

张文开, 鲍征宇, Diego Armando PINZON NUNEZ, 等. 超声辅助乙醇提取富硒金花葵花朵中的硒及抗氧化活性分析 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(16): 201–208. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023070202

ZHANG Wenkai, BAO Zhengyu, Diego Armando PINZON NUNEZ, et al. Ultrasonic Assisted Ethanol Extraction of Selenium and Antioxidants from Selenium-rich *Hibiscus manihot* L.[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(16): 201–208. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023070202

· 工艺技术 ·

超声辅助乙醇提取富硒金花葵花朵中的硒及抗氧化活性分析

张文开¹, 鲍征宇^{1,2,3}, Diego Armando PINZON NUNEZ¹, 邵玲玲¹, 徐 峰²,

张宏宇⁴, 赵月华⁵, 田 欢^{1,2,3,*}

(1. 中国地质大学(武汉)材料与化学学院, 湖北武汉 430000;

2. 安康国硒源科技有限公司, 陕西安康 725000;

3. 紫阳中地大硒科技有限公司, 陕西安康 725000;

4. 西北大学地质学系, 陕西西安 710000;

5. 武汉测绘研究院, 湖北武汉 430000)

摘要:为促进优质天然富硒植物资源的科学开发利用, 本文选取富硒金花葵为研究对象, 采用氢化物发生-原子荧光光谱法(Hydride Generation-Atomic Fluorescence Spectrometry, HG-AFS)检测不同植物器官样品中的硒含量, 超声辅助乙醇提取金花葵花朵中的含硒有机活性组分并使用响应面法优化获得最佳提取工艺, 同时对含硒提取物开展抗氧化活性研究。结果显示, 金花葵各器官中硒含量从高到低依次为叶、果、花、根和茎, 分别为 21.99、14.29、12.93、10.90 和 10.23 mg/kg。响应面优化结果表明, 含硒有机活性成分最佳提取参数为提取温度 40 ℃、固液比 1:60、提取时间 40 min、超声功率 350 W、乙醇浓度 50% (V/V) 和提取次数 1 次。在最佳提取参数下, 硒的提取率为 35.65%±0.65%。DPPH 抗氧化活性测定结果显示, 含硒有机活性成分的半抑制浓度 (IC₅₀) 为 0.048 mg/mL (硒元素浓度为 0.79 μg/mL), 羟基自由基清除实验显示样品浓度为 8 mg/mL 时达到最大清除率 97%, IC₅₀ 为 0.56 mg/mL, 还原力实验表明样品的还原能力随样品浓度的增大而增强。证明金花葵的含硒乙醇提取物具有良好的抗氧化能力。本研究可以为合理利用富硒金花葵和研发加工富硒农副产品提供一些理论依据。

关键词: 金花葵, 硒, 含硒活性成分, 提取工艺优化, 响应面, 抗氧化活性

中图分类号: TS255.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2024)16-0201-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023070202

本文网刊:



Ultrasonic Assisted Ethanol Extraction of Selenium and Antioxidants from Selenium-rich *Hibiscus manihot* L.

ZHANG Wenkai¹, BAO Zhengyu^{1,2,3}, Diego Armando PINZON NUNEZ¹, SHAO Lingling¹, XU Feng²,

ZHANG Hongyu⁴, ZHAO Yuehua⁵, TIAN Huan^{1,2,3,*}

(1. Faculty of Materials Science and Chemistry, China University of Geoscience (Wuhan), Wuhan 430000, China;

2. Ankang Se-Resources Hi-Tech Co., Ltd., Ankang 725000, China;

3. Ziyang Zhongdida Selenium Technology Co., Ltd., Ankang 725000, China;

4. Department of Geology, Northwest University, Xi'an 710000, China;

5. Wuhan Geomatic Institute, Wuhan 430000, China)

收稿日期: 2023-07-24

基金项目: 陕西省创新能力支撑计划-青年科技新星项目(2021SR5101); 陕西省安康市科学技术研究发展计划项目(AK2020-FX01-9)。

作者简介: 张文开(1998-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 地球化学, Email: wkzhang@cug.edu.cn。

* 通信作者: 田欢(1988-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 地球化学, Email: huantian@cug.edu.cn。

Abstract: To promote scientific progress and optimize the utilization of natural plant resources that rich in selenium, the study selected selenium-rich *Hibiscus manihot* L. as the research object, using the HG-AFS to detect the selenium content in different plant organ samples, ultrasound assisted ethanol extraction of selenium containing organic active components from sunflower flowers, and obtaining the optimal extraction process by response surface methodology. At the same time, conducting antioxidant activity research on selenium containing extracts. The results showed that the total Se concentrations in different organs of *Hibiscus manihot* L., from highest to lowest were found in the leaves, fruits, flowers, roots, and stems, with concentrations of 21.99, 14.29, 12.93, 10.90, and 10.23 mg/kg, respectively. The RSM optimization results indicated that the ideal conditions for the extraction parameters were as follows: Extraction temperature of 40 °C, solid-liquid ratio of 1:60, extraction time of 40 minutes, ultrasonic power of 350 W, ethanol concentration of 50% (V/V), under one-time extraction. For the optimal conditions, the selenium extraction rate was 36.65%±0.65%. The DPPH antioxidant activity analysis showed a half-inhibitory concentration (IC₅₀) value of 0.048 mg/mL (with a Se concentration of 0.79 µg/mL), the hydroxyl radical scavenging analysis showed that the maximum clearance rate was 97% when the extracts concentration was 8 mg/mL, and the IC₅₀ was 0.56 mg/mL. The reducing power analysis showed that the reducing power of the extracts increases with the increase of the concentration, indicating that the extracts possess a good antioxidant capacity. The present study would provide empirical evidence to support the efficient use of selenium-rich *Hibiscus manihot* L. and the extraction of selenium-rich agricultural by-products.

Key words: *Hibiscus manihot* L.; selenium; selenium-rich active component; extraction optimization; response surface methodology; antioxidant activity

金花葵(*Hibiscus manihot* L.), 别名菜芙蓉、野芙蓉等。一年生葵锦科秋葵属草本植物, 形态与秋葵类似, 果实可入药^[1-2], 多生长于山中, 易成活且在重金属环境下仍能萌发^[3]。金花葵被认为是 200 多种秋葵属植物中药用价值最高的一种, 其花朵和果实中富含黄酮、多酚、多糖等小分子有机化合物^[4], 且研究发现它对硒元素具有较强的富集能力。硒是一种人体必需的微量元素^[5-6], 可通过参与合成谷胱甘肽过氧化物酶来影响人体多项生理活动和健康^[7-8]。

目前植物源含硒活性成分的提取和应用是一个非常热门的研究方向, 金花葵是一种高药用价值的天然富硒植物, 但关于富硒金花葵中含硒活性成分提取的研究较少, 因此, 开展其含硒活性成分提取优化实验及抗氧化活性研究对高附加值的富硒产品开发具有重要意义。传统方法主要有碱提法、醇提法、酶提法和水提法等^[9-11], 这些方法所用提取试剂简单且易于规模化应用。常用的辅助提取技术有超声微波辅助、电磁脉冲辅助和高温高压辅助等手段, 其中超声辅助提取的设备易得且操作简单, 适合各类样品的提取^[12-13]。实验中涉及的提取条件有提取次数、提取温度、提取时间、超声功率、固液比和提取试剂浓度等^[14-19]。Macias 等^[20]使用超声乙醇提取鼠尾草中的多酚化合物, 优化得到在 75% 乙醇、30% 振幅和 10 min 提取条件下, 提取物中多酚组分的抗氧化活性和浓度均达到最佳水平。刘剑^[1]使用热水提取金花葵籽中的硒多糖, 得到最优条件为 3.3 h、温度 71 °C 和固液比 1:31, 此时硒多糖提取率最高为 13.58%。本研究采用乙醇超声辅助提取的方式对富硒金花葵中的含硒活性组分进行提取, 通过单因素实验和响应面试验得到最佳提取条件, 并对提取

物开展抗氧化活性研究, 为富硒金花葵的合理开发利用提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

富硒金花葵样品 依托安康国硒源科技有限公司种植并采样; 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl radical, DPPH 自由基试剂) 福州飞净生物科技有限公司; 硒标准溶液 北京北方伟业计量研究院; 乙醇 分析纯(AR), 天津市天力化学试剂有限公司; 硼氢化钾 分析纯(AR), 天津市科密欧化学试剂有限公司; 双氧水溶液(30%)、硝酸、盐酸为优级纯(GR)、水杨酸、三氯乙酸、硫酸亚铁、氯化铁、铁氰化钾、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾和氢氧化钾均为分析纯(AR) 国药集团化学试剂有限公司。

HGF-V2 原子荧光光度计 北京海光仪器有限公司; KQ-100DE 数控超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司; UV-Mini1285 型紫外分光光度计 岛津(上海)实验器材有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 富硒金花葵样品前处理 在陕西安康市金花葵种植大田中随机选取五个采样点, 采集盛花期、无虫害的金花葵完整植株, 按照采样地点分别为 JHK-1、JHK-2、JHK-3、JHK-4、JHK-5。带回实验室, 按照根、茎、叶、花、果分开, 经自来水清洗干净后, 再用超纯水清洗 3 次以上, 控干水分, 置于干燥箱内烘干至恒重。使用高速破壁机将样品破碎, 过 60 目筛, 并于 4 °C 下避光保存。

1.2.2 金花葵硒活性成分的提取方法 精确称取 1.0000±0.0005 g 金花葵花朵样品于 100 mL 离心管中, 加入 40 mL 50%(V:V)的乙醇水溶液, 混合均

匀后在 250 W 的超声功率下提取 1 h, 提取液经 4000 r/min 离心 15 min, 将上清液转移至干净的 100 mL 离心管中并保存于 4 ℃ 条件下。

1.2.3 富硒金葵花各器官硒含量检测前处理 粉末样品硒含量检测方法(高温密闭消解法): 准确称取 0.1000 ± 0.0005 g 样品于聚四氟乙烯消解罐中, 加入 3 mL 硝酸和 1 mL 双氧水, 冷消 1 h, 然后加钢套于 160 ℃ 烘箱中消解 12 h 以上, 冷却取出后置于 130 ℃ 电热板上, 蒸发样品溶剂至近干, 加入 2 mL 50%(V/V) 盐酸溶液于 100 ℃ 还原 30 min, 再用 10% 盐酸溶液定容至 10 mL。

1.2.4 富硒金葵花样品的含量测定 样品硒含量检测均采用氢化物发生-原子荧光光谱法(Hydride Generation Atomic Fluorescence Spectrometry, HG-AFS)测试, 消解方法和仪器参数修改自参考文献[21-23]。仪器参数如下: 负高压 240 V, 灯电流 30 mA, 载气流量 600 mL/min, 屏蔽气流量 400 mL/min, 载流 10% 盐酸溶液, 还原剂 0.5%(M/V) 氢氧化钾+1%(M/V) 硼氢化钾溶液, 还原剂用量为 1.5 mL/次; 采用峰面积法, 读取时间 5~25 s。

$$C = \frac{c \times V_0 \times D}{M} \quad \text{式 (1)}$$

式中: C 为金葵花各器官硒的浓度, mg/kg; c 为测试液硒浓度, ng/mL; V_0 为测试液总体积, mL; D 为样品稀释倍数; M 为金葵花样品称取重量, g。

1.2.5 提取液中硒含量检测方法 使用移液枪准确吸取 5 mL 提取液于聚四氟乙烯的消解罐中, 在 130 ℃ 电热板上蒸发至 0.2 mL 左右, 加入 3 mL 浓硝酸, 加盖 130 ℃ 消解 5 h, 消解完成后去盖蒸至近干, 后续还原步骤同 1.2.3 中的方法。硒提取率的计算公式如下所示:

$$W = \frac{c \times V_1 \times D}{m} \quad \text{式 (2)}$$

式中: W 为硒的提取率, %; c 为使用标准曲线法计算出的硒浓度, ng/mL; V_1 为测试液总体积, mL; D 为样品稀释倍数; m 为金葵花花朵的总硒含量, μg 。

1.2.6 超声波辅助乙醇提取富硒金葵花花朵中含硒活性成分的条件优化

1.2.6.1 单因素实验设计 对富硒金葵花粉末开展提取实验, 分别考察了提取温度(20、30、40、50、60 ℃), 固液比(1:10、1:20、1:30、1:40、1:60、1:80), 提取时间(10、20、30、40、50、60 min), 超声波功率(250、300、350、400、450、500 W), 乙醇浓度(0、20%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%), 提取次数(1、2、3 次)六个因素对金葵花中含硒活性成分提取率的影响。

1.2.6.2 响应面试验设计 在单因素实验结果基础上采用 Box-Behnken 中心组合试验设计开展三因素三水平响应面优化试验, 将乙醇浓度、固液比和超声

功率作为优化条件, 探究三个因素对其提取率的影响, 其他试验条件为: 提取次数 1 次, 提取温度为 40 ℃, 提取时间为 40 min, 条件范围的选择参照单因素优化条件的最大值相邻的参数作为优化参数, 选择因素和水平设计如表 1 所示。

表 1 响应面试验因素水平设计
Table 1 Design of the response surface test factor level

水平	因素		
	乙醇浓度(%)	固液比(g/mL)	超声功率(W)
1	80	1:80	400
0	50	1:60	350
-1	20	1:40	300

1.2.7 DPPH 清除能力测定 方法参考文献[24-26]并适当修改。DPPH 自由基溶液的配制: 准确称取 0.008 g DPPH 固体于烧杯中, 使用无水乙醇溶解后定容至 100 mL 棕色容量瓶, 得到 0.2 mmol/L 的 DPPH 溶液。将 1.0 g 富硒金葵花提取物使用 50% 乙醇水溶液定容至 100 mL 容量瓶, 分别制作浓度为 0.01、0.05、0.1、0.5、1、4、8 mg/mL 的溶液, 维生素 C 的配制与金葵花提取物相同。取配好的不同梯度的两种溶液 2 mL 于比色管中, 加入上述配好的 DPPH 溶液 2 mL, 充分混合后避光保存 30 min 后在 517 nm 处测定其吸光度, 使用维生素 C 作为阳性对照样品进行试验。DPPH 自由基清除率计算公式:

$$\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100 \quad \text{式 (3)}$$

式中: A_1 为提取物溶液加入 DPPH 溶液后在 517 nm 处的吸光度; A_2 为提取物溶液加入 2 mL 无水乙醇后在 517 nm 处的吸光度; A_0 为 2 mL 无水乙醇加入 2 mL DPPH 后在 517 nm 下的吸光度。

提取物半抑制浓度 IC_{50} 计算方式参照改良寇式法^[27], 具体方式如下:

$$\lg IC_{50} = X_m - I \frac{p - (3 - P_m - P_n)}{4} \quad \text{式 (4)}$$

式中: IC_{50} 为半抑制浓度, mg/mL; X_m 为最大剂量的以 10 为底的对数; I 为最大浓度和相临浓度的比值求以 10 为底的对数; P 为自由基清除效率之和; P_m 为数据内最大自由基清除率, mg/mL; P_n 为数据内最小自由基清除率。

1.2.8 羟基自由基清除能力测定 参照刘剑^[1]的方法, 准确称取不同浓度的待测溶液 1 mL 于比色管中, 依次加入 9 mmol/L 的 FeSO_4 溶液、1 mL 9 mmol/L 水杨酸的乙醇溶液, 混合均匀后加入 1 mL 8.8 mmol/L 的 H_2O_2 溶液水浴 37 ℃ 反应 30 min, 样品在 510 nm 处测定吸光度。 IC_{50} 的计算同 DPPH 自由基。

$$\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100 \quad \text{式 (5)}$$

式中: A_1 为提取物溶液反应后在 510 nm 处的吸光度; A_2 为提取物溶液加入 2 mL 无水乙醇的吸光度; A_0 为加入 2 mL 无水乙醇的吸光度。

1.2.9 还原能力测定 参考刘剑^[1]的方法, 取 1 mL 上述不同浓度的提取物溶液于比色管中, 依次加入 1 mL 0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲溶液 (K_2HPO_4 - K_2HPO_4 , pH=6.6), 1 mL 1% (W/V) 的铁氰化钾溶液, 混合均匀后与水浴锅中 50 °C 下反应 20 min。混合物加入 1 mL 三氯乙酸反应一段时间后离心, 取上清液 2 mL 加入 2 mL 去离子水和 0.4 mL 0.1% (W/V) 的铁氰化钾溶液, 静置反应一段时间后在 700 nm 处测定吸光值。

1.3 数据处理

所有实验均做三次平行, 结果使用平均值 $\pm$ 标准差表示, 分别使用 SPSS 26.0 和 Origin 2021 进行数据分析和作图, 使用斯皮尔曼相关系数开展单因素分析, 其中 $|r|$ 越接近 1, 表明两组数据相关性越强, 使用 Design-expert 12.0 进行响应面作图和方差分析, 当 $P>0.05$ 时认为结果不显著, $P<0.05$ 时显著, $P<0.01$ 时极显著。

2 结果与分析

2.1 富硒金花葵各器官硒的分布

由图 1 可知, 样品中硒元素含量累积量最大的是叶, 其次是花和果实, 按照硒元素平均值从高到低依次为叶、果、花、根、茎, 硒元素含量分别为 21.99、14.29、12.93、10.90、10.23 mg/kg。根施处理硒元素在地上部分的累积程度最高, 这一实验结果与李哲^[28]的研究结果一致。本研究中硒元素主要存在于叶中, 可能是因为其植株较大, 叶生物量较大, 导致硒转运至花和果的部分较少, 植株中叶的硒累积量最大。

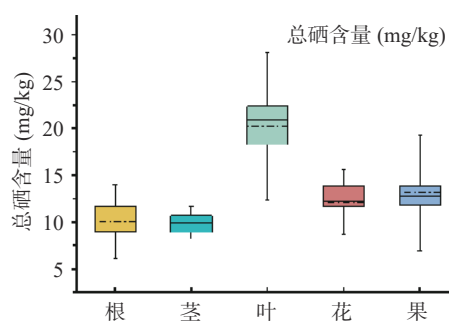


图 1 金花葵各器官硒含量分布图

Fig.1 Selenium distribution in organs of *Hibiscus manihot* L.

注: 实线代表中位数, 点划线代表均值 ($n=5$)。

2.2 提取条件优化

2.2.1 单因素实验结果 提取温度优化结果如图 2A, 相关分析表明, 温度对提取率的影响较小 ($r=-0.198$, $P>0.05$), 硒提取率随温度变化呈上下波动。可能是因为温度逐渐上升时, 部分乙醇分子达到饱和和蒸汽压

以气态分子的形式存在, 这部分溶剂不能起到提取的效果, 导致提取传质效率下降, 使样品的提取效果变差。

固液比优化如图 2B, 相关分析表明, 固液比对提取效果的影响极大, ($r=0.940$, $P<0.05$) 硒提取率随固液比的增大逐渐增大, 到达 1:80 的固液比时, 样品中的硒元素含量略微下降, 固液比过大对提取效果反而有负作用, 原因可能是固液比过大时, 样品的溶剂不能很好的接受超声的能量, 从而导致样品的提取效果变差^[29]。整体来看, 样品在溶剂量不足时不能将含硒元素的物质完全提取, 因此需要选用较大固液比完成实验。

提取时间优化如图 2C, 相关分析表明, 提取时间对提取效果影响较小 ($r=-0.340$, $P>0.05$), 硒提取率随时间变化先上升后下降, 可能的原因是样品在 40 min 时, 分子的交换已经达到终点, 溶剂继续与样品接触, 样品中其他杂质成分会相继溶出, 使得样品提取过程中的溶出效率变差^[30]。

超声功率优化如图 2D, 相关分析表明, 超声功率对提取效果影响较大 ($r=0.528$, $P<0.01$), 样品的提取效果随超声功率的改变, 呈现先增大后减小的趋势, 对样品的影响程度较小, 可能的原因是由于超声功率的增大, 样品接受能量后增大了溶出率, 然而当超声能量继续增大时, 样品除硒组分以外, 其他杂质也相继溶出, 造成提取效果的下降^[31]。

乙醇浓度优化如图 2E, 相关分析表明, 乙醇浓度的改变对提取率影响较大 ($r=-0.472$, $P<0.05$), 硒提取率随乙醇浓度改变呈现先增大后减小的趋势^[32], 样品在 40%~60% 浓度下样品的提取率最高, 而乙醇在 100% 比例时提取液中没有检测到硒元素含量, 可能是因为样品乙醇占比变大时溶液的极性更接近乙醇的极性, 导致提取出来的杂质变多, 影响了样品的提取率。

提取次数优化如图 2F 所示, 相关分析表明, 提取次数对提取率的影响极大 ($r=-0.879$, $P<0.01$), 随提取次数增加硒提取率极大降低, 一次提取占三次提取总硒含量的 97.32%, 可以认为样品在一次提取中得到了全部提取的硒, 这可能得益于样品实验过程中选择较大的固液比, 可以一次将硒小分子提取完成^[11]。

单因素的优化结果表明, 六个单因素优化结果的相关性从大到小分别是固液比、提取次数、乙醇浓度、超声功率、提取时间和提取温度 ($0.940>0.879>0.528>0.472>0.340>0.198$), 有显著影响的参数分别是固液比, 提取次数, 乙醇浓度和超声功率。然而样品的提取次数影响虽大, 却没有优化的必要, 原因是一次提取的效果基本达到最佳条件, 因此最终选择固液比、乙醇浓度和超声功率作为多因素优化实验的因子。

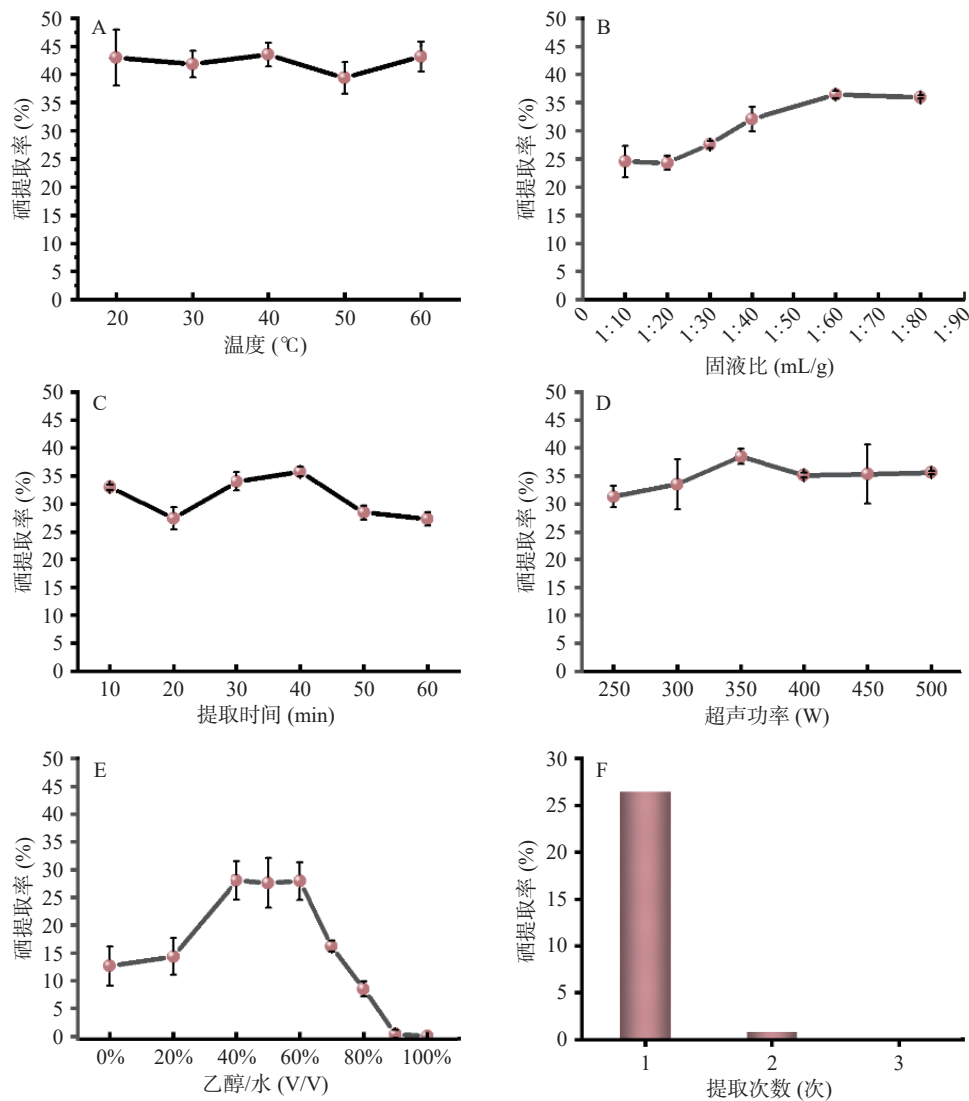


图 2 单因素实验结果
Fig.2 Optimization of single factor

2.2.2 响应面试验结果 响应面优化结果见表 2, 优化模型为二次项多项式模型, 拟合方程为:

$$Y = -261.80764 + 2.22006 \times A + 1.71826 \times B + 1.06945 \times C - 0.000012 \times AB - 0.000625 \times AC + 0.000410 \times BC - 0.016997 \times A^2 - 0.018810 \times B^2 - 0.001479 \times C^2$$

由表 3 可知, 二次项回归模型 P 检验值为 0.0001 ($P < 0.05$), 失拟项为 0.0630, 表示模型有显著的统计学意义, R^2 的值为 0.9981, Adjusted R^2 的值为 0.9957, 表明该模型拟合程度良好, 该模型的变异系数为 2.77%。单因素相关性分析中, 固液比(A)的 F 检验值为 11.54, P 值为 0.0115 ($P < 0.05$), 有显著的统计学意义; 乙醇浓度(B) F 检验值为 6.82, P 值为 0.0348 ($P < 0.05$), 显示有显著的相关性。超声功率(C)的 F 检验值为 14.57, P 值为 0.0066 ($P < 0.05$), 存在明显的相关性。交互项的检验表明, 三种交互项均不存在明显的相关性(P 检验均大于 0.05), 各实验因子之间不存在互相影响。二次项分析显示, 三种单因素的二次项均显著。综上, 三个因素对模型均有较大影响, 且影响程度从大到小依次为超声功率、固液

表 2 响应面试验设计与结果

Table 2 Design and test results of response surface optimization

实验号	固液比	乙醇浓度	超声功率	硒提取率(%)
1	-1	-1	0	14.48±0.83
2	1	-1	0	12.95±0.95
3	-1	1	0	12.21±0.35
4	1	1	0	10.65±0.46
5	-1	0	-1	25.14±0.73
6	1	0	-1	24.82±0.88
7	-1	0	1	28.04±0.94
8	1	0	1	25.22±0.86
9	0	-1	-1	15.42±0.35
10	0	1	-1	14.08±0.38
11	0	-1	1	16.04±0.69
12	0	1	1	17.16±0.73
13	0	0	0	36.23±1.35
14	0	0	0	35.91±1.67
15	0	0	0	36.75±1.49
16	0	0	0	36.62±1.33
17	0	0	0	35.99±1.89

比、乙醇浓度。
根据模型, 制作含有等高线图的三维响应曲面,

表 3 响应面回归模型方差分析

Table 3 Response surface quadratic model analysis of variance

方差源	平方和	自由度	均方差	F值	P值	显著性
模型	1579.75	9	175.53	417.41	<0.0001	**
A	4.85	1	4.85	11.54	0.0115	*
B	2.87	1	2.87	6.82	0.0348	*
C	6.13	1	6.13	14.57	0.0066	**
AB	0.0002	1	0.0002	0.0005	0.9822	
AC	1.56	1	1.56	3.72	0.0952	
BC	1.51	1	1.51	3.60	0.0997	
A ²	194.62	1	194.62	462.82	<0.0001	**
B ²	1206.66	1	1206.66	2869.47	<0.0001	**
C ²	57.53	1	57.53	136.80	<0.0001	**
残差	2.94	7	0.4205			
失拟项	2.39	3	0.7952	5.70	0.0630	
纯误差	0.5580	4	0.1395			

注:表中*表示 $P<0.05$,表明两者之间具有显著性,**表示 $P<0.01$,表明两者之间有极显著性, $R^2=0.9981$; $R^2_{adj}=0.9957$; $R^2_{pred}=0.9753$; $CV\%=2.77$ 。

结果如图 3~图 5 所示,依照优化结果分析不同因素之间的相互作用对提取率的影响,图 3 显示乙醇浓度和固液比对提取效果的影响较大,但没有发现明显的交互影响,图 4 可得乙醇浓度对样品的影响较大,但超声功率的变化曲线较为平缓,说明乙醇浓度和超声功率交互项对提取效果影响不大,图 5 显示超声功率和固液比的影响均较大,但交互项影响不显著。根据响应面优化模型得到样品的最佳提取条件为固液比 1:58.74,乙醇浓度 49.54%、超声功率 356.2 W,

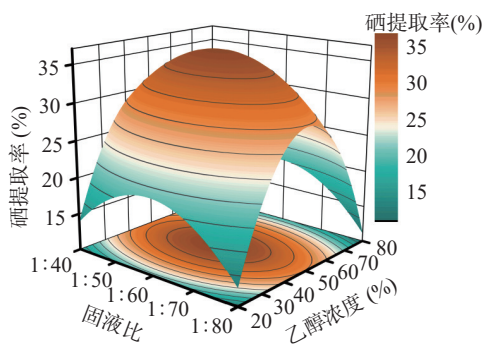


图 3 乙醇浓度-固液比响应面分析

Fig.3 Response surface analysis of solid-liquid ratio and ethanol concentration

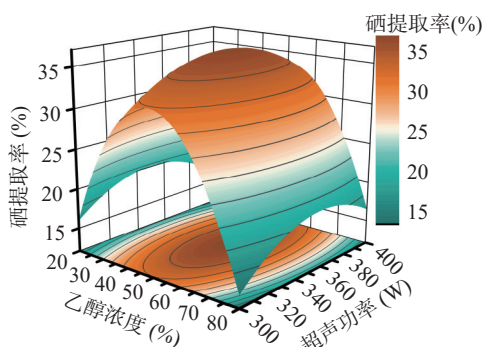


图 4 乙醇浓度-超声功率响应面分析

Fig.4 Response surface analysis of ethanol concentration and ultrasonic power

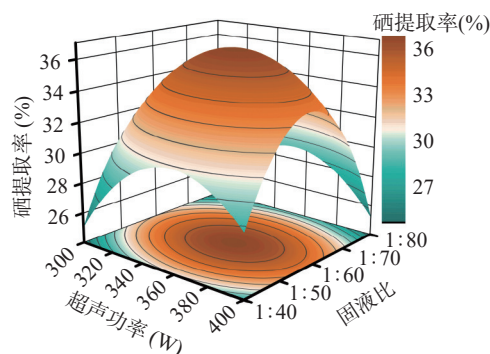


图 5 超声功率-固液比响应面分析

Fig.5 Response surface analysis ultrasonic power and solid-liquid ratio

此时硒提取率预测值为 36.38%, 为方便后续的实验方案进行,将样品的优化参数取整,最终得到样品的优化方案为乙醇浓度 50%、超声功率 350 W、固液比 1:60,提取时间 40 min、提取温度 40 ℃、提取次数一次。使用上述优化条件,得到提取后样品的硒得率为 $35.65\% \pm 0.65\%$,与预测值的相对标准偏差为 2.0%,证明该模型可以达到优化提取的目的。

在最优条件下,选择 10 g 金花葵花朵样品进行提取试验,提取液使用旋转蒸发仪快速去除溶剂后经冷冻干燥机制成干样,所得提取物干粉共 3.71 g。经消解处理和 HG-AFS 检测,本次提取产物中总硒浓度为 15.68 ± 0.47 mg/kg。

2.3 含硒乙醇提取物抗氧化活性结果分析

2.3.1 DPPH 自由基清除率评价 由图 6 可得,样品在浓度为 0、0.01、0.05、0.1、0.5 mg/mL 时,DPPH 自由基的清除效率随样品的浓度增大也相应增大,当样品的浓度为 4 mg/mL 时,样品的自由基清除效率与 V_C 基本一致,约为 97%,此时认为样品中的 DPPH 自由基已经完全被提取液的硒还原性组分中和。通过改良寇式计算法可得提取物的 IC_{50} 为 0.048 mg/mL,此时溶液中硒元素含量为 $0.79 \mu\text{g/mL}$ 。刘剑^[1]提取金花葵中的富硒多糖,得到多糖的 DPPH 自由基的半抑制浓度约为 1.8 mg/mL,崔琦^[2]提取金花葵中的黄酮组分,得到 DPPH 自由基的

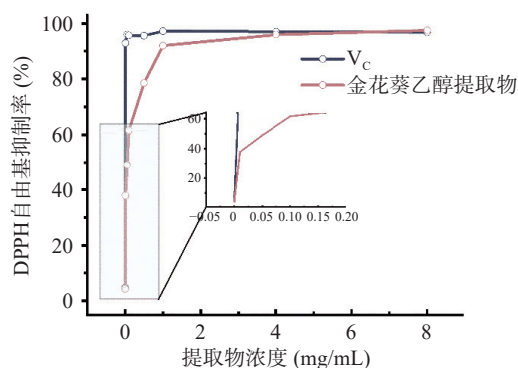


图 6 金花葵乙醇提取物的 DPPH 自由基抑制率

Fig.6 DPPH free radical inhibition rate of ethanol extract from *Hibiscus manihot* L.

IC_{50} 为 0.166 mg/mL。本研究中的 DPPH 自由基 IC_{50} 为 0.048 mg/mL, 说明提取物中含硒可以增强其抗氧化能力。

2.3.2 羟基自由基清除力评价 从图 7 中可以得出, 随着样品的质量浓度增大, 样品的羟基自由基清除效率也逐渐增大, 当提取物浓度达到 8 mg/mL 时样品的羟基自由基清除效率与 V_C 的清除效率基本一致, 为 97.0%, IC_{50} 为 0.56 mg/mL, 证明提取物有较强的羟基自由基清除能力。

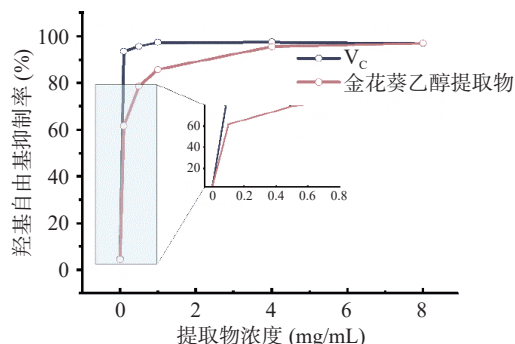


图 7 金花葵乙醇提取物的羟基自由基清除能力

Fig.7 Scavenging effects on $\cdot OH$ of ethanol extracts from *Hibiscus manihot* L.

2.3.3 还原力评价 金花葵乙醇提取物还原能力曲线如图 8 所示, 由图 8 可知, 金花葵乙醇提取物与 V_C 的还原能力均随着浓度的增大而增强, 显示出提取物较强的还原能力。

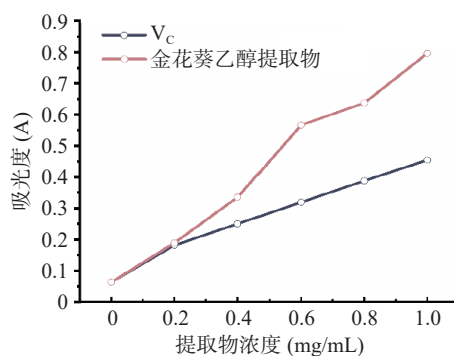


图 8 金花葵乙醇提取物的还原能力

Fig.8 Reduction ability of ethanol extracts from *Hibiscus manihot* L.

3 结论

本研究通过检测富硒金花葵硒含量, 发现金花葵具有较强的富硒能力, 硒主要集中于地上部分且叶片富硒能力最强, 硒含量高达 22 mg/kg, 是根和茎的 2 倍以上。富硒金花葵花朵中含硒活性成分的提取优化结果显示, 最佳提取条件为: 提取温度 40 $^{\circ}C$ 、固液比 1:60、提取时间 40 min、超声功率 350 W、乙醇浓度 50%, 提取 1 次, 在此条件下, 金花葵花朵的硒提取率为 $35.65\% \pm 0.65\%$ 。含硒提取物 DPPH 抗氧化活性测试和羟基自由基清除效率实验和还原力实验结果证明, 提取物有良好的抗氧化能力。本研究

结果可以为富硒金花葵提取含硒活性成分提供数据支持, 然而对硒在金花葵中的转运机制和含硒活性成分的组成及其药用价值仍需开展深入研究。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] 刘剑. 金花葵富硒及硒多糖的研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2018. [LIU J. Study on selenium rich and selenium polysaccharide of *Hibiscus Manihot* L.[D]. Xi'an: Shaanxi University of Science and Technology, 2018.]
- [2] 崔琦. 金花葵抗炎化学成分分离、结构鉴定及其绿色提取分离新工艺[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2020. [CUI Q. Isolation, structure identification and a new technology of green extraction and separation of the anti-inflammatory chemical constituents from *Hibiscus manihot* L. flower[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2020.]
- [3] WANG X F, ZHOU Q X. Ecotoxicological effects of cadmium on three ornamental plants[J]. *Chemosphere*, 2005, 60(1): 16-21.
- [4] CHEN S S, XU M L, ZHOU M, et al. *Hibiscus manihot* L. improves obesity in mice induced by a high-fat diet[J]. *Journal of Functional Foods*, 2022, 89.
- [5] SOLOVYEV N, PRAKASH N T, BHATIA P, et al. Selenium-rich mushrooms cultivation on a wheat straw substrate from seleniferous area in Punjab, India[J]. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2018, 50: 362-366.
- [6] SALLES M S V, SAMÓRA T S, LIBERA A M M P D, et al. Selenium and vitamin E supplementation ameliorates the oxidative stress of lactating cows[J]. *Livestock Science*, 2022, 255.
- [7] ZWOLAK I, ZAPOROWSKA H. Selenium interactions and toxicity: A review[J]. *Cell Biol Toxicol*, 2012, 28(1): 31-46.
- [8] 龙泽东. 硒在天然富硒区恩施与石台土壤-作物-人体系统中的分布特征和健康效应研究[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2020. [LONG Z D. A study on distribution characteristics and health effects of selenium in soil-crop-human system in the Se-rich area Enshi and Shitai, China[D]. Hefei: University of Science and Technology of China, 2020.]
- [9] CARRERA C, RUIZ-RODRIGUEZ A, PALMA M, et al. Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2012, 732: 100-104.
- [10] 方媛, 张碟, 蔡杰, 等. 硒蛋白的提取方法及生理功能研究进展[J]. *食品科技*, 2021, 46(12): 1-7. [FANG Y, ZHANG D, CAI J, et al. A review on the extraction approaches and physiological functions of selenoprotein[J]. *Food Science and Technology*, 2021, 46(12): 1-7.]
- [11] LIU J Z, ZHANG C C, FU Y J, et al. Comparative analysis of phytochemical profile, antioxidant and anti-inflammatory activity from *Hibiscus manihot* L. flower[J]. *Arab J Chem*, 2022, 15(1): 10.
- [12] 莫翠园, 盛丽, 刘若凡, 等. 虎奶菇多糖提取工艺优化、结构鉴定及抗氧化活性研究[J]. *食品科技*, 2022, 47(9): 156-163.
- [13] MO C Y, SHENG L, LIU R F, et al. Extraction process optimization, structure identification and antioxidant activity of pleurotus Tuber-Regium polysaccharide[J]. *Food Science and Technology*, 2022, 47(9): 156-163.]
- [13] 罗蓉, 蔡旭, 薛宏坤, 等. 响应面法优化超声辅助低共熔溶剂

- 提取山楂总黄酮工艺[J]. 食品工业科技, 2022, 43(22): 229-237.
- [13] LUO R, CAI X, XUE H K, et al. Optimization of ultrasonic-assisted deep eutectic solvent extraction of flavonoids from *Crataegus pinnatifida* using response surface methodology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(22): 229-237.]
- [14] LIU J Z, LYU H C, FU Y J, et al. Simultaneous extraction of natural organic acid and flavonoid antioxidants from *Hibiscus manihot* L. flower by tailor-made deep eutectic solvent[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 163.
- [15] DAS A K, ISLAM M N, FARUK M O, et al. Review on tannins: Extraction processes, applications and possibilities[J]. South African Journal of Botany, 2020, 135: 58-70.
- [16] GEUM N G, YU J H, YEO J H, et al. Immunostimulatory activity and anti-obesity activity of *Hibiscus manihot* leaves in mouse macrophages, RAW264.7 cells and mouse adipocytes, 3T3-L1 cells[J]. Journal of Functional Foods, 2021, 87.
- [17] ALARA O R, ABDURAHMAN N H, UKAEGBU C I. Extraction of phenolic compounds: A review[J]. Current Research in Food Science, 2021, 4: 200-214.
- [18] 夏光辉. 玉竹二氢高异黄酮分离与抗氧化活性研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2020. [XIA G H, Study on the separation and antioxidant activity of dihydrogenistein from polygonatum odoratum[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2020.]
- [19] 赖雨微, 张倩, 高俊鹏, 等. 响应面法优化松茸蛋白的提取工艺[J]. 中国调味品, 2022, 47(8): 90-95, 105. [LAI Y W, ZHANG Q, GAO J P, et al. Optimization of extraction process of *Tricholoma matsutake* protein by response surface methodology[J]. China Condiment, 2022, 47(8): 90-95, 105.]
- [20] MACIAS C E, GALLEGOS I J A, ROCHA G N E, et al. Antioxidant and anti-inflammatory polyphenols in ultrasound-assisted extracts from salvilla (*Buddleja scordioides* Kunth)[J]. Ultrason Sonochem, 2022, 83: 105917.
- [21] 唐沫岚, 鲍征宇, 范博伦, 等. 顺序提取分离-氢化物发生-原子荧光光谱法测定富硒土壤中5种形态硒的含量[J]. 理化检验(化学分册), 2018, 54(4): 408-412. [TANG M L, BAO Z Y, FAN B L, et al. HG-AFS speciation analysis for 5 species of selenium in Se-rich soil with separation by sequential extraction[J]. Physical Testing and Chemical Analysis Part B: Chemical Analysis, 2018, 54(4): 408-412.]
- [22] BAÑUELOS G S, FREEMAN J L, ARROYO I S. Selenium content and speciation differences in selenium enriched soups made from selenium biofortified plants[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2022, 105.
- [23] 贾玮, 周媛媛, 许牡丹, 等. 湿法消解-电感耦合等离子体发射光谱法检测富硒豆类中硒蛋白含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(19): 7520-7526. [JIA W, ZHOU Y Y, XU M D, et al. Determination of selenium protein in Se-riched beans by wet digestion-inductively coupled plasma optical emission spectrometry[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(19): 7520-7526.]
- [24] XIA G H, LI X H, ZHANG Z, et al. Effects of fermentation treatments on polygonatum odoratum flavones' antioxidant activities[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2021, 28(9): 5011-5016.
- [25] TENG C, QIN P Y, SHI Z X, et al. Structural characterization and antioxidant activity of alkali-extracted polysaccharides from quinoa[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 113: 106392.
- [26] QIAO Z, HAN L, LIU X S, et al. Extraction, radical scavenging activities, and chemical composition identification of flavonoids from sunflower (*Helianthus annuus* L.) receptacles[J]. Molecules, 2021, 26(2): 403.
- [27] 郑亚虹, 岳程程, 张慧, 等. 肺炎克雷伯菌肝脓肿小鼠模型的制备与评价[J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(11): 1701-1706. [ZHENG Y H, YUE C C, ZHANG H, et al. Construction and evaluation of *Klebsiella pneumoniae* liver abscess mouse model[J]. Acta University Medicinalis Anhui, 2021, 56(11): 1701-1706.]
- [28] 李哲. 外源硒在小白菜和小麦体内的分布及形态研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2017. [LI Z. Distribution and speciation of exogenous selenium in pakchoi and wheat[D]. Xianyang: Northwest Agriculture & Forestry University, 2017.]
- [29] KADERIDES K, PAPAOIKONOMOU L, SERAFIM M, et al. Microwave-assisted extraction of phenolics from pomegranate peels: Optimization, kinetics, and comparison with ultrasounds extraction[J]. Chemical Engineering and Processing-Process Intensification, 2019, 137: 1-11.
- [30] SUN X Y, YANG S, LIU C, et al. Study on the extraction and antioxidant activity of total flavonoids from Netted Melon with ultrasonic[J]. Advanced Materials Research, 2013, 807-809: 2003-2008.
- [31] 曹叶霞, 李慧卿, 尹爱萍, 等. 超声辅助提取罗望子中总多酚及其抗氧化性研究[J]. 粮食与油脂, 2023, 36(1): 131-134, 138. [CAO Y X, LI H Q, YIN A P, et al. Study on the ultrasonic assisted extraction of polyphenols from *Tamarindus indica* L. and their antioxidant activity[J]. Cereals & Oils, 2023, 36(1): 131-134, 138.]
- [32] WEN C T, HE X D, ZHANG J X, et al. A review on selenium-enriched proteins: Preparation, purification, identification, bioavailability, bioactivities and application[J]. Food & Function, 2022, 13(10): 5498-5514.