

微波辅助法提取紫苏油粕黄酮工艺及其抗氧化性的研究

张 艳,张传智,徐 森,田海娟

(吉林工商学院 粮油食品深加工吉林省高校重点实验室,吉林 长春 130507)

摘 要:本研究以紫苏油粕为原料,利用微波辅助法提取紫苏油粕中的黄酮物质。通过一系列的优化试验,确定最佳工艺参数:料液比1:20(g/mL),乙醇浓度60%,经过60 s、500 W微波辅助处理后,提取率达到3.04%;与传统的醇提取方法对比,其提取率可提高54.31%;提取物在0.05~0.3 mg/mL的范围内,其浓度与羟基、超氧阴离子自由基的清除能力呈量效关系,在浓度为0.3 mg/mL时,两种自由基的清除率分别达75%、77%。本研究为紫苏抗氧化功能的开发利用提供了一定的依据。

关键词:紫苏油粕;微波辅助提取法;黄酮;抗氧化性

中图分类号:TS 229 **文献标识码:**A **文章编号:**1007-7561(2017)06-0021-05

Study on microwave-assisted extraction of flavonoids from perilla oil meal and antioxidation

ZHANG Yan, ZHANG Chuan-zhi, XU Miao, TIAN Hai-juan

(Key Laboratory of Grain and Oil Deep Processing of Jilin province, Jilin Business and Technology College, Changchun Jilin 130507)

Abstract: Flavonoids were extracted from perilla oil meal by microwave-assisted extraction. The results showed that the optimum parameters were as followings: the ratio of solid to liquid was 1:20 g/mL, the ethanol concentration was 60%, the microwave power was 500 W and the microwave time was 60 s. According to the above conditions, the extraction rate could reach 3.04%. Compared with traditional extraction method by ethanol, the extraction rate increased 54.31%. Concentration of the extracts in the range of 0.05~0.3 mg/mL had a remarkable dose-effect relationship with the antioxidant activity. When the concentration of the flavonoids from the perilla oil meal was 0.3 mg/mL, the clearance rate of the hydroxyl radicals and $O_2^- \cdot$ were up to 75%, 77%. The studies provided a basis for the development and utilization on the flavonoids of perilla oil meal.

Key words: perilla oil meal; microwave-assisted extraction; flavonoids; antioxidation

紫苏籽系唇形科一年生草本植物紫苏的成熟果实,含有丰富的脂肪和蛋白质,其中油脂含量为40%~50%,蛋白质含量约为25%^[1],另外还含有黄酮、多酚、迷迭香酸、儿茶素等多种抗氧化成分,对消除自由基、防止脂质过氧化、阻断亚硝基类物质具有一定的作用,对于保健、防衰老有独特的意义^[2]。目前,对紫苏抗氧化成分提取的相关研究很多,但大多都集中在从其根、茎、叶中提取^[3~6],从紫苏籽中提取则鲜有报道。紫苏油粕

是紫苏籽脱脂后的副产品,主要被当作动物饲料、燃料或回收入田充当肥料,紫苏油粕中丰富的抗氧化成分没有得到合理的利用,造成了资源的浪费^[7]。

微波辅助提取法(简称微波法)是在传统溶剂萃取的基础上发展起来可以有效提高萃取率的辅助技术,是利用高频电磁波穿透萃取介质,到达物料的内部维管束和腺胞系统,使细胞破裂,从而使细胞内有效成分自由流出;同时微波产生的电磁场还可加速被萃取成分向萃取溶剂界面扩散,使有效成分在相对较低的温度下以较快的速度被萃取,从

收稿日期:2017-05-09

作者简介:张艳,1976年出生,女,讲师。

而最大限度保证萃取的质量^[8]。具有快速、高效、加热均匀,节省能源的特点^[9]。其操作方便,提取率高,是近几年来出现在功能成分提取方面的新技术之一。本研究采用微波辅助法提取紫苏油粕中抗氧化成分—黄酮,优化工艺参数,与传统的提取方法进行对比分析;并在完成紫苏油粕黄酮微波提取方法的基础上研究紫苏油粕黄酮的抗氧化性,从而为紫苏油粕抗氧化性功能的开发提供一定的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

紫苏油粕:吉林省洮南市百群食品科技有限公司提供。邻二氮菲、硫酸亚铁、冰乙酸、铁氰化钾、氢氧化钠、无水乙醇、硝酸铝、亚硝酸钠等试剂均为分析纯,购于北京蓝弋化学试剂有限公司。芦丁标准品:上海永叶生物科技有限公司。

WGD2S-01 微波发生器:南京三乐微波技术发展有限公司;L5S 紫外-可见分光光度计:上海精密科学仪器厂;20B 万能粉碎机:江阴市普友粉体设备有限公司;PHS-3C pH 计:上海仪器设备有限公司;MS-H-Prot 恒温磁力搅拌器:上海大龙电器有限公司;TDL-5-A 低速大容量离心机:北京安亭科学仪器厂;LGJ-10 冷冻干燥机:北京松原华兴科技发展有限公司;AL204 电子天平:瑞士梅特勒公司。

1.2 实验方法

1.2.1 芦丁标准曲线的绘制:精密称取芦丁标准品 0.025 g,置于 100 mL 容量瓶,加 80% 的乙醇摇匀使之溶解,定容。精密吸取芦丁溶液 0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mL 于 50 mL 容量瓶中,加质量分数为 5% 的亚硝酸钠 1.5 mL,摇匀后放置 6 min,再加质量分数为 10% 的硝酸铝 1.5 mL 摇匀,放置 6 min;加质量分数为 10% 的氢氧化钠溶液 20 mL,再加 80% 的乙醇定容,混匀,放置 15 min。以 80% 的乙醇作为空白对照,在 510 nm 下测其吸光度 3 次,取平均值,以芦丁浓度为横坐标,吸光度为纵坐标作图,绘制标准曲线(见图 1),建立回归方程^[10]。

根据图 1 所示,可得回归方程: $y = 12.897x + 0.0031$,相关系数 $R^2 = 0.999$ 。表明在 0~0.05 mg/mL 范围内芦丁浓度与吸光度值有良好的线性关系,能够进行黄酮类物质的测定。

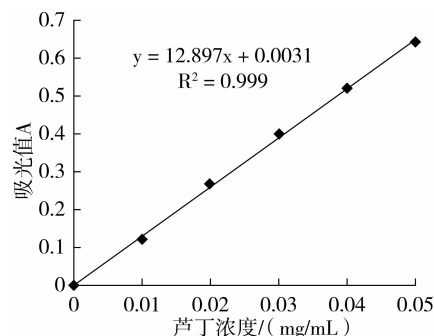


图 1 芦丁标准曲线

1.2.2 紫苏油粕黄酮得率的计算:采用亚硝酸钠—硝酸铝显色法测定紫苏油粕黄酮的得率。公式:

$$\text{紫苏油粕黄酮得率}/\% = \frac{C \times V \times 100}{M} \times 100$$

式中: C 为根据芦丁标准曲线计算出的提取液中黄酮的浓度(g/mL), V 为样品提取液总体积(mL), M 为样品质量(g)。

1.2.3 微波法提取紫苏油粕黄酮工艺流程:紫苏油粕→粉碎→加入乙醇→微波处理→冷却振荡→离心分离→上清液→过滤→浓缩干燥→抗氧化物质。

1.2.4 单因素实验:精确称取一定量的脱脂紫苏油粕粉末,加入乙醇溶液后,进行微波处理,冷却振荡 10 min,再提取紫苏油粕黄酮。根据 1.2.2 的公式,计算紫苏油粕中黄酮的得率。以黄酮得率为评价指标,对料液比(1:5、1:10、1:15、1:20、1:25、1:30 g/mL)、乙醇浓度(15%、30%、45%、60%、75%、90%)、微波功率(100、200、300、400、500、600 W)、微波时间(15、30、45、60、75、90 s)4 个因素分别进行单因素试验,以确定固液比、乙醇浓度、微波功率、微波时间对黄酮得率的影响。

1.2.5 微波提取工艺参数的优化:在单因素试验的基础上,选取 4 因素的 3 水平进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,并进行方差分析和试验验证,从而确定微波法提取紫苏油粕黄酮的最佳工艺参数。

1.2.6 微波法与传统提取法的对比:传统提取法为:准确称取紫苏油粕干粉末 3 份,分别放入三角瓶中,按 1:20 的比例与 60% 的乙醇溶液进行料液配比,将其放入 80 ℃ 的水浴锅中回流提取 2 h,将提取液进行真空抽滤至小于 100 mL,将滤液定容至 100 mL 后在 510 nm 下测其吸光度^[11],根据 1.2.2 计算紫苏油粕黄酮得率,与微波法进行对比分析。

1.2.7 抗氧化性的测定:清除羟自由基的能力。是常用的体外评估物质抗氧化性的方法之一。精密称取待测物,加入乙醇,分别配制成浓度为0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mg/mL溶液,将2 mmol/L FeSO₄溶液1 mL、6 mmol/L水杨酸溶液2 mL、待测溶液2 mL置于10 mL的试管中,立即混匀;再加入0.01% H₂O₂ 1 mL混合均匀。在37℃水浴中反应20 min,在510 nm处测定吸光度。V_c作为阳性对照,羟自由基的清除率(D)公式为: $D/\% = \frac{A_0 - (A_x - A_{x_0})}{A_0} \times 100$ (A₀以乙醇溶剂代替提取物溶液测得的吸光度,A_x为加提取物测得的吸光度,A_{x0}为溶剂代替显色剂H₂O₂测得的吸光度。)^[12]

清除超氧阴离子自由基的能力。把待测物分别按浓度0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mg/mL进行配制,在10 mL试管中,分别加入不同浓度提取物溶液2 mL、磷酸缓冲溶液5 mL、1 mL甲醇,混匀放置20 min,再加入0.5 mmol/L的邻苯三酚溶液1 mL,混匀后在37℃水浴中反应5 min,在350 nm处测定吸光度。以V_c作阳性对照。O₂⁻·的清除率(E)公式如下: $E/\% = \frac{B_0 - (B_x - B_{x_0})}{B_0} \times 100$ (B₀为以乙醇溶剂代替提取物测得的吸光度,B_x为加提取物测得的吸光度,B_{x0}为溶剂代替显色剂邻苯三酚测得的吸光度。)

1.3 数据分析

实验数据采用Excel软件进行处理及作图,SPSS软件进行方差分析。

2 结果与讨论

2.1 单因素试验

2.1.1 料液比对紫苏油粕黄酮得率(以下简称得率)的影响

把脱脂后的紫苏油粕按1:5、1:10、1:15、1:20、1:25、1:30 g/mL的比例与浓度为50%乙醇溶液进行配比,在300 W、50 s的条件下进行微波处理,得率结果见图2。

由图2可知,随着料液比的增大,黄酮得率逐渐上升,当料液比达到1:20后,增幅变缓。这是由于在料液比低的情况下,溶剂量少,导致黄酮类物质溶出少,随着萃取剂的增加,物质充分、快速溶解流出,当料液比达到1:20时,得率随着

料液比的变大增幅又变小,也就是说,料液比在1:20左右时,萃取剂已经很充足。因此在1:15至1:25的料液比范围内提取效果较好,1:20时最佳。

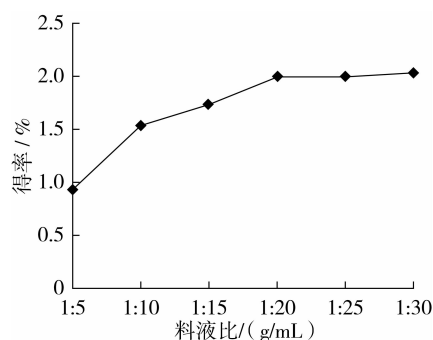


图2 料液比对得率的影响

2.1.2 乙醇浓度对得率的影响

用浓度分别为15%、30%、45%、60%、75%、90%的乙醇溶液按1:10的料液比进行配比,在300 W、50 s的条件下微波处理,得率结果见图3。

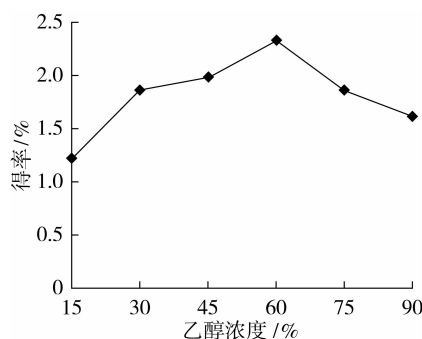


图3 乙醇浓度对得率的影响

由图3可知,随着乙醇浓度的升高,黄酮得率逐渐增大,当浓度达到60%左右,达到最高值,再随着浓度的增加,得率反而略有下降,这是由于乙醇浓度过高可能导致紫苏油粕中的黄酮类物质被破坏,从而使得率下降。结合成本考虑,乙醇的浓度范围选择在30%~60%较为合适。

2.1.3 微波功率对得率的影响

按料液比1:10 g/mL,把脱脂后的紫苏油粕物料与浓度为50%的乙醇溶液进行配比,分别在功率为100、200、300、400、500、600 W的条件下微波处理50 s,冷却后再恒温振荡10 min,计算得率结果见图4。

由图4可知,由于微波这种高频电磁波穿透萃取介质,到达物料的内部,使细胞破裂,且温度升高,细胞内有效成分自由流出。当600 W左右时,

则温度过高,导致部分抗氧化物质降解,从而使黄酮得率略有下降。因此选择微波功率范围在 300 ~ 500 W 较为合适。

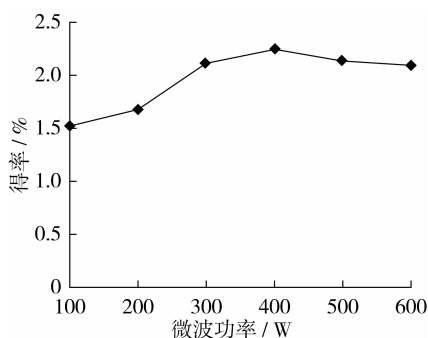


图4 微波功率对得率的影响

2.1.4 微波时间对得率的影响

在同上的条件下,微波功率为 300 W 时,分别微波 15、30、45、60、75、90 s,冷却振荡 10 min 后,提取紫苏油粕黄酮,结果见图 5。

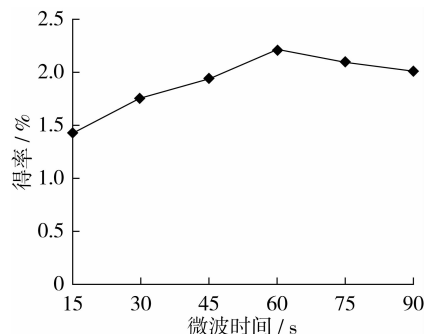


图5 微波时间对得率的影响

由图 5 可知,黄酮的得率随着时间的延长而逐渐增大,60 s 后,提取率略有下降。这是由于随着微波时间的延长,提取温度快速升高,萃取剂及物料都变得不稳定,从而使得率下降。因此选择微波的时间为 45 ~ 75 s 较为合适。

2.2 正交试验优化提取工艺条件

在 2.1 单因素试验结果的基础上,选取 4 因素的 3 水平进行 $L_9(3^4)$ 正交试验(见表 1 和 2),并进行方差分析和试验验证(见表 3),从而确定微波法提取紫苏油粕黄酮的最佳工艺参数。

表 1 正交试验因素水平

水平	料液比 / (g/mL)	乙醇浓度 / %	微波功率 / W	微波时间 / s
1	1 : 15	30	300	45
2	1 : 20	45	400	60
3	1 : 25	60	500	75

表 2 紫苏油粕黄酮提取工艺正交试验结果

序号	A 料液比	B 乙醇浓度	C 微波功率	D 微波时间	抗氧化物提取率 / %
1	1	1	1	1	1.89
2	1	2	2	2	2.91
3	1	3	3	3	2.75
4	2	1	2	3	2.85
5	2	2	3	1	2.56
6	2	3	1	2	2.77
7	3	1	3	2	2.66
8	3	2	1	3	2.53
9	3	3	2	1	2.77
K_1	7.55	7.40	7.19	7.22	
K_2	8.18	8.00	8.24	8.34	
K_3	7.96	8.29	8.26	8.29	
k_1	2.52	2.47	2.40	2.41	
k_2	2.73	2.67	2.75	2.87	
k_3	2.65	2.76	2.75	2.71	
R	0.21	0.29	0.35	0.46	
优方案	A_2	B_3	C_3	D_2	

表 3 方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F 值	F 临界值 $\alpha = 0.05$
料液比	0.07	2	1.00	19.00
乙醇浓度	0.14	2	12.21	19.00
微波功率	0.30	2	19.22	19.00 *
微波时间	0.23	2	27.85	19.00 *
误差	0.07	2		

由表 2、3 可知,影响紫苏油粕抗氧化物提取率的因素由大到小依次是: $D > C > B > A$, 即微波时间 > 微波功率 > 乙醇浓度 > 料液比,且微波的时间、功率具有显著的影响 ($\alpha = 0.05$)。以黄酮得率为评价指标,最佳工艺条件为: $A_2B_3C_3D_2$, 即料液比为 1 : 20,乙醇浓度为 60%,微波功率为 500 W,微波时间 60 s。在上述最佳条件下进行验证实验,经过 3 次实验,平均提取率为 3.04%。

2.3 微波提取法与传统提取法的对比分析

根据 1.2.6,用传统方法提取紫苏油粕中的黄酮,结果显示提取率为 1.97%,而微波提取法可得到的最佳提取率为 3.04%。比较两者,微波法较传统方法提高提取率 54.31%。在相同乙醇浓度时,微波法比传统提取法乙醇溶液用量少;在提取时间方面,传统法需 30 min 的提取时间,微波法 11 min 即能达到理想的提取效果。结果见表 4。由此可知:以黄酮得率为判断标准,使用微波提取法提取紫苏油粕抗氧化物质优于传统的提取方法。

表4 2种提取紫苏黄酮方法的比较

项目	料液比 (g/mL)	乙醇 浓度 /%	提取 功率 /W	提取 时间 /min	黄酮 得率 /%	相对乙醇 法提高率 /%
传统提取法	1:30	60	—	30	1.97	—
微波辅助提取法	1:20	60	500	11(10+1)	3.04	54.31

2.4 抗氧化性的测定

2.4.1 清除羟自由基的能力

羟基自由基是活性氧中最活泼的氧自由基之一,它几乎能与活细胞中任何分子发生反应,引发组织细胞病变,导致各种疾病发生和加速机体衰老。减少此类自由基可预防衰老、心血管疾病,并具有防癌抗癌的作用。如图6所示,提取的紫苏油粕抗氧化物浓度与羟自由基的清除能力呈量效关系,当浓度达0.3 mg/mL时,清除率可达75%。在0.05~0.3 mg/mL范围内与Vc相比较,清除自由基能力略低但接近于Vc。由此可知紫苏油粕抗氧化物对羟自由基有一定的清除能力。

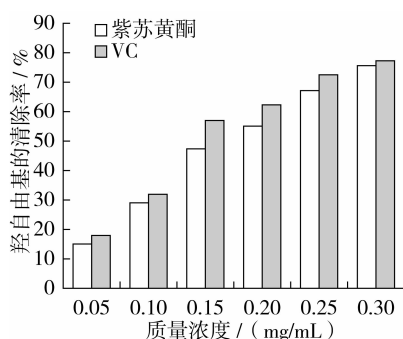


图6 清除羟自由基的能力

2.4.2 清除超氧阴离子自由基的能力

如图7所示,在所测定浓度范围内,紫苏油粕抗氧化物对超氧阴离子自由基有明显的清除作用,并且随浓度的增加呈增大的趋势,但清除能力低于Vc,其活性相对较弱。在浓度0.3 mg/mL时其清除率已经达到77%。

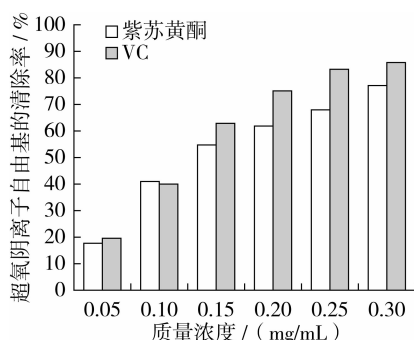


图7 清除超氧阴离子自由基的能力

3 结论

微波辅助法提取紫苏油粕黄酮的最佳工艺条件为用浓度60%乙醇,按1:20 g/mL的比例进行料液配比,经过60 s、500 W微波处理,得率达到3.04%,与传统的提取方法相对比,其黄酮得率提高54.31%。紫苏油粕黄酮对羟基、超氧阴离子自由基具有一定的清除能力。在0.05~0.3 mg/mL的范围内,其清除能力与抗氧化物的浓度呈良好的量效关系。与Vc相比较,清除羟基自由基能力接近于Vc;清除超氧阴离子自由基的能力则低于Vc。在浓度为0.3 mg/mL时,对两种自由基的清除率分别可达75%、77%。

参考文献:

- [1]徐冰冰,王瑛瑶,刘建学,等. 油用紫苏籽的综合利用[J]. 农业机械,2012(21):45-47.
- [2]宋继伟. 紫苏籽饼粕黄酮类物质的提取及抗菌性研究[D]. 长春:吉林农业大学,2014.
- [3]张燕平,戴志远,陈肖毅. 紫苏提取物体外清除自由基能力的研究[J]. 食品工业科技,2003,24(10):67-70.
- [4]Tae Young Kwon, Ji Su Park, Mun Yhung Jung. Headspace - Solid Phase Microextraction - Gas Chromatography - Tandem Mass Spectrometry (HS - SPME - GC - MS ~ 2) Method for the Determination of Pyrazines in Perilla Seed Oils; Impact of Roasting on the Pyrazines in Perilla Seed Oils[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013,36:61-66
- [5]Weizhuo Tang, Baoshan Sun, Yuqing Zhao. Preparative separation and purification of rosmarinic acid from perilla seed meal via combined column chromatography[J]. Journal of chromatography, B. Analytical technologies in the biomedical and life sciences, 2014(5):947-948.
- [6]陈惠,许妍姬,崔承弼,等. 超声辅助提取强抗氧化性的紫苏叶工艺条件研究[J]. 安徽农业科学,2014,42(15):4618-4620.
- [7]吕耀平,王小芬,张小平. 利用紫苏子提取物作为异育银鲫饲料添加剂的生产试验[J]. 中国饲料,2007(8):33-38.
- [8]严炎中. 微波法在中药有效成分提取中的应用特点[J]. 海峡药学,2003,15(6):91-92
- [9]方婧,付梅红,杨洪军,等. 微波协助提取在中药饮片含量测定中的应用(1) - 微波法与药典法测定黄芩苷含量比较研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(21):46-48.
- [10]李小芳,冯小强,杨声,等. 决明子抗氧化成分提取工艺的优化及性能测定[J]. 湖南农业科学,2012(17):96-98.
- [11]丁友芳. 紫苏种子质量标准及其醇提物的生物活性研究[D]. 北京:北京林业大学,2012.
- [12]张福平,马瑞君,王季梅,等. 蓬雾叶黄酮类化合物微波提取工艺及其抗氧化性研究[J]. 广东农业科学,2011,52(22):91-