

柠檬籽油中几种活性成分的分析与检测

董庆亮,刘 凌,崔明学

(中国食品发酵工业研究院,北京,100027)

摘 要 为了解柑橘属种子油的回收利用价值,对柠檬籽油所含的主要活性成分进行了分析检测。结果显示:柠檬籽油中含有 2.2 mg/mL 的柠檬苦素类似物、6.95 mg/mL 的黄酮类物质、161 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 的 V_E 、1.34% 的磷脂;柠檬籽油中饱和脂肪酸(SFA)、单不饱和脂肪酸(MUFA)、多不饱和脂肪酸(PUFA)的质量之比 0.8:1:1.3,亚油酸和亚麻酸的质量比例为 3.9:1,是一种营养丰富的植物油。

关键词 柠檬籽油,柠檬苦素类似物,黄酮类物质, V_E ,磷脂

随着生活水平的提高,人们对食用油的要求越来越高,不仅关心油品的质量,而且关心油脂的营养价值。因此,具有较高营养价值的特种油脂备受关注。目前我国特种食用植物油料作物的品种多达上百种,这些特种油脂中,大多含有丰富的不饱和脂肪酸,尤其是油酸、亚油酸和亚麻酸的含量较高,同时还富含多种微量元素和生物活性物质,是开发调和油和功能性油脂的重要油源。

柠檬籽主要来源于柑橘属植物柠檬的加工企业的下脚料,含油率高达 20%~40%,很早以前就有将其作为食用油料的记载,但是对其油脂中的营养成分、特殊生理活性成分的分析检测成果鲜有所见。本文以柠檬籽为研究对象,开展了对特种油脂柠檬籽油的检测与分析,以期深入了解其营养价值和回收再利用价值。

1 材料和方法

1.1 原料和标准品

原料:产自我国云南的尤力克柠檬籽。

标准品:芦丁(lutin)纯度 97.0%~102.0%,ACROS ORGANIC 公司;柠檬苦素(limoin)纯度 98.0%以上 MP Biomedicals LLC 公司。

1.2 主要试剂

对二甲氨基苯甲醛(β -DMBA),分析纯,北京市旭东化工厂;其他常用试剂均为市售分析纯。

1.3 实验仪器和设备

榨油机,北京康尔旺食品机械技术公司;UV7500 紫外/可见分光光度计,上海天美科学仪器有限公司;旋转蒸发器 RE-52,上海亚荣生化仪器

厂;电热真空干燥箱,电工科学器械制造厂制造;BS2103 电子天平,北京赛多利斯天平有限公司;AdvanturerTM天平,奥豪斯国际贸易有限公司;KQ-250DE 型数控超声波发生器,昆山市超声仪器有限公司;岛津 GC-9A 气相色谱仪,岛津公司;岛津 10AVP 高效液相色谱仪,岛津公司。

1.4 柠檬籽油制取方法

以尤力克柠檬籽为原料,经干燥、压榨、过滤工序制得冷榨柠檬籽油。

1.5 柠檬苦素类似物的测定方法

本测定方法利用了柠檬苦素类似物中的呋喃环与 Ehrlich 试剂呈显色反应,形成稳定的红色化合物^[1,2]的作用原理。

1.5.1 Ehrlich 试剂配制^[3]

A 液:精确称取 125 mg 对二甲氨基苯甲醛,溶于 100 mL 浓 H_2SO_4 和乙醇的混合冷却液中(浓 H_2SO_4 65mL,乙醇 35mL)

B 液:称取氯化铁 9.00 g,用蒸馏水溶解并定容至 100 mL,使成为 90 mg/mL 的三氯化铁溶液。

在 A 液中加入 0.05 mL 的 B 液并混匀后作为 Ehrlich 试剂待用。

1.5.2 标准溶液的配制与标准曲线的绘制

取柠檬苦素标准品,在 95~105 $^{\circ}\text{C}$ 下真空干燥 35 min。称取干燥标准品 0.0174g,用无水乙醇洗入 100 mL 容量瓶,并用无水乙醇定容,放进超声波发生器内,使标准品充分溶解(温度 50 $^{\circ}\text{C}$ 、功率 150W、时间 30 min)。

分别移取上述溶液 0、0.2、0.4、0.8、1.2、1.4、2.0mL 置于具塞试管中,再次用无水乙醇定容到 2 mL,并加入 Ehrlich 试剂 5 mL,摇匀后静止显色 40 min,然后在波长 500 nm 处检测吸光度^[1],以吸光度值 A 为纵坐标(Y)以柠檬苦素的质量浓度(mg/mL)

第一作者:硕士研究生(刘凌教授为通讯作者)。

收稿日期:2007-02-01

为横坐标(X)作图,绘制柠檬苦素的标准曲线。

1.5.3 柠檬籽油样的处理

取1 mL冷榨油样置于10 mL具塞量筒内,依次加入4 mL无水乙醇、4 mL正己烷,塞住瓶口振荡2 min加入2 mL质量浓度10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液,静置分层后移出上层油相;再次汲取2 mL正己烷二次分离出油相;随后采用真空加热回收醇相中乙醇,蒸馏底物用10 mL二氯甲烷溶解、过滤并挥干透过液中二氯甲烷溶剂;底物加10 mL无水乙醇用超声波发生器充分溶解,冷却后待测。

1.5.4 柠檬籽油样的柠檬苦素含量检测

用移液管吸取处理后的油样2.0 mL,放入试管内,加入5 mL Ehrlich 试剂,摇匀并静止显色40 min后在波长500 nm处检测吸光度,重复取样检测3次取平均值,并根据标准曲线回归方程计算油中的类柠檬苦素含量。

1.5.5 柠檬苦素类似物的加样回收试验

按1.5.4测得处理油样吸光度值,可知油样的柠檬苦素含量。再取5份0.5 mL的处理油样,分别加入不同剂量柠檬苦素标准品,同法测量吸光度值,计算每份样品的柠檬苦素类似物含量及加样回收率。

1.6 黄酮类物质测定方法^[4]

本测定方法采用亚硝酸钠-硝酸铝比色法,以芦丁为标样,根据芦丁标准品和油样的波段扫描的谱图选择检测波长,测算油中黄酮类物质含量。

1.6.1 溶液的制备

芦丁标准液:精密称取在105℃左右干燥恒重的芦丁标准品11.9 mg,用无水乙醇溶解,摇匀;定容到50 mL容量瓶内,制成浓度为0.238 mg/mL的芦丁标准品溶液。

另外配制质量分数5% NaNO_2 溶液、质量分数10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液和质量分数4% NaOH溶液。

1.6.2 标准曲线的绘制

吸取芦丁标准品溶液分别为0.2、0.4、0.6、0.8、1.2、1.4、1.6、1.8 mL置25 mL具塞容量瓶内,加入1 mL 5% NaNO_2 摇匀静止10 min,再加入1 mL 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 摇匀静止10 min,最后加入10 mL 4% NaOH溶液并用无水乙醇定容到25 mL,静止15 min,在选定检测波长下测定吸光度值。以吸光度值A为纵坐标(Y),以芦丁的质量浓度(mg/L)为横坐标(X)绘制芦丁标准曲线。

1.6.3 柠檬籽油样的黄酮类物质含量测定

取0.06 mL的油样,按照1.6.2的方法依次加

入显色溶液并定容后测定吸光度值,重复取样检测3次计算平均值,然后根据标准曲线回归方程计算油中的黄酮类物质的含量。

1.6.4 黄酮类物质的加样回收试验

取5份不同体积的油样,分别加入不同剂量的芦丁标准品,按1.6.2测定吸光度值,计算每份样品的黄酮类物质的含量及加样回收率。

1.7 磷脂测定

采用GB/T5537—1985的重量法。

1.8 脂肪酸成分测定

采用GB/T 17377—1998的方法。

GC色谱条件为:色谱柱 Agilent DB-23(60 m × 0.25 mm i. d.,膜厚0.20 μm);载气 N_2 ,柱温:130℃(1 min)→175℃(7℃/min),175℃→230℃(4℃/min)→230℃(10 min);进样器:分流比50:1,270℃;检测器 FID 270℃,进样量0.5 μL。

1.9 V_E 测定

采用GB/T 5009.82—2003的方法。

HPLC色谱操作条件为流动相: $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ 体积比98:2,临用前脱气;色谱柱: C_{18} 柱;预柱:ultrasphere ODS 10 μm,4 mm × 4.5 cm;分析柱:ultrasphere ODS 5 μm,4.6 mm × 25 cm;检测器:紫外检测器,波长300 nm,量程0.02进样量:20 μL;流速1.7 mL/min;泵 LC-10ATVP;自动进样器 SIL-10ADVP;柱温箱38℃,CTO—10ADVP。用标准物质色谱峰的保留时间定性,积分仪测定峰面积归一化法定量。

2 结果与分析

2.1 柠檬籽油中的柠檬苦素类似物含量测定与加样回收率实验

实验得到柠檬苦素标准曲线回归方程为: $Y = 5.314X - 0.0325$,相关系数0.9998。柠檬籽油样中柠檬苦素类似物含量为2.20 mg/mL。

本项检测对油样采取无水乙醇和正己烷双相萃取的分离方法脱脂提纯,不仅降低了油脂色素对检测的干扰,同时还除去了样品中的弱极性非类柠檬苦素萜类物质^[5],有助于获取准确性良好的检测结果。

加样回收率实验结果如表1所示,柠檬苦素类似物加样回收率在96.59%~104.81%之间,变异系数3.16%,数据显示本比色法测量柠檬苦素类似物的结果是准确可靠的。

表 1 比色法测量柠檬苦素类似物的
加样回收试验结果

| 组数 | 加入量/mg | 吸光度 | 测得值/mg | 回收率/% |
|----|---------|-------|---------|--------|
| 1 | 0.260 3 | 0.795 | 0.311 4 | 104.81 |
| 2 | 0.234 3 | 0.689 | 0.271 5 | 100.15 |
| 3 | 0.208 2 | 0.553 | 0.220 4 | 97.96 |
| 4 | 0.156 2 | 0.486 | 0.195 1 | 101.12 |
| 5 | 0.130 2 | 0.396 | 0.161 3 | 96.59 |

2.2 柠檬籽油中黄酮类物质的测定结果

对油样谱图(见图 1)和芦丁标样谱图(见图 2)的波峰值进行对比分析,确定测定黄酮类物质的最佳检测波长是 357nm。

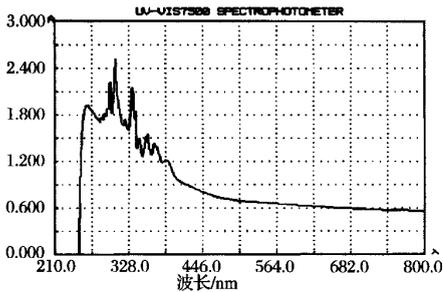


图 1 柠檬籽油紫外吸收图谱

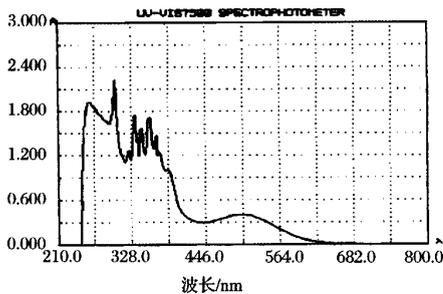


图 2 芦丁标准品紫外吸收图谱

实验得到芦丁标准曲线回归方程为 $Y = 0.043X + 0.0055$, 相关系数 0.999 6。柠檬籽油的黄酮类化合物含量为 6.95mg/mL。

加样回收实验回收率实验结果如表 2 所示,黄酮类物质加样回收率在 96.59%~104.81%之间,变异系数 3.22%,数据显示本比色法测量黄酮类物质的结果是准确可靠的。

表 2 加样回收试验结果

| 组数 | 加入量/mg | 吸光度 | 测得值/mg | 回收率/% |
|----|--------|-------|--------|--------|
| 1 | 0.023 | 0.527 | 0.303 | 100.73 |
| 2 | 0.046 | 0.456 | 0.262 | 102.91 |
| 3 | 0.092 | 0.414 | 0.238 | 102.81 |
| 4 | 0.138 | 0.352 | 0.202 | 97.11 |
| 5 | 0.184 | 0.424 | 0.243 | 95.98 |

2.3 柠檬籽油的脂肪酸成分及组成

图 3 是柠檬籽油脂酸检测的 GC 谱图,表 3 是柠檬籽油的脂肪酸组成。

研究显示,人类乳汁的特点是棕榈酸和油酸含量相对较高,而且含有少量而很重要的长碳链多不饱和脂肪酸(花生四烯酸和 DHA)^[6],婴幼儿在体内能将亚油酸和亚麻酸降低饱和度并延伸成为对其生长发育有益的长链同系物(花生四烯酸和 DHA)^[7]。而柠檬籽油的亚油酸、油酸、棕榈酸含量较高。研究证实,因此,柠檬籽油是开发婴幼儿食品的可选配料。

柠檬籽油中的亚油酸、亚麻酸相对含量也比较高。在植物油脂中所含的亚麻酸多为 ω -3 系列脂肪酸,而亚油酸多为 ω -6 系列脂肪酸^[8]。目前,对于大众消费的油脂,很多国家和组织根据本国或本地区的膳食摄取情况,对 ω -6 系列脂肪酸和 ω -3 系列脂肪酸的摄取比例发布了推荐值。我国尚未推出相关标准,邻国日本 2000 年推荐食用油中 ω -6 和 ω -3 质量比例以 4:1 为佳,柠檬籽油中 ω -6 和 ω -3 的质量比例为 3.9:1(见表 3)与之非常接近。

此外,柠檬籽油中 SFA 含量为 25.70%、MUFA 含量为 31.71%、PUFA 含量为 42.34%,其 SFA:MUFA:PUFA 质量之比为 0.8:1:1.3,非常接近联合国粮农组织推荐标准 1:1:1。因此,可以说柠檬籽油是一种非常理想的植物油源。

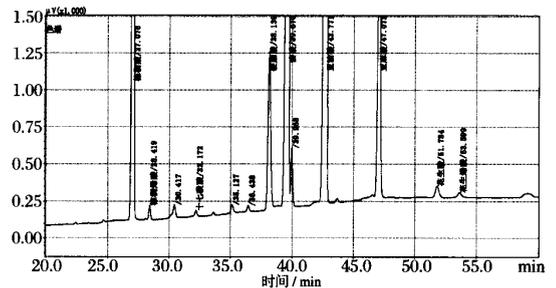


图 3 柠檬籽油脂酸 GC 分析

表 3 柠檬籽油的脂肪酸成分表

| 编号 | 脂肪酸名称 | 脂肪酸成分含量/% |
|----|------------------------|-----------|
| 1 | C _{16:0} 棕榈酸 | 21.29 |
| 2 | C _{16:1} 棕榈烯酸 | 0.41 |
| 3 | C _{17:0} 十七碳酸 | 0.17 |
| 4 | C _{18:0} 硬脂酸 | 3.85 |
| 5 | C _{18:1} 油酸 | 31.30 |
| 6 | C _{18:2} 亚油酸 | 33.70 |
| 7 | C _{18:3} 亚麻酸 | 8.64 |
| 8 | C _{20:0} 花生酸 | 0.39 |
| 9 | C _{22:0} 山俞酸 | 0.17 |

2.4 柠檬籽油中 V_E 的含量

HPLC 谱图中检测到的 3 种 V_E 成分,峰面积的大小依次是 α - $V_E > \gamma$ - $V_E > \delta$ - V_E ,其中 α - V_E 的含量明显高于其他 2 种。常温下 α 、 β 、 γ 、 δ -生育酚抗氧化性能接近,而生理作用以 α -生育酚最强, β 、 γ 不及 α 效能的一半, δ 几乎没有生理效应^[9]。柠檬籽油 V_E 的检测值为 $161 \mu\text{g/g}$,其中 α - V_E 近 $110 \mu\text{g/g}$,表明柠檬籽油有很强的生理活性。

2.5 磷脂含量的测定

按重量法测得柠檬籽油的磷脂含量为 1.34%,此值在植物油中是比较高的,与大豆油中的磷脂含量相当。因此,柠檬籽又是一种理想的磷脂摄取源。

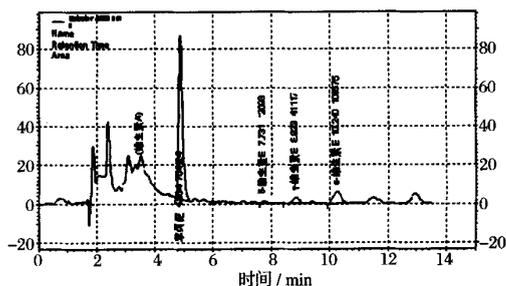


图 4 柠檬籽油中的 V_E 的 HPLC 谱图

3 结论

文中首次提出用比色法定量分析油中柠檬苦素类物质,确定了双溶剂萃取的前处理方法,并通过加样回收实验对此方法的准确性进行了验证。

经检测,柠檬籽油中含有 2.2 mg/mL 柠檬苦素类似物、 6.95 mg/mL 黄酮类物质、 $161 \mu\text{g/g}$ V_E 、1.34% 磷脂,这些活性成分具有有益于健康的良好生理效能。同时,柠檬籽油脂脂肪酸配比也较为理想,堪称是一种具有丰富营养价值的植物油。

参 考 文 献

- 1 田庆国,丁霄霖. 测定橘核中柠檬苦素类似物的分光光度法[J]. 分析测试学报,1999,18(5):45~46
- 2 三尺丰,松原良,土井信明. 柑桔类苦味成分リモニンおよびノシリニン定量に関する研究[J]. 日本食品工业学会志,1971,18(7):326
- 3 三口一孝,植物成分分析法[M]. 东京:南江堂,1958. 520
- 4 余旭亚,王洪钟. 核桃油总黄酮含量的测定[J]. 中国油脂,2002,27(1):59~60
- 5 Dai Jianming V A, Yaylayan G S, Vijaya Raghavan, et al. Multivariate calibration for the determination of total azadirachtin-related limonoids and simple terpenoids in neem extracts using vanillin assay[J]. Agricultural Food Chemistry,2001(49):1 169~1 174
- 6 Van Aerde. J E, Clandinin M T. Controversy in fatty acid balance[J]. Canadian journal of physiology and pharmacology. 1993, 71(9):707
- 7 Hui Y H 主编. 油脂化学与工艺学(第五版)(第二卷)[M]. 北京:中国轻工业出版社,2001. 67
- 8 张根旺主编. 油脂化学[M]. 北京:中国财政经济出版社,1999,163

Measurement and Analysis of Several Functional Compounds in Lemon Seed Oil

Dong Qingliang, Liu Ling, Cui Mingxue

(China National Institute of Food and Fermentation Industries, Beijing 100027, China)

ABSTRACT The main functional compounds in lemon seed oil are measured and analyzed to know the beneficial value of recovering citrus seed oil. The results show that the lemon seed oil contains 2.20 mg/mL limonoids, 6.95 mg/mL flavonoids, 16.1 mg/100g V_E , and 1.34% phospholipids; the mass ratio of SFA, MUFA and PUFA was 0.8 : 1 : 1.3, the mass ratio of linoleic and linolenic was 3.9 : 1, so it was a plant oil riched in the nutrients.

Key words the lemon seed oil, limonoids, flavonoid, V_E , phospholipids

信
息
窗

中国凯瑞商务与技术中心在上海落成

凯瑞集团,一个生产食品配料和香精的全球性上市公司,宣布设立在中国上海的现代化行政、技术和应用中心正式投入使用。这个中心将进一步支持凯瑞的增长战略,并且是在这个区域发展规划中的关键。

这个商务和技术中心也是凯瑞集团中 Kerry Bio-Science, Mastertaste 以及 Kerry Ingredients 共同的办公地点。它具有研发,应用,销售,财务和行政职能。中心投入使用意味凯瑞集团在向中国客户提供全套产品系列和服务方面,以及支持亚洲市场发展战略方面迈出了重要一步。中心在 2007 年 3 月 29 日正式投入使用。