

综合利用

超声辅助提取葵花籽黄酮及其抗氧化活性研究

张海容, 贺泽民, 高瑞苑, 陈金娥

(忻州师范学院 生化分析技术研究所, 山西 忻州 034000)

摘要:研究了超声辅助提取葵花籽黄酮的最佳工艺。通过单因素实验选取超声功率、提取温度、液料比、提取时间为考察因素,利用响应面法 Box - Behnken 设计对提取葵花籽黄酮工艺参数进行优化,并用 DPPH · 法评价葵花籽黄酮体外抗氧化活性。结果表明:超声辅助提取葵花籽黄酮的最优工艺参数为超声功率 120 W、提取温度 64 °C、液料比 33:1、提取时间 28 min,在此条件下,葵花籽黄酮得率为 1.91%;葵花籽黄酮对 DPPH · 清除率 IC_{50} 为 0.09 mg/mL,优于食品抗氧化剂 BHT 对 DPPH · 清除率 (IC_{50} 为 0.11 mg/mL);与传统的索氏提取法对比,超声辅助法提取葵花籽黄酮时间短、节能和得率高。

关键词:葵花籽粕;黄酮;提取;超声辅助;抗氧化活性

中图分类号:TS229;TQ646

文献标识码:A

文章编号:1003 - 7969(2018)08 - 0133 - 05

Ultrasound - assisted extraction of flavonoids from sunflower seed meal and its antioxidant activity

ZHANG Hairong, HE Zemin, GAO Ruiyuan, CHEN Jin'e

(Laboratory of Biochemical Analysis, Xinzhou Teachers University, Xinzhou 034000, Shanxi, China)

Abstract: The optimal technology of ultrasound - assisted extraction of sunflower seed flavonoids was studied. The ultrasonic power, extraction temperature, liquid - material ratio and extraction time were selected as factors by single factor experiment, and the process parameters of extraction of flavonoids from sunflower seed meal were optimized by response surface methodology with Box - Behnken design. The results showed that the optimal extraction parameters of flavonoids from sunflower seed meal were obtained as follows: ultrasonic power 120 W, extraction temperature 64 °C, liquid - material ratio 33:1 and extraction time 28 min. Under these conditions, the sunflower seed flavonoids yield was 1.91%. The IC_{50} of sunflower seed flavonoids on DPPH · was 0.09 mg/mL, which was better than that of food antioxidant BHT (the IC_{50} was 0.11 mg/mL). Compared with the traditional Soxhlet extraction method, ultrasound - assisted extraction of sunflower seed flavonoids had the advantages of short time, energy saving and high yield.

Key words: sunflower seed meal; flavonoids; extraction; ultrasound - assist; antioxidant activity

葵花籽粕是葵花籽榨取油脂后的副产物,我国葵花籽粕的年产量超过 40 万 t^[1]。葵花籽粕有较高营养价值,一般含粗蛋白质 28% ~ 32%、粗纤维 20%,除含有丰富 B 族维生素、色素、常量元素钙、

磷及微量元素锌、铁外,还含有广泛药理价值的绿原酸、黄酮化合物^[2]。目前,关于葵花籽粕开发利用主要集中在植物蛋白^[3-8]及绿原酸^[9-10]提取分离研究,大量的葵花籽粕被当作垃圾处理或者作为动物饲料被利用,造成了一定的环境污染^[11],高附加值产品尚不多见。

黄酮类化合物广泛地存在于自然植物中,以游离态或与糖结合为苷的形式^[12]存在,能防治心脑血管疾病和呼吸系统的疾病,具有抗炎抑菌、降血糖、

收稿日期:2017 - 12 - 17;修回日期:2018 - 04 - 21

基金项目:山西省科技厅软科学研究计划(2017041015 - 2);

山西省教育厅 1331 工程优势学科化学(2017)资助

作者简介:张海容(1957),男,教授,博士,研究方向为有机分析(E-mail)hairong1015@163.com。

抗氧化、抗辐射、抗癌、抗肿瘤以及增强免疫力等多种药理作用^[13]。经文献^[11-16]查阅,对葵花籽粕中黄酮类化合物提取分离尚未见报道。因此,本文采用超声辅助法提取葵花籽黄酮,以期为葵花籽粕综合利用及生产高附加值产品提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

葵花籽粕,取自山西忻州油料加工基地;芦丁标准品、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、95%乙醇、无水乙醇、石油醚,均为分析纯;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH),分析纯,日本东京化成工业株式会社;2,6-二叔丁基对甲酚(BHT),化学纯。

1.1.2 仪器与设备

SL-100型高速多功能粉碎机;UV-1800型紫外检测器(日本岛津);HH-2型数显恒温水浴锅;分析天平;SL01型低速离心机;SB-5200DTDN型超声波清洗器。

1.2 实验方法

1.2.1 葵花籽粕预处理

将葵花籽粕在50℃下烘干6h,用粉碎机粉碎后过40目筛,用石油醚进一步脱脂,置于通风处挥干溶剂,制得葵花籽粕粉,密封、保存待用。

1.2.2 超声辅助提取葵花籽黄酮

称取1g葵花籽粕粉置于150mL三角烧瓶中,加入一定体积的95%乙醇,封口膜封口后,按设定的实验条件进行超声提取,超声结束后将提取液置于4000r/min离心机离心,最后用95%乙醇定容到100mL容量瓶中,冰箱保存、待用。

1.2.3 芦丁标准曲线绘制

按照文献^[11]方法,准确称取0.1000g芦丁标准品,用95%乙醇溶解、定容于100mL容量瓶中,制成1.0mg/mL储备液,然后稀释成100μg/mL工作液,待用。准确吸取芦丁工作液0、1、2、3、4、5、6mL于10mL比色管中,分别加入5%亚硝酸钠溶液0.5mL,10%硝酸铝溶液0.5mL,再加入4%的氢氧化钠溶液4.0mL,用50%乙醇定容。以第一支试管芦丁样品浓度为零作空白参比,在波长510nm处测吸光度,并以吸光度A为纵坐标,芦丁质量浓度C(μg/mL)为横坐标绘制标准曲线,得回归方程为 $A = 0.010C + 0.006$, $R^2 = 0.9980$ 。

1.2.4 葵花籽黄酮的测定

准确移取2mL提取液至10mL比色管中,按1.2.3的方法依次添加5%亚硝酸钠溶液0.5mL,10%硝酸铝溶液0.5mL,4%的氢氧化钠溶液4.0

mL,用50%乙醇定容,以相同质量浓度提取液为参比,在最大吸收波长510nm处测其吸光度,代入回归方程计算黄酮质量浓度。黄酮得率计算公式如下:

$$\text{黄酮得率} = \frac{C \times E \times F}{10^6 W} \times 100\%$$

式中:C为葵花籽粕提取液测得黄酮质量浓度,μg/mL;E为稀释倍数;F为葵花籽黄酮提取液体积,mL;W为葵花籽粕粉质量,g。

1.2.5 索氏提取法提取葵花籽黄酮

称取1g葵花籽粕粉于滤纸上,卷为略松散的柱状,开口端折叠密封,然后放入索氏提取器中。将150mL圆底烧瓶安装于恒温水浴锅上,放入1~2粒沸石,加入66mL95%乙醇,80℃加热回流9h,冷却、定容,测样品吸光度。

1.2.6 DPPH法测定葵花籽黄酮抗氧化活性

用DPPH法测定葵花籽黄酮的抗氧化活性,用BHT进行对照。准确移取2mL0.15mg/mL DPPH溶液于10mL比色管中,然后加入一定体积的葵花籽黄酮提取液或BHT溶液,定容,反应30min,在517nm处测其吸光度,计算DPPH·清除率。

$$\text{DPPH} \cdot \text{清除率} = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100\%$$

式中: A_0 为未加葵花籽黄酮提取液或BHT溶液的吸光度; A_1 为加入葵花籽黄酮提取液或BHT溶液体系的吸光度,测定时以等质量浓度葵花籽黄酮提取液或BHT溶液作参比。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 提取时间的影响

设定液料比30:1、超声功率120W、提取温度40℃,分别在10、20、30、40、50、60min的提取时间下提取葵花籽黄酮,结果见图1。

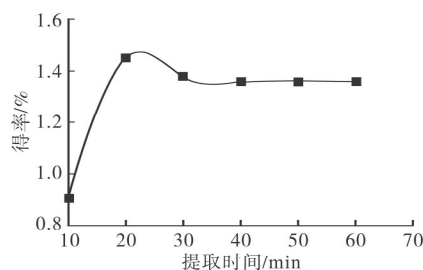


图1 提取时间对葵花籽黄酮得率的影响

由图1可知,提取时间在10~20min范围内,葵花籽黄酮得率增加明显。超过20min略有下降;当提取时间超过30min黄酮得率基本保持不变。因此,选择20min为葵花籽黄酮最佳提取时间。

2.1.2 超声功率的影响

设定液料比 30:1、提取时间 20 min、提取温度 40℃,分别在 80、120、160、200 W 的超声功率下提取葵花籽黄酮,结果见图 2。

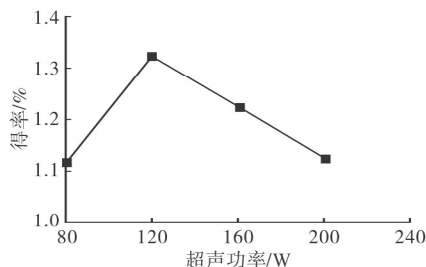


图2 超声功率对葵花籽黄酮得率的影响

由图 2 可知,超声功率在 80~120 W 范围内,葵花籽黄酮得率随超声功率增大不断增加;超过 120 W 后,随超声功率增加黄酮得率逐渐下降。因此,选择 120 W 为最佳超声功率。

2.1.3 液料比的影响

设定提取时间 20 min、超声功率 120 W、提取温度 40℃,分别在 10:1、20:1、30:1、40:1、50:1、60:1 液料比下提取葵花籽黄酮,结果见图 3。

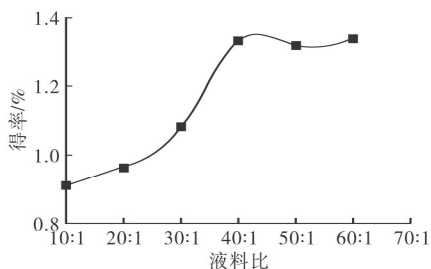


图3 液料比对葵花籽黄酮得率的影响

由图 3 可知,液料比在 10:1~40:1 时,随液料比增大,葵花籽黄酮得率不断增大,当液料比超过 40:1 后,随着液料比的增加黄酮得率基本保持不变。因此,选择 40:1 为最佳液料比。

2.1.4 提取温度的影响

设定液料比 40:1、提取时间 20 min、超声功率 120 W,分别在 30、40、50、60℃ 和 70℃ 提取温度下提取葵花籽黄酮,结果见图 4。

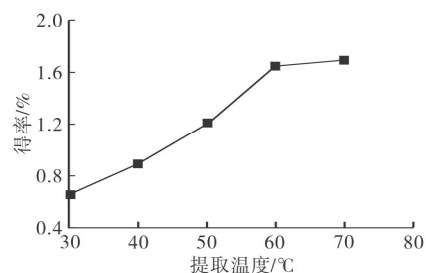


图4 提取温度对葵花籽黄酮得率的影响

由图 4 可知,提取温度在 30~60℃ 时,黄酮得

率随提取温度升高不断上升,随后基本保持不变。实验表明,温度升高有利于黄酮分离的固液传质过程。因此,选择提取温度为 60℃。

2.2 响应面优化实验

2.2.1 响应面实验设计及结果

根据单因素实验结果,设计四因素三水平响应面实验方案。选择超声功率(A)、提取温度(B)、液料比(C)和提取时间(D)为自变量,黄酮得率(Y)为响应值,响应面因素水平见表 1。响应面实验设计及结果见表 2。

表 1 响应面因素水平

水平	A/W	B/°C	C	D/min
-1	80	50	30:1	10
0	120	60	40:1	20
1	60	70	50:1	30

表 2 响应面实验设计及结果

实验号	A	B	C	D	Y/%
1	-1	-1	0	0	1.532
2	1	-1	0	0	1.522
3	-1	1	0	0	1.747
4	1	1	0	0	1.750
5	0	0	-1	-1	1.643
6	0	0	1	-1	1.652
7	0	0	-1	1	1.862
8	0	0	1	1	1.910
9	-1	0	0	-1	1.410
10	1	0	0	-1	1.587
11	-1	0	0	1	1.875
12	1	0	0	1	1.820
13	0	-1	-1	0	1.583
14	0	1	-1	0	1.910
15	0	-1	1	0	1.435
16	0	1	1	0	1.545
17	-1	0	-1	0	1.687
18	1	0	-1	0	1.702
19	-1	0	1	0	1.725
20	1	0	1	0	1.915
21	0	-1	0	-1	1.512
22	0	1	0	-1	1.485
23	0	-1	0	1	1.562
24	0	1	0	1	1.765
25	0	0	0	0	1.875
26	0	0	0	0	1.868
27	0	0	0	0	1.870
28	0	0	0	0	1.872
29	0	0	0	0	1.872

利用 Design - Expert 软件程序,对表 2 中响应面黄酮得率(Y)实验数据进行多元回归拟合,得到

多元二次回归模型方程: $Y = 1.87 + 0.027A + 0.088B - 0.017C + 0.13D + 3.25 \times 10^{-3}AB + 0.044AC - 0.058AD - 0.054BC + 0.057BD + 9.75 \times 10^{-3}CD - 0.074A^2 - 0.19B^2 - 0.037C^2 - 0.098D^2$, 回归模型方差分析见表3。

表3 回归模型方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	0.610	14	0.043	4.79	0.003 0
A	8.53×10^{-3}	1	8.53×10^{-3}	0.95	0.347 3
B	0.093	1	0.093	10.30	0.006 3
C	3.50×10^{-3}	1	3.50×10^{-3}	0.39	0.543 3
D	0.19	1	0.19	20.92	0.000 4
AB	4.22×10^{-5}	1	4.22×10^{-5}	4.68×10^{-3}	0.946 4
AC	7.65×10^{-3}	1	7.65×10^{-3}	0.85	0.372 6
AD	0.013	1	0.013	1.49	0.242 2
BC	0.012	1	0.012	1.30	0.272 5
BD	0.013	1	0.013	1.47	0.246 1
CD	3.80×10^{-4}	1	3.80×10^{-4}	0.04	0.840 3
A ²	0.036	1	0.036	3.94	0.067 1
B ²	0.230	1	0.230	25.83	0.000 2
C ²	8.83×10^{-3}	1	8.83×10^{-3}	0.98	0.339 2
D ²	0.062	1	0.062	6.86	0.020 2
残差	0.130	14	9.02×10^{-3}		
失拟项	0.130	10	0.013	1.86	0.770 8
纯误差	2.72×10^{-3}	4	6.80×10^{-3}		
总变异	0.73	28			

注: $P < 0.01$ 为差异极显著; $P < 0.05$ 为差异显著。

由表3可知,本实验所选模型差异极显著($P < 0.01$),表明回归方程模型与实际实验拟合性较好。实验表明,用响应面法优化葵花籽黄酮提取工艺可靠、稳定性较好,所得模型方程能较好地预测实验结果。模型的一次项B、D差异极显著,交互项差异不显著;二次项B²差异极显著;失拟项 $P > 0.05$ 不显著。分析P值知各因素的主效应关系为:提取时间 > 提取温度 > 超声功率 > 液料比,提取时间和提取温度起主导作用,与单因素实验结果一致。

2.2.2 最佳工艺条件确定

对多元二次回归方程求一阶偏导,得到在超声功率133 W、提取温度64℃、液料比33:1、提取时间28 min的条件下,葵花籽黄酮得率最大,为1.94%。根据实际设备条件,将优化提取条件修正为:超声功率120 W,提取温度64℃,液料比33:1,提取时间28 min。3次验证实验得到葵花籽黄酮得率为1.91%,与模型理论值相接近。

2.2.3 超声辅助提取法和索氏提取法对比实验

称取1 g葵花籽粕,分别用索氏提取法和超声辅助法(2.2.2中最优条件)对葵花籽黄酮提取结果

进行对比,实验结果见表4。

表4 索氏提取法和超声辅助提取法实验对比结果

项目	索氏提取法	超声辅助提取法
超声功率/W	-	120
提取温度/℃	80	64
液料比	66:1	33:1
提取时间/min	540	28
黄酮得率/%	1.55	1.91

由表4可知,采用传统的索氏提取法,葵花籽黄酮得率为1.55%,低于超声辅助提取法。通过对比实验,体现了超声辅助提取法用时短、效率高和得率高的特征,优于索氏提取法。

2.3 葵花籽黄酮对DPPH·的清除率

实验对比测定了葵花籽黄酮提取液与BHT溶液对DPPH·的清除能力,结果见图5。

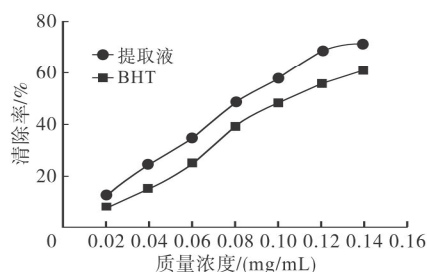


图5 葵花籽黄酮与BHT对DPPH·的清除率

由图5可知,葵花籽黄酮提取液对DPPH·的清除率高于相同质量浓度条件下BHT对DPPH·的清除率,说明葵花籽黄酮提取液有较强的抗氧化活性。质量浓度为0.14 mg/mL时,葵花籽黄酮对DPPH·的最大清除率为71.2%,而BHT为60.7%。数据经线性回归处理、计算可知,葵花籽黄酮对DPPH·清除率的IC₅₀为0.09 mg/mL, BHT对DPPH·清除率的IC₅₀为0.11 mg/mL。

3 结论

(1)通过响应面法优化超声辅助提取葵花籽黄酮确定的最优工艺参数为:超声功率120 W,提取温度64℃,液料比33:1,提取时间28 min。在最优条件下,葵花籽黄酮得率可达1.91%,优于索氏提取法(1.55%)。

(2)抗氧化性实验研究表明,质量浓度为0.14 mg/mL,葵花籽黄酮对DPPH·的最大清除率为71.2%,而BHT为60.7%。葵花籽黄酮对DPPH·清除率的IC₅₀为0.09 mg/mL, BHT对DPPH·清除率的IC₅₀为0.11 mg/mL,表明葵花籽黄酮的抗氧化活性较强。

(下转第142页)

- trosc, 2014, 72(72):72-78.
- [22] FOCA G, FERRARI C, ULRICI A, et al. Iodine value and fatty acids determination on pig fat samples by FT-NIR spectroscopy [J]. Food Anal Methods, 2016, 9(10):1-16.
- [23] RAO Y, XIANG B, ZHOU X, et al. Quantitative and qualitative determination of acid value of peanut oil using near-infrared spectrometry [J]. J Food Eng, 2009, 93(2):249-252.
- [24] 王立琦,张礼勇,朱秀超.大豆油脂过氧化值的近红外光谱分析[J].食品科学,2010,31(6):205-207.
- [25] DA COSTA G B, FERNANDES D D, GOMES A A, et al. Using near infrared spectroscopy to classify soybean oil according to expiration date [J]. Food Chem, 2016, 196:539-543.
- [26] 毕艳兰,鲍丹青,田原,等.利用傅里叶近红外技术快速测定食用植物油的过氧化值[J].中国油脂,2009,34(3):71-74.
- [27] YASUSHI E, MISAKO T, KENICHIRO K. Rapid determination of iodine value and saponification value of fish oil by near infrared spectroscopy [J]. J Food Sci, 2010, 70(2):C127-C131.
- [28] CERTZ C, FIEBIG H J, HANCOCK J N S. FT-near infrared(NIR) spectroscopy - Screening analysis of used frying fats and oils for rapid determination of polar compounds, polymerized triacylglycerols, acid value and anisidine value [DGF C - VI 21a(13)] [J]. Eur J Lipid Sci Tech, 2013, 115(10):1193-1197.
- [29] WANG L, LEE F S C, WANG X, et al. Feasibility study of quantifying and discriminating soybean oil adulteration in camellia oils by attenuated total reflectance MIR and fiber optic diffuse reflectance NIR [J]. J Agric Food Chem, 2005, 53(16):6201-6206.
- [30] KARUNATHILAKA S R, KIA A F, SRIGLEY C, et al. Nontargeted, rapid screening of extra virgin olive oil products for authenticity using near-infrared spectroscopy in combination with conformity index and multivariate statistical analyses [J]. J Food Sci, 2016, 81(10):2390-2397.
- [31] DVOŘÁK L, LUŽOVÁ T, ŠUSTOVÁK. Comparison of butter quality parameters available on the Czech market with the use of FT-NIR technology [J]. Mljekarstvo, 2016, 66(1):73-80.
- [32] MOSSOBA M M, AZIZIAN H, TYBURCZY C, et al. Rapid FT-NIR analysis of edible oils for total SFA, MUFA, PUFA, and *trans* FA with comparison to GC [J]. J Am Oil Chem Soc, 2013, 90(6):757-770.
- [33] WAN L S, SUN H Q, NI Z B, et al. Rapid determination of oil quantity in intact rapeseeds using near-infrared spectroscopy [J]. J Food Pro Eng, 2018, 41(1):e12594.
- [34] 商连光,李军会,王玉美,等.棉籽油分含量近红外无损检测分析模型与应用[J].光谱学与光谱分析,2015,35(3):609-612.
- [35] 崔志立,谢锦春,王南,等.近红外单籽粒玉米油分无损测定仪器研制[J].光谱学与光谱分析,2005,25(11):1807-1809.

(上接第136页)

参考文献:

- [1] 张维农,刘大川.向日葵籽资源的综合开发[J].武汉工业学院学报,2002(1):29-30,35.
- [2] 高荣丽,陶冠军,杨严俊.葵花籽粕的综合利用[J].食品工业科技,2006,27(7):138-140.
- [3] 董聪,李芳,王琳,等.超声波预处理葵花籽粕蛋白制备抗氧化多肽的研究[J].食品研究与开发,2015,36(24):10-14.
- [4] 郭婷婷,万楚筠,黄凤洪,等.葵花籽粕酶法制备多肽的湿热预处理研究[J].中国油脂,2017,42(11):61-64.
- [5] 加列西·马那甫,德娜·吐热汗,景伟文.葵花籽粕蛋白质、绿原酸分步提取工艺参数优化[J].分子科学学报,2014,30(2):112-117.
- [6] 徐姗姗,阮美娟,李广鹏.葵花籽粕多肽的提取工艺研究[J].食品工业科技,2012,33(20):245-247.
- [7] 刘刚,王春燕,宋阳成.葵花籽粕中蛋白质提取工艺的优化[J].长春师范学院学报(自然科学版),2011,30(3):82-85.
- [8] 刘文静,张雪,李鑫一,等.葵花籽粕中热变性蛋白粉制备工艺的研究[J].粮食与油脂,2017,30(11):79-82.
- [9] 李彩云,康健,刘晓娜,等.微波超声辅助优化葵花籽粕绿原酸的提取工艺[J].中国油脂,2016,41(2):88-91.
- [10] 杜延兵,裘爱泳,逯昕.葵花粕中绿原酸提取工艺的研究[J].中国油脂,2006,31(2):37-40.
- [11] 张海容,史振华.响应面法优化超声波辅助提取沙棘籽粕中黄酮工艺[J].中国油脂,2017,42(3):117-121.
- [12] 闵巍巍,张作法.黄酮类化合物的药理作用[J].蚕桑通报,2007,38(4):101-103.
- [13] 曹伟国,刘志勤,邵云,等.黄酮类化合物药理作用的研究进展[J].西北植物学报,2003,23(12):2241-2247.
- [14] 张斌,许莉.超声萃取技术研究与应用进展[J].浙江工业大学学报,2008,36(5):558-561.
- [15] 熊科,夏延斌,刘蓉,等.响应面法优化超声波强化提取醇溶性 β -胡萝卜素[J].食品科学,2008,29(3):140-144.
- [16] 蔡文,谭兴和,张喻,等.超声辅助提取蜜柑皮总黄酮的工艺优化研究[J].农产品加工,2014(5):1-4.