

亚临界流体萃取马蔺籽油的成分及抗氧化活性研究

栾真杰^{1,2}, 李朵^{1,2}, 李佩佩^{1,2}, 赵景阳¹, 孟晓萍¹, 孙菁¹

1.青海省青藏高原特色生物资源研究重点实验室, 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810008;

2.中国科学院大学, 北京 100049

摘要: 目的 优化马蔺籽油亚临界流体萃取法的提取条件, 分析所得籽油的成分, 评价其抗氧化活性。**方法** 采用响应面法优化亚临界流体萃取法提取马蔺籽油的条件, 并分别参照国家标准及行业标准测定所得籽油的理化常数及总多酚含量, 采用气质联用法分析籽油脂肪酸的组成及相对含量, 利用 DPPH 法和 FRAP 法评价马蔺籽油的抗氧化活性。**结果** 亚临界流体萃取法提取马蔺籽油的优化条件为液料比 6 mL/g、萃取 5 次、萃取温度 42.29 °C、萃取时间 22.41 min, 在此条件下马蔺籽油得率的理论值为 13.250%。所得籽油的不皂化物含量为 1.28%, 酸值为 0.124 mg/g, 皂化值为 198.077 mg/g, 过氧化值为 4.346 mmol/kg。籽油的总多酚含量为 146.64 mg/kg。籽油浓度为 14 mg/mL 时, DPPH 自由基清除率最大, 为 71.42%, IC₅₀ 为 12.033 mg/mL; 籽油浓度为 168 mg/mL 时, 总抗氧化能力最强, 为 0.420 7 mmol/L FeSO₄ 当量。**结论** 亚临界流体萃取法所得马蔺籽油具有较高含量的总多酚及较强的抗氧化活性。

关键词: 亚临界流体萃取法; 响应面法; 马蔺籽油; 成分分析; 抗氧化活性; 总多酚

中图分类号: R284.2 文献标识码: A 文章编号: 1005-5304(2021)04-0101-06

DOI: 10.19879/j.cnki.1005-5304.202008300

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Study on Composition and Antioxidant Activity of *Iris lactea* Seed Oil Extracted by Subcritical Fluid

LUAN Zhenjie^{1,2}, LI Duo^{1,2}, LI Peipei^{1,2}, ZHAO Jingyang¹, MENG Xiaoping¹, SUN Jing¹

1. Qinghai Provincial Key Laboratory of Qinghai-Tibet Plateau Biological Resources,
Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: Objective To optimize the extraction conditions of *Iris lactea* seed oil (ILSO) with subcritical fluid extraction technology; To analyze the composition of the ILSO, and evaluate the antioxidant activity. **Methods** The response surface methodology was used to optimize the extraction conditions of ILSO by subcritical fluid technology, and the physical and chemical characteristics and total polyphenol content of the ILSO were also determined according to the national standard and industry standard, respectively. The composition and relative content of fatty acid were analyzed by GC-MS. DPPH and FRAP method were used to evaluate the antioxidant activity of ILSO. **Results** The optimal conditions for subcritical fluid extraction technology of ILSO were as follows: the liquid to material ratio was 6 mL/g, the extraction frequency was 5 times, the extraction temperature was 42.29 °C, and the extraction time was 22.41 min. Under these conditions, the theoretical value of oil yield reached 13.250%. It was found that the unsaponifiable content of the obtained seed oil was 1.28%; the acid value was 0.124 mg/g; the saponification value was 198.077 mg/g; the peroxide value was 4.346 mmol/kg. The total polyphenols content of the seed oil was 146.64 mg/kg. When the seed oil concentration was 14 mg/mL, the DPPH free radical scavenging activity reached the maximum value of 71.42%, and IC₅₀ value was 12.033 mg/mL. The total antioxidant activity reached the strongest when the concentration of ILSO was 168 mg/mL, which was 0.420 7 mmol/L FeSO₄ equivalent. **Conclusion** The seed oil obtained through subcritical fluid extraction technology in this study has a high content of

基金项目: 青海省科研基础条件平台建设项目(2020-ZJ-T05); 青海省自然科学基金面上项目(2019-ZJ-904); 青海省高端创新人才千人计划(2017年); 中国科学院仪器设备功能开发技术创新项目(2022gl09)

通讯作者: 孙菁, E-mail: sunj@nwipb.cas.cn

total polyphenols and strong antioxidant activity.

Keywords: subcritical fluid extraction technology; response surface methodology; *Iris lactea* seed oil; component analysis; antioxidant activity; total polyphenols

马蔺 *Iris lactea* Pall. var. *chinensis* (Fisch.) Koidz. 为鸢尾科鸢尾属多年密丛生草本植物, 生于海拔 2200~4900 m 的早山坡、高山草地、荒地、湿地, 我国西北、华北、东北及华东各省均有分布, 朝鲜、蒙古、俄罗斯及中亚和西亚地区也有分布^[1], 是一种盐生植物, 可用于改造利用盐渍环境^[2]。马蔺为重要的藏药资源, 以种子入药, 味辛性平, 具有解痉止痛、驱虫、生肌敛疮等功效^[3], 可退烧、解毒, 用于治疗阑尾炎、龋齿及食物中毒引起的泻痢等^[4]。马蔺籽种仁部分含有大量油细胞^[5], 据报道超临界萃取法马蔺籽油得率为 11.15%^[6], 超声波提取法籽油得率为 10.56%^[7], 索氏提取法籽油得率为 3%~12%^[8]。研究表明, 马蔺籽油的脂肪酸成分主要为油酸及亚油酸, 不皂化物主要为豆甾醇、 β -谷甾醇及菜油甾醇等甾醇类化合物, 籽油的总多酚含量较高, 具有较强的抗氧化活性^[6]。

亚临界流体萃取技术是根据相似相溶原理, 利用亚临界状态溶剂分子与固体原料充分接触中发生的分子扩散作用, 使物料中可溶成分迁移至萃取溶剂中, 再经减压蒸发脱溶获得目标提取物的新型萃取技术。随着亚临界流体萃取理论及相关设备的不断发展, 该技术已广泛应用于植物油料、动物原料、微生物原料及其加工副产物, 并取得了相应的工业成果^[9]。通过测定不同提取方法所得巴西坚果油的成分, 发现通过亚临界流体萃取法获得的油中生物活性化合物含量较高^[10]。本研究采用响应面法优化亚临界流体萃取法提取马蔺籽油的条件下, 分析所得籽油的脂肪酸组成及相对含量, 并测定总多酚含量, 在此基础上采用 DPPH 法及 FRAP 法评估籽油的抗氧化活性, 为该植物资源的进一步开发利用提供依据。

1 仪器与试剂

CBE-T-5L 亚临界流体双溶剂萃取实验室成套设备, 河南省亚临界技术有限公司; Thermo TRACE 1300 系列-TSQ 8000Evo 三重四极杆气质联用仪, 美国赛默飞世尔科技公司; Cary60 紫外分光光度计, 美国安捷伦科技有限公司; Milli-Q 纯水机, 德国默克集团; ZFJ-200 中草药粉碎机, 江阴市跨越机械有限公司; 二醇基固相萃取小柱 (500 mg/3 mL), 天津博进科技有限公司。

福林酚为 BR 生物试剂; 氦气为食品级; 对照品

菜油甾醇 (纯度>98%, 批号 190107)、 β -谷甾醇 (纯度>98%, 批号 181217)、豆甾醇 (纯度>95%, 批号 190608), 北京世纪奥科生物技术有限公司; 没食子酸 (纯度>98%, 批号 18032703)、抗坏血酸 (纯度>98%, 批号 170709), 成都普菲德生物技术有限公司; 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH, 纯度>98%, 批号 C36912133EE24), APExBIO 公司。总抗氧化能力检测试剂盒 (A015-3 FRAP 法, 批号 20200702), 南京建成生物工程研究所, 使用危险品包括浓硫酸 (白银良友化学试剂有限公司, 批号 20190102)。石油醚 (60~90 °C)、氢氧化钾、氢氧化钠、正己烷、酚酞、乙醇、碘化钾、淀粉、硫代硫酸钠、冰乙酸、碱性蓝 6B、碳酸钠、无水硫酸钠、甲醇、无水乙醇等均为国产分析纯, 总多酚测定中所用甲醇及正己烷为色谱纯。

马蔺籽产自青海互助县, 购于青海药材市场, 经中国科学院西北高原生物研究所卢学峰研究员鉴定为鸢尾科鸢尾属马蔺 *Iris lactea* Pall. var. *chinensis* (Fisch.) Koidz. 的干燥成熟种子, 筛除碎壳、残叶等杂质后, 置于 50 °C 烘箱中烘干至恒重, 用多功能粉碎机碎皮, 过 20 目筛, 除去种皮, 得到马蔺籽种仁, 将种仁用中草药粉碎机粉碎后过 40 目筛, 装于自封袋中, 4 °C 冷藏备用。

2 方法与结果

2.1 亚临界流体萃取工艺优化

取马蔺籽种仁粉 300.00 g, 装袋封口, 放入萃取密封罐, 抽空萃取罐与分离罐的空气, 加入萃取剂丁烷, 水浴加热, 萃取一定时间。将萃取液放入分离罐, 回收溶剂, 放出提取物, 称重, 计算马蔺籽油得率。马蔺籽油得率 (%) = 马蔺籽油质量 ÷ 原料质量 × 100%。

2.1.1 单因素试验

2.1.1.1 夹带剂浓度

在萃取温度 35 °C、萃取时间 25 min、萃取次数 3 次、液料比 5 mL/g 的条件下, 分别选择无夹带剂及 95%、100%乙醇为夹带剂进行试验, 结果无夹带剂及 95%、100%乙醇为夹带剂的马蔺籽油得率分别为 8.78%、11.28%、9.86%, 因此选择 95%乙醇为夹带剂进行后续试验。

2.1.1.2 液料比

在萃取温度 35 °C、萃取时间 25 min、萃取次数

3次、95%乙醇为夹带剂的条件下,考察液料比分别为4、5、6、7、8 mL/g对马蔺籽油得率的影响。当液料比为4~7 mL/g时,马蔺籽油得率随液料比增加而逐渐增大;液料比超过7 mL/g时,马蔺籽油得率明显下降。因此,选择液料比6~8 mL/g进行响应面优化试验。

2.1.1.3 萃取次数

在液料比为5 mL/g、萃取时间25 min、萃取温度35℃、95%乙醇为夹带剂的条件下,考察萃取次数为1、2、3、4、5次对马蔺籽油得率的影响。马蔺籽油得率随萃取次数增多而逐渐增大,萃取1~3次时马蔺籽油得率上升较快,萃取4~5次时马蔺籽油得率上升较慢。因此,选择萃取次数为1~5次进行响应面优化试验。

2.1.1.4 萃取温度

在液料比为5 mL/g、萃取时间25 min、萃取次数3次、95%乙醇为夹带剂的条件下,考察萃取温度为30、35、40、45、50℃时对马蔺籽油得率的影响。萃取温度为30~40℃时,马蔺籽油得率随萃取温度升高而逐渐增大;萃取温度超过40℃后,马蔺籽油得率逐渐趋于平稳且有所下降。因此选择萃取温度为30~50℃进行响应面优化试验。

2.1.1.5 萃取时间

在液料比为5 mL/g、萃取温度40℃、萃取次数3次、95%乙醇为夹带剂的条件下,考察萃取时间为15、20、25、30、35、40 min对马蔺籽油得率的影响。萃取时间为15~20 min时,马蔺籽油得率随萃取时间增加而逐渐增大;当萃取时间超过20 min时,马蔺籽油得率反而下降;在萃取时间20 min处有明显的峰值。因此,选择萃取时间为15~25 min进行响应面优化试验。

2.1.2 响应面试验

根据单因素试验结果,选取液料比(A)、萃取次数(B)、萃取温度(C)和萃取时间(D)为变量,将每个变量按低、中、高级别分别指定为-1、0、+1,以马蔺籽油得率(Y)为响应值,采用Box-Behnken试验对提取工艺进行优化,因素水平见表1,试验设计及结果见表2。

表1 响应面试验因素水平

| 水平 | 液料比/(mL/g) | 萃取次数 | 萃取温度/℃ | 萃取时间/min |
|----|------------|------|--------|----------|
| | A | B | C | D |
| -1 | 6 | 1 | 30 | 15 |
| 0 | 7 | 3 | 40 | 20 |
| +1 | 8 | 5 | 50 | 25 |

表2 响应面试验设计及结果

| 试验号 | A | B | C | D | Y/% |
|-----|---|---|----|----|-------|
| 1 | 7 | 3 | 40 | 20 | 9.09 |
| 2 | 6 | 1 | 40 | 20 | 5.92 |
| 3 | 7 | 3 | 40 | 20 | 8.15 |
| 4 | 7 | 3 | 40 | 20 | 11.79 |
| 5 | 7 | 5 | 50 | 20 | 10.88 |
| 6 | 8 | 3 | 30 | 20 | 9.23 |
| 7 | 7 | 1 | 40 | 15 | 3.73 |
| 8 | 7 | 5 | 40 | 15 | 11.43 |
| 9 | 8 | 3 | 50 | 20 | 10.37 |
| 10 | 6 | 3 | 30 | 20 | 9.32 |
| 11 | 7 | 3 | 50 | 25 | 8.16 |
| 12 | 6 | 3 | 40 | 15 | 7.89 |
| 13 | 7 | 1 | 50 | 20 | 3.53 |
| 14 | 7 | 5 | 30 | 20 | 7.87 |
| 15 | 7 | 3 | 30 | 25 | 5.74 |
| 16 | 8 | 3 | 40 | 15 | 6.96 |
| 17 | 6 | 5 | 40 | 20 | 11.58 |
| 18 | 7 | 3 | 50 | 15 | 7.36 |
| 19 | 6 | 3 | 50 | 20 | 9.16 |
| 20 | 8 | 1 | 40 | 20 | 7.06 |
| 21 | 8 | 3 | 40 | 25 | 7.62 |
| 22 | 8 | 5 | 40 | 20 | 12.14 |
| 23 | 7 | 5 | 40 | 25 | 13.41 |
| 24 | 7 | 3 | 30 | 15 | 5.25 |
| 25 | 7 | 3 | 40 | 20 | 10.82 |
| 26 | 7 | 3 | 40 | 20 | 9.95 |
| 27 | 7 | 1 | 40 | 25 | 5.02 |
| 28 | 7 | 1 | 30 | 20 | 2.06 |
| 29 | 6 | 3 | 40 | 25 | 10.42 |

采用Design-Expert11.1.2.0软件对响应面试验结果进行回归拟合,结果见表3。可以看出,在所选取的各因素水平范围内,B因素(萃取次数)对马蔺籽油得率的影响极为显著,AB、AC、AD、BC、BD、CD所对应的P值均大于0.1,表明4个因素之间的两两交互作用不明显。根据F值的大小,得到4个因素对马蔺籽油得率的影响顺序为B因素(萃取次数)>C因素(萃取温度)>D因素(萃取时间)>A因素(液料比)。拟合回归方程为: $Y=9.96-0.075A+3.33B+0.83C+0.65D-0.15AB+0.32AC-0.47AD+0.39BC+0.17BD+0.078CD+0.47A^2-1.16B^2-1.87C^2-1.36D^2$ 。

表3 回归模型方差分析

| 方差来源 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F 值 | P 值 |
|----------------|--------|-----|--------|-------|----------|
| 模型 | 189.15 | 14 | 13.51 | 5.91 | 0.001 0 |
| A | 0.07 | 1 | 0.07 | 0.03 | 0.864 7 |
| B | 133.18 | 1 | 133.18 | 58.26 | <0.000 1 |
| C | 8.31 | 1 | 8.31 | 3.64 | 0.077 2 |
| D | 5.01 | 1 | 5.01 | 2.19 | 0.161 1 |
| AB | 0.09 | 1 | 0.09 | 0.04 | 0.849 4 |
| AC | 0.42 | 1 | 0.42 | 0.18 | 0.675 2 |
| AD | 0.87 | 1 | 0.87 | 0.38 | 0.546 2 |
| BC | 0.59 | 1 | 0.59 | 0.26 | 0.618 5 |
| BD | 0.12 | 1 | 0.12 | 0.05 | 0.822 8 |
| CD | 0.02 | 1 | 0.02 | 0.01 | 0.919 8 |
| A ² | 1.46 | 1 | 1.46 | 0.64 | 0.437 7 |
| B ² | 8.68 | 1 | 8.68 | 3.80 | 0.071 6 |
| C ² | 22.63 | 1 | 22.63 | 9.90 | 0.007 1 |
| D ² | 12.02 | 1 | 12.02 | 5.26 | 0.037 8 |
| 残差 | 32.00 | 14 | 2.29 | | |
| 失拟项 | 23.88 | 10 | 2.39 | 1.18 | 0.475 0 |
| 纯误差 | 8.12 | 4 | 2.03 | | |
| 总误差 | 221.15 | 28 | | | |

由表3可知,该模型影响极显著($P=0.0010$),且其失拟项不显著($P=0.4750$),决定系数 $R^2=0.8553$,表明模型相关度较好,校正决定系数 $R^2_{adj}=0.7106$ 。经响应面回归分析得到的最优提取工艺条件为液料比6 mL/g、萃取5次、萃取温度42.29 °C、萃取时间22.41 min,在此条件下,马蔺籽油得率的理论值达到13.250%。

2.2 马蔺籽油理化特性分析

参照中华人民共和国国家标准《动植物油脂酸值和酸度的测定》(GB/T 5530-2005)、《动植物油脂皂化值的测定》(GB/T 5534-2008)、《动植物油脂过氧化值的测定》(GB/T 5538-2005)、《动植物油脂不皂化物测定第2部分:己烷提取法》(GB/T 5535.2-2008)分别测定马蔺籽油酸值、皂化值、过氧化值和不皂化物含量。结果显示,马蔺籽油酸值为0.124 mg/g,皂化值为198.077 mg/g,过氧化值为4.346 mmol/kg,不皂化物含量为1.28%。可以看出,马蔺籽油的酸值与皂化值的差值很大,预测油品在劣化之后形成油泥沉淀的可能性比较大。

2.3 马蔺籽油脂肪酸成分分析

参照《食品安全国家标准:食品中脂肪酸的测定》(GB 5009.168-2016)方法对马蔺籽油进行甲酯化处理。采用气相色谱-质谱法(GC-MS)对马蔺籽油

脂肪酸成分进行分析。分析条件:毛细管色谱柱为安捷伦DB-FFAP柱(100 m×0.25 mm ID, 0.25 μm);进样口温度280 °C;载气为氦气;进样量为1.0 μL;分流比20:1;程序升温50 °C保持1 min,以25 °C/min升温至175 °C,再以4 °C/min升温至230 °C,保持5 min;电离方式为电子轰击离子源(EI);柱头压力230 kPa;传输线温度280 °C。通过检索NIST14标准谱库,分析图谱中的主要成分,并采用面积归一化法定量。亚临界流体萃取法所得马蔺籽油脂肪酸主要为油酸(19.28%)及亚油酸(65.23%),不饱和脂肪酸总含量为86.602%,含量最高的饱和脂肪酸为棕榈酸(6.050%),见表4。

表4 马蔺籽油脂肪酸组成及相对含量

| 序号 | 脂肪酸 | 相对含量/% | 序号 | 脂肪酸 | 相对含量/% |
|----|--------|--------|----|-----------|--------|
| 1 | 月桂酸 | 0.038 | 10 | 花生酸 | 0.849 |
| 2 | 肉豆蔻酸 | 0.049 | 11 | α-亚麻酸 | 0.382 |
| 3 | 棕榈酸 | 6.050 | 12 | 11-二十碳一烯酸 | 0.032 |
| 4 | 棕榈油酸 | 0.081 | 13 | 二十一烷酸 | 0.131 |
| 5 | 十七烷酸 | 0.041 | 14 | 二十碳二烯酸 | 0.074 |
| 6 | 十七碳一烯酸 | 0.083 | 15 | 二十二烷酸 | 0.143 |
| 7 | 硬脂酸 | 1.104 | 16 | 二十三烷酸 | 1.468 |
| 8 | 油酸 | 19.280 | 17 | 二十碳五烯酸 | 1.440 |
| 9 | 亚油酸 | 65.230 | 18 | 二十四烷酸 | 0.294 |

2.4 马蔺籽油不皂化物中甾醇含量测定

2.4.1 分析条件

气相色谱条件:J&W DB-5MS UI毛细管色谱柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μm);进样口温度275 °C;进样量为1.0 μL,分流比为10:1;载气为高纯氦气,流速1.0 mL/min;程序升温初始温度180 °C,以15 °C/min升温至280 °C,保持25 min。

质谱条件:EI离子源,电子能量70 eV;离子源温度230 °C;四极杆温度150 °C;传输线温度280 °C;质量范围35~650 amu,全扫描方式;溶剂延迟2 min。

2.4.2 对照品溶液制备

分别称取7.70 mg菜油甾醇、11.12 mg豆甾醇和10.28 mg β-谷甾醇于3个10 mL容量瓶中,用正己烷溶解并定容,配成甾醇对照品溶液。从上述3种对照品溶液中分别准确移取0.4 mL于2 mL离心管中,混匀,即得3种甾醇的混合对照品溶液,进样测定。以峰面积为纵坐标,甾醇浓度为横坐标,制作标准曲线,得到回归方程。菜油甾醇: $Y=1.91442 \times 10^7 X + 8.49544 \times 10^7$ ($r=0.99918$);豆甾醇: $Y=2.50625 \times 10^7 X - 1.45465 \times 10^7$ ($r=0.99978$);β-谷甾醇: $Y=1.47498 \times 10^7 X + 4.05537 \times 10^7$ ($r=0.99411$)。

2.4.3 供试品溶液制备与样品测定

将按照“2.2”项下方法制得的不皂化物溶于5 mL正己烷中,进行GC-MS分析。根据各对照品回归方程计算菜油甾醇、豆甾醇、 β -谷甾醇的含量。结果亚临界流体萃取法所得马蔺籽油中菜油甾醇含量为1620 mg/kg,豆甾醇含量为145 mg/kg, β -谷甾醇含量为18 860 mg/kg。

2.5 马蔺籽油总多酚含量测定

参照中华人民共和国粮食行业标准《粮油检验:植物油中多酚的测定 分光光度法》(LS/T 6119—2017)对马蔺籽油的总多酚含量进行测定。

2.5.1 供试品溶液制备

准确称取2 g(精确至0.001 g)样品溶于6 mL正己烷中,将该溶液以1.0 mL/min流速通过二醇基固相萃取柱,再用10 mL正己烷淋洗萃取柱,弃去全部流出液,最后用10 mL甲醇洗脱,收集全部洗脱液,于45 °C水浴中弱氮气吹干,残渣溶于2 mL甲醇-水溶液中,涡旋振荡1 min,-18 °C冷冻16 h,4 °C、10 000 r/min离心5 min,取上清液,待测。

2.5.2 对照品溶液制备

配制浓度为1.0 mg/mL的没食子酸对照品贮备液,用移液枪分别移取1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL贮备液于100 mL容量瓶中,分别用纯水定容至刻度,摇匀,即得浓度分别为10、20、30、40、50 μ g/mL的没食子酸工作液。

2.5.3 样品测定

用移液枪分别移取没食子酸工作液、纯水及供试品溶液各1.0 mL于试管中,再依次加入福林酚试剂0.5 mL、7.5%碳酸钠溶液2.0 mL和纯水6.5 mL,涡旋振荡1 min,70 °C水浴反应30 min,于波长750 nm处测定吸光度。以没食子酸工作液的吸光度为纵坐标,没食子酸浓度为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $Y=0.010\ 04X+0.007\ 2$ ($r=0.999\ 58$)。将样品吸光度代入回归方程,平行试验3次,计算总多酚平均含量为146.64 mg/kg。

2.6 马蔺籽油抗氧化活性测定

2.6.1 DPPH法

称取DPPH 0.019 7 g,用无水乙醇定容至250 mL,配制成浓度为0.2 mmol/L的DPPH溶液,4 °C保存备用。称取马蔺籽油1.12 g,分别配制成浓度为28、14、7、3.5、0.875 mg/mL的马蔺籽油溶液。分别量取不同浓度的样品溶液2 mL和DPPH溶液2 mL于试管中,避光反应30 min,于波长517 nm处测定吸光度。以2 mL无水乙醇和2 mL DPPH溶液为空白对照,计

算DPPH自由基清除率。DPPH自由基清除率(%)=[1-($A_{\text{sample}}-A_{\text{sample blank}}$)/ A_{control}] \times 100%。式中, A_{sample} 为DPPH与样品混合溶液吸光度, $A_{\text{sample blank}}$ 为不含DPPH的样品溶液吸光度, A_{control} 为空白对照溶液吸光度。

不同浓度马蔺籽油DPPH自由基清除率见图1。在浓度为0.875~28 mg/mL范围内,马蔺籽油的DPPH自由基清除率随浓度升高而增大,在14 mg/mL时达到最大,为71.42%。采用SPSS25软件计算马蔺籽油DPPH自由基清除率的 IC_{50} 值为12.033 mg/mL。

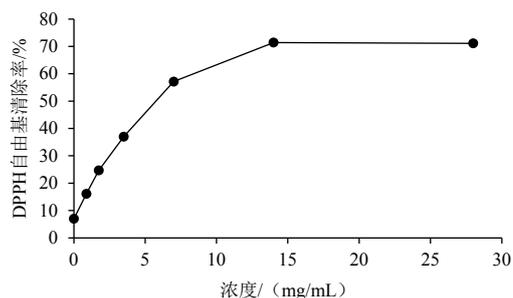


图1 不同浓度马蔺籽油DPPH自由基清除率

2.6.2 FRAP法

按总抗氧化能力检测试剂盒(A015-3 FRAP法)说明制备FRAP反应工作液,并于37 °C水浴30 min,依次加入7、14、28、56、112、168、224、280 mg/mL马蔺籽油溶液,37 °C反应5 min,测定反应液在波长593 nm处的吸光度,每个样品重复3次。以纯水为空白对照,以 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 为对照品,分别配制浓度为0.15、0.30、0.60、0.90、1.20、1.50 mmol/L的溶液,以吸光度为纵坐标,对照品浓度为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $Y=0.314\ 32X+0.069\ 87$ ($r=0.997$)。将样品溶液的吸光度代入回归方程,用与样品溶液抑制率相同的 $FeSO_4$ 浓度(mmol/L)表示样品的总抗氧化能力,结果见图2。马蔺籽油浓度在7~280 mg/mL范围内,其总抗氧化能力先升高后降低,在浓度为168 mg/mL时总抗氧化能力达到最高,为0.420 7 mmol/L $FeSO_4$ 当量。

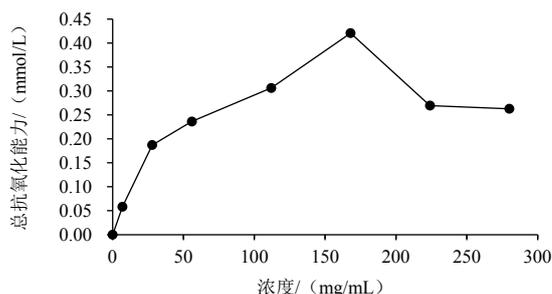


图2 不同浓度马蔺籽油总抗氧化能力

3 讨论

在亚临界流体萃取法提取马蔺籽油的过程中, 萃取压力、温度、时间、次数均为影响马蔺籽油得率的关键因素^[11-12]。本研究采用响应面法优化提取条件时发现, 液料比在 3~8 mL/g 范围内, 马蔺籽油得率随液料比的增加呈先上升后下降的趋势, 可能原因是当溶剂量已满足将马蔺籽油提取完全时, 继续增大溶剂量会造成提取之后脱溶剂困难, 从而导致马蔺籽油得率下降。马蔺籽油得率随着萃取次数增加其上升速率逐渐下降, 可能由于萃取 3 次已可萃取出绝大部分马蔺籽油, 故继续增加萃取次数则马蔺籽油得率上升缓慢。萃取温度在 40 °C 左右已可萃取出绝大部分马蔺籽油, 继续升高萃取温度会造成溶剂挥发过快, 液料比降低, 从而使马蔺籽油得率下降。单因素试验结果表明, 马蔺籽油得率随萃取时间延长而逐渐增大, 在 20 min 处出现峰值。响应面优化结果显示, 亚临界流体萃取法提取马蔺籽油在最佳条件(液料比 6 mL/g、萃取 5 次、萃取温度 42.29 °C、萃取时间 22.41 min)下, 马蔺籽油得率的理论值达到 13.250%。

亚临界流体萃取法所得马蔺籽油的不皂化物含量为 1.28%, 与超临界流体萃取法所得籽油不皂化物含量(1.31%)基本相同; 酸值为 0.124 mg/g, 小于超临界流体萃取法所得籽油酸值(0.239 mg/g); 皂化值为 198.077 mg/g, 略高于超临界流体萃取法所得籽油皂化值(193.794 mg/g); 过氧化值为 4.346 mmol/kg, 低于超临界流体萃取法所得马蔺籽油的过氧化值(7.026 mmol/kg)^[6]。

亚临界流体萃取法所得马蔺籽油脂肪酸主要为油酸(19.28%)及亚油酸(65.23%), 饱和脂肪酸含量为 86.602%, 饱和脂肪酸含量最高者为棕榈酸(6.050%)。该结果与超临界流体萃取法所得马蔺籽油的脂肪酸组成基本相同, 但亚油酸相对含量明显高于超临界流体萃取法所得籽油(41.31%)^[6]。亚临界流体萃取法所得籽油总多酚含量为 146.64 mg/kg 没食子酸当量, 明显高于超临界流体萃取法所得籽油总多酚含量(36.55 mg/kg 没食子酸当量)。在其他常见籽油中, 葡萄籽油总多酚含量为 26.41~185.62 mg/kg^[13], 橄榄油总多酚含量为 21.26~26.04 mg/kg^[14]。

亚临界流体萃取法所得马蔺籽油的 DPPH 自由基清除率最高可达 71.42%, 其 IC₅₀ 值为 12.033 mg/mL, 超临界流体萃取法所得马蔺籽油 DPPH 自由基清除率

为 18.99%~88.27%, 其 IC₅₀ 值为 3.27 mg/mL。FRAP 法测定亚临界流体萃取法所得马蔺籽油总抗氧化活性, 在浓度为 168 mg/mL 时最强, 为 0.420 7 mmol/L FeSO₄ 当量, 而超临界流体萃取法所得籽油在浓度为 168 mg/mL 时, 总抗氧化活性最强为 0.475 9 mmol/L FeSO₄ 当量^[6]。

参考文献:

- [1] 中国科学院西北高原生物研究所. 青海植物志[M]. 西宁: 青海人民出版社, 1999: 293-294.
- [2] 贾恢先, 孙学刚. 中国西北内陆盐地植物图谱[M]. 北京: 中国林业出版社, 2005: 12, 122.
- [3] 青海省药品检验所, 青海省藏医药研究所. 中国藏药[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1990: 232-235.
- [4] 中国科学院西北高原生物研究所. 藏药志[M]. 西宁: 青海人民出版社, 1991: 47-49.
- [5] 李颖, 杨光, 池秀莲, 等. 鸢尾科 3 种药用植物种子的形态学及显微结构[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(23): 59-63.
- [6] LUAN Z J, LI P P, LI D, et al. Optimization of supercritical-CO₂ extraction of *Iris lactea* seed oil: Component analysis and antioxidant activity of the oil[J]. Industrial Crops and Products, 2020, 152: 112553.
- [7] 栾真杰, 李佩佩, 皮立, 等. 超声波提取马蔺籽油的脂肪酸组成及其抗氧化能力评价[J]. 中国粮油学报, 2020, 35(4): 77-82.
- [8] 臧静逸, 夏光成, 刘雪明. 马蔺子油的理化性质及其脂肪酸的鉴定[J]. 中草药, 1983, 14(3): 7-9.
- [9] 郭婷婷, 万楚筠, 黄凤洪, 等. 亚临界流体萃取油脂及微量成分研究进展[J]. 中国油料作物学报, 2020, 42(1): 154-160.
- [10] ZANQUI A B, SILVA C M, RESSUTTE J B, et al. Brazil nut oil extraction using subcritical n-propane: advantages and chemical composition[J]. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2020, 31(3): 603-612.
- [11] 李冰, 刘小波, 张晓雪, 等. 亚临界流体萃取富集金盏花中叶黄素工艺优化[J]. 食品工业科技, 2020, 41(23): 129-135.
- [12] 贺瑶, 曹健, 何东平, 等. 微拟球藻脂质的亚临界提取工艺优化及其成分分析[J]. 中国油脂, 2020, 45(5): 23-26.
- [13] 蔡媛媛. 葡萄籽油微量成分及其抗氧化能力分析和指纹图谱构建[D]. 无锡: 江南大学, 2018.
- [14] 向春蓉, 徐洲, 王寒冬, 等. 3 个引进油橄榄品种初榨油多酚类化合物含量及抗氧化活性研究[J]. 中国粮油学报, 2017, 32(9): 94-98.

(收稿日期: 2020-08-18)

(修回日期: 2020-09-08; 编辑: 陈静)