

# 槐米抗食用油脂氧化活性及其成分研究

黄海兰, 李俊, 徐波

(青岛大学师范学院, 山东 青岛 266071)

**摘要:** 用 1:2 的氯仿:甲醇超声提取槐米成分, 并用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇依次进行萃取, 利用 Schaal 烘箱法进行抗氧化实验, 同时与合成抗氧化剂 BHT 进行对照。结果显示正丁醇提取物(BF)具有最高的抗氧化活性, 其活性大于人工合成抗氧化剂 BHT。利用硅胶、RP-18 和 Sephadex LH-20 对其进行活性追踪分离, 得到两种纯的抗氧化成分。利用现代波谱技术对其化学结构进行了鉴定, 结果显示为槲皮素和芦丁。抗氧化活性大小顺序为槲皮素>芦丁>BF>BHT。含酚羟基化合物的抗氧化活性与其结构密切相关。活性大小主要取决于酚羟基的数目。

**关键词:** 槐米; 食用油脂; 抗氧化活性; 抗氧化成分

Study on Antioxidant Activity and Constituents of *Flos Sophorae Immaturus* in Edible Oil and Fat

HUANG Hai-lan, LI Jun, XU Bo

(Normal College, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

**Abstract:** *Flos Sophorae Immaturus* (FSI) was extracted with chloroform: methanol (1:2) in a ultrasonicator, and the extraction was then partitioned with petroleum ether, EtOAc and BuOH successively. Antioxidant activity (AA) of the extract was evaluated by using Schaal method and compared with that of BHT. The BF (*n*-butanol-soluble fraction) exhibited the highest AA, which was greater than that of BHT. Furthermore, bioactivity-guided chromatographic fractionation was conducted by repeated column chromatography with a silica gel, RP-18, and Sephadex LH-20 to obtain two kinds of pure antioxidant compounds. Their structures were determined by interpretation of the 1D and 2D NMR, as well as mass spectral data. The results demonstrated that quercetin and rutin were the major antioxidative constituents in FSI. The AA of the compounds decreased in the following order: quercetin>rutin>BF>BHT. The AA of phenolic compounds is closely correlated to their chemical structures. In general, the AA of phenolics depends mainly on the number of hydrogen-donating hydroxyl groups on the aromatic ring of the

收稿日期: 2007-06-22

作者简介: 黄海兰(1963-), 女, 教授, 硕士, 主要从事天然产物化学研究。

IMF 食品水分活度的作用。

对 GAB 公式的回归结果检验分析可以看出在水分活度取值范围超过 0.9 时, 回归结果并不十分理想,  $R^2$  都小于 0.9,  $P$  都大于 10%; 另外, 从测量与回归图来看, 误差最大的部分都集中于水分活度 > 0.9 以上的区域。我们将水分活度取值范围缩小到 0.9 以下时, 回归效果明显改善, 说明 GAB 公式的有效范围应在 0~0.9。

参考文献:

- [1] JAMES M, FLINK. Intermediate moisture food products in the American marketplace[J]. Food Process Preserv, 1977 (1): 324-339.
- [2] SLOAN A E, WALETZKO P T, LABUZA T P. Prediction of water activity lowering ability of food humectants at high  $A_w$ [J]. Journal of Food Science, 1976, 41: 532-535.
- [3] 达式奎. 食品工程测试[M]. 上海: 上海交通大学出版社, 1987.
- [4] LABUZA T P. Moisture sorption: practical aspects of isotherm measurement and use[M]. St. Paul: American Association of Cereal Chemists, 1984.
- [5] GREENSPAN L. Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions[J]. Journal of Research of the National Bureau of Standards-A. Physics and Chemistry, 1977, 81 (1).
- [6] 何清波, 苏炳华, 钱亢. 医学统计学及其软件包[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2002.
- [7] 夏宝岚, 张慕蓉, 夏耘. C程序设计[M]. 2版. 上海: 华东理工大学出版社, 2003.
- [8] LABUZA T P, KANANE A, CHEN J Y. Effect of temperature on the moisture sorption isotherms and water activity shift of two dehydrated foods[J]. Journal of Food Science, 1985, 50: 385-391.
- [9] 文友先. 稻谷吸附等温线模型及计算机模拟[D]. 武汉: 华中农业大学, 1999.

phenolic molecules.

**Key words** *Flos Sophorae Immaturus* edible oil and fat; antioxidant activity; antioxidative constituent

中图分类号: R151.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)08-0086-04

随着生活水平的提高,人们对天然健康食品的需求越来越高,研究开发广谱、高效、安全的天然抗氧化剂,成为当今食品添加剂研究领域的热点之一<sup>[1-4]</sup>。

食用油脂是人类膳食的重要组成部分,但食用油脂长期贮存会发生自动氧化,不仅引起风味变化、营养价值下降,而且产生有害物质。添加抗氧化剂可以防止和减缓油脂的自动氧化,增强稳定性,保持油脂原有的色、香、味,避免营养成分损失,延长货架寿命。我国中草药资源丰富,许多中草药富含抗氧化成分。在食用油脂中添加天然的中草药抗氧化剂,不仅可以减缓油脂本身的氧化过程,提高油脂营养价值,而且使食用油脂具有保健功能。因此,从中草药中筛选抗氧化剂,添加到食用油脂中,研究和分析对其油脂的抗氧化作用,成为一个有重要意义的研究课题,将对保健性功能食用油脂的研发具有一定的参考价值。

槐米(*Flos Sophorae Immaturus*),为豆科植物槐(*Sophora japonica* L.)的花蕾。凉血止血,清肝泻火。用于便血、痔血、血痢、崩漏、吐血、衄血、肝热目赤、头痛眩晕。近年来有关槐米在临床和药理方面有诸多报道,其化学成分已有报道,主含三萜皂苷、槲皮素、芸香苷、异鼠李素等黄酮类化合物,另含鞣质。郭亚力等<sup>[5]</sup>曾利用电子顺磁共振法、DPPH法及邻二氮菲- $\text{Fe}^{2+}$ 法,研究了槐米提取物的抗自由基作用,结论是槐米提取物对自由基的清除率可以达到40%~70%。有可能作为一种良好的新型抗自由基食品添加剂使用。本实验利用Schaal烘箱法,详细研究槐米提取物对花生油和猪油的抗氧化作用,并利用硅胶、RP-18和Sephadex LH-20对槐米提取物进行活性追踪分离,利用现代波谱技术对抗氧化成分进行结构鉴定,并对其抗氧化机理进行探讨。目前尚未见槐米对食用油脂抗氧化活性及其成分的研究报道。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

槐米于2006年3月购于青岛宏仁堂大药房。40℃烘干,粉碎并过40目筛;花生油购于青岛超市;猪油为市售新鲜板油,熬制过滤冷藏备用。

柱层析硅胶(100~200目、200~300目) 青岛化学试剂厂; GF254硅胶板(厚度: 0.2~0.25mm) 青岛海洋化工分厂; RP-18(40~75 $\mu\text{m}$ ) Fuji Silysia化学有限公司; Sephadex LH-20(18~110 $\mu\text{m}$ ) Pharmacia公司; 芦丁 上海国药集团化学试剂有限公司; 所用化学试剂均

为国产分析纯试剂; 所用水为二次蒸馏水。

Bruker Avance 500MHz FT-NMR核磁共振光谱仪, 共振频率为500MHz( $^1\text{H}$ )、125MHz( $^{13}\text{C}$ ); VG Autospet-3000 质谱仪; RE-52A型旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; ZF-2型三用紫外仪 上海市安亭电子仪器厂; 752型分光光度计 上海分析仪器总厂; Nicolet AVATAR 360 FT-IR红外分光光度计; 电热恒温鼓风干燥箱 上海精宏实验设备有限公司; KS-250D超声波清洗仪 宁波科生仪器厂。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 抗氧化成分的提取分离

称取干燥槐米粉末1kg,室温下用1:2的氯仿:甲醇,超声提取,过滤,滤渣同上重复提取两次,合并滤液,减压旋转蒸发溶剂。得粗提物(MCE)。

将所得粗提物分散于水中,依次用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取,每种溶剂萃取三次。合并萃取液,置于圆底烧瓶中,旋转蒸发去除溶剂,分别得石油醚萃取物(PEF)、乙酸乙酯萃取物(EAF)、正丁醇萃取物(BF)。

采用活性追踪分离法,将活性最强萃取物进行硅胶柱层析分离(200~300目),用V(氯仿):V(甲醇)=99:1~0:100进行梯度洗脱,洗脱液进行薄层层析(TLC)检测,合并相同组分溶液。旋转蒸发去除溶剂。将活性最强组分利用硅胶,RP-18和Sephadex LH-20进行反复柱层析分离以及制备TLC分离,最终得到纯的强活性化合物。

#### 1.2.2 抗氧化活性测定

Schaal烘箱法稍加修改:将一定量的提取物及BHT加入到50g油样中,分别配制成抗氧化剂浓度为0.02%的被测样,混合均匀。敞口置于恒温干燥箱中强化保存,每隔一定时间测定过氧化值,检测油脂的品质变化。称取2.00~3.00g混匀的样品,置于250ml碘量瓶中,加入30ml三氯甲烷-冰醋酸混合液,使样品完全溶解,加入1.00ml饱和碘化钾溶液,紧密塞好瓶盖,并轻轻振摇0.5min,然后在暗处放置3min。取出加100ml水,摇匀,立即用0.002mol/L硫代硫酸钠标准溶液滴定,至淡黄色时,加1ml淀粉指示剂,继续滴定至蓝色消失为终点,取相同量三氯甲烷-冰醋酸溶液、碘化钾溶液、水、按同一方法,做试剂空白实验。所有测定均平行进行三次,按下式计算过氧化值<sup>[6]</sup>。取其平均值。

$$\text{POV} = [(V_2 - V_1) \times C] \times 1000/m$$

式中, POV 为样品的过氧化值, meq/kg;  $V_2$  为样品消耗硫代硫酸钠标准溶液体积, ml;  $V_1$  为试剂空白消耗硫代硫酸钠标准溶液体积, ml;  $C$  为硫代硫酸钠标准溶液的浓度, mol/L;  $m$  为样品质量, g。

### 1.2.3 抗氧化成分的鉴定

利用 1D、2DNMR、ESI-MS、紫外和红外分光光度计鉴定抗氧化成分的结构。 $^1\text{H}$ NMR 测定, 共振频率 500MHz;  $^{13}\text{C}$ NMR 测定, 共振频率 125MHz, 溶剂  $\text{CD}_3\text{OD}$ 。ESI-MS 主要鉴定其分子离子峰。

## 2 结果与分析

### 2.1 槐米各提取物的抗氧化活性

#### 2.1.1 对花生油的氧化抑制作用

烘箱加温法是加速油脂氧化进程的实验。最大优点是设备简单, 和实际情况比较接近。在这种方法中, 油脂的品质在 1d 内的变化和在常温货架条件下 1 个月的变化情况相差无几, 所以烘箱加温法是广泛使用的油脂抗氧化实验。在本研究中, 分别对添加槐米各提取物的油样进行实验, 同时与添加合成抗氧化剂 BHT 的油样进行比较, POV 越低, 表明添加物的抗氧化作用越强。对于不同的油脂, 国家标准都规定了其 POV 的范围, 花生油 POV 必须小于 20meq/kg, 猪油 POV 则必须小于 16meq/kg。实验以空白油样的 POV 超过规定的数值时为实验的终点。添加了槐米各提取物的花生油 POV 在贮藏过程中的变化情况见图 1。

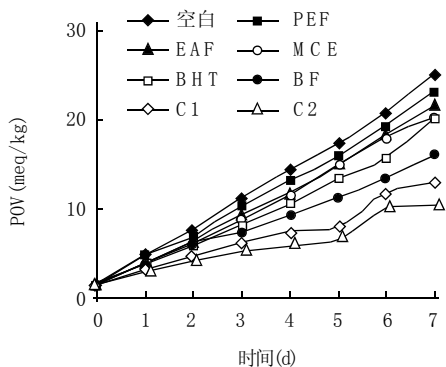


图1 添加槐米各提取物的花生油 POV 变化情况  
Fig.1 Changes of POV of peanut oil added of extracts from FSI

由图 1 可以看出, 槐米的氯仿-甲醇粗提物(MCE)对花生油氧化有较好的抑制作用。空白的花生油在 60℃ 促氧化条件下, 经过 6d 的时间, POV 达到 20.67meq/kg, 已经超过了所规定的数值; 而添加槐米 MCE 的花生油的 POV 为 17.98meq/kg。比空白油样的 POV 低。在

槐米的石油醚萃取物(PEF)、乙酸乙酯萃取物(EAF)、正丁醇萃取物(BF)中, BF 对花生油表现出最强的抗氧化作用(6d 的 POV 为 13.38meq/kg), 其活性大于人工合成抗氧化剂 BHT(6d 的 POV 为 15.57meq/kg)。各相活性大小顺序依次为 BF > BHT > MCE > EAF > PEF。说明槐米中的极性的组分抗氧化能力较强。

为进一步得到槐米的抗氧化成分, 采用活性追踪分离法, 利用硅胶、RP-18 和 Sephadex LH-20, 将 EAF 反复进行活性测定—筛选—柱层析分离以及制备 TLC 分离, 最终得到强活性的纯化合物 C1 和 C2。图 1 也显示了添加了纯化合物 C1 和 C2 花生油的 POV 在贮藏过程中变化情况。可以看出, 两种化合物对花生油均具有明显较强的抗氧化作用。恒温 6d 的 POV 依次仅为 11.69、9.89meq/kg, 均比 BF 和合成抗氧化剂 BHT 的 POV 低。活性大小顺序为化合物 2 > 化合物 1。

#### 2.1.2 对猪油的氧化抑制作用

添加了槐米各提取物的猪油 POV 在贮藏过程中变化情况见图 2 所示。

从图 2 可知, 空白的猪油在 80℃ 促氧化条件下, 经过 5d 的时间, POV 达到 16.12meq/kg。已经超过了所规定的数值。对比之下, 添加了槐米各提取物的猪油经过 5d 的时间, POV 都没有超标。添加槐米粗提物的猪油的 5d 的 POV 为 10.65meq/kg, 比空白油样的 POV 低得多。萃取物中, 除了 PEF 相外, 其它对花生油氧化均具有一定的抑制作用。同样还是 BF 抗氧化活性最强(5d 的 POV 为 7.22meq/kg), 其活性大于粗提物和合成抗氧化剂 BHT(5d 的 POV 为 7.78meq/kg)。各相活性大小与在花生油中有着同样顺序, 依次为 BF > BHT > MCE > EAF。

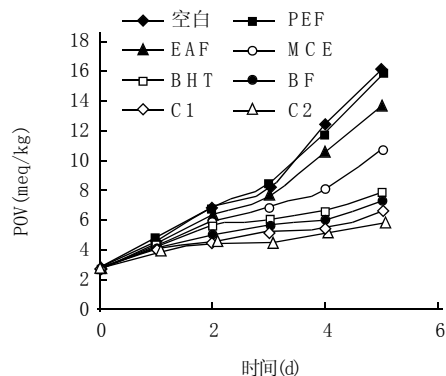


图2 添加槐米各提取物的猪油 POV 变化情况  
Fig.2 Changes of POV of lard added extracts from FSI

从图 2 还可以看出, 两种化合物 C1 和 C2 对猪油同样均具有明显较强的抗氧化作用。恒温 5d 的 POV 依次仅为 6.56meq/kg 和 5.78meq/kg, 均比 BF 和合成抗氧化剂 BHT 的 POV 低。活性大小顺序同样为化合物 2 > 化合物 1。

合物 1。

以上实验结果证明,对于实验中所选用的油样,两种化合物 C1 和 C2 的抗氧化作用非常明显,说明化合物 C1 和 C2 为槐米中的主要抗氧化成分。

## 2.2 抗氧化成分的结构鉴定

化合物 C1: 黄色无定性粉末(甲醇),熔点为 179℃。采用与标准品对照法,该化合物的紫外、红外和 TLC 的  $R_f$  值与标准品基本一致,故鉴定化合物 C1 为芦丁。

化合物 C2: ESI-MS ( $m/z$ ): 准分子离子峰 325 [ $M+Na$ ] $^+$ , 表明分子量为 302。该化合物氢谱和碳谱数据与文献[7]中的槲皮素数据基本一致,故鉴定化合物 C2 为槲皮素。

化合物 C1 和 C2 的化学结构如图 3 所示。

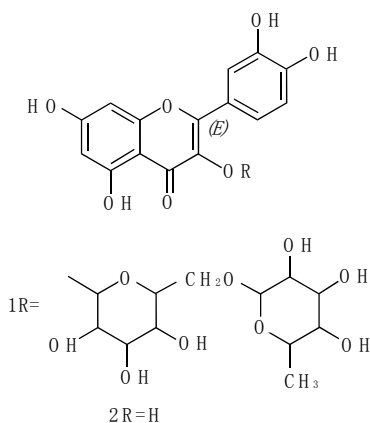


图3 化合物 C1 和 C2 的化学结构

Fig.3 Chemical structures of compounds 1-2

## 2.3 抗氧化机理探讨

油脂的氧化历程主要是自由基的连锁反应,包含如下三个阶段(以 RH 表示油脂):

引发反应:  $RH + O_2 \rightarrow ROOH$

$ROOH \rightarrow ROO \cdot + H \cdot$

$ROOH \rightarrow RO \cdot + \cdot OH$

$RH + \cdot OH \rightarrow R \cdot + H_2O$

自由基传递:  $R \cdot + O_2 \rightarrow ROO \cdot$

$ROO \cdot + R' H \rightarrow ROOH + R' \cdot$

终止反应:  $ROO \cdot + R' OO \cdot \rightarrow ROOR' + O_2$

$RO \cdot + R' \cdot \rightarrow ROR'$

$ROO \cdot + R' \cdot \rightarrow ROOR'$

式中,  $R \cdot$  为油脂自由基;  $ROO \cdot$  为过氧化自由基;  $ROOH$  为氢过氧化物。

由 2.2 得知,槐米的主要抗氧化成分为槲皮素和芦丁。这两种化合物均为含酚羟基化合物,易失去  $H \cdot$ , 将  $H \cdot$  提供给  $ROO \cdot$  或  $R \cdot$  生成相对稳定的自由基  $A \cdot$ , 即:  $ROO \cdot + AH \rightarrow ROOH + A \cdot$ ;  $R \cdot + AH$

$\rightarrow RH + A \cdot$ , 从而延长了脂肪氧化的诱导期,终止了油脂氧化链式反应的传播,起到了油脂抗氧化剂的作用。

含酚羟基化合物的抗氧化活性与其结构密切相关。活性大小主要取决于酚羟基的数目和位置[8]。槲皮素的抗氧化性明显优于 BHT。从结构上(图 3)看,槲皮素的结构中存在五个酚羟基,提供氢后形成的自由基具有共振半醌式结构,这种共振半醌式结构除了能使电子自旋密度分布比较均匀外,还可同时形成大的共轭  $\pi$  键,进一步降低了自由基结构中的电子云密度,稳定性强。BHT 只有一个酚羟基,与脂类化合物自由基反应后生成的自由基上的未成对电子可以在苯环上离域分布,此自由基结构比较稳定,但是与槲皮素在消除脂类化合物的自由基后形成的自由基相比,由于不形成大的共轭  $\pi$  键效应,也不能形成分子内氢键,所以 BHT 所形成的自由基结构没有槲皮素自由基结构稳定。此外,芦丁的抗氧化活性低于槲皮素,可能由于空间位阻效应,使得芦丁所形成的自由基结构没有槲皮素自由基结构稳定。

## 3 结 论

槐米的正丁醇萃取物(BF)对食用油脂表现出最强的抗氧化作用,其活性大于人工合成抗氧化剂 BHT。活性追踪分离及结构鉴定结果表明:槐米对食用油脂的主要抗氧化成分为槲皮素和芦丁。抗氧化活性大小顺序为槲皮素 > 芦丁 > BF > BHT。含酚羟基化合物的抗氧化活性与其结构密切相关。活性大小主要取决于酚羟基的数目。

槐米作为传统的药食两用植物,价廉、无毒,分布及应用相当广泛。其抗氧化成分对食用油脂具有较强的抗氧化作用。可作为一种具有保健功能的新型食用油脂和含脂食品添加剂使用,具有广泛的应用前景。

## 参考文献:

- [1] 凌关庭. 食品抗氧化剂及其进展(三)[J]. 粮食与油脂, 2000(8): 45-48.
- [2] HUANG H L, WANG B G. Antioxidant capacity and lipophilic content of seaweeds collected from the Qingdao coastline[J]. J Agric Food Chem, 2004, 52(16): 4993-4997.
- [3] 黄海兰, 徐波, 李增新, 等. 崂山蘑菇抗氧化成分提取及其活性研究[J]. 食品科学, 2005, 26(9): 61-66.
- [4] 黄海兰, 徐波, 段春生. 金钱草抗食用油脂氧化活性及其成分研究[J]. 中国油脂, 2006, 30(12): 32-35.
- [5] 郭亚力, 李聪, 欧灵澄, 等. 槐米中天然抗氧化剂的提取及其抗自由基性能研究[J]. 食品科学, 2004, 25(7): 154-157.
- [6] GB/T5009.37-2003 食用植物油卫生标准的分析方法[S].
- [7] 于德泉, 杨俊山. 分析化学手册: 第七分册[M]. 2版. 北京: 化学工业出版社, 1999: 901.
- [8] CAI Y, LUO Q, SUN M, et al. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer[J]. LifeSci, 2004, 74: 2157-2184.