

林蛙卵油的提取、成分分析及抗氧化活性研究

韩子晗, 孙尧, 杨富雅, 高冷*

(长春工业大学化学与生命科学学院, 吉林长春 130012)

摘要:以林蛙卵为原料,采用超临界 CO₂ 提取法提取林蛙卵中的林蛙卵油,研究其成分含量和抗氧化活性。采用气相色谱-质谱法(GC-MS)联用对林蛙卵油的成分进行检测分析,确定成分及含量,并进行 DPPH 自由基清除能力试验、羟基自由基清除试验和超氧阴离子自由基清除试验确定林蛙卵油的抗氧化能力。通过单因素实验和正交试验确定最佳提取工艺为提取压力 35 MPa,提取温度 60 °C,CO₂ 流量 10 L/h,提取时间 150 min,此时林蛙卵油的提取率为 34.26%。GC-MS 结果显示林蛙卵油中含有 34 种脂肪酸,其中饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸相对含量分别为 31.95% 和 68.05%。体外抗氧化试验结果表明林蛙卵油对 DPPH 自由基的 IC₅₀ 值为 0.897 mg/mL,对羟基自由基的 IC₅₀ 值为 1.392 mg/mL,对超氧阴离子的 IC₅₀ 值为 1.687 mg/mL。林蛙卵油具有较强的体外抗氧化活性,在天然抗氧化剂和保健食品中有一定的开发利用价值。

关键词:林蛙卵油,超临界二氧化碳提取法,气相色谱-质谱法,高级脂肪酸,成分测定,抗氧化活性

Extraction, Component Analysis and Antioxidant Activity of *Rana chensinensis* Egg Oil

HAN Zi-han, SUN Yao, YANG Fu-ya, GAO Leng*

(College of Chemistry and Life Sciences, Changchun University of Technology, Changchun 130012, China)

Abstract: The egg oil of *Rana chensinensis* was extracted by supercritical CO₂ extraction from the eggs of *Rana chensinensis*, the component content and antioxidant activity of the *Rana chensinensis* egg oil were researched. The components and the contents of *Rana chensinensis* egg oil were analyzed and detected used the method of gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). DPPH radical scavenging ability test, hydroxyl radical scavenging test and superoxide anion free radical scavenging test were carried out for determining the antioxidant capacity of *Rana chensinensis* egg oil. The optimum extraction conditions were determined by single factor test and orthogonal test were as follows: Extraction pressure 35 MPa, extraction temperature 60 °C, CO₂ flow rate 10 L/h and extraction time 150 min. The extraction rate of *Rana chensinensis* egg oil was 34.26%. The results of GC-MS showed that there were 34 fatty acids in the frog egg oil, the relative contents of saturated fatty acids and unsaturated fatty acids were 31.95% and 68.05%, respectively. The results of *in vitro* antioxidant test suggested that the IC₅₀ value of *Rana esculenta* egg oil to DPPH free radical was 0.897 mg/mL, the IC₅₀ value for hydroxyl radicals was 1.392 mg/mL, and the IC₅₀ value of superoxide anion was 1.687 mg/mL. The frog egg oil had effective activity *in vitro* antioxidant experiment and showed certain development and utilization value in natural antioxidants and health foods.

Key words: *Rana chensinensis* egg oil; supercritical carbon dioxide extraction; gas chromatography mass spectrometry (GC-MS); higher fatty acid; composition determination; antioxidant activity

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2020)11-0060-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020.11.009

引文格式: 韩子晗, 孙尧, 杨富雅, 等. 林蛙卵油的提取、成分分析及抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(11): 60-65.

东北林蛙 (*Rana temporaria chensinensis* David), 简称林蛙, 又称雪蛤, 俗称田鸡、哈士蟆, 属两栖纲、无尾目、蛙科、林蛙属, 广泛分布于我国中北

部, 主产于我国黑龙江、吉林、辽宁和内蒙古。中国林蛙体内富含蛋白质、糖类以及多种维生素和激素等营养成分^[1], 具有重要的保健功能^[2]。林蛙卵是林

收稿日期: 2019-07-30

作者简介: 韩子晗(1996-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物提取与应用, E-mail: jiao15943063528@163.com。

* 通讯作者: 高冷(1963-), 男, 硕士, 研究方向: 天然产物化学, E-mail: 1455019770@qq.com。

基金项目: 吉林省科技创新专项资金项目(吉才教指[2017]1522号)。

蛙油生产过程中的副产物之一,林蛙卵的年产量大且未能得到充分利用逐渐得到关注。林蛙卵油中含有丰富的不饱和脂肪酸成分^[3-4],林蛙卵油具有抗惊厥^[5]、抗焦虑^[6]和调节血脂^[7]等作用。近几年,国外对于林蛙的研究微乎其微,对于林蛙卵油的研究尚未查阅到相关文献,国内刘俊梅等^[8]对林蛙卵的营养成分和保健功效进行了系统分析,陈宁宁等^[9]对林蛙卵油进行成分分析,并利用脂肪酸的乳化性质在化妆品领域进行产品研制。

CO₂是一种无毒、纯度高、可再循环利用的溶剂,是超临界流体提取技术最常用的溶剂^[10-11]。与常见的有机溶剂提取法相比,超临界流体提取物中没有溶剂残留,同时CO₂的临界压力与临界温度较为温和,提取过程可以在较低的压力温度下进行,不会对热敏性物质产生影响,更不会引起部分物质的氧化^[12]。作为一种环境友好型技术,超临界流体提取被应用于各种科学和工业生产领域^[13]。杨小斌等^[14]研究了超临界二氧化碳萃取蓝圆鲈鱼油的工艺条件,探究了不同提取条件对蓝圆鲈鱼油提取率的影响;Nuria等^[15]使用超临界二氧化碳对鱼油进行提取,并与其它方法进行了比较。

气相色谱-质谱法(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)联用灵敏度较高、抗干扰能力强,在化学、生物领域具有广泛的应用^[16-18]。肖井雷等^[19]利用气相色谱-质谱联用(GC-MS)的方法,对林蛙油中激素类成分进行了测定。

本文采用超临界CO₂提取法从林蛙卵中提取林蛙卵油,以单因素实验为基础,研究不同的提取因素对林蛙卵油提取率的影响,后续进行正交试验设计和极差分析,得出各因素之间的交互作用,确定不同因素对林蛙卵油提取率的影响强弱,对最佳提取工艺进行优化。采用GC-MS对林蛙卵油的成分进行检测分析,鉴定其主要成分,进而对其进行抗氧化活性研究^[20-21],为更好地开发并利用林蛙卵油提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

林蛙卵 长春工业大学化学与生命科学实验室;正己烷 分析纯,天津市富宇精细化工有限公司;氢氧化钠、甲醇、乙醚、氢氧化钾、无水乙醇、盐酸、氯化钠 分析纯,北京化工厂;水杨酸、邻苯三酚 分析纯,天津市光复精细化工有限公司;硫酸亚铁 分析纯,廊坊科瑞化工有限公司;过氧化氢 分析纯,西陇化工股份有限公司;Tris(生化试剂) 上海展云化工有限公司;1,1-二苯基-2-三硝基苯酚(DPPH) 分析纯,合肥巴斯夫生物科技有限公司。

SCION SQ 气质联用仪 上海冉超光电科技有限公司;HA221-50-06 超临界CO₂提取仪 江苏淮安科技有限公司;AE1012031 紫外分光光度计 上海元析仪器有限公司;CO₂钢瓶(40 L) 沈阳鑫东基化工气体有限公司;MixPlus 漩涡振荡器 南京东迈科技仪器有限公司;JE101 电子天平 上海浦春计量仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 林蛙卵油的提取

1.2.1.1 原料预处理 将林蛙卵除杂后放至超声波清洗仪(40 kHz, 30 °C下超声清洗30 min)中清洗,再进行真空干燥,相对真空度0.09 MPa,温度90 °C干燥至表面不含水分,使用粉碎机进行粉碎,-20 °C放置备用。

1.2.1.2 林蛙卵油提取工艺 称取1 kg 经过预处理的干燥林蛙卵原料装入提取釜中,加盖拧紧,装入反应容器中,控制单因素实验条件,在一定的温度、一定的压力、一定的时间和一定的CO₂流量进行提取,通过收集林蛙卵油,计算提取率,确定最佳单因素范围。

1.2.1.3 单因素实验 a:提取温度对林蛙卵油提取率的影响:称取1 kg 预处理过的林蛙卵原料,控制提取时间150 min,提取压力30 MPa,CO₂流量10 L/h 恒定不变,改变提取温度分别为40、45、50、55、60、65和70 °C,提取林蛙卵油,研究提取温度对林蛙卵油提取率的影响。

b:提取压力对林蛙卵油提取率的影响:称取1 kg 预处理过的林蛙卵原料,控制提取时间150 min,提取温度55 °C,CO₂流量10 L/h 恒定不变,改变提取压力分别为15、20、25、30、35、40和45 MPa,提取林蛙卵油,研究提取压力对林蛙卵油提取率的影响。

c:提取时间对林蛙卵油提取率的影响:称取1 kg 预处理过的林蛙卵原料,控制提取温度55 °C,提取压力30 MPa,CO₂流量10 L/h 恒定不变,改变提取时间分别为60、90、120、150、180、210和240 min,提取林蛙卵油,研究提取时间对林蛙卵油提取率的影响。

d:CO₂流量对林蛙卵油提取率的影响:称取1 kg 预处理过的林蛙卵原料,控制提取时间150 min,提取温度55 °C,提取压力30 MPa,改变CO₂流量分别为4、6、8、10、12、14和16 L/h,提取林蛙卵油,研究CO₂流量对林蛙卵油提取率的影响。

1.2.1.4 正交试验 在单因素实验的基础之上,筛选出对提取率影响较大的因素:提取温度、提取压力、提取时间、CO₂流量,并以林蛙卵油提取率为检验指标,进行L₉(3⁴)正交试验设计,正交实验设计因素水平表见表1。

表1 L₉(3⁴)正交试验因素水平

Table 1 Factor and level of Orthogonal test L₉(3⁴)

因素	水平			
	A 提取温度 (°C)	B 提取压力 (MPa)	C 提取时间 (min)	D CO ₂ 流量 (L/h)
1	55	30	150	8
2	60	35	180	10
3	65	40	210	12

1.2.1.5 林蛙卵油提取率测定方法 使用电子天平称量出干燥林蛙卵的质量,记为m₂,使用超临界CO₂提取,提取完成称量林蛙卵油质量,记为m₁,根据公式计算出林蛙卵油提取率X。林蛙卵油提取率公式为:

$$X(\%) = \frac{m_1}{m_2} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

式中, X: 林蛙卵油的提取率(%); m_1 : 林蛙卵油的质量(g); m_2 : 干燥林蛙卵的质量(g)。

1.2.2 脂肪酸组成的检测方法

1.2.2.1 林蛙卵油样品前处理

准确称取提取后的林蛙卵油 0.20 g, 加入正己烷使林蛙卵油完全溶解并定容在 10.00 mL 容量瓶中, 摇匀后用移液枪移取 50 μ L 于 10 mL 试管中, 加入 0.4 mol/L 的氢氧化钠-甲醇溶液 2.00 mL 后, 放置在漩涡振荡器中, 振荡 2 min, 放置 10 min, 再加入 1.95 mL 正己烷于试管中, 将其放入漩涡振荡器振荡 2 min, 让后用质量分数为 8.0% 的氯化钠溶液稀释至 10 mL, 以 2000 r/min 离心 10 min 后吸出上清液于微量试管中, 过 0.45 μ m 的微孔滤膜过滤, 再经过三氟化硼法进行脂肪酸的甲酯化处理^[22], 最后取 1 μ L 样品进行 GC-MS 分析。

1.2.2.2 色谱条件

DB-5MS 毛细管柱 (30 mm \times 0.25 μ m \times 0.25 nm), 进样口温度 250 $^{\circ}$ C; 程序升温: 90 $^{\circ}$ C 持续 1 min, 以 5 $^{\circ}$ C/min 至 140 $^{\circ}$ C, 再以 3 $^{\circ}$ C/min 至 170 $^{\circ}$ C, 持续 1 min, 最后以 10 $^{\circ}$ C/min 至 250 $^{\circ}$ C, 持续 5 min。载气: 高纯氦气; 流量 1 mL/min; 分流比: 40:1。

1.2.2.3 质谱条件

EI⁺ 离子源, 离子能量 70 eV; 灯丝流量 0.2 mA; 离子源温度: 230 $^{\circ}$ C; 接口温度: 250 $^{\circ}$ C; 扫描质量范围: 10~550 amu。

1.2.2.4 图谱分析

GC-MS 数据的定性分析: 样品经过 GC-MS 分析后, 以峰的保留时间及谱库检索进行定性分析, 然后与相应标准峰面积进行比较完成定量分析得出林蛙卵油主要的化学成份。

1.2.3 抗氧化活性

1.2.3.1 DPPH 自由基清除率的测定

依据贺银菊等^[23]的描述, 配制 1 mmol/L 的 DPPH 溶液, 放置在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。实验前, 用无水乙醇将配制好的溶液稀释至 0.2 mmol/L 使用。取 1~8 号试管中分别加入不同浓度的林蛙卵油作为实验组, 9 号试管作为对照组, 依次测定在 519 nm 处的吸光度值。

DPPH 自由基清除率(I, %) 公式

$$I(\%) = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100 \quad \text{式(2)}$$

式中: A_0 为空白对照组的吸光度值; A_1 为实验样品组的吸光度值。

1.2.3.2 羟基自由基清除率的测定

采用水杨酸乙醇-分光光度法^[24]并做适当改进, 测定林蛙卵油对羟基自由基的清除能力, 取 1~8 号为样品组、9 号为空白组、10~17 号为不加显色剂的对照组。1~8 号试管中分别加入 1 mL 不同浓度的林蛙卵油, 再依次加入 1 mL 的硫酸亚铁溶液、1 mL 的乙醇-水杨酸溶液, 11 mL 去离子水以及 1 mL 的过氧化氢溶液。向 9 号管中添加 1 mL 的硫酸亚铁溶液、1 mL 的乙醇-水杨酸溶液, 12 mL 去离子水以及 1 mL 的过氧化氢溶液。向 10~17 号管中分别添加 1 mL 的硫酸亚铁溶液、1 mL 的乙醇-水杨酸溶液, 12 mL 去离子水以及各浓度的林蛙卵油。水浴 15 min 后取出, 在 510 nm 处依次测定反应后各溶液吸光度值。

$$I(\%) = [A_0 - (A_1 - A_x)]/A_0 \times 100 \quad \text{式(3)}$$

式中: A_0 为空白对照组的吸光度值; A_1 为实验样品组的吸光度值; A_x 为不加显色剂对照组的吸光度值。

1.2.3.3 超氧阴离子自由基清除率的测定

参考 Siswoyo 等^[25]的方法, 取 1~8 号试管中分别加入 2 mL 不同浓度的林蛙卵油作为实验组, 9 号试管中加入 2 mL 去离子水作为对照组, 再加入 5.0 mL Tris-HCl 缓冲溶液, 充分混匀, 37 $^{\circ}$ C 水浴 10 min, 加入 1.0 mL 邻苯三酚溶液, 充分反应 6 min, 迅速加入 0.5 mL HCl 终止反应。依次测定反应后各溶液在 420 nm 处的吸光度值。

超氧阴离子自由基清除率(I, %) 公式:

$$I(\%) = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100 \quad \text{式(4)}$$

式中: A_0 为空白对照组的吸光度值; A_1 为实验样品组的吸光度值。

1.3 数据处理

使用 SPSS 16.0 进行数据处理。

2 结果与分析

2.1 CO₂ 超临界提取条件单因素实验结果

由图 1A 可以看出, 温度低于 60 $^{\circ}$ C 时, 提取温度升高使分子间的热运动加剧, 传质效率和扩散系数增加, 从而增加 CO₂ 流体的溶解度, 提取率也随之升高。而当温度高于 60 $^{\circ}$ C 时, 温度升高, CO₂ 流体的密度降低, 导致其溶解能力降低, 提取率也随之降低^[26]。因此温度选择为 55、60、65 $^{\circ}$ C。

由图 1B 可以看出, 在提取过程中当压力低于 35 MPa 时, CO₂ 流体的密度随着压力的升高而增加, 不断接近林蛙卵油的密度而发挥 CO₂ 的脂溶性, 根据相似相溶原理, 林蛙卵油在 CO₂ 流体中的溶解度不断增加, 从而使提取率快速升高。当压力达到 35 MPa 时, 继续升高压力, 溶解度基本达到饱和状态, 林蛙卵油的溶解量几乎不再增加, 提取率增加变缓, 甚至不变^[27]。因此提取压力选择为 30、35、40 MPa。

由图 1C 可以看出, 当提取时间小于 150 min 时, CO₂ 流体对物料浸提不完全, 提取率低, 提取时间增加, CO₂ 流体与物料充分接触, 使浸提充分, 所以能迅速地提高提取率。当提取时间达到 150 min 后, 物料已基本被充分提取, 再增加提取时间对提取率影响不大^[28]。因此提取时间选择为 150、180、210 min。

由图 1D 可以看出, 当 CO₂ 流量增大, 提取釜入口处的 CO₂ 流速增大, 提取釜中 CO₂ 的流动方向由于卷吸效应发生弯曲, CO₂ 流量越大, 卷吸效应越强, 使得提取釜中的原料与超临界 CO₂ 充分反应, 使提取速率不断升高。当 CO₂ 流量超过 10 L/h 时, 提取率变化不大。因此 CO₂ 流量选择为 8、10、12 L/h。

根据图 1 所示的曲线, 从量化生产的经济方面考虑, 为了提高林蛙卵油的提取率, 同时又降低能源损耗, 选取提取温度在 55~65 $^{\circ}$ C, 最适提取压力在 30~40 MPa 之间, 最适提取时间在 150~210 min 之间, 最适 CO₂ 流量在 8~12 L/h 之间。

2.2 正交试验结果

在单因素实验的基础上, 采用四因素三水平的

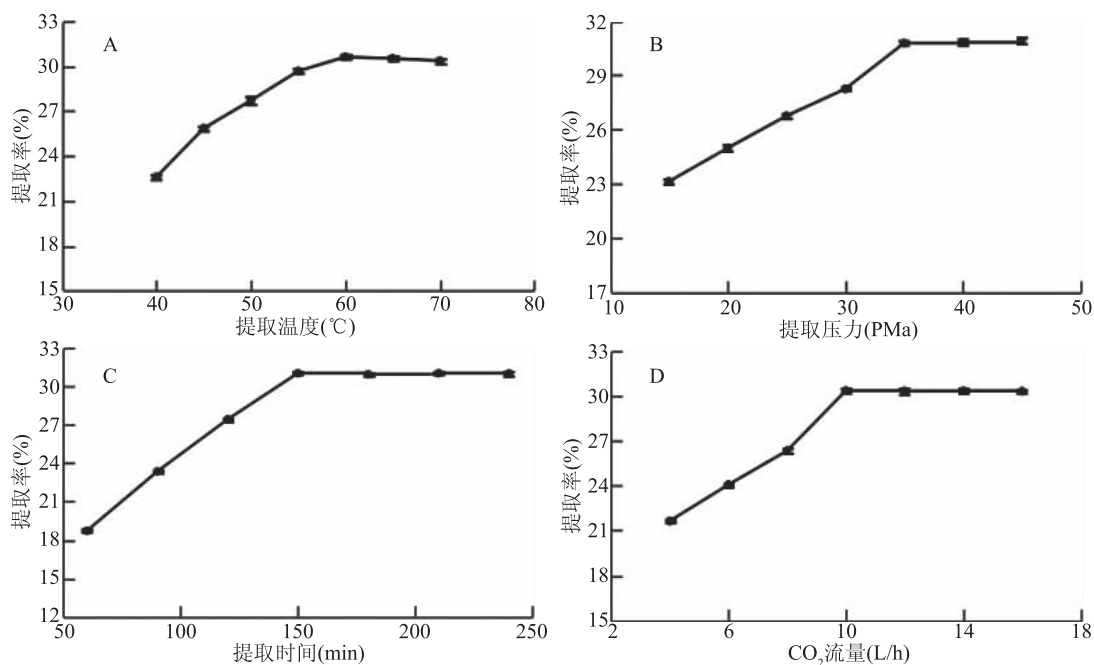


图1 单因素实验结果

Fig.1 The result of single factor experiment

的正交设计方案,在9种不同工艺条件下提取林蛙卵油,分别测定其提取率,结果见表2。表2的极差分析结果表明,超临界提取4个因素对林蛙卵油提取率的影响顺序为:提取压力>提取温度>CO₂流量>提取时间。综合考虑,林蛙卵油的最佳提取方案为A₂B₂C₁D₂,即最佳提取工艺条件组合为提取压力35 MPa,提取温度60℃,CO₂流量10 L/h,提取时间150 min。

表2 正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal experiment

试验号	A	B	C	D	提取率(%)
1	1	1	1	1	28.27 ± 0.13
2	1	2	2	2	30.93 ± 0.19
3	1	3	3	3	30.90 ± 0.05
4	2	1	2	3	30.3 ± 0.16
5	2	2	3	1	32.25 ± 0.25
6	2	3	1	2	32.64 ± 0.26
7	3	1	3	2	30.22 ± 0.20
8	3	2	1	3	32.51 ± 0.36
9	3	3	2	1	32.14 ± 0.23
K ₁	90.10	88.79	93.42	92.66	
K ₂	95.19	95.69	93.37	93.79	
K ₃	94.87	95.68	93.37	93.71	
k ₁	30.03	29.59	31.14	30.89	
k ₂	31.73	31.90	31.12	31.26	
k ₃	31.62	31.89	31.12	31.23	
R	1.70	2.31	0.02	0.37	

2.3 正交试验最佳提取条件验证

在上述最佳条件下(提取压力35 MPa,提取温度60℃,CO₂流量10 L/h,提取时间150 min)进行3次重复试验,其林蛙卵油提取率分别为34.36%、

34.18%和34.24%,得到平均提取率为34.26% ± 0.09%,由提取率可看出,最佳提取工艺条件具有较好的重复性,林蛙卵油提取率较高,说明该工艺条件是合理的、可靠的。

2.4 林蛙卵油成分分析结果

采用GC-MS分析法对CO₂超临界提取法所得到的林蛙卵油脂肪酸甲酯液进行分析,得林蛙卵油脂肪酸甲酯色谱图,如图5所示。同时采用面积归一化法定量分析计算出各成分的相对含量,结果见表3。由表3可知,林蛙卵油中共鉴定出34种脂肪酸,其饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸相对含量分别为31.95%、68.05%。十六烷酸为7.65%、十六碳一烯酸为14.66%、十八碳烯酸(油酸)为27.94%、二十碳五烯酸(EPA)为8.85%及二十二碳六烯酸(DHA)为2.32%。

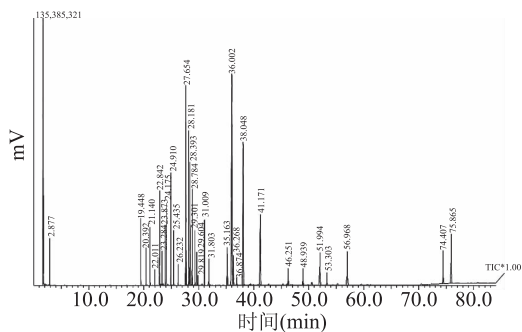


图2 林蛙卵油脂肪酸甲酯色谱图

Fig.2 Fatty acids methyl esters chromatogram of *Rana chensinensis* egg oil

2.5 抗氧化活性结果

如图3, V_c清除DPPH自由基能力随浓度升高而增加,当V_c浓度为0.8 mg/mL后继续提高浓度清除率基本不发生改变;林蛙卵油清除DPPH能力随林蛙

表3 林蛙卵油脂肪酸成分与含量
Table 3 Compositions and contents of fatty acids in *Rana chensinensis* egg oil

序号	保留时间 (min)	脂肪酸名称	相对含量 (%)
1	2.877	己酸	0.08
2	19.448	月桂酸	0.22
3	20.392	十三烷酸	0.06
4	21.140	十四碳二烯酸	0.12
5	22.011	十四碳烯酸	0.04
6	22.842	十四烷酸	1.36
7	23.284	9-甲基十四烷酸	0.06
8	23.873	12-甲基十四烷酸	0.28
9	24.175	十五烷酸	0.07
10	24.910	14-甲基十五烷酸	0.78
11	25.435	十六碳二烯酸	0.12
12	26.232	7-十六碳一烯酸	0.16
13	27.654	9-十六碳一烯酸	14.50
14	28.181	十六烷酸	1.42
15	28.393	14-甲基十六烷酸	4.94
16	28.784	15-甲基十六烷酸	1.29
17	29.301	十七烷酸	0.27
18	29.604	十八碳四烯酸	0.15
19	29.819	十七碳二烯酸	0.19
20	31.009	10-十七碳烯酸	0.59
21	31.803	亚麻酸	0.33
22	35.163	亚油酸	3.39
23	36.002	油酸	27.94
24	36.268	十八烷酸	2.88
25	36.874	十九碳烯酸	0.24
26	38.048	十九烷酸	18.26
27	41.171	二十碳五烯酸(EPA)	8.85
28	46.251	二十碳四烯酸	0.89
29	48.939	8,11,14,-二十碳三烯酸	0.61
30	51.994	11,14,17-二十碳三烯酸	3.28
31	53.303	顺-11,14-二十碳二烯酸	0.43
32	56.968	二十二碳六烯酸(DHA)	2.32
33	74.407	二十二碳二烯酸	0.92
34	75.865	二十二碳烯酸	2.96
不饱和脂肪酸		68.05	
饱和脂肪酸		31.95	

卵油浓度增加而增加,当林蛙卵油浓度为 1.0 mg/mL 后继续提高林蛙卵油浓度清除率上升缓慢。使用 SPSS16.0 对数据进行分析,得出 V_c 对 DPPH 自由基清除能力 IC_{50} 值为 0.289 mg/mL,林蛙卵油对 DPPH 自由基清除能力 IC_{50} 值为 0.897 mg/mL。

如图 4 所示, V_c 清除羟基自由基能力随浓度升高而增加,当 V_c 浓度为 0.8 mg/mL 时,清除率达到最大值,后继续提高浓度清除率基本不发生改变;林蛙卵油清除羟基自由基能力随林蛙卵油浓度增加而增加,当林蛙卵油浓度为 1.0 mg/mL 时继续提高林蛙卵油浓度清除率上升缓慢。使用 SPSS16.0 对数据进行分析, V_c

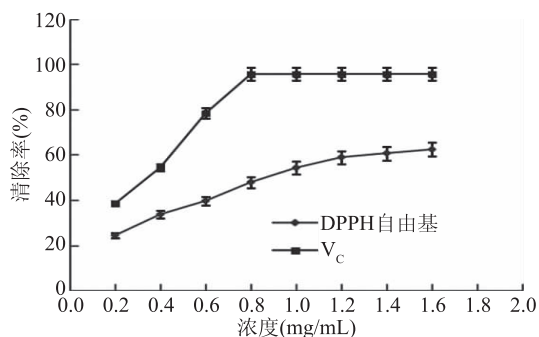


图3 林蛙卵油浓度对 DPPH 自由基的清除效果
Fig.3 Scavenging effect of *Rana chensinensis* egg oil concentration on DPPH free radicals

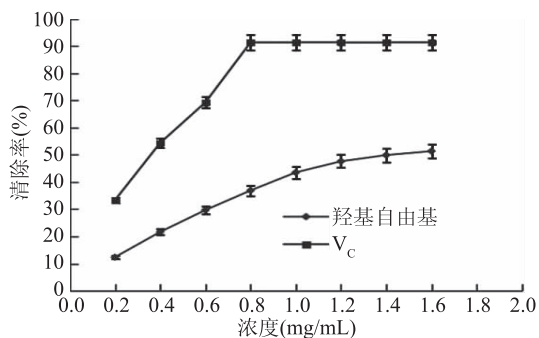


图4 林蛙卵油浓度对羟基自由基的清除效果
Fig.4 Scavenging effect of *Rana chensinensis* egg oil concentration on hydroxyl free radicals

对羟基自由基清除能力 IC_{50} 值为 0.317 mg/mL,林蛙卵油对羟基自由基清除能力 IC_{50} 值为 1.392 mg/mL。

如图 5 所示, V_c 清除超氧阴离子自由基能力随浓度升高而增加,当 V_c 浓度为 1.0 mg/mL 后继续提高浓度清除率基本不发生改变;林蛙卵油清除超氧阴离子自由基能力随林蛙卵油浓度增加而增加,当林蛙卵油浓度为 1.0 mg/mL 时继续提高林蛙卵油浓度清除率上升缓慢。使用 SPSS16.0 对数据进行分析, V_c 对超氧阴离子自由基清除能力 IC_{50} 值为 0.457 mg/mL,林蛙卵油对超氧阴离子自由基清除能力 IC_{50} 值为 1.687 mg/mL。

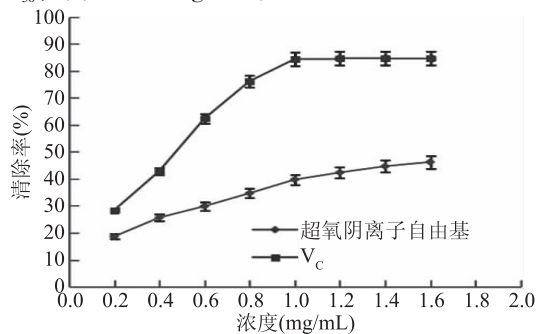


图5 林蛙卵油浓度对超氧阴离子自由基的清除效果
Fig.5 Scavenging effect of *Rana chensinensis* egg oil concentration on superoxide anion free radicals

通过与吕培霖等^[29]研究的花籽油、樊梓鸾等^[30]研究的红松松针精油、梁美融等^[31]研究的花楸精油相比,相同浓度的林蛙卵油抗氧化活性更加优良。

3 结论

通过单因素实验和正交试验确定超临界 CO₂ 法提取林蛙卵油的最佳提取工艺为:提取压力 35 MPa, 提取温度 60 °C, CO₂ 流量 10 L/h, 提取时间 150 min, 此时林蛙卵油的提取率为 34.26%。在此条件下采用 GC-MS 分析法对林蛙卵油脂肪酸甲酯液的成分进行检测, 确定其含有 34 种脂肪酸, 其中饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸相对含量分别为 31.95% 和 68.05%, 主要脂肪酸有十六烷酸、十六碳一烯酸、十八碳烯酸、十八碳二烯酸、二十碳五烯酸(EPA)及二十二碳六烯酸(DHA)。通过抗氧化活性研究试验表明, 林蛙卵油对 DPPH 自由基的 IC₅₀ 值为 0.897 mg/mL, 对羟基自由基的 IC₅₀ 值为 1.392 mg/mL, 对超氧阴离子的 IC₅₀ 值为 1.687 mg/mL。林蛙卵油具有较强的体外抗氧化活性, 在天然抗氧化剂和保健食品中有良好的开发利用价值。

参考文献

- [1] 中国药用动物志. 中国药用动物志: 第一册[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1982: 174-176.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 239.
- [3] 李梁, 范宁, 刘少华, 等. 东北林蛙卵活性成分及药理活性研究进展[J]. 医药导报, 2016, 35(4): 363-366.
- [4] 刘艳辉, 祖岫杰, 刘铁钢, 等. 野生及养殖拉氏鱼鲷营养成分比较分析[J]. 吉林农业大学学报, 2017, 39(1): 82-88, 93.
- [5] 彭飞, 徐峰, 赵倩, 等. 中国林蛙卵油的抗惊厥作用及其与单胺神经递质的关系[J]. 中国药理学杂志, 2005, 40(12): 912-915.
- [6] 闫清伟, 田青. 中国林蛙卵油对焦虑大鼠运动能力影响研究[J]. 河南师范大学学报: 自然科学版, 2013, 41(3): 138-140, 155.
- [7] Chang - hui Zhao, Chao Zhao, Hai - qing Ye, et al. Hypolipidemic activity of low - cholesterol ovum oil of *Rana chensinensis* and phytosterol (stigmasterol) in rats [J]. Journal of Zhejiang University - Science B (Biomedicine & Biotechnology), 2019, 20(7): 613-616.
- [8] 刘俊梅, 吴世玉, 王丹洋, 等. 林蛙卵营养成分和保健功能的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(11): 220-224.
- [9] 陈宁宁, 卫功庆, 常雷, 等. 东北林蛙卵油脂肪酸化妆品的研制[J]. 经济动物学报, 2018, 22(3): 160-167.
- [10] 代德财. 超临界流体萃取技术在天然药物提取中的应用探讨[J]. 现代食品, 2018(10): 167-168.
- [11] 张伟, 马莹, 梁臣艳, 等. 超临界二氧化碳萃取法提取石岩枫挥发油成分分析[J]. 北方药学, 2019, 16(8): 9-10.
- [12] Yilmaze E, Özvural B, Vural H. Extraction and identification of proanthocyanidins from grape seed (*Vitis vinifera*) using supercritical carbon dioxide [J]. Journal of Supercritical Fluids, 2011, 55: 924-928.
- [13] Dasilvarpf F, Rocha - santos Tap, Duarte Ac. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds [J]. Trends in Analytical Chemistry, 2016, 76: 40-51.
- [14] 杨小斌, 周爱梅, 王爽, 等. 响应面法优化超临界二氧化碳萃取蓝圆鲈鱼油工艺研究[J]. 中国油脂, 2018, 43(4): 7-10, 15.
- [15] Nuria Rubio-Rodríguez, Sara Mde Diego, Sagrario Beltrán, et al. Supercritical fluid extraction of fish oil from fish by-products: A comparison with other extraction methods [J]. Journal of Food Engineering, 2012, 109(2): 238-248.
- [16] Sara Gaggiotti, Blerina Shkemi, Giampiero Sacchetti, et al. Study on volatile markers of pasta quality using GC-MS and a peptide based gas sensor array [J]. LWT, 2019, 114: 1-9.
- [17] Rachele Rocchi, Marcello Mascini, Angelo Faberi, et al. Comparison of IRMS, GC - MS and E - Nose data for the discrimination of saffron samples with different origin, process and age [J]. Food Control, 2019, 106: 1-9.
- [18] Newman Mark, Pratt Suzanne M, Curran Desmond A, et al. Evaluating urinary estrogen and progesterone metabolites using dried filter paper samples and gas chromatography with tandem mass spectrometry (GC-MS/MS). [J]. BMC chemistry, 2019, 13(1): 1-12.
- [19] 肖井雷, 康岚, 朱键勋, 等. 林蛙油中激素类成分的 GC-MS 分析[J]. 吉林中医药, 2014, 34(10): 1007-1008.
- [20] Hui Yang, Jun - Li Hua, Chuang Wang. Anti - oxidation and anti - aging activity of polysaccharide from *Malus micromalus* Makino fruit wine. [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 121: 1203-1212.
- [21] Gholizadeh Ashraf. Purification of a ribosome - inactivating protein with antioxidation and root developer potencies from *Celosia plumosa* [J]. Physiology and molecular biology of plants: An international journal of functional plant biology, 2019, 25(1): 243-251.
- [22] 杨君. 植物油中多环芳烃的 GC-MS/MS 检测方法的研究及应用[D]. 青岛: 青岛大学, 2014.
- [23] 贺银菊, 彭莘媚, 杨再波, 等. 香芹茎叶挥发油提取工艺及清除 DPPH 自由基活性研究[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(36): 158-161, 165.
- [24] Perumal Siddhuraju. The antioxidant activity and free radical - scavenging capacity of phenolics of raw and dry heated moth bean (*Vigna aconitifolia*) (Jacq.) Marechal seed extracts [J]. Food Chemistry, 2005, 99(1): 149-157.
- [25] Siswoyo T A, Mardiana E, Lee K O, Hoshkawa K. Isolation and characterization of antioxidant protein fractions from melinjo (*Gnetum gnemon*) seeds [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(10): 5648-5656.
- [26] 杨庆利, 禹山林, 秦松. 超临界 CO₂ 流体提取海滨锦葵籽油的工艺条件优化[J]. 农业工程学报, 2009, 25(5): 253-257.
- [27] 陆柏益, 鲍建峰, 山琳, 等. 超临界 CO₂ 提取毛竹笋油的工艺及产品成分[J]. 农业工程学报, 2009, 25(8): 312-316.
- [28] 董迪迪, 王鸿飞, 周增群, 等. 响应面法优化超临界 CO₂ 提取杨梅籽油工艺条件的研究[J]. 中国粮油学报, 2014, 29(2): 30-35.
- [29] 吕培霖, 李成义, 彭文化, 等. 红花籽油抗氧化活性实验研究[J]. 西北国防医学杂志, 2017, 38(7): 439-441.
- [30] 樊梓鸾, 张艳东, 张华, 等. 红松松针精油抗氧化和抑菌活性研究[J]. 北京林业大学学报, 2017, 39(8): 98-103.
- [31] 梁美融, 谢漫丽, 张仁文, 等. 花椒精油抗氧化及抑菌真菌活性的研究[J]. 大众科技, 2017, 19(6): 52-54.