

李小红,吴地尧,李 安,等. 缬草挥发油的微波辅助提取工艺及其抗氧化活性[J]. 江苏农业科学,2018,46(8):198-201.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.08.050

缬草挥发油的微波辅助提取工艺及其抗氧化活性

李小红¹, 吴地尧², 李 安¹, 张静宜¹, 吴德智¹

(1. 贵州理工学院, 贵州贵阳 550003; 2. 江西中医药大学, 江西南昌 330004)

摘要:以缬草根茎为原料,以缬草挥发油得率为指标,采用微波辅助水蒸气蒸馏法对缬草挥发油提取工艺进行单因素分析,并通过 Box - Behnken 响应曲面试验进行优化,分别用还原力、1,1 - 二苯基 - 2 - 三硝基苯肼(简称 DPPH)自由基清除力和羟自由基清除力对其抗氧化能力进行研究。结果表明,缬草挥发油微波提取的最佳工艺条件为微波功率 330 W、提取时间 25 min、液料比 8.6 mL : g,在此条件下提取的缬草挥发油得率为(5.92 ± 0.07)%。微波提取的缬草挥发油对 DPPH 自由基、羟自由基均有较强的清除能力及较高的还原力,与水蒸气蒸馏法相比具有明显差异,可为缬草抗氧化产品的开发提供参考。

关键词:缬草挥发油;微波提取;Box - Behnken 响应曲面试验;抗氧化

中图分类号:R284.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)08-0198-04

缬草(*Valeriana officinalis* L.)为败酱科缬草属多年生草本植物,具有镇静、催眠和抗惊厥等神经系统作用,同时具有调节循环系统和抗氧化、抗肿瘤等药理活性^[1]。缬草含有挥发油、黄酮类、环烯醚萜类、生物碱类等活性成分,其中挥发油是缬草的主要活性成分。目前,缬草挥发油的提取方法主要是水蒸气蒸馏法,但该方法存在能耗高、提取时间长、提取效率低、挥发油外观与气味发生明显变化等不足。近年来兴起的超临界流体萃取已经应用于缬草挥发油的提取^[2],该方法高效、得油率高、安全环保,但成本较高。目前微波辅助提取技术已广泛应用于挥发油提取^[3-6],该法能在较短时间完成提取,减少了挥发油因长时间高温所造成的含氧化合物热解、水解、氧化等,具有能量利用率高、提取速率快、得率高、可维持挥发油的天然品质等特点^[7]。本研究以缬草挥发油提取率为

主要指标,通过单因素及 Box - Behnken 响应曲面试验优化微波辅助水蒸气蒸馏提取工艺条件,并通过还原力、1,1 - 二苯基 - 2 - 三硝基苯肼(简称 DPPH)自由基清除力以及羟自由基清除力的测定,与传统水蒸气蒸馏法所得挥发油的抗氧化能力进行比较,以期对缬草的药用和食用产品研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

缬草根茎,采自贵州省江口县缬草种植基地。正己烷、无水乙醇、铁氰化钾,国药集团化学试剂有限公司;所用其他试剂均为分析纯。

Scientz - IIDM 微波光波超声波萃取仪,宁波新芝生物科技股份有限公司;FA1004B 电子天平,上海越平科学仪器有限公司;旋转蒸发器,上海上天精密仪器有限公司;UV - 2550 型紫外 - 可见分光光度计,梅特勒 - 托利多国际股份有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 缬草挥发油的提取工艺 采用一般水蒸气蒸馏法对缬草挥发油进行提取。称取适量样品,加一定量 NaCl 溶液,振荡混合后浸泡一定时间。连接挥发油测定器与回流冷凝管,保持微沸,蒸馏一段时间后停止加热,静置,取挥发油,加无水硫酸钠过夜,过滤得缬草挥发油提取物备用,与微波辅助提取的缬草挥发油进行抗氧化活性的比较。

收稿日期:2017-07-05

基金项目:贵州省科技计划(编号:黔科合基础[2017]1073);贵州省教育厅青年成长项目(编号:黔教合 KY 字[2016]233);贵州理工学院博士启动基金(编号:XJGC20161218);贵州省大学生创新创业项目(编号:201714440004);江西省中医药科研计划(编号:2016A020)。

作者简介:李小红(1984—),女,江西抚州人,博士,副教授,主要从事食品与药品的研究与开发工作。E-mail:370145344@qq.com。
通信作者:吴德智,博士,教授,主要从事食品与药品的研究与开发工作。E-mail:754756587@qq.com。

- [19] 岳晓华,沈月新. 可食性壳聚糖膜性能的研究[J]. 食品科学, 2002,23(8):62-67.
[20] 钟业俊. 复合保鲜涂膜剂(OAA-7)抑菌特性及其在水果保鲜中的应用研究[D]. 南昌:南昌大学,2007.
[21] 孙新枝. 壳聚糖保鲜剂涂膜对保鲜葡萄的效果研究[J]. 食品工业科技,2012,33(19):329-330,369.
[22] 康明丽,谷进军,郭小磊. 大蒜精油-羧甲基纤维素钠复合涂膜提高草莓贮藏效果[J]. 农业工程学报,2016,32(14):300-305.
[23] 阎春琦,葛喜珍,田平芳. 小檗碱和壳聚糖抗蔬菜病原真菌活性测定及复合膜制备[J]. 北方园艺,2009(8):131-133.

- [24] 周 浩,甘启贵,杨 鸾,等. 添加天然防腐剂的涂料在水果保鲜贮藏中的应用[J]. 天然产物研究与开发,1999(3):47-52.
[25] 郑小林,田世平,徐 勇,等. 气调贮藏下草酸处理对芒果果实成熟和腐烂的影响[J]. 果树学报,2005,22(4):351-355.
[26] 张 桂. 果蔬采后呼吸强度的测定方法[J]. 理化检验(化学分册),2005,41(8):596-597.
[27] 库尔班江,赛丽曼. 碘量法测水果蔬菜中维生素 C 的含量[J]. 伊犁师范学院学报(自然科学版),2007(3):28-32.
[28] 翁 霞,辛 广,李云霞. 蒽酮比色法测定马铃薯淀粉总糖的条件研究[J]. 食品研究与开发,2013(17):86-88.

参照谭承佳等的微波辅助提取挥发油的方法^[8]对缬草挥发油进行提取。取适量缬草,将正己烷按一定比例加入圆底烧瓶内,置于改良的微波炉腔内。根据试验要求设定微波功率与时间,回流提取后冷却至室温,抽滤,收集滤液,适量浓缩,水浴蒸干得到微波提取物。再采用上述一般水蒸气蒸馏法收集缬草挥发油,计算挥发油得率:

缬草挥发油得率 = [缬草挥发油质量(g)/缬草质量(g)] × 100%。

1.2.2 单因素考察微波辅助提取工艺 本试验针对微波功率(150、300、450、600、750 W)、提取时间(10、15、20、25、30、35 min)、液料比(4 mL : 1 g、6 mL : 1 g、8 mL : 1 g、10 mL : 1 g、12 mL : 1 g) 3 个因素,保持其中 2 个变量固定不变,对另 1 个变量进行单因素试验,以挥发油提取率为指标,以确定 Box - Behnken 响应曲面设计所需的水平范围。

1.2.3 Box - Behnken 响应曲面法优选缬草挥发油提取工艺 在单因素试验的基础上,选取微波功率、提取时间、液料比 3 个对挥发油提取率影响较大的因素,用 Design - Expert 8.0.6 提供的 Box - Behnken 试验,以挥发油提取率为指标优化提取工艺参数,试验设计如表 1、表 2 所示。

表 1 Box - Behnken 响应面试验因素与水平

水平	因素		
	A:微波功率(W)	B:提取时间(min)	C:液料比(mL : g)
-1	150	15.0	6 : 1
0	300	22.5	8 : 1
1	450	30.0	10 : 1

表 2 缬草挥发油提取的 Box - Behnken 响应曲面试验设计及评价指标

序号	A:微波功率(W)	B:提取时间(min)	C:液料比(mL : g)	提取率(%)
1	450.00	22.50	10 : 1	4.75
2	450.00	15.00	8 : 1	4.46
3	150.00	22.50	6 : 1	3.21
4	300.00	15.00	10 : 1	4.49
5	300.00	22.50	8 : 1	5.81
6	450.00	22.50	6 : 1	4.32
7	150.00	30.00	8 : 1	3.57
8	300.00	30.00	6 : 1	5.21
9	150.00	15.00	8 : 1	3.19
10	300.00	22.50	8 : 1	5.82
11	450.00	30.00	8 : 1	4.68
12	300.00	15.00	6 : 1	5.32
13	150.00	22.50	10 : 1	3.36
14	300.00	22.50	8 : 1	5.89
15	300.00	22.50	8 : 1	5.66
16	300.00	30.00	10 : 1	5.63
17	300.00	22.50	8 : 1	5.71

1.2.4 DPPH 自由基清除能力测定 参照 Kim 等的方法^[9]进行 DPPH 自由基清除能力的测定。以无水乙醇为溶剂,将挥发油配制成浓度为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/mL 的溶液备用。精确吸取上述不同浓度的溶液 300 μL,与 2 mL 0.004% DPPH 溶液充分混合后于室温静置 20 min,在 517 nm 处测其吸光度 $D_{517\text{ nm}(1)}$ 。以不加提取液的 DPPH 为空白对照,以维生素 C 为阳性对照,测定溶液在 517 nm 处的吸光度

$D_{517\text{ nm}(0)}$ 。精确吸取 300 μL 上述不同质量浓度的挥发油溶液,分别与 2 mL 无水乙醇混合均匀后,以无水乙醇为对照,测定各溶液在 517 nm 处的吸光度 $D_{517\text{ nm}(2)}$ 。用同样的方法对水蒸气蒸馏法提取的挥发油 DPPH 自由基清除能力进行测定,计算公式如下:

DPPH 自由基清除率 = { 1 - [$D_{517\text{ nm}(1)}$ - $D_{517\text{ nm}(2)}$] / $D_{517\text{ nm}(0)}$ } × 100%。

1.2.5 铁氰化钾还原法测定还原力 参照刘水英等的方法^[10]对还原力进行测定。配制不同浓度的挥发油样品溶液。取 1.5 mL 样品,加入 1.5 mL pH 值 6.6 的磷酸盐缓冲液和 1.5 mL 六氰合铁酸钾溶液,混匀后于 50 ℃ 恒温放置 20 min,快速冷却后加入 1 mL 10% 三氯乙酸溶液,于 3 000 r/min 离心 10 min,取 1 mL 上清液再加入 1 mL 蒸馏水和 1 mL 0.1% 三氯化铁溶液,充分混匀并静置后,于 700 nm 处测定吸光度,以吸光度表示还原能力,以维生素 C 为阳性对照。用同样的方法对水蒸气蒸馏法提取的缬草挥发油的还原力进行测定。

1.2.6 羟自由基清除率 参照陈美珍等的方法^[11-12]进行羟自由基清除力的测定。配制不同浓度的挥发油样品溶液,取 1.5 mL 样品,分别加入 1.0 mL 2.5 mmol/L 水杨酸溶液、1.0 mL 5 mmol/L FeSO₄ 溶液和 2.0 mL 蒸馏水,充分混匀,加入 1.0 mL 5 mmol/L H₂O₂,先置于 37 ℃ 恒温水浴锅中反应 30 min,再于 510 nm 处测定其吸光度,以蒸馏水作为空白参比,以维生素 C 作为阳性对照。用同样的方法对水蒸气蒸馏法提取的缬草挥发油的羟自由基清除率进行测定,具体公式如下:

羟自由基清除率 = $\left[1 - \frac{D_{510\text{ nm}(2)} - D_{510\text{ nm}(1)}}{D_{510\text{ nm}(0)}} \right] \times 100\%$ 。

式中: $D_{510\text{ nm}(0)}$ 为空白对照吸光度; $D_{510\text{ nm}(2)}$ 为加 H₂O₂ 样品溶液吸光度; $D_{510\text{ nm}(1)}$ 为不加 H₂O₂ 样品溶液吸光度。

2 结果与分析

2.1 单因素考察挥发油微波辅助提取工艺

2.1.1 微波功率对挥发油提取率的影响 由图 1 可知,随着微波功率的增加,挥发油提取率呈现先上升后下降的趋势。当微波功率为 300 W 时,挥发油提取率为 (5.27 ± 0.27) %。分析其原因,主要由于当功率升高时,温度过高,低沸点物质随介质沸腾而有所损失。因此,选定 150 ~ 450 W 为响应面设计的最佳水平。

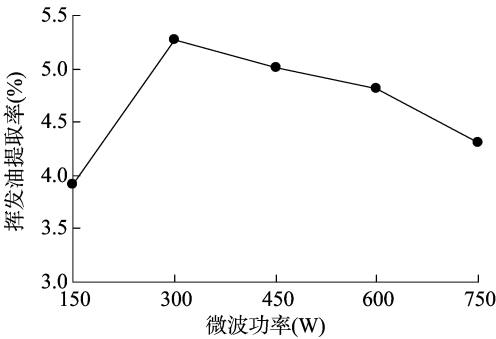


图1 微波功率对挥发油提取率的影响

2.1.2 提取时间对挥发油提取率的影响 由图 2 可知,随着提取时间的增加,挥发油提取率呈先上升后稳定在一定水平

再下降的趋势。当提取时间为 20~30 min 时,提取率稳定在(4.75±0.16)%左右,当继续增加提取时间,挥发油被破坏或从介质挥发从而出现提取率下降的趋势。因此,选定 15~30 min 为响应面设计的提取时间范围。

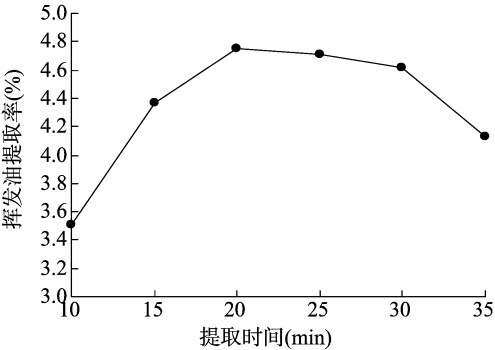


图2 提取时间对挥发油提取率的影响

2.1.3 液料比对挥发油提取率的影响 由图 3 可知,随着液料比的增加,挥发油提取率先上升后稳定在一定水平,没有明显提高。当液料比为 8 mL:1 g 时,提取率稳定在(5.7±0.25)%左右。主要是因为提取液的增加可使缬草与提取溶剂充分接触,有利于挥发油的浸出。当液料比超过 8 mL:1 g 时,挥发油的提取基本达到饱和状态。因此,选定(6~10 mL):1 g 为响应面设计的水平。

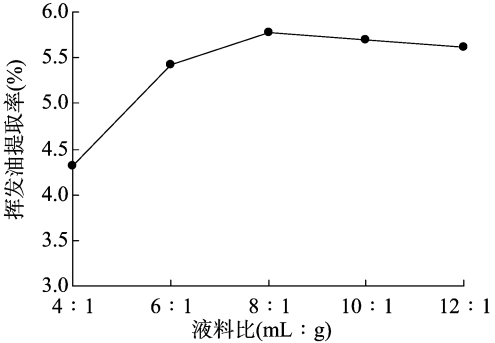


图3 液料比对挥发油提取率的影响

2.2 Box-Behnken 响应曲面设计优化挥发油微波辅助提取工艺

采用 Design-Expert 8.0.6 提供的 Box-Behnken 试验对各因素进行拟合,得到多元回归方程:

$$R_{\text{提取率}} = -6.1005 + 0.0437A + 0.0914B + 0.8323C - 3.5555 \times 10^{-5}AB + 2.3333 \times 10^{-4}AC + 0.0208BC - 6.7900 \times$$

$$10^{-5}A^2 - 4.8933 \times 10^{-3}B^2 - 0.0851C^2。$$

对挥发油提取率的回归模型进行方差及显著性分析的结果见表 3。可以看出,该模型方程有极显著影响($P<0.0001$),失拟项不显著($P=0.0612>0.05$),说明在本试验条件下,该回归模型所考察的因素足以反映试验中各提取工艺参数对挥发油提取率的影响。 $R^2=0.9880$, $R^2_{\text{adj}}=0.9725$,说明回归模型与试验值拟合均较好,可用于挥发油提取率的理论推测和分析,各因素影响大小依次为微波功率>提取时间>液料比。由 F 检验结果可知,一次项中微波功率、提取时间对挥发油的提取率具有极显著影响($P<0.01$),交互项中提取时间与液料比之间的交互作用对挥发油提取率具有极显著影响($P<0.01$);在二次项中微波功率、提取时间、液料比均对挥发油提取率具有极显著影响($P<0.01$),其他因素之间影响不显著。表 3 的结果与图 4 中响应面图反映的各因素间的交互作用吻合。

表 3 试验结果方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
回归模型	14.91	9	1.66	63.97	<0.0001
A	2.98	1	2.98	114.93	<0.0001
B	0.33	1	0.33	12.82	0.0090
C	0.003612	1	0.003612	0.14	0.7199
AB	0.006400	1	0.006400	0.25	0.6344
AC	0.020	1	0.020	0.76	0.4132
BC	0.39	1	0.39	15.08	0.0060
A ²	9.83	1	9.83	379.43	<0.0001
B ²	0.32	1	0.32	12.32	0.0099
C ²	0.49	1	0.49	18.82	0.0034
残差	0.18	7	0.026		
失拟项	0.15	3	0.049	5.80	0.0612
净误差	0.034	4	0.008470		
总和	15.09	16			

由 Design-Expert 8.0.6 软件得出,挥发油提取的最佳工艺参数是微波功率 326.30 W、提取时间 25.48 min、液料比 8.57 mL:1 g,在此条件下挥发油的提取率为 5.89%。便于生产试验需求,设定微波功率为 330 W,提取时间为 25 min,液料比为 8.6 mL:1 g,进一步进行验证试验,得出挥发油提取率为(5.92±0.07)%。该值与预测值比较近,因此选取微波功率 330 W、提取时间 25 min、液料比 8.6 mL:1 g 作为微波辅助提取缬草挥发油的工艺参数。

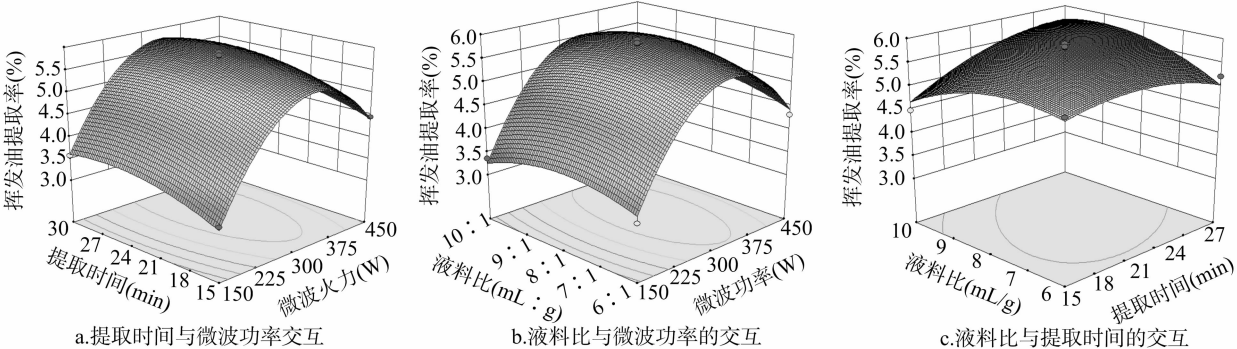


图4 不同提取参数的相互作用对挥发油提取率影响的响应面图谱

2.3 不同提取工艺提取的缬草挥发油抗氧化活性

2.3.1 DPPH 自由基清除能力测定结果 由图 5 可知,水蒸气蒸馏法与微波辅助提取法得到的缬草挥发油对 DPPH 自由基均有较强的清除能力,且缬草挥发油浓度与 DPPH 清除率存在正相关关系,微波辅助提取的清除能力明显高于一般水蒸气蒸馏法。当缬草挥发油浓度为 0.5 mg/mL 时,微波辅助提取法的清除率为 80.9%,而水蒸气蒸馏法的清除率为 70.2%。

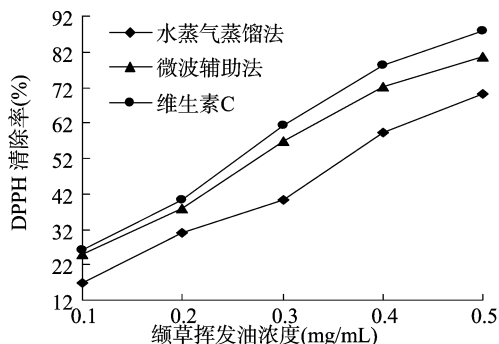


图5 不同提取方法所得缬草挥发油对 DPPH 自由基清除率的影响

2.3.2 还原力测定结果 吸光度与样品的还原力具有正相关关系,吸光度越大,样品的还原力越强。由图 6 可知,水蒸气蒸馏法与微波辅助提取法得到的缬草挥发油均具有较强的还原能力,说明该缬草挥发油也具有较的抗氧化能力。在测定的质量浓度范围内,缬草挥发油的还原力随着浓度的升高而增强,且微波辅助提取的缬草挥发油还原力明显高于一般水蒸气蒸馏法。当缬草挥发油浓度为 0.5 mg/mL 时,微波辅助提取法的吸光度为 1.35。

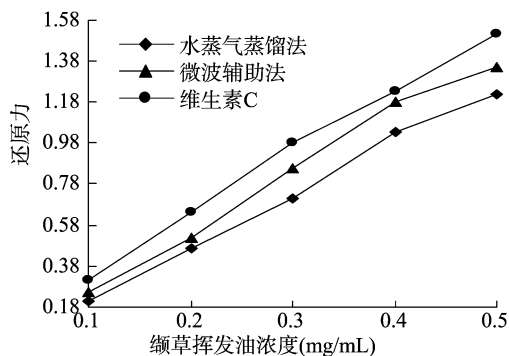


图6 不同提取方法所得缬草挥发油对还原力的影响

2.3.3 羟自由基清除率 由图 7 可知,水蒸气蒸馏法与微波辅助提取法得到的缬草挥发油对羟自由基均有较强的清除能力,随着挥发油浓度的增加,清除率也随之提高,微波辅助提取的清除能力明显高于一般水蒸气蒸馏法。当缬草挥发油浓度为 0.5 mg/mL 时,微波辅助提取法的清除率为 78.9%,而水蒸气蒸馏法的清除率为 73.1%。

3 结论

响应面法已广泛应用于化工、食品、农林、冶金等各领域,具有试验次数少、设计简便等优点。本研究以缬草为主要原料,采用 Box - Behnken 响应曲面设计,对其挥发油微波辅助提取工艺条件进行优化,并对微波辅助提取的挥发油与一般水蒸气蒸馏得到的挥发油进行抗氧化性能研究。结果表明,

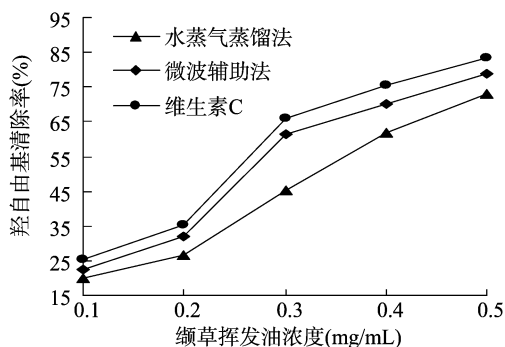


图7 不同提取方法所得缬草挥发油对羟自由基清除率的影响

微波辅助提取挥发油的最佳工艺条件为微波功率 330 W、提取时间 25 min、液料比 8.6 mL : 1 g,此条件下提取的缬草挥发油得率为 $(5.92 \pm 0.07)\%$ 。本试验挥发油提取工艺稳定可行,提取率高,具有较强的还原能力,对 DPPH 自由基、羟自由基均有较强的清除能力,抗氧化能力与一般水蒸气蒸馏法相比具有显著差异。微波辅助提取是一种节能、高效、提取植物高品质挥发油的新技术,在植物开发及食品研究中具有很好的应用前景。

参考文献:

- [1] 张 丹,周立新,林能明. 缬草的药理作用研究进展[J]. 中国临床药理学杂志,2014,23(6):397-402.
- [2] 李 岗,范文全,余德顺,等. 缬草挥发油的提取及抗氧化能力研究[J]. 时珍国医国药,2015,26(11):2647-2650.
- [3] Golmakani T M, Rezaei K. Comparison of microwave - assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. [J]. Food Chem, 2008,109(4):925-930.
- [4] Chemat F, Lucchesi M E, Smadja J, et al. Microwave accelerated steam distillation of essential oil from lavender: a rapid, clean and environmentally friendly approach [J]. Anal Chim Acta, 2006, 555(1):157-160.
- [5] Wang Z M, Ding L, Li T C, et al. Improved solvent - free microwave extraction of essential oil from dried *Cuminum cyminum* L. and *Zanthoxylum bungeanum* Maxim [J]. J Chromatogr A, 2006, 1102(1/2):11-17.
- [6] Viana M A, Fernandez X, Visinoni F, et al. Microwave hydrodiffusion and gravity, a new technique or extraction of essential oils [J]. J Chromatogr A, 2008, 1190(1):14-17.
- [7] 邹小兵,陶进转,夏之宁,等. 微波辅助提取挥发油的研究进展[J]. 中成药,2010,32(6):1014-1020.
- [8] 谭承保,温荣伟,马家骅,等. 微波提取柴胡挥发油的工艺研究[J]. 中成药,2014,36(6):1315-1317.
- [9] Kim D, Lee K W, Lee H J, et al. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals [J]. J Agric Food Chem, 2002, 50(13):3713-3717.
- [10] 刘水英,李新生,党 娅,等. 响应面法优化紫山药花青苷提取工艺及其抗氧化活性[J]. 食品科学,2014,35(22):84-91.
- [11] 陈美珍,余 杰,郭慧敏,等. 大豆分离蛋白酶解物清除羟自由基作用的研究[J]. 食品科学,2002,23(1):43-47.
- [12] 殷 军,葛 青,毛建卫,等. 竹叶多糖的组分及抗氧化活性分析[J]. 食品工业科技,2013,34(2):100-103.