

精炼对油茶籽油三萜类化合物含量的影响

董莹莹^{1,2},胡重怡²,叶航³,朱启盛⁴,朱作为²,郭平²,张文中²,王栋^{1,2}

(1.江西农业大学 食品科学与工程学院,南昌 330045; 2.江西省食品检验检测研究院,南昌 330001;

3.广西壮族自治区林业科学研究院,南宁 530002; 4.江西齐云山油茶科技有限公司,江西 赣州 341000)

摘要:不同精炼工序油茶籽油经中性氧化铝柱层析分离,正己烷洗脱后,采用 GC-MS 测定各工序油茶籽油 11 种三萜类化合物含量,研究精炼对油茶籽油中三萜类化合物含量的影响。结果表明:环阿屯醇和 β -香树脂醇为油茶籽油中两种主要的三萜类化合物,毛油中含量分别达到 1 043.30 mg/kg 和 878.24 mg/kg;除羽扇豆醇外,其他三萜类化合物含量随着脱酸、脱色、脱臭精炼过程不断降低,其中 β -谷甾醇、 β -香树脂醇含量受脱酸影响较大,角鲨烯含量受脱色过程影响较大,环阿屯醇含量受脱色和脱臭影响较大;各精炼工序油茶籽油中均未检出菜籽甾醇、熊果醇和桦木醇。通过研究初步探明油茶籽油主要三萜类化合物类型,为油茶籽油的适度精炼提供数据支撑。

关键词:油茶籽油;三萜类化合物;精炼工艺

中图分类号:TS207.3;TS221 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2020)11-0021-05

Effect of refining process on triterpenes content in oil - tea camellia seed oil

DONG Yingying^{1,2}, HU Zhongyi², YE Hang³, ZHU Qisheng⁴,

ZHU Zuowei², GUO Ping², ZHANG Wenzhong², WANG Dong^{1,2}

(1. College of Food Science and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China;

2. Jiangxi Institute for Food Control, Nanchang 330001, China; 3. Forestry Research Institute of

Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530002, China; 4. Jiangxi Qiyunshan

Sasanqua Technology Co., Ltd., Ganzhou 341000, Jiangxi, China)

Abstract:Oil - tea camellia seed oils from different refining processes were separated by neutral alumina column chromatography with *n* - hexane as eluent, then GC - MS was used to determine the contents of eleven triterpenes in oil - tea camellia seed oil in each process to study the effect of refining process on triterpenes content in oil - tea camellia seed oil. The results showed that cycloartenol and β - amyrin were the main triterpenes in oil - tea camellia seed oil, and their contents in crude oil reached 1 043.30 mg/kg and 878.24 mg/kg respectively. The contents of triterpenes reduced after deacidification, bleaching and deodorization except lupeol, in which β - sitosterol and β - amyrin contents were greatly affected by deacidification, squalene content was greatly affected by bleaching, and cycloartenol content was greatly affected by bleaching and deodorization. No brassicasterol, uvaol and betulin were detected in oil - tea

camellia seed oil in each refining process. Through the study, the main triterpene types in oil - tea camellia seed oil were initially identified, and data support was provided for the proper refining of oil - tea camellia seed oil.

Key words: oil - tea camellia seed oil; triterpene; refining process

收稿日期:2020-02-23;修回日期:2020-06-29

基金项目:江西省重点研发项目(20192BBF60047, 20192ACB60006);国家市场监督管理总局项目(2019MK040);江西省市场监督管理局项目(GSJK201916)

作者简介:董莹莹(1995),女,硕士,研究方向为食品检验检测(E-mail)jxaudyy@163.com;胡重怡(1982),女,博士,研究方向为食品组学(E-mail)rebeccahu0801@126.com。董莹莹、胡重怡同为第一作者。

通信作者:王栋,主任药师,硕士生导师,硕士(E-mail)jxdcwd@126.com。

油茶籽油,又名山茶油、茶油,其脂肪酸组成与“液体黄金”橄榄油尤为相似^[1-2],其还富含角鲨

烯、甾醇等三萜类化合物。三萜类化合物对人体的营养保健起着重要的作用,如具有降低血清胆固醇水平,预防心脏病及抗炎、抗癌等作用^[3-5]。目前,油茶籽油三萜类化合物研究大多集中在菜油甾醇、谷甾醇、豆甾醇等几种常见甾醇,而对其他三萜类化合物并未深入研究^[6]。为关注油茶籽油精炼加工过程中三萜类化合物含量变化,本研究以正己烷为洗脱剂,采用中性氧化铝柱层析提取分离不同精炼工序油茶籽油中三萜类化合物,并利用 GC-MS 测定不同精炼工序的油茶籽油中三萜类化合物含量,研究精炼过程对三萜类化合物含量的影响,对全面认识油茶籽油的营养具有重要意义,并为后续开展油茶籽油适度精炼提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

油茶籽浸出毛油及其脱酸油、脱色油、脱臭油、成品油,各 6 批次,由江西齐云山油茶科技有限公司提供。

角鲨烯、胆甾烷醇、菜籽甾醇、菜油甾醇、豆甾醇、 β -谷甾醇、 β -香树脂醇、羽扇豆醇、环阿屯醇、熊果醇、桦木醇、无水嘧啶,美国 Sigma 公司;羊毛甾醇,美国 Avanti 公司;中性氧化铝(薄层用,FCP200~300 目);氢氧化钾、无水乙醇,分析纯;正己烷,色谱纯,美国 Honeywell 公司;0.22 μm 滤膜,日本 Shimadzu 公司;99:1 双三甲基硅基三氟乙酰胺-三甲基氯硅烷(99:1 BSTFA-TMCS),美国 TCI 公司。

1.1.2 仪器与设备

7890B+7000D 气相色谱-三重四级杆串联质谱联用仪,美国安捷伦公司;QUINTIX124-1CN 电子分析天平(精度 $\leqslant 0.1 \text{ mg}$),德国赛多利斯公司;HH-6 电热恒温水浴锅,上海博讯实业有限公司;Vortex Wizard 涡旋仪,意大利 VELP 公司;N-EVAP

氮吹仪,美国 Organomation 公司;R-100 旋转蒸发器,瑞士 Buchi 公司;层析柱、冷凝回流管、圆底烧瓶、玻璃试管,四川蜀玻有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 标准曲线的绘制

用丙酮分别配制 1 mg/mL 角鲨烯、菜籽甾醇、菜油甾醇、胆甾烷醇、豆甾醇、 β -谷甾醇、 β -香树脂醇、环阿屯醇、羽扇豆醇、熊果醇、羊毛甾醇、桦木醇母液。样品测定时,根据油茶籽油中实际三萜类化合物浓度,在各三萜类化合物线性范围内将母液配制成分别含有 0.2、0.5、1、2、5、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 豆甾醇、羽扇豆醇、桦木醇、熊果醇、菜籽甾醇、菜油甾醇,2、5、10、20、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 角鲨烯、 β -谷甾醇、羊毛甾醇,10、25、50、100、250、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 环阿屯醇、 β -香树脂醇 6 个梯度的不同质量浓度混标,混标中加入 100 μL 内标(1 mg/mL 胆甾烷醇)。氮吹后加入 100 μL 硅烷化试剂(99:1 BSTFA-TMCS 和等体积无水嘧啶)衍生试剂,室温放置 15 min,加入 1 500 μL 正己烷稀释,过 0.22 μm 有机滤膜,进气相色谱-质谱检测。以目标化合物质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线。

1.2.2 GC-MS 条件

1.2.2.1 GC 条件

HP-5MS 色谱柱(30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm);载气为氦气,流速 0.95 mL/min;进样口温度 320 $^{\circ}\text{C}$,进样量 1 μL ,不分流进样;柱升温程序为初始温度 180 $^{\circ}\text{C}$,保持 1 min,以 4 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升到 300 $^{\circ}\text{C}$,保持 25 min;溶剂延迟时间 20 min。

1.2.2.2 MS 条件

电子轰击离子源,电子能量 70 eV,传输线温度 300 $^{\circ}\text{C}$,离子源温度 250 $^{\circ}\text{C}$,质量扫描范围(m/z) 50~650。每种目标化合物定性、定量离子见表 1。

表 1 目标化合物定性、定量离子

化合物	定性离子(m/z)	定量离子(m/z)
角鲨烯	41 69 81 95 191 273 342 410	69
菜籽甾醇	69 129 255 342 365 380 470	129
菜油甾醇	43 55 73 95 129 213 255 343 382 472	95
豆甾醇	55 83 129 213 255 379 394 484	83
羊毛甾醇	69 109 135 187 241 281 393 483	109
β -谷甾醇	129 161 215 255 357 381 396 486	129
β -香树脂醇	73 95 135 175 203 218 279 393 498	218
羽扇豆醇	73 109 189 218 257 279 299 369 498	189
环阿屯醇	69 95 175 203 231 286 339 483	69
熊果醇	41 55 73 129 161 203 216 255 496	73
桦木醇	55 69 81 95 135 189 234 363 411 442	95

1.2.3 中性氧化铝柱的制备

参照 GB/T 25223—2010《动植物油脂甾醇组成和甾醇总量的测定 气相色谱法》并稍作改进。在 20 mL 乙醇中加入 10 g 中性氧化铝混合，并将混合液倒入层析柱中，使氧化铝沉降并敲打至无缝隙，使用前打开活塞使乙醇液面到达氧化铝顶层时关闭，备用。

1.2.4 样品中三萜类化合物的提取及含量测定

准确称取每批次油茶籽油样品(0.50 ± 0.01)g, 3 个重复, 加入 100 μL 内标物(1 mg/mL 胆甾烷醇)和 2% 的氢氧化钾 - 乙醇溶液, 混匀, 75 °C 下水浴回流 1 h 后冷却至室温, 取 5 mL 皂化液至中性氧化铝柱, 先用 5 mL 乙醇洗涤不皂化物, 后用 30 mL 正己烷洗脱并控制流速, 收集洗脱液。洗脱液在 65 °C 旋转蒸发器蒸干后复溶于 5 mL 正己烷, 转移到 15 mL 玻璃离心小管中, 氮吹后加入 100 μL 硅烷化试剂(99:1 BSTFA - TMCS 和等体积无水嘧啶)衍生试剂, 室温放置 15 min, 加入 1 500 μL 正己烷稀释, 过 0.22 μm 有机滤膜, 进样, 按 1.2.2 条件进行 GC - MS 分析, 峰面积带入标准曲线方程中计算各三萜类化合物的含量。

表 2 11 种目标化合物的线性方程、相关系数及线性范围见表 2。

化合物	线性方程	相关系数(R^2)	线性范围/($\mu\text{g}/\text{mL}$)
角鲨烯	$y = 0.8043x + 0.0252$	0.9976	0.5 ~ 1 000
菜籽甾醇	$y = 0.7235x + 0.0002$	0.9931	0.5 ~ 1 000
菜油甾醇	$y = 0.9534x + 0.0004$	0.9982	0.5 ~ 1 000
豆甾醇	$y = 1.1223x + 0.0017$	0.9986	0.5 ~ 1 000
羊毛甾醇	$y = 0.4954x + 0.0007$	0.9967	0.5 ~ 1 000
β -谷甾醇	$y = 1.5368x + 0.0041$	0.9970	0.5 ~ 1 000
β -香树脂醇	$y = 1.0013x + 0.0008$	0.9975	1 ~ 1 000
羽扇豆醇	$y = 0.9062x + 0.0023$	0.9975	0.3 ~ 1 000
环阿屯醇	$y = 1.1055x + 0.0125$	0.9960	0.5 ~ 1 000
熊果醇	$y = 0.9621x + 0.0039$	0.9951	0.1 ~ 1 000
桦木醇	$y = 1.1334x + 0.0005$	0.9933	0.1 ~ 500

由表 2 可以看出, 各化合物线性范围内线性关系良好, 相关系数均在 0.99 以上。

2.2 分离纯化方法及洗脱剂的优化

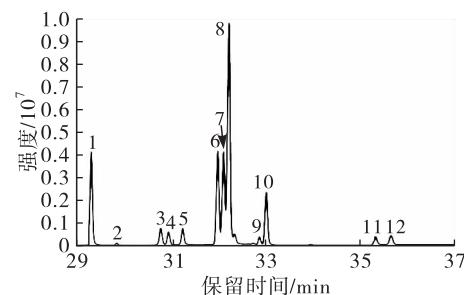
在 NY/T 3111—2017《植物油中甾醇含量的测定 气相色谱 - 质谱法》和 GB/T 25223—2010《动植物油脂 甾醇组成和甾醇总量的测定 气相色谱法》两种方法的基础上进行了改进, 对比了中性氧化铝柱层析和水 - 二氯甲烷液液萃取两种分离纯化植物油不皂化物效果, 发现利用中性氧化铝柱层析分离纯化不皂化物, 氮吹后干扰物质少, 省时省力, 并能

2 结果与分析

2.1 GC - MS 方法学考察

2.1.1 GC - MS 分离

按照 1.2.1 配制不同质量浓度混标溶液, 采用 1.2.2 的 GC - MS 条件, 对 11 种目标化合物混标溶液进行 GC - MS 分析, 所得 GC - MS 谱图如图 1 所示。由图 1 可以看出, 11 种目标化合物在 GC - MS 条件下均能有效分离。



注:1. 角鲨烯;2. 胆甾烷醇;3. 菜籽甾醇;4. 菜油甾醇;5. 豆甾醇;6. 羊毛甾醇;7. β -谷甾醇;8. β -香树脂醇;9. 羽扇豆醇;10. 环阿屯醇;11. 熊果醇;12. 桦木醇。

图 1 目标化合物 GC - MS 谱图

2.1.2 线性关系

11 种目标化合物的线性方程、相关系数及线性范围见表 2。

有效减少有机试剂的使用, 因此采用中性氧化铝柱层析分离油脂中不皂化物。此外对乙醚和正己烷提取效果进行了比较, 结果发现正己烷相对于乙醚提取, 各种目标化合物峰形较好, 最终采用正己烷作为提取溶剂。

2.3 不同精炼工序油茶籽油三萜类化合物含量变化

2.3.1 角鲨烯

角鲨烯是一种开链三萜类化合物, 具有调控人体胆固醇代谢^[7]、抗癌^[8]、抗氧化^[9]、抗辐射^[10]等功能。油茶籽油精炼过程中角鲨烯含量变化如表 3 所示。

表3 油茶籽油精炼过程中角鲨烯含量变化

油茶籽油	含量/(mg/kg)
毛油	133.26 ± 7.17
脱酸油	111.53 ± 12.47
脱色油	80.55 ± 4.50
脱臭油	64.17 ± 10.17
成品油	55.73 ± 11.27

由表3可以看出,油茶籽毛油中角鲨烯含量最高,为133.26 mg/kg。随着精炼的进行角鲨烯含量降低,在成品油中,角鲨烯含量已降至55.73 mg/kg。与毛油相比,在脱酸、脱色、脱臭过程中,油茶籽油中角鲨烯含量分别下降16.31%、23.25%、

12.29%,其中脱色步骤对角鲨烯影响较大,脱臭后灌装为成品油前会贮藏于成品油罐中数月,可能导致成品油中角鲨烯含量下降6.33%。油茶籽油精炼过程中角鲨烯总损失58.18%,与张智敏等^[11]报道油茶籽油精炼至脱臭步骤角鲨烯损失60.55%结论一致。

2.3.2 甾醇

植物甾醇是含有环戊烷多氢菲为骨架的一类四环三萜类化合物,在化学结构上与动物甾醇较为相似。植物甾醇具有抗癌^[12-14]、改善血脂异常及预防动脉粥样硬化^[15-17]、抗炎^[18]、抗氧化^[19]的功效。油茶籽油精炼过程中甾醇含量变化见表4。

表4 油茶籽油精炼过程中甾醇含量变化

甾醇	毛油	脱酸油	脱色油	脱臭油	成品油	mg/kg
菜油甾醇	25.56 ± 3.36	25.27 ± 0.51	23.94 ± 1.71	19.83 ± 0.49	17.77 ± 0.47	
豆甾醇	19.87 ± 3.62	16.55 ± 0.64	15.13 ± 2.11	13.85 ± 3.14	13.34 ± 1.19	
羊毛甾醇	112.12 ± 31.23	65.92 ± 21.47	66.16 ± 8.32	63.95 ± 7.92	54.49 ± 9.13	
β - 谷甾醇	305.74 ± 30.25	193.95 ± 21.76	149.99 ± 6.94	125.90 ± 5.56	109.82 ± 6.60	
环阿屯醇	1 043.30 ± 74.50	932.19 ± 65.43	720.14 ± 150.64	551.68 ± 50.79	552.91 ± 110.65	
总甾醇	1 506.59 ± 142.96	1 233.88 ± 109.81	975.36 ± 169.72	775.21 ± 67.90	748.33 ± 128.04	

由表4可以看出,油茶籽浸出毛油总甾醇含量为1 506.59 mg/kg,并在油茶籽油样品中均未检测出菜籽甾醇,相比较毛油,油茶籽脱酸油、脱色油、脱臭油和成品油总甾醇含量分别下降18.10%、17.16%、13.28%和1.78%,脱酸和脱色对于总甾醇含量影响较大,总甾醇含量经过精炼下降50.33%。油茶籽油中环阿屯醇和β - 谷甾醇含量较高,其中环阿屯醇受脱色和脱臭影响较大,相比较毛油这两个精炼工序造成环阿屯醇下降36.47%,经过精炼环阿屯醇总体损失47.00%;而β - 谷甾

醇受脱酸影响较大,脱酸步骤损失36.56%,经过精炼β - 谷甾醇总体损失64.08%。工厂脱色一般采用白土吸附等工艺,三萜类化合物会随之损耗,而脱臭主要是真空高温分离脱臭油,温度、真空间度和时间均会影响油脂中三萜类化合物的损耗,尤其在250℃高温条件下三萜类化合物易挥发造成损耗。

2.3.3 其他三萜类化合物含量

油茶籽油精炼过程中β - 香树脂醇和羽扇豆醇含量变化见表5。

表5 油茶籽油精炼过程中β - 香树脂醇和羽扇豆醇含量变化

化合物	毛油	脱酸油	脱色油	脱臭油	成品油	mg/kg
β - 香树脂醇	878.24 ± 57.37	777.03 ± 45.61	711.26 ± 47.87	645.57 ± 42.02	571.36 ± 87.35	
羽扇豆醇	126.91 ± 14.68	124.71 ± 5.72	138.30 ± 29.33	146.00 ± 19.88	135.62 ± 12.54	

由表5可以看出,与毛油相比,在精炼过程中,油茶籽脱酸油、脱色油、脱臭油和成品油中β - 香树脂醇含量分别下降11.52%、7.49%、7.48%、8.45%,整个精炼过程β - 香树脂醇含量下降34.94%。而羽扇豆醇含量在精炼过程中略有升高,具体原因还需进一步探明。各精炼工序油茶籽油中均未检出α - 香树脂醇的代谢产物熊果醇和羽扇豆醇的代谢产物桦木醇。

β - 香树脂醇和羽扇豆醇是植物中合成三萜皂苷的两个重要的前体物质,近年来已有报道分离鉴

定油茶中三萜皂苷,目前已分离的油茶三萜皂苷均来自于从β - 香树脂醇代谢而来的齐墩果烷型三萜皂苷^[20-23]。结合本文实验结果,我们推测β - 香树脂醇是油茶中三萜皂苷的主要代谢通路。

3 结论

本文采用GC - MS测定油茶籽油精炼过程中三萜类化合物含量的变化,结果发现油茶籽油中环阿屯醇和β - 香树脂醇含量较高,油茶籽油中大部分三萜类化合物随着精炼的进行含量均降低,其中角鲨烯含量受脱色过程影响较大,β - 谷甾醇、β - 香

树脂醇含量受脱酸影响较大,环阿屯醇受脱色和脱臭影响较大。受制于已有标准品的限制,本文检测到的三萜类化合物种类仍然有限,还需要后续进一步挖掘,此外如何通过改进精炼工艺在去杂降害的情况下尽量保留油茶籽油中微量有益化合物将是下一步油茶籽油产业的焦点。

参考文献:

- [1] 李志晓,金青哲,叶小飞.精炼过程中油茶籽油活性成分和抗氧化性的变化[J].中国油脂,2015,40(8):1-5.
- [2] 郑淑敏,马传国,王伟.植物油中甾醇在加工过程中的变化[J].粮食与油脂,2015,28(3):19-21.
- [3] 刘存存,方学智,姚小华.油茶籽油精炼过程中主要营养成分的变化[J].中国油脂,2011,36(2):36-38.
- [4] 肖义坡.茶叶籽油与油茶籽油不皂化物研究[D].南昌:南昌大学,2015.
- [5] 陈小露,陈百莹,王政.10个地区不同单粒质量野生油茶籽油及其营养成分的比较[J].食品科学,2019,40(16):227-234.
- [6] KOZŁOWSKA M, GRUCZYŃSKA E, ŚCIBISZ I, et al. Fatty acids and sterols composition, and antioxidant activity of oils extracted from plant seeds [J]. Food Chem, 2016, 213:450-456.
- [7] CHAN P, TOMLINSON B, LEE C B. Effectiveness and safety of low-dose pravastatin and squalene, alone and in combination, in elderly patients with hypercholesterolemia [J]. J Clin Pharmacol, 1996, 36(5): 422-427.
- [8] RAO C V, NEWMARK H L, REDDY B S. Chemopreventive effect of squalene on colon cancer [J]. Carcinogenesis, 1998, 19(2): 287-290.
- [9] DU PREEZ H. Squalene - antioxidant of the future? [J]. Medicine, 2007, 33:106-112.
- [10] STORM H M, OH S Y, KIMLER B F. Radioprotection of mice by dietary squalene [J]. Lipids, 1993, 28(6): 555-559.
- [11] 张智敏,吴苏喜,刘瑞兴.制油工艺对油茶籽油营养品质的影响[J].食品科学,2013,34(11):268-272.
- [12] CILLA A, ATTANZIO A, BARBERÁ R. Anti-proliferative effect of main dietary phytosterols and β -cryptoxanthin alone or combined in human colon cancer Caco-2 cells through cytosolic Ca^{+2} - and oxidative stress - induced apoptosis [J]. J Funct Foods, 2015, 12:282-293.
- [13] LLAVERIAS G, ESCOLÀ-GIL J C, LERMA E. Phytosterols inhibit the tumor growth and lipoprotein oxidizability induced by a high-fat diet in mice with inherited breast cancer [J]. J Nutr Biochem, 2013, 24(1): 39-48.
- [14] BIN SAYEED M S, AMEEN S S. Beta-sitosterol: a promising but orphan nutraceutical to fight against cancer [J]. Nutr Cancer, 2015, 67(8): 1214-1220.
- [15] WANG P, CHEN Y M, HE L P, et al. Association of natural intake of dietary plant sterols with carotid intima-media thickness and blood lipids in Chinese adults: a cross-section study [J/OL]. PLoS One, 2012, 7(3): e32736[2020-02-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3296732>.
- [16] KLINGBERG S, ELLEGÅRD L, JOHANSSON I. Inverse relation between dietary intake of naturally occurring plant sterols and serum cholesterol in northern Sweden [J]. Am J Clin Nutr, 2008, 87(4): 993-1001.
- [17] MCKENNEY J M, JENKS B H, SHNEYVAS E. A soft gel dietary supplement containing esterified plant sterols and stanols improves the blood lipid profile of adults with primary hypercholesterolemia: a randomized, double-blind, placebo-controlled replication study [J]. J Acad Nutr Diet, 2014, 114(2): 244-249.
- [18] BACKHOUSE N, ROSALES L, APABLAZA C. Analgesic, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Buddleja globosa*, *Buddlejaceae* [J]. J Ethnopharmacol, 2008, 116(2): 263-269.
- [19] 傅梦月,胡倩,唐元元,等.植物甾醇对肉鸡肠道氧化还原状态的影响[J].食品工业科技,2013(4):353-356.
- [20] ZHANG X F, YANG S L, HAN Y Y. Qualitative and quantitative analysis of triterpene saponins from tea seed pomace (*Camellia oleifera* Abel) and their activities against bacteria and fungi [J]. Molecules, 2014, 19(6): 7568-7580.
- [21] 任琦,陈冈,周志强.油茶根中1个新的三萜皂苷[J].中草药,2019,50(18):4261-4265.
- [22] 熊磊,付辉政,鄢庆伟.油茶枯饼中1个新的三萜皂苷[J].中草药,2017,48(21):4375-4380.
- [23] 焦玉兰,付辉政,周国平.油茶茎中1个新的三萜皂苷[J].中草药,2016,47(15):2592-2596.