

DOI:10.11937/bfyy.201613036

响应面法优化 SFE-CO₂ 提取 酸枣仁中脂肪油及成分分析

白鹤龙¹, 祝文学², 王 晶¹, 时东方¹

(1. 长春师范大学 中心实验室, 吉林 长春 130032; 2. 抚顺市农业特产学校 示范基地办公室, 辽宁 抚顺 113123)

摘 要:以酸枣仁为研究对象,采用超临界流体萃取技术提取油酸枣仁中脂肪油成分,并利用响应面分析法分析了超临界流体萃取的试验条件,研究了系统压力、提取温度、动态萃取时间和酸枣仁粉末粒度 4 个影响因素对脂肪油提取效果的影响,并应用 GC-MS 技术对脂肪油中的主要成分进行了分析。结果表明:应用响应面法优化酸枣仁中脂肪油的 SFE-CO₂ 最佳提取方案为提取温度 40 ℃,萃取压力 395 bar,动态萃取时间 2.5 h,酸枣仁样品粉末粒度为 40 目,其中脂肪油提取效果较好,提取率约为 20%;应用 GC-MS 检测结果表明,脂肪油中的主要成分为 10-十八碳烯酸、十八烷酸、9,12-十八碳二烯酸、十六烷酸等;脂肪油是其主要成分,占相对含量的 60% 以上;SFE-CO₂ 萃取技术具有高效、方便、提取效率高、绿色环保等显著优点,适合于酸枣仁中脂肪油的提取。

关键词:酸枣仁;脂肪油;超临界流体萃取;响应面法;气质联用

中图分类号:Q 946 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)13-0136-05

中药酸枣仁(*Zizyphi spinosi* Semen)是鼠李科(Rhamnaceae)枣属植物的干燥种子,其味酸性平,具有补肝、宁心、敛汗、生津的功效,是较为常用的镇静安眠中药^[1],在《神农本草经》中列为上品,《本草纲目》将其列为本部类,中医药学教科书中列为养心安神类药物。中药酸枣仁的产地主要是河北、陕西、辽宁、河南等^[2]。现代药理研究表明,酸枣仁具有镇静安眠、调节神经中枢、增强免疫功能、镇痛、抗心律失常、改善心肌缺血和抗血小板聚集等多种功效^[3],而且毒副作用较小。酸枣仁中主要包括脂肪酸、三萜、黄酮类化合物等的成分,其中,脂肪酸类提取率可高达 30% 以上^[4],有研究报道

酸枣仁中不饱和脂肪酸具有抗炎、抗氧化和抗肿瘤等作用^[5],尤其在安眠镇静方面的显著作用,使其受到越来越多的关注和研究^[6-8]。

传统的酸枣仁脂肪油提取工艺存在温度高、溶剂有残留、毛油色泽较深、时间长、溶剂用量大等缺点。超临界流体萃取技术是用超临界流体为萃取溶剂的萃取分离、富集技术,在中草药化学成分的应用中较广泛,尤其适合弱极性成分^[9-10]。相对于传统溶剂提取方法,SFE-CO₂ 萃取方法具有高效、高选择、低温等显著优点,特别因其无有机溶剂的残留,是一种绿色环保的食品药品提取技术。而响应面法统计设计能够充分反映因素间对于试验结果的相互影响。

现以酸枣仁为研究对象,采用了超临界提取技术对酸枣仁中的脂肪油进行提取,以脂肪油提取率为考察指标,应用响应面系统考察压力、温度、萃取时间及粉末粒度对提取率的影响,优化提取方法,并利用 GC-MS 法分析了酸枣仁中脂肪油的主要成分。

第一作者简介:白鹤龙(1980-),男,吉林长春人,硕士研究生,研究方向为天然药物分析。E-mail:baihelong2000@126.com

责任作者:时东方(1978-),男,吉林长春人,博士,副教授,研究方向为天然药物分析。E-mail:shidongfang3@163.com

基金项目:吉林省教育厅资助项目(吉教科合字[2013]第 254 号)。

收稿日期:2016-02-14

storage quality of broccoli, low O₂ easily led to anaerobic respiration and produced ethanol and acetaldehyde, high O₂ would accelerate physiological activity such as etiolating rate and cause nutrient depletion. On the premise of 40% CO₂, with the increasing of O₂, ethylene production, respiration and etiolating rate were increased, while the chlorophyll content, ethanol and acetaldehyde contents, were decreased. Only the proper O₂/CO₂ proportion behaved a good storage quality. In this experiment condition, the best treatment was 40% O₂+40% CO₂.

Keywords: broccoli; carbon dioxide(CO₂); oxygen(O₂); quality; controlled atmospheres; storage

1 材料与方法

1.1 试验材料

中药酸枣仁购于同仁堂大药房(吉林长春),粉碎,过40~80目筛,1% H_2SO_4 -MeOH 新鲜溶液、硫酸、正己烷等试剂均为分析纯(北京化工厂)。甲醇为色谱纯试剂(美国 Fisher 公司)。

SFE-prime 超临界流体萃取仪(Applied Separation Co., 美国);BS-124S 电子天平(赛多利斯公司,德国);HP6890/5975 气-质联用仪(Agilent 公司,美国)。

1.2 试验方法

1.2.1 SFE- CO_2 萃取方法 开启超临界流体仪的电源,首先启动冷却装置,在 SFE 使用之前需要将仪器预冷 1 h 左右。使用前需要对仪器进行检测是否存在漏气的情况。当完成仪器的预冷后,精密称取约 5.000 0 g 不同目数的酸枣仁粉末,将样品装入体积为 24 mL 的反应釜。设置萃取温度,开启 CO_2 加压,恒温恒压下静态萃取 30 min,进行动态萃取,按照响应面法的试验条件进行时间的设定,完成萃取后,设置出口阀的温度,温度达到后,开启出口阀,收集提取物,称重,计算提取率。提取率(%)=萃取物/原料质量 \times 100。

1.2.2 响应面方法试验设计 采用响应面法优化超临界萃取酸枣仁中脂肪油的试验条件,根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理,选择提取温度 X_1 、系统压力 X_2 、动态萃取时间 X_3 和中药酸枣仁粉末粒度 X_4 为自变量,脂肪油提取率为响应值(Y),设计试验(表 1)。

表 1 响应面法的因素及水平设计

Table 1 Factors and levels design of the response surface method

因素 Factor	水平 Level		
	-1	0	+1
提取压力 Extraction pressure/bar	200	300	400
动态萃取时间 Extraction time/h	0.5	1.5	2.5
萃取温度 Extraction temperature/ $^{\circ}\text{C}$	40	50	60
粒度 Particle size/目	40	60	80

1.2.3 GC-MS 分析条件 首先将 2 mL 的 1% 硫酸-甲醇溶液加入到 100 μL 酸枣仁脂肪油中,然后将其放置在 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应 30 min,反应完成后,将混合物冷却到室温,加入 2 mL 正己烷溶解,剧烈摇动,吸取上层有机相,过滤,通过 GC-MS 进行分析。GC 色谱条件:色谱柱,FFAD 25 mm \times 0.2 mm;程序升温设计,100 $^{\circ}\text{C}$ 柱温保持 8 min,以 10 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 将柱温升至 230 $^{\circ}\text{C}$,并保持 30 min;GC 载气为高纯氮气;样品进样温度为 250 $^{\circ}\text{C}$;氮气流速为 25 $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$;分流比设置为 1:50。MS 分析条件:离子源为 EI 电离源,其电离电压为 70 eV,离子源温度设置为 230 $^{\circ}\text{C}$;样品扫描的质量范围为 50~500 Da。

2 结果与分析

2.1 响应面法分析结果

采用 4 因素、3 水平设计方案,响应面分析共设计 29 组提取方法。将每个自变量以 -1、0、1 进行编码,对所称量的 29 个样品按照试验方案进行提取,酸枣仁脂肪油的提取率为响应值(Y),记录响应面分析的试验结果(表 2)。

应用 Design-Expert 8.05b 控制软件对所设计的不同提取方案中的酸枣仁脂肪油提取率(Y)及各因素(X)进行多元回归分析和最小二乘法拟合,得到二次多项回归模拟方程: $Y = 15.74 - 0.56X_1 + 3.99X_2 + 2.77X_3 - 0.34X_4 - 0.78X_1X_2 - 2.06X_1X_3 - 0.30X_1X_4 + 0.99X_2X_3 + 0.40X_2X_4 - 2.43X_3X_4 - 1.87X_1^2 - 2.75X_2^2 - 2.21X_3^2 - 1.11X_4^2$ 。

表 2 响应面法分析结果

Table 2 Analysis results of response surface method

编号 No.	X_1 萃取温度 Extraction temperature / $^{\circ}\text{C}$	X_2 提取压力 Extraction pressure /bar	X_3 提取时间 Extraction time /h	X_4 粒度 Particle size /目	提取率 Extraction rate /%
1	1(60)	0(300)	1(2.5)	0(60)	12.18
2	-1(40)	0(300)	0(1.5)	1(80)	10.74
3	-1(40)	1(400)	0(1.5)	0(60)	19.17
4	0(50)	0(300)	-1(0.5)	-1(40)	7.75
5	0(50)	-1(200)	0(1.5)	-1(40)	8.83
6	0(50)	0(300)	0(1.5)	0(60)	15.74
7	-1(40)	0(300)	0(1.5)	-1(40)	11.97
8	0(50)	-1(200)	0(2.5)	1(80)	9.24
9	0(50)	0(300)	1(2.5)	1(80)	13.03
10	0(50)	1(400)	-1(0.5)	0(60)	10.32
11	0(50)	0(300)	0(1.5)	0(60)	15.74
12	0(50)	0(300)	1(2.5)	-1(40)	19.29
13	0(50)	0(300)	-1(0.5)	1(80)	11.20
14	-1(40)	0(300)	-1(0.5)	0(60)	7.83
15	1(60)	-1(200)	0(0.5)	0(60)	2.43
16	0(50)	0(300)	0(1.5)	0(60)	15.74
17	0(50)	1(400)	0(1.5)	-1(40)	14.54
18	0(50)	0(300)	0(1.5)	0(60)	15.74
19	1(60)	0(300)	0(1.5)	1(80)	11.33
20	1(60)	0(300)	-1(0.5)	0(40)	10.70
21	0(50)	1(400)	1(2.5)	0(60)	16.65
22	-1(40)	-1(200)	0(1.5)	0(60)	7.16
23	1(60)	0(300)	0(1.5)	-1(40)	13.76
24	0(50)	-1(200)	-1(0.5)	0(60)	5.29
25	-1(40)	0(300)	1(2.5)	0(60)	17.57
26	0(50)	0(300)	0(1.5)	0(60)	15.74
27	0(50)	-1(200)	1(2.5)	0(60)	7.65
28	0(50)	1(400)	0(1.5)	1(80)	16.55
29	1(60)	1(400)	0(1.5)	0(60)	14.30

2.2 响应面方差分析

上述的多项回归模拟方程表示了酸枣仁中脂肪油的提取率与 SFE-CO₂ 不同的萃取条件之间的变化规律。其中, Y 表示脂肪油的提取率, 为效应值, 4 个影响因素为自变量, 根据响应面软件进行方差分析。

从表 3 可以看出, 该响应面模型 F 值为 11.74, 概率 $P < 0.000 1$, 表明模型具有高度显著性。同时, 此模型决定系数 R^2 为 0.921 5, 表明方程的因变量与所有自变量线性关系较为显著, Y 改变的 92.15% 来自于所选自变量, 此模型在整个回归区域的相关性良好; 该模型的信噪比为 11.866, 表明该响应面设计方案具有可行性, 拟合度良好; 决定系数 B(萃取压力), C(动态萃取时间), AC(萃取温度与动态萃取时间的交互作用), CD(动态萃取时间和粒度的交互作用)的 P 值分别为 $< 0.000 1^*$ 、 $< 0.000 1^*$ 、0.020 8、0.008 5, 均小于 0.05, 表明对酸枣仁脂肪油提取率的影响具有显著性。

表 3 回归模型方差分析

Table 3 ANOVA results for response surface quadratic model analysis

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方和 Mean square	F 值 F value	P 值 P value
模型 Model	413.41	14	29.53	11.74	$< 0.000 1^*$
A-萃取温度 Extraction temperature	3.79	1	3.79	1.50	0.240 1
B-萃取压力 Extraction pressure	191.44	1	191.44	76.10	$< 0.000 1^*$
C-萃取时间 Extraction time	92.30	1	92.30	36.69	$< 0.000 1^*$
D-粒度 Particle size	1.37	1	1.37	0.54	0.473 2
AB	2.46	1	2.46	0.98	0.339 0
AC	17.06	1	17.06	6.78	0.020 8
AD	0.36	1	0.36	0.14	0.710 9
BC	3.94	1	3.94	1.57	0.231 2
BD	0.64	1	0.64	0.25	0.621 8
CD	23.57	1	23.57	9.37	0.008 5
A ²	22.74	1	22.74	9.04	0.009 4
B ²	49.01	1	49.01	19.48	0.000 6
C ²	31.61	1	31.61	12.57	0.003 2
D ²	8.01	1	8.01	3.18	0.096 0
变异系数 Coefficient of variation/ %			12.73		
相关系数 R^2			0.921 5		
信噪比 Adeq precisor			11.866		

注: * 表示差异显著。

Note: * means significant difference.

2.3 响应面分析

以设计方案中任意 2 个不同因素为考察对象, 将剩余 2 个因素水平取值为 0, 可以进行降维分析, 得到萃取温度、系统压力、动态萃取时间和酸枣仁样品粒度对其脂肪油提取率的响应面结果(图 1)。

图 1A 为萃取温度和系统压力与脂肪油的提取率的响应面结果, 萃取时间和样品粒度不变, 萃取压力对于脂肪油提取率影响显著, 温度影响较小。图 1B 表示的是萃取温度与动态萃取时间的交互作用对提取率的影响, 可以看出, 温度较低时, 提取率随时间的增加逐渐提高, 而温度较高的条件下, 随着时间的改变, 提取率先升高后降低, 原因可能是高温条件下, 较长时间的提取作用会使酸枣仁中有效成分进行分解, 从而影响了提取率。从图 1C 可以观察到萃取温度和样品的粒度对酸枣仁中脂肪油提取率的影响相对较小, 随着样品粒度和温度的改变, 提取率的变化不明显。随着样品粉碎程度较大, 粉末变得很细, 不利于和溶媒的接触, 可能影响了提取效果。图 1D 表示的是萃取压力和动态萃取时间对提取率的影响效果, 增加萃取压力以及延长动态萃取时间, 脂肪油的提取率会有非常显著的增加, 说明高压萃取条件下, 延长提取时间能够使酸枣仁的脂肪油提取更充分。图 1E 表示的萃取压力和粒度对提取率的影响, 可以看出, 样品粒度对提取率的影响不大, 而萃取时间的增加能够明显的提高提取率。图 1F 表示动态萃取时间和粒度的交互作用的响应面结果, 虽然样品粒度对提取率的贡献不大, 但萃取压力和粒度的交互作用对样品的提取率有显著的影响。此外, AC 和 CD 的交互作用对酸枣仁中脂肪油的提取率影响较大, 在试验设计参数的所选择范围内, 它们对脂肪油提取率的影响随着另一因素的改变有显著的变化; 而 AB 与 BC 的交互作用对提取率也存在一定的影响, 对提取率的影响随着另一因素的改变也有一定的变化; 而 AD 和 BD 的交互作用对脂肪油提取率影响不明显, 在试验条件的范围内, 对脂肪油提取率的影响随着另一因素的改变变化不明显。该 4 种因素对脂肪油提取率的影响, 以及各因素之间的交互影响与响应面模拟方程的回归分析结果相吻合。

通过响应面法优化试验的重要参数, 得到提取方案为萃取温度 40 °C, 系统压力为 395 bar, 动态萃取时间为 2.5 h, 酸枣仁样品粉末粒度为 40 目, 通过 Design-Expert 8.05b 软件模拟试验, 脂肪油提取率的预期值是 21.09%。根据所提供的最佳条件进行 3 次平行试验, 得到酸枣仁中脂肪油的实际提取率的平均值为 19.55%, 与提取率的预测值较为接近, 该试验结果说明, 响应面分析方法的回归模型可以真实地反映各因子对酸枣仁中脂肪油提取率的影响。

2.4 酸枣仁脂肪油成分的检测

将硫酸甲酯化产物应用 GC-MS 联用仪进行分析检测, 自动检索 NBS 标准谱图库, 分析酸枣仁中脂肪油的主要成分(表 4)。

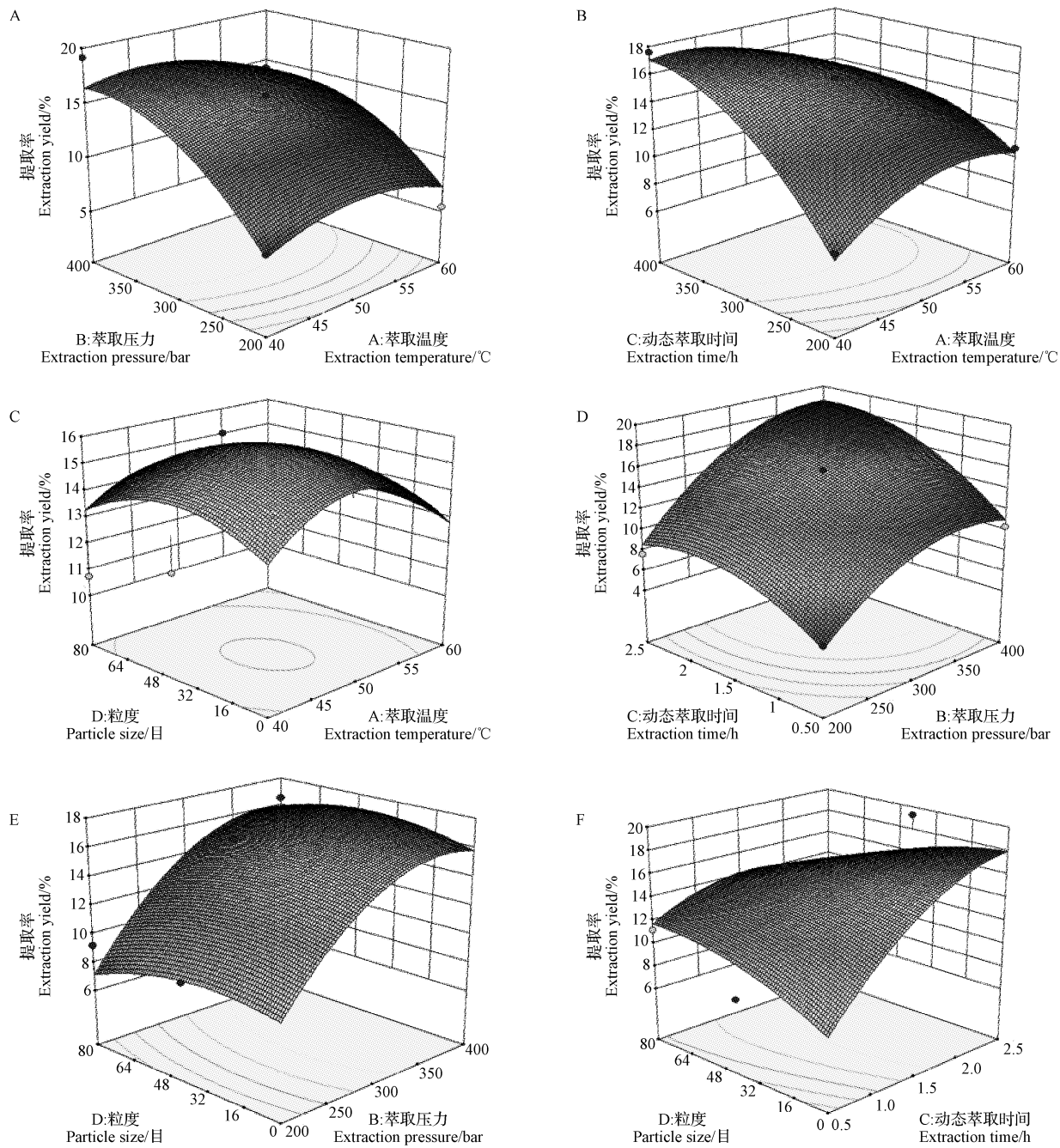


图 1 不同因素对酸枣仁脂肪油提取率的响应面结果

Fig. 1 Response surface plots of different extraction factors on the extraction yield of fatty oil from *Zizyphi spinosi* Semen

表 4 超临界方法提取酸枣仁脂肪油主要成分及相对含量

Table 4 The main components and their relative content of fatty oil from *Zizyphi spinosi* semen by SFE

编号 No.	分子量 Molecular weight	分子式 Molecular formula	化合物 Compounds	相对含量 Relative content/%
1	228	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	十四烷酸	0.05
2	254	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	11-十六烷烯酸	0.13
3	256	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	十六烷酸	6.58
4	280	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	9,12-十八碳二烯酸	7.68
5	282	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	10-十八碳烯酸	30.15
6	284	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	十八烷酸	16.37
7	310	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	11-二十烯酸	4.52
8	312	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	二十烷酸	1.53
9	296	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	10-十九烷烯酸	0.21
10	340	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	二十二烷酸	1.37
11	354	C ₂₃ H ₄₆ O ₂	二十三烷酸	0.14
12	368	C ₂₄ H ₄₈ O ₂	二十四烷酸	0.54
13	396	C ₂₆ H ₅₂ O ₂	二十六烷酸	0.07

酸枣仁脂肪油经硫酸甲酯化后,应用 GC-MS 技术检测出 13 种脂肪油化合物,其中 10-十八碳烯酸、十八烷酸、9,12-十八碳二烯酸、十六烷酸等脂肪油是其主要成分,占相对含量的 60% 以上,与相关文献报道的结果相似^[11-12]。

3 结论

应用 SFE-CO₂ 萃取技术对酸枣仁的脂肪油进行提取,应用响应面分析法优化了 SFE 最佳提取条件:提取温度为 40 ℃、系统压力为 395 bar、动态萃取时间为 2.5 h、酸枣仁样品粉末粒度为 40 目,在此条件下,脂肪油的提取率可以达到 20% 左右,并通过验证试验对结果进行了确认。应用响应面分析法对提取条件进行优化,可以考察因素与响应值之间、不同因素之间相互影响,克服正交法优化的此类缺陷。同时利用 GC-MS 方法对所提取的酸枣仁脂肪油进行了分析,10-十八碳烯酸、十八烷酸、9,12-十八碳二烯酸和十六烷酸等脂肪油是其主要成分。

参考文献

- [1] 宋立人. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:262.
- [2] 张照荣,周凤琴,李建秀,等. 酸枣仁品种整理及质量研究[J]. 山东中医药大学学报,1997,21(5):388.
- [3] 梁柱华,杨建设,杨艺虹,等. 酸枣仁中总黄酮的提取率测定研究[J]. 分析测试技术与仪器,2008,14(1):34-37.
- [4] 李兰芳,赵淑兰,吴树勋,等. 酸枣仁脂肪油化学成分的研究[J]. 中药材,1993,16(3):29-30.
- [5] SHARIF M A, JUNG I Y, HYU J K, et al. Antiinflammatory activity of seed essential oil from *Zizyphus jujube*[J]. Food Chem Toxicol, 2010, 48: 639-643.
- [6] 吴和珍,陈婧,杨艳芳,等. 超临界二氧化碳萃取酸枣仁油的指纹图谱研究[J]. 中国医院药学杂志,2007,27(1):24-27.
- [7] 侯冬岩,回瑞华,杨梅,等. 酸枣仁中挥发性化学成分分析[J]. 分析试验室,2003,22(3):84-86.
- [8] 陈振德,许重远,谢立. 超临界流体 CO₂ 萃取酸枣仁脂肪油化学成分的研究[J]. 中草药,2001,32(11):976-977.
- [9] MEZZOMO N, MILEO B R, FRIEDRICH M T, et al. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: Process yield and extract composition[J]. Journal of Bioresource Technology, 2010, 101: 5622-5632.
- [10] SÁNCHEZ-VICENTE Y, CABANAS A, RENUNCIO J A R, et al. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) seed oil using carbon dioxide and ethanol[J]. The Journal of Supercritical Fluids, 2009, 49: 167-173.
- [11] 贡济宇,赵启铎,蔡广知,等. 超临界萃取酸枣仁油及其成分研究[J]. 长春中医药大学学报,2005(21):58-59.
- [12] 钟广华,梁宝钻,葛发欢. 酸枣仁油的超临界 CO₂ 萃取[J]. 中药材,2002(25):407-408.

Supercritical CO₂ Fluid Extraction of the Fatty Oil From *Zizyphi spinosi* Semen Optimized by Response Surface Methodology

BAI Helong¹, ZHU Wenxue², WANG Jing¹, SHI Dongfang¹

(1. The Central Laboratory, Changchun Normal University, Changchun, Jilin 130032; 2. Demonstration Base Office, Fushun Agricultural Specialty School, Fushun, Liaoning 113123)

Abstract: Taking *Zizyphi spinosi* Semen as material, supercritical CO₂ fluid extraction of the fatty oil from *Zizyphi spinosi* Semen was carried out, the extraction temperature, pressure, time and the sample particle size were independent determined and the conditions were evaluated by response surface methodology (RSM). The results showed that the maximum extraction yield of about 20% was achieved at extract temperature of 40 ℃, pressure of 395 bar, dynamic extraction time of 2.5 h and power particle size of 40 mesh. The chemical compositions of fatty oil were investigated by GC-MS. The results indicated that supercritical CO₂ fluid extraction method was the suitable method, the main fatty acids were 10-octadecenoic acid, octadecanoic acid, 9,12-octadecadienoic acid and palmitic acid, respectively. Supercritical fluid extraction was proved to an effective technique for extracting fatty oil from *Zizyphi spinosi* Semen.

Keywords: *Zizyphi spinosi* Semen; fatty oil; supercritical CO₂ fluid extraction; response surface method; GC-MS