

# 水酶法提取石榴籽油脂肪酸组成与氧化稳定性分析

苗利利 夏德水 高丽娜 郑战伟 仇农学\*

陕西师范大学食品工程与营养科学学院 西安 710062

**摘要:**通过气相色谱-质谱法分析了水酶法提取的石榴籽油的脂肪酸组成。结果表明:石榴籽油含有丰富的不饱和脂肪酸,总不饱和脂肪酸含量达94%以上。采用Schall烘箱法,以过氧化值(POV)为参考指标,研究了光线、温度及抗氧化剂对石榴籽油氧化稳定性能的影响。结果表明,温度、光线对石榴籽油的氧化过程都有影响,温度的影响更为显著;叔丁基对苯二酚(TBHQ)对石榴籽油具有良好的抗氧化效果,并与抗坏血酸( $V_C$ )具有较好的协同增效作用;生育酚( $V_E$ )和没食子酸丙酯(PG)对石榴籽油无显著抗氧化作用。

**关键词:**石榴籽油;脂肪酸组成;抗氧化性

中图分类号:Q946.81

文献标识码:A

## Analysis of Fatty Acid Composition and Antioxidation Stability of Pomegranate Seeds Oil Extracting by Aqueous Enzymatic

MIAO Li-li, XIA De-shui, GAO Li-na, ZHENG Zhan-wei, QIU Nong-xue\*

College of Food Engineering and Nutrition Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China

**Abstract:** The fatty acid compositions of pomegranate seeds oil extracting by aqueous enzymatic were analyzed by GC-MS. The results showed that pomegranate seeds oil contained substantial unsaturated fatty acid, and the total amount of unsaturated fatty acid reaches 94%. The effects of temperature, light, and several antioxidants on the antioxidation of pomegranate seeds oil were investigated by Schall experiment in reference to peroxide value (POV). The results showed that the antioxidation of the oil was affected by temperature and light, and the effect of temperature was dominant. TBHQ possessed good antioxidation and had satisfactory synergistic effect with  $V_C$ .  $V_E$  and PG had no significant antioxidation on pomegranate seeds oil.

**Key words:** pomegranate seeds oil; fatty acid composition; antioxidation

石榴(*Punica granatum* L.)又名安石榴、若榴、丹榴、天浆及金罌等,属于石榴科石榴属落叶灌木或者小乔木,我国南北各地均有种植,分布广泛。石榴是生食鲜果,也是传统中药的重要来源。石榴籽油因其特殊的脂肪酸组成,越来越受到人们的重视,研究表明石榴籽油具有很高的营养及医疗保健价值<sup>[1-3]</sup>。

石榴籽油中含有丰富的不饱和脂肪酸,含量在90%以上<sup>[4]</sup>,而不饱和脂肪酸的富集使油脂在加工、储藏和使用过程中易受空气、光照、酶及金属离子等的作用,发生自动氧化反应,导致酸败变质。因此,在石榴籽油的加工及贮藏过程中,防止不饱和脂肪酸的自动氧化进程将是保证油脂品质一个不容忽

视的问题。为延缓石榴籽油自动氧化进程,提高其保存期,本文在分析石榴籽油脂肪酸组成的基础上,研究了它的抗氧化性能,预测其货架寿命,以期对石榴籽油的加工、应用及深度开发提供一定的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料、仪器、试剂

#### 1.1.1 试验原材料

石榴籽取自陕西恒兴果汁饮料有限公司(产地为陕西临潼),挑选、去除杂物,洗净、晾干,粉碎后40目筛,制成石榴籽粉,低温避光保存备用。

#### 1.1.2 试验仪器及试剂

DF-401S 集热式恒温加热磁力搅拌器:巩义市英峪予华仪器厂;KDF-2311 型多功能食品粉碎机:天津市康达电器公司;TDL-4 型离心机:上海安亭科学仪器厂;QP2010 型气相色谱-质谱仪:日本岛津公

收稿日期:2010-06-09

接受日期:2010-09-26

基金项目:国家大学生创新性实验计划项目(091071839)

\* 通讯作者 Tel: 86-29-85310517; E-mail: nongxueq@snnu.edu.cn

司, 色谱柱为  $30\text{ m} \times 0.25\text{ mm} \times 0.25\text{ }\mu\text{m}$  的毛细管柱, 内涂 SE-54; 滴定装置等。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 石榴籽油水酶法提取<sup>[5]</sup>

准确称取  $100.0\text{ g}$  粉碎的石榴籽粉, 装入烧杯中, 用  $\text{pH} = 10$  的缓冲液调节  $\text{pH}$  到  $8.0$ ,  $100\text{ }^\circ\text{C}$  灭酶  $5\text{ min}$ , 降温至  $50\text{ }^\circ\text{C}$ , 然后加入  $2\%$  Alcalase 蛋白酶 ( $\text{mL/g}$ ) 在  $50\text{ }^\circ\text{C}$  进行酶解, 酶解  $3\text{ h}$  后在  $3500\text{ 转/分}$  离心  $20\text{ min}$ , 分离清油, 得到的石榴籽油在  $105\text{ }^\circ\text{C}$  下干燥至恒重。

### 1.2.2 过氧化值(POV)的测定

参照国家标准 GB/T 5538-1995。

### 1.2.3 GC-MS 分析条件

采用日本岛津公司 QP2010 型气相色谱-质谱仪进行分析, 色谱柱为  $30\text{ m} \times 0.25\text{ mm} \times 0.25\text{ }\mu\text{m}$  的毛细管柱, 内涂 SE-54。

### 1.2.4 甲酯化方法<sup>[6]</sup>

称取约  $100\text{ mg}$  油样, 置于具塞试管中, 加入  $1 \sim 2\text{ mL}$  石油醚 ( $30 \sim 60\text{ }^\circ\text{C}$ ) 与苯 ( $1:1, \text{V/V}$ ) 的混合液, 振摇使油脂溶解后, 加入  $1 \sim 2\text{ mL}$   $0.4\text{ mol/L}$  的 KOH-甲醇溶液, 混匀后在室温下静置  $5 \sim 10\text{ min}$ , 再加入  $12\text{ mL}$  水, 静置取上层溶液, 进行色谱分析。

### 1.2.5 气相色谱-质谱分析条件

载气 He, 柱前压为  $109.8\text{ KPa}$ , 分流比为  $20:1$ , 进样温度为  $250\text{ }^\circ\text{C}$ , 进样量为  $1\text{ }\mu\text{L}$ , 接口温度  $270\text{ }^\circ\text{C}$ , 程序升温  $150\text{ }^\circ\text{C}$   $\frac{15\text{ }^\circ\text{C}}{\text{min}}$   $225\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $225\text{ }^\circ\text{C}$   $\frac{10\text{ }^\circ\text{C}}{\text{min}}$   $280\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $280\text{ }^\circ\text{C}$  保持  $3\text{ min}$ 。质谱电离方式 EI, 离子源温度  $200\text{ }^\circ\text{C}$ , 电离方式  $70\text{ eV}$ , 加速电压  $6\text{ kV}$ , 分辨率  $800$ , 扫描范围  $m/z: 50 \sim 450$ 。

### 1.2.6 温度、光线对石榴籽油氧化稳定性的影响

分别称取  $100.0\text{ g}$  石榴籽油置于  $250\text{ mL}$  烧杯中, 于  $(62 \pm 1)\text{ }^\circ\text{C}$  避光、室温 ( $25 \sim 30\text{ }^\circ\text{C}$ ) 见光和避光三种条件下存放, 每隔  $3\text{ d}$  测油样的过氧化值 (POV), 研究温度、光线对石榴籽油稳定性的影响。

### 1.2.7 抗氧化剂对石榴籽油氧化稳定性的影响

选用  $\text{V}_\text{E}$ 、PG(没食子酸丙酯)、TBHQ(叔丁基对苯二酚)为抗氧化剂, 研究其对石榴籽油氧化稳定性的影响。

采用 Schall 烘箱法, 以不添加抗氧化剂的油样为空白对照, 将分别在  $100.0\text{ g}$  的石榴籽油中分别加入  $\text{V}_\text{E}$ 、PG(没食子酸丙酯)、TBHQ(叔丁基对苯二酚)。添加量分别为  $0.02\%$ , 以 VC 为增效剂, 置于

$(62 \pm 1)\text{ }^\circ\text{C}$  的数显恒温干燥器中, 每隔  $3\text{ d}$  测定油样的过氧化值 (POV), 研究不同抗氧化剂对石榴籽油抗氧化性能的影响。按国际标准的规定, 油脂的过氧化值上限为  $10\text{ meq/kg}$ , 根据 Arrhenius 经验公式, 烘箱法中油脂存放  $1\text{ d}$  相当于  $20\text{ }^\circ\text{C}$  条件下贮藏  $1$  个月。由 Schall 耐热实验可以得出石榴籽油在  $(62 \pm 1)\text{ }^\circ\text{C}$  条件下过氧化值达到国际标准规定值所需的贮藏时间, 据此可推得石榴籽油在  $20\text{ }^\circ\text{C}$  条件下的预期贮藏时间, 即为石榴籽油的预期货架寿命。

## 2 结果与分析

### 2.1 石榴籽油的脂肪酸组成分析

资料显示<sup>[7]</sup>, 石榴酸为石榴籽油的主要成分, 含量在  $50\%$  以上。通过质谱分析所得石榴籽油组分的谱图见图 1, 水酶法提取的石榴籽油鉴定出  $8$  种脂肪酸成分, 结果见表 1。

如表 1 所示, 石榴籽油脂肪酸组成为: 石榴酸  $82.314\%$ 、亚油酸  $4.881\%$ 、油酸  $4.188\%$ 、棕榈酸  $2.231\%$ 、硬脂酸  $1.813\%$ 、二十碳三烯酸  $2.569\%$  等; 与超声波辅助提取的石榴籽油的 GC-MS 分析结果<sup>[8]</sup> (石榴酸  $58.68\%$ 、二十碳三烯酸  $15.02\%$ 、亚油酸  $6.06\%$ 、油酸  $6.46\%$ 、棕榈酸  $2.81\%$ 、二十碳烯酸  $1.23\%$  等) 相差较大, 尤其是石榴酸含量; 另外, 由图 1 所示, 石榴酸峰型不对称。石榴酸为 ( $9\text{-cis}$ ,  $11\text{-tran}$ ,  $13\text{-cis}$ ) - 十八碳三烯酸, 有研究表明, 除石榴酸外, 石榴籽油中可能同时存在其他构型异构体, 如  $\alpha$ -桐酸 [( $9\text{-cis}$ ,  $11\text{-tran}$ ,  $13\text{-tran}$ ) - 十八碳三烯酸],  $\beta$ -桐酸 [( $9\text{-tran}$ ,  $11\text{-tran}$ ,  $13\text{-tran}$ ) - 十八碳三烯酸] 等, 但石榴酸占绝大多数。这些异构体的双键位置都相同, 只是构型不同, 并且在一定条件下可以互相转化, 这也使 GC-MS 上石榴酸的峰型呈现不对称的特点<sup>[9]</sup>。

水酶法提取石榴籽油出油率为  $20.77\%$ , 而索

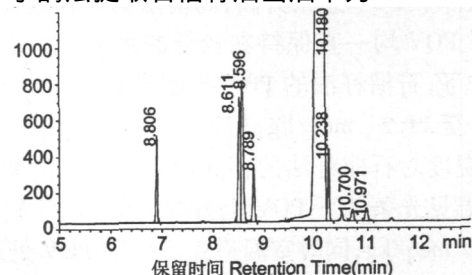


图 1 石榴籽油的色谱图

Fig. 1 Gas chromatography spectrum of pomegranate seeds oil

表1 石榴籽油脂肪酸组成

Table 1 Fatty acid components of pomegranate seeds oil

峰号 Peak No.	保留时间 Retaining time ( min )	百分含量 Contents ( % )	名称 Name of fatty acid
1	6.898	2.231	棕榈酸
2	8.511	4.881	亚油酸
3	8.566	4.818	油酸
4	8.789	1.813	硬脂酸
5	10.160	82.314	石榴酸 <sup>a</sup>
6	10.235	2.569	二十碳三烯酸
7	10.700	0.515	二十碳烯酸
8	10.971	0.463	花生酸

<sup>a</sup> 可能同时存在少量其他构型异构体。

式提取法的出油率 25.10% ,超声波及微波辅助提取石榴籽油的出油率分别为 23.53% 和 20.93%<sup>[10]</sup>。水酶法提油工艺设备简单、操作安全,处理条件温和,能够尽可能保存营养物质;而且游离油得率较高,可以得到无有机溶剂残留的可直接食用的油脂;能耗低,污染少,废水中 BOD(生化需氧量)与 COD(化学需氧量)值较低,整个工艺安全可行,适合于工业化生产,具有广阔的市场前景。

## 2.2 石榴籽油抗氧化稳定性研究

### 2.2.1 温度、光线对石榴籽油氧化稳定性的影响

油脂在贮藏期间,由于受到光、热、空气中的氧,以及油脂中的水和酶的作用,常会发生一些化学、生物等复杂变化,不仅营养价值降低,而且引起酸败,最终变质腐败。因此,石榴籽油的抗氧化问题是一个重要的研究内容。将石榴籽油在烘箱( $62 \pm 1$ )℃条件下避光、室温见光和室温避光条件下存放,测定过氧化值(POV)的变化,结果见图2。

由图2可以看出,在各处理条件下,石榴籽油的过氧化值随着时间的延长而升高。烘箱( $62 \pm 1$ )℃避光条件下 POV 急剧升高,而室温见光和室温避光条件下 POV 均一直保持在较低的水平。在烘箱避光条件下,石榴籽油的 POV 急剧升高,27 d 即由起始值升至 11.31 meq/kg,超过国际卫生标准。由此可见,温度对石榴籽油的存放影响较大。由图2可见,室温见光条件下 POV 上升幅度低,30 d 后 POV 为 2.19 meq/kg;同时室温避光条件下 POV 处理 30 d 后仍只上升至 1.39 meq/kg,这两种条件下存放的石榴籽油 POV 都远低于国际卫生标准。在氧化初期,石榴籽油 POV 值的变化速率缓慢,其原因可

能是提取的石榴籽油含有一定的  $V_E$ ,起到一定的抗氧化作用,同时油脂氧化尚处于诱导阶段,因此氧化的速率较慢。从图可见温度、光线均可加速石榴籽油的氧化,且温度的影响远大于光线。因此,较低温度和避光保存是重要的措施之一。降低石榴籽油氧化速率和延长贮藏时间的最主要措施就是低温,另外避光保存也是重要措施之一。

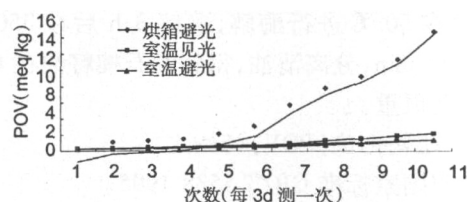


图2 温度、光线对石榴籽油氧化稳定性的影响

Fig. 2 The effects on oxidation stability of pomegranate seed oil by temperature and light

### 2.2.2 抗氧化剂对石榴籽油氧化稳定性的影响

不饱和脂肪酸含量较高的油脂极易氧化酸败,提高其抗氧化性能的措施主要有改善提取工艺条件、使用脱氧剂或抗氧化剂、低温密闭贮藏以及采用微胶囊包埋技术进行处理等。在油脂保存过程中添加抗氧化剂是一种既简单又比较经济的方法。本试验选用  $V_E$ 、TBHQ、PG 三种抗氧化剂,研究其对石榴籽油的抗氧化效果。 $V_C$  本身并无抗氧化性,但由于  $V_C$  具有较强的还原性,可捕获过氧化自由基,阻断自由基链式反应,从而能够抑制油脂氧化酸败。因此,  $V_C$  可用作多种油脂抗氧化剂的增效剂。

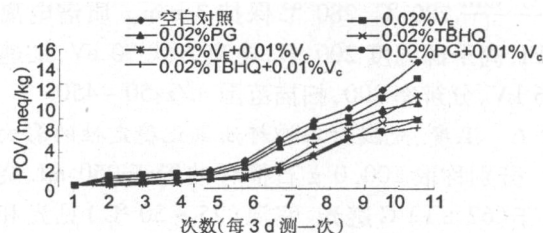


图3 抗氧化剂对石榴籽油 POV 影响

Fig. 3 The effects on POV of pomegranate seed oil by antioxidant

由图3可见,石榴籽油在烘箱加速氧化试验中 POV 随着存放时间的延长而升高,添加抗氧化剂后,石榴籽油的 POV 升高受到抑制,这种作用随着时间的延长表现得更加明显,且随着抗氧化剂的不同而存在显著差异。可以发现,在( $62 \pm 1$ )℃条件下,  $V_E$ 、TBHQ 和 PG 试验组的 POV 均低于空白对照

组,尤其是TBHQ组的POV与空白对照组的差异显著,是比较理想的抗氧化剂。 $V_E$ 是一种公认的抗氧化剂,但其对植物油的抗氧化效果表现不一,如果油脂中 $V_E$ 含量低,添加 $V_E$ 后则抗氧化效果显著。本试验中可能是石榴籽油中 $V_E$ 含量比较丰富,所以 $V_E$ 对其抗氧化效果不明显。PG对石榴籽油的抗氧化效果也不如TBHQ。对于这三种抗氧化剂的抗氧化效果强弱顺序依次为:TBHQ > PG >  $V_E$ 。由图3可以看出, $V_C$ 对三种抗氧化剂均有良好的协调作用,对TBHQ的抗氧化协同作用最强。 $0.2\text{ g/kg TBHQ} + 0.1\text{ g/kg } V_C$ 能将杏仁油的贮藏期从27个月延长到40个月以上,是良好的抗氧化剂及增效剂。

### 3 结论

3.1 气相-质谱分析石榴籽油组分的谱图显示,水酶法提取的石榴籽油主要脂肪酸组成有8种,分别为:石榴酸 82.314%、亚油酸 4.881%、油酸 4.188%、棕榈酸 2.231%、硬脂酸 1.813%、花生酸 2.569%等,不饱和脂肪酸含量达94%。

3.2 根据Arrhenius经验公式,Schaal烘箱法中油脂存放的1d相当于20℃条件下贮藏1个月的货架寿命,计算货架寿命以pov值低于10来计算。温度对石榴籽油的氧化作用比较明显,光线对石榴籽油氧化作用的影响不大。所以,室温条件下无论见光或者避光,石榴籽油放置3年其过氧化值仍低于2.0 meq/kg,具有很好的氧化稳定性。

3.3 添加抗氧化剂可明显提高石榴籽油的贮藏稳定性,随着存放时间的延长,效果愈显著。 $V_E$ 和PG对石榴籽油抗氧化效果不大显著,TBHQ对石榴籽油表现出显著的抗氧化效果。 $V_C$ 是TBHQ的有效增效剂, $200\text{ mg/kg TBHQ} + 100\text{ mg/kg } V_C$ 作为石榴籽油的抗氧化剂,可使石榴籽油的贮藏期从27个月延长到40个月以上,抗氧化效果显著。

### 参考文献

- 1 Zhao YR(赵云荣),Wang WL(王文领),Wang Y(王勇), et al. Analysis of fatty acid in pomegranate seed. *Chem Res* (化学研究) 2005, 16(2): 72-74.
- 2 Kim ND, Mehta R, Yu W et al. Chemopreventive and adjuvant pomegranate (punicagranatum) for human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2002, 71: 203-217.
- 3 Van Elswijk DA, Schobel UP, Lansky EP et al. Rapid dereplication of estrogenic compounds in pomegranate (*Punica granatum*) using on-line biochemical detection coupled to mass spectrometry. *Phytochemistry* 2004, 65: 233-241.
- 4 Ma Q(马齐),Qin T(秦涛),Wang LE(王丽娥), et al. Research on nutritional content and application of pomegranate. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技) 2007, 28: 237-241.
- 5 Chen J(陈晶),Xu SY(许时婴). Study on extraction process of Linseed oil by aqueous enzymatic method. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技) 2007, 28: 151-154.
- 6 Chen YG(陈业高),Lu Y(卢艳),Liu Y(刘莹), et al. Study on fatty acids extracted from pomegranate seed oil. *Food Sci* (食品科学) 2003, 24: 111-112.
- 7 Kaufman M, Wiesman Z. Pomegranate oil analysis with emphasis on MALDI-TOF/MS triacylglycerol fingerprinting. *J Agr Food Chem* 2007, 55: 10405-10413.
- 8 Miao LL(苗利利),Deng H(邓红),Qiu NX(仇农学). Ultrasound wave auxiliary extraction technology for pomegranate seeds oil and analysis of fatty acid by GC-MS. *Sci Tech Food Ind* (食品工业科技) 2008, 29: 226-231.
- 9 Wang H(王惠),Li ZX(李志西),Li YP(李彦萍). Fatty acid composition and application of Punica granatum L. Seed Oil. *China Oil Fat* (中国油脂) 1998, 23(2): 54-56.
- 10 Miao LL(苗利利),Qiu NX(仇农学),Pang FK(庞福科), et al. Effect of different extraction method on the content of punicic acid in pomegranate seed oil. *China Oil Fat* (中国油脂) 2009, 34(3): 6-8.

(上接第1109页)

- 5 Wang LN(王丽楠),Yang MH(杨美华). Comparison of the content of main effective constituents among different parts of *Eucommiae ulmoides*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发) 2009, 21: 108-110.
- 6 Liu JH(刘军海),Qiu AY(裘爱泳). The extraction and purification of chlorogenic acid from leaves of *Eucommia ul-*

*moides*. *Shandong Med J* (山东医药) 2004, 44(32): 7-9.

- 7 Li LJ(李利军),Hao XC(郝学超),Cheng H(程昊), et al. Simultaneous determination of chlorogenic acid and caffeic acid by sweeping micellar electrokinetic capillary chromatography. *Chin J Anal Lab* (分析实验室) 2008, 28: 119-122.