

# 米口袋抗食用油脂氧化活性及其成分研究

黄海兰, 徐 波  
(青岛大学师范学院 山东 青岛 266071)

**摘 要:** 用 1:2 的氯仿: 甲醇超声提取米口袋成分, 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。结果显示乙酸乙酯提取物(EAF) 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 3 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-3-O-葡萄糖甙、芹菜素和 4', 7-二羟基黄酮。抗氧化活性大小顺序为槲皮素-3-O-葡萄糖甙 > 芹菜素 > 4', 7-二羟基黄酮 > EAF > 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:** 米口袋; 食用油脂; 抗氧化活性; 抗氧化成分

Study on Anti oxidant Acti vi ti y and Pri nci pal s of *Guel denstaedtia mul ti flora Bge* in Edi ble Oi l and Fat

HUANG Hai-lan, XU Bo  
(Normal Col lege, Qi ngdao Uni versi ty, Qi ngdao 266071, Chi na)

**Abstract:** *Guel denstaedtia mul ti flora Bge* (GMB) 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 extractions was evaluated by using Schaal method, and compared with that of BHT. The EAF (ethyl acetate-soluble fraction) exhibited the highest AA, which was greater than that of BHT. Furthermore, bioactivity-guided chromatographic fractionation was conducted by repeated column chromatography over a silica gel, RP-18, and Sephadex LH-20 to obtain three pure antioxidant compounds. Their structures were determined by interpretation of the 1D and 2D NMR, as well as mass spectral data. The result demonstrated that quercetin 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside, apigenin and 4', 7-dihydroxyflavone were the major antioxidative constituents in GMB. The AA of the compounds decreased in the following order: quercetin 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside > apigenin > 4', 7-dihydroxyflavone > EAF > BHT. The AA of phenolic compounds is 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 phenolic molecules.

**Key words:** *Guel denstaedtia mul ti flora Bge*; 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(2006)11-0093-04

食用油脂和含脂食品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。目前, 油脂在生产中使用的抗氧化剂多为人工合成的化合物, 如二叔丁基羟基甲苯(BHT)、叔丁基羟基茴香醚(BHA)等。但有研究表明这类化合物有一定的危害性, 甚至可以致癌, 许多国家已禁止使用或限量使用这些抗氧化剂。因此, 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>。

按照中医“药食同源”的原则, 从膳食中摄取抗氧化剂, 是预防疾病的最佳的方法, 而通过食用油脂补充抗氧化剂就是一条理想的途径。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

收稿日期: 2006-08-09

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

研发具有一定的参考价值。

米口袋为豆科 *Leguminosae* 米口袋属 *Gueldenstaedtia Fisch*, 学名 *Gueldenstaedtia multiflora Bge.*。民间作为中药地丁应用。有清热解毒、凉血消肿的功能, 用于化脓性炎症、疮痈肿毒、高热烦躁、黄疸、肠炎、痢疾等症。近年来有关米口袋在临床和药理方面有诸多报道, 其化学成分已有报道, 含有酚性成分、黄酮类、甙类、甾醇等成分<sup>[5, 6]</sup>。但目前对其抗氧化性能及抗氧化成分研究尚未见报道。本文利用 Schaal 烘箱法, 详细研究米口袋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 对米口袋提取物进行活性追踪分离, 利用 1D、2DNMR 和 ESI-MS 对抗氧化成分进行结构鉴定, 并对其抗氧化机理进行探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和仪器

材料: 米口袋 青岛宏仁堂大药房。40 烘干, 粉碎并过 40 目筛。花生油 青岛超市; 猪油 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 $\mu$ m) Fuji Silysia 化学有限公司; Sephadex LH-20(18~110 $\mu$ m) Pharmacia 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。

仪器: Bruker Avance 500MHz FT-NMR 核磁共振光谱仪, 共振频率: 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 型紫外仪 上海市安亭电子仪器厂; 722 型可见光栅分光光度计 上海分析仪器总厂; 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

称取干燥米口袋粉末 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(TCL) 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>[7]</sup>。取其平均值。

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

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

#### 1.2.3 抗氧化成分的鉴定

利用 1D、2DNMR 和 ESI-MS 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 米口袋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, 分别对添加米口袋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。添加了米口袋各提取物的花生油 POV 在贮藏过程中的变化情况见图 1。

图 1 可以看出, 米口袋的氯仿-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 22.11meq/kg,

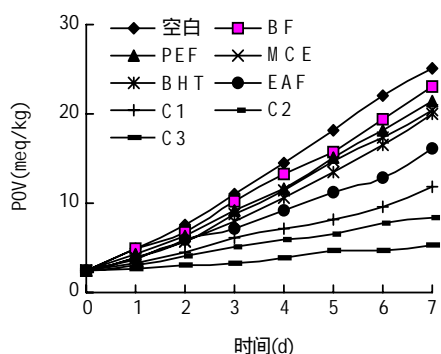


图1 添加米口袋各提取物的花生油 POV 变化情况

Fig.1 Changes of the POV of peanut oil with addition of extracts from GMB

已经超过了所规定的数值；而添加米口袋 MCE 的花生油的 POV 为 17.25meq/kg。比空白油样的 POV 低。在米口袋的石油醚萃取物(PEF)、乙酸乙酯萃取物(EAF)、正丁醇萃取物(BF)中，EAF 对花生油表现出最强的抗氧化作用(6d 的 POV 为 12.83meq/kg)，其活性大于人工合成抗氧化剂 BHT(6d 的 POV 为 16.50meq/kg)。各相活性大小顺序依次为 EAF > BHT > MCE > PEF > BF。说明米口袋中的中等极性的组分抗氧化能力较强。

为进一步得到米口袋的抗氧化成分，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、C2 和 C3。图 1 也显示了添加了纯化合物 C1、C2 和 C3 的花生油的 POV 在贮藏过程中变化情况。可以看出，三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 依次为 9.69、7.74 和 4.74meq/kg，均比 EAF 和合成抗氧化剂 BHT 的 POV 低得多。活性大小顺序为化合物 3 > 化合物 2 > 化合物 1。

### 2.1.2 对猪油的氧化抑制作用

添加了米口袋各提取物的猪油 POV 在贮藏过程中变化情况见图 2 所示。

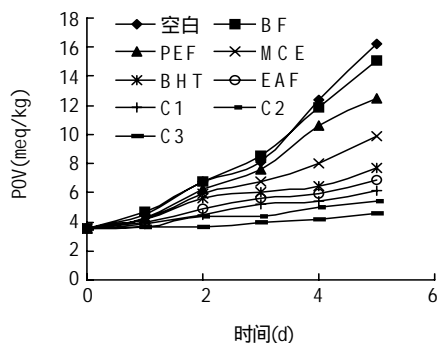


图2 添加米口袋各提取物的猪油 POV 变化情况

Fig.2 Changes of the POV of lard with addition of extracts from GMB

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 16.20meq/kg。已经超过了所规定的数值。对比之下，添加了米口袋各提取物的猪油经过 5d 的时间，POV 都没有超标。添加米口袋粗提物的猪油的 5d 的 POV 为 9.85meq/kg，比空白油样的 POV 低得多。萃取物中，除了 BF 相外，其它对花生油氧化均具有一定的抑制作用。同样还是 EAF 抗氧化活性最强(5d 的 POV 为 6.82meq/kg)，其活性大于粗提物和合成抗氧化剂 BHT(5d 的 POV 为 7.70meq/kg)。各相活性大小与在花生油中有着同样顺序，依次为 EAF > BHT > MCE > PEF。

从图 2 还可以看出，三种化合物 C1、C2 和 C3 对猪油同样均具有明显较强的抗氧化作用。恒温 5d 的 POV 依次为 6.12、5.42 和 4.62meq/kg，均比 EAF 和合成抗氧化剂 BHT 的 POV 低。活性大小顺序同样为化合物 3 > 化合物 2 > 化合物 1。

以上实验结果证明，对于实验中所选用的油样，三种化合物 C1、C2 和 C3 的抗氧化作用非常明显，说明化合物 C1、C2 和 C3 为米口袋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：ESI-MS(m/z)：准分子离子峰 277 [M+Na]<sup>+</sup> 和 293 [M+K]<sup>+</sup>，表明分子量为 254。该化合物氢谱和碳谱数据与文献[6]中的 4',7-二羟基黄酮数据基本一致，故鉴定化合物 C1 为 4',7-二羟基黄酮。

化合物 C2：ESI-MS(m/z)：准分子离子峰 293 [M+Na]<sup>+</sup>，表明分子量为 270。该化合物氢谱和碳谱数据与文献[6]中的芹菜素数据基本一致，故鉴定化合物 C2 为芹菜素。

化合物 C3：ESI-MS(m/z)：准分子离子峰 487 [M+Na]<sup>+</sup>，主要碎片峰 302[M-glucopyranoside]<sup>+</sup> 和 274[M-glucopyranoside-CO]<sup>+</sup>，表明分子量为 464。该化合物氢谱和碳谱数据与文献[8]中的槲皮素-3-o-葡萄糖甙数据基本一致，故鉴定化合物 C3 为槲皮素-3-o-葡萄糖甙。

化合物 C1、C2 和 C3 的化学结构如图 3 所示。

### 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 3 个阶段(以 RH 表示油脂)：

引发反应： $RH + O_2 \rightarrow R\cdot + HO_2\cdot$

$R\cdot + O_2 \rightarrow ROO\cdot$

$ROO\cdot + RH \rightarrow ROOH + R\cdot$

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

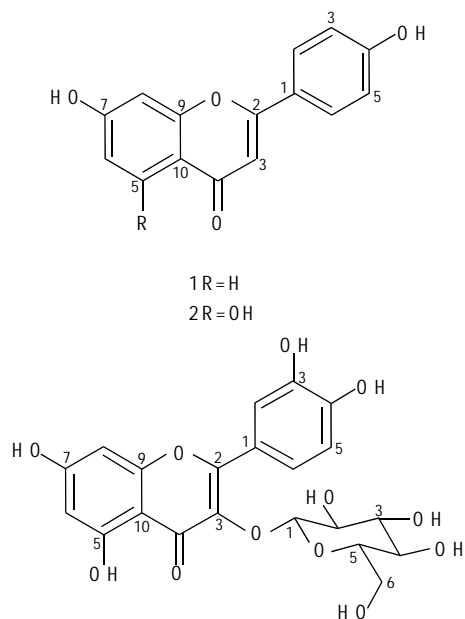
自由基传递： $R\cdot + O_2 \rightarrow ROO\cdot$

$ROO\cdot + RH \rightarrow ROOH + R\cdot$

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

$R\cdot + R\cdot \rightarrow ROR$

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

图1 化合物 C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub> 和 C<sub>3</sub> 的化学结构Fig.1 The chemical structures of compounds C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>

R· 为油脂自由基；R O O· 为过氧化自由基；R O O H 为氢过氧化物。

由 2.2 得知，米口袋的主要抗氧化成分为槲皮素-3-o-葡萄糖甙、芹菜素和 4', 7- 二羟基黄酮。这三种化合物均为含酚羟基化合物，易失去 H·，即将 H· 提供给 R O O· 或 R· 生成相对稳定的自由基 A·，即： $R O O· + A H \rightarrow R O O H + A·$ ； $R· + A H \rightarrow R H + A·$  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<sup>[9]</sup>。槲皮素-3-o-葡萄糖甙的抗氧化性明显优于芹菜素和 4', 7- 二羟基黄酮和 BHT。从结构上(图 3)看，槲皮素-3-o-葡萄糖甙的结构中存在 4 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-3-o-葡萄糖甙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-3-o-葡萄糖甙自由基结构稳定。此外，芹菜素的结构中存在 3 个酚羟基，而 4', 7- 二羟基黄酮的结构中存在 2 个酚羟基，所以抗氧化性前者大于后者，且均低于槲皮素-3-o-葡萄糖甙。

### 3 结 论

米口袋的乙酸乙酯萃取物(EAF)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：米口袋对食用油脂的主要抗氧化成分为槲皮素-3-o-葡萄糖甙、芹菜素和 4', 7- 二羟基黄酮。上述三个化合物的抗氧化活性大小顺序为槲皮素-3-o-葡萄糖甙 > 芹菜素 > 4', 7- 二羟基黄酮 > EAF > 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。

米口袋作为传统的中草药，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很强的抗氧化作用，不仅可以减缓油脂氧化变质，提高油脂营养价值，而且使食用油脂具有保健功能。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 Qi ngdao 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, 赵祖亮, 王斌贵. 磷钼络合物法与 -胡萝卜素-亚油酸法测定海藻脂类成分抗氧化活性的比较[J]. 中国油脂, 2005, 30(3): 32-35.
- [5] 朱蓉, 朱大元, 徐任生. 地丁化学成分的研究[J]. 中草药, 1984, 15(8): 1-3.
- [6] 王军宪, 朱蓉. 米口袋的化学成分研究[J]. 西北植物学报, 1989, 9(2): 127-130.
- [7] GB/T5009.37-2003, 食用植物油卫生标准的分析方法[S].
- [8] Wang Y B, Zhao J F, Li G P, et al. Studies on the chemical constituents of Knoxia corymbosa[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2004, 39: 439-441.
- [9] Cai Y, Luo Q, Sun M, et al. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer[J]. Life Sci, 2004, 74: 2157-2184.