

# 大豆油中植物甾醇提取工艺及抗氧化活性研究

李万林<sup>1</sup>, 钟姣姣<sup>1</sup>, 冯 巩<sup>1</sup>, 李 波<sup>1</sup>, 赵红红<sup>1</sup>, 刘彩芬<sup>2</sup>, 李 睿<sup>1</sup>, 刘 欢<sup>1</sup>

(1. 陕西理工学院 化学与环境科学学院, 陕西 汉中 723000; 2. 陕西理工学院 生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723000)

**摘要:** 以大豆油为原料, 采用微波辅助提取植物甾醇, 在单因素试验的基础上, 通过正交试验对提取工艺进行优化。结果表明: 微波辅助提取大豆油中植物甾醇最佳条件为: 微波温度 40℃、微波功率 400 W、微波时间 2 min、料液比 1:19 (g:mL), 在此最佳工艺条件下, 植物甾醇的提取量可达到 2.317 mg·g<sup>-1</sup>。以大豆油中粗甾醇为原料, 通过研究其清除羟自由基(·OH)的能力来确定其抗氧化性。结果表明, 大豆油粗甾醇清除羟自由基(·OH)的作用随质量浓度增加而增强, 其 IC<sub>50</sub> 为 16.430 mg·mL<sup>-1</sup>。

**关键词:** 大豆油; 植物甾醇; 微波; 提取工艺; 抗氧化性

**中图分类号:** TS229 **文献标识码:** A **DOI:** 10.11861/j.issn.1000-9841.2014.05.0731

## Extraction Process and Antioxidative Activity of Phytosterol in Soybean Oil

LI Wan-lin<sup>1</sup>, ZHONG Jiao-jiao<sup>1</sup>, FENG Gong<sup>1</sup>, LI Bo<sup>1</sup>, ZHAO Hong-hong<sup>1</sup>, LIU Cai-fen<sup>2</sup>, LI Rui<sup>1</sup>, LIU Huan<sup>1</sup>

(1. College of Chemistry and Environmental Science, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723000, China; 2. College of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723000, China)

**Abstract:** The extraction of phytosterol assisted by microwave was optimized through orthogonal experiments on the basis of single factor test by taking soybean oil as raw material. The results showed as follows: microwave temperature 40℃, microwave power 400 W, microwave time 2 min, ratio of material to liquid was 1:19 (g:mL), and under those conditions, the extraction volume could reach to 2.317 mg·g<sup>-1</sup>. The antioxidant was determined through studying the ability to scavenging hydroxyl free radicals(·OH) of crude sterol which was extracted from soybean oil. The experimental results showed that, the ability of crude sterol scavenging hydroxyl free radical(·OH) effect increasing with the concentration increasing, the IC<sub>50</sub> was 16.430 mg·mL<sup>-1</sup>.

**Key words:** Soybean oil; Phytosterol; Microwave; Extraction process; Antioxidative activity

甾醇广泛分布于动、植物界中, 大豆甾醇是大豆油脂中的一种功能性成分, 是人体中比较重要的生理活性物质, 可有效降低血清中胆固醇水平, 起到预防和治疗高血压、冠心病等心血管疾病的作用<sup>[1]</sup>。不仅如此, 大豆甾醇还具有抗炎作用, 设法阻断致癌细胞形成等多种生理特性<sup>[2]</sup>。甾醇的这些生理特性决定了其在医药领域的广泛应用, 除在医药领域之外, 在食品、化工等领域也得到广泛的应用。本试验采用微波辅助提取大豆油中植物甾醇。微波加热具有升温速度快、受热均匀、成本和能耗低, 仅为传统电热法能耗的 30%~40%, 操作简单、产品质量好、较易实现自动化控制等一系列优点<sup>[3]</sup>。在单因素试验的基础上通过正交试验比较得出较优的提取工艺, 旨在为工业化研究微波辅助提取植物甾醇提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 原料 大豆油(汉中某榨油公司)。

1.1.2 设备 MM721NG1-PW 微波炉; 紫外分光光度计(UV-2550); DGG-9140B 型电热恒温鼓风干燥箱; 电子天平(AL204); HH-2 电热恒温水浴锅等。

1.1.3 试剂 豆甾醇(西安蓝田生物工程有限责任公司, 95%); 三氯甲烷、无水乙醇、乙酸酐、浓硫酸、过氧化氢溶液、氯化亚铁及水杨酸均为市售分析纯。

### 1.2 方法

1.2.1 植物甾醇的提取 精确称取 1.00 g 大豆油置于 100 mL 的烧杯中, 按一定料液比分别加入乙醇溶液, 在一定温度、功率的条件下, 微波辅助提取一定时间, 真空泵下减压挥干溶剂得黄色黏稠物即为植物甾醇粗提物; 加 CHCl<sub>3</sub> 溶解粗提物, 定容至 10 mL, 进行甾醇含量分析。

1.2.2 最大吸收波长的确定 准确吸取 1.00 mL 豆甾醇标准溶液于 5 mL 具塞比色管中, 加入 2.00 mL 硫酸试剂, 用三氯甲烷定容至 5.00 mL, 显色 10 min 后, 以试剂为空白, 用紫外可见分光光度计于 550~800 nm 范围扫描, 以确定最大吸收波长<sup>[4]</sup>。

1.2.3 甾醇标准曲线的绘制 分别用移液管精密

收稿日期: 2014-01-22

基金项目: 陕西省 2014 年省级大学生创新创业训练项目(1594); 陕西理工学院大学生创新实验项目(UIRP2014012)。

第一作者简介: 李万林(1991-), 男, 学士, 主要从事天然产物的提取、分离和纯化研究。E-mail: 18049165510@163.com。

移取 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL 大豆甾醇标准溶液于 5 mL 具塞比色管中, 分别加入显色剂 2.0 mL, 以  $\text{CHCl}_3$  定容, 摇匀, 静置显色 10 min 后, 以试剂空白为参比在最大吸收波长处测量吸光度, 每个点重复 3 次。以各试管大豆甾醇质量浓度  $C$  为横坐标, 以吸光度  $A$  为纵坐标, 绘制标准曲线。

1.2.4 甾醇含量的测定 准确吸取甾醇提取物样品溶液 1 mL 于 10 mL 具塞试管中, 加入显色剂 2 mL, 用三氯甲烷定容至刻度, 超声分散 1 min, 静置 10 min, 于最大吸收波长下测定其吸光度  $A$ , 在标准曲线中查出相应的豆甾醇质量浓度<sup>[5]</sup>。样品总甾醇含量( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )按下式计算:

$$\text{样品总甾醇的含量(提取量)} = \frac{W \times V \times N}{M}$$

其中,  $W$ —样品中豆甾醇的质量浓度( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ );  $V$ —定容体积( $\text{mL}$ );  $N$ —稀释倍数;  $M$ —样品质量( $\text{g}$ )。

1.2.5 大豆甾醇的抗氧化活性研究 采用水杨酸法研究大豆油中植物甾醇清除羟基自由基的能力, 来评价植物甾醇的抗氧化性。羟自由基( $\cdot\text{OH}$ )是化学性质最活泼的一种自由基分子, 具有很高的反应速率常数, 因此, 在自由基中, 其危害性最大。因此, 利用清除 $\cdot\text{OH}$ 的能力来评价一种物质对自由基的清除效果<sup>[6]</sup>。

### 1.3 数据分析

采用 Excel 2003 进行数据处理及分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 最大波长的确定及标准曲线的绘制

2.1.1 最大吸收波长的确定 如图 1 所示, 豆甾醇标准品在 710 nm 处有最大吸收峰, 多次重复, 峰形

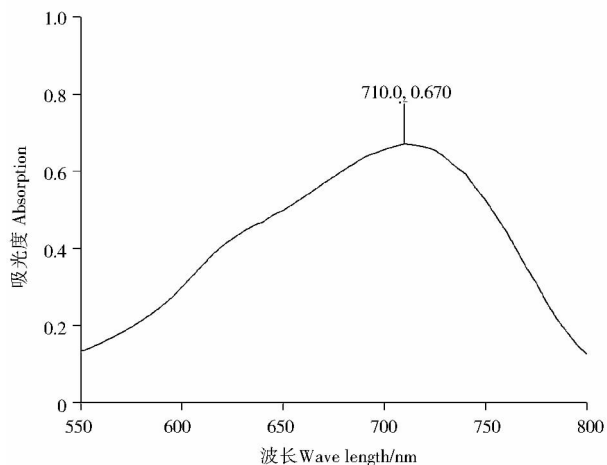


图 1 豆甾醇标准品的可见光吸收曲线  
Fig. 1 Absorption curve of stigmasterol standard of visible light

一致, 故选择 710 nm 作为大豆油中甾醇测定的最大吸收波长。

2.1.2 甾醇标准曲线的绘制 大豆甾醇标准曲线为  $A = 3.6768C - 0.0724$  ( $R^2 = 0.9994$ )。

### 2.2 大豆油中植物甾醇提取方法的单因素试验

2.2.1 料液比 分别称取 1.00 g 大豆油 5 份, 固定微波时间为 120 s, 微波功率为 400 W, 微波温度为 50℃, 以料液比为 1:10、1:13、1:16、1:19、1:22 进行甾醇提取。由图 2 可知, 当料液比为 1:19 时提取量最大。在料液比低于 1:19 时, 随着料液比的增大, 大豆油中植物甾醇提取量也在逐渐增大, 这是因为料液比较小时, 植物甾醇吸收的微波能量相对较多, 提取量呈增加趋势; 但是料液比过大时, 大豆油中植物甾醇已基本浸出, 所以造成提取量减小, 因此确定料液比为 1:19。

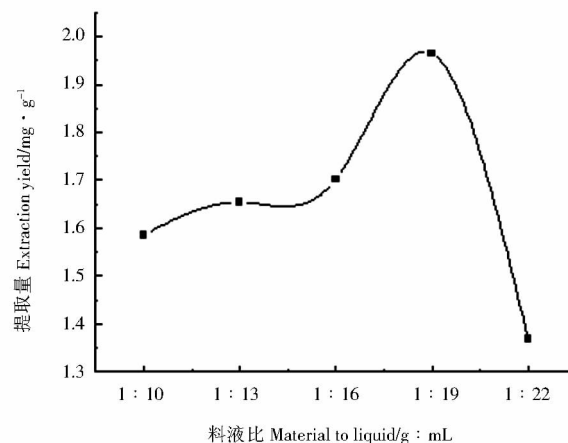


图 2 料液比对植物甾醇提取量的影响  
Fig. 2 Effect of ratio of material to liquid on extraction yield of phytosterol

2.2.2 微波温度 分别称取 1.00 g 大豆油 5 份, 固定微波时间为 120 s, 微波功率为 400 W, 料液比

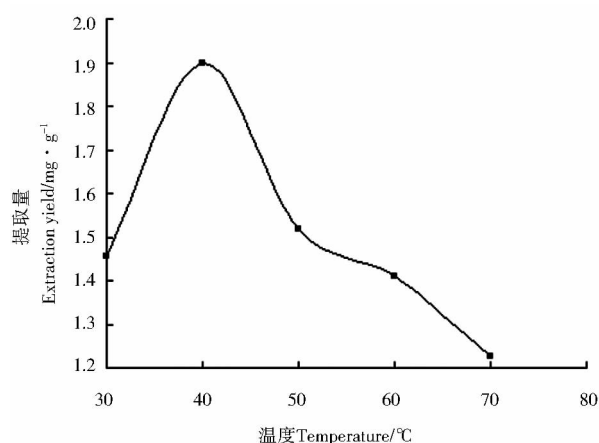


图 3 微波温度对植物甾醇提取量的影响  
Fig. 3 Effect of microwave temperature on extraction yield of phytosterol

1:19,以微波温度为 30,40,50,60,70℃ 进行试验。由图 3 可知,随着微波温度的增高,大豆油中植物甾醇提取量逐渐增大,当微波温度为 40℃ 时提取量达到最大,之后开始减小。这是因为温度升高,分子运动速度加快,细胞扩散速度加快,甾醇类物质更佳容易转移到溶剂中。当温度超过 40℃ 时植物甾醇结构及部分官能团可能遭到破坏,同时一些醇溶性杂质也会同时增多。因此导致提取率的降低。故选择 40℃ 为宜。

**2.2.3 微波时间** 分别称取 1.00 g 大豆油 5 份,固定微波温度为 40℃,微波功率为 400 W,料液比 1:19,以微波时间为 60,90,120,150,180 s 进行提取。由图 4 可知,在时间为 120 s 时植物甾醇提取量最大,之后提取量开始有所降低。低于 120 s 时,随着微波时间的延长,大豆油中植物甾醇提取量逐渐增大,这是因为具有特殊作用的微波效应促使了植物甾醇的快速溶解,但是随着时间的进一步延长,将会破坏甾醇类物质的原有结构,从而导致提取量降低。综合可得微波时间选取 120 s 为宜。

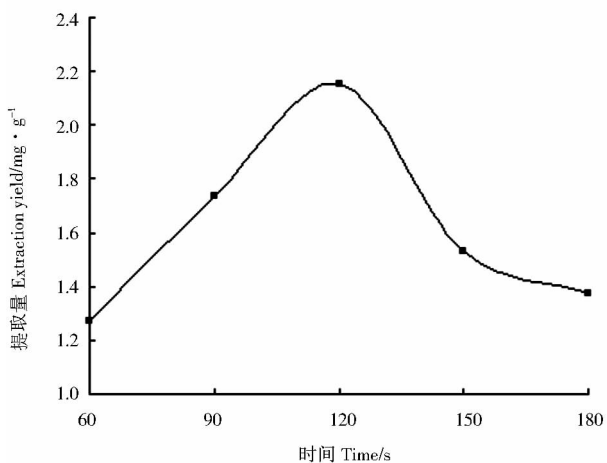


图 4 微波时间对植物甾醇提取量的影响

Fig. 4 Effect of microwave time on extraction yield of phytosterol

**2.2.4 微波功率** 分别称取 1.00 g 大豆油 5 份,固定微波温度为 40℃,微波时间为 120 s,料液比 1:19,以微波功率为 200,300,400,500,600 W 进行试验。由图 5 可知,在微波功率为 500 W 时植物甾醇提取量最大,之后提取量开始减小。低于 500 W 时,随着微波功率的增大,大豆油中植物甾醇提取量也在逐渐增大。这可能是因为微波功率过低时,对细胞膜破碎作用较小,所以植物甾醇提取量不高;随着微波功率不断增大,分子运动逐渐加剧,细胞膜破碎程度进一步加大。但是由于存在其他物质与植物甾醇之间的竞争,所以功率过大导致植物甾醇

的活性成分降低,进而造成植物甾醇提取量降低。考虑到生产成本,以微波功率 500 W 为宜。

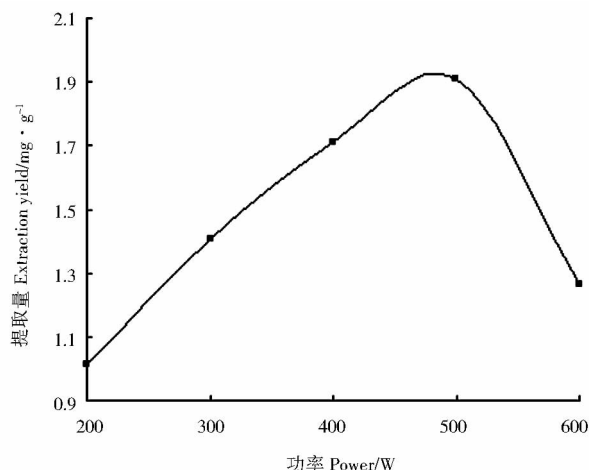


图 5 微波功率对植物甾醇提取量的影响

Fig. 5 Effect of microwave power on extraction yield of phytosterol

## 2.3 正交试验优化提取工艺

根据单因素试验结果,采用  $L_{16}(4^5)$  正交试验设计表,对料液比、微波温度、微波时间及微波功率 4 因子进行优化。

由表 1 可知,最优因素水平组合为  $A_3B_2C_2D_2$ ,即料液比为 1:19 (g:mL)、微波功率为 400 W、微波时间为 120 s、微波温度为 40℃。各因素影响大豆油中植物甾醇提取量的顺序是  $A > B > C > D$ ,即料液比 > 微波功率 > 微波时间 > 微波温度。

由正交试验结果的方差分析可知,所选取的 4 个因素中,料液比、微波功率、微波时间对大豆油中植物甾醇的提取量的都有一定的影响,影响都不显著(方差分析表略)。实际生产若考虑经济性,则料液比和微波功率可适当降低,但要控制好微波时间。

为进一步考察上述优选工艺的稳定性,按上述的最佳条件,进行 3 次平行试验。用紫外可见分光光度法测定,代入标准方程中计算其提取量,在最优条件下平行验证试验,得到大豆油中植物甾醇的提取量为  $2.317 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

## 2.4 大豆甾醇的抗氧化活性研究

由图 6 可以看出,大豆油粗甾醇有清除羟自由基( $\cdot\text{OH}$ )的作用,在甾醇样品  $0 \sim 50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  质量浓度范围内,清除羟自由基( $\cdot\text{OH}$ )的作用随着质量浓度的增加而增强,其  $\text{IC}_{50}$  为  $16.430 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。结果表明,大豆油粗甾醇具有较强的抗氧化性。

表 1 正交试验结果  
Table 1 Result of  $L_{16}(4^5)$  orthogonal experiment

试验序号 Test No.	料液比 Material to liquid/(g : mL)	功率 Power/W	时间 Time/s	温度 Temperature/℃	提取量 Extraction rate/mg·g <sup>-1</sup>
1	1(13)	1(300)	1(90)	1(30)	1.45
2	1	2(400)	2(120)	2(40)	1.95
3	1	3(500)	3(150)	3(50)	0.65
4	1	4(600)	4(180)	4(60)	0.75
5	2(16)	1	2	3	1.31
6	2	2	1	4	1.24
7	2	3	4	1	0.89
8	2	4	3	2	0.97
9	3(19)	1	3	4	1.68
10	3	2	4	3	1.54
11	3	3	1	2	1.53
12	3	4	2	1	1.08
13	4(22)	1	4	2	0.93
14	4	2	3	1	0.78
15	4	3	2	4	1.26
16	4	4	1	3	1.11
K <sub>1</sub>	1.200	1.342	1.333	1.050	
K <sub>2</sub>	1.103	1.378	1.400	1.345	
K <sub>3</sub>	1.458	1.083	1.020	1.153	
K <sub>4</sub>	1.020	0.978	1.028	1.232	
极差 R	0.438	0.400	0.380	0.295	

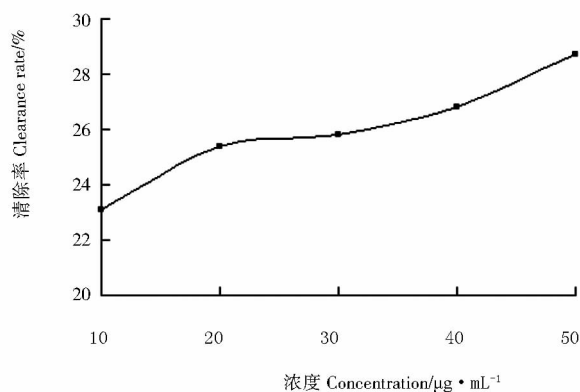


图 6 不同浓度样品溶液对羟自由基的清除作用

Fig. 6 Scavenging effect of sample solution of different concentration on  $\cdot\text{OH}$

### 3 结 论

在单因素的基础上,通过正交试验优化确定微波辅助提取大豆油中植物甾醇优化提取工艺为:料液比 1:19(g:mL)、微波功率为 400 W、微波时间为 120 s、微波温度为 40℃ 条件下,植物甾醇的提取量最高,可达到  $2.317 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。抗氧化性试验结果表明,大豆油粗甾醇具有较强的抗氧化性,可作为先导生产具有清除羟自由基作用药物的主要成分。

### 参考文献

- [1] 权静,卢定强,张筱.大豆功能性成分的研究现状[J].大豆通报,2004(3):27-29. (Quan J, Lu D Q, Zhang X. Recent development of soybean functional components[J]. Soybean Bulletin, 2004(3):27-29.)
- [2] 谢兵,傅相锴,隋岩,等.大豆天然甾醇的提取[J].西南师范大学学报,2005,30(5):897-900. (Xie B, Fu X K, Sui Y, et al. Extraction of soybean natural sterols[J]. Journal of Southwest China Normal University, 2005, 30(5):897-900.)
- [3] 朱飞蛾,田自华,张子义.甘草总黄酮微波法提取工艺的研究[J].畜牧与饲料科学,2008(5):1-2. (Zhu F E, Tian Z H, Zhang Z Y. Licorice microwave extraction technology of total flavonoids[J]. Animal Husbandry and Feed Science, 2008(5):1-2.)
- [4] 刘海霞,王峰,赵雁武,等.苹果籽油中植物甾醇的提取及分光光度法含量测定研究[J].食品科学,2009,30(6):146-150. (Liu H X, Wang F, Zhao Y W, et al. Extraction and spectrophotometric determination of plant sterols in apple seed oil[J]. Food Science, 2009, 30(6):146-150.)
- [5] 刘海霞,仇农学,王峰.苹果籽油中植物甾醇含量的薄层色谱—分光光度法测定[J].中国油脂,2008,33(11):76-79. (Liu H X, Qiu N X, Wang F. Phytosterols content in apple seed oil by thin-layer chromatography—spectrophotometric determination[J]. China Oil, 2008, 33(11):76-79.)
- [6] 姚钰蓉.紫甘薯花青素的提取纯化、稳定性及抗氧化活性研究[D].保定:河北农业大学,2009. (Yao Y R. Study on extracting and purifying anthocyanin from purple sweet potato, stability and antioxidative activity [D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2009.)