

分光光度法测定油茶籽油中总三萜含量的前处理方法研究

叶美金^{1,2}, 杨玉敏³, 冯 鸿^{1,2}, 姜虹宇^{1,2}, 何咨霆¹, 邱宇帆¹

(1. 成都师范学院 化学与生命科学学院, 成都 611130; 2. 特色园艺植物资源开发与利用四川省高等学校重点实验室, 成都 611130; 3. 四川省农业科学院 农业资源与环境研究所, 成都 610066)

摘要: 为准确定量油茶籽油中三萜类物质, 对分光光度法测定油茶籽油中总三萜含量的样品前处理方法进行研究。通过单因素试验和正交试验考察了乙醇体积分数、提取温度、提取时间和提取次数对油茶籽油中总三萜含量的影响。结果表明: 各因素对油茶籽油中总三萜提取的影响程度从大到小依次为乙醇体积分数 > 提取次数 > 提取温度 = 提取时间; 油茶籽油中总三萜的最佳提取工艺条件为乙醇体积分数 80%、提取温度 80℃、提取时间 40 min、提取次数 4 次, 在此条件下提取测得油茶籽油中总三萜含量为 $(0.78 \pm 0.06)\%$ (以齐墩果酸计)。综上, 该方法操作简便、快速、灵敏度高, 可用于油茶籽油中总三萜含量的测定。

关键词: 油茶籽油; 总三萜; 分光光度法; 前处理

中图分类号: TS225.1; TQ646 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2023)04-0140-04

Pretreatment for determination of total triterpene in oil – tea camellia seed oil by spectrophotometry

YE Meijin^{1,2}, YANG Yumin³, FENG Hong^{1,2}, JIANG Hongyu^{1,2}, HE Ziting¹, QIU Yufan¹

(1. College of Chemistry and Life Sciences, Chengdu Normal University, Chengdu 611130, China; 2. Key Laboratory of Development and Utilization of Characteristic Horticultural Plant Resources, Sichuan Provincial Higher University, Chengdu 611130, China; 3. Institute of Agricultural Resources and Environment, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, China)

Abstract: To accurately quantify triterpenoids in oil – tea camellia seed oil, a sample pretreatment method was investigated for the determination of total triterpene in oil – tea camellia seed oil by spectrophotometry. The effects of volume fraction of ethanol, extraction temperature, extraction time and extraction times on the extraction of total triterpene from oil – tea camellia seed oil were investigated by single factor experiment and orthogonal experiment. The results showed that the significance of the factors affecting the extraction of total triterpene from oil – tea camellia seed oil decreased in the order: ethanol volume fraction > extraction times > extraction temperature = extraction time. The optimal extraction conditions of total triterpene were as follows: volume fraction of ethanol 80%, extraction temperature 80℃,

extraction time 40 min, and extraction times 4. Under these conditions, the content of total triterpene in oil – tea camellia seed oil was $(0.78 \pm 0.06)\%$ (calculated by oleanolic acid). In conclusion, the method is simple, rapid and sensitive, and can be used for the determination of total triterpene in oil – tea camellia seed oil.

Key words: oil – tea camellia seed oil; total triterpene; spectrophotometry; pretreatment

收稿日期: 2022-07-10; 修回日期: 2023-01-16

基金项目: 四川省科学技术厅应用基础研究项目 (2020YJ0469); 国家级、省级大学生创新创业训练计划项目 (202214389015, 202214389038, S202214389106, S202114389064); 成都师范学院专项科研项目 (ZZBS2019-05)

作者简介: 叶美金 (1984), 女, 副教授, 博士, 主要从事植物资源开发与利用研究 (E-mail) 091048@cdnu.edu.cn。

通信作者: 冯 鸿, 教授, 博士 (E-mail) 091006@cdnu.edu.cn。

油茶,为我国特有木本油料树种,也是世界四大木本油料植物之一^[1-2]。油茶籽油通过压榨或浸出油茶种子获得,其富含油酸,还含有生育酚、角鲨烯等营养物质,具有一定的生理功能^[3-5]。

三萜皂苷为油茶植物的主要成分之一,其中油茶皂苷以齐墩果酸型三萜类皂苷为主^[6-7]。研究表明,三萜类化合物(以下称为总三萜)具有抗肿瘤、抗癌、保肝等作用^[8]。油茶籽油中富含总三萜^[9-10],对其中总三萜的准确定量,对于油茶籽油的开发利用具有重要意义。目前,主要采用分光光度法测定总三萜含量。其原理是在高氯酸作用下,总三萜中酚羟基被氧化成羧基,增加一个双键,再经双键移位、双分子缩合等反应生成共轭双键系统,在酸性条件下形成的阳碳离子与香兰素结合形成红色络合物而显色^[11]。

本文以齐墩果酸为标准品,采用分光光度法测定油茶籽油中总三萜含量,对样品前处理条件进行了优化,以期为油茶籽油中总三萜的准确定量提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

油茶籽油,贵州大亨油茶科技有限公司;齐墩果酸标准品(纯度 $\geq 98\%$),上海源叶生物科技有限公司;其他试剂均为分析纯;水为蒸馏水。

UV-1750型紫外分光光度计,AUW120型电子天平,HH-6型恒温水浴锅,万用电炉。

1.2 试验方法

1.2.1 油茶籽油中总三萜的提取

称取6g油菜籽油样品于平底烧瓶中(精确到0.0001g),加入20mL一定体积分数的乙醇,在一定温度下搅拌提取一定时间,离心,收集上清液,下层再次重复提取、离心,将上清液合并并转移至100mL容量瓶中,无水乙醇定容,待测。

1.2.2 标准曲线的制作

参照文献^[12]的方法,以齐墩果酸为标准品,以无水乙醇为溶剂配制不同质量浓度的标准溶液(8、16、24、32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和40 $\mu\text{g}/\text{mL}$),再以5%香草醛-冰乙酸溶液和高氯酸显色,在540nm处测定系列质量浓度的标准溶液的吸光度,以吸光度(A)为纵坐标,齐墩果酸质量浓度(X)为横坐标,绘制标准曲线,拟合得到回归方程: $A = 0.0246X - 0.0487$ ($R^2 = 0.9951$)。

1.2.3 总三萜含量的测定及计算

参照文献^[12]的方法,取1.2.1试样,经显色反应后,测定其吸光度,并通过标准曲线方程按式(1)计

算油茶籽油中总三萜的含量(以齐墩果酸计)。

$$X = \frac{C \times V_1}{m_2 \times 10^6} \times 100\% \quad (1)$$

式中:X为样品中总三萜的含量;C为根据标准曲线计算的质量浓度, $\mu\text{g}/\text{mL}$;V₁为样品中总三萜经乙醇提取后最终定容体积,mL;m₂为样品质量,g。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 乙醇体积分数的选择

在提取温度80℃、提取时间40min、提取次数2次的条件下,考察乙醇体积分数对总三萜含量的影响,结果见图1。

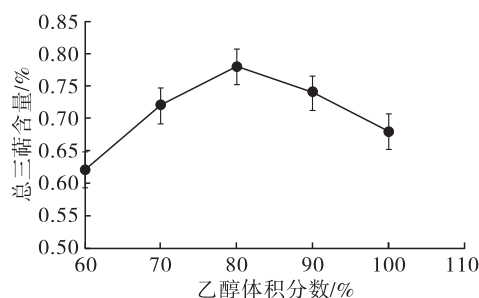


图1 乙醇体积分数对总三萜含量的影响

由图1可知,总三萜含量随乙醇体积分数的升高先增大后减小,当乙醇体积分数为80%时,总三萜含量达到最大。这可能是因为根据相似相溶原理,低体积分数的乙醇溶液极性较大,更有利于极性较大的三萜皂苷的提取,而高体积分数的乙醇溶液极性低,更有利于弱极性的游离三萜类物质的提取^[13]。因此,选择最佳乙醇体积分数为80%。

2.1.2 提取温度的选择

在乙醇体积分数80%、提取时间40min、提取次数2次的条件下,考察提取温度对总三萜含量的影响,结果见图2。

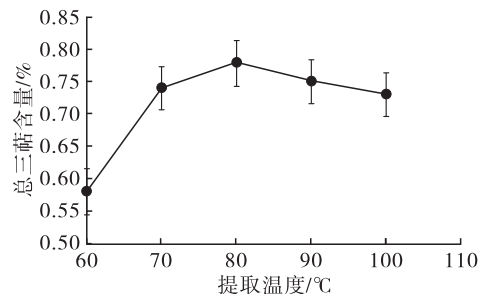


图2 提取温度对总三萜含量的影响

由图2可知,总三萜含量随提取温度升高先增加后降低,在提取温度为80℃时,总三萜含量达到最大。这可能是因为,在一定范围内,随着温度的升高,传质效率加快,有利于总三萜的提取,当温度继续升高时,其他物质的溶解度加大,影响总三萜的提

取,同时容易使总三萜结构发生变化,影响检测结果^[14]。因此,选择最佳提取温度为80℃。

2.1.3 提取时间的选择

在乙醇体积分数80%、提取温度80℃、提取次数2次的条件下,考察提取时间对总三萜含量的影响,结果见图3。

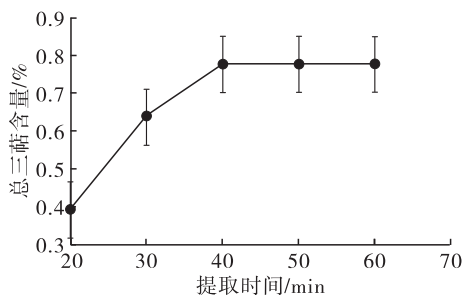


图3 提取时间对总三萜含量的影响

由图3可知,总三萜含量随提取时间的延长先增大后趋于平衡,在提取时间为40 min时,总三萜含量达到最大。这可能是由于在一定范围内,随着提取时间的延长,有利于总三萜的溶出,而当提取时间继续延长时,杂质溶出也会增加,从而影响总三萜的提取效果^[15]。因此,选择最佳提取时间为40 min。

2.1.4 提取次数的选择

在乙醇体积分数80%、提取温度80℃、提取时间40 min条件下,考察提取次数对总三萜含量的影响,结果见图4。

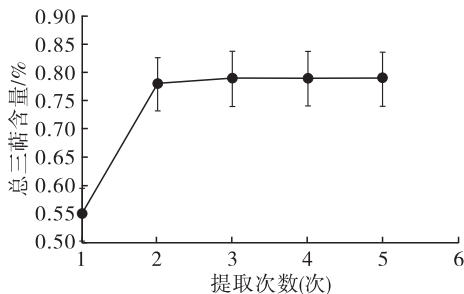


图4 提取次数对总三萜含量的影响

由图4可知,总三萜含量随提取次数的增加先增大后趋于平衡,在提取次数为3次时,总三萜含量达到最大。这是因为随着提取次数的增加,油茶籽油中的总三萜含量不断减少,每次提取时总三萜在提取溶剂和油茶籽油中建立新的溶解平衡,而当达到一定提取次数时,总三萜溶出将达到最终平衡,不再随提取次数的增加而增加^[16]。综合考虑,选择最佳提取次数为3次。

2.2 正交试验

在单因素试验的基础上,以总三萜含量为评价指标,对乙醇体积分数、提取温度、提取时间和提取次数进行四因素三水平正交试验。正交试验因素水平见

表1,正交试验设计与结果见表2。

表1 正交试验因素水平

水平	A 乙醇 体积分数/%	B 提取 温度/℃	C 提取 时间/min	D 提取 次数(次)
1	70	70	30	2
2	80	80	40	3
3	90	90	50	4

表2 正交试验设计与结果

试验号	A	B	C	D	总三萜含量/%
1	1	1	1	1	0.58
2	1	2	2	2	0.72
3	1	3	3	3	0.73
4	2	1	2	3	0.78
5	2	2	3	1	0.78
6	2	3	1	2	0.76
7	3	1	3	2	0.76
8	3	2	1	3	0.78
9	3	3	2	1	0.72
k_1	0.68	0.71	0.71	0.69	
k_2	0.77	0.76	0.74	0.75	
k_3	0.75	0.74	0.76	0.76	
R	0.09	0.05	0.05	0.07	

由表2可知,各因素对总三萜含量的影响程度从大到小依次为A(乙醇体积分数)>D(提取次数)>B(提取温度)=C(提取时间),最佳提取工艺组合为 $A_2B_2C_3D_3$,即乙醇体积分数80%、提取温度80℃、提取时间50 min、提取次数4次。由于提取时间对总三萜含量的影响较小,且在提取时间分别为40、50 min条件下, k_2 和 k_3 相差不大,为缩短前处理时间,选择提取时间为40 min。在最佳工艺条件下进行3次验证试验,测得油茶籽油中平均总三萜含量为 $(0.78 \pm 0.06)\%$ 。

3 结论

通过单因素试验以及正交试验优化分光光度法测定油茶籽油中总三萜含量的前处理方法。结果发现:各因素对油茶籽油中总三萜提取的影响程度从大到小为乙醇体积分数>提取次数>提取温度=提取时间;油茶籽油中总三萜最佳提取工艺条件为乙醇体积分数80%、提取温度80℃、提取时间40 min、提取次数4次。在最佳条件下提取,采用分光光度法测得油茶籽油中总三萜含量为 $(0.78 \pm 0.06)\%$ 。分光光度法操作简便、快速,本文优化的样品前处理方法,可用于油茶籽油中总三萜含量的测定。

参考文献:

- [1] 周激,吴雪辉. 油茶综合利用开发前景[J]. 中国农村科技,2006(10):21-23.

味对检测人员的负担,同时量化污水的臭味浓度,其结果与 GC-IMS 的变化规律大致相同,可供污水处理站人员初步判定污水异味程度。虽受限于 GC-IMS 软件内置数据库还不够完善,部分挥发性化合物尚待鉴定,但 GC-IMS 仍可应用于快速鉴定食用油脂加工厂污水的挥发性化合物,并通过谱图对比、指纹图谱和主成分分析,可以看到污水处理站 8 个处理工序污水样品挥发性物质组成的差异,后续可进一步探讨挥发性化合物的阈值,确立关键异味成分并推测异味生成因素,制订出减少食用油脂加工厂污水处理异味的策略。

参考文献:

[1] 闫博文. 基于感官测定与气质联用恶臭污染物的定量关系研究[D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学,2019.

[2] 刘舒乐,王伯光,何洁,等. 城市污水处理厂恶臭挥发性有机物的感官定量评价研究[J]. 环境科学,2011,32(12):3582-3587.

[3] 唐小东,王伯光,赵德骏,等. 城市污水处理厂的挥发性恶臭有机物组成及来源[J]. 中国环境科学,2011,31(4):576-583.

[4] ZHOU Y, HALLIS S A, VITKO T, et al. Identification, quantification and treatment of fecal odors released into the air at two wastewater treatment plants [J]. J Environ Manage, 2016, 180:257-263.

[5] KOTOWSKA U, ALIKOWSKI M, ISIDOROV V A. HS-SPME/GC-MS analysis of volatile and semi-volatile organic compounds emitted from municipal sewage sludge [J]. Environ Monit Assess, 2011, 184(5):2893-2907.

[6] GAO W, YANG X F, ZHU X M, et al. Limitations of GC-QTOF-MS technique in identification of odorous

compounds from wastewater: the application of GC-IMS as supplement for odor profiling [J/OL]. Atmosphere, 2021, 12(2): 265 [2021-11-09]. <https://doi.org/10.3390/atmos12020265>.

[7] VERA L, COMPANIONI E, MEACHAM A, et al. Real time monitoring of VOC and odours based on GC-IMS at wastewater treatment plants [J]. Chem Eng Tran, 2016, 54:79-84.

[8] 陈通,谷航,陈明杰,等. 基于气相离子迁移谱对葵花籽油精炼程度的检测[J]. 食品科学,2019,40(18):312-316.

[9] 郭向阳,霍羽佳,王本友,等. 采用气相色谱-离子迁移谱分析黄大茶加工过程挥发性成分[J]. 农业工程学报,2021,37(6):274-281.

[10] RICE E W, BRIDGEWATER L. Standard methods for the examination of water and wastewater [M]. Washington DC: American Public Health Association, 2012.

[11] 王灿,胡洪营,席劲瑛. 城市污水处理厂恶臭污染及其评价体系[J]. 给水排水,2005,4(9):15-19.

[12] PUGET F P, MELO M V, MASSARANI G. Wastewater treatment by flotation [J]. Braz J Chem Eng, 2000, 17(4/5/6/7):407-414.

[13] CARRERA-CHAPELA F, DONOSO - BRAVO A, SOUTO J A, et al. Modeling the odor generation in WWTP: an integrated approach review [J/OL]. Water Air Soil Poll, 2014, 225(6): 1-15 [2021-11-09]. <https://doi.org/10.1007/s11270-014-1932-y>.

[14] FAN F Q, XU R H, WANG D P, et al. Application of activated sludge for odor control in wastewater treatment plants: approaches, advances and outlooks [J/OL]. Water Res, 2020, 181: 115915 [2021-11-09]. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115915>.

[15] 唐小东. 城市污水处理厂挥发性有机恶臭污染物的来源及感官定量评价[D]. 广州:暨南大学,2011.

(上接第 142 页)

[2] 邹锡兰,吴尚清. 国务院批准颁布《全国油茶产业发展规划(2009—2020年)》千亿油茶产业待破局[J]. 中国经济周刊,2009(47):45-46.

[3] SNYDER J M, FRANKEL E N, SELKE E. Capillary gas chromatographic analyses of headspace volatiles from vegetable oils[J]. J Am Oil Chem Soc,1985,62(12):1657-1679.

[4] 王萍,张银波,江木兰. 多不饱和脂肪酸的研究进展[J]. 中国油脂,2008,33(12):42-46.

[5] 刘世鹏,周伯川. 油茶籽的开发利用[J]. 中国油脂,1996,21(4):39-42.

[6] 汪玥,何恩铭,王雅英,等. 油茶植物化学成分及药理活性研究进展[J]. 亚热带植物科学,2014,46(4):394-400.

[7] 孔庆博,姜惠,郭春雨,等. 油茶主要化学成分及药理活性研究进展[J]. 中国粮油学报,2022,37(4):194-202.

[8] 罗俊,林志彬. 灵芝三萜类化合物药理作用研究进展[J]. 药科学报,2002,37(7):574-578.

[9] 谭传波,田华,赖琼玮,等. 不同工艺油茶籽油中生物活性物质含量的比较[J]. 中国油脂,2018,43(12):41-44.

[10] 谭传波,田华,周刚平,等. 鲜榨油茶籽油与特级初榨橄榄油营养价值的比较[J]. 中国油脂,2019,44(1):67-69.

[11] 黄书铭,杨新林,黄健,等. 紫外分光光度法快速测定灵芝样品中三萜类化合物的含量[J]. 北京理工大学学报,2004,24(6):555-558.

[12] 李维嘉,王志强,许泽群,等. 分光光度法测定灵芝孢子油中总三萜的含量[J]. 食品研究与开发,2019,40(17):165-170.

[13] 孟煜嘉,徐逸凡,王艳妮,等. 微波及超声法提取苦丁茶中熊果酸的对比研究[J]. 机电信息,2017(17):36-42.

[14] 郭梅,呼娜,王娜. 山楂中熊果酸的提取工艺[J]. 食品研究与开发,2015,36(20):104-107.

[15] 郭华,刁全平,张博,等. 杨树口蘑多糖的超声波辅助提取工艺及其抗氧化活性[J]. 食品工业科技,2018,39(5):180-184.

[16] 檀琪,阮文辉,杨官娥,等. 响应面法优化桦褐孔菌总三萜回流提取工艺[J]. 山西医科大学学报,2020,51(1):99-104.