

尿素包合法富集苦瓜籽油中 α -桐酸的工艺优化

帅晓艳^{1,2}, 王惠玲^{1,2}, 张瑞^{1,2}, 杨宁^{1,2}, 吴慕慈^{1,2}, 叶树芯³, 李玉保³, 何静仁^{1,2}

(1. 武汉轻工大学 硒科学与工程现代产业学院, 武汉 430023; 2. 武汉轻工大学 食品科学与工程学院, 武汉 430023; 3. 运鸿集团股份有限公司, 湖北 武穴 435406)

摘要:以超临界 CO₂ 萃取的苦瓜籽油为原料, 经皂化酸解法制得混合脂肪酸, 再采用尿素包合法富集其中的 α -桐酸。在单因素试验的基础上, 采用正交试验对富集工艺条件进行优化。结果表明, α -桐酸的最佳富集工艺条件为: 采用 95% 乙醇作为尿素溶剂, 混合脂肪酸与尿素质量比 1:3, 尿素与 95% 乙醇质量比 1:5, 包合温度 4℃, 包合时间 24 h。在最佳工艺条件下, α -桐酸纯度从苦瓜籽油中的 28.83% 提高至 60.03%, 产物中共轭亚麻酸相对含量达到 71.28%。

关键词: 苦瓜籽油; 共轭亚麻酸; α -桐酸; 尿素包合法; 富集纯化

中图分类号: TS225.6; O658 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2022)04-0072-05

Enrichment of α -eleostearic acid from bitter gourd seed oil by urea adduction fractionation

SHUAI Xiaoyan^{1,2}, WANG Huiling^{1,2}, ZHANG Rui^{1,2}, YANG Ning^{1,2},
WU Muci^{1,2}, YE Shuxin³, LI Yubao³, HE Jingren^{1,2}

(1. Modern Industry School of Selenium Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China; 2. School of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China; 3. Yunhong Group Corporation, Wuxue 435406, Hubei, China)

Abstract: Using bitter gourd seed oil extracted by supercritical CO₂ as raw material, the mixed fatty acid was obtained by saponification and acid hydrolysis, and then the α -eleostearic acid was enriched by urea adduction fractionation. Based on single factor experiment, the enrichment conditions were optimized by orthogonal experiment. The results showed that the optimal process for enriching α -eleostearic acid from bitter gourd seed oil were obtained as follows: with 95% ethanol as urea solvent, mass ratio of mixed fatty acid to urea 1:3, mass ratio of urea to 95% ethanol 1:5, adduction temperature 4℃ and adduction time 24 h. Under these conditions, the purity of α -eleostearic acid increased from 28.83% (in bitter gourd seed oil) to 60.03%, the total relative content of conjugated linolenic acid in the product reached 71.28%.

Key words: bitter gourd seed oil; conjugated linolenic acid; α -eleostearic acid; urea adduction fractionation; enrichment and purification

苦瓜 (*Momordica charantia* L, MC), 是葫芦科

(Cueurbitaceae) 苦瓜属草本植物果实, 作为一种药食同源性瓜果, 在我国已有上千年的栽培食用历史, 其营养价值在所有葫芦科植物中排名第一^[1], 具有抗肿瘤、降低胆固醇等多种生物功效^[2]。苦瓜籽仁中含有多糖、皂苷等生物活性成分, 其蛋白质含量高达 39%~45%^[3]。苦瓜籽仁中含有大量油脂, 占苦瓜籽总质量的 25% 以上^[4]。苦瓜籽油富含共轭亚麻酸 (CLN), 尤其含有大量 α -桐酸 (CLN 的一

收稿日期: 2021-05-17; 修回日期: 2021-11-24

基金项目: 湖北省果蔬精深加工及营养功能食品开发企校联合创新中心 (whpu-2020-kj-304)

作者简介: 帅晓艳 (1996), 女, 硕士研究生, 研究方向为天然产物化学和功能性食品 (E-mail) 2276531233@qq.com。

通信作者: 何静仁, 教授, 硕士生导师 (E-mail) jingren.he@whpu.edu.cn。

种)^[5]。共轭亚麻酸是一组在 C9, 11, 13 位具有双键的十八碳三烯酸的同分异构体, 其天然存在于极少数反刍动物体内和植物种子油中, 且主要以甘油三酯的形式存在。近年来, 许多研究表明共轭亚麻酸具有减肥^[6]、抗癌^[7]、抗糖尿病^[8]和调节肝脂代谢^[9]等多种生理功能。苦瓜籽油作为为数不多的富含 α -桐酸的可食用植物油来源之一, 具有良好的应用开发价值。

当前, 对苦瓜及苦瓜籽中生物活性物质的分离纯化研究多集中于活性多肽、多糖和皂苷等成分, 而对功能性脂肪酸分离方面的研究报道较少。脂肪酸分离纯化方法主要包括蒸馏法、尿素包合法、低温结晶法、高速逆流色谱法、脂肪酶辅助法、超临界 CO₂ 萃取法、分子蒸馏法等^[10]。与其他方法相比, 尿素包合法操作简单, 试验条件温和, 成本低且无污染。本试验以超临界 CO₂ 萃取的苦瓜籽油为原料, 采用皂化酸解法制得混合脂肪酸, 再利用尿素包合法对 α -桐酸进行富集, 分析富集前后的脂肪酸组成及含量, 以期对苦瓜籽油的深度开发和综合利用研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

苦瓜籽油(超临界 CO₂ 萃取所得), 运鸿集团股份有限公司提供; 氢氧化钾、95% 乙醇、石油醚(30~60℃)、盐酸、无水硫酸钠、尿素等, 均为分析纯; 甲醇、正己烷, 均为色谱级, 美国 Fisher 公司; α -桐酸标准溶液(5 mg/mL), 上海甄准生物公司。

PF-101T 集热式恒温磁力搅拌器; R3 旋转蒸发仪, 瑞士 Buchi 公司; YR-PTB 真空泵; AL204 电子分析天平, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; PCR-B-SF-10 超纯水机; 7890A-5975C 气相色谱质谱联用仪, 美国 Agilent 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 苦瓜籽油理化指标测定

相对密度, 参照 GB 5009.2—2016 进行测定; 酸值, 参照 GB 5009.229—2016 进行测定; 碘值, 参照 GB/T 5532—2008 进行测定; 过氧化值, 参照 GB 5009.227—2016 进行测定; 皂化值, 参照 GB/T 5534—2008 进行测定。

1.2.2 苦瓜籽油混合脂肪酸的制备

准确称取 4 g 左右苦瓜籽油于烧瓶中, 加入 0.5 mol/L 氢氧化钾乙醇溶液 20 mL, 于 70℃ 下磁力搅拌回流 1.5 h。冷却至室温, 加入 2 mL 蒸馏水后用石油醚萃取 3 次, 除去溶液中的不皂化物。底层溶

液用 2 mol/L HCl 调节 pH 至 2~3, 用石油醚萃取 3 次后合并有机相, 用无水硫酸钠脱水, 旋转蒸发除去石油醚后得到苦瓜籽油混合脂肪酸。

1.2.3 尿素包合法富集 α -桐酸

参照文献[11-12], 尿素中加入一定量溶剂(95% 甲醇或 95% 乙醇), 于 75℃ 水浴下加热回流并磁力搅拌至尿素溶解完全, 然后加入一定量苦瓜籽油混合脂肪酸, 在 70℃ 水浴下加热回流并磁力搅拌, 直至溶液变为澄清透明后, 室温下冷却, 于一定温度下包合一定时间。包合完成后减压抽滤, 滤液于 40℃ 回收溶剂后加入 2 mL 蒸馏水并用 2 mol/L HCl 调节 pH 为 2~3, 加石油醚萃取 3 次, 合并有机相后用温水洗至溶液呈中性, 加入无水硫酸钠进行脱水, 旋转蒸发回收石油醚, 即得较高含量的 α -桐酸(产物)。产物收率为富集后 α -桐酸质量与混合脂肪酸质量的比值。

1.2.4 脂肪酸组成的测定

参照 GB 5009.168—2016, 采用三氟化硼法对样品进行甲酯化, 然后采用 GC-MS 测定脂肪酸组成。GC 条件: HP-88 色谱柱(100 m × 0.25 mm × 0.20 μ m); 载气为 99.999% 高纯氮气, 恒流模式, 柱流速 1 mL/min; 进样量 1 μ L, 不分流进样; 进样口温度 250℃; 升温程序为 150℃ 保持 0 min, 以 4℃/min 升温至 190℃, 保持 5 min, 再以 2℃/min 升温至 230℃, 保持 10 min。MS 条件: 离子化方式 EI⁺, 电子能量 70 eV, 接口温度 250℃, 离子源温度 200℃。

质谱库为 NIST11.L。采用峰面积归一化法对各脂肪酸进行定量。

1.2.5 α -桐酸纯度的计算

先将 1 mL 5 mg/mL α -桐酸标准品甲酯化。准确吸取 1 mL α -桐酸甲酯(α -桐酸质量浓度 2.5 mg/mL)于 1 mL 容量瓶中, 作为 α -桐酸甲酯标准储备液。精密量取储备液 0.4、0.2、0.1、0.05、0.02 mL 于 1 mL 容量瓶中, 用正己烷定容, 制得系列标准工作溶液, 经 GC-MS 测定后, 以峰面积(X)为横坐标, α -桐酸质量浓度(Y)为纵坐标绘制标准曲线, 得到 α -桐酸的标准曲线方程为 $Y = 1.24 \times 10^{-8} X + 0.1665$ ($R^2 = 0.9953$)。根据标准曲线方程以及样品甲酯化后经 GC-MS 测定获得的 α -桐酸甲酯峰面积, 按下式计算试样的 α -桐酸纯度(Y_0)。

$$Y_0 = \frac{c \times V}{m} \times 10^{-3} \times 100\% \quad (1)$$

式中: c 为代入标准曲线计算所得 α -桐酸质量浓度, mg/mL; V 为甲酯化稀释体积, mL; m 为甲酯化苦瓜籽油质量, g。

1.2.6 数据分析

试验数据采用“平均数 ± 标准差”表示,采用 Origin 9.0 作图。

2 结果与讨论

2.1 苦瓜籽油的理化指标(见表1)

表1 苦瓜籽油主要理化指标

项目	指标
感官	常温下为蜡状白色固体,融化后为黄色透明油状液体
相对密度(20℃/4℃)	0.979 ± 0.002
皂化值(KOH)/(mg/g)	148.524 ± 6.462
酸值(KOH)/(mg/g)	1.684 ± 0.046
过氧化值/(mmol/kg)	8.995 ± 0.666
碘值(I)/(g/100g)	108.324 ± 4.004

由表1可以看出,苦瓜籽油过氧化值相对较高,这与文献[13-14]报道不一致,可能与苦瓜籽油放置时间、苦瓜种类、提取方法有关。另外,苦瓜籽油皂化值较低,可能是因为它含有较多的不皂化物。

2.2 单因素试验

2.2.1 尿素包含溶剂种类对 α -桐酸富集的影响

在混合脂肪酸与尿素质量比1:4、尿素与溶剂质量比1:4、包含温度0℃、包含时间18h条件下,考察溶剂(95%甲醇、95%乙醇)对 α -桐酸富集效果的影响,结果如图1所示。

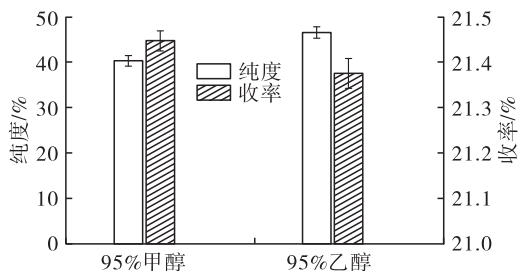


图1 尿素包含溶剂种类对富集效果的影响

由图1可以看出,95%甲醇、95%乙醇作为溶剂时,包含后得到的 α -桐酸纯度和产物收率差别不大,考虑到95%甲醇作溶剂可能会形成甲酯,甲酯具有一定的毒性^[15],影响 α -桐酸后续在保健品等方面的应用。因此,选择95%乙醇作溶剂。

2.2.2 尿素与溶剂质量比对 α -桐酸富集的影响

在95%乙醇作溶剂、混合脂肪酸与尿素质量比1:4、包含温度0℃、包含时间18h条件下,考察尿素与乙醇质量比对 α -桐酸富集效果的影响,结果如图2所示。

由图2可以看出, α -桐酸纯度和产物收率随着乙醇用量的增加均有较大幅度的提高, α -桐酸纯度由29.67%提高到44.21%,产物收率由12.94%提

高到26.92%。这是因为乙醇用量的增加会降低混合脂肪酸的浓度,尿素分子可以与脂肪酸充分接触,单不饱和脂肪酸更容易被尿素包含。此外,受乙醇用量增加的影响,混合脂肪酸的黏度逐渐降低,进一步减少了过滤过程中尿素包含晶体对多不饱和脂肪酸的吸附,从而使得滤液中 α -桐酸的纯度提高。在尿素与乙醇质量比为1:5时,尿素分子的包含能力即将达到极限, α -桐酸纯度和产物收率增加都趋于平缓。因此,选择尿素与乙醇质量比为1:5。

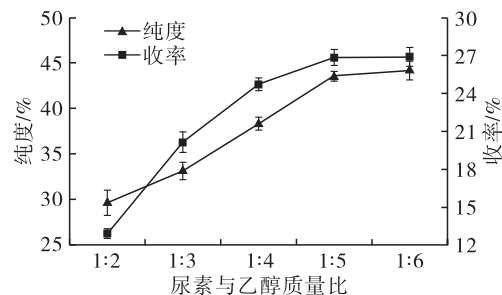


图2 尿素与乙醇质量比对富集效果的影响

2.2.3 混合脂肪酸与尿素质量比对 α -桐酸富集的影响

在95%乙醇作溶剂、尿素与乙醇质量比1:5、包含温度0℃、包含时间18h条件下,考察混合脂肪酸与尿素质量比对 α -桐酸富集效果的影响,结果如图3所示。

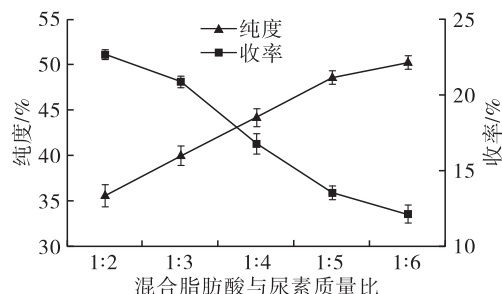


图3 混合脂肪酸与尿素质量比对富集效果的影响

由图3可以看出:随着混合脂肪酸与尿素质量比的增加, α -桐酸的纯度逐渐提高,由35.60%提高到50.20%;而产物收率随混合脂肪酸与尿素质量比的增加从22.66%降低到12.15%。这可能是由于当尿素用量较低时,各脂肪酸之间会相互竞争,尿素无法将单不饱和脂肪酸、饱和脂肪酸完全包含,因此在滤液中残留较多未被包含的单不饱和脂肪酸和饱和脂肪酸,使得 α -桐酸的纯度不高而产物收率较高。但是尿素包含脂肪酸的能力是一定的,尿素用量过多时,剩余的尿素就会与部分多不饱和脂肪酸进行包含,从而导致产物收率降低。此外,多不饱和脂肪酸和尿素分子均具有较强的极性,彼此之间存在相互吸附作用,并能形成氢键,在过滤过程中

部分多不饱和脂肪酸仍能被尿素吸附。因此,选择混合脂肪酸与尿素质量比为1:4。

2.2.4 包合时间对 α -桐酸富集的影响

在95%乙醇作溶剂、尿素与乙醇质量比1:5、混合脂肪酸与尿素质量比1:4、包合温度0℃条件下,考察包合时间对 α -桐酸富集效果的影响,结果如图4所示。

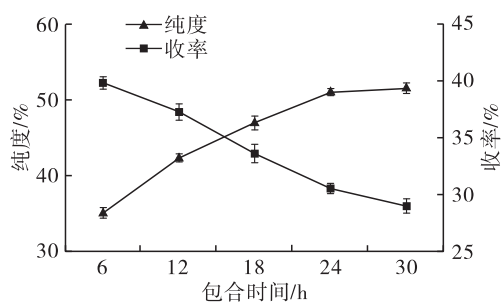


图4 包合时间对富集效果的影响

由图4可以看出,随着包合时间的延长, α -桐酸纯度先增加后趋于平缓,同时产物收率随着包合时间的延长而减少。这可能是由于在较短的包合时间内,尿素晶粒生长受到影响,随着包合时间的延长,尿素与饱和脂肪酸和单不饱和脂肪酸的包合更加充分,从而使得 α -桐酸纯度逐渐提高。然而当尿素的晶粒长到一定程度时,继续包合会导致尿素对多不饱和脂肪酸的包合,从而降低产物收率。因此,选择包合时间为18 h。

2.2.5 包合温度对 α -桐酸富集的影响

在95%乙醇作溶剂、尿素与乙醇质量比1:5、混合脂肪酸与尿素质量比1:4、包合时间18 h条件下,考察包合温度对 α -桐酸富集效果的影响,结果如图5所示。

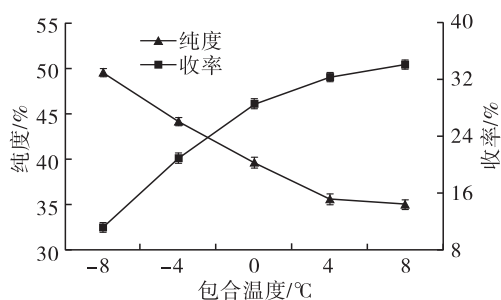


图5 包合温度对富集效果的影响

由图5可以看出:随包合温度的升高, α -桐酸纯度呈下降趋势,这是因为尿素包合过程是一个放热的过程,较低的温度能够促进包合物生成,提高产物纯度^[16];但是在包合温度过低时,尿素与脂肪酸包合速率过快,反应体系在未包合完全的情况下就已经凝结,使得后期过滤困难,导致产物收率偏低,随着包合温度的升高,多不饱和脂肪酸在乙醇中的

溶解度提高,使产物收率升高。然而包合温度升高,脂肪酸与尿素的结合并不稳固,包合物晶体之间分布较为松散,饱和脂肪酸和单不饱和脂肪酸很容易与尿素脱离,从而使 α -桐酸纯度下降。包合温度为0℃时, α -桐酸纯度和产物收率都较高。因此,选择包合温度为0℃。

2.3 正交试验

在单因素试验基础上,固定95%乙醇作为尿素溶剂,尿素与乙醇质量比1:5,以混合脂肪酸与尿素质量比、包合时间、包合温度为因素, α -桐酸纯度为指标,设计三因素三水平的正交试验优化 α -桐酸富集工艺。正交试验因素水平见表2,正交试验设计及结果见表3。

表2 正交试验因素水平

水平	A 混合脂肪酸与尿素质量比	B 包合时间/h	C 包合温度/℃
1	1:3	12	-4
2	1:4	18	0
3	1:5	24	4

表3 正交试验设计及结果

试验号	A	B	C	空列	α -桐酸纯度/%
1	1	1	1	1	51.72
2	1	2	2	2	52.46
3	1	3	3	3	60.03
4	2	1	2	3	37.17
5	2	2	3	1	43.13
6	2	3	1	2	39.38
7	3	1	3	2	41.82
8	3	2	1	3	41.46
9	3	3	2	1	42.65
K_1	164.21	130.71	132.56	137.50	
K_2	119.68	137.05	132.28	133.66	
K_3	125.93	142.06	144.98	138.66	
R	44.53	11.35	12.70	5.00	

由表3可以看出,各因素对 α -桐酸富集的影响主次顺序为A>C>B,即混合脂肪酸与尿素质量比的影响最大,其次是包合温度、包合时间。最佳工艺组合为A₁B₃C₃,即选择95%乙醇为尿素溶剂,尿素与乙醇质量比1:5,混合脂肪酸与尿素质量比1:3,包合温度4℃,包合时间24 h。在最佳条件下, α -桐酸纯度为60.03%,产物收率为33.94%。

2.4 尿素包合前后脂肪酸组成(见表4)

由表4可知:苦瓜籽油中共检出8种脂肪酸,与张飞等^[14]的研究结果相似;饱和脂肪酸有3种,不饱和脂肪酸有5种,其中共轭亚麻酸包括 α -桐酸及其两种顺反异构体CLN-B、CLN-C,与文献

[14,17-18]所测的苦瓜籽油含有高不饱和脂肪酸结果相同。富集前苦瓜籽油中主要的脂肪酸是硬脂酸和 α -桐酸,相对含量分别为37.64%、32.97%,富集后,硬脂酸相对含量减少至16.10%,而 α -桐酸相对含量增加至53.94%,此时 α -桐酸纯度为60.03%,较苦瓜籽油中的28.83%显著提高;共轭亚麻酸相对含量达到71.28%,比富集前增加了19.65个百分点。因此,尿素包合法可用于富集苦瓜籽油中的 α -桐酸。

表4 α -桐酸富集前后脂肪酸组成及相对含量 %

脂肪酸	富集前	富集后
棕榈酸	2.29	1.71
硬脂酸	37.64	16.10
油酸	3.25	4.35
亚油酸	4.59	0.43
花生酸	0.60	6.13
α -桐酸(CLN-A)	32.97	53.94
CLN-B	3.41	3.56
CLN-C	15.25	13.78
共轭亚麻酸(CLN)	51.63	71.28
饱和脂肪酸	40.53	23.94
不饱和脂肪酸	59.47	76.06

3 结论

以超临界CO₂萃取的苦瓜籽油为原料,采用尿素包合法富集苦瓜籽油中的 α -桐酸。通过单因素试验和正交试验,确定最佳富集工艺条件为:以95%乙醇为尿素溶剂,苦瓜籽油混合脂肪酸与尿素质量比1:3,尿素与乙醇质量比1:5,包合温度4℃,包合时间24 h。在最佳条件下, α -桐酸纯度为60.03%,产物收率为33.94%, α -桐酸相对含量为53.94%,共轭亚麻酸相对含量达到71.28%。

参考文献:

[1] KWATRA D, DANDAWATE P, PADHYE S, et al. Bitter melon as a therapy for diabetes, inflammation, and cancer: a panacea? [J]. *Curr Pharmacol Rep*, 2016(2): 34-44.
 [2] MANJAPPA B M, GANGARAJU S, GIRISH K S, et al. *Momordica charantia* seed extract exhibits strong anticoagulant effect by specifically interfering in intrinsic pathway of blood coagulation and dissolves fibrin clot [J]. *Blood Coagul Fibrinol*, 2015, 26(2): 191-199.
 [3] 朱新产,张庭荣,宋玉芹. 苦瓜的营养成分研究 [J]. *广西科学*, 2003, 10(3): 238-240.
 [4] CHAN F K, HSU C, LI T C, et al. Bitter melon seed oil increases mitochondrial content in gastrocnemius muscle and improves running endurance in sedentary C57BL/6J mice [J]. *J Nutr Biochem*, 2018, 58: 150-157.

[5] GÖLÜKÇÜ M, TOKER R, AYAS F, et al. Some physical and chemical properties of bitter melon (*Momordica charantia* L.) seed and fatty acid composition of seed oil [J]. *Derim*, 2014, 31(1): 17-24.
 [6] CHEN P H, CHEN G C, YANG M F, et al. Bitter melon seed oil - attenuated body fat accumulation in diet - induced obese mice is associated with cAMP - dependent protein kinase activation and cell death in white adipose tissue [J]. *J Nutr*, 2012, 142(7): 1197-1204.
 [7] CHANG Y Y, SU H M, CHEN S H, et al. Roles of peroxisome proliferator - activated receptor α in bitter melon seed oil - corrected lipid disorders and conversion of α - eleostearic acid into rumenic acid in C57BL/6J mice [J/OL]. *Nutrients*, 2016, 8(12): 805[2021-05-17]. <https://doi.org/10.3390/nu8120805>.
 [8] SAHA S S, GHOSH M. Antioxidant and anti - inflammatory effect of conjugated linolenic acid isomers against streptozotocin - induced diabetes [J]. *Br J Nutr*, 2012, 108(6): 974-983.
 [9] SUZUKI R, NOGUCHI R, OTA T, et al. Cytotoxic effect of conjugated trienoic fatty acids on mouse tumor and human monocytic leukemia cells [J]. *Lipids*, 2001, 36(5): 477-482.
 [10] 程瑾,李澜鹏,罗中,等. 脂肪酸分离技术研究进展 [J]. *中国油脂*, 2018, 43(11): 49-53.
 [11] 张霞,郝晓丽,何静,等. 尿素包合法富集驼峰油中不饱和脂肪酸的工艺优化 [J]. *中国油脂*, 2020, 45(4): 9-13.
 [12] 李伟,李保国,姜元荣,等. 尿素包合法富集沙棘果油棕榈油酸的工艺优化 [J]. *中国油脂*, 2019, 44(12): 51-54,64.
 [13] 胡小华,魏冰. 新鲜的与放置两个半月的苦瓜籽油的脂肪酸组成对比分析 [J]. *中国油脂*, 2011, 36(8): 81-83.
 [14] 张飞,潘亚萍,杨康. 苦瓜籽油脂肪酸成分的 GC-MS 分析 [J]. *粮食与食品工业*, 2011, 18(3): 19-22.
 [15] 姚静雯. 不饱和脂肪酸的分离纯化 [D]. 杭州:浙江工业大学, 2019.
 [16] MU H, JIN J, XIE D, et al. Combined urea complexation and argentated silica gel column chromatography for concentration and separation of PUFAs from tuna oil: based on improved DPA level [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2016, 93(8): 1157-1167.
 [17] 吴丹,邓泽元,余迎利. 苦瓜籽中脂肪酸成分分析 [J]. *食品科技*, 2006, 31(9): 227-229.
 [18] 刘小如,邓泽元,范亚苇,等. ICP-AES 测定苦瓜籽矿物质元素及 GC-MS 鉴定其油脂脂肪酸 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2010, 30(8): 2265-2268.