

响应面法优化超声-微波协同萃取槟榔籽油及其脂肪酸组成分析

辛晓晨, 裴志胜, 袁腊梅, 盛灵芝, 普凤娇, 张海德*

(海南大学食品学院, 海南 海口 570228)

摘要: 利用超声-微波协同萃取技术提取槟榔籽油, 采用紫外分光光度法快速测定所提取槟榔籽油的含量。通过单因素和响应面试验, 考察提取时间、提取温度、液固比对槟榔籽油提取率的影响, 确定了最佳提取工艺, 结果表明: 恒温模式、提取时间 22min、温度 65℃、液料比 11:1(mL/g)条件下, 槟榔籽油的提取率可达 14.29%。槟榔籽油脂的气相色谱-质谱法分析表明, 其主要成分为豆蔻酸 33.50%、油酸 20.40%、亚油酸 19.19%、棕榈酸 15.82%、月桂酸 9.51%、硬脂酸 1.59%。

关键词: 槟榔籽油; 超声-微波协同萃取; 响应面法; 紫外分光光度法; 气相色谱-质谱法

Optimization of Ultrasonic-Microwave Assisted Extraction of Betel Nut Oil by Response Surface Methodology and Analysis of Its Fatty Acid Composition

XIN Xiao-chen, PEI Zhi-sheng, YUAN La-mei, SHENG Ling-zhi, PU Feng-jiao, ZHANG Hai-de*

(College of Food Science, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: Betel nut oil was obtained by ultrasonic-microwave assisted extraction and its compositions were rapidly determined by a spectrophotometer. The extraction process conditions were optimized by response surface tests on the basis of single factor tests. According to the effects of extraction time, extraction temperature and material-liquid ratio on extraction rate of betel nut oil, the optimal extraction process parameters were extraction time of 22 min, extraction temperature of 65 °C and material-liquid ratio of 1:11 (g/mL). Under the optimal extraction process conditions, the extraction rate of betel nut oil was up to 14.29%. Gas chromatography analysis showed that the major compositions of betel nut oil were 33.5% myristic acid, 20.4% 9-octadecenoic acid, 19.19% 12-octadecadienoic acid, 15.82% hexadecanoic acid, 9.51% dodecanoic acid and 1.59% octadecanoic acid.

Key words: betel nut oil; ultrasound-microwave assisted extraction; response surface methodology (RSM); ultraviolet spectrophotometry; gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)02-0067-05

槟榔(areca nut, AN), 为棕榈科(Palmate)植物槟榔(*Areca catechu* L.)的成熟果实, 别名大白槟、花槟榔、大肚子等。槟榔中脂肪含量约为 14%~18%, 含有月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、癸酸、油酸、亚油酸、十二碳烯酸、十四碳烯酸等多种脂肪酸。槟榔油的现有研究表明其具有抗炎、抑制微生物生长等功效^[1], 槟榔油脂的风味与加工性能与人造黄油相比均要好^[2]。

目前国内外槟榔的研究报道主要集中在槟榔碱、多酚等物质上, 对槟榔的利用也主要是槟榔原产品和初级

加工产品, 槟榔籽作为加工废弃物, 往往直接丢弃。利用槟榔籽废弃料提取脂肪酸, 延长了槟榔生产的产业链, 对槟榔的综合利用和深加工具有重要意义。

常用的油脂提取计算方法工作量大、准确度差、时间长。本实验采用响应面分析法(response surface methodology, RSM), 利用最新超声-微波协同萃取法^[3-4], 将微波的高能作用和超声波振动的空化作用(同时具有萃取和机械搅拌作用)有机结合^[5-6], 辅助提取槟榔籽油脂, 采用紫外分光光度法测定槟榔籽提取液中油脂含量, 并利用气相色谱-质谱(gas chromatography-

收稿日期: 2011-06-29

作者简介: 辛晓晨(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为农产品深加工。E-mail: xin_023@163.com

* 通信作者: 张海德(1970—), 男, 教授, 博士, 研究方向为农产品深加工。E-mail: zhanghaide@163.com

mass spectrometry, GC-MS)对其提取脂肪酸组成进行分析鉴定, 以期为棕榈油脂的进一步研究和应用提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

棕榈籽, 取自新鲜棕榈(海南品种, 采自海南大学儋州校区植物园内), 50℃烘干粉碎, 过 80 目筛, 收集备用; 石油醚 II (AR)、无水硫酸钠(AR, 105℃烘干 3h, 冷却后装瓶备用) 广州化学试剂厂。

1.2 仪器与设备

CW-2000 型超声-微波协同萃取仪 上海新拓微波溶样测试有限公司; FW135 中草药粉碎机 天津市泰斯特仪器有限公司; RE52CS-2 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; DZF-6053 真空干燥箱 上海一恒科技有限公司; TU-1901 双光束紫外-可见光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司; HP6890/5973MS 气相色谱-质谱仪 美国 Hewlett-Packard 公司。

1.3 方 法

1.3.1 溶剂选择

由预实验可知, 棕榈籽油的提取试剂主要是正己烷、石油醚 II 和乙酸乙酯, 但正己烷和乙酸乙酯的成本较高, 且乙酸乙酯在 200~500nm 有吸收^[7]。综合分析, 选择石油醚 II 为棕榈籽油的提取试剂。

1.3.2 棕榈籽油标准曲线的制备

1.3.2.1 标准油品的制备

参照 GB/T 14772—2008《食品中粗脂肪的测定》^[8], 称取粉碎的棕榈籽原料 10.00g 放入滤纸筒中, 再将纸筒置于索氏提取器中, 加入 100mL 石油醚, 将索氏提取器安装在恒温水浴锅上, 设定水浴温度 80 度, 冷凝回流, 控制回流次数在 10 次/h, 时间 6h。提取结束后, 收集提取液, 8000r/min 离心处理后通过内铺 15g 无水硫酸钠的砂芯漏斗, 重复一次。收集提取液于旋转蒸发器中浓缩, 浓缩液 65℃真空干燥 1.5h, 即得棕榈籽油标准品^[7,9]。

1.3.2.2 最大吸收波长的确定

准确称取标准油品 0.100g 溶于石油醚中, 移入 100mL 容量瓶内, 稀释至标线, 储于冰箱, 此即标准油储备溶液。

有文献称植物油中多为不饱和羧酸油脂(C₁₆~C₁₈), 在 200nm 附近有强吸收^[10-12], 将配制好的标准油溶液, 在波长 200~300nm 之间扫描, 测得其最大吸收峰的位置在 210nm 处(图 1), 故选择 210nm 作为样品测定波长。

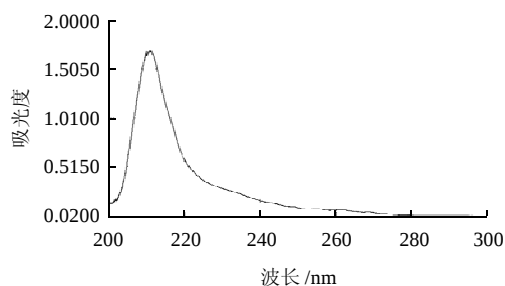


图 1 棕榈籽油紫外吸收曲线

Fig.1 UV absorption spectrum of betel nut oil

1.3.2.3 标准曲线的绘制

于 6 个 50mL 比色管内分别加入 5.00、10.00、15.00、20.00、25.00、30.00mL 标准油溶液, 用石油醚(60~90℃)定容至标线。用 10mm 石英比色皿, 以石油醚为参比在 210nm 处测定吸光度, 依次测定上述系列样品的吸光度。

用“最小二乘法”对实验数据进行回归, 得到标准曲线: $A = 0.0001C + 0.8970$, $r^2 = 0.9994$; 应用本实验方法, 棕榈籽油在 100~600mg/L 范围内呈良好的线性关系。

1.3.3 棕榈籽油含量的测定

$$\text{棕榈油质量/g} = \frac{(A - 0.8970) \times V}{100} \quad (1)$$

$$\text{棕榈油提取率/\%} = \frac{(A - 0.8970) \times V}{100 \times m} \times 100 \quad (2)$$

式中: A 为吸光度; V 为提取液体积/mL; m 为棕榈籽样品质量/g。

1.3.4 棕榈籽油提取工艺

取一定量的棕榈籽原料, 置于 100mL 仪器专用萃取瓶中, 加入适量石油醚后搅拌使样品良好分散于溶剂中。将萃取瓶放于仪器萃取炉腔中, 安装好冷凝回流装置, 分别设置微波功率、提取时间等参数, 检查完毕后开启微波及超声(超声输出功率 50W, 频率 40kHz)进行萃取。提取完成后收集提取液 8000r/min 离心处理, 提取液用紫外分光光度计在 210nm 测定吸光度, 而后计算提取率。

1.3.5 棕榈籽油的成分分析

1.3.5.1 样品甲酯化^[13]

取棕榈籽油标品 50mg 至 25mL 具塞试管中, 加入正己烷-乙醚(2:1)5mL, 0.5mol/L KOH 甲醇溶液 3mL, 超声处理 20min, 加水 10mL, 摇匀, 超声处理 1min, 取

出移至离心管中, 4000r/min 离心 2min, 吸取上层脂肪酸甲酯, 做 GC-MS 分析。

1.3.5.2 气相色谱条件

石英毛细管柱 HP-FFAP(30m × 0.25mm, 0.25μm), 程序升温: 从 120℃ 开始, 以 6℃/min 升到 250℃, 保持 5min; 载气为 He, 柱流量 1.0mL/min, 进样口温度 250℃, 分流比 50:1。

1.3.5.3 质谱条件

EI 源, 电离电压 70eV, 离子源温度 230℃, 扫描范围 10~500u, 进样量 1.0μL。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 提取时间对槟榔籽油提取的影响

恒温模式下, 液料比为 10:1(mL/g), 提取温度 65℃, 功率自动, 选取不同提取时间对槟榔籽油提取率的影响如图 2 所示。

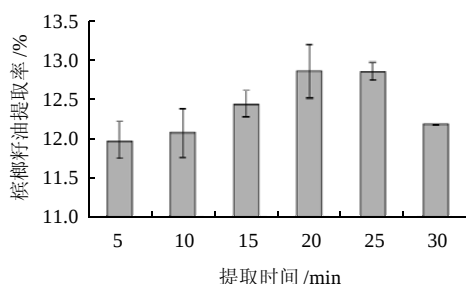


图 2 提取时间对槟榔籽油提取率的影响

Fig.2 Effect of extraction time on extraction rate of betel nut oil

从图 2 可知, 当萃取时间为 5~20min, 提取率从 11.98% 增加到 12.86%; 萃取时间为 20~30min, 提取率开始缓慢下降; 所以超声-微波协同萃取槟榔籽油的最佳萃取时间为 20min。

2.1.2 提取温度对槟榔籽油提取的影响

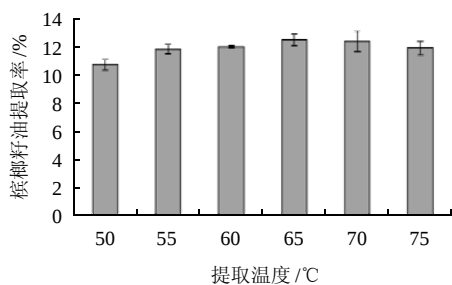


图 3 提取温度对槟榔籽油提取率的影响

Fig.3 Effect of extraction temperature on extraction rate of betel nut oil

恒温模式下, 液料比为 10:1(mL/g), 提取时间 20min, 功率自动, 选取不同提取温度对槟榔籽油提取率的影响如图 3 所示。

从图 3 可知, 当提取温度低于 65℃ 时, 槟榔籽油提取率随着提取温度的升高而增加, 当提取温度为 65℃ 时, 提取率达到最大值; 当提取温度超过 65℃ 时, 提取率开始下降; 这是因为提取温度过高, 溶剂气化严重, 造成易挥发组分的损失, 提取率下降。

2.1.3 液料比对槟榔籽油提取的影响

恒温模式下, 提取时间 20min、提取温度 65℃, 功率自动、超声频率 40kHz, 选取不同液料比对槟榔籽油提取率的影响如图 4 所示。

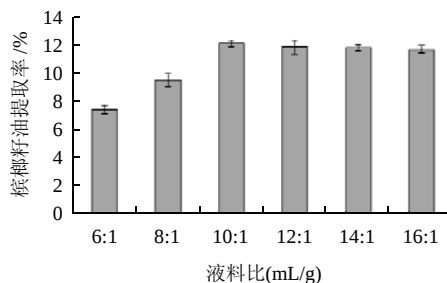


图 4 液料比对槟榔籽油提取率的影响

Fig.4 Effect of liquid-to-material ratio on extraction rate of betel nut oil

由图 4 可知, 随着提取溶剂比率的增大, 槟榔籽油提取率随之增加。因为溶剂用量越大, 体系渗透压差越大, 油脂越易渗透出来, 当液料比超过 10:1(mL/g) 后, 提取率趋于平衡。考虑到成本等问题, 取液料比为 10:1。

2.2 响应面试验

表 1 槟榔籽油提取响应面响应面设计及其结果

Table 1 Design and results of RSM

试验号	X ₁ 时间/min	X ₂ 温度/℃	X ₃ 液料比(mL/g)	提取率/%
1	-1(15)	-1(60)	0(10:1)	12.71
2	-1	1(70)	0	12.78
3	1	-1	0	15.12
4	1(25)	1	0	11.46
5	0(20)	-1	-1(8:1)	11.26
6	0	-1	1(12:1)	13.89
7	0	1	-1	10.20
8	0	1	1	12.19
9	-1	0(65)	-1	10.17
10	1	0	-1	10.52
11	-1	0	1	12.99
12	1	0	1	14.17
13	0	0	0	13.89
14	0	0	0	13.97
15	0	0	0	14.08

在单因素试验的基础上, 根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理, 以提取时间、提取温度、液料比为自变量, 槟榔籽油的提取率为响应值, 进行三因素三水平的响应面分析试验^[14]。响应面因素水平试验设计和结果如表 1 所示。

采用 Design-Expert 软件对所得数据进行分析, 回归分析结果见表 2, 得到二次多元回归方程为:

$$Y = -13.98 + 0.3275X_1 - 0.79375X_2 + 1.38625X_3 - 0.4425X_1^2 - 0.9325X_1X_2 + 0.2075X_1X_3 - 0.52X_2^2 - 0.16X_2X_3 - 1.575X_3^2$$

表 2 回归模型方差分析

Table 2 Variance analysis of regression model

方差来源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值
模型	9	35.09501	3.899445	35.04647	0.000545
一次项	3	21.27188	7.090625	63.72736	0.000209
二次项	3	10.07028	3.356761	30.16907	0.001253
交互项	3	3.75285	1.25095	11.24298	0.011623
残差	5	0.556325	0.111265		
失拟	3	0.538125	0.179375	19.71154	0.048668
纯误差	2	0.0182	0.0091		
总和	14	35.65133			

确定系数 $R^2=98.44\%$ 调整确定系数 $R^2_{Adj}=95.63\%$

从表 2 可知, 模型 $P = 0.000545 < 0.001$, 表明回归模型极显著, 因变量与所有自变量之间的线性关系显著($R^2 = 98.44\%$)。模型的调整确定系数 $R^2_{Adj} = 95.63\%$, 说明该模型拟合程度良好, 试验误差小, 可用此模型来分析和预测超声-微波协同萃取槟榔籽油的工艺结果^[15-16]。

表 3 回归方程系数显著性检验

Table 3 Significance test for regression coefficients

方差来源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值
X_1	1	0.85805	0.85805	7.711769	0.03904
X_2	1	5.040313	5.040313	45.30007	0.001098
X_3	1	15.37351	15.37351	138.1702	0.0001
X_1^2	1	0.722977	0.722977	6.497793	0.051324
X_1X_2	1	3.478225	3.478225	31.26073	0.002526
X_1X_3	1	0.172225	0.172225	1.547881	0.268591
X_2^2	1	0.9984	0.9984	8.973172	0.030254
X_2X_3	1	0.1024	0.1024	0.920325	0.381448
X_3^2	1	9.159231	9.159231	82.31907	0.000272

由表 3 可知, 该模型的一次项提取温度 X_2 、液料比 X_3 极显著, 提取时间 X_1 影响显著; 二次项 X_1X_2 、 X_3^2 影响极显著, X_2^2 影响显著, 其他项影响不显著。这表明各因素对槟榔籽油的提取率不是简单的线性影响关系。且影响超声-微波协同萃取槟榔籽油的因素组词顺序为: 液料比>提取温度>提取时间。

超声-微波协同萃取槟榔籽油的响应面分析与优化模型的响应面及其等高线见图 5。

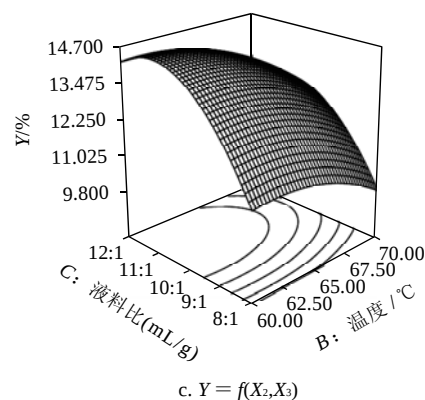
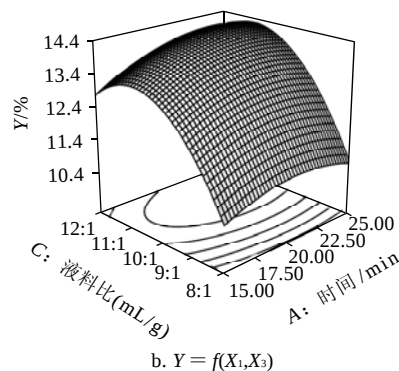
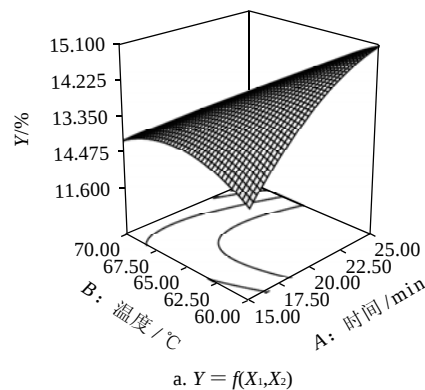


图 5 槟榔籽油提取的响应面图和等高线图

Fig.5 Response surface and contour plots

由图 5a 可看出, 提取温度不变, 槟榔籽油提取率随提取时间的增加而明显增高; 由图 5a、5b 可看出, 槟榔籽油提取率随液料比和提取温度的增加, 呈先明显增大, 后缓慢下降的趋势。

将回归方程用 LINGO 语言进行分析, 得到最佳方案为料液比 10.94:1mL/g、提取时间 22.4min、温度 65℃,

棕榈籽油提取率的理论值为 14.38%。

为验证响应面法的可行性, 选择液料比为 11:1(mL/g)、提取时间 22min、温度 65℃对棕榈籽样品进行提取验证实验。3 次平行实验得到实际平均提取率为 14.29%, 与理论值相差不大。

2.3 棕榈籽油 GC-MS 分析

表 4 棕榈籽油的脂肪酸组成与含量

Table 4 Chemical compositions and contents of fatty acids in betel nut oil

序号	保留时间/min	化学名称	相对含量/%
1	5.12	十二烷酸(月桂酸)	9.51
2	7.67	十四烷酸(豆蔻酸)	33.50
3	10.49	十六烷酸(棕榈酸)	15.82
4	13.25	十八烷酸(硬脂酸)	1.59
5	13.44	十八碳烯酸(油酸)	20.40
6	14.01	十八碳二烯酸(亚油酸)	19.19

由表 4 可看出, 不饱和脂肪酸含量达 39.59%, 与文献[17-18]对照, 无论成分及含量均有明显的差异, 这可能与棕榈品种、成熟度、取样范围、提取方法、提取溶剂等差别有关。

3 结 论

3.1 采用紫外分光光度法测定棕榈籽油含量, 并确定棕榈籽油的石油醚萃取液在 100~600mg/L 范围内在 210nm 处呈良好的线性关系。

3.2 最优提取方案为液料比 1:1mL/g、提取时间 22min、温度 65℃, 棕榈籽油提取率的理论值为 14.38%, 验证值为 14.29%, 误差不大, 棕榈油含量 14%~18%, 可看出提取率较高。

3.3 气相色谱测定棕榈籽油的脂肪酸主要成分为十四烷酸(豆蔻酸)33.50%、十八碳烯酸(油酸)20.40%、十八碳二烯酸(亚油酸)19.19%、十六烷酸(棕榈酸)15.82%、十二烷酸(月桂酸)9.51%、十八烷酸(硬脂酸)1.59%。

3.4 超声-微波协同萃取法能实现在常温常压下的开放式大批量萃取, 安全快速, 但由于超声功率不可调, 萃取效率仍有不尽人意之处, 仪器还有待完善。本实验该方法应用于棕榈油的萃取中, 与传统方法相比, 超

声-微波协同萃取法更加安全高效, 节约了物料和溶剂, 具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] RAMACHANDRAIAH O S, JANGANMOHAN-RAO S, RAMAYYA D A, et al. Processing of arecanut for the recovery of edible fat[J]. Journal of Plantation Crops, 1976, 4(2): 51-53.
- [2] ONTENGCO D C, TALAUE M, CRUZ L J, et al. MICs (Minimum inhibitory concentration) of betel oil against common clinical pathogens [J]. Alta Manilana, 1999, 47(6): 118-121.
- [3] 帅率, 超声-微波协同萃取新方法及其应用研究[D]. 广州: 中山大学, 2005.
- [4] LAGHAL A, CHEMATL S, BARTELS P V, et al. Microwave - ultrasound combined reactor suitable for atmospheric sample preparation procedure of biological and chemical products[J]. Analisis, 1999, 27(5): 452-457.
- [5] CHEN Yiyong, GU Xiaohong, HUANG Shenquan, et al. Optimization of ultrasonic/microwave assisted extraction (UMAE) of polysaccharides from *Inonotus obliquus* and evaluation of its anti-tumor activities[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2010, 46(4): 429-435.
- [6] FROST S P, DEAN J R, EVANS K P, et al. Extraction of hexaconazole from weathered soils: a comparison between soxhlet extraction, microwave assisted extraction, supercritical fluid extraction and accelerated solvent extraction[J]. Analyst, 1997, 122(9): 895-898.
- [7] 黄君礼, 鲍治宇. 紫外吸收光谱法及其应用[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1992: 143-153.
- [8] 全国食品工业标准化技术委员会. GB/T 14772 — 2008 食品中粗脂肪的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [9] 周建勇, 顾跃明. 紫外分光光度法测定工业废水中的油含量[J]. 冶金分析, 2002, 22(3): 51-52.
- [10] 张霖霖, 周勇强, 谢浩东, 等. 紫外分光光度法直接测定废水中微量油的研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2001, 21(5): 716-718.
- [11] 万楚筠, 黄凤洪, 祝俊, 等. 紫外法快速测定废水中微量油的研究[J]. 环境工程, 2007, 25(6): 70-73.
- [12] 廖雷, 钱公望, 何英, 等. 活性炭吸附 - 紫外分光光度法测定油烟挥发组分[J]. 环境监测管理与技术, 2004, 16(2): 23-25.
- [13] 耿薇. 新鲜椰子果肉脂肪酸成分的 GC-MS 分析[J]. 广东化工, 2010, 37(1): 122-123.
- [14] 程谦伟, 孟陆丽, 何仁, 等. 响应面法优化微波辅助提取百香果籽油工艺研究[J]. 粮食与油脂, 2010, 5(5): 20-22.
- [15] 张峰, 仇农学. 响应面法优化超声波辅助提取辣椒籽油及脂肪酸组成分析[J]. 中国油脂, 2008, 33(11): 38-43.
- [16] 张丽, 陈计雷, 宋丽军, 等. 响应面法优化超声波提取核桃油工艺的研究[J]. 农产品加工, 2009, 11(11): 17-20.
- [17] 张海德, 黄玉林, 韩林. 棕榈油的分离及 GC-MS 分析[J]. 食品科学, 2009, 30(22): 298-300.
- [18] 朱莉, 罗士数, 张海德, 等. 棕榈籽油的超临界二氧化碳萃取及其成分分析[J]. 食品科学, 2010, 31(24): 151-154.