

新资源食品牡丹加工剩余物乙醇提取物成分分析及其活性的研究

毕晓娟¹, 魏亮¹, 柴艳敏², 杨慧莹¹, 于欣馨³, 蒲铎文³, 黄冬成^{4*}, 路祺¹

¹东北林业大学化学化工与资源利用学院, 黑龙江 哈尔滨

²东北林业大学附属医院, 黑龙江 哈尔滨

³东北林业大学林学院, 黑龙江 哈尔滨

⁴黑龙江大三源乳品机械有限公司, 黑龙江 哈尔滨

Email: *32313369@qq.com

收稿日期: 2021年4月17日; 录用日期: 2021年5月19日; 发布日期: 2021年5月26日

摘要

本研究以油用牡丹加工剩余物籽壳为原料, 乙醇为溶剂, 提取物产率为响应值, 通过单因素和正交实验制备最优提取工艺, 最优工艺为: 乙醇浓度95%、提取温度90℃、料液比1:10、提取时间4 h, 提取物产率为24.68% ± 1.27%。牡丹籽壳提取物中检测到白藜芦醇(0.014%)和芍药苷(1.40%), 在油部分中首次检测到二十碳五烯酸(0.0526%)和角鲨烯(0.007%), 并进行扫描电镜、热重、红外光谱、多糖、总酚、总黄酮、体外抗氧化活性和鼠毒性实验。结果表明, 牡丹加工剩余物乙醇提取物的体外抗氧化活性较强。提取物在0.05~0.8 g/kg范围内为无毒, 能够使鼠血清中超氧化物歧化酶、过氧化氢酶活力增加, 丙二醛含量降低。本研究将为油用牡丹企业深加工, 以及籽壳提取物潜在应用提供基础数据支撑。

关键词

牡丹籽壳, 毒性, 抗氧化活性, 二十碳五烯酸(EPA), 角鲨烯

Study on Component Analysis and Activity of Ethanol Extract from Processing Residues of New Resource Food Peony

Xiaojuan Bi¹, Liang Wei¹, Yanmin Chai², Huiying Yang¹, Xinxin Yu³, Duowen Pu³, Dongcheng Huang^{4*}, Qi Lu¹

¹College of Chemistry, Chemical Engineering and Resource Utilization, Northeast Forestry University, Harbin Heilongjiang

*通讯作者。

文章引用: 毕晓娟, 魏亮, 柴艳敏, 杨慧莹, 于欣馨, 蒲铎文, 黄冬成, 路祺. 新资源食品牡丹加工剩余物乙醇提取物成分分析及其活性的研究[J]. 食品与营养科学, 2021, 10(2): 133-147. DOI: 10.12677/hjfn.2021.102017

²Affiliated Hospital of Northeast Forestry University, Harbin Heilongjiang

³School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin Heilongjiang

⁴Heilongjiang Dasanyuan Dairy Machinery Co., Ltd., Harbin Heilongjiang

Email: *32313369@qq.com

Received: Apr. 17th, 2021; accepted: May 19th, 2021; published: May 26th, 2021

Abstract

In this study, the seed shell of oil peony processing residue was used as raw material, ethanol was used as solvent, and the extraction yield was used as response value. The optimal extraction process was prepared by single factor and orthogonal experiment. The optimal extraction process was as follows: ethanol concentration was 95%, extraction temperature was 90°C, solid-liquid ratio was 1:10, extraction time was 4 h, and the extraction yield was 24.68% ± 1.27%. Resveratrol (0.014%) and paeoniflorin (1.40%) were detected in the extract of peony seed shell. Eicosapentaenoic acid (0.0526%) and squalene (0.007%) were detected in the oil for the first time. Scanning electron microscopy, thermogravimetry, infrared spectroscopy, polysaccharides, total phenols, total flavonoids, *in vitro* antioxidant activity and mouse toxicity tests were carried out. The results showed that the ethanol extract of peony processing residue had strong antioxidant activity *in vitro*. The extract was nontoxic in the range of 0.05~0.8 g/kg, which could increase the activities of superoxide dismutase and catalase in serum and decrease the content of malondialdehyde. This study will provide basic data support for the deep processing of oil peony enterprises and the potential application of seed shell extract.

Keywords

Peony Seed Husk, Toxicity, Antioxidant Activity, Eicosapentaenoic Acid (EPA), Squalene

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

牡丹(*Paeonia suffruticosa* Andr.)原产地中国,是木本油料作物,且兼具有药用和观赏价值。属于毛茛科芍药属。至今培植已有大约 2000 年的历史。通过对传统药用牡丹以及观赏牡丹价值的研究进而衍生出油用牡丹,并将其制备成为牡丹籽油作为首要用途。紫斑牡丹和凤丹牡丹的籽仁制备的籽油在 2011 年卫生部发布的第 9 号公告中被批准为新资源食品[1]。据统计我国油用牡丹种子的年产量约为 99.9×10^3 吨,如果全部用来生产牡丹籽油,每年将产生约 44.95×10^3 吨牡丹籽壳。如果不能很好的将牡丹籽壳利用起来,就会造成严重的资源浪费现象,还会引起环境问题。牡丹籽壳加工利用问题吸引了许多研究人员的注意力。然而到目前为止,牡丹的应用和开发仍处于起步阶段,关于牡丹籽壳的研究报告更是少之又少。故该研究将对牡丹(凤丹)籽壳的研究与开发应用提供更加广泛的途径。

正己烷作为提取植物油的常用溶剂,存在诸多不足,如毒性、安全性、不可再生性和一定的环境污染等[2]。目前,已有一些国家在食品、药品、保健食品和化妆品生产中对正己烷的适用性出台了相关法规和限制[3]。乙醇作为提取的溶剂,已广泛用于食品和制药行业[4]。2016 年, Toda 等人以乙醇作为溶

剂研究了大豆油提取动力学[5]。贝萨等人的研究成果进一步表明,乙醇能够从固体基质中将油脂完全提取出来[6]。与正己烷相比,乙醇法提取油脂含有更多的活性物质[7]。

综上所述,本研究以乙醇作为提取溶剂,油用牡丹(凤丹)加工剩余物籽壳为原料,以提取物产率为响应值,通过单因素实验和正交实验制备最优提取工艺。通过热重分析(Thermogravimetric Analysis, TG)、傅里叶变换红外光谱仪(Fourier Transform Infrared Spectromete, FTIR)、扫描电子显微镜(Scanning Electron Microscope, SEM)、高效液相色谱(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)、气相色谱(Gas Chromatography, GC),以及体外抗氧化活性和鼠体内毒性实验对富含活性成分的籽壳提取物进行表征分析。本研究将为油用牡丹企业深加工,以及牡丹籽壳提取物的潜在应用提供基础数据支撑,为其资源开发利用做出贡献。

2. 材料与方法

2.1. 材料

白藜芦醇标准品、芍药苷标准品:美国 Sigma 公司;芦丁标准品:成都普思生物科技股份有限公司;超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、过氧化氢酶(CAT)试剂盒、丙二醛(MDA)试剂盒:南京建成生物科技股份有限公司;没食子酸、亚硝酸钠、氯化铝、过氧化氢、三氯化铁、苯酚、抗坏血酸、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)、硫代巴比妥酸(TBA)、三氯乙酸(TCA)、硫酸亚铁、3,5-二硝基水杨酸等均为分析纯。

2.2. 仪器与设备

UV-5500 紫外-可见分光光度计:IRAffinity-1 傅里叶变换红外色谱(FTIR):日本岛津公司;QUANTA200 电子扫描显微镜(SEM):FEI;7890A 气相色谱仪:安捷伦有限公司;1525 高效液相色谱仪(HPLC):WATERS;Infinite M200 PRO 酶标仪:长沙泰肯生物技术有限公司;STA449F5 Jupiter®热重分析仪:德国耐驰。

2.3. 方法

2.3.1. 样品处理

油用牡丹(凤丹)加工剩余物牡丹籽壳是由江苏国色天香油用牡丹技术开发有限公司惠赠,牡丹籽壳置于阴凉通风处,吹干,使用多功能粉碎机将样品碎成粉末状,过筛,目数 20。 $0^{\circ}\text{C}\sim 4^{\circ}\text{C}$ 低温干燥处保存,留作备用。

2.3.2. 牡丹籽壳的提取

将 40.0 g 牡丹籽壳粉与一定体积的乙醇溶液混合于圆底烧瓶中,回流提取,一定时间后,5000 r/min 离心 8 min,取出上清液,置于旋转蒸发仪上负压旋出溶剂乙醇,剩余物为牡丹籽壳提取物,标记为 PEO, -20°C 低温保存备用。

将 PEO 用十倍体积的石油醚置于分液漏斗中进行萃取,分离得到石油醚相,旋蒸回收溶剂,所获得的部分为 PEO 的含油部分,剩余部分为 PEO 的非油部分。另外,采用传统索氏提取法,以石油醚为溶剂,抽提,干燥后得到的提取物,标记为 SEO。

$$\text{得率公式}/\% = \frac{m_1}{m_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中: m_0 为粉碎后的牡丹壳粉的质量/g, m_1 为离心干燥后牡丹壳提取物的质量/g。

2.3.3. 单因素及正交实验设计

单因素实验部分：以 PEO 产率为响应值，分别探讨乙醇浓度(55%、65%、75%、85%、95%)、固液比(1:6、1:8、1:10、1:12、1:14)、提取温度(60℃、70℃、80℃、90℃、100℃)和提取时间(2 h、3 h、4 h、5 h、6 h) 4 个单因素对 PEO 产率的影响。

正交实验部分：以单因素实验为基础，PEO 产率为响应值，采用正交实验设计表 $L_{16}(4^5)$ 对 PEO 提取工艺进行优化，因素与水平设计如表 1，每组实验进行三次平行。

Table 1. $L_{16}(4^5)$ orthogonal experiment factors and levels

表 1. $L_{16}(4^5)$ 正交实验因素与水平

水平	乙醇浓度/%	固液比/(g/mL)	提取温度/℃	提取时间/h
	A	B	C	D
1	80	1:6	70	2
2	85	1:8	80	3
3	90	1:10	90	4
4	95	1:12	100	5

2.3.4. SEM 分析方法

用导电双面胶将样品固定在样品台上，真空喷镀，通过扫描电子显微镜观察牡丹籽壳原料和提取后残渣的表面形态。

2.3.5. TG 分析方法

称取 25~30 mg 样品放在氧化铝坩埚，以空坩埚作为基线，氮气气氛，加热温度从 40℃~800℃，升温速率为 10℃/min，对样品的热分解规律进行检测。

2.3.6. FTIR 分析方法

称取 2.0 mg 样品与 200.0 mg KBr 研磨混合压片，采用红外光谱仪在 500~4000 cm^{-1} 范围对样品进行红外光谱检测。

2.3.7. 多糖、酚类和总黄酮含量测定

1) 采用苯酚-硫酸法[8]检测多糖含量

以葡萄糖为标准品制作标准曲线，波长设定为 490 nm，测定数值，并计算出回归方程及相关系数 R^2 。将牡丹籽壳油样品(1 mg/mL)吸光值，带入回归方程，计算出总糖在样品溶液中的含量。

2) 检测牡丹籽壳油样品中总酚[9]含量

标准曲线的制作：在试管中加入不同体积的(0.2 mL、0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL、1.0 mL)没食子酸标准品(1 mg/mL)，没食子酸标准品用甲醇溶解，加入甲醇将各管补至相同的体积(1 mL)。加入福林酚 1.5 mL 和 Na_2CO_3 (20%)溶液 2 mL，混匀后，静置 0.5 h，波长设定为 765 nm，测定数值，并计算出回归方程及相关系数 R^2 。

样品中总酚含量的测定：甲醇溶解样品，浓度为 5mg/mL。按照上文标准曲线的制作方法，用配置好的牡丹籽壳油样品来替代没食子酸，测定吸光值，带入回归方程，计算出总多酚在牡丹籽壳油样品溶液中的含量。

样品中总黄酮含量采用氯化铝比色法[10]：用 5.0 mL 蒸馏水溶解一定质量的牡丹籽壳油样品，加入 0.3 mL 的亚硝酸钠(6%)，混匀，室温静置 5 min。然后，加入 0.3 mL 的氯化铝(10%)和 2.0 mL 的氢氧化

钠(1 M), 再静置 6 min。最后, 用蒸馏水定容至 10 mL。波长设定为 510 nm。测定数值, 并计算出回归方程及相关系数 R^2 。对应样品中总黄酮含量用每克样品芦丁当量毫克来表示。

2.3.8. 牡丹籽壳油中白藜芦醇和芍药苷含量测定

1) 白藜芦醇含量检测: 配置白藜芦醇标准储备液(1 mg/mL), 稀释成不同的浓度, 采用 HPLC 仪检测, Diamonsil 反相 C18 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 - 乙酸水(0.2%) (30:7, V/V); 流速 1.0 mL/min; 柱温 30°C; 进样量 10 μL; 检测波长 306 nm。其保留时间为 7.9 min, 白藜芦醇的回归方程为 $Y_{\text{白藜芦醇}} = 23861X + 34896$ ($R^2 = 0.9994, n = 8$)。通过比较其与白藜芦醇标准品的保留时间比对, 算出白藜芦醇在样品中的含量。

2) 芍药苷含量检测: 配置芍药苷标准储备液(1 mg/mL), 稀释成不同的浓度, 采用 HPLC 仪检测, Diamonsil 反相 C18 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 - 水(16:84, V/V); 流速 1 mL/min; 柱温 30°C; 进样量 10 μL; 检测波长 230 nm。芍药苷的保留时间为 13.2 min, 芍药苷的回归方程为 $Y_{\text{芍药苷}} = 4173.9X + 5245.3$ ($R^2 = 0.9994, n = 8$)。通过比较其与芍药苷标准品的保留时间比对, 算出芍药苷在样品中的含量。

2.3.9. 脂肪酸成分分析

样品前处理: 正己烷溶解一定量的样品, 定容至 25 mL。将样品进行甲酯化, 用移液枪吸取 PEO 样品 2 mL 至试管中, 向其再加入氢氧化钠-甲醇溶液 2 mL(0.5 mol/L)。混匀后, 静置 5 min, 向混合液中加入一定体积的超纯水, 摇匀, 静置后, 弃去下层液体, 上层液体用超纯水反复洗涤, 直至 PH 为 7, 并弃去水层。用于 GC 分析。

GC 条件: Agilent HP-55% 苯基甲基硅氧烷毛细管柱(30 m × 0.32 mm, 0.25 μm); 载气: 高纯氮气; 载气压力: 0.25 mpa; 分流进样, 分流比: 10:1; 流速: 0.90 mL/min; 进样量: 1.0 μL; 进样口温度: 250°C; 检测器温度: 280°C; 升温程序: 初始温度设置为 130°C, 以 4°C/min 的速率升至 230°C, 在 230°C 保持 30 min 直至分析完成。

2.3.10. 体外抗氧化活性分析

1) DPPH 自由基清除: 参照文献方法[11], 并稍作修改。用 80%乙醇配置不同浓度样品, 对照组为抗坏血酸。用无水乙醇配制 25 mg/mL 的 DPPH 溶液。在各试管中, 加入 2 mL 配置好的 PEO 样品和 2 mL 的 DPPH 溶液, 混匀, 避光处理, 0.5 h 后, 波长设定为 517 nm, 检测吸光值。清除率表示样品 PEO 清除 DPPH 的能力。平行 3 次, 计算清除率。其公式为:

$$\text{清除率}/\% = \frac{A_0 - A_1 + A_2}{A_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中: A_0 为 DPPH 溶液与 80%乙醇的混合液; A_1 为 DPPH 溶液与样品溶液的混合液; A_2 为 80%乙醇与样品溶液的混合液。

2) ABTS 自由基清除: 用 80%乙醇配置不同浓度样品, 对照组为抗坏血酸。在各试管中, 加入 2.0 mL 样品和 2.0 mL ABTS [12]溶液(7 mmol/L), 避光处理, 0.5 h 后, 波长设定为 734 nm, 检测吸光值。清除率表示 PEO 样品清除 ABTS 的能力。平行 3 次, 计算得出清除率。其公式为:

$$\text{清除率}/\% = \frac{A_0 - A_1 + A_2}{A_0} \times 100\% \quad (3)$$

式中: A_0 为 ABTS 溶液与 80%乙醇的混合液; A_1 为 ABTS 溶液与样品溶液的混合液; A_2 为 PBS 溶液与样品溶液的混合液。

3) 超氧自由基清除: 用 80%乙醇配置不同浓度样品, 对照组为抗坏血酸。在各试管中, 加入待测样

品 1 mL, Tris-HCl 缓冲溶液 4 mL (PH = 8), 邻苯三酚[13]溶液 0.4 mL, 5 min 后加入 1 mL HCl (8 mmol/L), 波长设定为 322 nm, 检测吸光值。清除率表示样品 PEO 清除超氧自由基的能力。平行 3 次, 计算得出清除率。其公式为:

$$\text{清除率}/\% = \frac{A_0 - A_1 + A_2}{A_0} \times 100\% \quad (4)$$

式中: A_0 为空白对照; A_1 为待测样品的吸光值; A_2 为无邻苯三酚时样品的吸光值。

4) 羟自由基清除: 用 80% 乙醇配置不同浓度样品, 对照组为抗坏血酸。在各试管中, 加入 1 mL 样品和 2 mL 浓度为 6 mmol/L 的 FeSO_4 溶液, 混匀后加入 6 mmol/L 的 H_2O_2 2 mL, 避光处理, 混匀, 静置 8 min, 再加入 2 mL 的水杨酸[14]溶液(6 mmol/L), 37°C, 水浴反应 0.5 h, 波长设定为 510 nm, 检测吸光值。清除率表示样品 PEO 清除羟自由基的能力。平行 3 次, 计算得出清除率。其公式为:

$$\text{清除率}/\% = \frac{A_0 - A_1 + A_2}{A_0} \times 100\% \quad (5)$$

式中: A_0 为空白对照; A_1 为样品的吸光值; A_2 为无水杨酸时样品的吸光值。

5) 脂质体过氧化抑制活性: 采用硫代巴比妥酸(TBARS) [15], 通过硫代巴比妥酸反应物测定牡丹籽壳中 PEO 和 SEO 样品对脂质过氧化抑制的活性(TBARS)分析。将小鼠的肝脏加入生理盐水(W/V = 1:100), 使用高速匀浆机进行匀浆, 在各试管中加入 1 mL 小鼠肝脏溶液, 和 1 mL 不同浓度的样品, 0.5 mmol/L 的 FeCl_3 , 0.05 mL 的 H_2O_2 (0.5 mmol/L), 混匀后 37°C 条件下静置 30 min, 再加入 1.5 mL TCA (20%, W/V) 溶液, 1.5 mL 硫代巴比妥酸(TBA)溶液(0.8%, W/V)终止反应, 混匀, 置于 99°C 水浴中加热 10 min, 冷却后, 4000 r/min 离心 10 min, 上清液在 532 nm 处进行检测。其公式为:

$$\text{清除率}/\% = \frac{A_0 - A_1 + A_2}{A_0} \times 100\% \quad (6)$$

式中: A_0 为空白对照; A_1 为待测样品的吸光值; A_2 为小鼠肝细胞溶液的吸光值(80%无水乙醇和小鼠肝细胞溶液的混合液)。

2.3.11. 鼠体内毒性分析

30 只体重 60~80 g 的雄性 Wistar 大鼠(六周)购买于中国上海 SLAC 动物实验室, 每 5 只为一组, 将其随机分为六组。在一定条件下(每 12 h 进行明暗循环, 温度 20°C~24°C 和相对湿度 35%~60%)饲养在不锈钢笼中, 食物和水自由供应。实验前 12 小时, 自行饮水, 禁食。使用盐水 - 羧甲基纤维素钠盐(99:1, V:V)制备 PEO 样品溶液。将该溶液在室温搅拌直至使用, 大鼠实验组使用不同剂量 0.0546~0.8736 mg/kg 的 PEO 溶液, 对照组使用相同剂量的盐水 - 羧甲基纤维素钠盐(99:1, V:V)的溶液。每天下午 2 点进行灌胃, 连续灌胃 45 天后, 将大鼠禁食 24 h, 并通过脊椎脱臼法处死, 本研究依据《黑龙江省实验动物管理条例》进行。将大鼠的血清收集, 分离并在 -80°C 保存。大鼠血清中 CAT、SOD、MDA 水平的测定是按照 CAT、SOD、MDA 检测试剂盒说明书进行操作的。

3. 结果与分析

3.1. 单因素实验结果

3.1.1. 乙醇浓度对 PEO 产率的影响

固定料液比 1:10 g/mL、提取温度 90°C、提取时间 4 h 条件下, 评价乙醇在不同浓度(55%、65%、75%、85%、95%)条件下对 PEO 产率的影响见图 1(a)。可以观察得出, 乙醇浓度对 PEO 产率的影响极为明显。随乙醇浓度的增加, PEO 产率也持续增加。较高乙醇浓度有利于溶剂的扩散和渗透, 可提取较多的弱极

性物质。本实验结果与文献[3]结论相一致。因此,选择95%的乙醇浓度作为最佳提取浓度。

3.1.2. 料液比对 PEO 产率的影响

固定乙醇浓度95%、提取温度90℃、提取时间4h,评价不同料液比(1:6、1:8、1:10、1:12、1:14)对PEO产率的影响见图1(b)。可以观察得出,在一定范围内,伴随着料液比的增大,PEO产率先增加,在料液比为1:10时,产率最高,不断增大料液比后,产率逐步趋于平稳。合理的增加料液比,可以增大反应溶剂和提取物之间的接触面积,过多溶剂也会增加回收溶剂成本,过大料液比不利于PEO的回收处理,因此选择料液比为1:10 g/mL作为最佳提取料液比。

3.1.3. 提取温度对 PEO 产率影响

同样在固定乙醇浓度95%、料液比1:10、提取时间4h,评价不同提取温度(60℃、70℃、80℃、90℃、100℃)对PEO产率的影响见图1(c)。可以观察得出,PEO产率与温度呈正相关趋势,即温度越高,产率越大,90℃时达到峰值,100℃时趋于稳定。高温条件下更有利于传质,但提取温度超过乙醇溶液的沸点时,传质无明显变化。因此,提取温度选择为90℃。

3.1.4. 提取时间对 PEO 产率的影响

固定浓度95%,料液比1:10,提取温度90℃,评价不同提取时间(2、3、4、5、6h)对PEO产率的影响见图1(d)。可以观察得出,在2~4h,PEO产率与时间呈正相关趋势,在4h时达到最大值,继续增加提取时间,产率不在继续增加。过长的提取时间,增加了溶质与氧的接触,导致更多氧化反应的发生,不利于PEO的提取。故提取时间设为4h。

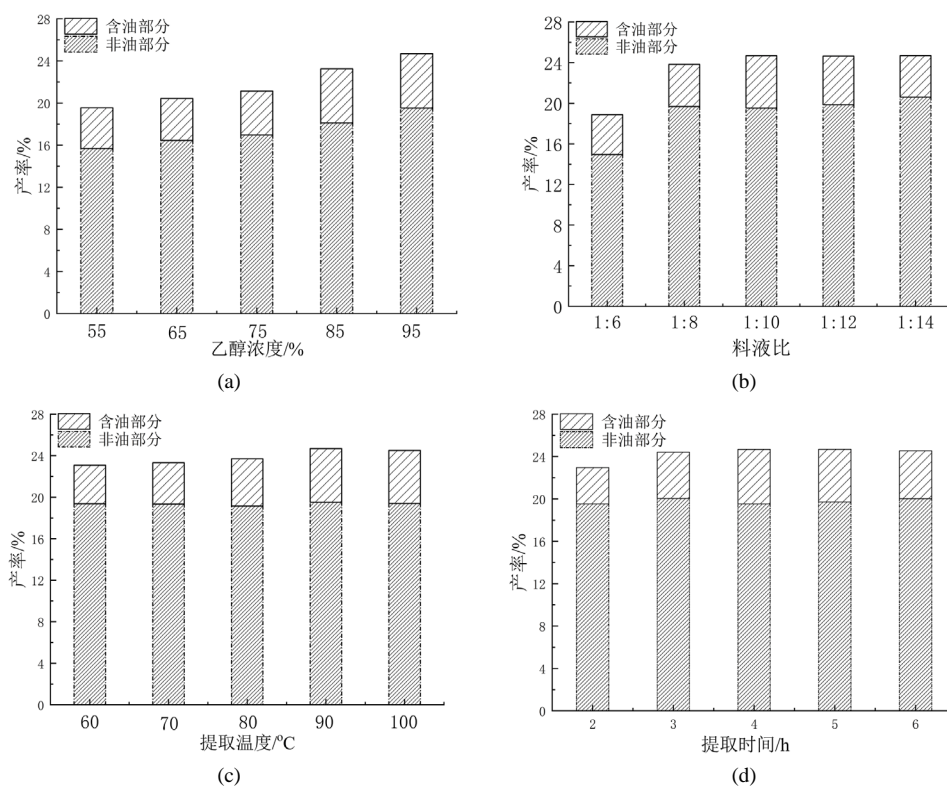


Figure 1. (a) The influence of ethanol concentration on the yield of PEO; (b) The influence of material-to-liquid ratio on the yield of PEO; (c) The influence of extraction temperature on the yield of PEO; (d) Effect of extraction time on the yield of PEO
图 1. (a) 乙醇浓度对 PEO 产率的影响; (b) 料液比对 PEO 产率的影响; (c) 提取温度对 PEO 产率的影响; (d) 提取时间对 PEO 产率的影响

3.2. 正交实验结果

本研究采用 $L_{16}(4^5)$ 正交实验对实验条件进行了优化。表 2 为正交实验结果。每个影响因素对 PEO 产率影响表现为极差(R)值的大小, R 值的大小与 PEO 的产率呈正相关趋势, R 越小, 表明影响因素对 PEO 产率的影响越小, 各影响因素对 PEO 产率的影响顺序由高到低依次为: $A > B > C > D$ 。根据(表 3)方差结果分析观察得到, 四个反应因素中影响最大的因子是乙醇浓度(因素 A), 第二位是固液比(因素 B), 其次为提取温度(因素 C), 最后为提取时间(因素 D)。提取 PEO 的最佳工艺分别为: A4, B3, C3 和 D3 (乙醇浓度为 95%, 固液比为 1:10 g/mL, 提取温度为 90°C, 提取时间为 4 h)。在此条件下, PEO 产率为 $24.68 \pm 1.27\%$ ($n = 3$), 油脂和非油脂部分产率分别为 5.16 和 19.52%。PEO 中油脂部分的产率与 SEO 基本相同 (4.77%)。PEO 中多糖、总酚和总黄酮含量分别为 8.72、5.85 和 10.19%。

Table 2. PEO $L_{16}(4^5)$ orthogonal experiment results

表 2. PEO $L_{16}(4^5)$ 正交实验结果

水平	乙醇浓度/%	固液比/(g/mL)	提取温度/°C	提取时间/h	PEO 产率/%
1	1	1	1	1	15.79 ± 0.95
2	1	2	2	2	20.85 ± 1.25
3	1	3	3	3	22.03 ± 1.54
4	1	4	4	4	20.01 ± 1.21
5	2	1	2	3	21.23 ± 1.73
6	2	2	1	4	20.54 ± 1.03
7	2	3	4	1	21.72 ± 1.95
8	2	4	3	2	22.13 ± 1.77
9	3	1	3	4	23.07 ± 0.89
10	3	2	4	3	23.26 ± 1.16
11	3	3	1	2	22.52 ± 1.68
12	3	4	2	1	22.59 ± 1.81
13	4	1	4	2	22.36 ± 1.33
14	4	2	3	1	23.12 ± 1.62
15	4	3	2	4	24.37 ± 1.95
16	4	4	1	3	23.68 ± 1.18
K1	19.670	20.612	20.633	20.805	
K2	21.405	21.943	22.260	21.965	
K3	22.860	22.660	22.587	22.550	
K4	23.383	22.102	21.838	21.997	
R	3.713	2.048	1.954	1.745	
最佳	A4	B3	C3	D3	

Table 3. Orthogonal experiment analysis of variance

表 3. 正交实验方差分析

因素	平方和	自由度	F-值	$F_{0.05}$	显著性
A	33.270	3	18.062	9.280	*
B	9.032	3	4.903	9.280	
C	8.771	3	4.762	9.280	
D	6.461	3	3.508	9.280	
误差	1.840	3			

3.3. 形态分析

图 2(a)~(d)为牡丹籽壳原料、提取剩余物的实物照片和 SEM 扫描电镜照片。从图可以看出，它们的表面形态存在明显的差异，其中牡丹籽壳原料表面呈现光滑的块状结构，而提取剩余物表面则呈现多孔隙的片层结构。对比观察得出，乙醇溶液对牡丹籽壳的提取效果作用比较明显。

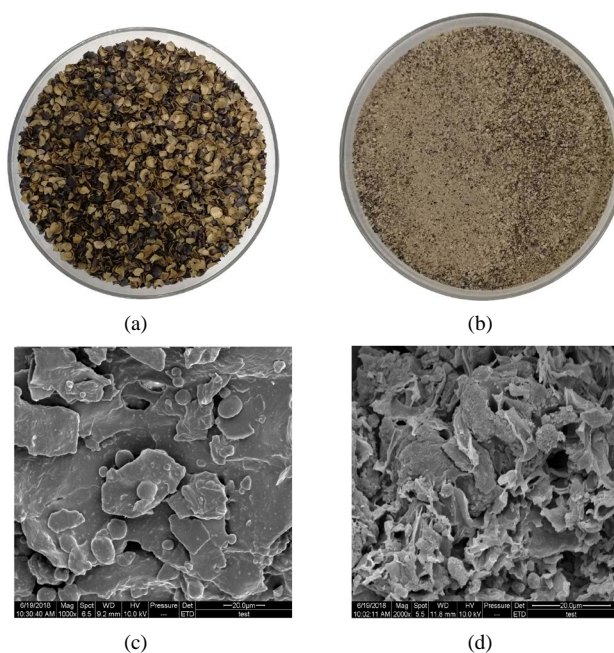


Figure 2. (a) Peony seed husk raw materials; (b) Peony seed husk raw material extraction residue; (c) Electron microscope picture of peony seed shell raw material (1000 \times); (d) Electron microscope picture of the residue of peony seed hull extraction (1000 \times)

图 2. (a) 牡丹籽壳原料; (b) 牡丹籽壳原料提取剩余物; (c) 牡丹籽壳原料电镜图片(1000 \times); (d) 牡丹籽壳提取剩余物电镜图片(1000 \times)

3.4. 热重结果

图 3(a)和图 3(b)分别为 SEO 和 PEO 的热重图。DTG 曲线上的峰值代表在该温度范围的最大失重率[16][17]。从图中观察到，SEO 和 PEO 低分子量组分分解峰分别在 259 $^{\circ}\text{C}$ 和 277 $^{\circ}\text{C}$ 处，SEO 和 PEO 高分子量组分分解峰在 367 $^{\circ}\text{C}$ 和 406 $^{\circ}\text{C}$ 处。由于 PEO 中含有较多的多糖和其他活性成分，导致 PEO 的分解温度低于 SEO。

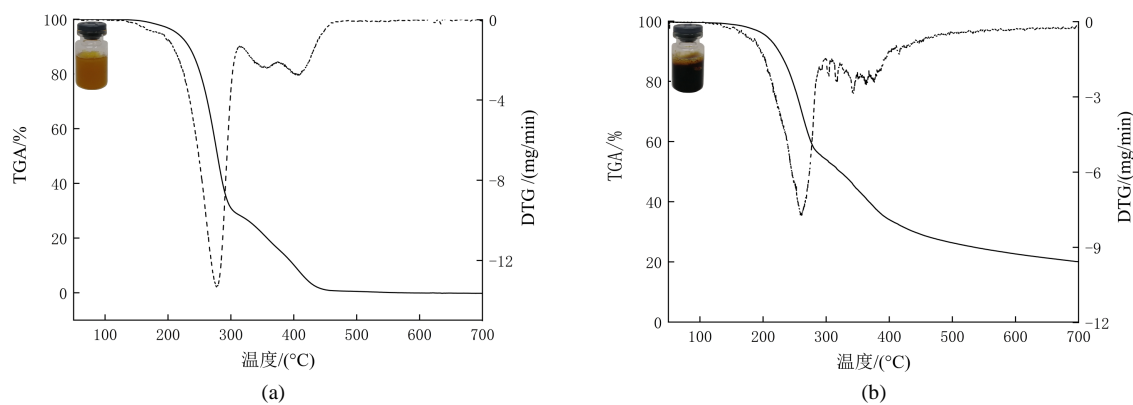


Figure 3. (a) SEO thermogram; (b) PEO thermogram

图 3. (a) SEO 热重图; (b) PEO 热重图

3.5. 芍药苷与白藜芦醇含量分析

HPLC 检测分析结果(见图 4)可得 PEO 样品中提取的活性成分含量与 SEO 样品相比, 其含量更高, PEO 中白藜芦醇含量为 0.014%, 对比 SEO 中白藜芦醇的含量仅为 0.0011%, PEO 中白藜芦醇含量为 SEO 的 12.72 倍。此外, 在 PEO 样品中, 含有芍药苷成分, 其芍药苷含量为 1.40%, 而 SEO 样品中不含有芍药苷成分。

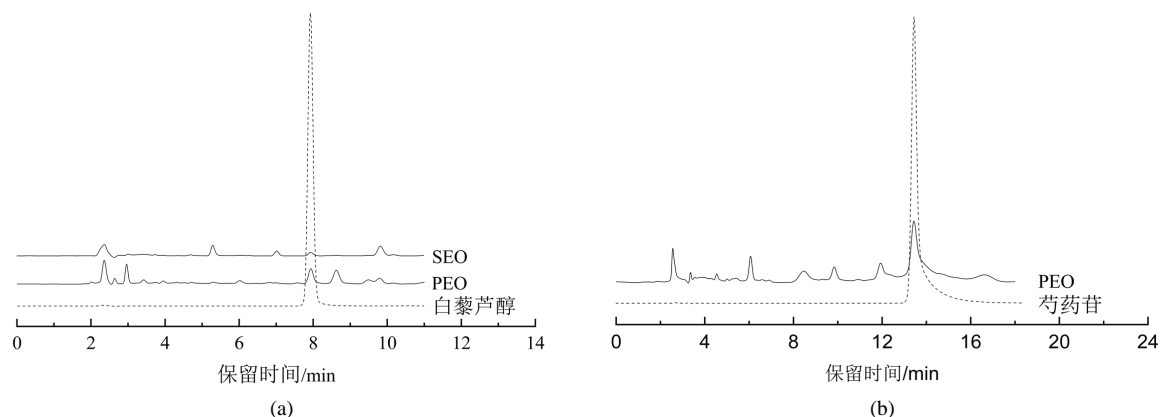


Figure 4. (a) Resveratrol, PEO, SEO liquid chromatogram; (b) PEO, paeoniflorin liquid chromatogram

图 4. (a) 白藜芦醇、PEO、SEO 液相色谱图; (b) PEO、芍药苷液相色谱图

3.6. 红外光谱分析

白藜芦醇、角鲨烯、芍药苷、PEO、SEO、EPA 红外谱图如图 5。观察得出, 芍药苷在 3420 cm^{-1} 处有明显的羟基振动吸收峰, PEO 在 3420 cm^{-1} 也有了明显的羟基振动吸收峰, 对比 SEO 在 3420 cm^{-1} 处没有振动吸收峰, 三者说明 PEO 中含有芍药苷成分, 在 SEO 中没有芍药苷。角鲨烯、EPA、PEO 和 SEO 在 3009 、 2925 和 2854 cm^{-1} 处的峰分别为顺式双键(-C=C)上的 -CH 伸缩振动[18]、亚甲基(-CH_2)和甲基(-CH_3)伸缩振动, 这表明 PEO 和 SEO 均含有角鲨烯和 EPA。白藜芦醇、PEO 和 SEO 在 3293 和 1147 cm^{-1} 处有明显的羟基和醚键振动吸收峰, 这一结果表明 SEO 和 PEO 两者中皆含有白藜芦醇。波数为 938 cm^{-1} 处的吸收峰, 代表双键[19]上的 -CH 平面外变形振动。苯环特征吸收峰的波数在 $1604\sim 1450\text{ cm}^{-1}$ 之间。另外, 在 1712 cm^{-1} 的峰被和酮(-C=O)的振动相关, 红外光谱结果表明 PEO 富含活性成分, 包括白藜芦醇、芍药苷、EPA 和角鲨烯, 这结果也被 HPLC 和 GS 结果所证实。

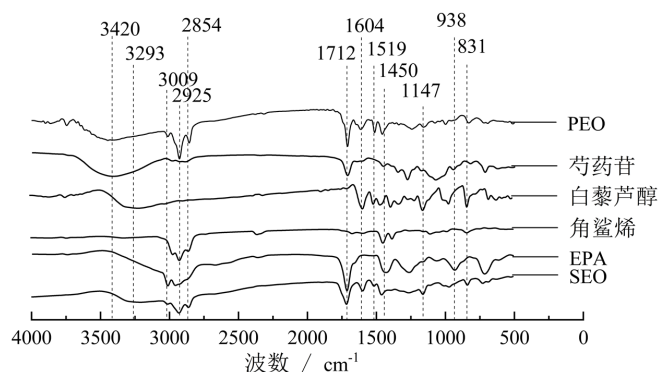


Figure 5. Infrared spectra of paeoniflorin, resveratrol, squalene, EPA, SEO, PEO

图 5. 芍药苷、白藜芦醇、角鲨烯、EPA、SEO、PEO 红外谱图

3.7. 脂肪酸成分分析

SEO 和 PEO 油脂部分的脂肪酸组成见图 6, 观察得出, SEO 和 PEO 脂肪酸组成成分比较相似。此次实验 SEO 油脂部分中的油酸含量(27.0%), 亚油酸的含量(22.9%)和 PEO 油脂部分中的油酸含量(28.2%), 亚油酸的含量(23.0%)均与文献[20]已经报道的牡丹籽油中含有油酸含量(27.73%)和亚油酸的含量(21.4%)基本一致。而 PEO 油脂部分中的 α -亚麻酸含量(39.8%)和棕榈酸的含量(5.8%)和 SEO 油脂部分中的 α -亚麻酸含量(41.8%)和棕榈酸的含量(5.2%), 与已报道牡丹籽油中 α -亚麻酸含量(33.87%)和棕榈酸的含量(0.54%)相比数值高一些。此外, 首次在 PEO 的油脂部分中发现角鲨烯和 EPA, 其含量经计算分别为 0.007% 和 0.0526%, 在 SEO 中的含量分别为 0.0397% 和 0.0134%。PEO 油脂部分中所包含的肉豆蔻酸、十七烷酸、油酸、 γ -亚麻酸、二十碳三烯酸和二十碳五烯酸的量比 SEO 包含的量要高。这可以说明乙醇作为提取物的溶剂对比石油醚作为提取溶剂具有一定的优势, 可以将更多的活性成分提取出来。

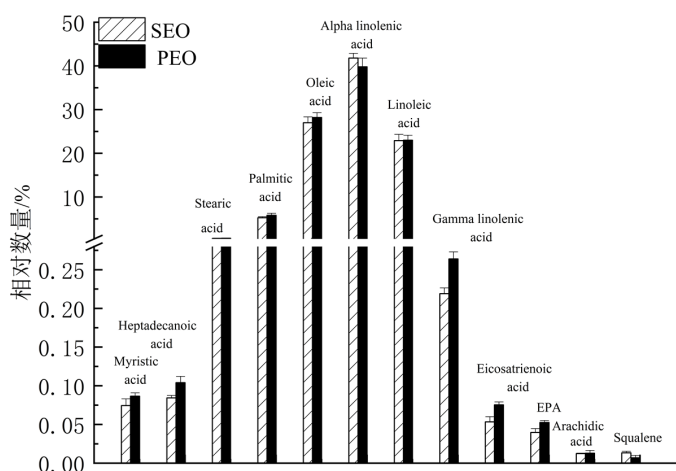


Figure 6. Fatty acid composition of PEO and SEO oil
图 6. PEO 和 SEO 油脂部分的脂肪酸组成

3.8. 体外抗氧化活性分析

SEO 与 PEO 对 DPPH 自由基清除能力见图 7(a)。观察得出, 样品浓度与 DPPH 自由基清除能力呈正相关趋势, 即浓度越大, DPPH 自由基清除能力越强。清除能力, Vc 高于 PEO, PEO 高于 SEO。SEO 与 PEO 的 DPPH 自由基清除 IC₅₀ 值分别为 13.393 与 0.209 mg/mL。

SEO 与 PEO 对羟自由基的清除能力见图 7(b)。观察得出, Vc 的羟自由基清除能力比 SEO 和 PEO 强。PEO 的羟自由基清除能力比 SEO 要强, SEO 与 PEO 的羟基自由基清除 IC₅₀ 值分别为 9.195 与 12.347 mg/mL。

SEO 与 PEO 对 ABTS 自由基的清除能力见图 7(c)。观察得出, PEO 的 ABTS 自由基清除能力高于 SEO, 比 Vc 的清除能力也略强一些。SEO 与 PEO 的 ABTS 自由基清除 IC₅₀ 值分别为 1.294 与 0.003 mg/mL。

SEO 与 PEO 对超氧阴离子自由基的抑制能力见图 7(d)。PEO 对超氧阴离子自由基的抑制能力明显高于 SEO, 与 Vc 相比的抑制能力弱一些。SEO 与 PEO 的超氧阴离子自由基清除 IC₅₀ 值分别为 51.680 与 1.493 mg/mL。

自由基介导的链式反应的结果是脂质过氧化, 其终产物直接或间接造成 DNA 损伤[21]。SEO 与 PEO 抗脂质过氧化的能力见图 7(e)。SEO 与 PEO 的抗脂质过氧化能力 IC₅₀ 值分别为 19.024 与 7.997 mg/mL。结果显示, PEO 抗脂质过氧化的能力比 SEO 强。

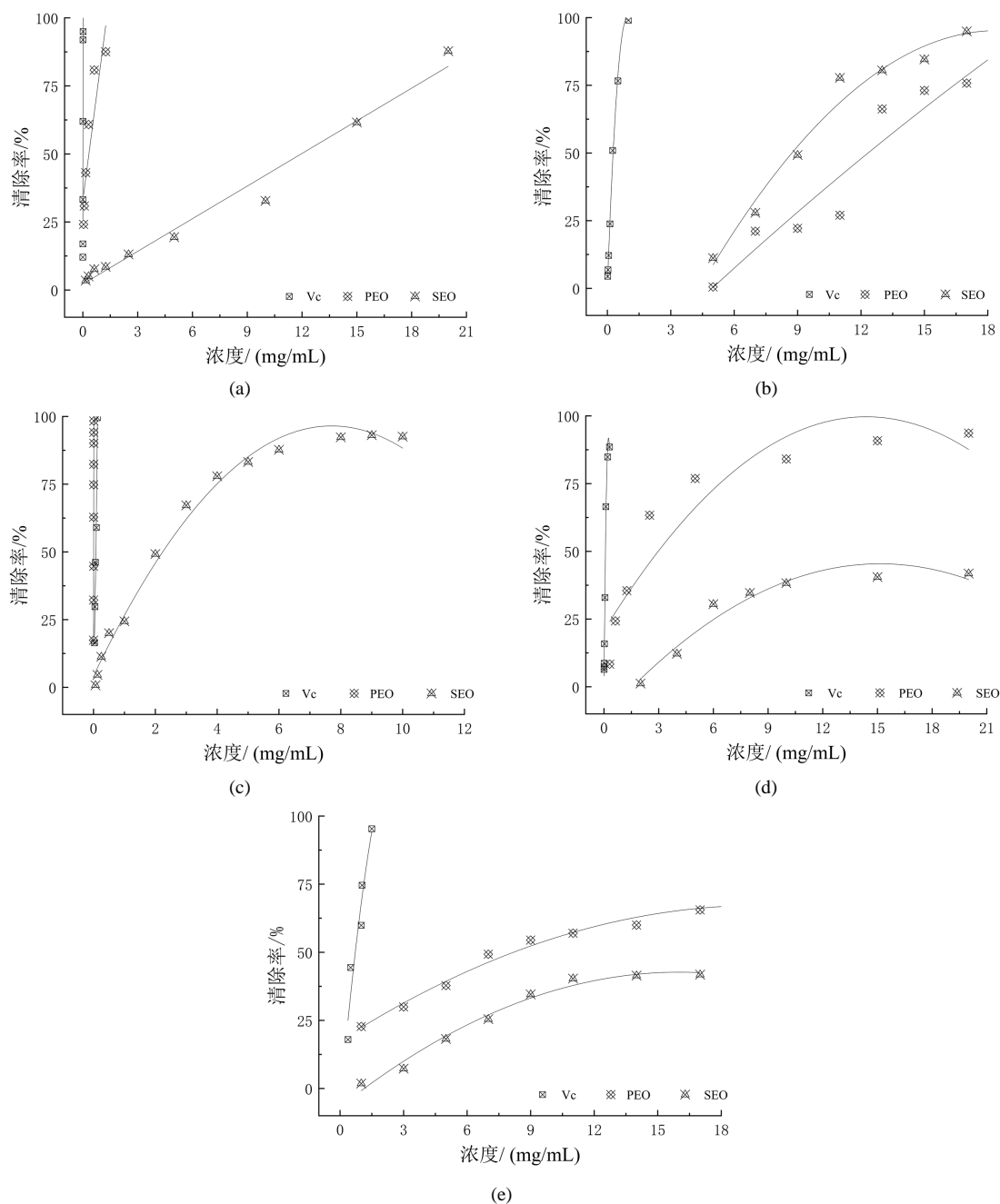


Figure 7. (a) PEO and SEO's ability to scavenge DPPH free radicals; (b) PEO and SEO's ability to scavenge hydroxyl radicals; (c) PEO and SEO's ability to scavenge ABTS free radicals; (d) PEO and SEO Scavenging ability of superoxide anion free radicals; (e) PEO and SEO anti-lipid peroxidation ability

图 7. (a) PEO 和 SEO 对 DPPH 自由基的清除能力; (b) PEO 和 SEO 对羟自由基的清除能力; (c) PEO 和 SEO 对 ABTS 自由基的清除能力; (d) PEO 和 SEO 对超氧阴离子自由基的清除能力; (e) PEO 和 SEO 抗脂质过氧化的能力

综上所述，牡丹籽壳提取物 PEO 由于富含活性成分，包括多糖和活性小分子物质，具有很强的综合抗氧化活性。

3.9. 毒性实验结果分析

在本研究 PEO 的给药范围内(0.05~0.8 g/kg)，大鼠连续灌胃 45 天后，未发现 PEO 具有毒性。MDA

通常被用于氧化应激的标记物[22] [23]。另外,细胞中存在多种抗氧化机制阻止细胞内活性氧的产生和氧化损伤, CAT 和 SOD 为其中两种常见的细胞抗氧化酶,它们可以有效减少过氧化氢的产生和脂质过氧化[24] [25]。本研究通过对大鼠血清中 CAD、SOD 和 MDA 含量与对照组含量进行比对分析。实验结果表明,大鼠血清中 CAD (见图 8(a))和 SOD (见图 8(b))的值随着 PEO 口服灌胃剂量的增加而升高,而 MDA 却呈现降低的趋势(见图 8(c))。与对照组(盐水-羧甲基纤维素钠盐)相比, PEO 能有效抑制体内 MDA 的产生,促进大鼠血清中 CAT 和 SOD 的升高。该实验结果也与 PEO 体外抗氧化活性相契合。

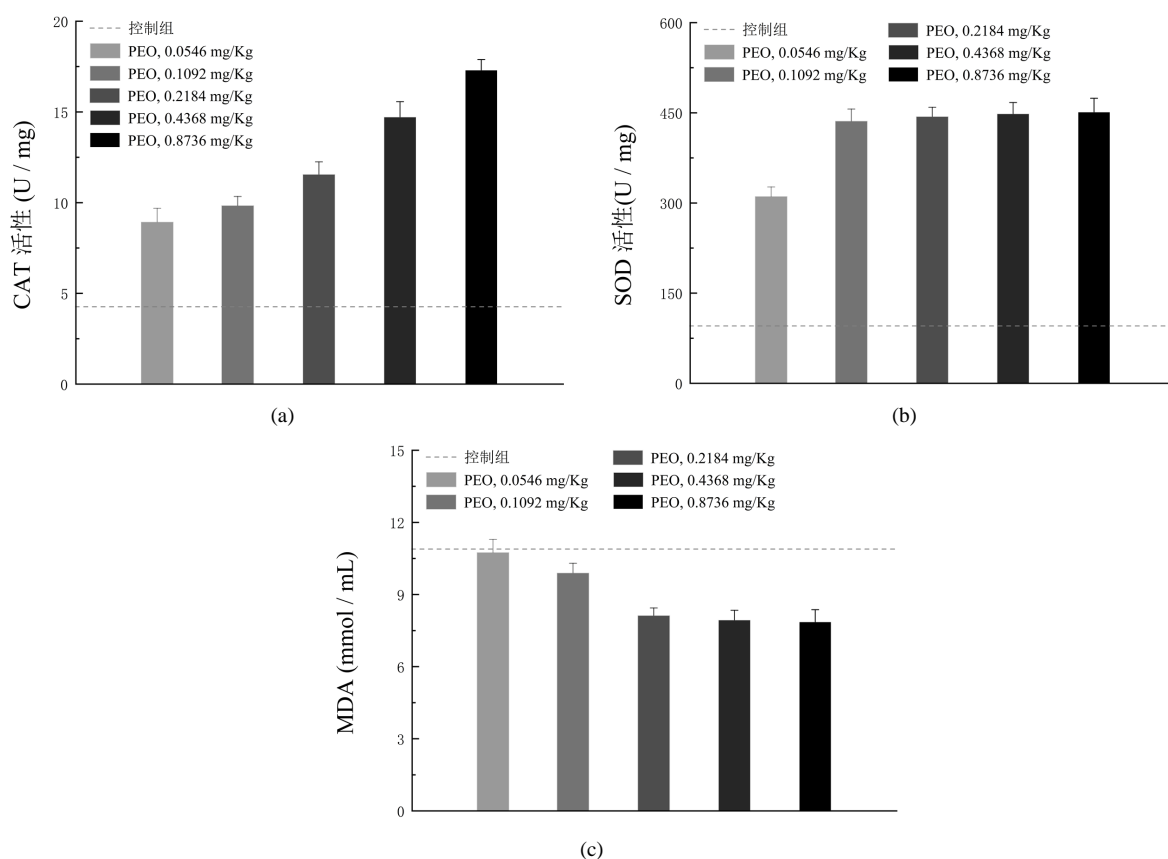


Figure 8. (a) CAT activity and PEO dose change graph; (b) SOD activity and PEO dose change graph; (c) MDA activity and PEO dose change graph

图 8. (a) CAT 活性与 PEO 剂量变化图; (b) SOD 活性与 PEO 剂量变化图; (c) MDA 活性与 PEO 剂量变化图

4. 结论

本研究,以油用牡丹“凤丹”加工剩余物籽壳为原料,乙醇为溶剂,提取物产率为响应值,通过单因素和正交实验制备最优提取工艺,最优工艺为:乙醇浓度 95%、提取温度 90℃、料液比 1:10,提取时间 4 h。在最优提取工艺条件下,PEO 产率为 $24.68\% \pm 1.27\%$,其中油和非油部分产率分别为 5.16% 和 19.52%。经 HPLC 检测,比对分析,牡丹籽壳乙醇提取物(PEO)内含有白藜芦醇和芍药苷,在传统石油醚索氏提取法(SEO)中含有白藜芦醇,不含有芍药苷,且白藜芦醇含量仅有 PEO 的 1/12.72。通过 GC 油脂组成分析,首次在 PEO 的油脂部分中发现到角鲨烯(0.007%)和 EPA (0.0526%)。并且经过计算 PEO 油脂部分中所含有的棕榈酸和 α -亚麻酸含量比牡丹籽油中的含量数值大一些,另外,PEO 油脂部分中所包含的肉豆蔻酸、十七烷酸、油酸、 γ -亚麻酸、二十碳三烯酸和二十碳五烯酸的量比 SEO 包含的量要高。从体外抗氧化实验分析得出,牡丹籽壳乙醇提取物(PEO)具有很强的综合抗氧化活性。鼠持

续灌胃 45 天后, 未发现 PEO 具有毒性, 大鼠血清检测发现 PEO 可以促进 CAT 和 SOD 的升高, 并且抑制 MDA 的产生。

综上所述, 以新资源食品牡丹“凤丹”加工剩余物籽壳为原料, 采用乙醇为提取溶剂, 获得籽壳乙醇提取物的研究, 将为油用牡丹“凤丹”企业深加工, 以及牡丹籽壳提取物的广阔的应用前景提供基础数据支撑, 为资源合理开发利用做出相应贡献。

基金项目

感谢黑龙江省基金面上项目(C2018003)的资助。

参考文献

- [1] 于玲, 左利娟. 油用牡丹开发利用研究进展[J]. 北京农业职业学院学报, 2017, 31(1): 23-31.
- [2] Capellini, M.C., Giacomini, V., Cuevas, M.S. and Rodrigues, C.E.C. (2017) Corrigendum to “Rice Bran Oil Extraction Using Alcoholic Solvents: Physicochemical Characterization of Oil and Protein Fraction Functionality”. *Industrial Crops and Products*, **104**, 133-143. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.017>
- [3] Attard, T.M., Bukhanko, N., Eriksson, D., Arshadi, M., Geladi, P., Bergsten, U., Budarin, V.L., Clark, J.H. and Hunt, A.J. (2018) Supercritical Extraction of Waxes and Lipids from Biomass: A Valuable First Step towards an Integrated Biorefinery. *Journal of Cleaner Production*, **177**, 684-698. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.12.155>
- [4] 杨剖舟, 翟晓娜, 栾霞, 等. 响应面优化水-乙醇法提取云南咖啡生豆绿原酸工艺研究[J]. 粮油食品科技, 2020, 28(5): 156-162.
- [5] Toda, T.A., Sawada, M.M. and Rodrigues, C.E. (2016) Kinetics of Soybean Oil Extraction Using Ethanol as Solvent: Experimental Data and Modeling. *Food and Bioproducts Processing*, **98**, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2015.12.003>
- [6] Bessa, L.C.B.A., Ferreira, M.C., Rodrigues, C.E.C., Batista, E.A.C. and Meirelles, A.J.A. (2017) Simulation and Process Design of Continuous Countercurrent Ethanolic Extraction of Rice Bran Oil. *Journal of Food Engineering*, **202**, 99-113. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.01.019>
- [7] Alzeer, J. and Abou Hadeed, K. (2016) Ethanol and Its Halal Status in Food Industries. *Trends in Food Science and Technology*, **58**, 14-20. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.10.018>
- [8] Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. (1956) Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, **28**, 350-356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- [9] Madaan, R., Bansal, G., Kumar, S. and Sharma, A. (2011) Estimation of Total Phenols and Flavonoids in Extracts of *Actaea spicata* Roots and Antioxidant Activity Studies. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **73**, 666-669. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.100242>
- [10] Busaba, T. and Siriporn, L. (2014) Phenolics, Flavonoids and Antioxidant Activity of Vegetables as Thai Side Dish. *Apcbee Procedia*, **8**, 99-104. <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2014.03.008>
- [11] Liu, Y., Zhang, B., Ibrahim S.A., Gao, S.S., Yang, H. and Huang, W. (2016) Purification, Characterization and Antioxidant Activity of Polysaccharides from *Flammulina velutipes* Residue. *Carbohydrate Polymers*, **145**, 71-77. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.03.020>
- [12] Jeddou, K., Chaari, F., Maktouf, S., Nouri-Ellouz, O., Claire, B. and Ghorbel, R. (2016) Structural, Functional, and Antioxidant Properties of Water-Soluble Polysaccharides from Potatoes Peels. *Food Chemistry*, **205**, 97-105. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.108>
- [13] 李军, 涂宗财, 张露, 等. 热加工条件对牛血清白蛋白-葡萄糖糖基化体系抗氧化活性的影响[J]. 食品科学, 2020, 41(11): 7-13.
- [14] 莫开菊, 柳圣, 程超. 生姜黄酮的抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2006, 27(9): 110-115.
- [15] 王宏雁, 张朋杰, 杨琴. 白藜芦醇纳米脂质体的制备与抗氧化性能[J]. 粮食与油脂, 2018, 31(3): 93-97.
- [16] Silva, L.S., González, D.L., Villaseñor, J., Sánchez, P. and Valverde, J.L. (2012) Thermogravimetric-Mass Spectrometric Analysis of Lignocellulosic and Marine Biomass Pyrolysis. *Bioresource Technology*, **109**, 163-172. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.001>
- [17] Yang, H., Yan, R., Chen, H., Lee, D.H. and Zheng, C. (2007) Characteristics of Hemicellulose, Cellulose and Lignin Pyrolysis. *Fuel*, **86**, 1781-1788. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2006.12.013>
- [18] Guillen, M. and Cabo, N. (2000) Some of the Most Significant Changes in the Fourier Transform Infrared Spectra of

- Edible Oils under Oxidative Conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80**, 2028-2036. [https://doi.org/10.1002/1097-0010\(200011\)80:14<2028::AID-JSFA713>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1097-0010(200011)80:14<2028::AID-JSFA713>3.0.CO;2-4)
- [19] Cebi, N., Yilmaz, M.T., Sagdic, O., Yuce, H. and Yelboga, E. (2017) Prediction of Peroxide Value in Omega-3 Rich Microalgae Oil by ATR-FTIR Spectroscopy Combined with Chemometrics. *Food Chemistry*, **225**, 188-196. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.013>
- [20] Liu, P., Xu, Y.F., Gao, X.D., Zhu, X.Y., Du, M.Z., Wang, Y.X., Deng, R.X. and Gao, J.Y. (2017) Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Oil from the Seed Kernels and Isolation of Monoterpene Glycosides from the Oil Residue of *Paeonia lactiflora* Pall. *Industrial Crops & Products*, **107**, 260-270. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.013>
- [21] 高延静. 基于脂质体与 DNA 的酶动力学与细胞应用研究[D]: [博士学位论文]. 上海: 中国科学院大学, 2019: 144.
- [22] Reiter, R.J., Tan, D.X. and Galano, A. (2014) Melatonin Reduces Lipid Peroxidation and Membrane Viscosity. *Frontiers in Physiology*, **5**, 377. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00377>
- [23] Ho, E., Galougahi, K.K., Liu, C.C. and Bhindi, R.G.A. (2013) Biological Markers of Oxidative Stress: Applications to Cardiovascular Research and Practice. *Redox Biology*, **1**, 483-491. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.07.006>
- [24] Benaicheta, N., Labbaci, F.Z., Bouchenak, M. and Boukortt, F.O. (2016) Effect of Sardine Proteins on Hyperglycaemia, Hyperlipidaemia and Lecithin: Cholesterol Acyltransferase Activity, in High-Fat Diet-Induced Type 2 Diabetic Rats. *British Journal of Nutrition*, **115**, 6-13. <https://doi.org/10.1017/S0007114515004195>
- [25] 南芝润, 范月仙. 植物过氧化氢酶的研究进展[J]. 安徽农学通报, 2008, 14(5): 27-29.