

橡胶籽油的不皂化物组分及抗氧化活性

苏悦, 杨晶晶, 刘云, 胡祥, 杨文仪, 阚欢

(西南林业大学 生命科学学院, 昆明 650224)

摘要:依据国家标准方法(GB/T 5535.2—2008)提取橡胶籽油不皂化物并测定其含量,通过气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)对橡胶籽油不皂化物组分进行分析;并采用 DPPH· 和 ABTS· 法评价了橡胶籽油及其不皂化物的抗氧化活性。结果表明:橡胶籽油不皂化物含量为(1.44 ± 0.03)%,共鉴定出 13 种物质,主要含有 γ -谷甾醇(40.24%)、豆甾醇(17.20%)、3,4-二氢-2,2,5,7,8-五甲基-2H-1-苯并芘喃-6-酚(9.53%)、4-胆甾烯-3-酮(6.64%)、角鲨烯(6.14%)、菜油甾醇(4.37%)和 *D*- γ -(*P*)-生育三烯酚(3.27%)等;橡胶籽油及其不皂化物均具有良好的抗氧化活性,清除 DPPH· 的 IC₅₀ 值分别为 6.979 mg/mL 和 3.819 mg/mL,清除 ABTS· 的 IC₅₀ 值分别为 16.979 mg/mL 和 4.356 mg/mL。

关键词:橡胶籽油;不皂化物;组分分析;抗氧化活性

中图分类号: TS225.6; TS227 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2021)12-0118-05

Component and antioxidant activity of unsaponifiable matter in rubber seed oil

SU Yue, YANG Jingjing, LIU Yun, HU Xiang, YANG Wenyi, KAN Huan

(College of Life Science, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China)

Abstract: The content of unsaponifiable matter in rubber seed oil was measured according to national standard GB/T 5535.2-2008. Then the components of unsaponifiable matter in rubber seed oil were further analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The antioxidant activities of rubber seed oil and its unsaponifiable components were evaluated by DPPH· and ABTS· methods. The results showed that the unsaponifiable matter content in rubber seed oil was (1.44 ± 0.03)%, there were 13 kinds of unsaponifiable matter in rubber seed oil, mainly including γ -sitosterol (40.24%), stigmasterol (17.20%), 3,4-dihydro-2,2,5,7,8-pentamethyl-2H-1-benzopyrene-6-phenol (9.53%), 4-cholesterin-3-ketone (6.64%), squalene (6.14%), campesterol (4.37%), *D*- γ -(*P*)-tocotrienol (3.27%) and etc. Rubber seed oil and its unsaponifiable matter had good antioxidant activity, and their IC₅₀ values of DPPH· scavenging rate were 6.979 mg/mL and 3.819 mg/mL, their IC₅₀ values of ABTS· scavenging rate were 16.979 mg/mL and 4.356 mg/mL, respectively.

Key words: rubber seed oil; unsaponifiable matter; component analysis; antioxidant activity

橡胶树(*Hevea brasiliensis*),源于南美巴西亚马逊河盆地的热带雨林中,喜高温、高湿、静风,不耐

寒,易受极端天气影响^[1]。橡胶树在我国台湾、福建南部、广东、广西、海南和云南南部均有栽培,以海南和云南南部种植较多。橡胶籽中油脂含量丰富,接近 50%。橡胶籽油具有降血脂功效,是一种优质的食用油^[2-3]。食用橡胶籽油最早于 1903 年提出,1928 年已经在国际市场流通,我国云南热带科学研究所最早于 1963 年对橡胶籽油进行研究^[4]。

目前,对橡胶籽油在药食两用方面的研究主要

收稿日期:2020-12-22;修回日期:2021-07-24

基金项目:云南森林培育协同创新中心(501355)

作者简介:苏悦(1996),女,硕士研究生,研究方向为农林食品研究与开发(E-mail)18487285221@163.com。

通信作者:阚欢,教授(E-mail)13700650213@163.com。

集中在提取^[5]、精炼工艺^[6-7]、成分分析^[5,8]和保健功效^[9]等方面,对于橡胶籽油中不皂化物的研究仅限于含量测定^[10],而对橡胶籽油不皂化物组分分析及抗氧化活性研究鲜有报道。植物油不皂化物中含有植物甾醇、角鲨烯、生育酚等活性成分,具有较高的保健功效^[11]。橡胶籽油不皂化物含量高于大豆油^[10],分析橡胶籽油中不皂化物的组分及含量对橡胶籽油的开发及利用具有实际应用意义。基于此,本文通过GC-MS分析和鉴定了橡胶籽油不皂化物的组分,并对其抗氧化活性进行了研究,以期对橡胶籽油的深加工提供理论指导和数据支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 原料与试剂

橡胶籽,采自云南省西双版纳傣族自治州景洪市普文镇普文农场(东经101.1°,北纬22.5°),海拔800~1000 m,橡胶籽经低温冷榨得到橡胶籽油。

氢氧化钾、石油醚(沸程30~60℃)、无水乙醇、无水硫酸钠、酚酞;正己烷(色谱纯),北京化标源科技有限公司;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH),美国Sigma公司;2'-联氨-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS),BOMEI试剂公司;2,6-二叔丁基对甲酚(BHT,食品级)。

1.1.2 仪器与设备

RV10旋转蒸发仪;DK-98-II恒温水浴锅;101-2AB电热恒温鼓风干燥箱;AX224ZH电子天平;QP2020 GC-MS、UV-2600紫外可见分光光度计,日本岛津公司;FD5-3真空冷冻干燥机,美国西盟(SIM)国际集团有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 橡胶籽油不皂化物的提取

依据GB/T 5535.2—2008提取橡胶籽油不皂化物。取10~15 g橡胶籽油于250 mL圆底烧瓶中,加入沸石,再按照料液比1:10加入1 mol/L的KOH乙醇溶液,待水浴锅沸腾计时,回流皂化1 h。皂化完成后,停止加热,从冷凝管顶部加入100 mL蒸馏水并旋转摇动,取出冷却。

将冷却后的皂化液移入1 L分液漏斗,用石油醚多次洗涤沸石和圆底烧瓶,将洗涤液倒入分液漏斗中,加入与1 mol/L KOH乙醇溶液等体积的石油醚,盖好塞子,倒转分液漏斗,剧烈振荡1 min,缓慢转动塞子间歇释放内压,如果形成乳化液,加入适量高浓度氢氧化钾溶液破乳。静置分层后,将下层皂化液倒入另一分液漏斗中,采用相同的步骤重复提取下层皂化液2次,合并3次萃取液。向萃取液中

加入体积分数为10%的乙醇溶液进行多次洗涤,每次用量50 mL,直至下层洗涤液加入1滴酚酞溶液不变红为止。将上层石油醚溶液移入已称量的烧瓶中,加热挥干溶剂后在(105±2)℃下烘至恒重,称重。按下式计算橡胶籽油不皂化物含量(C)。

$$C = m/M \times 100\% \quad (1)$$

式中: m 为不皂化物质量,g; M 为橡胶籽油质量,g。

1.2.2 橡胶籽油不皂化物组分分析

采用无水硫酸钠干燥橡胶籽油不皂化物萃取液,并用旋转蒸发仪脱除石油醚,再加入10 mL正己烷溶解浓缩橡胶籽油不皂化物,过0.22 μm有机滤膜,待GC-MS检测。

GC条件:DB-5MS安捷伦毛细管柱(60 m×0.25 mm×0.25 μm);升温程序为初温60℃,保持2 min,以8℃/min的速度升温至300℃,保持5 min,再以10℃/min的速度升温至320℃,保持5 min;进样温度320℃;载气为高纯氮气,流速1 mL/min;分流比10:1;进样量1 μL。

MS条件:离子源温度220℃,接口温度280℃,EI离子源,电子能量70 eV,溶剂延迟时间3 min;质量扫描范围(m/z)35~540;扫描方式为全扫描模式。

1.2.3 橡胶籽油及其不皂化物抗氧化活性测定

1.2.3.1 DPPH·清除试验

参照郑瑞凤等^[12]的方法测定DPPH·的清除能力。用无水乙醇配制0.1 mmol/L DPPH溶液,用无水乙醇将样品配制成质量浓度分别为2、4、6、8、10、20 mg/mL的溶液,各取0.5 mL上述样品溶液,分别加入3.5 mL的0.1 mmol/L DPPH溶液,混匀后静置30 min,在517 nm下测定吸光值(A_1)。用无水乙醇代替样品溶液为空白对照,测定吸光值(A_0),用无水乙醇代替0.1 mmol/L DPPH溶液测定吸光值(A_2)。以样品相同质量浓度的BHT溶液作为阳性对照。每组试验重复3次。按下式计算DPPH·清除率(Y_1)。

$$Y_1 = [A_0 - (A_1 - A_2)] / A_0 \times 100\% \quad (2)$$

1.2.3.2 ABTS·清除试验

参照宋思圆等^[13]的方法进行测定。用蒸馏水配制7 mmol/L的ABTS储备液和140 mmol/L的过硫酸钾溶液。ABTS工作液:按照每20 mL ABTS储备液添加352 μL过硫酸钾溶液混合,室温下避光反应12~16 h;使用前,用无水乙醇稀释至 A_{734} 为0.700±0.020,现配现用。取0.1 mL不同质量浓度的样品溶液,加入3.9 mL现配的ABTS工作液,混

合摇匀,室温下避光、静置反应 30 min,测定其在 734 nm 下的吸光值(A_1)。以无水乙醇为空白对照,测定其吸光值(A_2)。以样品相同质量浓度的 BHT 溶液作为阳性对照。每组试验重复 3 次。按下式计算 ABTS·清除率(Y_2)。

$$Y_2 = (A_2 - A_1) / A_2 \times 100\% \quad (3)$$

2 结果与分析

2.1 橡胶籽油不皂化物含量及组分

2.1.1 橡胶籽油不皂化物含量

不皂化物主要包括植物甾醇、生育酚、高碳脂肪醇、脂溶性维生素、微量的色素和蜡质等成分,不同的植物油中不皂化物含量和种类也各不相同。在食用植物油中,不皂化物的含量很低,大多数仅占植物油质量的 1% 左右^[14]。本试验橡胶籽油中不皂化物含量为(1.44 ± 0.03)%,与何美莹等^[2]的研究结果一致,与李普旺等^[15]的研究结果接近。

2.1.2 橡胶籽油不皂化物组分

经 GC-MS 测定得到橡胶籽油不皂化物总离子流图如图 1 所示。

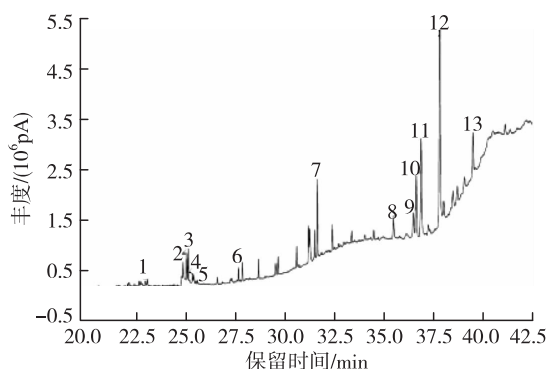


图 1 橡胶籽油不皂化物总离子流(TIC)图

根据质谱扫描结果,与 NIST2011 质谱库检索匹配和标准谱图对照,得到橡胶籽油不皂化物组分分析结果见表 1。

由表 1 可知,从橡胶籽油不皂化物中共检测出 13 种物质。根据 NIST2011 质谱库检索的鉴定结果,橡胶籽油不皂化物组分中主要有 γ -谷甾醇、豆甾醇、3,4-二氢-2,2,5,7,8-五甲基-2H-1-苯并呋喃-6-酚、4-胆甾烯-3-酮、角鲨烯、菜油甾醇、 D - γ -(P)-生育三烯酚,含量分别为 40.24%、17.20%、9.53%、6.64%、6.14%、4.37%、3.27%。植物甾醇是一种三萜醇类化合物,包括 β -谷甾醇、菜油甾醇、豆甾醇、羊毛甾醇等,植物甾醇具有降低血液中胆固醇浓度、防治前列腺疾病、阻断致癌物诱发癌细胞形成的作用,可作为抗癌物质^[16],植物甾醇还能够消炎、杀菌,具有类激素功

能,可调节免疫能力和促进生长。橡胶籽油不皂化物中检测出角鲨烯,含量达 6.14%,相对较高,角鲨烯具有很强的抗氧化活性,能够清除人体自由基,延缓衰老。橡胶籽油不皂化物中香叶基香叶醇含量为 0.79%。香叶基香叶醇是一种直链二萜类物质,化学名为 3,7,11,15-四甲基-2,6,10,14-十六烷四烯-1-醇,是萜类化合物、紫杉醇、甾醇等前体物质的重要组成部分,也是生产香料、萜类药物和合成维生素 A、维生素 K、维生素 E、辅酶的重要中间体^[17]。Ziebart 等^[18]研究发现,香叶基香叶醇可辅助双磷酸盐治疗颌骨坏死,能够有效抑制双磷酸盐治疗过程中伤口愈合速度慢、新血管生长抑制等副作用。Inoue 等^[19]研究表明,香叶基香叶醇能够破坏金黄色葡萄球菌的细胞膜,而细胞膜对于细胞具有保护作用,可维持渗透压平衡,细胞膜被破坏后,细胞会快速死亡,所以香叶基香叶醇具有杀菌的特效。香叶基香叶醇还可抑制细胞的生长、繁殖,诱导细胞凋亡,在抗肿瘤方面有重要作用^[20]。另外,橡胶籽油不皂化物中还检测出亚油酸乙酯、油酸乙酯、硬脂酸乙酯等脂肪酸酯,含量分别为 2.03%、2.60%、0.81%。其中,亚油酸乙酯可主要用于制药原料,具有降低胆固醇、血脂和防止动脉粥样硬化的作用,油酸乙酯和硬脂酸乙酯都可作为润滑剂、抗水剂以及食用香料^[21-22]。

表 1 橡胶籽油不皂化物组分及含量

| 峰号 | 保留时间/min | 化合物 | 含量/% |
|----|----------|---------------------------|-------|
| 1 | 22.950 | 西松烯 | 0.46 |
| 2 | 25.032 | 亚油酸乙酯 | 2.03 |
| 3 | 25.103 | 油酸乙酯 | 2.60 |
| 4 | 25.327 | 香叶基香叶醇 | 0.79 |
| 5 | 25.392 | 硬脂酸乙酯 | 0.81 |
| 6 | 27.831 | 2,2'-亚甲基双-(4-甲基-6-叔丁基苯酚) | 1.80 |
| 7 | 31.603 | 角鲨烯 | 6.14 |
| 8 | 35.429 | D - γ -(P)-生育三烯酚 | 3.27 |
| 9 | 36.428 | 菜油甾醇氢-2,2,5,7, | 4.37 |
| 10 | 36.570 | 8-五甲基-2H-1-苯并 | 9.53 |
| 11 | 36.811 | 甾醇-6-酚 | 17.20 |
| 12 | 37.748 | γ -谷甾醇 | 40.24 |
| 13 | 39.425 | 4-胆甾烯-3-酮 | 6.64 |

2.2 橡胶籽油及其不皂化物的抗氧化活性

2.2.1 DPPH·清除率

橡胶籽油及其不皂化物对 DPPH·清除能力如图 2 所示。

由图 2 可知,随着样品质量浓度的增加,DPPH·清除率呈现增加趋势。在质量浓度为 2~

10 mg/mL时,与同等质量浓度 BHT 相比,橡胶籽油的 DPPH·清除率远低于 BHT 的。随着质量浓度的增加,橡胶籽油对 DPPH·的清除率从 15.479% (2 mg/mL)增加到 94.501% (20 mg/mL);在橡胶籽油不皂化物质量浓度为 10 mg/mL时,其对 DPPH·的清除率达 87.916%,而 10 mg/mL BHT 对 DPPH·的清除率为 96.261%。当橡胶籽油不皂化物质量浓度为 20 mg/mL时,其对 DPPH·的清除率接近 BHT。

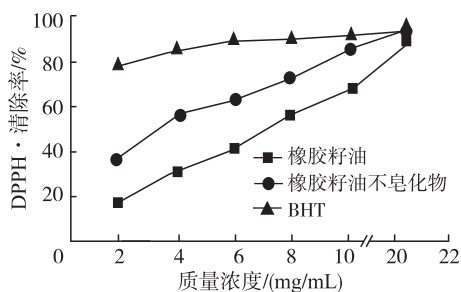


图2 橡胶籽油及其不皂化物对 DPPH·清除能力

2.2.2 ABTS·清除率

橡胶籽油及其不皂化物对 ABTS·清除能力如图 3 所示。

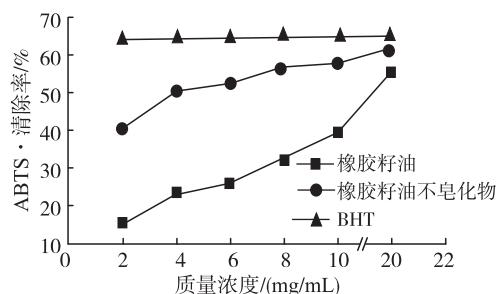


图3 橡胶籽油及其不皂化物对 ABTS·清除能力

由图 3 可知,随着橡胶籽油及其不皂化物质量浓度的增加,ABTS·的清除率也随之增加。当质量浓度为 2~20 mg/mL,橡胶籽油不皂化物对 ABTS·的清除率低于 BHT,橡胶籽油对 ABTS·的清除能力远低于 BHT 和橡胶籽油不皂化物。

从 IC₅₀值来看,橡胶籽油不皂化物对 DPPH·清除能力(3.819 mg/mL)及 ABTS·清除能力(4.356 mg/mL)大于橡胶籽油的(6.979、16.979 mg/mL)。

3 结论

橡胶籽油中不皂化物含量为(1.44 ± 0.03)%。通过 GC-MS 橡胶籽油不皂化物中共鉴定出 13 种物质,橡胶籽油及其不皂化物都具有良好的抗氧化活性,清除 DPPH·的 IC₅₀值分别为 6.979、3.819 mg/mL,清除 ABTS·的 IC₅₀值分别为 16.979、4.356 mg/mL。橡胶籽油及其不皂化物抗氧化活性较强,可能与其含有角鲨烯、植物甾醇、生育三烯酚等物质

有关。下一步将对活性物质进一步分离纯化以明确其抗氧化作用的主要组分及对橡胶籽油的抗氧化机制。

参考文献:

- [1] 邱华兴,黄淑美,张永田. 中国植物志:第44卷(二)[M]. 北京:科学出版社,1996:138.
- [2] 何美莹,徐荣. 橡胶种子、橡胶种子油的营养及食用安全性研究[J]. 热带农业科技,2013,36(3):1-6,10.
- [3] 蓝钦沐. 橡胶籽及其油脂的理化性质和化学成份的分析研究综述[J]. 油脂科技,1982(1):9-14.
- [4] 王绍曾,王实. 橡胶种子油的加工与利用[J]. 热带作物研究,1989(3):74-78.
- [5] 杨晶晶,刘云,胡祥,等. 响应面法优化超声波辅助提取橡胶籽油及其脂肪酸成分分析[J]. 食品研究与开发,2020,41(21):137-144.
- [6] 王慧敏. 橡胶籽油的提取、精炼及其氧化稳定性研究[D]. 海口:海南大学,2012.
- [7] 胡小泓,刘大川,张新才. 橡胶籽油的制取及精炼工艺研究[J]. 中国油脂,2005,30(11):65-67.
- [8] 李湘洲. 橡胶籽的综合利用[J]. 经济林研究,1995(4):35-36,80.
- [9] WEN Z G, WU Y B, QI Z G, et al. Rubber seed oil supplementation enriches n-3 polyunsaturated fatty acids and reduces cholesterol contents of egg yolks in laying hens[J]. Food Chem, 2019, 301: 125-198.
- [10] 林贝贝,张新党,王恒志,等. 橡胶籽营养价值及其在水产饲料中的应用进展[J]. 云南农业大学学报(自然科学版),2020,35(5):919-925.
- [11] 王衍彬,秦玉川,王丽玲,等. 省沽油种仁油脂脂肪酸及不皂化物分析[J]. 中国油脂,2018,43(9):128-131.
- [12] 郑瑞凤,何钢,梁立,等. 黑木耳子实体油脂成分分析及其抗氧化研究[J]. 食品科技,2017,42(6):229-233.
- [13] 宋思圆,苏平,王丽娟,等. 响应面试验优化超声提取黄秋葵花果胶多糖工艺及其体外抗氧化活性[J]. 食品科学,2017,38(2):283-289.
- [14] 黎文生,阮栋梁,雅韵,等. 大麻籽油不皂化物的分析与分离[J]. 中国油料作物学报,2018,24(3):55-57.
- [15] 李普旺,OU N. 橡胶树种子油的研究[J]. 热带农业工程,2000(3):30-32.
- [16] 常翠青. 植物甾醇与心血管疾病的研究进展和应用现状[J]. 中国食物与营养,2016,22(6):76-80.
- [17] 吴伟鹏. 酿酒酵母生物合成香叶基香叶醇和β-紫罗兰酮的研究[D]. 杭州:浙江大学,2018.
- [18] ZIEBART T, KOCH F, KLEIN M, et al. Geranylgeraniol—a new potential therapeutic approach to bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw[J]. Oral Oncol, 2011, 47(3):195-201.
- [19] INOUE Y, HADA T, SHIRAIISHI A, et al. Biphasic effects of geranylgeraniol, teprenone, and phytol on the

- growth of *Staphylococcus aureus* [J]. *Antimicrob Agents Chem*, 2005, 49(5): 1770-1774.
- [20] 吴伟鹏, 于洪巍, 叶丽丹, 等. 基于关键节点代谢流重排提高酿酒酵母的香叶基香叶醇产量[J]. *高校化学工程学报*, 2018, 32(4): 145-152.
- [21] 康建波, 胡士恒, 王亚男, 等. 脂肪酶催化玉米油合成脂肪酸乙酯工艺研究[J]. *现代化工*, 2012, 32(7): 47-49.
- [22] 刘润哲, 毕艳兰, 杨国龙, 等. 红花籽油醇解法制备脂肪酸乙酯[J]. *中国油脂*, 2009, 34(1): 50-53.

· 信息 ·

关于对“膳食棕榈酸会增加癌症扩散风险”的几点看法

2021年11月10日,国际学术期刊《自然》(英文名“Nature”)刊出一篇由英国慈善机构全球癌症研究所资助的,题为“膳食棕榈酸通过神经胶质细胞促进前转移性记忆”(英文名为“Dietary palmitic acid promotes a prometastatic memory via Schwann cells”)的研究论文(以下称“该文”)。该文作者发现,棕榈酸可以促进小鼠口腔癌和黑色素瘤的转移,并且在移植后仍然有高度转移性。当日,英国媒体《卫报》(英文名为“The Guardian”)立即对该文予以报道。随后,科技日报、人民网、光明网等多家国内权威媒体也纷纷跟进转载报道,经过网络传播,不断发酵,引起了社会各界的广泛关注和强烈反响。

对此中国粮油学会油脂分会组织专家针对该事件进行了认真讨论,形成以下几点看法:

一、棕榈酸又名软脂酸或十六烷酸,是一种饱和脂肪酸,几乎所有的食用油脂都含有数量不等的棕榈酸。常见动植物油脂中棕榈酸的含量(占总脂肪酸的比例)分别为:棕榈油(39%~48%)、猪油(20%~28%)、稻米油(12%~18%)、玉米油(9%~17%)、橄榄油(8%~20%)、大豆油(8%~14%)、花生油(8%~14%)、芝麻油(8%~12%)、葵花籽油(5%~8%)、菜籽油(3%~7%)、可可脂(约26%)等;畜禽肉类中棕榈酸含量分别占总脂肪酸的40%~50%,大多数哺乳动物乳(包括牛羊乳)及其制品(如黄油、稀奶油)的脂肪中棕榈酸含量在20%~25%之间;值得一提的是,人类乳汁脂肪中也含有20%~25%的棕榈酸,人体本身也含有比较高的棕榈酸,平均来说,一个体重70公斤左右的人体身上约含有3.5公斤的棕榈酸。

二、膳食营养均衡,包括饱和脂肪酸、不饱和脂肪酸和多不饱和脂肪酸的比例均衡原则是世界各国营养界的共识。要达到脂肪酸比例的均衡,棕榈酸是不能缺席的、更不能强行排除。

三、在日常饮食中,我们通常将脂肪与食物作为一个整体来摄取,而不会食用单一脂肪酸。一种食物及其成分对人体健康的好坏,关键在于食物各种成分的协同作用和摄入量。

四、棕榈油含有相对较高的棕榈酸,在马来西亚和印度尼西亚,有上千年的食用历史。流行病学队列研究和病例对照研究迄今未发现这些国家或地区人群的癌症发病率和死亡率比其他国家高。世界卫生组织(WHO)下属的国际癌症研究机构(IARC)的研究报告数据显示,近5年来马来西亚和印度尼西亚的癌症发病率和死亡率都不到高收入国家的1/2。

综上所述,我们认为该文发表的内容,只是利用动物实验研究了肿瘤某个阶段的机制,比较适合于在学术界内部进行讨论。而把这种结果外延到人体身上并等同,结论有些偏颇,也是不负责任的。特别是有些媒体的转载更是采用“务必让肿瘤远离棕榈酸”“食用油促进癌症转移”等标题,夸大了棕榈酸的风险,扭曲了油脂、脂肪酸与癌症之间的关系,造成了消费者的恐慌,应该尽快纠正,挽回影响。

中国粮油学会油脂分会

2021年11月28日