

文章编号:1001-6880(2014)10-1685-05

构树种子油的超声强化提取及其抗氧化性研究

瞿晓晶,彭芳芳,尹楹富,谭莹莹,权春善*

大连民族学院生命科学学院,大连 116600

摘要:本文采用单因素设计,进行均匀设计实验,用超声波提取法考察了溶剂种类、超声波强度、超声波提取时间、料液比(g/mL)对构树种子油提取率的影响,同时研究了构树种子油清除羟基自由基和超氧阴离子自由基的能力。结果表明,在以丙酮作提取剂,各因素对构树种子油提取效率的影响次序为:超声波强度 > 料液比 > 超声时间;工艺参数为:超声波强度为 65%,料液比(g/mL)1:12,超声提取时间 7 min,构树种子油提取率可达 30.2%。同时,以构树种子油清除羟基自由基能力和超氧阴离子自由基能力为指标,研究构树种子油的抗氧化能力。通过 DPPH 法和邻苯三酚自氧化法测定其抗氧化活性,结果发现其对羟基自由基的抑制率高达 93.56%,而对超氧阴离子没有明显抑制作用。

关键词:构树种子油;超声波强化;提取率;羟基自由基;超氧阴离子自由基;抗氧化性

中图分类号:TQ646

文献标识码:A

Ultrasonic Extraction and Antioxidant Activity Investigation of *Broussonetia papyrifera* Seed Oil

QU Xiao-jing, PENG Fang-fang, YIN Ying-fu, TAN Ying-ying, QUAN Chun-shan*

College of Life Science, Dalian Nationality University, Liaoning Dalian 116600, China

Abstract: In this study, the effects of extraction solvents, ultrasonic power, treatment time and ratio of solid to liquid were investigated by an uniform design experiment. Meanwhile, the scavenging activities of *Broussonetia papyrifera* seed oil on hydroxyl free radical and superoxide anion radical were determined. The results indicated that the influencing factors on extraction yield of *B. papyrifera* seed oil were in this order (from strong to weak): ultrasonic power, ratio of solid to liquid, treatment time. The optimized processing parameters were determined to be: ultrasonic power was 65%, treatment time was 7 min, ratio of solid to liquid was 1:12. Under the optimized extraction conditions, the extraction yield of *B. papyrifera* oil was 30.2%. The antioxidant activities of the oil were determined by DPPH and pyrogallol autoxidation assays. The results indicated that *B. papyrifera* seed oil had strong hydroxyl free radical scavenging activity, reaching 93.56%, but no superoxide anion radical scavenging activity.

Key words: *Broussonetia papyrifera* seed oil; ultrasonic power; extraction yield; hydroxyl free radical; superoxide anion free radical; antioxidant activity

构树 [*Broussonetia papyrifera* (L.) Vent.] 为桑科直立落叶乔木,分布在我国华北、西北、华东、中南、西南及辽宁^[1],多为野生,长于山坡、沟边,有少量栽培。构树果可生食,亦可酿酒,有补肾、壮筋骨、健胃消肿之功效,构树皮、白色汁液均可入药。临幊上用于治疗腰膝酸软、虚劳骨蒸、头晕目昏、目生膜、水肿胀满,还可以治疗顽癣、神经性皮炎、湿疹等皮肤病^[2]。《名医别录》载为上品:甘、寒、无毒。古本草

多记载楮实子(构树果实)为补益药,功用大补益,久服不饥、不老,轻身^[3]。现代药理研究表明:构树果实具有促进记忆、调节免疫,降血脂,抗氧化作用,且对肝病、肾病、眼病、男女不孕不育症等疾病都有一定的疗效,具有很好的药用价值,可以被用于生产药物或保健品。

超声波提取法是一种新的分离提取技术,现已广泛应用于油脂工业,具有操作简便快捷、提取温度低、提取物的结构不被破坏等优点^[4],目前,超声波技术已经尝试用于八角油、扁桃油、玉米胚芽油、松籽油、苹果籽油、西瓜籽油、辣椒籽油、猕猴桃籽油的提取中。利用高强度、高频率声波及其与物质之间

相互作用,不但可以破碎植物细胞壁,使被提取物质更易释放出来,且还可加速溶剂从连续相到植物细胞过程。本文利用超声波法考察了各种因素对构树种子油提取率的影响,并对其提取工艺进行了初步研究,为构树的综合利用奠定了基础。

同时,已有研究表明自由基与衰老、癌症、心血管疾病及炎症的发生有着密切的关系^[5],而超氧阴离子的过量会导致细胞DNA损坏,破坏人类机体功能。为进一步研究构树种子油的功效,拓展其应用市场,本文通过测定构树种子油对自由基的清除能力以及对超氧阴离子的抑制作用,较为详细的研究了构树种子油的抗氧化能力。为构树种子油在医药、食品、化妆品方面的开发利用提供了理论依据。

1 材料、试剂与仪器

1.1 实验材料

构树种子于2010年和2011年7月至9月采与大连民族学院校内。

1.2 仪器与设备

超声细胞破碎仪(VCX130PB, USA);旋转蒸发仪(R-200, Switzerland);离心机(NAPCO 2080R, French);分光光度计(Ultraspec 4300pro, Amersham Biosciences);其他均为常规仪器。

1.3 试剂

丙酮、无水乙醇、石油醚、乙醚、正己烷、乙酸乙酯、三氯甲烷、盐酸、DPPH(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼)、Tris(三羟甲基氨基甲烷),以上试剂均为分析纯。

2 实验方法

2.1 最佳溶剂筛选

分别以无水乙醇、石油醚、乙醚、丙酮、正己烷、乙酸乙酯、三氯甲烷为提取溶剂。通过比较七种溶剂提取效果和溶剂物化性质,筛选出提取构树种子油最佳溶剂。

2.2 构树种子油的提取

影响构树种子油提取率的因素主要有三个:超声波强度、超声作用时间和料液比(g/mL)。首先,将构树种子用研钵研碎,然后称取质量,每个试管中装取1 g。最后,参照以下步骤进行实验。

2.2.1 超声波强度对构树种子油提取率的影响

在相同的作用时间5 min和料液比1:10(g/mL)条件下,用不同的超声波强度0%、20%、40%、

60%、80%、100%分别处理构树种子,离心,将溶剂倒入圆底蒸馏烧瓶中,通过旋转蒸发仪将溶剂蒸出。称量提取出的种子油的质量并按照如下公式计算提取率。

$$\text{提取率}(\%) = \frac{\text{提取质量}}{\text{样品质量}} \times 100\%$$

2.2.2 料液比对构树种子油提取率的影响

保持一定的作用时间(5 min)和超声强度(60%),在料液比(g/mL)分别为1:4、1:6、1:8、1:10、1:14、1:16的情况下,对构树种子油提取率进行测定。

2.2.3 超声作用时间对构树种子油提取率的影响

在超声强度(60%)和料液比(1:10)条件不变的情况下,改变作用时间,时间(min)分别设定为2、4、6、8、10、12、14,对提取率进行测定。

2.2.4 均匀设计实验

以影响构树种子油提取率的超声波强度、作用时间、料液比为考察因素,各因素取三个水平,探求超声波强化提取构树种子油的最佳工艺。

2.3 构树种子油抗氧化活性的测定

2.3.1 有机自由基(DPPH)的清除能力

吸取10 mL 6.5×10^{-4} mol/L DPPH溶液100 mL容量瓶中定容,摇匀,室温下避光静置30 min。分别量取0.2 mL、0.4 mL、0.8 mL的构树种子油,用丙酮溶解并定容至10 mL,配制成体积比不同的样品,编号分别为1、2、3,在517 nm处测定溶液的吸光值,通过下式计算对DPPH的清除率:

$$SA\% = \frac{1 - (A_i - A_j)}{A_0} \times 100\%$$

式中: A_0 为2 mL DPPH溶液+2 mL丙酮; A_i 为2 mL DPPH溶液+2 mL样品; A_j 为2 mL样品+2 mL丙酮。每个浓度的样品重复三次,计算平均值^[6]。

2.3.2 超氧阴离子自由基(O_2^-)清除作用

邻苯三酚在碱性条件(pH 8.2)下发生自身氧化反应,释放超氧阴离子自由基(O_2^-),生成有色中间产物并不断积累,此反应导致吸光度在波长320 nm处形成线性积累。若加入超氧阴离子自由基清除剂,吸光度会发生改变。按照配方将样品与邻苯三酚溶液混合,测定其吸光度随时间的变化值,并计算出变化率,将此变化率与对照溶液变化率相比较便可得出构树种子油对 O_2^- 的清除能力^[7]。

样品制备:分别量取40、60、70、80、100 μ L的构

树种子油,用无水乙醇定容至 10 mL,配制成不同体积比的样品。

分别将 50 mmol/L Tris-HCl 溶液,30 mol/L 邻苯三酚溶液和无水乙醇在 25 ℃水浴中预热 20 min,以 50 mmol/L Tris-HCl 溶液调零,然后按表 1 顺序迅速加入反应液。

表 1 试剂的加入量及顺序 (mL)

Table 1 Quantity and adding order of reagents (mL)

分组 Group	三羟甲基氨基甲烷盐酸盐 Tris-HCl	无水乙醇 Ethanol absolute	邻苯三酚 Pyrogallol	样品 Sample
A ₀	2.5	3	0.5	0
A _样	2.5	2.99	0.5	0.01

依次添加完试剂后迅速摇匀,在波长 320 nm 处测定吸光度,每隔 30 s 记录一次吸光度,在线性范围内连续记录 10 min,然后计算不同体积比的样品对超氧阴离子自由基(O₂⁻)的清除率。

$$\text{即: } O_2^- \text{ 清除率} (\%) = \frac{V_{\text{空}} - V_{\text{样}}}{V_{\text{空}}} \times 100\%$$

式中: $V_{\text{空}}$ 为邻苯三酚自氧化速率; $V_{\text{样}}$ 为邻苯三酚加入样品后的氧化速率。

3 实验结果

3.1 溶剂的选择

通过查阅大量的相关文献,得出七种提取种子油的常用溶剂,即无水乙醇、石油醚、乙醚、丙酮、正己烷、乙酸乙酯、和三氯甲烷。利用这些溶剂对构树种子油进行提取,实验发现三氯甲烷密度过小,不适合做构树种子油的溶剂,故本实验不予考虑。结果如图 1 所示。

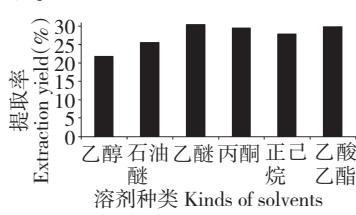


图 1 不同试剂对构树种子油提取率影响

Fig. 1 Effects of different solvents on extraction yield of *B. papyrifera* seed oil

如图 1 所示,丙酮提取率为 29.5%,比乙醚低 0.9%、比乙酸乙酯低 0.3%,但比无水乙醇、石油醚和正己烷的提取率分别高 7.80%、3.95%、1.75%。由于丙酮是提取油脂常用试剂,其沸点比构树种子

油沸点低、密度大、毒性小、同时价格较低,所以选用丙酮提取构树种子油。

3.2 超声波强化提取构树种子油

3.2.1 超声波强度对构树种子油提取率的影响

按实验设计称量研磨构树种子,在不同超声波强度下各自提取 5 min,料液比(g:mL)为 1:10,测定提取率,结果见图 2。

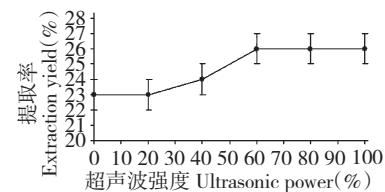


图 2 超声波强度对提取率影响

Fig. 2 Effects of ultrasonic power on extraction yield of *B. papyrifera* seed oil

由图 2 可见,超声波强度越大,构树种子油提取率越高。当超声波强度为 20% 时,构树种子油提取率为 23%,超声波强度为 40% 时,提取率为 24%。这是由于超声波强度越大,空化现象越剧烈,媒质粒子速度和加速度亦越大,界面扩散层上分子扩散就越快^[8],构树种子油脂渗透出来的速度就越大,但当超声波强度达到一定值(60%)时,由于构树种子内渗透压达到平衡,构树种子油提取率便趋于稳定。

3.2.2 料液比对构树种子油提取率影响

在超声波强度为 60%,超声处理时间为 5 min 条件下,比较料液比(g/mL)对提取率的影响,结果如图 3 所示。

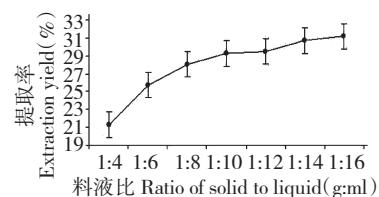


图 3 料液比对提取率影响

Fig. 3 Effects of ratio of solid to liquid on extraction yield of *B. papyrifera* seed oil

由图 3 可知,构树种子油提取率与料液比有关,当料液比(g/mL)为 1:8 时,提取率(28%)要比料液比(g/mL)为 1:4(21.3%)时提取率高 6.7%。因为溶剂量增加,会降低溶剂中构树种子油浓度,增加构树种子油与溶剂接触界面处浓度差,从而提高传质速率,在一定时间内提取率增大。但当料液比为 1:10 时,大部分构树种子油已被提取出,再增加溶

剂用量,提取率基本保持不变,从经济角度考虑,溶剂用量不宜太大^[9]。

3.2.3 超声波提取时间对构树种子油提取率影响

当超声波强度为 60%,料液比(g:mL)为 1:10 时,研究处理时间对构树种子油提取率影响,结果见图 4。

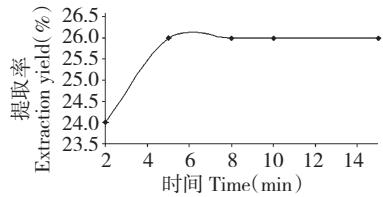


图 4 超声时间对提取率的影响

Fig. 4 Effects of treatment time on extraction yield of *B. papyrifera* seed oil

由图 4 所示,超声波处理时间越长,原料颗粒被粉碎机会越多^[10],油脂浸出越充分。当超声波提取时间为 2 min 时,提取率仅为 24%,而当提取时间增加到 5 min 时,提取率则达 26%。且 5 min 后,体系渗透压达到平衡,提取率趋于稳定。可见超声波能在短时间(5 min)内对构树种子油进行充分提取。

3.2.4 均匀设计实验

在以上单因素提取实验基础上,为了考察多因素综合效应,以超声波强度、料液比、超声提取时间为因素,以均匀设计法观察影响提取率的各个因素。超声波强化提取构树种子油均匀实验设计及结果如下。

表 2 均匀设计实验结果

Table 2 Experimental results of uniform design

序号 No.	强度 Power(%) A	料液比 Ratio of solid to liquid (g/mL) B	时间 Treatment time (min) C	构树种子 油得率 Extraction yield (%)
1	45	1:8	8	24.6
2	55	1:10	44	27.4
3	65	1:12	7	30.2
4	40	1:14	3	27.5
5	50	1:16	6	25.3
6	60	1:18	2	26.0
7	70	1:20	5	26.6

通过均匀设计分析,得到结果如表 2 所示,超声波强化提取构树种子油最优条件为 A₆₅B_{1:12}C₇(实验

3),即超声波强度为 65%,料液比(g/mL)为 1:12,时间为 7 min;各因素对超声波强化提取构树种子油影响大小次序为:超声波强度 > 料液比(g/mL) > 超声时间。

3.3 构树种子油抗氧化活性的测定

3.3.1 DPPH 自由基的清除能力

构树种子油对 DPPH 自由基的清除能力如图 5 所示。由结果可以看出,构树种子油对 DPPH 自由基的清除率随着油浓度的增加而增加,平均清除率高达 91.21%,有显著的清除能力。

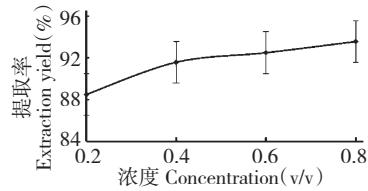


图 5 不同浓度油对 DPPH 自由基的清除率

Fig. 5 Clearance rate of different concentrations of *B. papyrifera* seed oil to DPPH radicals

3.3.2 超氧阴离子自由基(O₂⁻)清除作用

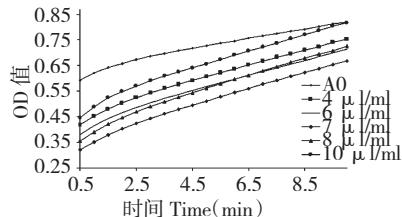


图 6 不同浓度构树种子油对超氧阴离子抑制曲线

Fig. 6 Inhibitory curves of different concentrations of *B. papyrifera* seed oil to superoxide anion

构树种子油对超氧阴离子自由基(O₂⁻)的清除作用结果如图 6 所示,通过计算,得出加入构树种子油后,氧化的速率并没有减小,故构树种子油对超氧阴离子自由基的抑制能力很低。

4 结论

提取油脂理想溶剂具有以下特性:对油脂溶解性好、选择性好;物理、化学性质稳定;无腐蚀性、无毒性;沸点低、易于回收、不残留;价格低廉,来源广泛。实际上目前国内外尚无这种理想溶剂,各种溶剂都有一定优缺点^[10],本文通过对构树种子油最佳溶剂的筛选试验,得出丙酮是提取构树种子油的理想溶剂。

利用超声波产生强烈震动、空化效应等作用,可

提高效率、改善油脂品质、节约原料、提高出油率。因此,把超声波作为生产工艺一种手段,在油脂加工提取中将发挥巨大作用。本文应用超声波强化提取法对构树种子油进行提取,由均匀设计法实验得出构树种子油最佳提取工艺参数为:超声波强度为65%,料液比(g/mL)为1:12,时间为7 min,提取率高达30.2%。

构树种子油具有较好的清除羟基自由基的作用,平均清除率高达91.21%。随着油浓度的增加,抑制率增加。而构树种子油无清除超氧阴离子自由基的能力。

参考文献

- 1 Zheng HZ(郑虎占), Dong ZH(董泽宏), Yu J(余静). Modern Study of Traditional Chinese Medicine(中药现代研究与应用). Beijing: Academy Press, 1999.
- 2 Yuan X(袁晓), Yuan P(袁萍). Study on supercritical carbon dioxide extraction of *Broussonetia papyrifera* seed oil. *Chin Tradit Drug*(中草药), 2005, 36:1136-1138.
- 3 Tao HJ(陶弘景). Transactions of Famous Physicians(名医别录). Beijing: People's Medical Publishing House, 1986.
- 4 Yan XP(严小平), Li CP(李成平), Jin JC(金建昌). Study on optimum extraction of water melon seed oil by ultrasonic oil. *J Chin Cereals Oils Assoc*(中国粮油学报), 2012, 27 (3):53-55.

(上接第1676页)

- 3 Feng CG(冯长根), Chen L(陈凌), Liu X(刘霞). Progress on research of α -glucosidase inhibitor from herbal medicines. *Chin New Drug J*(中国新药杂志), 2005, 14:669-672.
- 4 Zheng D(郑丹). Study on the Huidouba Oral Liquid Preparation. Changchun: Jilin University(吉林大学), Msc. 2011.
- 5 Xu QY(许芹永), Zhu JB(朱靖博), Wang ZZ(王振中), et al. The research of α -glucosidase inhibitors from *Cortex cinnamomi*. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2012, 24:1246-1249.
- 6 Zhao JH(赵劲航), Tian SQ(田淑琴). Study on diabetes mellitus therapeutic effects of traditional Chinese medicine Compound HDB. *Southwest Univ Nation*(西南民族大学学报), 2008, 34:1186-1188.
- 7 Chen YZ(陈燕忠), Fu MY(符美燕), Xie QC(谢清春), et al. Extraction and assaying of Huidouba polysaccharides.

- 5 Wen J(文镜), He SH(贺素华), Yang YY(杨育颖), et al. The *in vitro* experimental method and principles for the elimination of free radicals by health functional foods. *Food Sci*(食品科学), 2004, 25:190-195.
- 6 Wei XY(魏希颖), Xu HX(徐慧娴), Yang XJ(杨小军), et al. Analysis of essential oil of *Forsythia suspense* (Thunb.) Vahl. by GC-MS and its antioxidant activities. *J Shaanxi Normal Univ, Nat Sci Ed*(陕西师范大学学报, 自科版), 2010, 38(1):70-74.
- 7 Chou H(仇海). Microwave extraction and free radical scavenging activity of *Abelmoschus manihot* (L.) Medic seed oil. *Food Sci*(食品科学), 2010, 31:111-113.
- 8 Han JQ(韩军岐), Zhang YL(张有林), Dai GH(戴桂花), et al. Study on the extraction of sunflower seed oil by ultrasonic wave treatment. *J Cereals Oils*(中国粮油学报), 2004, 9:24-25.
- 9 Zhou RJ(周如金), Gu LJ(顾立军), Li ZG(黎周国), et al. Study on ultrasonically aided solvent extraction of walnut oil. *Food Sci*(食品科学), 2003, 24(10):34-37.
- 10 Hu AJ(胡爱军), Qiu TQ(丘泰球), Liang HH(梁汉华). Study on ultrasonically aided solvent extraction of *Coix Lacryma-jobi* seed oil. *Mod Chem Ind*(现代化工), 2002, 22(10):34-37.

Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2011, 17(6):79-82.

- 8 Pierre C, Roland R, Tremblay P. Nitrophenol- α -glucopyranoside as substrate for measurement of maltase activity in human semen. *J Clin Chem*, 1978, 24:208-211.
- 9 Hu FL, Deng CH, Zhang XM. Development of high performance liquid chromatography with immobilized enzyme onto magnetic nanospheres for screening enzyme inhibitor. *J Chromatogr B*, 2008, 871:67-71.
- 10 Zhu WJ(朱文佳), Kou ZN(寇自农), Zhang X(张曦), et al. Study of screening method for α -glucosidase inhibitors *in vitro*. *Food Res Dev*(食品研究与开发), 2012, 33:171-176.
- 11 Li ZM(李知敏), Peng L(彭亮). Inhibitory effect on α -glucosidase of Huidouba extracts *in vitro*. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2012, 23:1379-1380.