

沙棘果油索氏提取及体外抗氧化活性研究

赵统超, 张宇, 王丽红, 王宇亮, 李兰兰, 赵宏* (佳木斯大学药学院, 黑龙江佳木斯 154007)

摘要 [目的]采用响应面分析法优化沙棘果油的索氏提取工艺,并测定其抗氧化活性。[方法]在单因素试验的基础上,利用响应面分析法考察料液比、提取时间、离心转速对索氏提取沙棘果油得油率的影响;通过测定 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 以及DPPH \cdot 的清除能力,探讨沙棘果油的抗氧化能力。[结果]最优提取工艺条件:料液比1:8,提取时间3.5 h,离心转速9 350 r/min,得油率为21.9%;沙棘油对 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、DPPH \cdot 自由基均有较好的清除作用,且清除率与浓度呈一定量效关系。[结论]通过响应面法优选的沙棘果油索氏提取工艺提取率高,简单可行,易于工业化大生产;沙棘果油具有较强的抗氧化作用。

关键词 沙棘果油;索氏提取;响应面法;抗氧化

中图分类号 S-3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)22-0145-04

Study on Soxhlet Extraction Technology and Antioxidant Activity of Seabuckthorn Fruit Oil

ZHAO Tong-chao, ZHANG Yu, WANG Li-hong et al (Pharmacy College of Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154007)

Abstract [Objective] Response surface analysis methodology (RSM) was used for optimizing the Soxhlet extraction technology of seabuckthorn fruit oil and determining the antioxidant activity. [Method] On the basis of single factor experiments, response surface methodology (RSM) was used to investigate the effects of solid-liquid ratio, extraction time and rotational speed on the yield of seabuckthorn fruit oil obtained by Soxhlet extraction. The antioxidant capacity of seabuckthorn fruit oil was evaluated by measuring the scavenging capacity of $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ and DPPH \cdot . [Result] The optimum conditions were solid-liquid ratio 1:8, extraction time 3.5 h, rotational speed 9350 r/min and extraction yield 21.9%. The seabuckthorn fruit oil had a good scavenging effect on $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ and $\cdot\text{DPPH}$, and existed concentration-effect relationships in some extent. [Conclusion] This optimum Soxhlet extraction process of seabuckthorn fruit oil is simple and feasible with high extraction rate, and it is suitable for industrial production. The seabuckthorn fruit oil showed strong antioxidant activities.

Key words Seabuckthorn fruit oil; Soxhlet extraction; Response surface methodology; Antioxidation

沙棘(*Hippophae* L.)为胡颓子科沙棘属植物,沙棘果富含丰富的维生素及黄酮、三萜、甾体、酚类化合物、脂肪酸等生物活性成分^[1],具有抗心肌缺氧、增强免疫力、抗肿瘤、保肝、抗炎、抗辐射等作用^[2]。近几年,对沙棘果的化学成分、活性进行初筛,发现沙棘果油含量丰富,具有显著的收敛、抗氧化和免疫调节等活性。目前沙棘果油的提取方法多见超临界流体萃取法、水代法和酶法等^[3-4],但这些方法均存在出油效率低的缺点,未将这一重要活性物质充分提取和利用。采用响应面分析法优化沙棘果油索氏提取工艺^[5-6],并对其抗氧化活性进行研究,旨在寻找适合沙棘果油提取的最优方法及工艺,为深入开展其结构特征、活性机理、临床应用的研究奠定基础。

1 材料与方

1.1 试验材料 沙棘鲜果由哈尔滨裕嘉源农业有限公司提供,经佳木斯大学药学院张宇教授鉴定;DPPH(美国Sigma公司);邻苯三酚(中国医药集团上海化学试剂公司);石油醚(60~90℃)、无水乙醇、水杨酸、 V_C 、过氧化氢、硫酸亚铁、乙酸乙酯均购于天津市科密欧化学试剂有限公司(AR)。

FW177 粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司);RE-52A 系列旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);765 型紫外可见分光光度计(上海仪电分析仪器有限公司);TGL-16M 台式高速冷冻离心机(长沙平凡仪器仪表有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 单因素试验

1.2.1.1 料液比。将沙棘果清洗除杂后在65℃烘制8h取出,冷却,粉碎过筛得沙棘果干粉。取10.00g沙棘果干粉各5份,用石油醚(60~90℃)按照料液比为1:4、1:6、1:8、1:10、1:12 g/mL,水浴温度80℃,索氏提取3h,经抽滤、减压蒸馏、9 000 r/min 离心得沙棘果油。按下式计算得油率:

$$\text{得油率} = M_1 / M_2 \times 100\%$$

式中, M_1 为沙棘果油的质量(g); M_2 为沙棘果干粉质量(g)。

1.2.1.2 提取时间。取10.00g沙棘果干粉各5份,用石油醚(60~90℃)按照料液比为1:10,水浴温度80℃,分别索氏提取1、2、3、4、5 h,经抽滤、减压蒸馏、9 000 r/min 离心得沙棘果油,计算得油率。

1.2.1.3 离心转速。取10.00g沙棘果干粉各5份,用石油醚(60~90℃)按照料液比为1:10 g/mL,水浴温度80℃,索氏提取3 h,经抽滤、减压蒸馏,分别按照离心转速3 000、5 000、7 000、9 000、11 000 r/min 离心得沙棘果油,计算得油率。

1.2.2 响应面试验。在单因素试验基础上,以A(料液比)、B(提取时间)、C(离心转速)为因素,利用Design-Expert.V 8.0.6软件,以得油率为响应值,进行三因素三水平响应面分析试验,试验因素与水平设计见表1。

表1 响应面试验因素与水平

Table 1 Factors and levels of RSM

水平 Level	因素 Factor		
	A//g/mL	B//h	C//r/min
-1	1:8	2	7 000
0	1:10	3	9 000
1	1:12	4	11 000

基金项目 中国博士后科学基金面上资助项目(2015M571454);黑龙江省博士后科研基金项目(LBH-Z14204);黑龙江省教育厅青年创新人才项目(UNPYSCT-2016095);佳木斯大学青年创新人才培养计划(22Zq201501)。

作者简介 赵统超(1993—),男,黑龙江朗乡人,硕士研究生,研究方向:沙棘油提取精炼与药理研究。*通讯作者,副教授,博士,硕士生导师,从事天然产物的结构与活性研究。

收稿日期 2018-02-27

1.2.3 沙棘果油的体外抗氧化试验。用乙酸乙酯将沙棘果油配制成 2、4、6、8、10 g/L 的溶液, DPPH 配制成浓度为 0.2 mmol/L DPPH 标准品溶液, 分别取样品 3 mL 于试管并加入 2 mL DPPH 标准溶液, 摇匀, 避光, 静置 30 min, 于 517 nm 波长处测定吸光度 A_i 。按上述方法以 V_c 为阳性对照, 均做 3 次平行试验, 根据下式计算清除率:

$$\text{清除率} = [1 - (A_i - A_j) / A_c] \times 100\%$$

式中, A_j 为乙酸乙酯代替 DPPH 溶液测得的吸光度; A_c 为无水乙醇代替样品溶液测得的吸光度。

将沙棘果油用无水乙醇分别稀释成质量浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 g/L 的沙棘果油溶液, 分别向试管中移取 1 mL, 依次加入 6 mmol/L FeSO_4 溶液 1 mL、6 mmol/L 水杨酸乙醇溶液 1 mL, 最后加入 8 mmol/L H_2O_2 溶液 1 mL 以启动反应, 静置 30 min 后终止反应, 于波长 510 nm 处测定吸光度 A_i 。按上述方法以 V_c 为阳性对照, 做 3 次平行试验, 根据下式计算清除率:

$$\text{清除率} = [1 - (A_i - A_j) / A_c] \times 100\%$$

式中, A_j 为无水乙醇代替 H_2O_2 溶液测得的吸光度; A_c 为蒸馏水代替样品溶液所测得的吸光度。

将沙棘果油用无水乙醇分别稀释成质量浓度为 0.02、0.04、0.06、0.08、0.10 g/L 的沙棘果油溶液, 分别向试管中移

取 1 mL, 加入 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH = 8.2) 4.5 mL 和 3 mmol/L 的邻苯三酚溶液 0.1 mL, 于 25 °C 恒温水浴反应 5 min 后加入 1 mL 8 mmol/L HCl 溶液终止反应, 于波长 299 nm 处测定样品溶液的吸光度 A_i 。按上述方法以 V_c 为阳性对照, 均做 3 次平行试验, 根据下式计算清除率:

$$\text{清除率} = [1 - (A_i - A_j) / A_c] \times 100\%$$

式中, A_j 为无水乙醇代替邻苯三酚溶液测得的吸光度; A_c 为蒸馏水代替样品溶液测得的吸光度。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 料液比。得油率随料液比增大呈逐渐增加的趋势, 说明溶剂用量越大颗粒内外浓度差越大, 当浓度差趋于平衡时得油率则趋于相对稳定。当料液比为 1:10 g/mL 时, 最大得油率为 21.96%, 结果见图 1A。

2.1.2 提取时间。得油率随提取时间延长呈现逐渐增加的趋势。说明颗粒与溶剂接触的时间越长, 油脂越容易渗出, 当溶解度接近饱和时得油率不再有明显变化。当提取时间为 3 h 时, 最大得油率为 20.68% (图 1B)。

2.1.3 离心转速。得油率随离心转速的增加而增大, 说明增大离心转速有助于不溶性物质的析出。当离心转速为 11 000 r/min 时, 最大得油率为 21.59% (图 1C)。

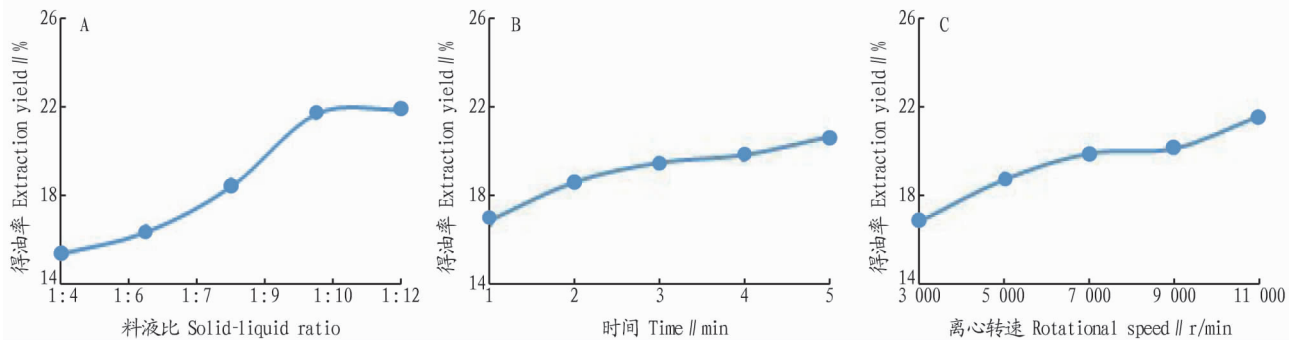


图 1 各单因素对得油率的影响

Fig.1 Effects of various factors on extraction yield

2.2 响应面试验

2.2.1 响应面试验设计及结果。试验结果见表 2。

2.2.2 模型评价。利用 Design-Expert 进行二次多项式回归拟合, 得到的数学模型为:

$$Y = 22.08 + 2.15A + 1.39B + 0.66C - 0.47AB - 0.50AC - 0.35BC - 4.88A^2 - 1.60B^2 - 1.22C^2$$

响应面的方差分析和显著性检验结果见表 3。可以看出此模型的 P 值为 0.000 1 < 0.01, 失拟项 P 值为 0.214 4 > 0.05, 说明二次模型很显著。回归系数 R^2 为 0.973 3, 变异系数为 4.60%, 说明拟合程度良好, 该模型无失拟因素存在, 可用此模型代替试验分析结果。由方差分析可知, 各个因素对得油率影响大小的顺序为 $A > C > B$, 其中对得油率影响最显著的是料液比, 这与前期单因素试验得到的结果相符合。

2.2.3 响应面分析。由图 2 可知, AB、AC 响应面曲线较陡, 等高线密集, 其交互作用较显著, 其他条件都固定时, 当料液比发生变化时得油率变化幅度最大, 因此判断料液比对得油

表 2 沙棘果油提取工艺 Box-Behnken 试验结果

Table 2 Box-Behnken experimental result of extraction process of seabuckthorn fruit oil

编号 No.	A	B	C	得油率 Extraction yield / %
1	0	0	0	22.20
2	0	1	1	20.70
3	-1	0	1	12.19
4	0	0	0	21.45
5	1	1	0	18.45
6	-1	0	1	14.38
7	0	-1	-1	17.11
8	0	-1	1	19.26
9	-1	-1	0	11.82
10	-1	1	0	16.17
11	1	0	1	18.78
12	1	-1	0	15.97
13	0	0	0	22.29
14	1	0	-1	18.57
15	0	0	0	23.04
16	0	1	-1	19.95
17	0	0	0	21.41

率的影响最显著。通过最优化分析得最佳的提取条件:料液比为 1:8.39,提取时间为 3.39 h,离心转速为 9 354.21 r/min,此时理论最大得油率为 22.61%。

2.2.4 验证试验。根据响应面所得索氏提取最佳工艺条件,考虑操作的可行性,将提取条件修正为料液比 1:8,提取时间 3.5 h,离心转速为 9 350 r/min,在此条件下平行进行 3 次验证试验,得油率的平均值为 21.9%, RSD 值为 1.2%,与理论预测值的相对偏差为 3.1%,说明优选的提取工艺稳定可靠,

重复性良好。

2.3 沙棘果油的体外抗氧化试验

2.3.1 对 DPPH· 的清除作用。沙棘果油清除 DPPH· 试验结果见表 4,其对 DPPH· 具有较强的清除作用,在 2~10 g/L 内几乎呈线性增加,沙棘果油浓度越大,清除效果越好,呈一定浓度依赖性,当样品浓度为 10 g/L 时,最高清除率达 80.30%(表 4)。

表 3 响应面模型的方差分析

Table 3 Variance analysis of response surface model

方差来源 Variance source	平方和 Square sum	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 Fvalue	P 值 P value
模型 Model	183.55	9	20.39	28.35	0.000 1
A	37.02	1	37.02	51.47	0.000 2
B	15.43	1	15.43	21.45	0.002 4
C	3.51	1	3.51	4.88	0.062 9
AB	0.87	1	0.87	1.22	0.306 7
AC	0.98	1	0.98	1.36	0.281 3
BC	0.49	1	0.49	0.68	0.436 4
A ²	100.08	1	100.08	139.13	<0.000 1
B ²	10.78	1	10.78	14.99	0.006 1
C ²	6.30	1	6.30	8.75	0.021 2
残差 Residual	5.04	7	0.72		
失拟项 Lack of fit	3.21	3	1.07	3.24	0.214 4
纯误差 Pure error	1.83	4	0.46		
总和 Sum	188.58	16			

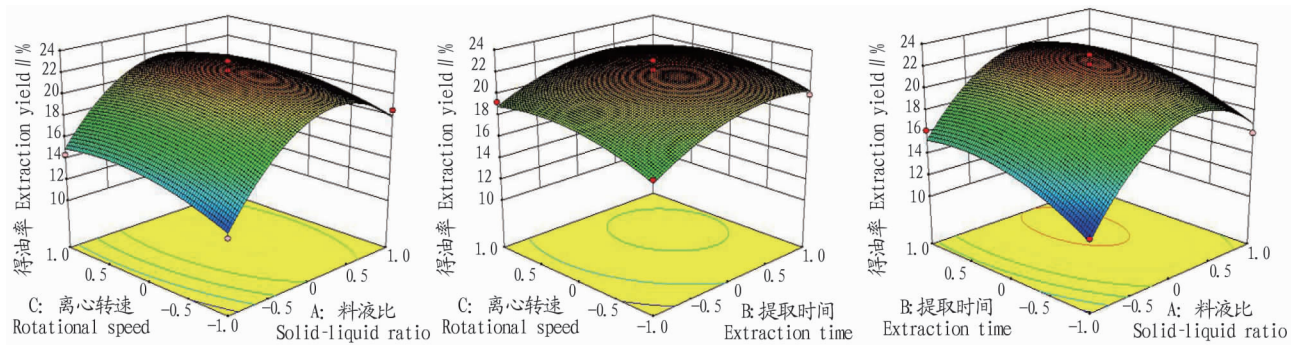


图 2 料液比、提取时间及离心转速对沙棘果油得油率影响的三维响应曲面

Fig.2 Three-dimensional response surface showing effects of solid-liquid ratio,extraction time and rotational speed on the yield of seabuckthorn fruit oil

表 4 沙棘果油对 DPPH· 的清除作用

Table 4 Scavenging effects of seabuckthorn fruit oil on DPPH·

样品 Sample	样品浓度 Sample concentration // g/L				
	2	4	6	8	10
沙棘果油 Seabuckthorn fruit oil	27.87	41.55	51.60	74.40	80.30
V _c	95.12	95.37	95.51	95.69	96.00

2.3.2 对 ·OH 的清除作用。沙棘果油清除 ·OH 试验结果见表 5,其具有很强的 ·OH 的清除能力,在浓度为 0.2~1.0 g/L 时,对 ·OH 的清除能力随着浓度的增大而提高,但

浓度超过 0.8 g/L 后,清除率的增长趋势变缓,当样品浓度为 1.0 g/L 时最大清除率为 91.54%,与 V_c 的清除率接近。

表5 沙棘果油对·OH的清除作用

Table 5 Scavenging effects of seabuckthorn fruit oil on ·OH

%

样品 Sample	样品浓度 Sample concentration // g/L				
	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
沙棘果油 Seabuckthorn fruit oil	58.19	65.37	77.11	89.85	91.54
V _c	95.12	95.37	95.51	95.69	96.00

2.3.3 对O₂⁻的清除作用。沙棘果油清除O₂⁻试验结果见表6,其对O₂⁻有较强的清除作用,各浓度下清除率甚至高于阳

性对照组V_c,且清除作用随着浓度的升高而增强,具有明显的剂量依赖性,当样品浓度为0.1 g/L时最大清除率为91.23%。

表6 沙棘果油对O₂⁻的清除作用Table 6 Scavenging effects of seabuckthorn fruit oil on O₂⁻

%

样品 Sample	样品浓度 Sample concentration // g/L				
	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10
沙棘果油 Seabuckthorn fruit oil	65.92	71.56	79.88	85.36	91.23
V _c	38.26	44.72	46.73	57.77	67.38

3 结论与讨论

在前期试验中在提取溶剂乙酸乙酯、正己烷、石油醚(30~60℃)、石油醚(60~90℃)中进行最佳溶剂筛选,结果表明以石油醚(60~90℃)做溶剂得油率最高,且其价格低廉,故选用石油醚(60~90℃)做溶剂更符合该试验研究需要。通过响应面分析方法对索氏提取沙棘油的最佳工艺进行优化,得到最佳提取条件:料液比1:8,提取时间3.5 h,离心转速9 350 r/min,最大得油率为21.9%。索式提取沙棘果油操作简单,条件温和,低成本,高效率,更适合工业化生产,由于索式提取需要溶剂达到沸点,该方法不考虑温度对提取率的影响。

人体在生长过程中不断地产生自由基,而内分泌失调、癌症、衰老或其他疾病大都与过量自由基的产生有关^[7-8],自由基成为人类健康潜在的威胁,因此体外抗氧化需要考虑自由基的清除率。课题组前期已经对不同浓度沙棘油的体外抗氧化作用进行考察,其中该研究所选浓度为沙棘果油对各自自由基清除能力最强的浓度,该试验再次确定沙棘果油对·OH、O₂⁻、DPPH·均有良好的清除作用,其中对O₂⁻的清除作用超过V_c,可能是由于沙棘油中含有大量的不饱和脂肪酸,其中的π键的电子团暴露于键的外围,容易吸引亲电

体,而邻苯三酚自氧化中间体为多元醌类化合物,沙棘油中含有大量微量元素可能与其形成螯合物而改变吸光度,进而表现为超强的抗氧化能力。作为药食两用的传统中药,沙棘资源丰富,安全有效,作为保健品和药品开发的重要物质具有一定的优势。物质结构差异会导致活性机制的差异,因此,该研究将深入开展沙棘油这一活性物质基础的结构特征、与氧化相关疾病的活性及机制研究,确定量效关系,为沙棘果的药用价值利用与开发奠定理论基础。

参考文献

- [1] 臧茜茜,邓乾春,从仁怀,等.沙棘油功效成分及药理功能研究进展[J].中国油脂,2015,40(5):76-81.
- [2] 刘凤云.沙棘油的药理研究[J].生物学通报,2005,40(2):3-15.
- [3] 张逸,黄凤洪,马方励,等.沙棘油提取工艺研究进展[J].中国油脂,2016,41(3):16-20.
- [4] 荣辉,吴兵兵,杨贤庆,等.水酶法提取生物油脂的研究进展[J].食品工业科技,2017,38(2):374-378.
- [5] 苏娜,张丽,段龙艳,等.响应面优化热浸提法提取石榴皮总多酚的工艺研究[J].安徽农业科学,2017,45(9):78-83.
- [6] 冯艳芸,李海萍.葡萄籽油提取工艺条件优化[J].安徽农业科学,2016,44(6):94-96.
- [7] 阳松威,郭建生,王晓倩,等.补肾疗更浸膏对去势更年期模型大鼠下丘脑β-内啡肽与自由基代谢的影响[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(21):148-151.
- [8] 郭芙蓉,周媛媛,李占生.木瓜黄精膏对衰老模型小鼠血清SOD活性及MDA含量的影响[J].辽宁中医杂志,2013,40(1):168-169.

(上接第129页)

参考文献

- [1] 阿布力克木·阿布力孜,迪丽努尔·塔力甫,艾沙·努拉洪.分光光度法测定和田核桃仁内隔膜中总黄酮含量[J].食品科学,2008,29(11):552-554.
- [2] 马良进,吴美卿,苏秀,等.山核桃外果皮提取物活体抑菌活性[J].浙江林学院学报,2009,26(5):620-624.
- [3] 翟梅枝,王磊,何文君,等.核桃青皮乙醇提取物抑菌活性研究[J].西北植物学报,2009,29(12):2542-2547.

- [4] 陈卫东,李建飞,吴桂军.核桃青皮萃取物防治板栗叶螨试验[J].河北果树,2009(5):8,11.
- [5] 邹玉,邵鸣,王涛,等.马齿苋提取物对玉米蚜的拒食活性[J].安徽农业科学,2016,44(31):94-96.
- [6] 邵鸣,邹玉,付文龙,等.核桃青皮提取物对玉米蚜的毒杀活性[J].中国林副特产,2017(2):26-28.
- [7] 高蓉,田暄,张兴.3种鬼臼毒类物质杀虫活性测试[J].西北农林科技大学学报,2001,29(1):71-74.
- [8] 许龙,邹玉,王长平.马齿苋提取物对玉米蚜的触杀活性[J].安徽农业科学,2018,46(14):154-155,165.

本刊提示 文稿题名下写清作者及其工作单位名称、邮政编码;第一页地脚注明第一作者简介,格式如下:“作者简介:姓名(出生年—),性别,籍贯,学历,职称或职务,研究方向”。