

尿素包合法富集压榨松籽油中皮诺敛酸工艺优化

Optimization of the process for the enrichment of pinolenic acid
from pressed pine seed oil by urea inclusion method

刘志鑫 刘志彬 张根生 岳晓霞 杨慧铎 许春明
LIU Zhi-xin LIU Zhi-bin ZHANG Gen-sheng YUE Xiao-xia YANG Hui-duo XU Chun-ming
(哈尔滨商业大学食品工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150076)
(College of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin, Heilongjiang 150076, China)

摘要:以压榨松籽油为原料,研究乙醇浓度、脂肪酸与尿素比、脂肪酸与乙醇比、包合时间、包合温度及包合次数对松籽油中皮诺敛酸的影响。在单因素试验的基础上,以皮诺敛酸含量和损失率的综合分为响应值,根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理,进行优化试验设计,并建立皮诺敛酸的尿素包合回归模型。研究表明:脂肪酸:尿素=1:2.88 (g/g),脂肪酸:乙醇=1:7.98 (g/mL),包合时间 23.44 h,包合温度 4.18 ℃,该条件下对皮诺敛酸进行二次包合,含量可由一次包合的 39.27% 提高到 53.36%,皮诺敛酸损失率为 17.24%,综合分值为 0.954 3,综合评价指标最高。

关键词:皮诺敛酸;松籽油;尿素包合;十八碳三烯酸

Abstract: The effects of different concentration of ethanol, ratio of fatty acid to urea, ratio of fatty acid to ethanol, inclusion time, inclusion temperature and times of inclusion on pinolenic acid in pressed pine seed oil were studied. Based on results from single factor test, the optimal experimental design was carried out according to the principle of Box-Behnken central combination test design. The urea inclusion regression model of pinolenic acid was established using the comprehensive score of pinot acid content and loss rate as the response value. The results showed that the fatty acid : urea = 1 : 2.88 (g/g), fatty acid : ethanol = 1 : 7.98 (g/mL), inclusion time was 23.44 h, and the inclusion temperature was 4.18 ℃. Under this condition, the content was increased from 39.27% to 53.36%, with 17.24% loss of pinolenic acid, and the comprehensive score was 0.954 3, and the comprehensive evaluation index was the highest.

Keywords: pinolenic acid; pine seed oil; urea inclusion; calendic acid

皮诺敛酸是松籽油中独有的一种十八碳三烯酸^[1],分子式为 C₁₈H₃₀O₂^[2],与其他的不饱和脂肪酸不同,它只存在于松籽油中^[3]。近年来,肥胖人群逐渐增多,一般的减脂产品都有抑制神经中枢等副作用^[4],而皮诺敛酸不仅能够降低体重,还能抑制、消除其他不饱和脂肪酸对机体的不利影响,同时还具有抗炎、解热、镇痛,对抗各种真菌、病毒感染,促进中老年人排泄功能等作用^[5]。对升高高密度脂蛋白胆固醇水平、降低低密度脂蛋白胆固醇、甘油三酯和血糖水平的作用更是显著^[6]。中国东北地区松籽资源丰富,但大量的松籽都出口国外^[7],国内市场上也罕见以松籽为原料的保健食品。

国内外研究人员关于不饱和脂肪酸提取的研究方法主要包括尿素包合法^[8]、低温结晶法^[9]、分子蒸馏法^[10]、精馏分离法^[11]、吸附分离法^[12]、脂肪酶浓缩法^[13]、超临界流体萃取法^[14]等。尿素包合法相对于其他方法具有设备简单、操作简便、价格低廉等优点^[15],适合工厂进行大规模的富集生产。现有利用尿素包合法提取不饱和脂肪酸的研究对象也主要集中在植物油类^[16]、鱼油类^[17]和 EPA/DHA 等脂肪酸^[18],而对皮诺敛酸提取的研究则相对较少。为数不多的关于松籽油和皮诺敛酸的研究主要集中在脂肪酸成分分析及其功能性上,对提取条件并未深化研究, Lee 等^[19]在试验中对皮诺敛酸进行一次尿素包合,尿素包合后皮诺敛酸质量分数由 14.1% 提高到 45.1%,将皮诺敛酸的质量分数提高了近 3 倍。杨明非等^[20]利用尿素包合法对脂肪酸进行一次包合后,皮诺敛酸质量分数提高到 45.8%。

压榨松籽油中不饱和脂肪酸含量较高,品质较好,营养成分未被破坏,且酸、碱、重金属、胆固醇等残留较少。本研究拟以压榨松籽油为原料,利用尿素包合法对皮诺敛酸进行多次包合试验,在单因素基础上对其富集条件进行优化,旨在为松籽的开发利用和提高松籽产品的附加值提供试验依据。

基金项目:哈尔滨商业大学研究生创新科研项目(编号:YJSCX2017-463HSD)
作者简介:刘志鑫,女,哈尔滨商业大学在读硕士研究生。
通信作者:张根生(1964—),男,哈尔滨商业大学教授,博士生导师,硕士。E-mail:zhanggsh@163.com
收稿日期:2018-03-07

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

压榨松籽油:黑龙江宏泰松果有限公司;
尿素:分析纯,天津市天力化学试剂有限公司;
正庚烷:色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司;
三氟化硼甲醇溶液:14%,上海源叶生物科技有限公司;
盐酸、甲醇、乙醇、氯仿:分析纯,西陇化工股份有限公司;
皮诺敛酸甲酯标准品:≥98%,Cayman Chemical Com-pany;

氢氧化钾、氢氧化钠、氯化钠、无水硫酸钠:分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

电子分析天平:BS224S型,塞多利斯贸易有限公司;
电热恒温水浴锅:DK-98-1型,天津市泰斯特仪器有限公司;
旋转蒸发仪:R-205型,上海申胜生物技术有限公司;
循环水式多用真空泵:SHB-IV双A型,郑州长城科工贸有限公司;
集热式恒温加热磁力搅拌器:CI-200型,巩义市予华仪器有限公司;
气相色谱仪:GC7900型,上海天美科学仪器有限公司;
高纯氢发生器:SGH-300型,北京东方京华苑科技有限公司;
低噪音空气泵:SGK-2LB型,北京东方京华苑科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 游离脂肪酸的制备 根据文献[21],修改如下:配制200 mL浓度为0.6 mol/L的氢氧化钾乙醇溶液,向溶液中加入30 g松籽油,在80℃条件下加热回流并进行磁力搅拌,45 min后冷却至5℃并在此条件下放置,1 h后将溶液中的不皂化物抽滤除去。旋转蒸发乙醇,加入100 mL蒸馏水,用6 mol/L的盐酸将其pH调至2,旋转蒸发出残留的溶剂,即得到游离脂肪酸。

1.2.2 尿素包含条件 将3 g脂肪酸加入到不同比例的尿素乙醇溶液中,在75℃条件下水浴至尿素完全溶解,冷却后在设定的温度和时间下放置。经抽滤回收乙醇后加入15 mL蒸馏水,盐酸酸化后加10 mL三氯甲烷萃取,得到浓缩的多不饱和脂肪酸。

1.2.3 脂肪酸甲酯的制备 按GB 5009.168—2016《食品安全国家标准 食品中脂肪酸的测定》规定的方法制备。

1.2.4 气相色谱分析条件 色谱条件为:Capillary 30 m×0.25 mm×0.33 μm,程序升温条件:初始温度150℃,保持2 min,以5℃/min升至200℃,保持5 min,以2℃/min升至220℃,保持17 min。FID检测器,检测器和进样口温度250℃,进样量0.4 μL,N₂流速15 cm/s,空气流速450 mL/min,H₂流速40 mL/min,尾吹流量30 mL/min。

1.2.5 皮诺敛酸含量和损失率的测定 皮诺敛酸含量的测

定按GB 5009.168—2016《食品安全国家标准 食品中脂肪酸的测定》规定的方法测定,按面积归一化法进行计算。皮诺敛酸的含量测定后,其损失率按式(1)计算:

$$R=\frac{m_{\text{原}}-m_{\text{包}}}{m_{\text{原}}}\times 100\%,\tag{1}$$

式中:

R ——皮诺敛酸的损失率,%;

$m_{\text{原}}$ ——原料中皮诺敛酸的质量,g;

$m_{\text{包}}$ ——尿素包含后皮诺敛酸的质量,g。

1.2.6 综合评分 运用隶属度综合评分法以皮诺敛酸含量、损失率为指标,对尿素包含工艺进行综合评分^[22],皮诺敛酸含量隶属度按式(2)计算,因为损失率越小越好,所以隶属度按式(3)计算:

$$l_1=\frac{c_i-c_{\min}}{c_{\max}-c_{\min}}\times 100\%,\tag{2}$$

$$l_2=\frac{c_{\max}-c_i}{c_{\max}-c_{\min}}\times 100\%,\tag{3}$$

式中:

l_1 ——皮诺敛酸含量的隶属度;

l_2 ——皮诺敛酸损失率的隶属度;

c_i ——指标值;

$c_{\min}$ ——指标值最小值;

$c_{\max}$ ——指标值最大值。

考虑到以皮诺敛酸含量为主要指标,损失率为次要指标,于是取值分别为0.8,0.2,综合评分按式(4)计算:

$$S=al_1+bl_2,\tag{4}$$

式中:

S ——综合分;

a ——皮诺敛酸含量的权值;

b ——皮诺敛酸损失率的权值。

1.2.7 尿素包合法富集皮诺敛酸的单因素试验设计

(1) 脂肪酸:尿素对皮诺敛酸含量和损失率的影响:按脂肪酸与乙醇比为1:8(g/mL),乙醇浓度95%,结晶温度5℃,结晶时间24 h。改变不同的脂肪酸:尿素比率[1:1,1:2,1:3,1:4,1:5(g/g)]测定皮诺敛酸含量和损失率的变化。

(2) 脂肪酸:乙醇对皮诺敛酸含量和损失率的影响:脂肪酸与尿素比为1:3(g/g),乙醇浓度95%,结晶温度5℃,结晶时间24 h。改变不同的脂肪酸:乙醇比率[1:6,1:7,1:8,1:9,1:10(g/mL)]测定皮诺敛酸含量和损失率的变化。

(3) 结晶温度对皮诺敛酸含量和损失率的影响:脂肪酸与乙醇比为1:8(g/mL),脂肪酸:尿素为1:3(g/g),乙醇浓度95%,结晶时间24 h。改变不同的结晶温度(−25,−15,−5,5,15℃)测定皮诺敛酸含量和损失率的变化。

(4) 结晶时间对皮诺敛酸含量和损失率的影响:脂肪酸与乙醇比为1:8(g/mL),脂肪酸:尿素为1:3(g/g),乙醇浓度95%,结晶温度5℃,改变不同的结晶时间(12,18,24,30,36 h)测定皮诺敛酸含量和损失率的变化。

1.2.8 包合次数对皮诺敛酸含量和损失率的影响 在最优的尿素包合条件下,对皮诺敛酸进行多次包合,通过测定皮诺敛酸含量和损失率的变化,得到最佳包合次数。

1.2.9 尿素包合法工艺参数优化 根据单因素试验结果,采用响应曲面法,考察尿素与脂肪酸比、乙醇与脂肪酸比、包合温度、包合时间 4 个因素对皮诺敛酸含量和损失率的影响。

1.2.10 数据处理方法 每个检测指标重复测定 3 次,采用 SPSS 17.0、Excel 2007、Design-Expert 8.0.6 等统计分析软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果与分析

2.1.1 脂肪酸、尿素比对皮诺敛酸含量和损失率的影响 由图 1 可知:随着尿素量的增加,皮诺敛酸含量呈现先升高后降低的趋势,与郭莹莹等^[16]富集文冠果油中神经酸结果相似。原因是随着尿素的增加,包合结晶物增加,包合效果更加完全,皮诺敛酸含量达到最大;而尿素过量添加,会阻碍包合晶体生长,使其含量呈平缓降低的趋势。随着尿素量的增加,使得晶体在包合其他脂肪酸的同时,对皮诺敛酸的携带和吸附也有所增加,导致皮诺敛酸损失率逐渐增大。因此,由皮诺敛酸含量和损失率综合考虑,脂肪酸:尿素最适宜配比为 1:3 (g/g)。

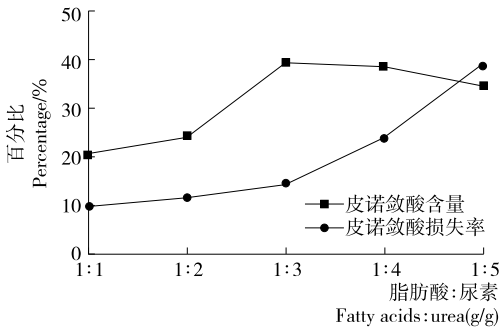


图 1 脂肪酸:尿素对皮诺敛酸含量和损失率的影响
Figure 1 Effect of fatty acids: urea on the content and loss rate of pinolenic acid

2.1.2 脂肪酸、乙醇比对皮诺敛酸含量和损失率的影响 由图 2 可知,随着乙醇量的增加,皮诺敛酸含量呈现先升高后降低的趋势。原因是随着乙醇的增加,尿素溶解量增大,包合向正反应方向进行,包合效果逐渐变好;而过量的乙醇则导致尿素比例减少,部分脂肪酸溶于乙醇中,使皮诺敛酸含量降低。随着乙醇的增加,皮诺敛酸损失率呈波动性变化,张彧等^[21]认为乙醇在包合过程中只起到溶剂的作用,对皮诺敛酸的损失率影响较小。因此,综合皮诺敛酸含量和皮诺敛酸损失率考虑,脂肪酸:乙醇最适宜配比为 1:8 (g/mL)。

2.1.3 结晶温度对皮诺敛酸含量和损失率的影响 由图 3 可知,随着温度的升高,皮诺敛酸的含量呈现先升高后降低的趋势,与闵征桥等^[8]富集鱼油中 EPA 和 DHA 的研究结果相似。原因是在包合温度较低时,形成的包合结晶物较快,晶核来不及长大,形成的晶体较小;当包合温度过高时,形成

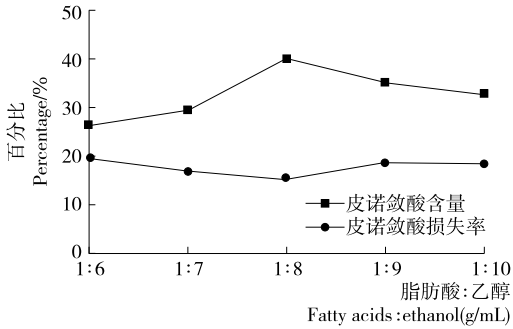


图 2 脂肪酸:乙醇对皮诺敛酸含量和损失率的影响
Figure 2 Effect of fatty acids: ethanol on the content and loss rate of pinolenic acid

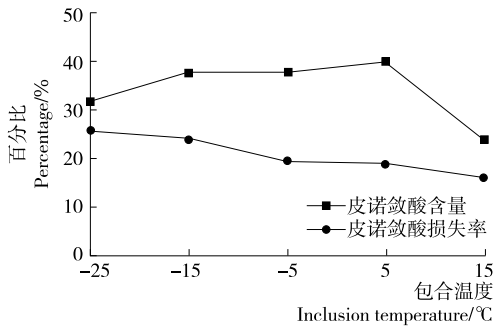


图 3 包合温度对皮诺敛酸含量和损失率的影响
Figure 3 Effect of inclusion temperature on the content and loss rate of pinolenic acid

的晶体较为粗糙,对脂肪酸包合不牢固,从而使其含量降低。随着温度的升高,皮诺敛酸损失率呈逐渐下降趋势,原因是温度越低,形成晶体越快,溶剂和尿包物一起凝固,使抽滤难度增大,皮诺敛酸损失率较高。因此,综合皮诺敛酸含量和皮诺敛酸损失率考虑,尿素包合过程中最佳包合温度为 5 °C。

2.1.4 包合时间对皮诺敛酸含量和损失率的影响 由图 4 可知,随着包合时间的延长,皮诺敛酸含量呈现先升高后缓慢降低的趋势。原因是随着包合时间的延长,形成的包合结晶物缓慢增多,包合效果向正反应方向进行,当包合时间为 24 h 时,反应达到平衡;但随着包合时间继续延长,包合晶体逐渐增多,对皮诺敛酸的携带和吸附也增多,导致了皮诺敛酸含量的降低和损失率的增加^[21]。因此,综合皮诺敛酸含

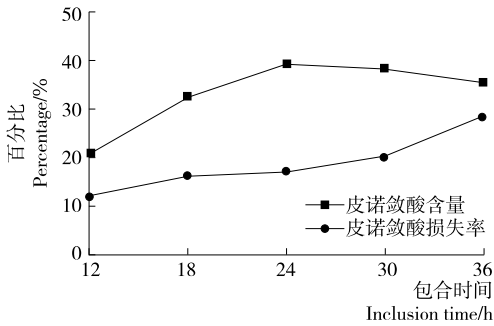


图 4 包合时间对皮诺敛酸含量和损失率的影响
Figure 4 Effect of inclusion time on the content and loss rate of pinolenic acid

量和皮诺敛酸损失率考虑,尿素包合过程中最适宜尿素包合时间为 24 h。

2.1.5 包合次数对皮诺敛酸含量和损失率的影响 由图 5 可知,随着包合次数的增加,皮诺敛酸含量呈现先升高后缓慢降低的趋势,皮诺敛酸损失率则呈现逐渐升高的趋势。当包合 2 次时,尿素晶体将残余的未包合的单不饱和脂肪酸和部分多不饱和脂肪酸进行进一步包合,使得皮诺敛酸含量有了显著的提高;包合 3 次时,残余的未包合的脂肪酸较少,所以皮诺敛酸含量略微有所提高,但皮诺敛酸损失率有明显的增加;包合 4 次时,由于经过多次包合步骤,在其他脂肪酸被包合的同时部分皮诺敛酸也被带走,使皮诺敛酸含量有所下降,损失率有所增加。因此,综合考虑皮诺敛酸含量和损失率,最适宜包合次数为 2 次,该条件下皮诺敛酸含量可提高到 53.26%。

2.2 尿素包合试验响应面结果及分析

根据上述单因素试验结果,确定尿素包合时间、包合温度、脂肪酸与尿素比、乙醇与尿素比的各项参数水平(表 1)。采用 Box-Behnken 设计对尿素包合工艺进行优化,结果见表 2。

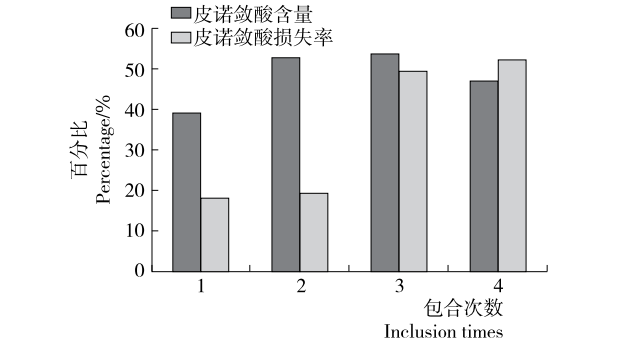


图 5 包合次数对皮诺敛酸含量和损失率的影响
Figure 5 Effect of inclusion times on the content and loss rate of pinolenic acid

表 1 Box-Behnken 试验设计因素水平表				
Table 1 Independent variables and levels of BBD				
水平	A 尿素：脂肪酸 (g/g)	B 乙醇：脂肪酸 (mL/g)	C 包合温 度/℃	D 包合时 间/h
—1	2	7	—5	18
0	3	8	5	24
1	4	9	15	30

表 2 响应面试验设计及结果
Table 2 Response surface experimental design and results

序号	A	B	C	D	Y ₁ 皮诺敛酸 含量/%	Y ₂ 皮诺敛酸 损失率/%	Y ₁ 隶属度	Y ₂ 隶属度	综合分 S
1	—1	1	0	0	47.65	17.50	0.155 2	0.786 3	0.281 4
2	1	1	0	0	49.99	20.53	0.494 5	0.155 3	0.426 6
3	0	0	0	0	53.36	18.53	0.983 1	0.571 1	0.900 7
4	0	0	—1	—1	50.72	18.45	0.600 0	0.589 4	0.597 8
5	0	1	0	—1	49.25	17.70	0.387 2	0.744 7	0.458 7
6	0	0	1	1	48.42	16.77	0.266 1	0.939 6	0.400 8
7	1	0	1	0	48.92	19.50	0.339 3	0.368 9	0.345 2
8	0	0	1	—1	48.18	16.68	0.232 0	0.958 3	0.377 3
9	0	0	—1	1	50.96	18.54	0.634 0	0.570 6	0.621 3
10	0	—1	0	—1	48.65	17.45	0.299 4	0.797 8	0.399 1
11	0	—1	—1	0	50.31	17.64	0.539 8	0.757 6	0.583 3
12	0	1	0	1	49.49	17.79	0.421 2	0.725 9	0.482 2
13	0	1	1	0	48.37	16.75	0.259 6	0.942 2	0.525 4
14	1	0	—1	0	51.46	21.27	0.707 3	0.000 0	0.565 8
15	—1	—1	0	0	47.05	17.25	0.067 4	0.839 5	0.221 8
16	0	1	—1	0	50.91	18.52	0.627 5	0.573 2	0.616 6
17	0	0	0	0	53.15	17.35	0.952 8	0.818 3	0.925 9
18	—1	0	1	0	46.58	16.48	0.000 0	1.000 0	0.200 0
19	—1	0	—1	0	49.12	18.25	0.367 9	0.631 1	0.420 6
20	1	—1	0	0	49.39	20.27	0.406 7	0.208 4	0.367 1
21	0	0	0	0	53.48	17.94	1.000 0	0.695 3	0.939 1
22	0	0	0	0	53.27	17.75	0.969 8	0.733 4	0.922 5
23	—1	0	0	1	47.70	17.51	0.161 7	0.783 7	0.276 0
24	—1	0	0	—1	47.46	17.42	0.127 6	0.802 5	0.262 6
25	0	—1	0	1	48.88	17.54	0.333 5	0.779 1	0.422 6
26	0	—1	1	0	47.77	16.50	0.171 8	0.995 3	0.336 5
27	0	0	0	0	53.36	17.54	0.983 3	0.777 3	0.942 1
28	1	0	0	—1	49.80	20.45	0.466 9	0.171 4	0.407 8
29	—1	0	0	1	49.76	17.84	0.461 4	0.714 8	0.512 0

2.2.1 综合分的回归方程及方差分析 利用 Design-Expert 8.06 分析软件对表 2 数据进行分析得到二元多项式回归方程:

$$S = 0.93 + 0.08A + 0.038B - 0.1C + 0.018D - 2.5 \times 10^{-5}AB + 0.023AD + 0.039BC - 0.35A^2 - 0.24B^2 - 0.19C^2 - 0.23D^2.$$
 (5)

通过方差分析(P>0.05),在剔除了不显著因素 AB 和 AD 后,得到新的回归方程:

$$S = 0.93 + 0.08A + 0.038B - 0.1C + 0.018D + 0.039BC - 0.35A^2 - 0.24B^2 - 0.19C^2 - 0.23D^2.$$
 (6)

由表 3 可知:二次回归模型的方差分析表明该模型达到极显著水平(P<0.000 1),失拟项 P=0.109 8>0.05,说明模型预测值与实际误差值较小,模型的拟合程度良好,未知因素对试验结果干扰很小^[22]。3 个因素的 P 值<0.01,1 个因素的 P 值<0.05,表明尿素与脂肪酸的配比、乙醇与脂肪酸的配比、包合温度、包合时间均是影响综合分的重要因素。决定系数 R²为 0.96、校正系数 R²_{adj}为 0.98、变异系数 C.V.为 5.54%,表明多项式模型的精密度和利用性是可行的,利用

此模型方程能预测包合条件在任何变量值下的综合分。

2.2.2 响应面结果分析 由图 6(a)可知,曲面较为陡峭,说明包合温度和乙醇与脂肪酸比对综合分的影响较大。由图 6(b)可知,等高线为椭圆形,说明包合温度和乙醇与脂肪酸比交互作用较为显著。

2.2.3 验证实验结果与分析 利用 Design-Expert 8.0.6 软件,通过设定综合分取最大值,对包合工艺进行优化,得到脂肪酸:尿素为 1:2.88(g/g),脂肪酸:乙醇为 1:7.98(g/mL),包合时间 23.44 h,包合温度 4.18℃,在此条件下皮诺敛酸含量为 53.21%,皮诺敛酸损失率为 17.49%,综合分值为 0.900 6。为进一步验证回归方程的准确性和有效性,考虑到实际操作的方便,设置参数[脂肪酸:尿素=1:3(g/g),脂肪酸:乙醇=1:8(g/mL),包合时间 24 h,包合温度 4℃]进行验证实验,得到皮诺敛酸含量为 53.36%,皮诺敛酸损失率为 17.24%,综合分值为 0.954 3,可见回归模型能很好地预测综合分,优化结果可靠。图 7(a)为松籽油气相检测图谱,图 7(b)为最佳包合条件下脂肪酸气相检测图谱,皮诺敛酸出峰时间为 22.537 min,证明了尿素对其他

表 3 回归方程系数及显著性检验结果[†]

Table 3 Analysis results of significance test of the regression coefficients						
方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	1.40	14	0.10	126.19	< 0.000 1	* *
A	0.08	1	0.08	97.41	< 0.000 1	* *
B	0.02	1	0.02	22.32	0.000 3	* *
C	0.12	1	0.12	156.68	< 0.000 1	* *
D	3.73×10 ⁻³	1	3.73×10 ⁻³	4.71	0.047 6	*
BC	6.05×10 ⁻³	1	6.05×10 ⁻³	7.64	0.015 2	*
A ²	0.79	1	0.79	994.03	< 0.000 1	* *
B ²	0.39	1	0.39	487.90	< 0.000 1	* *
C ²	0.22	1	0.22	281.54	< 0.000 1	* *
D ²	0.35	1	0.35	440.67	< 0.000 1	* *
残差	0.01	14	7.92×10 ⁻⁴			
失拟项	0.01	10	1.00×10 ⁻³	3.69	0.109 8	不显著
误差	1.08×10 ⁻³	4	2.71×10 ⁻⁴			
总和	1.41	28				

[†] * * 代表差异极显著; * 代表差异显著;R²为 0.96;R²_{adj}为 0.98;C.V.为 5.54%。

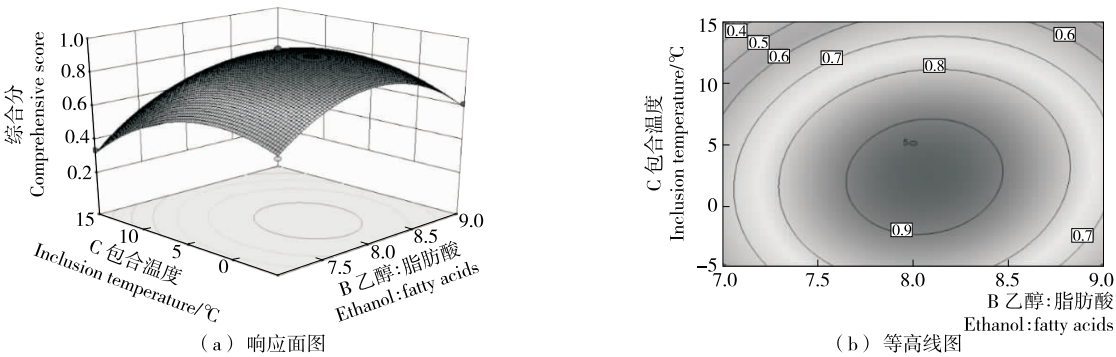


图 6 包合温度和乙醇与脂肪酸比对包合对工艺综合评分 S 的影响

Figure 6 Influence of inclusion temperature and ratio of ethanol to fatty acid on process comprehensive score (S)

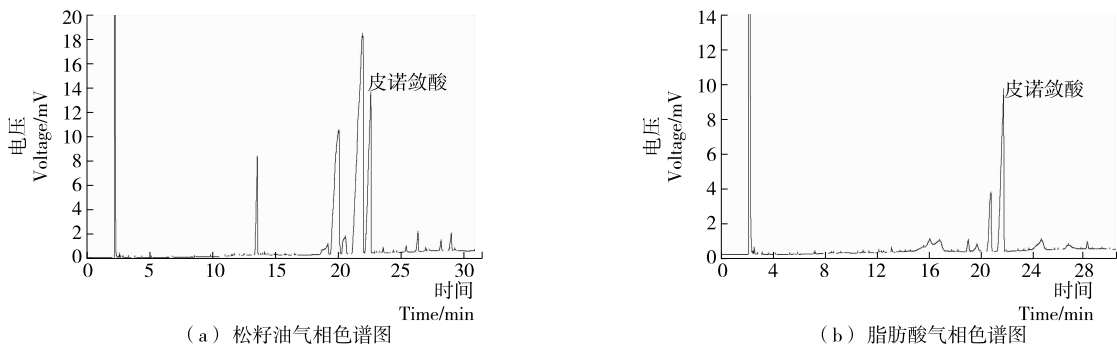


图 7 气相检测图谱
Figure 7 Gas chromatograph

脂肪酸的包合作用。

3 结论

本试验在脂肪酸：尿素 = 1：2.88 (g/g)，脂肪酸：乙醇 = 1：7.98 (g/mL)，包合时间 23.44 h，包合温度 4.18 ℃ 的最优工艺条件下，将皮诺敛酸含量由一次包合的 39.27% 提高到了 53.36%，证明多次包合对包合效果具有显著作用。通过响应面组合设计得出综合分的二次多项式回归模型，经过验证实验证明了模型的合理可靠性。尿素包合法是利用脂肪酸不饱和程度对其进行富集，可将尿素包合法与其他方法相结合，进一步提高皮诺敛酸含量。

参考文献

[1] 董越, 刘会平, 刘易坤, 等. 松子油提取工艺及 3 种松子油脂肪酸组成分析[J]. 中国油脂, 2017, 42(4): 8-11.

[2] GAËLLE Asset, BART Staels, ROBERT L Wolff, et al. Effects of Pinus pinaster and Pinus koraiensis seed oil supplementation on lipoprotein metabolism in the rat[J]. Lipids, 1999, 34(1): 39-44.

[3] CHEN Szu-jung, HSU Chih-ping, LI Chi-wei, et al. Pinolenic acid inhibits human breast cancer MDA-MB-231 cell metastasis in vitro[J]. Food Chemistry, 2011, 126(4): 1 708-1 715.

[4] 李苗. 减肥药物的分类浅析[J]. 世界最新医学信息文摘, 2012 (11): 182-183.

[5] 孙宇, 张泽生, 崔翠翠. 皮诺敛酸抑制小鼠营养性肥胖作用研究[J]. 营养学报, 2009, 31(4): 405-406.

[6] CHRISTIANSEN E, WATTERSON K R, STOCKER C J, et al. Activity of dietary fatty acids on FFA1 and FFA4 and characterisation of pinolenic acid as a dual FFA1/FFA4 agonist with potential effect against metabolic diseases [J]. The British Journal of Nutrition, 2015, 113(11): 1 677-1 688.

[7] DESTAILLATS F, CRUZ-HERNANDEZ C, GIUFFRIDA F, et al. Identification of the botanical origin of pine nuts found in food products by gas-liquid chromatography analysis of fatty acid profile[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(4): 2 082-2 087.

[8] 闵延桥, 高盼, 何东平, 等. 尿素包合法富集鱼油中 EPA 和 DHA 的工艺研究[J]. 粮油食品科技, 2013, 21(6): 25-27.

[9] 衣丹, 林学政, 刘发义, 等. 共轭亚油酸两种主要异构体冷冻结晶分离工艺研究[J]. 食品与机械, 2011, 27(1): 26-28.

[10] 宋旺弟, 刘盼盼, 陈文. 分子蒸馏纯化薰衣草精油主要成分的 HS-SPME-GC 分析[J]. 食品工业科技, 2018, 39(2): 196-201, 206.

[11] 齐金龙. C₁₈ 脂肪酸甲酯的高真空间歇精馏初步研究[D]. 天津: 天津大学, 2016: 18-20.

[12] 王淑云, 陈仲祥. 饱和-不饱和脂肪酸 π 络合分离技术研究[J]. 河北化工, 2008(5): 16-17.

[13] 邵平, 姜绍通, 李岩. 分子蒸馏耦合脂肪酶催化浓缩菜籽油脱臭馏出物中维生素 E 研究[J]. 中国农业科学, 2006(12): 2 570-2 576.

[14] 刘阳阳. 基于在超临界 CO₂ 溶解度的牡丹籽油提取工艺优化与贮藏过程中的抗氧化指标动态[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2016: 13-18.

[15] 樊莉, 张亚刚, 马莉, 等. 尿素包合法及其在多价不饱和脂肪酸分离纯化中的应用[J]. 兵团教育学院学报, 2002(3): 35-38.

[16] 郭莹莹, 刘玉兰, 梁绍全, 等. 尿素包合法富集文冠果油中神经酸的研究[J]. 中国油脂, 2018(7): 119-123.

[17] 单幸福, 李江, 郑晓林, 等. 尿素包合法富集鱼油乙酯中的 EPA 和 DHA[J]. 化学与生物工程, 2016, 33(6): 59-62.

[18] 林文, 田龙, 王志祥, 等. 尿素包合法联合分子蒸馏技术提纯乙酯化鱼油中 EPA 及 DHA 的工艺研究[J]. 中国粮油学报, 2012, 27(12): 84-88, 92.

[19] LEE Ah-ron, HAN Sung-nim. Pinolenic acid downregulates lipid anabolic pathway in HepG2 cells[J]. Lipids, 2016, 51(7): 847-855.

[20] 杨明非, 苏雯, 王海英. 尿素包合法富集红松子油脂肪酸成分分析[J]. 东北林业大学学报, 2017, 45(11): 111-113.

[21] 张彧, 李清光, 万惠萍, 等. 尿素包合法富集松油酸的研究[J]. 食品与机械, 2008, 24(4): 53-56.

[22] 景永帅, 吴兰芳, 王乾, 等. 远志多糖提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2016, 32(5): 152-156, 193.