设计进行实验设计,以包合温度 (°C)、尿素/混合脂肪酸 (w/w)、95% 乙醇/混合脂肪酸 (v/w) 和包合时间 (h) 四个因素为自变量,以富集产物的 γ -亚麻酸含量和 γ -亚麻酸的回收率为响应值,每个因素取三水平,以 -1、0、+1 编码,并根据单因素实验结果选定三因素的零水平和波动区,采用 Box-Beheken 实验设计实际考察的变量及其实验水平编码见表 1。

2 结果与讨论

2.1 超临界萃取月见草油各脂肪酸的组分和含量

超临界 CO₂ 萃取月见草籽油脂肪酸经甲酯化处理后,通过色谱数据分析,月见草籽油脂肪酸的组成见表 2。

表 1 中心组合设计因素水平表

水平	因素			
	A 包合温度 (°C)	B 尿素/混合脂肪酸 (w/w)	C 95% 乙醇/混合脂肪酸 (v/w)	D 包合时间 (h)
+1	0	3:1	10:1	18
0	-10	2:1	8:1	12
-1	-20	1:1	6:1	6

表 2 超临界萃取月见草油中组分含量结果表 (%)

棕榈酸	硬脂酸	油酸	亚油酸	γ -亚麻酸
6.84	1.39	8.30	72.75	10.63

2.2 月见草籽油提取率中心组合设计实验结果及响应面优化分析

按照 Box-Beheken 实验设计原理的实验方案进行四因素三水平实验,实验结果见表 3。

表 3 Box-Beheken 实验设计及结果

实验号	A	B	C	D	Y ₁ γ -亚麻酸含量 (%)	Y ₂ 回收率 (%)
1	-1	-1	0	0	26.15	42.81
2	1	-1	0	0	15.13	29.95
3	-1	1	0	0	53.31	74.87
4	1	1	0	0	45.16	76.23
5	0	0	-1	-1	15.85	29.89
6	0	0	1	-1	24.12	30.05
7	0	0	-1	1	36.6	54.22
8	0	0	1	1	36.87	51.52
9	-1	0	0	-1	26.51	40.54
10	1	0	0	-1	23.95	39.54
11	-1	0	0	1	42.32	74.55
12	1	0	0	1	25.35	42.54
13	0	-1	-1	0	16.44	31.21
14	0	1	-1	0	42.87	80.85
15	0	-1	1	0	16.35	31.54
16	0	1	1	0	44.6	84.65
17	-1	0	-1	0	44.97	78.75
18	1	0	-1	0	18.96	39.77
19	-1	0	1	0	45.94	79.58
20	1	0	1	0	19.1	39.86
21	0	-1	0	-1	15.57	30.65
22	0	1	0	-1	17.96	32.78
23	0	-1	0	1	17.05	30.63
24	0	1	0	1	47.12	89.25
25	0	0	0	0	45.58	78.05
26	0	0	0	0	45.57	78.03
27	0	0	0	0	45.53	77.95
28	0	0	0	0	45.55	77.93
29	0	0	0	0	45.58	77.97

表 3 中,实验号 1~24 是析因实验,实验号 25~29 是中心实验。29 个实验点分为析因点和零点,其中析因点为自变量取值在 X₁、X₂、X₃、X₄ 所构成的三维顶点;零点为区域的中心点,零点实验重复 5 次,用以估计实验误差。采用 Design-Expert 软件对所得数据进行回归分析,回归分析结果见表 4、表 5。

2.3 回归模型的建立及分析

采用 Design-Expert 软件对表 4、表 5 的实验数据进行多元回归拟合,得到富集产物中 γ -亚麻酸含量和 γ -亚麻酸的回收率对包合温度、尿素/混合脂肪

表4 响应面模型方差分析表(γ -亚麻酸含量)

方差来源	总和	自由度	均方	F 值	p 值	显著性
模型	4479.844	14	319.9889	12.09903	<0.0001	***
X ₁	698.4502	1	698.4502	26.40895	0.0002	***
X ₂	1735.929	1	1735.929	65.63683	<0.0001	***
X ₃	10.62201	1	10.62201	0.401626	0.5365	
X ₄	551.4852	1	551.4852	20.85209	0.0004	***
X ₁ X ₂	2.059225	1	2.059225	0.077861	0.7843	
X ₁ X ₃	0.172225	1	0.172225	0.006512	0.9368	
X ₁ X ₄	51.91203	1	51.91203	1.962834	0.1830	
X ₂ X ₃	0.8281	1	0.8281	0.031311	0.8621	
X ₂ X ₄	191.5456	1	191.5456	7.242489	0.0176	*
X ₃ X ₄	16	1	16	0.604973	0.4496	
X ₁ ²	122.844	1	122.844	4.644828	0.0490	*
X ₂ ²	414.5472	1	414.5472	15.67435	0.0014	**
X ₃ ²	352.7403	1	352.7403	13.33739	0.0026	**
X ₄ ²	865.2136	1	865.2136	32.7144	<0.0001	***
残差	370.2648	14	26.44748			
失拟项	370.2629	10	37.02629	78779.34	< 0.0001	
纯误差	0.00188	4	0.00047			
总和	4850.109	28				

R-Squared = 0.9237 Adj R-Squared = 0.8473

注: *** 为差异极显著(P<0.001); ** 为差异高度显著(P<0.01); * 为差异显著(P<0.05)。

表5 响应面模型方差分析表(γ -亚麻酸回收率)

方差来源	总和	自由度	均方	F 值	p 值	显著性
模型	12667.39	14	904.8134	13.18771	<0.0001	***
X ₁	1265.059	1	1265.059	18.4383	0.0007	***
X ₂	4873.882	1	4873.882	71.03711	<0.0001	***
X ₃	0.525008	1	0.525008	0.007652	0.9315	
X ₄	1616.112	1	1616.112	23.55493	0.0003	***
X ₁ X ₂	50.5521	1	50.5521	0.7368	0.4051	
X ₁ X ₃	0.1369	1	0.1369	0.001995	0.9650	
X ₁ X ₄	240.405	1	240.405	3.503917	0.0823	
X ₂ X ₃	3.010225	1	3.010225	0.043874	0.8371	
X ₂ X ₄	797.78	1	797.78	11.62769	0.0042	**
X ₃ X ₄	2.0449	1	2.0449	0.029805	0.8654	
X ₁ ²	428.6136	1	428.6136	6.247068	0.0255	*
X ₂ ²	795.616	1	795.616	11.59615	0.0043	**
X ₃ ²	860.2763	1	860.2763	12.53858	0.0033	**
X ₄ ²	3206.191	1	3206.191	46.73042	<0.0001	***
残差	960.5451	14	68.61036			
失拟项	960.5343	10	96.05343	35840.83	<0.0001	
纯误差	0.01072	4	0.00268			
总和	13627.93	28				

R-Squared = 0.9295 Adj R-Squared = 0.8590

注: *** 为差异极显著(P<0.001); ** 为差异高度显著(P<0.01); * 为差异显著(P<0.05)。

酸(w/w)、95%乙醇/尿素(v/w)和包合时间四个因素的二次多元回归方程如下:

产物中 γ -亚麻酸含量:

$$Y_1 = 45.56 - 7.63X_1 + 12.03X_2 + 0.94X_3 + 6.78X_4 + 0.72X_1X_2 - 0.21X_1X_3 - 3.60X_1X_4 + 0.46X_2X_3 + 6.92X_2X_4 - 2.00X_3X_4 - 4.35X_1^2 - 7.99X_2^2 - 7.37X_3^2 - 11.55X_4^2$$

γ -亚麻酸的回收率:

$$Y_2 = 77.99 - 10.27X_1 + 20.15X_2 + 0.21X_3 + 11.61X_4 + 3.56X_1X_2 + -0.18X_1X_3 - 7.75X_1X_4 + 0.87X_2X_3 + 14.12X_2X_4 - 0.71X_3X_4 - 8.13X_1^2 - 11.08X_2^2 - 11.52X_3^2 - 22.23X_4^2$$

2.4 工艺条件的确定

根据回归模型通过 Design Expert 软件分析得出,富集产物的 γ -亚麻酸含量和 γ -亚麻酸的回收率最高时的最佳工艺条件是:包合温度为-10℃、尿素/混合脂肪酸(w/w)为3:1、95%乙醇/混合脂肪酸(v/w)为8:1,包合时间为15.6h,根据上述条件进行3次重复实验,得出实际富集产物的 γ -亚麻酸含量为53.60%, γ -亚麻酸的回收率为94.48%,与预测值基本一致,说明该方程与实际情况拟合很好,充分验证了所建模型的正确性,说明响应面法适用于对尿素

(下转第249页)

中洗出物质总量以及其在整个洗涤过程中所占百分比。计算结果如表 5 所示。

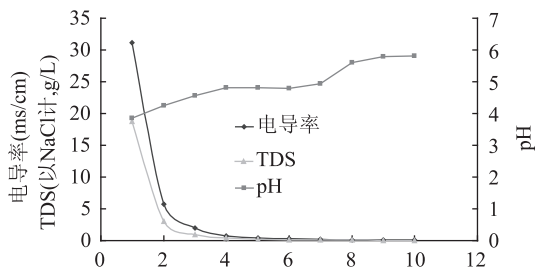


图 7 洗涤次数与电导率、TDS 及 pH 的关系曲线

由图 7 可见,滤液的电导率值及 TDS 值经过 4 次洗涤即可达到令人满意的程度。同时,从表 5 可见,第四次洗涤结束后,被洗出的物质累计已达 97.70%,而第五次的洗出物只有 0.74%。因此,洗涤级数为 4 即可满足洗涤要求。同时,由图 7 可见,洗涤次数越多,滤液的 pH 越接近 7,但经过 10 次洗涤后,滤液的 TDS 已降至 41.03mg/L,而 pH 仍为 5.821,说明滤液中的洗出物为强电解质,在较低浓度即能较大地影响溶液的 pH。

表 5 各次洗涤洗出物质总量及洗出百分比

洗涤次数	洗出物质总量 (以 NaCl 计,g)	洗出百分比 (%)
1	26.2206	79.08
2	4.2728	12.89
3	1.35352	4.08
4	0.54726	1.65
5	0.244552	0.74
6	0.186872	0.56
7	0.124138	0.37
8	0.094192	0.28
9	0.05663	0.17
10	0.057442	0.17
总计	33.158006	100

3 结论

3.1 通过单因素实验可知,搅拌转速越高,洗涤时间越长,料液比越大,洗涤效果越好。

3.2 通过 Box-Behnken 响应曲面优化实验得到该

(上接第 245 页)

包合法富集月见草籽油中 γ -亚麻酸的工艺进行回归分析和参数优化。

3 结论

3.1 通过响应面分析优化的尿素包合法富集超临界萃取月见草籽油中 γ -亚麻酸的最佳条件:包合温度为 -10°C 、尿素/混合脂肪酸 (w/w) 为 3:1、95% 乙醇/混合脂肪酸 (v/w) 为 8:1,包合时间为 15.6h,产品中 γ -亚麻酸含量可达 53.60%, γ -亚麻酸回收率达 94.48%。

3.2 尿素包合法富集超临界萃取月见草籽油中 γ -亚麻酸,条件温和、工艺简单、成本低廉,是制备高纯度 γ -亚麻酸的有效办法,为实现工业化生产提供了经济可行的工艺技术参考,具有广阔的前景。

方法下最佳洗涤条件为:搅拌转速 400r/min、料液比 1:7、洗涤时间 12min。

3.3 通过多次洗涤并测试洗涤液的电导率、pH 和 TDS,并计算得到洗出物质的百分比,得到了洗涤次数与 10 次洗涤洗出物质的百分比。确定最佳的洗涤级数为 4。

参考文献

[1] 陈晓鸣,陈又清,张弘,等.紫胶虫培育与紫胶加工[M].北京:中国林业出版社,2008.

[2] 凌关庭,唐述潮,陶民强.食品添加剂手册[M].第三版.北京:化学工业出版社,2003:864-865,1148-1161.

[3] 甘瑾,张弘,马李一,等.纳米 SiO_x 漂白紫胶复合膜对椴柑常温贮藏品质的影响[J].食品科学,2009,30(18):385-388.

[4] 甘瑾,张弘,马李一,等.漂白紫胶涂膜对苹果常温贮藏品质的影响[J].食品科学,2009,30(24):435-438.

[5] 甘瑾,马李一,张弘,等.漂白紫胶涂膜对甜樱桃常温贮藏品质的影响[J].江苏农业学报,2009,25(3):650-654.

[6] 甘瑾,马李一,张弘,等.漂白胶对芒果贮藏保鲜效果的研究[J].食品科学,2005,26(1):242-244.

[7] 马李一,甘瑾,殷宁,等.天然涂膜保鲜剂对青脆李的贮藏保鲜作用[J].食品与发酵工业,2004(7):135-138.

[8] 马李一,甘瑾,殷宁,等.中草药杀菌剂对李子的保鲜[J].东北林业大学学报,2004,32(6):58-63.

[9] 马李一,殷宁,甘瑾,等.中草药杀菌剂对花红保鲜的研究[J].食品工业科技,2004,24(9):129-132.

[10] 马李一,甘瑾,殷宁,等.纳米 SiO_x 在涂膜保鲜剂中的应用[J].北京林业大学学报,2004,24(6):98-101.

[11] 唐莉英,郑华,张弘,等.不同紫胶产品及制作工艺对可食性紫胶包装膜性质的影响[J].食品工业科技,2009,30(5):289-292.

[12] 潘永康.现代干燥技术[M].北京:化学工业出版社,1998:17-19.

[13] 化学工程手册编辑委员会.化学工程手册(14)—萃取及浸取[M].北京:化学工业出版社,1989.

[14] GB 8142-1987,紫胶产品取样方法[S].

参考文献

[1] 李国栋,范伟,陆国浩,等.月见草油的研究概况[J].药学实践杂志,2003,21(3):171-173.

[2] 周立新,黄凤洪,李文林,等. α -亚麻酸与 γ -亚麻酸[J].西部粮油科技,2000,25(6):46-48.

[3] 翁新楚,董新伟,任国谱.脲包法在脂类分离技术中的应用[J].中国油脂,1994,19(6):40-44.

[4] 杨文雄,高彦祥.响应面法及其在食品工业中的应用[J].中国食品添加剂,2005(2):68-71.

[5] LI Q H, FU C L. Application of response surface methodology for extraction optimization of germinant pumpkin seeds protein [J]. Food Chemistry, 2005, 92(4):701-706.