

梔子果油的生物活性成分及抗氧化活性评价

朱颖洁¹, 杨亚洁¹, 李群和², 邹盈², 罗自生^{1,3,4}

(1. 浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 浙江杭州 310058) (2. 温州科技职业学院, 浙江温州 325006) (3. 浙江大学宁波研究院, 浙江宁波 315100) (4. 浙江大学馥莉食品研究院, 农业部农产品采后处理重点实验室, 智能食品加工技术与装备国家地方联合工程实验室, 浙江省农产品加工技术研究重点实验室, 浙江杭州 310058)

摘要:以正己烷、乙酸乙酯、乙醇3种溶剂并结合超声辅助提取梔子果油, 对所获得的3种粗油和乙醇提取的副产物的得率、油脂组成、生物活性成分以及自由基清除能力进行分析。在固液比(1:8)、温度(40℃)、时间(20 min)、超声强度(200 W)的条件下, 乙醇提取得油率为13.26%, 略低于正己烷14.86%和乙酸乙酯13.84%, 副产物乙醇胶体相是乙醇提油后4℃静置分层得到的, 得率为9.68%。乙醇提取梔子果油相中总生育酚含量为1.62 μg/mg, 是正己烷提取粗油的1.27倍; 总甾醇含量为22.63 μg/mg, 是乙酸乙酯提取粗油的1.29倍。挥发性香草酸、丁香酸、丁香醇为乙醇提取粗油中的主要芳香成分。副产物醇溶性胶体相中检出了γ-亚麻酸(1.50%)和反式亚油酸(1.14%), 而在粗油中并未检出; 醇溶性胶体相DPPH、ABTS清除率的IC₅₀值分别为0.61 mg/mL和0.40 mg/mL, 极显著小于粗油中的检验结果(7.60~10.3 mg/mL); 通过UPLC-Triple-TOF/MS在醇溶性胶体相中初步鉴定出西红花酸及8种带糖衍生物。实验证明, 用乙醇提取梔子果油气味芳香, Omega-6型油脂种类及含量丰富, 生育酚、甾醇等活性物质含量更高, 此外副产物中的西红花及其衍生物有很强的自由基清除能力, 因此具有更高的经济价值。

关键词:梔子果; 醇溶性胶体相; 生物活性; 自由基清除能力

文章编号: 1673-9078(2021)02-103-113

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.2.0776

Evaluation of Bioactive Components and Antioxidant Activity of Gardenia Fruit Oil

ZHU Ying-jie¹, YANG Ya-jie¹, LI Qun-he², ZOU Ying², LUO Zi-sheng^{1,3,4}

(1. College of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China) (2. Wenzhou Vocational College of Science and Technology, Wenzhou 325006, China) (3. Ningbo Research Institute, Zhejiang University, Ningbo 315100, China) (4. Fuli Food Research Institute, Key Laboratory of Agro-Products Postharvest Handling, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National-Local Joint Engineering Laboratory of Intelligent Food Technology and Equipment, Zhejiang Key Laboratory of Agro-Food Processing, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: Gardenia fruit oil was extracted with hexane, ethyl acetate and ethanol combined with ultrasonic assisted extraction. The yield, oil composition, bioactive components and free radical scavenging ability of the three crude oils and ethanol extracts were analyzed. Under the same conditions that the solid-liquid ration was 1:8, the temperature was 40℃, the spending time was 20 minutes and ultrasonic intensity was 200 W, the oil yield extracted with ethanol was 13.26%, slightly lower than that of hexane (14.86%) and ethyl acetate (13.84%). The by-product ethanol colloid phase (ECP) was stratified at 4℃ from ethanol extraction, and the yield was 9.68%. The total tocopherol content in the crude oil of Gardenia fruit that extracted by ethanol was 1.62 μg/mg, which was 1.27 times of that obtained by n-hexane. The total sterol content was 22.63 μg/mg in the crude oil extracted by ethanol, which was 1.29 times of that obtained by ethyl acetate. The main aromatic components in the

引文格式:

朱颖洁, 杨亚洁, 李群和, 等. 梔子果油的生物活性成分及抗氧化活性评价[J]. 现代食品科技, 2020, 37(2): 103-113

ZHU Ying-jie, YANG Ya-jie, LI Qun-he, et al. Evaluation of bioactive components and antioxidant activity of gardenia fruit oil [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 37(2): 103-113

收稿日期: 2020-08-18

基金项目: 浙江省重点研发计划项目(2019C02041); 温州市重大科技创新攻关项目(2018ZD0001)

作者简介: 朱颖洁(1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品新资源开发

通讯作者: 罗自生(1972-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品新资源开发

crude oil extracted by ethanol were volatile vanillic acid, syringic acid, and syringol. Different from the three crude oils, γ -linolenic acid (1.50%) and trans-linoleic acid (1.14%) were detected in ECP. The IC_{50} values of DPPH clearance and ABTS in ECP were 0.61 mg/mL and 0.40 mg/mL, respectively, which were significantly lower than the test results in crude oil (7.62~10.31 mg/mL). In addition, crocetin and eight sugar derivatives were preliminarily identified in the ECP by the method UPLC-Triple-TOF/MS. The experimental results showed that gardenia fruit extracted with ethanol had higher economic value, for the reasons that it had sweet fragrance, rich types and higher contents of omega-6 fats, higher contents of active substances such as tocopherol and sterol, and strong free radical scavenging ability related to crocetin and its derivatives in the by-product.

Key words: gardenia fruit; ECP; bioactive components; free radical scavenging ability

栀子果实是一种重要的药食两用资源, 现代药理研究表明, 栀子果因富含黄酮类、类胡萝卜素、萜类等生物活性物质^[1-3], 具有抗炎、保肝、抗抑郁等功效。西红花酸及其衍生物是栀子果中主要的水溶性类胡萝卜素, 其主链上的异戊二烯共轭双键系统是发色基团, 使栀子果呈现出黄色至深红色, 可在食品工业中用作天然着色剂, 代替人工合成着色剂^[4,5]。此外, 栀子果的含油量较高, 大约为干果重量的 15%, 并且精炼后的栀子油可以与橄榄油媲美, 其酸价和抗氧化值都较低^[6], 作为一种高端食用油具有广阔的市场。

在工业上通常采用己烷等传统有机溶剂从油料作物中提取油, 但在生产过程中有可能存在溶剂残留, 这将导致食品安全和公共卫生问题^[7], 因此, 寻找一个更加绿色安全并且高效食用油提取溶剂是当前行业研究者们共同关注的问题。Natalia Castejón 等^[7]用正己烷、乙酸乙酯和乙醇作为萃取溶剂从车前草种子中提取油, 结果表明在超声辅助提油过程中, 55 °C、30 min 时乙醇获得了最佳油得率, 其次是正己烷和乙酸乙酯。此外, 还有一些研究采取 D-柠檬烯、 α -蒎烯、对伞花烃^[8]、植物油^[9]等新型溶剂提取植物油, 由于这些溶剂溶解性质和正己烷相近, 因此也获得了较高的得油率。但这些提取物需经过加水或乙醇进行二元或者三元共沸, 才能将提取溶剂的沸点降低到 100 °C 以下, 从而达到提取溶剂与提取的粗油分离的目的^[8], 这不仅会破坏粗油中的生物活性物质, 而且由于成本过高, 难以在生产上应用。

研究表明, 栀子果提取物的有效化学成分表现出中-高极性, 适于水溶液、95%~70%乙醇溶液提取^[10]。乙醇是一种常见的低成本的“绿色生物溶剂”, 其对环境无污染, 沸点比正己烷低, 是一种经济安全的溶剂, 已被研究作为提取食用油的替代溶剂^[11,12]。由于乙醇极性易于提取微量的营养化合物如生育酚^[13], 可提高油的品质。然而, 乙醇提取栀子果油的同时也会提取出一些不溶性化合物如磷脂、色素和糖, 这些物质需从油中分离。Sánchez R.J 等^[14]通过加入正己烷分馏进而达到分离的目的, 但仍会存在正己烷残留问题。

超声辅助提取技术(UAE)近年来已被作为一种高效廉价的手段来提取生物活性化合物和植物油脂^[15-17]。超声优化提取效率的机制在于超声的机械效应和空化作用, 可以促进提取物细胞破裂, 增强待提取物跨细胞膜传送速率^[18]。因此, 本研究通过评估超声辅助绿色溶剂(乙醇、乙酸乙酯)从栀子果中提取粗油的抗氧化能力, 并与使用超声辅助正己烷提取栀子果油的抗氧化能力进行比较, 旨在分析各提取物中抗氧化活性物质的成分及含量, 以确定主要的抗氧化活性物质, 为栀子果油高值绿色提取提供依据。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

栀子干果, 购于温州瑞安市。

Supelco 37 Component FAME 混合物、甲醇(HPLC 级, 纯度 $\geq 99.7\%$)、正己烷(HPLC 级, 纯度 $\geq 99.8\%$)、乙腈(LC-MS 级), 均购于阿拉丁试剂公司。D- α -生育酚(纯度 $\geq 97\%$)、DPPH(纯度 $\geq 97\%$)、ABTS(纯度 $\geq 98\%$), 阿拉丁试剂公司。D- β -生育酚(纯度 $\geq 98\%$), 上海源叶生物试剂公司。D- δ -生育酚(纯度 $\geq 98\%$), 北京索莱宝科技有限公司。没食子酸、原儿茶酸、对羟基苯甲酸、香草酸、咖啡酸、丁香酸、香草醛、表儿茶素、对羟基肉桂酸、丁香醛、对香豆酸、阿魏酸、芥子酸、肉桂酸、HPLC $\geq 97\%$, 一飞生物试剂公司; 5 α -胆甾烷、麦角甾醇、菜油甾醇、豆甾醇、 β -谷甾醇、HPLC $\geq 98\%$, 阿拉丁试剂公司; Crocin I (CAS: 42553-65-1)、Crocin II (CAS: 55750-84-0)、Crocetin (CAS: 27876-94-4)、HPLC $\geq 98\%$, 上海源叶生物试剂公司。

1.2 仪器与设备

超声均质机, 宁波新芝生物; RE-52A 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; Eppendorf Centrifuge 5430R 离心机, 艾本德上海国际贸易公司; MULTISKAN MK3 酶标仪, 赛默飞世尔(上海)仪器有限公司;

METTLER TOLEDO XS105、XPR10/AC 分析天平(瑞士 METTLER TOLEDO), 干式氮吹仪 UGC-24M(北京优晟联合科技有限公司)。Agilent-1100(美国)液相色谱仪(High-performance liquid chromatography, HPLC), 配备荧光检测器。Acquity TM ultra 型超高效液相色谱仪(Ultra performance liquid chromatography, UPLC)(美国 Waters), 三重四极杆-高分辨飞行时间质谱联用仪(UPLC-Triple-TOF/MS)(美国 AB SCIEX)。GC2014(日本岛津)气相色谱仪(Gas chromatography, GC), 配有自动进样器。Agilent7890b-7000c(美国)气相色谱质谱联用仪(Gas chromatography - mass spectrometry, GC-MS), 配有自动进样器, MassHunter 数据处理软件, NIST 14 质谱数据库。

1.3 试验方法

1.3.1 正己烷、乙酸乙酯、乙醇超声提取栀子油

称取 15 g 栀子粉, 记为 $m_{\text{干物质}}$, 量取 120 mL 有机溶剂, 以固液比 1:8 进行提取; 设置超声温度 40 °C, 时间 20 min, 超声功率 200 W; 之后 4 °C, 8000 r/min, 15 min 离心分离取上清放入旋蒸仪中, -0.1 MPa, 40 °C 蒸到恒重; 得到的粗油在 4 °C 冰箱静置过夜, 冬化沉淀油渣, 4000 r/min, 5 min 离心弃去油渣, 记录下液体质量 $m_{\text{油}}$; 计算得油率:

$$\text{得油率} / \% = m_{\text{油}} / m_{\text{干物质}} \times 100\%$$

1.3.2 自由基清除能力

DPPH: 将 400 μL 的 DPPH 储备液加入 400 μL 样品, 摇匀避光静置 30 min, 于 517 nm 处测得其吸光值记为 A_i , 做 3 次平行实验。将 400 μL 无水乙醇加入 400 μL 样品, 摇匀避光静置 30 min, 于 517 nm 处测得其吸光值记为 A_j 。最后 400 μL 无水乙醇加入 400 μL DPPH 储备液, 摇匀避光静置 30 min, 于 517 nm 处测得其吸光值记为 A_c 。按下式计算待测样品对 DPPH 自由基的清除率(K):

$$K / \% = [1 - (A_i - A_j) / A_c] \times 100\%$$

ABTS: 将 600 μL 的 ABTS 工作液加入 200 μL 样品, 摇匀避光在 30 °C 下静置 5 min, 于 734 nm 处测得其吸光值记为 A_i , 做 3 次平行实验。将 600 μL 的无水乙醇加入 200 μL 样品, 摇匀避光在 30 °C 下静置 5 min, 于 734 nm 处测得其吸光值记为 A_j 。最后 600 μL ABTS 工作液加入 200 μL 无水乙醇, 摇匀避光在 30 °C 下静置 5 min, 于 734 nm 处测得其吸光值记为 A_c 。按下式计算待测样品对 ABTS 自由基的清除率(K):

$$K / \% = [1 - (A_i - A_j) / A_c] \times 100\%$$

IC₅₀ 值计算: 将清除率 K 对浓度梯度的曲线用 Prism 8.0 软件进行拟合计算出 IC₅₀。

1.3.3 脂肪酸图谱

称取样品 0.0600 g, 放入 10 mL 离心管中, 加 4 mL 正己烷溶解; 加入 2 mol/L 的氢氧化钾/甲醇溶液 0.4 mL, 涡旋振荡 30 s, 静置至澄清, 向溶液中加入 1 g 硫酸氢钠, 猛烈振摇, 中和氢氧化钾。待盐沉淀后, 取上清液经 0.22 μm 滤膜过滤, 滤液于气相进样瓶中供气相色谱分析。GC 条件: 色谱柱: DB-23 毛细管柱(60 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μm), 载气(99.999% N₂), 柱流速 1 mL/min; 进样口: 进样量 1 μL , 气化室温度 250 °C, 分流进样, 分流比 10:1; 升温程序: 初始温度 100 °C, 保持 2 min, 以 10 °C/min 到 160 °C, 保持 4 min, 再以 10 °C/min 到 210 °C, 保持 5 min, 最后以 10 °C/min 到 240 °C, 保持 10 min; 检测器温度 300 °C。

1.3.4 酚酸含量

取 0.5 g 油样, 1.5 mL、1.5% 甲酸/甲醇溶液(V/V) 提取三次, 每次涡旋 2 min, 合并提取液 8200 r/min 离心 6 min, 取甲醇层。氮吹至干后复溶于 500 μL 甲醇, 上清 C₁₈(Agilent ZORBAX-SB, 250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)-HPLC 测定。流动相由 0.02% 磷酸(V/V, 溶液 A) 和乙腈(溶液 B) 组成, 流速为 1.0 mL/min, 梯度程序为 0~40 min, 溶液 B: 2%~25%; 40~45 min, 溶液 B: 25%~35%; 和 45~50 min, 溶液 B: 35%~50%。注射量为 10 μL , 柱温为 29 °C, 扫描波长设置为 254 nm~370 nm。分析前用 0.22 μm 滤膜过滤样品。各化合物的鉴别和定量分别根据已知的标准化合物保留时间和线性方程进行计算。

1.3.5 西红花素及其衍生物含量

取 0.5 g 油样, 3 mL、50% 甲醇(V/V) 提取两次, 每次涡旋 2 min, 合并提取液 8200 r/min 离心 6 min, 取甲醇层。氮吹至干后复溶于 600 μL 或 5 mL(仅 ECP 一个样品) 甲醇, 上清 C₁₈(AQ, 250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)-HPLC 测定。流动相由 0.02% 磷酸(V/V, 溶液 A) 和甲醇(溶液 B) 组成, 流速为 1.0 mL/min, 梯度程序为 0~4 min, 溶液 B: 0~10%; 4~50 min, 溶液 B: 10%~90%; 51~55 min, 溶液 B: 90%~10%。注射量为 10 μL , 柱温为 40 °C, 扫描波长设置为 440 nm。分析前用 0.22 μm 滤膜过滤样品。各化合物的鉴别和定量分别根据已知的标准化合物保留时间和线性方程进行。质谱采用 Triple-TOF 5600+ 飞行时间液质联用仪, 负离子扫描模式; 扫描范围: m/z 100~1500; 雾化气(GS1): 50 psi; 干燥气(GS2): 50 psi; 气帘气(CUR):

35 psi; 离子源温度(TEM): 550 °C; 离子源电压(IS): -4500 V; 一级扫描: 去簇电压(DP): 80 V; 聚焦电压(CE): 10 V; 二级扫描: 使用 TOF MS~Product Ion~IDA 模式采集质谱数据, CID 能量为-20、-40 和-60 V, 进样前, 用 CDS 泵做质量轴校正, 使质量轴误差小于 2×10^{-6} 。

1.3.6 生育酚含量

将栀子果油样品 (50 mg) 溶于 2 mL 甲醇, 10000 r/min 离心 10 min 取上清, 通过 C₁₈-HPLC/FLD(Waters, 150×4.6 mm, 3 μm) 上样分析, 设置为 295 nm (Ex) 和 335 nm (Em)。流动相为甲醇/水 (93:7, V/V), 流速为 1 mL/min, 柱温 40 °C。运行时间为 13 min。样品进样量为 20 μL。各化合物的鉴别和定量分别根据已知的标准化合物保留时间和线性方程进行计算。

1.3.7 甾醇含量

以 5α-胆甾烷 (50 μg) 为内标, 用 1 mol/L 氢氧化钾/甲醇溶液在 25 °C 下将 20 mg 栀子果油样品皂化 18 h。皂化后, 加入 5 mL 二氯甲烷和 5 mL 水, 摇匀混合物, 用二氯甲烷提取植物甾醇。然后将水除去, 并用水冲洗有机相三次, 直到溶液澄清。最后氮吹蒸发有机相。向棕色瓶中加入 100 μL BSTFA+TMCS (99:1, V/V) 进行衍生化, 80 °C 甲硅烷基化反应 40 min 后溶解于 1 mL 正己烷中, GC-MS 上样分析。色谱条件: 色谱柱 HP-5 (30 m×0.25 mm×0.32 μm); 载气 (99.99% He); 流速 1.0 mL/min; 进样口温度 300 °C; 不设置分流比; 进样量 1 μL; 起始温度 100 °C, 保持 1 min, 以 50 °C/min 升至 200 °C, 再以 1.5 °C/min 升至 300 °C, 保持 10 min; 质谱条件: EI 离子源; 离子源温度 250 °C; 传输线温度 300 °C; 电子能量 70 eV; 质量扫描范围 m/z 50~600 u。

1.3.8 数据处理

试验数据采用 Excel 2010 和 SPSS Statistics 20.0 统计分析软件进行差异显著性分析, 采用 Origin 9.1 软件、Prism 8.0、RStudio 2019 作图, 差异显著性水平为 $p < 0.05$ 。

2 结果与讨论

2.1 得油率(%)

在提油过程中, 通过 4 °C 静置沉淀、离心后, 得到比较稳定的粗油。乙醇提取物分成了油相和胶体相两层。由图 1 可知, 用超声辅助正己烷提取的栀子油得率最高为 14.86%, 其次是乙酸乙酯 (13.84%) 和乙醇油相 (13.26%), 乙醇胶体相得率最低, 为 9.68%。分析表明, 乙酸乙酯作为新型提油溶剂与传统的工业溶剂正己烷在得油率上并无显著差异 ($p < 0.05$); 乙醇油相的得率略低于正己烷, 但与乙酸乙酯没有显著差异 ($p < 0.05$)。Phiwe Charles Jiyane 等^[19]发现在其他条件一致的情况下, 乙酸乙酯提取 20 min 可得最大得油率, 而正己烷提取仅需 6 min 且得率更高。有研究表明超声辅助提取可以缩短提取时间, 提高油脂得率^[7,20], 因此该实验在没有超声辅助时与本实验结果有所差异。乙醇已被用于咖啡油^[21]、芝麻油^[22]、萝卜种子油^[23]的提取中。在提取过程中, 使用乙醇能减少溶剂使用量, 同时增加提取速率, 因此乙醇提油被当作一种新的绿色油脂提取技术。本文用乙醇提栀子果油也有副产物产生, 而这些醇溶性的成分有很高的抗氧化能力, 因此需评估这三种溶剂提取物的生物活性成分以及其与抗氧化的相关性, 综合分析选择可以代替工业溶剂的有机溶剂。

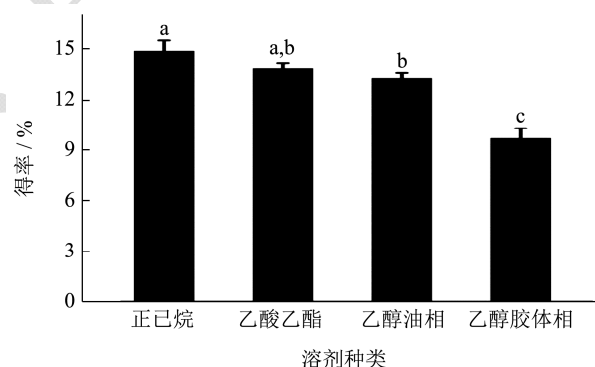


图1 栀子果不同有机溶剂超声提取物得率

Fig.1 Ultrasonic extraction yield of gardenia fruit with different organic solvents

2.2 自由基清除能力

表1 不同有机溶剂超声提取物 IC₅₀ 值

Table 1 The IC₅₀ value of DPPH and ABTS scavenging rate in different extraction

IC ₅₀	槲皮素/(μg/mL)	抗坏血酸/(μg/mL)	正己烷/(mg/mL)	乙酸乙酯/(mg/mL)	乙醇油相/(mg/mL)	乙醇胶体相/(mg/mL)
DPPH	8.66±1.04	8.99±1.06	10.31±1.32 ^a	8.38±1.32 ^a	8.96±1.34 ^a	0.61±0.18 ^b
ABTS	8.02±1.44	-	9.39±1.29 ^a	7.60±1.35 ^a	8.35±1.34 ^a	0.40±0.01 ^b

注: 数据为平均数±标准差, 同一行中的不同字母代表有显著差异 ($p < 0.05$), "-"表示未检出。

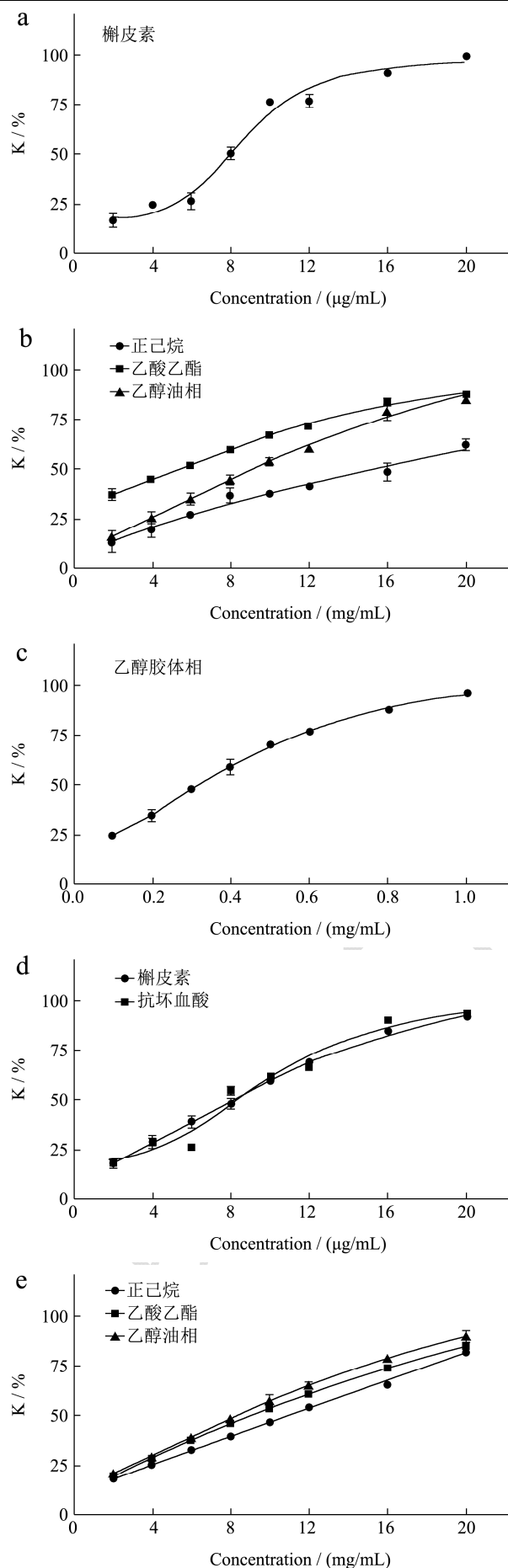


图2 不同有机溶剂超声提取物 ABTS 自由基清除能力(a~c)及 DPPH 自由基清除能力(d~f)

Fig.2 ABTS (a~c) and DPPH (d~f) free radical scavenging capacity of different extraction

与参考化合物儿茶素相比, 提取物具有剂量响应的 ABTS 自由基清除活性, 在最高测试浓度 (20 mg/mL, 图 2a~c) 下观察到最高活性。乙醇提取出的副产物 ECP 的 ABTS 自由基清除活性 ($IC_{50}=0.40$ mg/mL, 表 1) 极显著 ($p<0.01$) 高于粗油的 ABTS 清除活性 ($IC_{50}=7.60\sim9.39$ mg/mL)。

与参考化合物儿茶素和抗坏血酸相比, 提取物具有剂量响应的 DPPH 自由基清除活性, 在最高测试浓度 (20 mg/mL, 图 2d~f) 下观察到最高活性。乙醇提取出的副产物 ECP 的 DPPH 自由基清除活性 ($IC_{50}=0.61$ mg/mL, 表 1) 极显著 ($p<0.01$) 高于粗油的 DPPH 清除活性 ($IC_{50}=8.38\sim10.31$ mg/mL)。

Lee 等人^[24]研究表明栀子果乙醇提取物显示出极佳的 DPPH 自由基清除活性 ($IC_{50}=38.46$ μ g/mL), 其结果远小于本实验, 可能是因为该实验栀子果乙醇提取时间长达 24 h 且提取物经过了减压蒸发浓缩。Savic 等人用不同有机溶剂提取李子籽油^[25], DPPH 自由基清除实验 IC_{50} 值显示抗氧化活性降低顺序为: 氯仿: 甲醇(2:1 V/V)~丙酮>正己烷>正庚烷>乙酸乙酯, 得出溶剂极性越大, 提取油的抗氧化活性越高的结论。本实验乙醇胶体相显示出极低的 IC_{50} 值可能是由于乙醇的极性较高, 且是总酚、黄酮类、缩合单宁或原花色色素等抗氧化活性物质的良好溶剂^[26]。此外, 粗油中不饱和脂肪酸组成、甾醇含量、生育酚含量是常见的影响油本身抗氧化能力强弱的因素^[9]。两个自由基清除实验结果表明, 乙醇胶体相中可能存在一些醇溶性的抗氧化活性成分。

2.3 活性成分含量

2.3.1 脂肪酸图谱

由表 2 可知, 3 种有机溶剂提取的脂肪酸组成成分基本相同, 其链长从 C-16 至 C-23, 以不饱和脂肪

酸顺式亚油酸(18:2, 41.58%~42.90%)、油酸(18:1, 34.15%~35.95%)为主,而饱和脂肪酸中棕榈酸(16:0)是主要成分。李昊阳等人^[6]用正己烷、亚临界和超临界法萃取柚子果油,检测出6种脂肪酸,主要是油酸和亚油酸,其中不饱和脂肪酸含量为76.04%~78.00%,本文实验中还检测出花生酸、山嵛酸等脂肪酸组成成分,且饱和脂肪酸含量为80.93%~81.20%,这可能表明超声辅助溶剂提取油脂方法更易于油脂溶出,提高提取效率。饱和脂肪酸与不饱和脂肪酸的比例(P/S)是评估油质量最重要的指标之一,P/S越大,油的质量越好^[27]。据表2显示,乙醇提取的粗油P/S为4.31,而正己烷仅为4.24,说明乙醇提油油质显著($p<0.05$)优于正己烷,其原因可能是不同的萃取溶剂对脂肪酸与甘油酯的选择性不同。乙醇和乙酸乙酯提取物中存在 γ -亚麻酸(1.50%),乙醇的副产物中还检出了反式亚油酸(1.14%,如图3d左侧箭头所示)。亚油酸和亚麻酸是人和动物营养中必需的脂肪酸,可以降低血脂、防血栓,同时它们又是体内合成ARA、DHA、EPA的前体物质^[28-30],对于人体健康十分有益。因此,相比于正己烷和乙酸乙酯,乙醇是一种提取柚子果油的理想溶剂。

2.3.2 酚酸含量

由表3可知,正己烷提取的粗油中,只有对羟基肉桂酸和芥子酸有响应值,其浓度分别为0.46 $\mu\text{g/g}$ 和2.80 $\mu\text{g/g}$,表明用正己烷提取油是不利于酚酸从柚子果中分离的。在被精确定量的十种酚酸中,阿魏酸和丁香酸在乙醇提取的粗油中有较高的响应值,分别为248.79 $\mu\text{g/g}$ 和207.96 $\mu\text{g/g}$ 。丁香酸易挥发且有独特芳香气味,因此其可能是导致这两种粗油与正己烷提取的粗油在嗅觉上存在差异的主要原因。有研究表明柚子花的主要挥发性化学芳香成分为法尼烯, α -3-己烯酸酯, α -3-己烯苯甲酸酯,吲哚^[31],但乙醇提取柚子果油的芳香气味可能主要来源于丁香酸。乙酸乙酯有很强的刺激性气味,用乙酸乙酯提取柚子果油会在嗅觉上产生不愉悦感。在总酚含量上,乙醇提取副产物(1174.32 $\mu\text{g/g}$)显著($p<0.05$)高于乙酸乙酯(124.59 $\mu\text{g/g}$)和正己烷(3.25 $\mu\text{g/g}$),由于离心分离,酚酸大都集聚到乙醇胶体相中,这十分符合酚酸醇溶性的特征。Trishna Debnath等人研究柚子果提取物中的抗氧化活性,得出抗氧化剂活性与总酚和类黄酮含量相关^[32],Biglari等人^[33]的研究亦证实,柚子果的醇提物和水提物中酚类和类黄酮含量均比一些常见的新鲜或干燥的水果(比如 *Phoenix dactylifera*)强,可作为天然

抗氧化剂和膳食补充剂。

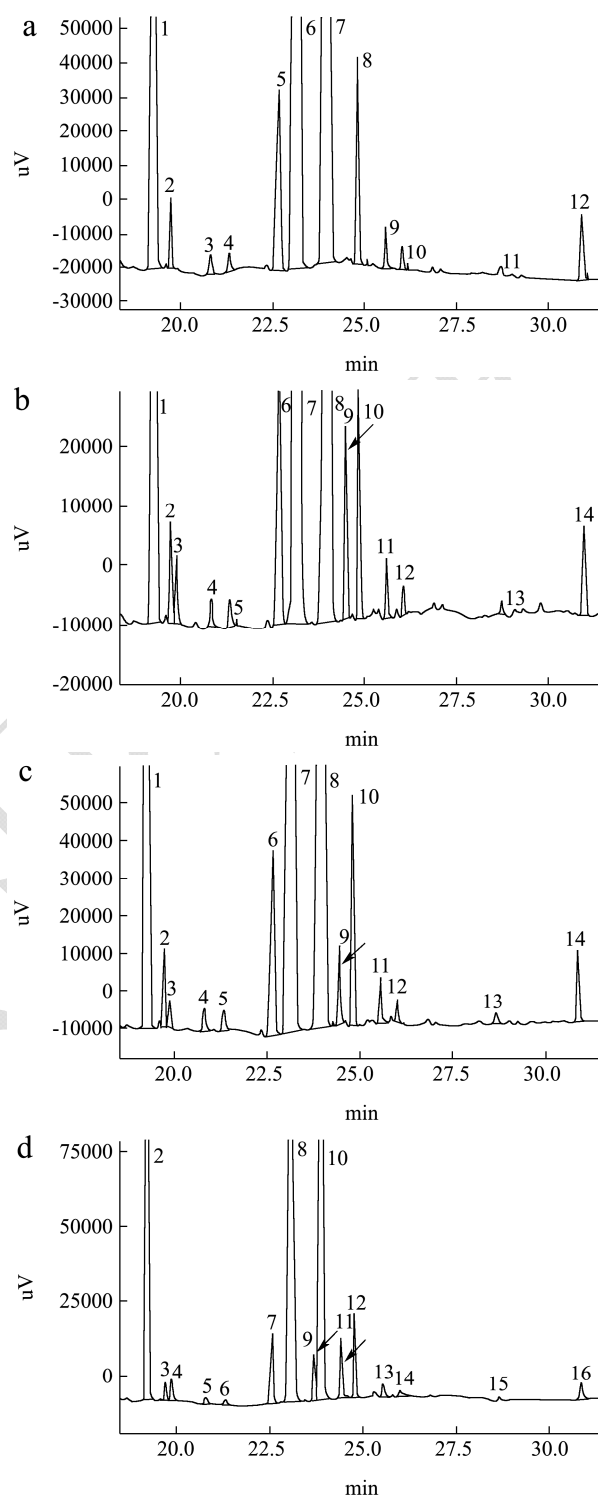


图3 不同有机溶剂超声提取柚子果油气相色谱图

Fig.3 Fatty acids GC profiles of different extraction

注: a 正己烷提取柚子果油的总离子流图(TIC), b 乙酸乙酯提取柚子果油的总离子流图(TIC), c 乙醇提取柚子果油的总离子流图(TIC), d 乙醇提取柚子果胶体相的总离子流图(TIC)。

表2 不同有机溶剂超声提取物脂肪酸图谱

Table 2 Fatty acids profiles of different extraction

保留时间/min	脂肪酸成分/%	正己烷	乙酸乙酯	乙醇油相	乙醇胶体相
19.211~19.27	棕榈酸(C16:0)	15.81±0.07 ^a	15.61±0.09 ^a	15.63±0.00 ^a	15.62±0.10 ^a
19.697~19.737	棕榈烯酸(C16:1)	0.45±0.01 ^a	0.46±0.01 ^a	0.45±0.00 ^a	0.40±0.01 ^b
20.781~20.823	十七烷酸(C17:0)	0.15±0.00 ^a	0.16±0.02 ^a	0.16±0.02 ^a	0.15±0.02 ^a
21.301~21.337	十七碳烯酸(C17:1)	0.14±0.00 ^a	0.15±0.01 ^a	0.16±0.00 ^a	0.13±0.03 ^a
22.557~22.692	硬脂酸(C18:0)	2.17±0.02 ^a	2.10±0.03 ^b	2.10±0.02 ^b	2.16±0.00 ^a
23.06~23.188	油酸(C18:1n9c)	35.95±0.05 ^a	35.53±0.05 ^c	35.69±0.07 ^b	34.15±0.04 ^d
23.687~23.694	反-9,12-十八碳二烯酸(C18:2n6t)	-	-	-	1.14±0.02 ^a
23.886~24.019	顺-9,12-十八碳二烯酸(C18:2n6c)	42.90±0.16 ^a	42.68±0.10 ^a	42.81±0.02 ^a	41.58±0.01 ^b
24.414~24.445	γ -亚麻酸(C18:3n6)	-	0.87±0.01 ^b	0.51±0.02 ^c	1.50±0.02 ^a
24.774~24.82	α -亚麻酸(C18:3n3)	1.33±0.00 ^c	1.38±0.00 ^b	1.40±0.00 ^b	2.05±0.02 ^a
25.538~25.573	花生酸(C20:0)	0.28±0.01 ^b	0.29±0.02 ^b	0.29±0.00 ^b	0.34±0.02 ^a
25.989~26.025	顺-11-花生酸(C20:1)	0.17±0.01 ^a	0.14±0.01 ^a	0.15±0.02 ^a	0.12±0.01 ^b
28.66~28.698	山嵛酸(C22:0)	0.07±0.01 ^a	0.07±0.00 ^a	0.07±0.00 ^a	0.06±0.00 ^a
30.863~30.919	二十三烷酸(C23:0)	0.58±0.00 ^a	0.55±0.01 ^a	0.58±0.01 ^a	0.60±0.10 ^a
饱和脂肪酸		19.07±0.10 ^b	18.80±0.03 ^a	18.84±0.01 ^a	18.94±0.00 ^{a,b}
不饱和脂肪酸	Mono/poly	80.93±0.10 ^b	81.20±0.03 ^a	81.16±0.01 ^a	81.06±0.00 ^{a,b}
P/S		4.24±0.03 ^b	4.32±0.01 ^a	4.31±0.00 ^a	4.28±0.00 ^{a,b}

注: P/S 代表 Unsaturated fatty acids/Saturated fatty acids, 不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸的比例。Mono/poly, 多不饱和脂肪酸与单不饱和脂肪酸之比。数据为平均数±标准差, 同一行中的不同字母代表有显著差异 ($p<0.05$), “-”表示未检出。

表3 不同有机溶剂超声提取物酚酸组成和含量

Table 3 Phenolic acid profile in different extraction

酚酸/($\mu\text{g/g}$)	简写	正己烷	乙酸乙酯	乙醇油相	乙醇胶体相
原儿茶酸	PA	-	4.13±0.07 ^b	3.39±0.29 ^b	31.69±1.03 ^a
对羟基苯甲酸	HBA	-	1.63±0.14 ^b	1.12±0.05 ^c	22.40±0.24 ^a
香草酸	VA	-	2.96±0.04 ^b	1.82±0.11 ^c	63.67±0.16 ^a
丁香酸	SYA	-	10.18±0.33 ^b	15.76±0.54 ^b	207.96±8.05 ^a
香草醛	VAAD	-	4.72±0.12 ^b	2.59±0.36 ^c	8.17±0.03 ^a
对羟基肉桂酸	HCI	0.46±0.04 ^b	5.57±0.23 ^b	3.43±0.66 ^b	109.03±4.96 ^a
丁香醛	SYAD	-	6.05±0.34 ^b	3.56±0.10 ^b	271.09±8.39 ^a
对香豆酸	COA	-	3.83±0.20 ^b	2.16±0.57 ^b	62.27±3.18 ^a
阿魏酸	FA	-	82.40±0.11 ^b	50.29±1.27 ^c	248.79±8.14 ^a
芥子酸	SIN	2.80±0.09 ^b	3.12±0.46 ^b	8.34±0.15 ^b	149.25±4.36 ^a
Total		3.25±0.12 ^d	124.59±0.22 ^b	92.46±0.19 ^c	1174.32±6.15 ^a

注: 数据为平均数±标准差, 同一行中的不同字母代表有显著差异 ($p<0.05$), “-”表示未检出。

2.3.3 西红花酸及其衍生物含量

以 Crocetin, Crocin I, Crocin II 作为液相外标, 定量分析粗油及副产物西红花素及其衍生物含量, 发现乙醇胶体相中有多个出峰并不能被合理解释。UPLC-Triple-TOF/MS 质谱分析结果显示保留时间为 12.0713 min (对应液相 9.646 min), 16.1819 min (对应液相 13.54~13.55 min), 17.3975 min (对应液相 14.53 min), 24.0474 min (对应液相 21.482~21.486 min) 的

准分子离子 $[M-H]^-$ 为 m/z 651.26, $[M+CH_3COOH]^+$ 为 m/z 711.32。对其进行碰撞诱导解离, 在二级质谱图中, 可观测系列脱糖碎片峰 m/z 489 $[M-H-Glc]^-$ 、 m/z 327 $[M-H-Glc-Glc]^-$ 等碎片离子, 该化合物的母核准分子离子为 m/z 327, 结构中存在 2 个葡萄糖。推测该化合物可能为母核是类似西红花酸的结构, 且存在顺反异构, 单侧带双糖, 或者双侧带单糖。

保留时间为 18.6372 min (对应液相 15.96~15.961

min) 的准分子离子 $[M-H]^-$ 为 m/z 813.31, $[M+Cl]^-$ 为 m/z 849.29。对其进行碰撞诱导解离, 在二级质谱图中, 可观测系列脱糖碎片峰 m/z 651 $[M-H-Glc]^-$ 、 m/z 489 $[M-H-Glc-Glc]^-$ 、 m/z 327 $[M-H-Glc-Glc-Glc]^-$ 等碎片离子, 该化合物的母核准分子离子为 m/z 327, 推测该化合物可能为母核是类似西红花酸的结构, 并在双侧一共携带 3 个葡萄糖分子, 为 Crocin II 的同分异构体。

保留时间为 20.5137 min (对应液相 17.749~17.751 min) 的准分子离子 $[M-H]^-$ 为 m/z 489.21, $[M+COOH]^-$ 为 m/z 535.22, $[M+COONa]^-$ 为 m/z 558.20。对其进行碰撞诱导解离, 在二级质谱图中, 可观测脱糖碎片峰 m/z 327 $[M-H-Glc]^-$ 等碎片离子, 推测该化合物可能为母核是类似西红花酸的结构, 并在一侧携带 1 个葡萄糖分子的西红花酸衍生物。

在乙酸乙酯的粗油提取物中仅检测到少量西红花酸 ($5.39 \pm 0.40 \mu\text{g/g}$), 但在乙醇胶体相中其含量非常丰富 ($p < 0.01$), 总量达到了 $31065.57 \mu\text{g/g}$, 远大于标定的十四种酚酸的总含量, 因而大量存在于乙醇胶体相中的醇溶性抗氧化活性物质可能为西红花酸及其衍生物。西红花苷是红花酸与不同糖结合而成的一系列

酯苷, 由于双侧带糖多羟基结构而易溶于水。在乙醇提油过程中由于加热以及相似相溶原理被大量溶出, 后因乙醇蒸发且粗油冷却形成胶体相析出。Yang 等人用 UPLC-Q/TOF-MS 色谱分析结合 HRESIMS、UV/vis、一维二维氢谱, 鉴定出包括 B-J(1-9) 和 13-cis-crocetin-8'-O- β -D-gentiobioside 十种新的西红花酸及其衍生物, 与本实验结果十分类似^[34]。

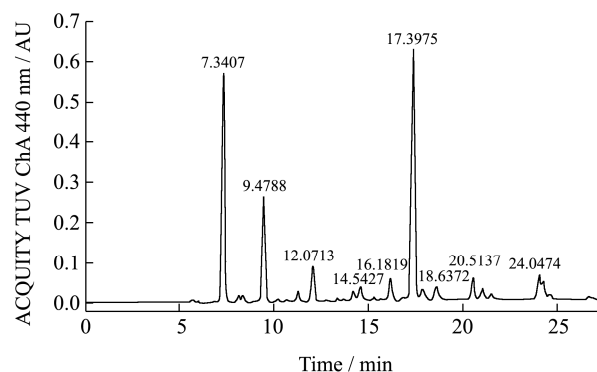


图 4 乙醇胶体相在吸收波长为 440 nm 通道下

UPLC-Triple-TOF/MS 色谱图

Fig 4 The UPLC-Triple-TOF/MS graph of ECP sample in $A_{440 \text{ nm}}$ channel

表 4 不同有机溶剂超声提取物西红花酸及其衍生物含量

Table 4 Crocetin and its derivative in different extraction

保留时间/min	西红花酸及其衍生物/ $\mu\text{g/g}$	正己烷	乙酸乙酯	乙醇油相	乙醇胶体相
5.604	Crocetin I	-	-	-	8525.07 ± 13.45^a
7.351~7.352	Crocetin II	-	-	-	3198.98 ± 5.36^a
9.646	$C_{32}H_{44}O_{14}$	-	-	-	1484.41 ± 2.31^a
13.544~13.545	$C_{32}H_{44}O_{14}$	-	-	-	1122.19 ± 1.17^a
14.53	$C_{32}H_{44}O_{14}$	-	-	-	12412.78 ± 4.85^a
15.96~15.961	$C_{38}H_{54}O_{19}$	-	-	-	897.57 ± 0.08^a
17.749~17.751	$C_{26}H_{34}O_9$	-	-	-	1042.22 ± 4.45^a
21.482~21.486	$C_{32}H_{44}O_{14}$	-	-	-	1160.07 ± 6.21^a
26.491~26.509	Crocetin	-	5.39 ± 0.40^b	8.26 ± 0.29^b	375.14 ± 11.41^a
	Total	-	5.39 ± 0.40^b	8.26 ± 0.29^b	31065.57 ± 3.77^a

注: 数据为平均数 $\pm$ 标准差, 同一行中的不同字母代表有显著差异 ($p < 0.05$), “-”表示未检出。表 6、7 同。

表 5 乙醇胶体相中的西红花酸衍生物质谱数据

Table 5 Mass spectrometric data of main crocetin derivative in ECP

保留时间/min	分子结构	$[M-H]^-$	$[M+Cl]^-$	$[M+COOH]^-$	$[M+CH_3COOH]^-$	$[MS/MS]$
7.3407	Crocetin I					
9.4788	Crocetin II					
12.0713	$C_{32}H_{44}O_{14}$	651.26	-	-	711.32	489, 327
16.1819	$C_{32}H_{44}O_{14}$	651.26	-	-	-	489, 327
17.3975	$C_{32}H_{44}O_{14}$	651.26	-	697.27	-	489, 327
18.6372	$C_{38}H_{54}O_{19}$	813.31	849.29	-	-	651, 489, 327
20.5137	$C_{26}H_{34}O_9$	489.21	-	535.22	-	327
24.0474	$C_{32}H_{44}O_{14}$	651.26	-	-	709.22	489, 327

表 6 不同有机溶剂超声提取物生育酚含量

Table 6 Tocopherol profiles of different extraction					
保留时间/min	生育酚/(μg/mg)	正己烷	乙酸乙酯	乙醇油相	乙醇胶体相
17.308~17.338	alpha	0.79±0.02 ^{a,b}	0.76±0.01 ^b	0.81±0.02 ^a	0.11±0.01 ^c
14.466~14.818	beta/gamma	0.47±0.01 ^b	0.49±0.01 ^{a,b}	0.51±0.02 ^a	0.22±0.00 ^c
12.166~12.290	theta	0.02±0.00 ^d	0.17±0.01 ^c	0.30±0.01 ^a	0.26±0.01 ^b
	Total	1.27±0.02 ^c	1.42±0.02 ^b	1.62±0.05 ^a	0.60±0.02 ^d

表 7 不同有机溶剂超声提取物甾醇含量

Table 7 Phytosterol profile of different extraction					
保留时间/min	植物甾醇/(μg/mg)	正己烷	乙酸乙酯	乙醇油相	乙醇胶体相
12.12~12.17	5α-Cholestane				
18.44~18.46	Crinosterol	0.24±0.04 ^a	-	-	-
19.82~19.87	Campesterol	4.02±0.18 ^{a,b}	3.56±0.43 ^b	4.42±0.22 ^a	0.41±0.03 ^c
20.53~20.57	Stigmasterol	2.99±0.05 ^b	2.68±0.15 ^b	3.47±0.22 ^a	-
21.15~21.18	Fungisterol	0.81±0.07 ^a	0.69±0.08 ^a	0.90±0.18 ^a	-
21.73~21.76	Obtusifolol	-	0.25±0.04 ^a	0.37±0.08 ^a	-
21.91~22.03	β-Sitosterol	7.11±0.09 ^b	6.25±0.24 ^c	7.98±0.33 ^a	0.63±0.06 ^d
22.30~22.35	Isofucosterol	0.67±0.08 ^b	0.53±0.01 ^c	0.84±0.00 ^a	-
22.60	Cycloartanol	0.20±0.07 ^a	-	-	-
23.35~23.44	Cycloartenol	4.18±0.01 ^a	3.54±0.33 ^b	4.65±0.13 ^a	0.27±0.02 ^c
	Total	20.22±0.58 ^a	17.50±1.20 ^b	22.63±1.16 ^a	1.30±0.08 ^c

2.3.4 生育酚含量

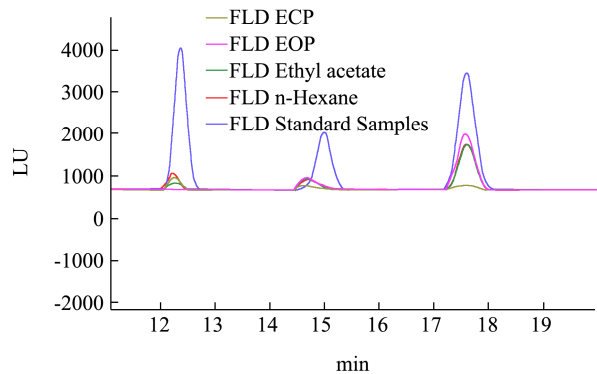


图 5 生育酚标准和栀子果提取物在激发波长为 295 nm，吸收波长为 330 nm 时液相色谱图

Fig.5 The HPLC (FLD) graph of 3 standard tocopherol samples and Gardenia fruit extract at an excitation wavelength of 295 nm and emission wavelength of 330 nm

由表 6 不难发现，乙醇提取的粗油中总生育酚含量为 1.62 μg/mg，显著高于 ($p<0.05$) 乙酸乙酯 (1.42 μg/mg) 和正己烷 (1.27 μg/mg)。其中，α-生育酚是栀子果油的主要成分 (0.76~0.81 μg/mg)，占总生育酚的 50% 以上。Imsanguan^[35]等人研究表明乙醇和己烷均不能从米糠中萃取 α-生育酚，这是因为米糠中的 α-生育酚为基质形式，低压 (即大气压) 下的提取不足以消除蛋白质、不溶于水的碳水化合物等其他分子的干扰。本实验可能是由于用超声辅助溶剂提取，促进

了栀子果粉末细胞破裂，增强 α-生育酚跨细胞膜传递速率，因而在常压下萃取出 α-生育酚。在乙醇提取的粗油以及副产物中，γ-生育酚的含量 (0.26~0.30 μg/mg) 显著高于 ($p<0.05$) 乙酸乙酯和正己烷提取的粗油中的含量，这些可能都由于生育酚有较长的侧链，乙醇对其的萃取能力高于正己烷和乙酸乙酯。近期研究表明^[36]，γ-生育酚可能是亲脂性亲电试剂更有效的捕集剂，对人体健康的影响可能比 α-生育酚更为重要。因此，乙醇提取栀子果油可能具有更高营养价值。

2.3.5 甾醇含量

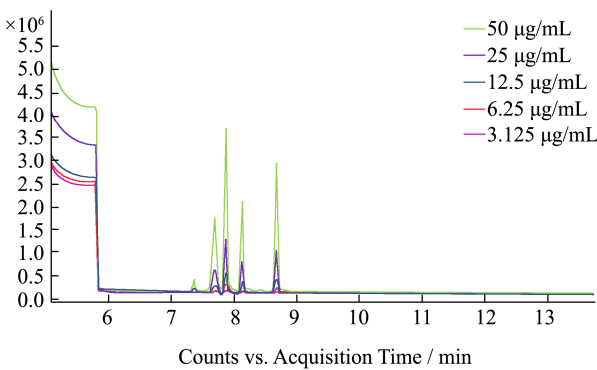


图 6 4 种植物甾醇标准品气相色谱图

Fig.6 The GC-MS graph of 4 standard phytosterol samples
注：植物甾醇标准的出峰依次为麦角甾醇、菜油甾醇、豆甾醇、β-谷甾醇。第一个小峰是 5α-胆甾烷作为内标。

GC-MS 定量结果表明不同有机溶剂提取物中存

在 9 种甾醇, 按出峰顺序分别为谷甾醇、菜油甾醇、豆甾醇、真菌甾醇、钝叶醇、 β -谷甾醇、异岩藻酯醇、环烷醇、环烯醇 (表 7)。 β -谷甾醇是栀子果油中最丰富的甾醇, 其次是菜油甾醇, 环烯醇和豆甾醇。其中, 环烯醇可作为一种补虚通乳, 排脓解毒的药物, 在一般的粗油品中较为少见^[37], 因此其可能成为栀子果油的特色功能成分。乙醇提取粗油中总甾醇含量为 22.63 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 显著 ($p<0.05$) 高于乙酸乙酯提取油 (17.50 $\mu\text{g}/\text{mg}$), 但与正己烷提取油并无显著 ($p<0.05$) 差异。此外, 乙醇提取粗油中 9 种甾醇含量均为最高 (除了环烷醇未检出), 表明乙醇比正己烷、乙酸乙酯更易于提取植物甾醇。

2.4 栀子果油提取物中活性成分含量与抗氧化活性双变量相关性分析

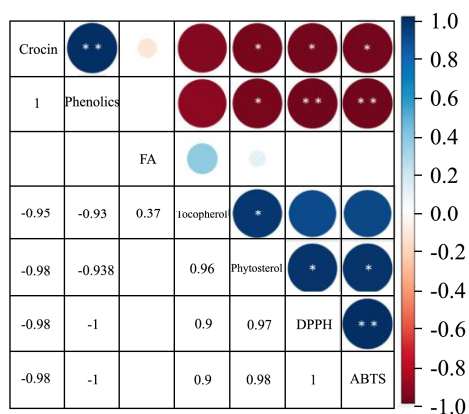


图 7 栀子果油提取物中活性成分含量与抗氧化活性双变量相关性分析 R 图

Fig.7 The correlation analysis of active components in gardenia fruit oil extract and its antioxidant activity by bivariate R chart

注: *: $p<0.05$; **: $p<0.01$ 。

Pearson 模型适用于分析两连续数值型变量之间的线性相关关系, 因此, 利用 SPSS 20 软件对不同栀子果油提取物中西红花酸及其衍生物、植物甾醇、生育酚、酚酸含量、不饱和脂肪酸/饱和脂肪酸比例 (P/S) 与抗氧化活性 (DPPH·清除能力、ABTS⁺清除能力, 以 IC_{50} 值表示) 进行双变量相关性分析, 结果如图 7 所示。DPPH·清除能力、ABTS⁺清除能力的 IC_{50} 值呈极显著相关 ($p<0.01$), 可能是由于 DPPH·和 ABTS⁺两种抗氧化检测方法都是基于单电子转移机制, 因此测定结果间的相关性很高。

抗氧化活性物质彼此之间的正负相关性则体现了活性物质溶解性之间的差异。在用乙醇提取栀子果油的 ECP 相中, 溶剂是旋蒸未完全除尽的乙醇和栀子果实中的结合水, 因此易溶于水的西红花酸及其衍生物、

酚酸更易溶解在此相中, 而脂溶性的植物甾醇和生育酚更易溶解在油相中。因而在栀子果油提取物中水易溶的活性物质与脂易溶的活性物质彼此间呈现负相关。

DPPH·清除能力、ABTS⁺清除能力的 IC_{50} 值与酚酸含量间均成极显著负相关, 与西红花酸及其衍生物间成显著负相关, 说明栀子果油提取物中, 酚酸、西红花酸及其衍生物的含量越高, IC_{50} 值越低, 自由基清除能力越强。而植物甾醇、生育酚、不饱和脂肪酸/饱和脂肪酸比例 (P/S) 在各种栀子果提取物中, 并不是影响 DPPH·和 ABTS⁺自由基清除能力的主要因素。这可能是由于酚酸类物质的多羟基结构和西红花酸及其衍生物共轭双键的作用。

3 结论

本研究表明不同的提取溶剂会影响栀子果油的得率、脂质组成、植物活性物质和体外抗氧化能力。栀子果油中的单不饱和脂肪酸 (MUFA) 和多不饱和脂肪酸 (PUFA) 含量极高, 尤其是亚油酸和油酸, 而乙醇还可将其中的 γ -亚麻酸成分提出。不同的有机溶剂对植物化学物质 (酚酸、生育酚、植物甾醇和西红花酸及其衍生物) 的含量有显著影响 ($p<0.05$), 乙醇提取粗油中酚酸, 生育酚和植物甾醇含量较高, 因此可能具有更高的生物活性。此外, 乙醇提取油的副产物胶体相中含有大量的与体外抗氧化活性 (DPPH·、ABTS) 显著相关的西红花酸及其衍生物, 这又进一步提高了乙醇提取栀子果油的经济价值。

参考文献

- [1] Li H B, Yu Y, Wang Z Z, et al. Iridoid and bis-iridoid glucosides from the fruit of *Gardenia jasminoides* [J]. Fitoterapia, 2013, 88: 7-11
- [2] Koo H J, Lim K H, Jung H J, et al. Anti-inflammatory evaluation of gardenia extract, geniposide and genipin [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2006, 103(3): 496-500
- [3] XIAO Wen-ping, LI Shi-ming, WANG Si-yu, et al. Chemistry and bioactivity of *Gardenia jasminoides* [J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2017, 25(1): 43-61
- [4] Li N, Fan M, Li Y, et al. Stability assessment of crocetin and crocetin derivatives in *Gardenia* yellow pigment and *Gardenia* fruit pomace in presence of different cooking methods [J]. Food Chemistry, 2019, 312: 126031
- [5] Hao S, Wang J, Li S, et al. Preparation of gardenia red pigment and its antineoplastic activity in multiple tumor cells [J]. Food Bioence, 2020, 35: 100582

- [6] 李昊阳,王飞运,刘华敏,等.不同方法制备的栀子果油的理化性质比较[J].现代食品科技,2016,32(9):209-215
LI Hao-yang, WANG Fei-yun, LIU Hua-min, et al. Comparison of the physicochemical characteristics of gardenia fruit oils obtained by various methods [J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(9): 209-215
- [7] Natalia Castejia, Luna P, Francisco J Serancis. Alternative oil extraction methods from *Echium plantagineum* L. seeds using advanced techniques and green solvents [J]. Food Chemistry, 2018, 244(APR.1): 75-82
- [8] Li Y, Fr Li Y Fine, Fabiano-Tixier A S, et al. Evaluation of alternative solvents for improvement of oil extraction from rapeseeds [J]. Comptesrendus - Chimie, 2014, 17(3): 242-251
- [9] Yara-Var7 Edinson, Ying L, Balcells Mercc, et al. Vegetable oils as alternative solvents for green oleo-extraction, purification and formulation of food and natural products [J]. Molecules, 2017, 22(9): 1474
- [10] Weiwei T, Hailou Z, Wenda X, et al. Optimization of supercritical fluid extraction of oil from the fruit of *Gardenia jasminoides* and its antidepressant activity [J]. Molecules, 2014, 19(12): 19350-19360
- [11] Prat, Denis, Wells, et al. CHEM21 selection guide of classical- and less classical-solvents [J]. Green Chemistry, 2016, 18: 288-296
- [12] Carr Patrick, MorganeC, Sylvie D. Hot ethanol extraction: economic feasibility of a new and green process [J]. Ocl, 2018, 25(2): 206-212
- [13] Bauemler E R, Carrin M E, Carelli A A. Extraction of sunflower oil using ethanol as solvent [J]. Journal of Food Engineering, 2016, 178(Jun.): 190-197
- [14] Sánchez R J, Fernández M B, Nolasco S M. Hexane-free green solvent extraction of canola oil from microwave-pretreated seeds and of antioxidant-rich byproducts [J]. European Journal of Lipid Ence and Technology, 2018, 120: 1800209
- [15] Gokhan Zengin, Aleksandra Cvetanović, Uroš Gašić, et al. UHPLC-LTQ OrbiTrap MS analysis and biological properties of *Origanum vulgare* subsp. *viridulum* obtained by different extraction methods [J]. Industrial Crops and Products, 2020, 154(15): 112747
- [16] SamaramS, Mirhosseini H, Tan C P, et al. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of oil from papaya seed by response surface methodology: oil recovery, radical scavenging antioxidant activity, and oxidation stability [J]. Food Chemistry, 2015, 172(Apr.1): 7-17
- [17] Samaram S, Mirhosseini H, Tan C P, et al. Ultrasound-assisted extraction and solvent extraction of papaya seed oil: crystallization and thermal behavior, saturation degree, color and oxidative stability [J]. Industrial Crops and Products, 2014, 52: 702-708
- [18] Khoei M, Chekin F. The ultrasound-assisted aqueous extraction of rice bran oil [J]. Food Chemistry, 2016, 194(MAR.1): 503
- [19] Jiyane, Phiwe, Charles, et al. Optimisation of croton gratissimus oil extraction by n-hexane and ethyl acetate using response surface methodology [J]. Journal of Oleo Science, 2018, 67(4): 369-377
- [20] Chen Q, Dong W, Wei C, et al. Combining integrated ultrasonic-microwave technique with ethanol to maximise extraction of green coffee oil from Arabica coffee beans [J]. Industrial Crops and Products, 2020, 151: 112405
- [21] Capellini M C, Larissa C, Vanessa G, et al. Alcoholic extraction of sesame seed cake oil: influence of the process conditions on the physicochemical characteristics of the oil and defatted meal proteins [J]. Journal of Food Engineering, 2018, 240(JAN.): 145-152
- [22] Stevanato, Natália, Da Silva C. Radish seed oil: ultrasound-assisted extraction using ethanol as solvent and assessment of its potential for ester production [J]. Industrial Crops and Products, 2019, 132: 283-291
- [23] Patricia Trevisani Juchen, Micheli Nolasco Araujo, Fabiane Hamerski, et al. Extraction of parboiled rice bran oil with supercritical CO₂ and ethanol as co-solvent: kinetics and characterization [J]. Industrial Crops & Products, 2019, 139: 111506
- [24] Lee J H, Lee D U, Jeong C S. Gardenia jasminoides Ellis ethanol extract and its constituents reduce the risks of gastritis and reverse gastric lesions in rats [J]. Food & Chemical Toxicology an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association, 2009, 47(6): 1127-1131
- [25] Savic I, SavicGajic I, Gajic D. Physico-chemical properties and oxidative stability of fixed oil from plum seeds (*Prunus domestica* Linn.) [J]. Biomolecules, 2020, 10(2): 294
- [26] Shanooba P M, Tungare K, Sunariwal S, et al. Extraction and characterization of polyphenols from *Artocarpus heterophyllus* and its effect on oxidative stability of peanut oil [J]. International Journal of Fruit Science, 2020, 6: 1-22