β-环糊精包合法纯化紫苏籽油中的α-亚麻酸

徐春明，刘金龙
(北京工商大学食品学院 食品添加剂与配料北京高校工程研究中心，北京市食品风味化学重点实验室，北京 100048)

摘 要：研究利用微射流均质机强化β-环糊精包合紫苏籽油纯化α-亚麻酸工艺，在单因素试验的基础上，选取用料比、处理压力、包合时间3因素进行Box-Behnken试验设计，并利用响应面法对包合工艺进行优化。优化结果表明，在用料比(紫苏油:β-环糊精)1:11(mL/g)、处理压力6000psi、包合时间105min时，β-环糊精包合紫苏籽油的包合率最高达81.64%。利用FT-NIR、扫描电镜对包合物进行物理特性表征，结果证明β-环糊精能够很好的包合紫苏籽油。GC-MS检测表明包合前后的α-亚麻酸的含量由53.50%提高到77.42%，因此表明β-环糊精包合法纯化紫苏籽油中α-亚麻酸工艺可行。

关键词：均质；包合；紫苏籽；α-亚麻酸；响应面

Optimization of β-Cyclodextrin Inclusion Conditions to Concentrate α-Linolenic Acid Content in Perilla frutescens Seed Oil

XU Chun-ming，LIU Jin-long
(School of Food and Chemical Engineering, Beijing Higher Institution Engineering Research Center of Food Additives and Ingredients, Beijing Key Laboratory of Food Flavor Chemistry, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China)

Abstract：The preparation of inclusion complexes of *Perilla frutescens* seed oil with β-cyclodextrin using a microfluidizer to increase the α-linolenic acid content in the oil was studied. Response surface methodology based on a Box-Behnken design was used to optimize *Perilla frutescens* seed oil-to-β-cyclodextrin ratio, pressure and inclusion reaction time. The maximum inclusion rate as high as 81.64% was obtained after 105 min of inclusion reaction between *Perilla frutescens* seed oil and β-cyclodextrin at a ratio of 1:11 (mL/g) at 6000 psi. FT-NIR analysis and SEM observation showed that *Perilla frutescens* seed oil was well included by β-cyclodextrin in the inclusion complex obtained. The α-linolenic acid content increased from 53.50% to 77.42% after β-cyclodextrin inclusion as shown by HPLC analysis. Therefore, β-cyclodextrin inclusion is a feasible way to concentrate the α-linolenic acid content in *Perilla frutescens* seed oil.

Key words：homogenization; inclusion；*Perilla frutescens* seeds；α-linolenic acid；response surface methodology
中图分类号：TS225.6 文献标识码：A 文章编号：1002-6630(2012)24-0132-05

紫苏(*Perilla frutescens*)，是唇形科紫苏属一年生草本植物，主要用于药用、油用、香料、食用等方面，近些年来，紫苏因其特有的活性物质及营养成分，成为一种倍受世界关注的多用途植物，经济价值很高[1]。紫苏种子中含大量油脂，出油率高达45%左右，油中含亚麻酸62.73%、亚油酸15.43%、油酸12.01%[2]。α-亚麻酸是生命核心物质，以甘油酯的形式存在于绿色植物中，是构成人体组织细胞的重要成分。它是维系人体进化，保持身体健康必需的脂肪酸，在体内参与磷脂的合成、代谢、转化为人体必需的生命活性因子DHA与EPA，是生命进化过程中最基本、最原始的物质[3]。由于α-亚麻酸的双键比EPA和DHA少，故紫苏油的氧化稳定性比鱼油强，而且鱼油含胆固醇，紫苏油则没有。如果能将紫苏油中α-亚麻酸的含量从50%提高到75%以上，其医用和保健功能将大大增强，商业价值也随之大大提高。故对紫苏油中的α-亚麻酸的纯化研究具有极大的现实意义[4]。

β-环糊精包合技术是一种微胶囊技术，主要原理是利用物质扩散至β-环糊精的空穴中形成环糊精的包合进行纯化[5-6]。高压均质技术被广泛地用在食品、制药和生物技术其他领域[7-9]。微射流技术，高压均质技术的一种，现在常常用于药学和化妆品领域，也有一些相关在食品和天然产物提取方面的研究，其原理是通过高压均质技术实现更好的混合和传质[10-12]。

高压均质技术在促进包合物的形成方面在国内外的报道很少，本实验在单因素试验的基础上，利用响应面方法优化微射流均质机强化β-环糊精对紫苏籽油的包合工艺，研究了包合前后α-亚麻酸含量的变化，为紫苏籽油的加工和生产提供科学依据。

收稿日期：2011-09-17
作者简介：徐春明(1978—)，男，副教授，博士，研究方向为功能性食品与生物化工。E-mail：xucm@yahoo.cn

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

紫苏籽油 实验室自制；β-环糊精 北京奥博星生物技术公司。

1.2 仪器与设备

傅里叶变换红外光谱仪 美国尼高力公司；GC/MS气质联用仪 日本岛津公司；扫描电子显微镜 捷克Tescan SRO公司；微射流均质机 上海鲤跃精密机械贸易有限公司。

1.3 方法

1.3.1 包合过程

将β-环糊精于烧杯加水溶解，在电动搅拌机搅拌下配制为饱和溶液。接着，滴加紫苏油，继续使用电动搅拌机搅拌，将溶液利用微射流均质机处理，处理后的溶液放入冰箱(3～5℃)中，放置不同时间进行包合。包合完成后将烧杯取出，将溶液转移至圆底烧瓶进行减压蒸发，将所得固体转移至原烧杯，无水乙醇清洗固体1～2次，抽滤得到白色固体，将固体放入干燥箱内，40℃干燥4h，最后所得固体就是β-环糊精包合物。称量包合物质量。

1.3.2 脱包过程

所得包合物加入到烧杯中冰混入一定量得石油醚，40℃超声回流1h，将所得液体转入烧瓶中，减压蒸发完全，最终烧瓶中所剩液体即为纯化后的紫苏籽油，称量所得紫苏籽油质量。

1.3.3 β-环糊精包合工艺优化的试验设计

影响α-亚麻酸β-环糊精包合的因素主要有紫苏油与β-环糊精之比(mL/g)、处理压力、循环次数和包合时间等，故以此进行设计，并以紫苏籽油的包合率为考察指标进行单因素试验，优选最佳包合工艺。根据单因素试验结果进行响应面试验设计。

1.4 包合率的计算

将得到的干燥包含物精密称量，按下式计算紫苏籽油的包合率：

$$包合率/\% = \frac{包合物中紫苏油的质量}{加入紫苏油的质量} \times 100$$

1.5 紫苏籽油成分的GC-MS检测条件

紫苏籽油和α-亚麻酸的的甲酯化：用移液管吸取0.5mL紫苏籽油置于10mL容量瓶中，依次加入1mL乙醚-正己烷混合液(乙醚:正己烷=2:1，*V*/*V*)和1mL氢氧化钾-甲醇溶液(0.8mol/L)，充分振荡，静置5min后加入蒸馏水至刻度，静置分层，吸上清液，加入少量无水硫酸钠干燥过夜，做GC-MS分析[13]。

GC-MS色谱条件：气相色谱条件：色谱柱为HP-5弹性石英毛细管柱(25m×0.20mm，0.33μm)；载气为He气；载气流量1mL/min；总流速52μL/min；进口温度250℃；分流比50:1，进样量1μL；程序升温条件：100℃(10℃/min)—280℃(18min)。质谱条件：离子源为电子电离(electron ionization，EI)源，离子温度230℃；接口温度230℃；四极杆温度150℃；倍增器电压1988V；发射电流34.6μA；扫描范围20～500u；电离电压70eV[14-15]。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 用料比(紫苏油:β-环糊精)不同对包合率的影响

设定处理压力10000psi、包合时间60min、循环次数2次，考察不同用料比下的包合率，结果如图1所示。

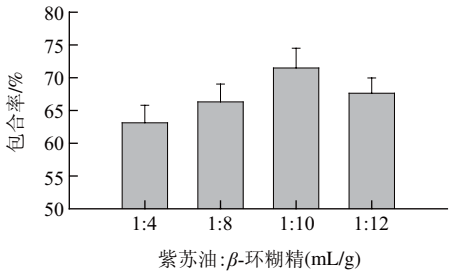


图1 β-环糊精包合用料比对包合率的影响

Fig.1 Effect of *Perilla frutescens* seed oil-to-β-cyclodextrin ratio on inclusion rate

由图1可以看出，用料比对包合率的影响，当用料比为1:4时包合率较低，随着β-环糊精所占比值的增大，包合率先增后减，当用料比为1:10时，包合率为71.49%，达到最大值。

2.1.2 处理压力不同对包合率的影响

设定用料比1:10、包合时间60min、循环次数2次。考察不同处理压力对包合率的影响，结果如图2所示。

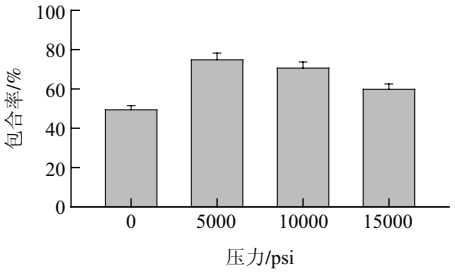


图2 β-环糊精包合处理压力对包合率的影响

Fig.2 Effect of pressure on inclusion rate

由图2可以看出，处理压力显著影响了β-环糊精对紫苏籽油的包合率，当处理压力超过5000psi时，包合率随着压力的增加反而降低，在处理压力为5000psi时，包合率为74.82%。

2.1.3 循环次数不同对包合率的影响

设定用料比为1:10，处理压力为5000psi，包合时间为60min。考察循环处理次数对包合率的影响，结果如图3所示。

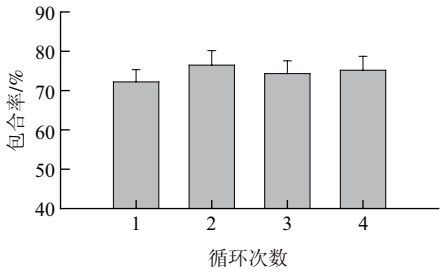


图3 循环处理次数对包合率的影响

Fig.3 Effect of cycle number on inclusion rate

由图3可知，循环处理次数对包合率没有显著性的影响，可能是一次处理就可以使β-环糊精和紫苏籽油充分分散混合。因此接下来的试验将不再将循环处理次数作为主要因素加以考虑。

2.1.4 包合时间对包合率的影响

设定用料比1:10、处理压力5000psi、循环处理次数1次，考察包合时间对包合率的影响，结果如图4所示。

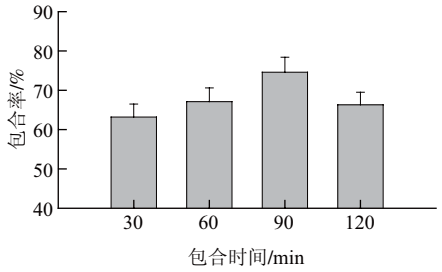


图4 包合时间对包合率的影响

Fig.4 Effect of inclusion time on inclusion rate

从图4可知，包合率随着包合时间延长在升高，当包合时间90min时包合率达最大值为74.6%，包合时间超过90min时，包合率随着时间的延长反而下降。

2.2 响应面试验

2.2.1 响应面试验设计

在单因素试验的基础上，确定出响应面试验的因素水平，具体试验设计见表1。

表1 β-环糊精对紫苏籽油的包合工艺优化响应面设计因素和水平

Table 1 Factors and levels used in response surface analysis

水平	因素		
	X_1用料比(紫苏油:β-环糊精)	X_2处理压力/psi	X_3包合时间/min
−1	1:8	2500	60
0	1:10	5000	90
1	1:12	7500	120

2.2.2 回归模型的建立

根据所设计的试验方案进行响应面试验，试验结果如表2所示。

表2 β-环糊精对紫苏籽油的包合工艺优化响应面试验设计与结果

Table 2 Experimental design and results for response surface analysis

试验号	X_1	X_2	X_3	包合率/%
1	−1	−1	0	65.3
2	1	−1	0	60.8
3	−1	1	0	67.4
4	1	1	0	74.2
5	−1	0	−1	63.2
6	1	0	−1	61.4
7	−1	0	1	59.9
8	1	0	1	80.2
9	0	−1	−1	63.6
10	0	1	−1	68.9
11	0	−1	1	67.3
12	0	1	1	71.3
13	0	0	0	74.6
14	0	0	0	82.8
15	0	0	0	75.8
16	0	0	0	80.1
17	0	0	0	78.4

利用统计分析软件，对表2数据进行二次回归拟合，得到回归方程：

$$Y= 78.34+2.6X_1+3.1X_2+2.7X_3+2.82X_1X_2+5.53X_1X_3-0.33X_2X_3-6.51X_1^2-4.91X_2^2-5.66X_3^2$$

2.2.3 回归模型的检验

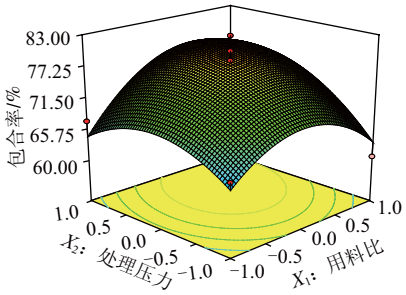
表3 回归模型的方差分析

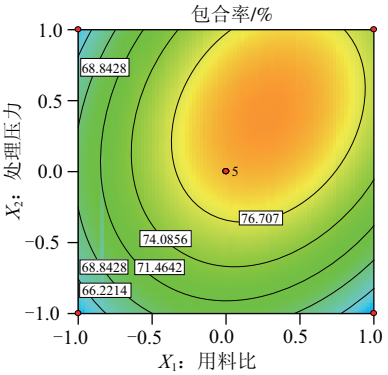
Table 3 Analysis variance for the fitted regressio model

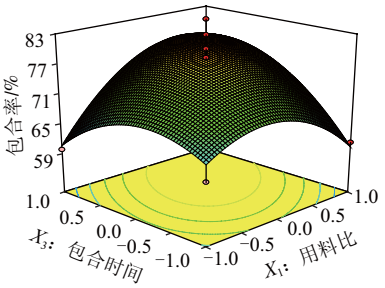
方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	806.06	9	89.56	6.81	0.0096
X_1	54.08	1	54.08	4.11	0.0322
X_2	76.88	1	76.88	5.84	0.0463
X_3	58.32	1	58.32	4.43	0.0433
X_1X_2	31.92	1	31.92	2.43	0.1633
X_1X_3	122.10	1	122.10	9.28	0.0187
X_2X_3	0.42	1	0.42	0.032	0.8628
X_1^2	178.31	1	178.31	13.55	0.0078
X_2^2	101.40	1	101.40	7.71	0.0274
X_3^2	134.77	1	134.77	10.24	0.0151
残差	92.09	7	13.16		
失拟值	48.65	3	16.22	1.49	0.3442
纯误差	43.43	4	10.86		
总差	898.15	16			

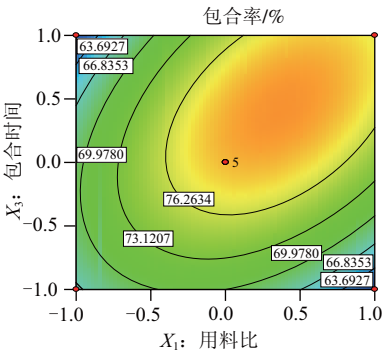
通过方差分析，回归模型极显著，3个因素的一次项、二次项及X_1X_3交互项对结果的影响均达到显著水平，失拟值不显著，模型的R^2=0.8975，R^2_{Adj}=0.8643说明模型与实际试验拟合程度较好，可以用此模型对紫苏油包合试验进行预测。

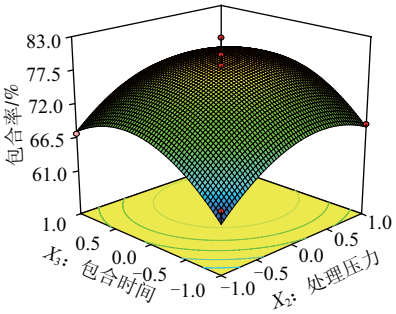
2.2.4 响应面分析

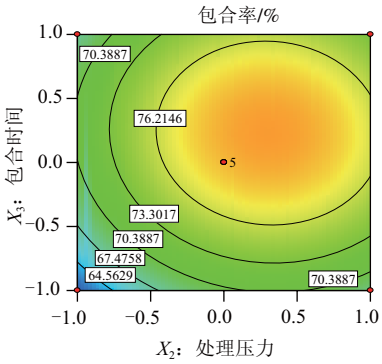












固定水平：用料比1:10；处理压力5000psi；包合时间90min。

图5 各因素交互作用的响应面和等高线图

Fig.5 Response surface and contour plots showing the effects of three reaction conditions on inclusion rate

图5结合表3的显著性检验结果，可以得出用料比和处理压力的交互作用不显著，处理压力和包合时间的交互作用不显著，其等高线图近圆形。而用料比和包合时间的交互作用比较显著，其等高线图呈椭圆形。这说明处理压力对包合率的影响机理可能与用料比和包合时间对包合率的影响机理不同，因而交互作用不明显。反应体系中*β*-环糊精和紫苏籽油的比例不同，达到包合平衡时所需的包合时间必然不同，这或许是用料比和包合时间之间交互作用显著的根本原因所在。

2.2.5 回归模型的验证实验

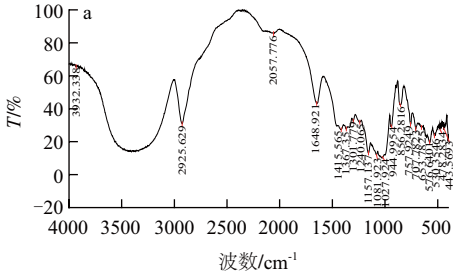
根据回归方程及上述分析，响应面存在最大值，解方程可得紫苏籽油的最佳包合工艺为用料比1:10.98、处理压力6100psi、包合时间104.1min，理论最大包合率82.3%。考虑实际操作，取用料比1:11、处理压力6000psi、包合时间105min，3次重复实验结果平均值为81.64%。基本与预测值相符，因此，本模型可以较好地反映紫苏籽油最佳包合的工艺条件。

2.3 分析检测

2.3.1 红外检测

将所得的*β*-环糊精包合物以及分析纯的*β*-环糊精进行红外检测，检测结果如图6所示。

从图6可以看出包合物在989、1502cm^{-1}和1812cm^{-1}处均有新的吸收峰出现，因与*β*-环糊精的羟基相互作用，因此各官能团的吸收峰均有所偏移，分别是R－CH=CH－R、－CH_2－和－COOH的振动吸收峰，说明包合物中有R—CH=CH－R、－CH_2－和－COOH等官能团存在，因此可以证明利用*β*-环糊精可以成功地包合紫苏籽油。



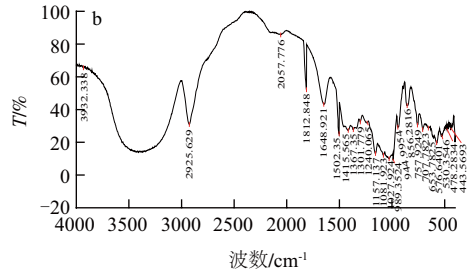


图 6 β-环糊精(a)和包合物(b)的FT-NIR光谱图

Fig.6 FT-NIR spectra of β-cyclodextrin and inclusion complex

2.3.2 电子显微镜观察

在电子显微镜下观察分析纯的β-环糊精和包合物，电镜图片如图7所示。

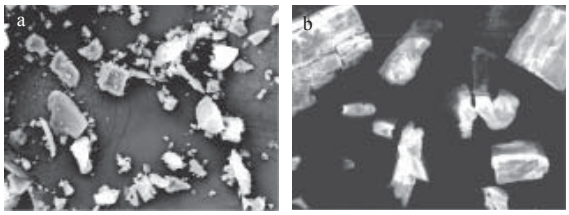


图 7 β-环糊精(a)和包合物(b)的电子显微镜成像图

Fig.7 SEM images of β-cyclodextrin and inclusion complex

图7所示是在放大500倍下β-环糊精(a)和包合物(b)的电子显微镜图，从图7可以清楚地看出β-环糊精包合前后的变化。包合后的固体呈晶体状，结构更有规则，表面平整，颗粒更大，而未包合的β-环糊精颗粒较小，比较散乱，表面粗糙。β-环糊精的结构存在一个非极性空腔，当和紫苏油包合后，亚麻酸的非极性部分进入空腔中，改变了β-环糊精的空间构象，形成的包合物的颗粒变大。

2.3.3 GC-MS检测

表 4 包合前后紫苏籽油成分变化

Table 4 Fatty acid composition of *Perilla frutescens* seed oil and inclusion complex

%

成分	亚油酸	α-亚麻酸	棕榈酸	硬脂酸
包合前	23.70	53.50	18.71	3.46
包合后	13.08	77.42	7.98	1.22

由于亚麻酸的结构式存在3个共轭双键形成一种类似芳香环状结构，β-环糊精的空腔中的羟基容易和芳香环结构形成新的氢键。而亚油酸只存在两个共轭双键不能形成芳香环结构，棕榈酸和硬脂酸是直链脂肪酸，因此这3种脂肪酸都不容易和β-环糊精的空腔中的羟基形成氢键，不能形成稳定的包合物。利用GC-MS技术检测可知紫苏籽油中主要成分为亚油酸、α-亚麻酸、棕榈酸和硬脂酸。包合前后的含量见表4，从表4可以看出，包合前后的亚麻酸的含量由53.50%提高到77.42%，因此可以表明利用β-环糊精包合法可以显著提高紫苏籽油中的亚麻酸的含量，说明β-环糊精包合法纯化紫苏籽油工艺可行。

3 结 论

采用微射流均质机辅助β-环糊精包合技术纯化紫苏籽油中的α-亚麻酸，通过单因素试验和和Box-Behnken试验设计以及响应面分析对提取工艺进行优化，得出较优工艺条件为用料比(紫苏籽油:β-环糊精)1:11、处理压力6000psi、包合时间105min，在较优的包合条件下，紫苏籽油的包合率可达到81.64%。并得到包合率与包合条件各因素变量的二次方程模型，该模型回归极显著，对试验结果拟合良好，可应用于实际预测。

通过对包合物的FT-NIR谱图分析和电镜图片分析，表明包合成功。通过GC-MS检测表明，紫苏籽油可以利用微射流均质机辅助β-环糊精包合技术纯化α-亚麻酸，脱包油中α-亚麻酸的含量由53.50%提高到77.42%。

参考文献：

[1] 赵德义, 徐爱遐, 张博勇, 等. 紫苏籽油的成分与生理功能的研究[J]. 河南科技大学学报: 农学版, 2004, 24(2): 47-50.

[2] 郭新竹, 宁正祥. 保健食用油—紫苏油研究进展[J]. 食品科技, 2001, 26(4): 6-7.

[3] 郝金玉, 黄若华, 邓修, 等. 微波萃取西番莲籽的研究[J]. 华东理工大学学报, 2001, 27(2): 117-119.

[4] 罗志刚, 杨连生. 紫苏油的研究与开发[J]. 粮油食品, 2002(3): 37-39.

[5] DU Yongzhong, XU Jiaguo, WANG Ling, et al. Preparation and characteristics of hydroxypropyl-β-cyclodextrin polymeric nanocapsules loading nimodipine[J]. European Polymer Journal, 2009, 45(5): 1397-1402.

[6] ALEXEI M, YURIY A, ABRAMOV S, et al. Development of machine learning models of β-cyclodextrin and sulfobutylether-β-cyclodextrin complexation free energies[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2011, 418(2): 207-216.

[7] FLOURY J, DESRUMAUX A, LARDIERES J. Effect of high pressure homogenization on droplet size distributions and rheological properties of model oil-in-water emulsions[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2000(1): 127-134.

[8] FLOURY J, DESRUMAUX A, AXELOS M A V, et al. Degradation of methylcellulose during ultra-high pressure homogenization[J]. Food Hydrocolloids, 2002, 16(1): 47-53.

[9] MORARU C I, PANCHAPAKESAN C P, HUANG Q, et al. Nanotechnology: a new frontier in food science[J]. Food Technology, 2003, 57(12): 24-29.

[10] CHENG Q, DAVID J. Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: factors affecting particle size[J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(5): 1000-1008.

[11] MARÍA V, ÁNGELA P, AMPARO C, et al. Effect of homogenization conditions on physicochemical properties of chitosan-based film-forming dispersions and films[J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(5): 1158-1164.

[12] CIRON C, GEE V L, KELLY A L, et al. Comparison of the effects of high-pressure microfluidization and conventional homogenization of milk on particle size, water retention and texture of non-fat and low-fat yoghurts[J]. International Dairy Journal, 2010, 20(5): 314-320.

[13] 郭英, 宋祥福, 杨世杰. 紫苏油对实验性高脂血症形成的影响[J]. 中国公共卫生学报, 1997(1): 44-45.

[14] 韩玉谦, 隋晓, 李娟, 等. 超临界二氧化炭流体萃取紫苏子油的研究[J]. 中国食品添加剂, 1996(4): 1-3.

[15] 宋曙辉, 何洪巨. 运用微波辅助萃取技术提取紫苏籽中油脂的研究[J]. 安徽农学通报, 2006(12): 34-35.