响应面法优化超临界CO_2萃取亚麻籽木脂素

刘振春[1]，范国婷[1]，苏　彤[2,*]，冯建国[1]，于　洋[1]
(1.吉林农业大学食品与科学工程学院，吉林 长春　130118；2.长春职业技术学院，吉林 长春　130033)

摘　要：以亚麻籽为原材料，利用响应面法优化超临界CO_2萃取亚麻木脂素的工艺。在单因素试验基础上，以萃取压力、萃取温度和萃取时间为影响因素，应用Box-Behnken方法进行三因素三水平试验，以木脂素得率为响应值，进行响应面分析。确定萃取的最佳工艺条件是萃取压力25.69MPa、萃取温度41.54℃、萃取时间182.80min，亚麻籽木脂素得率的预测值为2.401%，验证值为2.398%。结果表明利用响应面分析方法对超临界CO_2萃取亚麻木脂素的工艺条件进行优化，可获得最优的工艺参数，从而为进一步的研究提供依据。

关键词：响应面法；亚麻籽；木脂素；超临界CO_2萃取

Optimization of Supercritical CO_2 Extraction of Lignans from Flax Seed Using Response Surface Methodology

LIU Zhen-chun[1]，FAN Guo-ting[1]，SU Tong[2,*]，FENG Jian-guo[1]，YU Yang[1]
(1. College of Food Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun　130118, China；
2. Changchun Vocational Institute of Technology, Changchun　130033, China)

Abstract：The present study aimed to optimize supercritical carbon dioxide extraction of lignans from flaxseed using response surface methodology based on a 3- variable, 3- level Box-Benhnken design. The results showed that the optimum conditions were extraction pressure of 25.69 MPa, extraction temperature of 41.54 ℃, extraction time of 182.80 min. Under these conditions, the model predicted and experimental values of lignans yield were 2.401% and 2.398%, respectively.

Key words：response surface methodology；flax seed；lignans；supercritical CO_2 extraction
中图分类号：TS202.3　　文献标志码：A　　文章编号：1002-6630(2013)10-0082-04
doi:10.7506/spkx1002-6630-201310018

亚麻(*Linum ustitatissimum* Linaceae)又称胡麻，属亚麻科、亚麻属，是世界十大油料作物之一[1]，亚麻籽中富含蛋白质、多不饱和脂肪酸和膳食纤维等营养成分[2]。最近的研究发现，亚麻籽是以开环异落叶松脂酚二葡萄糖苷(secoisolariciresinal diglucoside，SDG)为主的多种木脂素的最丰富的来源[3]。

木脂素(lignan)又称木脂体、木酚素，是自然界植物中的一类植物雌激素。木脂素中具有易被氧化的芳香基团结构，有研究表明木脂素能抑制微粒体过氧化反应，清除过氧化氢自由基[4-5]，抑制肿瘤切除术后的肿瘤扩散[6]，降低血清中总胆固醇、低密度脂蛋白[7-8]。木脂素还有许多其他生理功能不断被报道，如延缓衰老、保护中枢神经系统、调节免疫功能等[9-10]。

目前，亚麻木脂素的提取方法主要是以传统的有机溶剂法为主，所用溶剂大多为甲醇、乙醇，少部分使用丙酮等，但是以这种方法得到的木脂素粗提物通常要在碱液中进行处理，以便将亚麻木脂素的络合状态解除，使其从复杂的形式中游离出来，有的则直接利用醇碱进行提取，但这同时可能引入更多的杂质，对纯化不利[11-12]，另外一些研究者利用索氏提取法、微波辅助法、超声波辅助法提取亚麻木脂素[13-14]，与常规溶剂提取法相比，以上方法显著提高了亚麻木脂素得率，缩短了时间，但是所使用的有机溶剂消耗量很大，其液料比通常达到8:1～10:1，甚至更大，提取周期长，附加劳动力大，污染环境。若使用超临界CO_2提取法能在有效地富集到木脂素类成分的同时，缩短提取时间、提高提取效率，避免有毒溶剂的使用，已经成为研究领域主要探索的新技术、新方法[15-16]。

1　材料与方法

1.1　材料、试剂与仪器

亚麻籽由吉林省农业科学院提供；CO_2气体(纯度≥99.5%，食品级)　长春氧气厂；开环异落叶松SDG标准

收稿日期：2012-03-05
基金项目：吉林省科技发展计划项目(2011026)
作者简介：刘振春(1963—)，男，教授，博士，研究方向为食品营养与功能性食品。E-mail：liuzhenchun63@163.com
*通信作者：苏彤(1968—)，女，副教授，硕士，研究方向为食品营养与功能性食品。E-mail：ST@163.com

品(纯度95%)　成都巨邦生物工程公司；甲醇(色谱纯)；自制超纯水；其他试剂均为分析纯。

SHA-B型水浴恒温振荡器　金坛市医疗仪器厂；FA1004A型电子天平　上海精天电子仪器有限公司；LXJ-离心机　上海安亭科学仪器厂；101A-3ET型电热鼓风干燥箱　上海实验仪器厂有限公司；FZ102型植物粉碎机　天津泰斯仪器有限公司；HA121-50-02型超临界CO_2萃取装置　江苏南通华安超临界萃取有限公司；LC-20AT型高效液相色谱仪　日本岛津公司。

1.2　方法

1.2.1　亚麻籽木脂素提取工艺过程

亚麻籽→粉碎→脱脂→装料入萃取釜→控制适宜温度、压力、时间→超临界CO_2萃取→分离萃取物→定容→待测

1.2.2　标准方程的建立

精密称取SDG标准品2.3mg用甲醇溶解，定容至10mL，得到0.23mg/mL的对照品溶液，取5份对照品溶液，分别稀释制成质量浓度为0.23、0.1725、0.115、0.0575、0.02875mg/mL的SDG标准品溶液，用0.45μm过滤膜过滤待用。分别吸取以上溶液10μL，注入高效液相色谱仪中。

HPLC条件为：色谱柱：C_{18}(4.6mm×250mm)；紫外检测波长：280nm；柱温：室温；流速：1.0mL/min；流动相：乙腈-水(含0.1%的醋酸)不同梯度条件对SDG样品进行高效液相色谱分析，0～5min，B：95%～85%；5～25min，B：85%～70%；25～40min，B：70%～30%(A为乙腈，B为含0.1%的醋酸的水)，得到扫描曲线图，然后以SDG标准品的质量浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，检测后得到回归方程为：$Y=397455x+10207$，$R^2=0.9973$。结果表明，含量与峰面积积分值呈良好的线性关系。用外标法计算样品的质量浓度，从而得出亚麻籽木脂素的得率。

$$亚麻籽木脂素的得率/\%=\frac{亚麻籽木脂素质量}{原料质量}\times 100$$

1.2.3　单因素对亚麻籽木脂素得率的影响

亚麻籽经过除杂、粉碎、脱脂后，进行超临界CO_2萃取，设定粉碎粒度20目、萃取温度40℃、萃取时间180min、萃取压力25MPa，然后将萃取物进行分离，定容后待测。固定其他条件，分别考察萃取压力(15～35MPa)、萃取温度(30～50℃)、萃取时间(120～240 min)对亚麻籽木脂素得率的影响。

1.2.4　响应面试验优化方案

采用响应面法进行试验数据处理，选用Box-Behnken模型对影响超临界CO_2法萃取亚麻木脂素得率的因素进行响应面设计，以亚麻木脂素的得率为响应值进行优化。

2　结果与分析

2.1　单因素试验

2.1.1　萃取压力对亚麻籽木脂素得率的影响

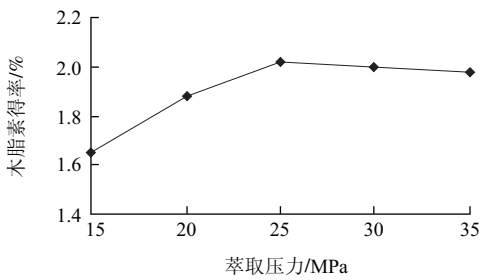


图1　萃取压力对木脂素得率的影响

Fig.1　Effect of extraction pressure on flaxseed lignans yield

由图1可知，在其他条件不变的情况下，亚麻木脂素得率随着压力的升高而增加，压力在25MPa时，木脂素得率最大，但随后随着压力的升高，在30MPa时却略有下降，这是因为压力增大会使流体密度增大，同时还会减少分子间的传质阻力和传质距离，有利于木脂素的萃取，但是随着压力的增大，流体密度也增大，可压缩性变小，溶解能力的增加有限，导致萃取的选择性有所下降，木脂素得率也有所降低，综合考虑，萃取压力为20～30MPa为宜。

2.1.2　萃取温度对亚麻籽木脂素得率的影响

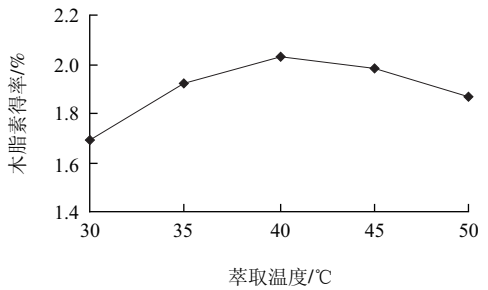


图2　萃取温度对亚麻籽木脂素得率的影响

Fig.2　Effect of extraction temperature on flaxseed lignans yield

由图2可知，随着萃取温度的升高，亚麻木脂素得率也增加，当萃取温度为45℃时，木脂素得率达到2.03%，而后随着萃取温度的进一步升高，木脂素得率反而下降。这是因为随着温度的升高，CO_2流体的黏度下降，使溶质扩散的速度提高，另外溶质的蒸汽压增大，使溶质在CO_2中的溶解度增大而有利于萃取的进行，但是温度升高，超临界流体密度降低，导致CO_2流体的溶解度下降，综合分析，选择萃取温度在35～45℃为宜。

2.1.3　萃取时间对亚麻籽木脂素得率的影响

从图3可以看出，随着萃取时间的延长，亚麻木脂素得率逐渐升高，这是因为萃取刚开始时，超临界CO_2流

体没有与溶质达到良好的接触，但是随着萃取时间的延长，传质达到良好的状态，木脂素得率增大，直到最大值。当萃取时间超过180min时，木脂素得率趋于平缓。并且随着时间的进一步延长，会使CO_2的消耗量进一步加大。因此，综合考虑，萃取时间为180min 左右为宜。

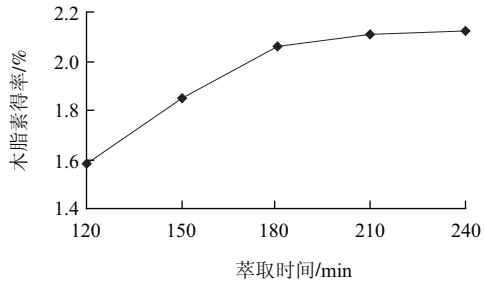


图 3 萃取时间对亚麻籽木脂素得率的影响

Fig.3 Effect of extraction time on flaxseed lignans yield

2.2 响应面优化试验

2.2.1 响应面分析方案及结果

综合单因素试验的结果，选取萃取压力、温度、时间3个因素，在单因素基础上采用三因素三水平的响应面分析方法，试验选用Box-Behnken 模型，试验因素设计及结果见表1。

表 1 Box-Behnken试验设计及结果

Table 1 Scheme and results of Box-Behnken design

试验号	因素水平			木脂素得率/%
	X_1萃取压力/MPa	X_2萃取温度/℃	X_3萃取时间/min	
1	−1(20)	1(45)	0	2.076
2	−1	−1(35)	0	1.780
3	0(25)	0(40)	0(180)	2.331
4	1(30)	0	−1(150)	2.148
5	−1	0	−1	1.721
6	0	0	0	2.409
7	0	−1	1(210)	2.026
8	0	0	0	2.389
9	0	0	0	2.374
10	−1	0	1	2.173
11	0	0	0	2.354
12	0	1	−1	2.182
13	0	1	1	2.150
14	1	1	0	2.143
15	0	−1	−1	1.646
16	1	0	1	2.028
17	1	−1	0	2.035

利用Design Expert 7.0.0软件对表1进行回归分析，得到二次多元回归模型为：$Y=2.37+0.076X_1+0.13X_2+0.085X_3-0.047X_1X_2-0.14X_1X_3-0.10X_2X_3-0.17X_1^2-0.19X_2^2-0.18X_3^2$。

对模型进行方差分析结果见表2。从表2可以看出：一次项和二次项的偏回归系数都显著，交互项的X_1X_3、X_2X_3也显著，模型的$R^2=0.9858$，$R_{Adj}^2=0.9676$，说明回归方程与实际情况吻合较好，实验误差小，可以用此模型对超临界CO_2萃取亚麻木脂素进行分析和预测。

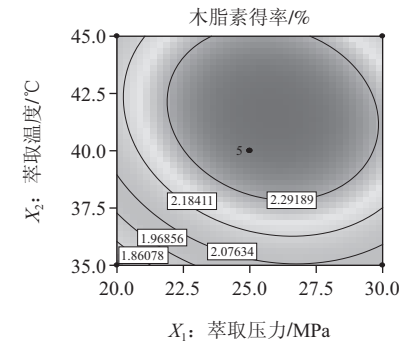
表 2 回归方程方差分析表

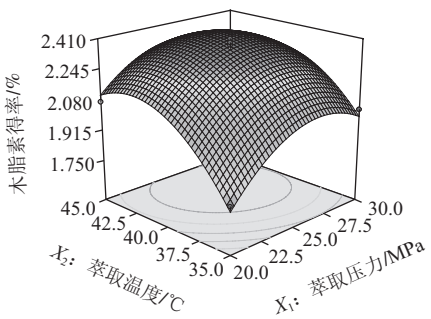
Table 2 Analysis of variance for fitted quadratic regression equation

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	0.84	9	0.094	54.18	＜0.0001	***
X_1	0.046	1	0.046	26.40	0.0013	**
X_2	0.14	1	0.14	81.94	＜0.0001	***
X_3	0.58	1	0.58	33.47	0.0007	***
X_1X_2	8.836×10^{-3}	1	8.836×10^{-3}	5.12	0.0582	
X_1X_3	0.082	1	0.082	47.36	0.0002	***
X_2X_3	0.042	1	0.042	24.57	0.0016	**
X_1^2	0.13	1	0.13	73.14	＜0.0001	***
X_2^2	0.15	1	0.15	87.73	＜0.0001	***
X_3^2	0.14	1	0.14	79.61	＜0.0001	***
残差	0.012	7	1.727×10^{-3}			
失拟向	8.424×10^{-3}	3	2.808×10^{-3}	3.06	0.1538	
纯误差	3.665×10^{-3}	4	9.163×10^{-3}			
总和	0.85	16				

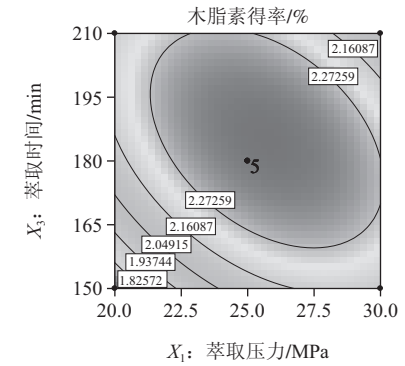
注：***. 差异极显著($P<0.001$)；**. 差异高度显著($P<0.01$)；*. 差异显著($P<0.05$)。

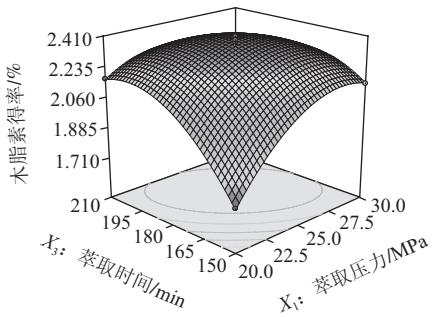
2.2.2 交互作用分析



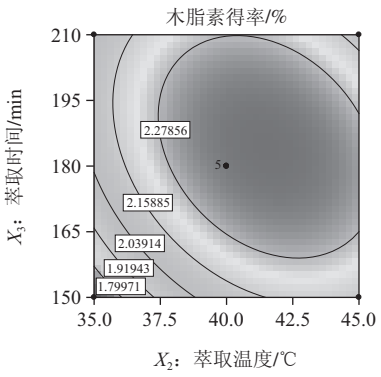


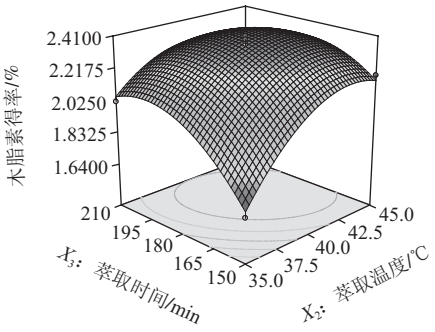
A. 萃取温度与萃取压力





B. 萃取时间与萃取压力





C. 萃取时间与萃取温度

图4 两因素交互作用对亚麻木脂素的交互影响

Fig.4 Response surface plot and contour plot showing the interactive effects of two factors on flaxseed lignans yield

由图4A可以看出，萃取温度和萃取压力的交互总用并不显著，木脂素得率主要受萃取温度的影响，木脂素得率随温度的升高而加大，在42℃左右时出现峰值，从等高线也可以看出，在萃取压力为26MPa时，较低的萃取温度即可获得较高的木脂素得率。由图4B可以看出，萃取时间与萃取压力对木脂素得率有极显著影响，两者在木脂素得率的提高中起到关键作用，并且随着萃取时间和萃取压力的增大而增大。由图4C可以看出，萃取时间与萃取温度交互作用显著，木脂素得率主要由萃取时间和萃取温度共同影响。比较3组图可知，萃取温度的影响最为显著，表现为等高线更为陡峭；萃取时间影响次之，萃取压力的等高线较平滑，说明其对响应值影响较小。

在上述响应面分析的结果确定的最佳工艺条件下，即萃取压力25.69MPa、萃取温度41.54℃、萃取时间182.80min，考虑到实际操作的便利，确定提取亚麻木脂素的工艺条件为萃取压力25MPa、萃取温度41℃、萃取时间182min，经过3次萃取实验，得到亚麻木脂素的平均得率为2.398%，与理论值2.401%相差不大。

3 结 论

在单因素试验基础上，通过Design-Expert软件，采用Box-Behnken试验设计法对超临界CO_2流体萃取亚麻木脂素工艺进行设计并优化。结果表明，萃取压力、萃取温度、萃取时间对亚麻木脂素得率的影响均显著，萃取时间和萃取压力，以及萃取时间和萃取温度的交互作用显著，但是萃取温度与萃取压力的交互作用不显著。利用响应面分析方法对超临界CO_2萃取亚麻木脂素的工艺条件进行优化，可获得最优的工艺参数，即超临界CO_2萃取亚麻木脂素的最佳工艺条件为萃取压力25.69MPa、萃取温度41.54℃、萃取时间182.80min，在此条件工艺下验证实验，亚麻木脂素得率为2.398%。从而为进一步的实验研究提供依据。

参考文献：

[1] OOMAH B D, MAZZA G. Flaxseed proteins: a review[J]. Food Chemistry, 1993, 48(2): 109-114.
[2] 陈海华. 亚麻籽的营养成分及开发利用[J]. 中国油脂, 2004, 29(6): 72-75.
[3] 黄海浪, 张水华. 亚麻籽的营养成分及其在食品工业中的应用[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(6): 147-149.
[4] WANG Liquan. Mammalian phytoestrogens: enterodiol and enterolactone[J]. Journal of Chromatography B, 2002, 777(1/2): 289-309.
[5] TOU J C, THOMPSON L U. Exposure to flaxseed or its lignan component during different developmental stages influences ratmammary gland structures[J]. Carcinogenesis, 1999, 20(9): 1831-1835.
[6] 陈茹, 赵健雄, 王学习, 等. 糙叶败酱总木脂素对K562细胞体外生长的影响[J]. 四川中医, 2007, 25(5): 14-17.
[7] JENAB M, RICKARD S E, ORCHESON L J, et al. Flaxseed and lignans increase cecal glucuronidase activity in rats[J]. Nutr Cancer, 1999, 33(2): 154-158.
[8] KAWAMRUA F, OHARA S, NISHIDA A. Antifungal activity of constituents from the heartwood of *Gmelina arborea*: Part 1. Sensitive antifungal assay against *Basidiomycetes*[J]. Holzforschung, 2004, 58(2): 189-192.
[9] 狄济乐. 亚麻籽作为一种功能食品来源的研究[J]. 中国油脂, 2002(4): 26-28.
[10] 何泽民, 朱俊玲. 木脂素的生理功能进展研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(5): 2541-2542.
[11] 杨宏志. 溶剂法提取亚麻木脂素(SDG)工艺优化研究[J]. 中国粮油学报, 2011, 26(1): 109-112.
[12] 陈志强, 高岚, 郑跃, 等. 正交设计法优选亚麻籽饼粕中亚麻木酚素的提取工艺[J]. 天津农业科学, 2008(2): 1-3.
[13] 孙伟浩, 杨宏志, 钟运翠, 等. 超声波提取亚麻木酚素的工艺研究[J]. 中国粮油学报, 2009, 24(7): 124-127.
[14] 张文斌, 许时婴. 亚麻木酚素的微波辅助提取工艺研究[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(2): 286-290.
[15] 刘蒙佳, 陈锦屏, 卢大新. 超临界流体提取技术及其在食品工业中的应用[J]. 食品与药品, 2006, 8(11A): 20-23.
[16] 刘欣, 银建中, 丁信伟. 超临界萃取工艺流程与设备的研究现状和发展趋势[J]. 化工装备技术, 2002(2): 14-18.