

李 童, 束成杰, 尹永祺, 等. 响应面法优化琉璃苣籽油提取工艺及其脂肪酸成分的测定[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(4): 914-920.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.04.029

响应面法优化琉璃苣籽油提取工艺及其脂肪酸成分的测定

李 童^{1,2}, 束成杰², 尹永祺¹, 石宝俊², 张卫明²

(1.扬州大学食品科学与工程学院, 江苏 扬州 225127; 2.南京野生植物综合利用研究院, 江苏 南京 210042)

摘要: 本研究旨在优化索氏法提取琉璃苣籽油的工艺, 以琉璃苣籽油提取率为指标, 利用单因素试验和响应面法研究索氏法提取工艺中提取时间、提取剂体积和提取温度对提取率的影响, 同时利用气相色谱仪对琉璃苣籽油中的脂肪酸进行分析鉴定。结果显示, 粉碎的琉璃苣种子 10 g, 工艺条件为提取时间 4.16 h, 提取溶剂体积 108.81 ml, 提取温度 83.15 °C 时, 琉璃苣籽油提取率最高 (34.05%)。提取的琉璃苣籽油中共鉴定出 15 种脂肪酸, 包括 9 种不饱和脂肪酸, 其中亚油酸占 37.75%, γ -亚麻酸占 20.96%, 油酸占 9.20%。本试验的提取方法简单易操作, 可为琉璃苣的产业化开发和利用提供依据。

关键词: 琉璃苣; 油脂; γ -亚麻酸

中图分类号: TS224.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)04-0914-07

Determination of fatty acid composition and optimization of extraction technology by response surface method for borage oil

LI Tong^{1,2}, SHU Cheng-jie², YIN Yong-qi¹, SHI Bao-jun², ZHANG Wei-ming²

(1. College of Food Science and Engineering, Yangzhou 225127, China; 2. Nanjing Institute for Comprehensive Utilization of Wild Plants, Nanjing 210042, China)

Abstract: To optimize the Soxhlet extraction technology for borage seed oil, the influences of extraction time, extraction solvent volume and extraction temperature on the extraction rate of the borage seed oil were studied by single factor test and response surface method. The fatty acids in borage seed oil were determined by gas chromatography. The results showed that borage seed oil extraction rate reached the highest level (34.05%) under the conditions of extraction time 4.16 h, the volume of extraction solvent 108.81 ml and extraction temperature at 83.15 °C. Totally 15 kinds of fatty acids were identified in borage seed oil, including nine kinds of unsaturated fatty acids, among which, linoleic acid accounted for 37.75%, gamma linolenic acid accounted for 20.96%, and oleic acid accounted for 9.20%.

Key words: borage; oil; gamma linolenic acid

收稿日期: 2017-02-21

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目 (2012BAD36B01)

作者简介: 李 童 (1991-), 女, 安徽阜阳人, 硕士研究生, 主要从事野生植物资源开发与利用研究。(Tel) 18852716927; (E-mail) 1543859178@qq.com

通讯作者: 张卫明, (E-mail) botanyzh@163.com; 尹永祺, (E-mail) yqyin@yzu.edu.cn

琉璃苣 (*Borago officinalis* L.) 为紫草科琉璃苣属的一种草本植物, 既有很高的观赏价值又可作为蜜源植物。其幼嫩茎叶有淡淡的黄瓜香味, 鲜叶和干叶都可用来炖菜, 其种子富含蛋白质、矿物质、脂肪和维生素^[1-2]。同时, 它也是欧洲人使用

了七百年的药草^[1]。多年以来,中国民间一直流传琉璃苣的多种功效,具有防治心血管病、糖尿病、癌症等疾病以及抗衰老、增强免疫、抗菌消炎等多种作用^[1]。

琉璃苣籽油对脂质代谢有一定的调节作用^[3-4],而且含有较丰富的脂肪酸,是极佳的 γ -亚麻酸(Gamma linolenic acid, GLA)的来源, γ -亚麻酸的含量高达 20.01%^[5]。人体中的 γ -亚麻酸可转化成前列腺素 E_1 ,能抑制血小板的聚集和血栓素 A_2 的形成,有明显的抗血栓及抗动脉粥样斑块形成的作用,能显著降低血脂、胆固醇、血糖、密度脂蛋白等,在延缓衰老和缓解女性经前症状方面也有显著疗效^[6-9]。因此,在琉璃苣开发利用的过程中需要更高效、更稳定的琉璃苣籽油提取工艺。

已报道的油脂提取方法有水酶法、有机溶剂浸提法、索氏法、膜分离法、分子蒸馏法、微波法和超声法等。其中,水酶法、超声法和索氏法的提取技术广泛应用于植物油的提取研究中,索氏法提取的油脂氧化稳定性最高^[10-14]。但在中国,对琉璃苣油脂提取工艺的研究甚少^[2]。本研究拟以琉璃苣种子为材料,应用响应面法优化琉璃苣籽油的索氏提取工艺,并利用气相色谱仪综合分析琉璃苣种子中的脂肪酸成分,以期对琉璃苣籽油的提取及其脂肪酸利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 原料、试剂和仪器设备

本试验所用琉璃苣种子由南京野生植物综合利用研究院保存。正己烷为分析纯(国药集团化学试剂有限公司产品)。所用仪器设备包括:NH-4 数显恒温水浴锅(金坛市三南仪器厂产品)、SHZ-D III 循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司产品)、RE-52AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂产品)、KF-1209 电子天平(凯丰集团有限公司产品)、HG75-4 电子恒温两用箱(南京实验仪器厂产品)、KQ-100B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司产品)、BCD-183A 冰箱(合肥荣事达电冰箱有限公司产品)、7820A 气相色谱仪(美国 Agilent 公司产品)。

1.2 琉璃苣籽油提取方法

将琉璃苣种子除杂干燥,粉碎至 40 目,4 ℃ 贮存备用。本试验使用正己烷作为提取剂,采用索氏

法提取琉璃苣籽油^[15-16]。

1.3 单因素试验

1.3.1 提取时间的选择 准确称取 10 g 粉碎的琉璃苣种子,在提取温度 80 ℃、提取剂体积 80 ml 的条件下,分别提取 4 h、6 h、8 h、10 h、12 h,测定琉璃苣种子不同提取时间的提取率 Y 。

$$Y = \frac{\text{提取油质量}}{\text{种子质量}} \times 100\%$$

1.3.2 提取剂体积的选择 准确称取 10 g 粉碎的琉璃苣种子,分别加入不同体积(40 ml、60 ml、80 ml、100 ml、120 ml)的提取剂正己烷,在 80 ℃ 的条件下提取 8 h,分别测定加入不同体积提取剂的琉璃苣籽油提取率。

1.3.3 提取温度的选择 准确称取 10 g 粉碎的琉璃苣种子,将其处理好后置于装有 80 ml 提取剂正己烷的索氏装置中,分别置于不同温度(50 ℃、60 ℃、70 ℃、80 ℃、90 ℃)下提取 8 h,测定其相应条件下的提取率。

1.4 响应面优化

基于单因素的试验结果,采用响应面法优化提取琉璃苣籽油的工艺条件(表 1)。

表 1 各因素水平编码表

Table 1 The levels of factors

因素	水平		
	-1	0	1
提取时间(h)	4	7	10
提取剂体积(ml)	60	90	120
提取温度(℃)	60	75	90

1.5 琉璃苣籽油脂肪酸成分分析

由于油脂中的脂肪酸沸点较高,不容易在高温下分解,为了使生成物更稳定,需将琉璃苣籽油甲酯化^[16],用气相色谱仪测定脂肪酸成分及含量。气相色谱条件:色谱柱 FFAP (30.00 m×0.32 mm×0.33 μ m);升温程序为初始温度 100 ℃,以 10 ℃/min 的速度升至 280 ℃,持续 15 min,汽化温度为 280 ℃。样品进样量为 1 μ l,分流比位 10:1。根据保留时间定性,采用面积归一化法定量^[17]。

1.6 数据分析

单因素试验结果采用 Excel 2003 分析处理,采用 Box-Behnken 试验设计原理优化试验方案,数据

采用软件 Design Expert 8.0.6 进行统计分析。所有试验结果均取平均值。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 提取时间对提取率的影响 提取时间直接影响琉璃苣籽油的提取率。若提取时间较短,则回流次数少,导致琉璃苣籽粉末提取不充分。若提取时间较长,随着回流次数增加,提取剂减少,可能使提取率降低^[16]。因此,适当的提取时间非常关键。试验结果(图 1)表明,随着提取时间的延长,提取率的变化范围基本趋于平缓,这是因为大部分提取物已经被提取出来了,进一步增加提取时间不会显著增加提取率。

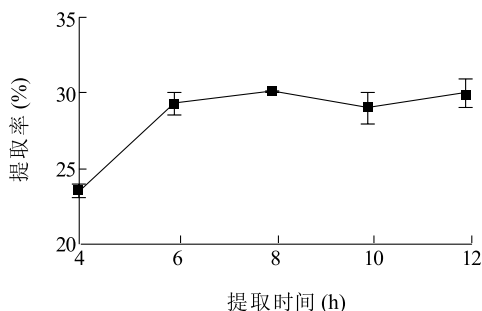


图 1 提取时间对提取率的影响

Fig.1 The effect of extraction time on extraction rate of borage seed

2.1.2 提取剂体积对提取率的影响 提取剂用量过少,提取可能不彻底,提取率不高,提取剂用量过高,不仅会增加生产成本,还会增加后续溶液处理的成本^[15]。图 2 显示,提取剂体积为 80 ml 时提取率最高,随着提取剂体积的继续增加,提取率缓慢降低。这可能是因为提取剂体积增加,液体流动性变差^[18],从而影响提取率。另外,提取剂体积增加,导致回流次数减少,也会降低提取率。

2.1.3 提取温度对提取率的影响 油脂提取过程中,温度的控制非常重要,若温度过低,未达到提取剂的沸点,可能影响回流速度,从而影响提取率。若温度过高,部分提取剂可能汽化,提取剂的体积减少,降低提取率。过高的温度也可能导致油脂变性,无法获取高品质的油脂。索氏法利用虹吸原理,随温度升高,每次虹吸前,固体物

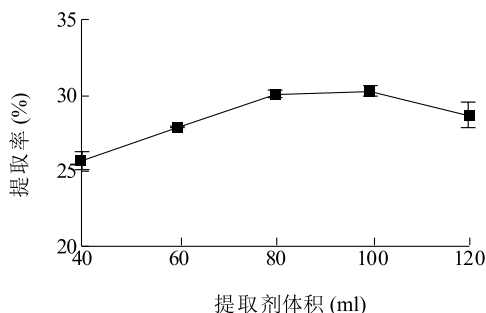


图 2 提取剂体积对提取率的影响

Fig.2 The effect of extractant volume on the extraction rate of borage seed

质都能被纯溶剂萃取,溶剂反复利用,缩短了提取时间,并且提高了萃取效率^[19]。图 3 显示,随着温度的升高,提取率先增加后趋于平缓。温度低于 70 ℃ 时,提取率较低的原因可能是提取剂正己烷的沸点为 69 ℃,低温影响虹吸管回流次数,从而降低提取率。

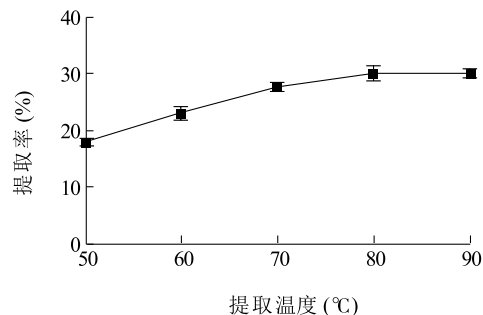


图 3 提取温度对提取率的影响

Fig.3 The effect of temperature on extraction rate of borage seed

由图 1、图 2、图 3 可知,索氏法提取琉璃苣籽油在不同条件下的最高提取率(30.43%)高于使用超临界 CO₂ 流体萃取技术萃取琉璃苣籽油的提取率(28.08%)^[17],而且索氏法提取粗脂肪比超临界 CO₂ 流体萃取技术和冷榨法更简单易操作^[17-20]。

2.2 响应面优化琉璃苣籽油提取工艺

琉璃苣籽油提取工艺的优化是在单因素试验结果的基础上,利用 Box-Behnken 设计原理,以提取时间(A)、提取剂体积(B)、提取温度(C)3 因素为自变量,以提取率为指标(表 2)。

表 2 Box-Behnken 试验设计方案与结果

Table 2 The Box-Behnken design and the extraction rate of borage seed

试验编号	提取时间	提取剂体积	提取温度	提取率 (%)
1	0	0	0	19.70
2	1	-1	0	30.10
3	0	1	-1	6.00
4	-1	0	-1	15.00
5	-1	-1	0	25.90
6	-1	1	0	30.00
7	0	0	0	22.00
8	0	-1	-1	4.00
9	1	0	-1	26.00
10	1	1	0	29.50
11	0	-1	1	15.22
12	-1	0	1	30.05
13	1	0	1	24.00
14	0	0	0	18.09
15	0	0	0	23.00
16	0	1	1	21.00
17	0	0	0	24.50

表 3 显著性分析结果

Table 3 The significance test results

方差来源	方差和	自由度	均方根误差	比值 F	P 值	显著性
模型	933.33	9	103.70	14.37	0.001 0	**
A	9.35	1	9.35	1.30	0.292 4	
B	15.90	1	15.90	2.20	0.181 3	
C	192.77	1	192.77	26.71	0.001 3	**
AB	5.52	1	5.52	0.77	0.410 7	
AC	72.68	1	72.68	10.07	0.015 6	*
BC	3.57	1	3.57	0.49	0.504 5	
A ²	405.39	1	405.39	56.16	0.000 1	**
B ²	24.16	1	24.16	3.35	0.110 0	
C ²	237.33	1	237.33	32.88	0.000 7	**
残差	50.53	7	7.22			
失拟项	24.17	3	8.06	1.22	0.410 4	
误差	26.36	4	6.59			
总和	983.86	16				

A:提取时间;B:提取剂体积;C:提取温度;**:差异极显著($P<0.01$);*:差异显著($P<0.05$)。

2.2.1 回归方程及方差分析 基于 Box-Behnken 试验设计的结果,经 Design expert 8.0.6 软件回归拟合试验数据,得出二次多元回归模型,即: $Y(\%) = 21.46 + 1.08A + 1.41B + 4.91C - 1.18AB - 4.26AC + 0.95BC + 9.81A^2 - 2.40B^2 - 7.51C^2$ 。其显著性分析结果如表 3 显示,通过比值 $F(14.37)$ 来判断,模型的 P 值为 0.001 0,其值越低说明此模型准确率越高。 C 、 AC 、 A^2 、 C^2 项对提取率的影响较明显。而显著性分析结果中,失拟项的 P 值为 0.410 4 ($P>0.05$),表明本试验获得了较为理想的模型,且能较好地预测出最佳工艺条件。由 3 个因素的分析结果可以看出,其对提取率影响的大小依次为:提取温度>提取时间>提取剂体积。此外,模型复相关系数 R^2 为 0.946 6,说明该方程拟合度较高。

2.2.2 响应曲面分析 以拟合方程为基准,固定任一因素在 0 水平上,得到另外 2 个影响因子交互的结果,获得响应面和二维等高线(图 4、图 5、图 6)。图 4 显示,琉璃苣籽油提取时间与提取体积的交互作用不明显,提取时间对提取率的影响较大,而提取剂体积对提取率的影响很小,随着提取剂体积的增大,提取率先缓慢增加再减小,整个趋势很平缓。

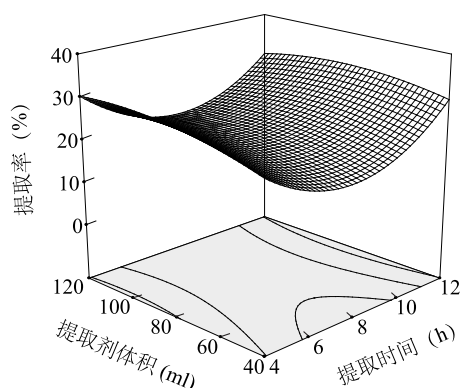


图 4 提取时间与提取剂体积交互作用对提取率的影响

Fig.4 The effect of extractant volume and extraction time on extraction rate of borage seed

图 5 显示,琉璃苣籽油提取时间与提取温度的交互作用显著,与提取时间相比,提取温度对提取率的影响更为显著。这可能是因为温度升高,溶剂汽化,体积减少,影响琉璃苣籽油的提取率。

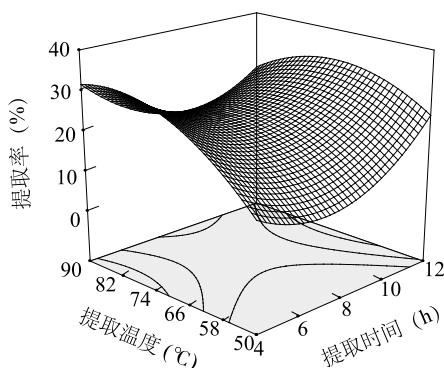


图 5 提取时间与提取温度交互作用对提取率的影响

Fig.5 The effect of extraction time and extraction temperature on extraction rate of borage seed

图 6 显示,琉璃苣籽油提取剂体积与温度的交互作用不显著,随着提取温度的增加,提取率先增大后减少。相对于提取剂体积而言,提取温度对应的等高线更陡,说明提取温度对提取率影响更大。根据各因素交互作用以及 Box-Behnken 试验设计结果,得到琉璃苣籽油提取最佳工艺条件:提取时间 4.16 h,提取剂体积 108.81 ml,提取温度 83.15 °C,在此条件下,琉璃苣籽油的提取率为 34.05%。为了验证模型的

准确度,进行 3 次平行验证试验,验证条件为提取时间 4.16 h,提取剂体积 109.00 ml,提取温度 83.20 °C,琉璃苣籽油提取率为 32.24% (与预测值相差 1.81 个百分点),可见该模型能较好地预测试验结果,此条件下的琉璃苣籽油提取率比超临界 CO₂ 萃取法提取率 (28.08%) 高^[17]。

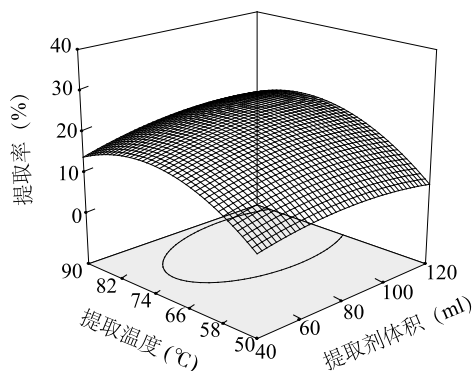


图 6 提取剂体积与提取温度交互作用对提取率的影响

Fig.6 The effect of extraction temperature and extractant volume on extraction rate of borage seed

2.3 琉璃苣籽油中脂肪酸成分

琉璃苣籽油含有丰富的脂肪酸,其中 γ -亚麻酸是人体各组织生物膜的结构材料,也是合成前列腺素的前体。本试验采用气相色谱仪测出琉璃苣籽油中含有 15 种脂肪酸,其中 9 种为不饱和脂肪酸。亚油酸占 37.75%, γ -亚麻酸占 20.96%,油酸占 9.20%。马丽艳^[2]等测定琉璃苣脂肪酸成分中不饱和脂肪酸占 75.00%,任飞^[17]等测定琉璃苣脂肪酸成分中不饱和脂肪酸占 85.28%,张红梅^[21]等采用气相色谱法测定琉璃苣脂肪酸成分中不饱和脂肪酸占 85.44%。本试验测得 γ -亚麻酸含量为 20.96% (表 4),该结果比任飞^[17]、张红梅^[21]、孙启良^[5]测得的 γ -亚麻酸含量高,比王英爽^[22]平行测定 6 次的结果低,可能是不同研究人员在不同条件下的测定误差,也可能是琉璃苣种子差异导致的。

3 讨论

本研究采用索氏法提取琉璃苣籽油,在单因素试验结果的基础上,采用 Design Expert 8.0.6 软件分析数据,得出优化后的最佳工艺条件为:提取时间 4.16 h,提取剂体积 108.81 ml,提取温度 83.15 °C,在此条件下,琉璃苣籽油的提取率为 34.05%。为

表 4 琉璃苣籽油中脂肪酸组成及其含量

Table 4 The composition and content of fatty acid in borage seed oil

试验编号	保留时间 (min)	脂肪酸	分子式	相对含量 (%)
1	10.360 8	肉豆蔻酸甲酯	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	0.073 1
2	12.284 9	反-9-十六烯酸甲酯	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	0.422 5
3	12.537 3	棕榈酸甲酯	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	11.902 1
4	13.477 3	15-甲基十六烷酸甲酯	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	0.081 4
5	14.101 8	γ -亚麻酸甲酯	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	20.955 6
6	14.322 6	亚油酸甲酯	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	37.747 7
7	14.360 5	油酸甲酯	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	9.203 4
8	14.499 3	硬脂酸甲酯	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	5.442 3
9	16.044 9	顺式-13-二十碳烯酸甲酯	C ₂₁ H ₄₀ O ₂	5.785 7
10	16.221 5	二十酸甲酯	C ₂₁ H ₄₂ O ₂	0.525 1
11	17.495 9	14-甲基-8-十六烯-1-缩醛	C ₁₇ H ₃₂ O	0.102 6
12	17.704 0	顺-11-二十烯酸甲酯	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	4.062 8
13	17.868 1	山嵛酸甲酯	C ₂₃ H ₄₆ O ₂	0.441 8
14	19.426 3	顺-15-十四酸甲酯	C ₂₅ H ₄₈ O ₂	2.989 8
15	19.628 2	木焦油酸甲酯	C ₂₅ H ₅₀ O ₂	0.264 1

了验证模型的准确度,做3次平行验证试验,琉璃苣籽油提取率为32.24%,该值与预测值基本吻合。本研究采用气相色谱仪鉴定出琉璃苣籽油含有15种脂肪酸,其中9种为不饱和脂肪酸。亚油酸占37.75%, γ -亚麻酸占20.96%,油酸占9.20%。马丽艳^[2]等测定出琉璃苣籽油含有6种脂肪酸,张红梅^[21]等测定出7种脂肪酸,任飞^[17]等测定出7种脂肪酸。有研究表明,不同播种期对琉璃苣生长发育和采种有影响,秋季早播优于迟播^[23]。不同产地琉璃苣脂肪酸成分也可能有所不同^[22]。琉璃苣籽油中含有大量不饱和脂肪酸,其中油酸为单不饱和脂肪酸,氧化稳定性高,可有效防止动脉硬化^[21]。 γ -亚麻酸直接参与人体一系列的代谢和生物合成,并促进胆固醇等的转化与利用^[24]。总之,琉璃苣籽油含有丰富的脂肪酸,极具开发利用价值。

参考文献:

- [1] 张广论,张卫明,肖正春.琉璃苣油研究进展[J].中国野生植物资源,2012(31):14-21.
- [2] 马丽艳,王国山,石文婷,等.琉璃苣种子的营养成分分析[J].农产品加工(创新版),2010(7):18-20.
- [3] MAANAN M. Heavy metal concentrations in marine molluscs from the Moroccan coastal region[J]. Environmental Pollution, 2008,

153(1):176-183.

- [4] STORELLI M M. Potential human health risks from metals (Hg, Cd, and Pb) and polychlorinated biphenyls (PCBs) via seafood consumption: estimation of target hazard quotients (THQs) and toxic equivalents (TEQs) [J]. Food & Chemical Toxicology, 2008, 46(8):2782-2788.
- [5] 孙启良. 琉璃苣种子油中 γ -亚麻酸的分析和制备[J]. 中草药, 1995(9):456-457.
- [6] 殷俊俊,马传国,朱 换,等. γ -亚麻酸降血压作用及其机制探究[J]. 粮食与油脂, 2013,26(7):49-52.
- [7] 周同永,任 飞,邓 黎,等. γ -亚麻酸及其生理生化功能研究进展[J].贵州农业科学,2011,39(3):53-58.
- [8] CHANG C S, SUN H L, LIH C K, et al. Gamma-linolenic acid inhibits inflammatory responses by regulating nf- κ B and AP-1 activation in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages[J]. Inflammation, 2010, 33(1):46-57.
- [9] PONNALA S, RAO K P, CHAUDHURY J R, et al. Effect of polyunsaturated fatty acids on diphenyl hydantoin-induced genetic damage *in vitro* and *in vivo* [J]. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 2009, 80(1):43-50.
- [10] 张 芳,程丽华,徐新华,等. 能源微藻采收及油脂提取技术[J]. 化学进展, 2012(10):2062-2072.
- [11] 刘 旷.大扁杏仁水酶法提油及水解蛋白性质研究[D].西安:陕西科技大学,2014.
- [12] 宋洁琼.腊梅籽中油及生物碱的提取与分析[D].上海:华东理工大学,2013.
- [13] 关海宁,乔秀丽,刁小琴.响应面法优化稻壳多糖超声辅助酶提

- 取工艺研究[J].粮食与油脂,2014,27(1):49-52.
- [14] 贺绍琴,张君萍,阿不力米提·伊力,等.莴苣籽油的超临界CO₂萃取工艺及其脂肪酸组成分析[J].中国油脂,2015,40(1):1-5.
- [15] 丁立军.文冠果种仁油制备生物柴油技术的研究[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2013.
- [16] 朱亚红,王俊淇,苏印泉,等.响应面法优化提取翅果油树种仁油的工艺条件[J].科技导报,2016,34(2):46-52.
- [17] 任 飞,韩 发,石丽娜,等.超临界CO₂流体提取琉璃苣籽油及其脂肪酸分析[J].中国油脂,2010(35):15-18.
- [18] 孙媛媛,赵晓非,肖清贵,等.索氏法提取五味子中木脂素[J].过程工程学报,2016,16(1):79-85.
- [19] 郭子耕,李丽华,张金生.索氏法萃取黄瓜籽油[J].辽宁石油化工大学学报,2009,29(4):27-29.
- [20] 刘光宪,冯健雄,闵 华,等.冷榨制油技术研究进展[J].江西农业学报,2009,21(12):134-136.
- [21] 张红梅,李思颖,蔡宝宏,等.琉璃苣种子中脂肪酸含量的测定[J].安徽农业科学,2014,42(31):11223-11224.
- [22] 王英爽,于淑娟.气相色谱法测定琉璃苣油中 γ -亚麻酸、亚油酸含量的研究[J].黑龙江科技信息,2009(8):24.
- [23] 任吉君,王 艳,周 荣,等.不同播种期对琉璃苣生长发育及采种的影响[J].种子,2015,34(11):124-125.
- [24] 张广伦,肖正春. γ -亚麻酸植物资源及开发利用[J].中国野生植物资源,1997,16(2):5-10.

(责任编辑:王 妮)