

琉璃苣籽油的萃取及对力竭运动大鼠骨骼肌 抗氧化酶活性的影响

周松峰, 房磊

(吉林农业科技学院, 长春 130000)

摘要: 为了促进琉璃苣籽油的开发利用, 以琉璃苣籽为原料, 采用亚临界丁烷萃取琉璃苣籽油, 通过单因素实验研究液料比、萃取温度、萃取时间对琉璃苣籽油萃取率的影响, 通过响应面实验对琉璃苣籽油萃取工艺条件进行优化, 并对最佳条件下萃取的琉璃苣籽油脂肪酸组成进行分析。将SD大鼠平均分成5组, 对照组不进行训练, 剩余4组进行力竭运动训练, 低、中、高剂量组每日灌胃10、15、20 mg/g琉璃苣籽油, 力竭运动组每日灌胃15 mg/g蒸馏水, 对照组正常饮水, 实验结束后测定大鼠骨骼肌中抗氧化酶活性, 考察琉璃苣籽油对力竭运动大鼠骨骼肌抗氧化酶活性的影响。结果表明: 琉璃苣籽油最佳萃取工艺条件为液料比6.2:1、萃取温度41℃、萃取时间53 min, 在该条件下琉璃苣籽油萃取率为35.32%; 琉璃苣籽油中不饱和脂肪酸含量为85.51%; 琉璃苣籽油可以恢复骨骼肌中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性, 降低骨骼肌中丙二醛(MDA)含量。琉璃苣籽油可以提高力竭运动大鼠骨骼肌抗氧化酶活性, 提高机体清除自由基的能力, 减少对机体细胞的损伤。

关键词: 琉璃苣籽油; 力竭运动; 骨骼肌; 抗氧化酶

中图分类号: TS225.1; TS224

文献标识码: A

文章编号: 1003-7969(2022)12-0015-05

Extraction of borage seed oil and its effect on antioxidant enzyme activity of skeletal muscle in exhaustive exercise rats

ZHOU Songfeng, FANG Lei

(Jilin Agricultural Science and Technology University, Changchun 130000, China)

Abstract: In order to promote the development and utilization of borage seed oil, taking borage seed as raw material, the borage seed oil was extracted with the subcritical butane extraction method. The effects of liquid-material ratio, extraction temperature and extraction time on the extraction rate of borage seed oil were studied by single factor experiment. The extraction conditions of borage seed oil were optimized by response surface methodology. The fatty acid composition of the borage seed oil was analyzed. In addition, SD rats were divided into five groups on average. The control group did not receive training, and the remaining four groups received exhaustive exercise training. The low, medium and high dose groups were gavaged with 10, 15 mg/g and 20 mg/g borage seed oil every day, the exhaustive exercise group was gavaged with 15 mg/g distilled water every day, and the control group drank water normally. After the experiment, the activity of antioxidant enzymes in the skeletal muscle of the rats was determined to investigate the effect of borage seed oil on the activity of antioxidant enzymes in the skeletal muscle of exhausted exercise rats. The results showed that the optimum extraction conditions of borage seed oil were as follows: liquid-material ratio 6.2:1, extraction temperature 41℃, extraction time 53 min. Under

these conditions, the extraction rate of borage seed oil was 35.32%. The content of unsaturated fatty acids in borage seed oil was 85.51%. The borage seed oil could restore the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT)

收稿日期: 2022-03-15; 修回日期: 2022-08-25

基金项目: 2022年度吉林省教育厅项目资助(JJKH20220382SK)

作者简介: 周松峰(1970), 男, 讲师, 硕士, 主要从事运动营养保健研究工作(E-mail: jlna0431@163.com)。

and glutathione peroxidase (GSH - Px) in skeletal muscle, and reduce the content of malondialdehyde (MDA) in skeletal muscle. Borage seed oil can increase the activity of antioxidant enzymes in skeletal muscle of exhausted exercise rats, improve the body's ability to scavenge free radicals and reduce the damage to body cells.

Key words: borage seed oil; exhaustive exercise; skeletal muscle; antioxidant enzyme

琉璃苣 (*Borago officinalis*) 为一年一季的草本植物,属于紫草科,主要产地在欧洲和小亚细亚等区域^[1-2]。目前,琉璃苣作为特种油料作物在我国西北地区大量种植和栽培。琉璃苣籽中富含维生素、脂肪、蛋白质等^[3]。研究表明,琉璃苣籽中油脂含量在 35% 左右,琉璃苣籽油中油酸、亚油酸和 γ -亚麻酸含量约为 20%、36% 和 20%^[4]。与其他草本植物油相比,琉璃苣籽油中 γ -亚麻酸含量较为丰富,而 γ -亚麻酸可以参与人体的一系列代谢和生物合成,具有降血脂、降血压、抗菌消炎、增强机体免疫力、抗肿瘤等多种功效,应用前景广阔^[5]。

植物油脂提取的常用方法有压榨法、有机溶剂提取法、微波或超声波辅助萃取法等^[6]。而亚临界丁烷萃取是目前研究较为成熟的一种油脂分离技术,可以较好地保留油脂内的有效成分^[7-8]。本文以琉璃苣籽为原料,采用亚临界丁烷萃取琉璃苣籽油,通过单因素实验和响应面实验对萃取条件进行优化,同时对大鼠灌胃琉璃苣籽油,建立大鼠运动模型,研究琉璃苣籽油对大鼠骨骼肌抗氧化酶活性的影响,以期为琉璃苣籽油的开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

琉璃苣籽,兰州沃特莱斯生物科技有限公司;丁烷(纯度 >99%),青岛贵达特种气体有限公司;正己烷,分析纯;超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH - Px)检测试剂盒,南京建成生物科技公司。

SPF 级 5 周龄雄性 SD 大鼠 50 只,体质量为 (180 ± 10)g,许可证号 SCXK(粤)2020 - 0050,由广州市白云区穗北实验动物养殖场提供。

JBS - 10 型亚临界萃取仪,海南建邦制药科技有限公司;N - 1200BV - W 型旋转蒸发仪,深圳市科力易翔仪器设备有限公司;AP135W 型电子天平,惠州市华高仪器设备有限公司;GI513 型粉碎机,颖上卓越电子商务有限公司;DZF - 6020 型鼓风干燥箱,甘易仪器设备(上海)有限公司;KW - PT - 6 型实验跑台,南京卡尔文生物科技有限公司;7890A 型

气相色谱仪,俊齐仪器设备(上海)有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 琉璃苣籽油的萃取

参考文献[9 - 10]的方法,选择外观饱满的琉璃苣籽,清洗后于 60 °C 干燥箱中恒温干燥 5 h,用粉碎机粉碎,过 0.18 mm(80 目)筛,得到琉璃苣籽粉。将琉璃苣籽粉放入亚临界萃取仪的萃取罐内,旋紧加料口的盖子,打开真空泵抽出罐内剩余空气,使压力低于 -0.5 MPa。将丁烷通过计量泵以亚临界流体的形式注入萃取罐中,在一定的液料比、萃取温度、萃取时间下萃取琉璃苣籽油,萃取完成后,将萃取液加入分离罐中,回收萃取溶剂,得到琉璃苣籽油。

按下式计算琉璃苣籽油萃取率。

$$Y = m_1 / m_2 \times 100\% \quad (1)$$

式中:Y 为琉璃苣籽油萃取率; m_1 为琉璃苣籽油质量,g; m_2 为琉璃苣籽粉质量,g。

1.2.2 琉璃苣籽油脂肪酸组成分析

1.2.2.1 样品处理

取 1.0 mL 琉璃苣籽油于三角瓶中,加入 4 mL 正己烷,加入 2.0 mL 氢氧化钠甲醇溶液(0.5 mol/L),放置在 70 °C 水浴锅中加热 15 min,取出冷却,转移至试管中,加入 12 mL 水,摇匀振荡、超声提取、离心,取上清液进行气相色谱分析。

1.2.2.2 气相色谱分析条件

FFAP 色谱柱(30.00 m × 0.32 mm × 0.33 μ m);升温程序为初始温度 100 °C,以 10 °C/min 升温至 280 °C,保持 15 min;汽化温度 280 °C;检测器温度 280 °C;进样量 1 μ L。

采用保留时间定性,峰面积归一化法定量。

1.2.3 大鼠分组及运动方案

将 SD 大鼠平均分成 5 个小组,每个小组 10 只,即对照组、力竭运动组、琉璃苣籽油低剂量组、琉璃苣籽油中剂量组、琉璃苣籽油高剂量组。3 个剂量组,即低、中和高剂量组每天灌胃 10、15、20 mg/g 琉璃苣籽油,力竭运动组每天灌胃 15 mg/g 蒸馏水,对照组正常饮水。

参考朱梅菊^[11]、朱晓东^[12] 等方法设置运动方案。对照组不进行训练,剩余4组每天在KW-PT-6型实验跑台上进行力竭运动训练,训练时间为6周。第一周大鼠先进行对跑台的整体适应训练,设置速度为15 m/min,坡度为0°,第二周将跑台的速度设置为20 m/min,坡度为5°,将4组大鼠放置在跑台上直至力竭。力竭判断的标准为大鼠的四肢与跑台速度出现不匹配情况,臀部压在跑台上,腹部与跑台皮带接触,毛刷刺激无效。实验6周结束后,取大鼠双侧骨骼肌组织,放入预先准备好的4℃生理盐水中洗净,根据检测试剂盒的方法测定SOD、CAT、GSH-Px、MDA。

1.2.4 数据分析

所有数据采用SPSS 20.0软件进行分析,结果以“均值±标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 琉璃苣籽油萃取单因素实验

2.1.1 液料比的影响

在萃取温度40℃、萃取时间40 min条件下,考察液料比对琉璃苣籽油萃取率的影响,结果见图1。

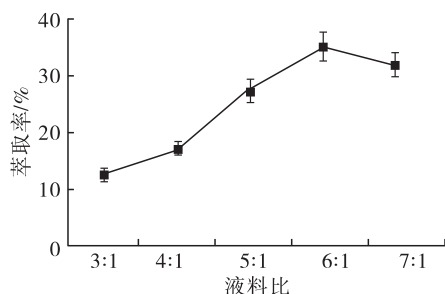


图1 液料比对琉璃苣籽油萃取率的影响

由图1可知,随着液料比的增大,琉璃苣籽油萃取率先升高后降低,在液料比为6:1时,琉璃苣籽油萃取率最大。这是因为液料比增大会增加萃取过程中油脂分子扩散的浓度差,从而有利于物料中的油脂被萃取到溶剂中,而当液料比增大到一定程度后,琉璃苣籽粉中的其他物质也会被萃取到溶剂中,与琉璃苣籽油形成竞争,导致油脂萃取率降低^[13]。故选择液料比为6:1。

2.1.2 萃取温度的影响

在萃取时间40 min、液料比5:1条件下,考察萃取温度对琉璃苣籽油萃取率的影响,结果见图2。

由图2可知,随着萃取温度的升高,琉璃苣籽油萃取率呈先上升后降低趋势,在萃取温度为40℃时,琉璃苣籽油萃取率最大。这可能是因为随着萃取温度升高,提高了溶剂的扩散能力,进而提高了琉

璃苣籽粉中油脂的扩散性,加速油脂进入溶剂中,而温度继续升高会提高溶剂的汽化速度,使得亚临界状态下的丁烷与物料接触减少,导致萃取率降低^[14]。故选择萃取温度为40℃。

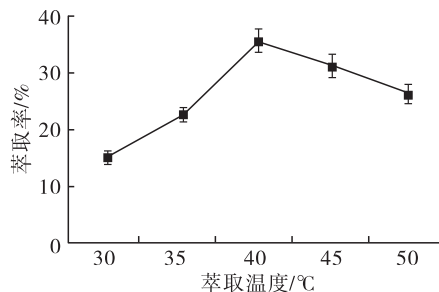


图2 萃取温度对琉璃苣籽油萃取率的影响

2.1.3 萃取时间的影响

在萃取温度40℃、液料比5:1条件下,考察萃取时间对琉璃苣籽油萃取率的影响,结果见图3。

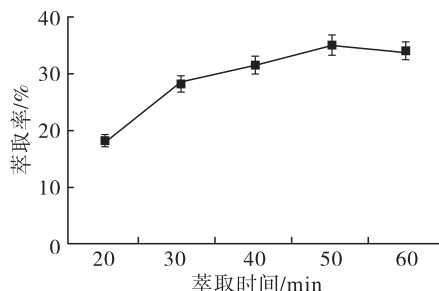


图3 萃取时间对琉璃苣籽油萃取率的影响

由图3可知,随着萃取时间的延长,琉璃苣籽油萃取率呈先上升后降低趋势,在萃取时间为50 min时,琉璃苣籽油萃取率最大。这是因为萃取时间在20~50 min时,油脂分子处于快速传质阶段,由玻璃苣籽粉向丁烷溶剂快速扩散,所以萃取率明显提高,继续延长萃取时间会导致琉璃苣籽粉中的其他成分溶出,与玻璃苣籽油形成竞争,导致萃取率降低^[15]。故选择萃取时间为50 min。

2.2 琉璃苣籽油萃取响应面实验

依据单因素实验结果,以琉璃苣籽油萃取率(Y)为指标,液料比(X_1)、萃取温度(X_2)和萃取时间(X_3)为因素,采用Design-Expert 8.0设计实验,优化亚临界丁烷萃取琉璃苣籽油的工艺条件,Box-Behnken实验因素与水平见表1,Box-Behnken实验设计与结果见表2,方差分析见表3。

表1 Box-Behnken实验因素与水平

水平	液料比	萃取温度/℃	萃取时间/min
-1	5:1	35	40
0	6:1	40	50
1	7:1	45	60

表2 Box - Behnken 实验设计与结果

实验号	X_1	X_2	X_3	$Y/\%$
1	0	0	0	32.74
2	1	0	-1	32.91
3	1	-1	0	35.32
4	0	-1	1	31.17
5	1	0	1	35.37
6	0	0	0	30.78
7	0	-1	-1	34.18
8	-1	0	-1	35.41
9	0	0	0	35.44
10	-1	0	1	32.44
11	-1	1	0	33.21
12	1	1	0	28.56
13	0	1	1	33.54
14	0	0	0	29.88
15	0	1	-1	30.01
16	-1	-1	0	35.30
17	0	0	0	31.72

表3 方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F	p
模型	77.92	9	8.66	3 883.66	<0.000 1 **
X_1	5.15	1	5.15	2 311.08	<0.000 1 **
X_2	15.48	1	15.48	6 946.00	<0.000 1 **
X_3	1.44	1	1.44	644.38	<0.000 1 **
X_1X_2	0.02	1	0.02	9.43	0.018 0 *
X_1X_3	0.02	1	0.02	7.01	0.033 1 *
X_2X_3	2.5×10^{-3}	1	2.5×10^{-3}	1.12	0.324 8
X_1^2	13.29	1	13.29	5 960.75	<0.000 1 **
X_2^2	36.12	1	36.12	16 203.52	<0.000 1 **
X_3^2	2.09	1	2.09	936.09	<0.000 1 **
残差	0.02	7	2.2×10^{-3}		
失拟项	1.7×10^{-3}	3	5.7×10^{-4}	0.17	0.914 2
纯误差	0.01	4	3.5×10^{-3}		
总和	77.94	16			

注: * 表示有显著差异($p < 0.05$); ** 表示有极显著差异($p < 0.01$)

根据表2数据,对液料比、萃取温度、萃取时间3个因素进行回归拟合,得到回归方程: $Y = 35.37 + 0.80X_1 + 1.39X_2 + 0.42X_3 + 0.072X_1X_2 + 0.063X_1X_3 - 0.025X_2X_3 - 1.78X_1^2 - 2.93X_2^2 - 0.70X_3^2$ 。

由表3可知:模型极显著,失拟项不显著,相关系数为0.999 8,调整相关系数为0.999 5,说明模型

拟合度良好,可用于琉璃苣籽油萃取率的预测; X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 影响均极显著, X_1X_2 、 X_1X_3 影响显著。

对回归方程求导,得出琉璃苣籽油萃取的最佳工艺条件为液料比6.24:1、萃取温度41.20℃、萃取时间53.08 min,此时预测琉璃苣籽油萃取率为35.69%。为了便于操作,将参数调整为液料比6.2:1、萃取温度41℃、萃取时间53 min,在该条件下进行3次平行验证实验,得到琉璃苣籽油萃取率为35.32%,与预测值接近,说明建立的模型可靠。

2.3 琉璃苣籽油的脂肪酸组成(见表4)

表4 琉璃苣籽油中脂肪酸组成及含量

保留时间/min	脂肪酸	相对含量/%
27.512	棕榈酸	9.82
32.331	硬脂酸	4.67
32.908	油酸	21.72
34.387	亚油酸	37.39
35.313	γ -亚麻酸	19.15
39.481	花生烯酸	4.07
49.710	芥酸	3.18

由表4可知,琉璃苣籽油中主要脂肪酸为油酸(21.72%)、亚油酸(37.39%)、 γ -亚麻酸(19.15%),其中不饱和脂肪酸含量为85.51%。

2.4 琉璃苣籽油对力竭运动大鼠骨骼肌抗氧化酶活性的影响(见表5)

由表5可见:力竭运动组SOD、CAT、GSH-Px活性与对照组相比显著降低($p < 0.05$),MDA含量显著增加($p < 0.05$);与力竭运动组比较,琉璃苣籽油高剂量组SOD、CAT、GSH-Px活性显著提高($p < 0.05$),MDA含量显著降低($p < 0.05$)。正常情况下,机体内日常自由基的产生和清除处于动态稳定状态,一旦开始进行力竭运动,体内会迅速产生大量自由基,并且肌肉过度疲劳,使得骨骼肌发生氧化应激,引发脂质过氧化反应,导致机体对于自由基的清除能力下降,进而使自由基累积而引起氧化损伤^[16-17]。MDA是引发脂质过氧化作用的主要产物,是氧化损伤的重要指标。SOD、CAT、GSH-Px是机体内重要的抗氧化酶,其可以清除体内自由基,减少自由基对机体的伤害。本实验结果显示,琉璃苣籽油可以恢复力竭运动大鼠骨骼肌中SOD、CAT、GSH-Px的活性,提高机体清除自由基的能力,降低骨骼肌中MDA含量,减少对机体细胞的损伤。

表5 琉璃苣籽油对力竭运动大鼠骨骼肌抗氧化酶活性的影响

组别	SOD	CAT	GSH - Px	MDA
对照组	115.24 ± 10.47	7.12 ± 1.33	158.64 ± 12.69	2.21 ± 0.46
力竭运动组	62.64 ± 5.22 [#]	3.21 ± 0.71 [#]	82.65 ± 7.84 [#]	5.67 ± 1.41 [#]
低剂量组	77.85 ± 6.74	4.43 ± 0.95	105.26 ± 8.41	4.23 ± 0.97
中剂量组	91.42 ± 7.23	5.35 ± 1.13	124.65 ± 9.11	3.15 ± 0.75
高剂量组	101.24 ± 8.21 [*]	6.52 ± 1.21 [*]	141.88 ± 11.73 [*]	2.46 ± 0.58 [*]

注: #表示力竭运动组与对照组相比有显著差异($p < 0.05$); *表示剂量组与力竭运动组相比有显著差异($p < 0.05$)

3 结论

通过单因素实验和响应面实验确定亚临界丁烷萃取琉璃苣籽油的最佳工艺条件为液料比 6.2:1、萃取温度 41 °C、萃取时间 53 min,在该条件下琉璃苣籽油萃取率为 35.32%。琉璃苣籽油中主要脂肪酸为油酸(21.72%)、亚油酸(37.39%)、 γ -亚麻酸(19.15%),不饱和脂肪酸含量较高,为 85.51%。琉璃苣籽油可以恢复力竭运动大鼠骨骼肌中 SOD、CAT、GSH - Px 的活性,降低骨骼肌中 MDA 含量。琉璃苣籽油可以提高力竭运动大鼠骨骼肌抗氧化酶活性,提高机体清除自由基的能力,减少对机体细胞的损伤。

参考文献:

- [1] 张广论, 张卫明, 肖正春. 琉璃苣油研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2012(31): 14 - 21.
- [2] SOTO C, CHAMY R, ZUNIGA M E. Enzymatic hydrolysis and pressing conditions effect on borage oil extraction by cold pressing[J]. Food Chem, 2007, 102(3): 834 - 840.
- [3] 李童. 琉璃苣籽油提取工艺及其抗氧化活性研究与产品开发[D]. 江苏 扬州: 扬州大学, 2017.
- [4] MAANAN M. Heavy metal concentrations in marine molluscs from the Moroccan coastal region[J]. Environ Pollut, 2008, 153(1): 176 - 183.
- [5] 唐传核, 徐建祥, 彭志英. 脂肪酸营养与功能的最新研究[J]. 中国油脂, 2000, 25(6): 20 - 23.
- [6] 李童, 束成杰, 尹永祺, 等. 响应面法优化琉璃苣籽油提取工艺及其脂肪酸成分的测定[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(4): 914 - 920.
- [7] 张庆, 袁源, 邓扬龙, 等. 响应面优化亚临界萃取核桃

油工艺及品质评价[J]. 食品工业, 2019, 40(9): 44 - 47.

- [8] 徐瑶. 苹果籽油的亚临界流体萃取[J]. 农产品加工, 2021(10): 14 - 16.
- [9] 王晨雨, 杜蕾, 张光杰, 等. 亚临界丁烷萃取海桐籽油及其性质[J]. 食品工业, 2021, 42(10): 132 - 135.
- [10] 黄睿涵, 管骁, 黄凯, 等. 亚临界萃取藜麦油组分及抗氧化性分析[J]. 包装与食品机械, 2021, 39(4): 1 - 5.
- [11] 朱梅菊, 朱洪竹, 张崇林, 等. 毛蕊花苷对递增负荷运动小鼠骨骼肌损伤的保护作用[J]. 天然产物研究与开发, 2018(30): 218 - 224.
- [12] 朱晓东. 葛根黄酮对大强度运动大鼠骨骼肌氧化应激损伤的保护作用及其机制研究[J]. 美食研究, 2020, 37(3): 78 - 82.
- [13] 徐国良. 亚临界萃取石榴籽油工艺的响应面优化[J]. 江西化工, 2019(1): 47 - 51.
- [14] 栾真杰, 李朵, 李佩佩, 等. 亚临界流体萃取马蔺籽油的成分及抗氧化活性研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2021, 28(4): 101 - 106.
- [15] 张爱华, 赖鹏英, 何怡丹, 等. 亚临界丁烷制取光皮楸木油的研究[J]. 中国粮油学报, 2021, 36(1): 100 - 104.
- [16] 朱晶. 元宝枫油对力竭运动大鼠骨骼肌损伤的影响[D]. 山西 临汾: 山西师范大学, 2016.
- [17] POWERS S K, CRISWELL D, LAWLER J. et al. Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle[J]. Am J Physiol, 1994, 266(2): 375 - 380.