

连翘叶中连翘苷和连翘酯苷A对食用油脂的抗氧化活性

邱智军^{1,2}, 原江锋¹, 张国庆², 刘胜男²

(1.河南科技大学食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471023; 2.三门峡出入境检验检疫局, 河南 三门峡 472000)

摘要:针对连翘叶中提取、分离和纯化的连翘苷和连翘酯苷A进行研究,通过油脂抗氧化实验,分别以油脂的酸价值和过氧化值为参考指标,评价连翘苷和连翘酯苷A的抗氧化活性和VC、柠檬酸对连翘苷和连翘酯苷A的协同增效作用。结果表明:制备得到纯度为93%连翘苷和92%连翘酯苷A,连翘苷和连翘酯苷A对猪油氧化作用均有一定的抑制作用,且随着剂量的增加,抑制效果越明显;其中,连翘酯苷A对油脂氧化的抑制作用远优于连翘苷,效果与阳性对照2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚接近;VC和柠檬酸对连翘苷和连翘酯苷A的抗氧化作用均表现出协调增效作用。

关键词:连翘苷;连翘酯苷A;食用油脂;抗氧化

Antioxidant Activity of Forsythin and Forsythiaside A from *Forsythia suspensa* Leaves on Edible Oils

QIU Zhijun^{1,2}, YUAN Jiangfeng¹, ZHANG Guoqing², LIU Shengnan²

(1. College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, China;

2. Sanmenxia Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Sanmenxia 472000, China)

Abstract: This study was focused on the antioxidant activity of forsythin and forsythiaside A isolated and purified from leaves of *Forsythia suspensa*, and the synergistic effect of the two compounds with vitamin C and citric acid as evaluated by acid value and peroxide value (POV) of lard. The results showed that forsythin with purity of 93% and forsythiaside A with purity of 92% were obtained and that both of these compounds had concentration-dependent inhibitory effects on lipid oxidation in lard. The inhibitory effect of forsythiaside A was close to that of the positive control 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT) but the inhibitory effect of forsythin on lipid oxidation was far weaker than that of forsythiaside A. Both vitamin C and citric acid exhibited remarkable synergistic antioxidant activity with forsythin and forsythiaside A.

Key words: forsythin; forsythiaside A; edible oil; antioxidant activity

中图分类号: TS201.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2015)17-0039-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201517008

油脂是人体必需的三大营养素之一,油脂以及含油丰富的食品在不适宜的贮藏条件下储存时间过长或使用不当,很容易发生酸败^[1],导致人体必需脂肪酸和脂溶性维生素的破坏,营养价值降低^[2],其本质是不饱和脂肪酸与氧之间发生的典型的自由基连锁反应^[3-5]。抗氧化剂能够防止或延缓食品成分发生氧化变质。合成抗氧化剂,如丁基羟基茴香醚、2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(butylated hydroxytoluene, BHT)、没食子酸丙酯、特丁基对苯二酚等,耐热性较差,熔点及沸点都较低,经过加热特别是在油炸等较高温度下很容易分解或挥发,另外其还具有一定的毒性,甚至对人体有致畸、致癌作用^[6-7]。因此,开发利用天然抗氧化剂已成为当今食品科学的发展趋势^[8-13]。连翘是一种具有很高利用价值的药食两用植

物,其提取物具有抗氧化、抑菌消炎、抑制病毒等活性作用^[14-19]。研究表明^[20],连翘叶提取物有明显的抗氧化作用,连翘苷和连翘酯苷A是其中两种主要的高效抗氧化功能组分。与连翘果实相比,连翘叶中连翘苷含量高于连翘果实约10倍以上,连翘酯苷A含量高于连翘果实5~10倍^[21]。连翘作为一种天然食品防腐剂,其具有价格低廉,对食品风味影响小等特点,极具开发价值^[15]。本实验将对连翘苷和连翘酯苷A在食用油脂中的抗氧化活性进行研究,以期为以后的应用开发提供一定的理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

连翘叶:2013年7月采自河南豫西伏牛山地区连翘种

收稿日期:2014-11-22

基金项目:国家自然科学基金河南人才培养联合基金项目(U1404307);洛阳市科技攻关项目(1401076A)

作者简介:邱智军(1978—),男,副教授,博士,主要从事活性成分的分析 and 预测研究。E-mail: qiuwj2003@163.com

植基地, 经河南科技大学农学院侯小改教授鉴定为木犀科植物连翘 (*Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl) 的干燥叶。

油脂: 新鲜猪油为市售板油; 连翘酯苷A (批号: 111810-201405, 纯度>91.4%)、连翘苷 (批号: 110821-201213, 纯度>95.3%) 中国食品药品检定研究所; BHT (食品级) 上海凯茵化工有限公司。

1.2 仪器与设备

1260高效液相色谱仪 美国安捷伦公司; BS 124S型万分之一天平、PB-310S型分析天平 赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司; 101-2型电热鼓风干燥箱 上海实验仪器厂; 恒温水浴锅 常州国华电器有限公司; 723型紫外分光光度计 上海第三分析仪器厂; TL00-200M蠕动泵 无锡市天利流体工业设备厂。

1.3 方法

1.3.1 连翘苷和连翘酯苷A的制备

将40 g粉碎连翘叶用1 200 mL体积分数55%的乙醇74 °C浸提50 min, 过滤, 提取2次, 合并滤液, 50 °C减压浓缩回收乙醇, 得浓缩液665 mL, 加入35 mL无水乙醇, 得到含体积分数5%乙醇的连翘叶提取液。将连翘叶提取液用2.6 cm×25 cm的AB-8树脂柱吸附, 分别用30%和50%乙醇的洗脱, 得到连翘叶提取物 I 和连翘叶提取物 II。连翘叶提取物 I 浓缩、静置沉淀; 用100%乙醇重新结晶3次, 得到纯的化合物 I。连翘叶提取物 II 用水饱和和正丁醇萃取3次, 回收正丁醇, 干燥, 得粗品; 粗品用30%的甲醇在8 cm×50 cm的C₁₈反相硅胶柱层析分离, 收集洗脱液, 减压浓缩得纯的化合物 II。样品重复制备5次。

1.3.2 色谱条件及检测方法

色谱柱: Agilent Zorbax SB-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇 (A) -水 (含体积分数0.2%冰醋酸) (B), 梯度洗脱: 0~3 min, 32%~32% A; 3~25 min, 32%~55% A; 25~30 min, 55%~55% A, 测定波长235 nm, 流速1.0 mL/min, 柱温30 °C。

1.3.3 油样的制备

将新鲜购买的猪板油切成约1 cm³小块, 用文火熬制, 之后用几层纱布过滤以除去残渣, 冷却后密封在-20 °C冰箱中保存。

1.3.4 酸价的测定

酸价测定具体方法参照GB/T 5009.37—2003《食用植物油卫生标准的分析方法》^[22]。

1.3.5 过氧化值 (peroxide value, POV) 的测定

油脂POV测定具体方法参照GB/T 5009.37—2003^[22]。

1.3.6 连翘苷和连翘酯苷A对猪油抗氧化作用的影响

油脂氧化试验采用Schaal烘箱法^[23], 连翘苷及连翘酯苷A按照猪油质量的0.02%、0.04%、0.08%、0.12%分别加入到50 g油脂中, 空白油样作为对照, 0.02%的BHT做阳性对照, 置于65 °C烘箱中, 每隔12 h搅拌一次并交换它们在烘箱中的位置, 定时 (0、5、10、14、18、22 d) 检测每份油样中的酸价和POV。

1.3.7 连翘苷和连翘酯苷A与VC和柠檬酸的协同抗氧化作用

精确称取10 mg的VC、柠檬酸、连翘苷和连翘酯苷A, 将VC和柠檬酸分别与连翘苷和连翘酯苷A混合溶解: 连翘苷+VC、连翘苷+柠檬酸、连翘酯苷A+VC和连翘酯苷A+柠檬酸, 将抗氧化剂增效组分别溶解到50 g猪油中, 置于65 °C烘箱中, 每隔12 h搅拌一次并交换它们在烘箱中的位置, 定时 (0、5、10、14、18、22 d) 检测每份油样中的酸价和POV。

2 结果与分析

2.1 连翘苷和连翘酯苷A分析

制得0.128 g化合物 I 和2.55 g化合物 II, 化合物 I 和化合物 II 的提取率分别为0.32%和6.39%。经高效液相方法鉴定, 化合物 I 和化合物 II 分别为连翘苷和连翘酯苷A, 结果见图1, 通过外标法检测连翘苷和连翘酯苷的纯度分别为93%和92%, 此样品作为油脂抗氧化活性使用。

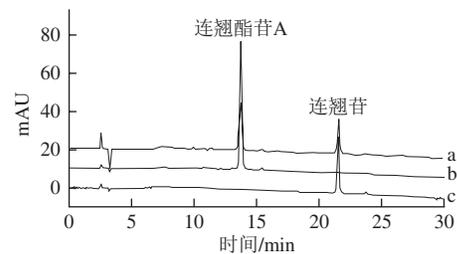
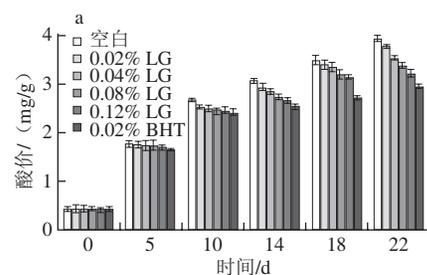
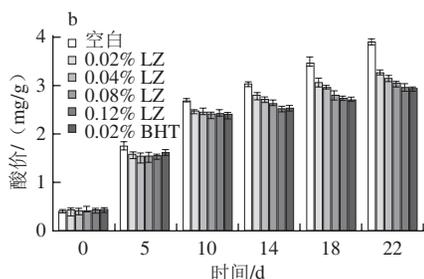


图1 连翘苷和连翘酯苷A混标 (a)、连翘酯苷A样品 (b)、连翘苷样品 (c) 的高效液相色谱图

Fig.1 Chromatograms of forsythiaside and forsythidin in mixed standard solution (a), purified forsythiaside A (b), and purified forsythidin (c)

2.2 连翘苷和连翘酯苷A对猪油的抗氧化作用





LG.连翘苷 (forsythin), LZ.连翘酯苷A (forsythiaside)。下同。

图2 不同剂量连翘苷 (a) 和连翘酯苷A (b) 对猪油酸价的影响
Fig.2 Effect of different doses of forsythin (a) and forsythiaside A (b) on acid value of lard

连翘苷抑制猪油氧化作用的酸价如图2a所示, 连翘苷对猪油的氧化酸败具有一定的抑制作用, 总体趋势是随着时间的延长, 猪油体系中酸败越明显; 随着连翘苷添加量增强, 连翘苷抑制酸败的作用越强。结果表明, 氧化实验的前10 d, 除空白组外各组间的变化差异不大; 10 d后各剂量连翘苷表现出抗氧化差异逐渐明显, 但其效果不及阳性对照BHT ($P < 0.01$)。连翘酯苷A对猪油的抑制效果见图2b, 各组表现趋势与连翘苷相似, 抗酸败作用呈现剂量依赖性, 0.12%连翘酯苷A具有较强的抗氧化功效, 效果与0.02% BHT阳性对照相当 ($P > 0.05$)。比较连翘苷和连翘酯苷A抗酸败作用可以看出, 连翘酯苷A抗酸败活性强于连翘苷活性。

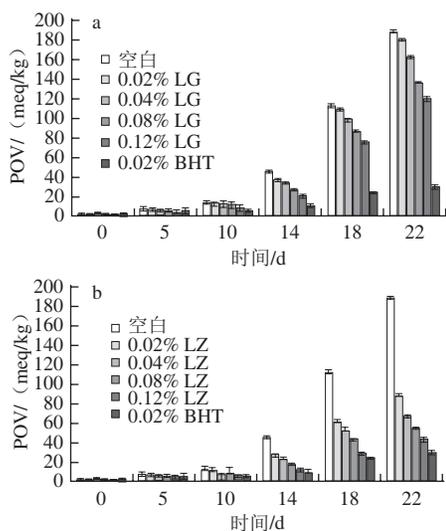


图3 不同剂量连翘苷 (a) 和连翘酯苷A (b) 对猪油POV的影响
Fig.3 Effect of different doses of forsythin (a) and forsythiaside A (b) on POV value of lard

油脂暴露在空气中易氧化形成自由基, 自由基继续与氧反应生成自由基和过氧化物, 自由基的链式反应再使油脂继续氧化, 可以测定油脂的POV来评价其氧化程度, POV越大, 氧化程度就越高。如图3a所示, 连翘苷POV与酸价的变化趋势相似, 随着时间的延长, POV不断增加, 最大添加量时对油脂抗氧化活性效果最强;

随着添加量连翘苷的增大, 抗氧化活性具有剂量效应关系; 但与阳性对照BHT相比, 连翘苷所显示的POV增加速率较快, 抗氧化能力远不及BHT ($P < 0.01$)。

如图3b所示, 连翘酯苷A的POV也是随着加热时间的延长而逐渐增加, 初期 (< 10 d) 各处理条件样品的过氧化值变化均无明显差异, 可能是因为氧化反应处于诱导期, 自由基初步生成, 过氧化物尚未大量生成, 表现为过氧化值变化不明显。14 d以后过氧化物逐渐增加, 呈现链式反应的加速期, 尤其是空白对照组过氧化值增加加快; 连翘酯苷A对猪油的氧化具有较强的抑制作用, 当添加量为0.12%时与0.02% BHT抗氧化能力较为接近。

从图2、3的结果比较还能看出, 连翘酯苷A抑制油脂氧化的作用明显相比连翘苷要强很多, 即连翘酯苷A的抗氧化活性具有明显的优势。

2.3 连翘苷和连翘酯苷A与VC和柠檬酸的协同抗氧化作用

某些有机酸与抗氧化剂混合组成复合抗氧化剂在发挥抗氧化作用时, 各组分间可能发生一系列复杂的反应, 表现协同增效的作用^[24]。本研究选用柠檬酸和VC为增效剂, 结果如图4a、4b所示, 在选用的剂量水平上, 复合抗氧化剂的效果分别优于对应单独组分 ($P < 0.05$), 在反应前期, 增效剂柠檬酸和VC的加入没有明显抑制油脂酸价和POV的增大, 而在反应后期增效剂的抑制作用则明显加强; 两者比较而言, VC对连翘苷和连翘酯苷A的增效作用较强, 而柠檬酸的增效作用较弱。

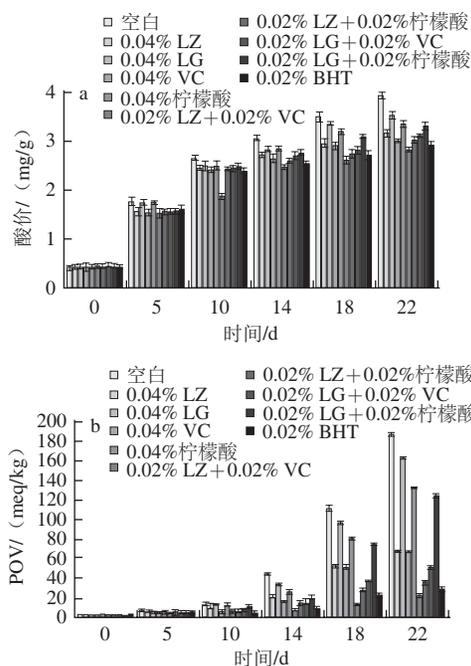


图4 协同抗氧化作用对猪油酸价 (a) 和POV (b) 的影响
Fig.4 Synergistic effect of forsythiaside A and forsythin with VC and citric acid on acid value(a) and POV value (b) of lard

抗氧化剂的混合使用较单一使用者更为有效,能够起到相互协同促进的作用,可能的原因是:VC本身就是一种重要的自由基清除剂,它通过逐渐供给电子而转变成半脱氢抗坏血酸和脱氢VC以达到清除活性氧自由基。VC也能溶于油脂中微量氧发生氧化还原反应从而避免油脂的自动氧化。另外,VC作为酸性物质,能够钝化油脂中促自动氧化的金属离子,从而对连翘苷和连翘酯苷A的抗油脂氧化产生协同增效作用。因此也可以说VC既是抗氧化剂又是增效剂。柠檬酸本身不具有抗氧化性,但是它也属于酸性物质,它对抗氧化剂的增效作用是因为其能与油脂中的金属离子发生螯合作用,降低了这些离子的有效浓度,而这些金属离子能够缩短链式反应及引发期的时间,加快脂类的氧化,柠檬酸的螯合作用使这些金属离子失去促油脂自动氧化的能力,以表现出对连翘苷和连翘酯苷A的协同增效作用^[25-26]。

3 结论

从酸价和POV两个油脂氧化程度的指标来看,连翘苷和连翘酯苷A对油脂均具有抗氧化作用,但连翘酯苷A抗氧化能力更强。连翘苷和连翘酯苷A是从连翘叶中提取制备的天然活性化合物,较人工合成的抗氧化剂(如:BHT)安全性高,毒副作用小;相比较而言,连翘酯苷A更适合用于开发天然抗氧化剂。

在油脂抗氧化体系中,不同添加量的连翘苷及连翘酯苷A均对猪油有一定的抗氧化作用,而且表现出剂量依赖性,其中连翘酯苷A的抗氧化效果更为显著。VC和柠檬酸对连翘苷和连翘酯苷A的抗氧化作用都具有明显的协同增效作用,混合使用抗氧化剂对猪油的抗氧化效果明显优于单一抗氧化剂的使用效果。总之,连翘酯苷A的抗氧化活性明显高于连翘苷,作为天然抗氧化剂,其又具有好的安全特性,在食品、医药领域有开发利用的价值,连翘酯苷A的体内抗氧化活性有待于进一步探究。

参考文献:

- [1] 罗彦斌,胡云辉. 油脂酸败及其控制[J]. 企业技术开发, 2000(7): 28-29.
- [2] 孙长颢. 营养与食品卫生学[M]. 6版. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 387-389.
- [3] 孙丽芹,董新伟,刘玉鹏,等. 脂类的自动氧化机理[J]. 中国油脂, 1998, 23(5): 56-57.
- [4] MORRISSEY P A, SHEEHY P J A, GALVIN K, et al. Lipid stability in meat and meat products[J]. Meat Science, 1998, 49(Suppl 1): 73-86.
- [5] COUPLAND J N, MCCLEMENTS D J. Lipid oxidation in food emulsions[J]. Trends in Food Science & Technology, 1996, 7(3): 83-91.
- [6] 刘燕,杨智玲,魏法山,等. 天然抗氧化剂的研究现状[J]. 粮油加工, 2014(4): 66-70.
- [7] 谷利伟,翁新楚. 食用天然抗氧化剂研究进展[J]. 中国油脂, 1997, 22(3): 37-38.
- [8] 王丽梅,叶诚,鄢又玉. 桂花总黄酮对油脂抗氧化作用研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(30): 14969-14970.
- [9] 蔡俊秀. 天然抗氧化剂对食用油氧化稳定性的研究[J]. 福建轻纺, 2014(9): 45-50.
- [10] 曹平. 天然抗氧化剂抑制油脂氧化的研究进展[J]. 中国油脂, 2005, 30(7): 49-53.
- [11] 李想,张铁英,户超,等. 天然抗氧化剂在花椒油中的应用[J]. 中国调味品, 2014, 39(3): 85-87; 111.
- [12] 孙亚男. 天然抗氧化剂在油脂中应用的研究进展[J]. 食品工程, 2011(3): 8-10; 25.
- [13] 周建新. 植物源天然食品防腐剂的研究现状、存在问题及前景[J]. 食品科学, 2006, 27(1): 263-268.
- [14] 史洋,王小平,白吉庆,等. 连翘抗菌、抗病毒的药理作用研究[J]. 中国现代中药, 2013, 15(11): 950-953.
- [15] 孙倩倩,姜子涛,李荣. 天然防腐剂连翘精油的研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2012(1): 222-226.
- [16] SIDDHURAJU P, BECKER K. The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts[J]. Food Chemistry, 2007, 101(1): 10-19.
- [17] SINDHU M, ABRAHAM T E. *In vitro* antioxidant activity and scavenging effects of *Cinnamomum verum* leaf extract assayed by different methodologies[J]. Food and Chemical Toxicology, 2006, 44(2): 198-206.
- [18] ZUBIA M, FABRE M S, KERJEAN V, et al. Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts[J]. Food Chemistry, 2009, 116(3): 693-701.
- [19] SARIKURKCU C, TEPE B, YAMAC M. Evaluation of the antioxidant activity of four edible mushrooms from the Central Anatolia, Eskisehir-Turkey: *Lactarius deterrimus*, *Suillus collitinus*, *Boletus edulis*, *Xerocomus chrysenteron*[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(14): 6651-6655.
- [20] 柴渭莉,刘静,杨建雄,等. 连翘叶提取物对油脂抗氧化作用的研究[J]. 陕西师范大学学报:自然科学版, 2004, 32(9): 187-188.
- [21] 薛愧玲,袁王俊. 连翘叶的药理学研究综述[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(5): 1149-1150.
- [22] 上海市卫生防疫站. GB/T 5009.37—2003 食用植物油卫生标准的分析方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [23] American Oil Chemists' Society. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society[M]. 4th ed. Chicago: AOCS, 1989: 8-53.
- [24] 吴克刚,柴向华,杨连生. 高效天然抗氧化剂的筛选及其作用机理的探讨[J]. 中国食品学报, 2001, 1(1): 6-10.
- [25] 毕艳兰. 油脂化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 62-73.
- [26] 李书国,李雪梅,陈辉,等. 油脂复合抗氧化剂抗氧化协同增效作用的研究[J]. 粮油加工与食品机械, 2004(4): 42-44.