

金柚幼果黄酮对 AAPH 诱导红细胞氧化损伤的保护作用

纳雨农¹, 陈乃驿¹, 张涣悠¹, 王琴^{1,2,3}, 肖更生^{1,3}, 刘祎帆^{1,2,3*}

(1. 仲恺农业工程学院轻工食品学院, 广东广州 510550) (2. 仲恺广梅研究院, 广东梅州 514799)

(3. 广东省岭南特色食品科学与技术重点实验室, 广东广州 510550)

摘要: 该研究通过微波超声辅助提取法提取金柚幼果粗黄酮, 经 AB-8 大孔树脂及制备液相色谱仪纯化得到金柚幼果黄酮 (PF)。使用液相色谱质谱联用仪 (LC-MS) 鉴定了 PF 的组成成分, 检测结果显示 PF 含有 35 种成分, 其中美鼠李苷、水苏碱、2-O-咖啡基熊果苷、甜菜碱的含量分别为 15.57%、1.6%、1.15%、0.13%。在 AAPH 诱导的红细胞溶血模型中, 经过高浓度 PF 处理后的实验组溶血率为 31.63%, 与 AAPH 组 52.79% 对比溶血率显著下降; 酶促抗氧化体系中, 经高浓度的 PF 处理后的超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、过氧化氢酶 (CAT) 的酶活性分别为 241.04 U/L、93.29 U/L、72.93 U/L 均低于 AAPH 组; 非酶促抗氧化体系中, 经高浓度的 PF 处理后的谷胱甘肽 (GSH)、丙二醛 (MDA) 的含量分别为 1233.94 $\mu\text{mol/L}$ 、27.39 nmol/L, 乳酸脱氢酶 (LDH) 酶活为 314.75 U/L 且均表现出剂量反应。由结果可知, PF 主要是通过非酶促体系清除自由基, 从而抑制 AAPH 诱导产生的氧化应激反应, 此研究为金柚幼果天然产物的开发提供一定的研究基础。

关键词: 金柚黄酮; 红细胞溶血模型; 抗氧化活性; 功能性物质分析

文章编号: 1673-9078(2022)02-36-45

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.2.0576

Protective Effect of Flavonoids from Young Fruit of Golden Pomelo on Oxidative Damage of Erythrocyte Induced by AAPH

NA Yunong¹, CHEN Naiyi¹, ZHANG Huanyou¹, WANG Qin^{1,2,3}, XIAO Gengsheng^{1,3}, LIU Huifan^{1,2,3*}

(1. College of Light Industry and Food Technology, Zhongkai University of Agricultural and Engineering, Guangzhou

510550, China)(2. Zhongkai University & Meizhou Industrial Zone Research Institute, Meizhou 514799, China)

(3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Lingnan Specialty Food Science and Technology, Guangzhou 510550, China)

Abstract: In this study, microwave-assisted ultrasonic were used to extracted flavonoids from golden pomelo, after purified by AB-8 macroporous resin and preparative liquid chromatography, the components of PF were identified by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). The results showed that PF contained 35 components, among which the contents of cascaroside A, stachydrine, 2-O-caffeinated arbutin and betaine were 15.57%, 1.6%, 1.15% and 0.13%, respectively. In the model of erythrocyte hemolysis induced by AAPH, the hemolysis rate of the experimental group was 31.63% after high concentration treatment of PF, which was significantly lower than that of the AAPH group (52.79%). In the enzymatic antioxidant system, the enzyme activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and catalase (CAT), after high concentration treatment, were 241.04 U/L, 93.29 U/L and 72.93 U/L, respectively, which were lower than those in AAPH group. In the non-enzymatic antioxidant system, the contents of glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) after high concentration of PF treatment were 1233.94 $\mu\text{mol/L}$, 27.39 nmol/L, respectively, and the activity of lactate dehydrogenase (LDH) was 314.75

引文格式:

纳雨农,陈乃驿,张涣悠,等.金柚幼果黄酮对 AAPH 诱导红细胞氧化损伤的保护作用[J].现代食品科技,2022,38(2):36-45,+103

NA Yunong, CHEN Naiyi, ZHANG Huanyou, et al. Protective effect of flavonoids from young fruit of golden pomelo on oxidative damage of erythrocyte induced by AAPH [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(2): 36-45, +103

收稿日期: 2021-05-29

项目名称: 国家自然科学基金项目 (32001622); 广东省岭南特色食品科学与技术重点实验室 (2021B1212040013)

作者简介: 纳雨农(2000-), 男, 本科生, 研究方向: 食品科学与工程, E-mail: 1512069641@qq.com

通讯作者: 刘祎帆(1990-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 天然产物开发, E-mail: lm_zkng@163.com

U/L, and all showed a dose response. The result shows that PF can inhibit AAPH induced oxidative stress mostly by scavenging free radicals through non-enzymatic system, which provides a certain research basis for the development of natural products of young pomelo.

Key words: golden pomelo flavonoids; erythrocyte hemolysis model; antioxidant activity; functional substance analysis

柚子是我国广泛种植的水果品种之一, 广东特色品种金柚已成为国家优势特色产业^[1]。未成熟的柚子在生长期自然脱落以及果农进行疏花疏果产生的落果称为金柚幼果^[2]。金柚幼果的研究主要包括膳食纤维、多糖、柚皮苷、活性肽等, 本课题组在前期研究中提取了金柚幼果的膳食纤维^[2]和多糖^[3], 其中总膳食纤维含量为 75.63%, 在四氧嘧啶诱导小鼠高血糖模型中有效降低小鼠血糖水平, 通过调节肠道菌群丰度缓解糖尿病症状; 发现金柚幼果多糖表面为光滑的多孔网状结构, 借由小鼠 RAW264.7 巨噬细胞模型验证多糖的免疫活性。另外, 采用响应面法优化后柚皮苷得率为 3.8%, 发现柚皮苷提取物能有效保护红细胞免受 AAPH 自由基的攻击, 显著降低红细胞溶血率^[4]。除了柚皮和幼果, 该课题组还通过共发酵体系提高了柚子核活性肽的含量, 在抑菌测试中共孵育柚核多肽, 对大肠杆菌的最小抑菌浓度为 12.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 其抑菌机理与细菌细胞膜形成孔洞有关^[5]。金柚幼果中果瓢占比 43%~48%, 而柚子果实中黄酮主要存在于果瓢中且在未成熟期累积, 故幼果中黄酮含量较高^[6-8]。在前期的研究中, 罗洁莹等^[6]使用微波超声辅助法提取并经过相应面优化, 总黄酮的提取率达 68.57%。经 AB-8 大孔树脂纯化后, 金柚幼果黄酮类化合物 (CF) 能显著抑制 AAPH 诱导红细胞溶血, 并呈现明显的剂量依赖性^[9]。

AAPH 氧化诱导剂常用于红细胞氧化溶血模型中, 在水溶液中经热分解会形成相对稳定的过氧自由基, 并且会引发自由基链式反应, 产生更多种类的自由基^[10,11]。以抗氧化活性为跟踪指标, 构建红细胞氧化模型, 测定过氧化氢酶 (CAT)、超氧化物歧化酶 (SOD)、乳酸脱氢酶 (LDH)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 的酶活性以及丙二醛 (MDA)、谷胱甘肽 (GSH) 的含量, 描述模型中酶促抗氧化通路以及非酶促抗氧化通路的变化情况, 以此判断物质抗氧化活性^[10]。张艳梅等^[12]建立 H_2O_2 红细胞溶血模型并发现沙葱总黄酮浓度在 30~520 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时均能够抑制 H_2O_2 氧化损伤引起的红细胞溶血, 降低红细胞中 MDA 含量, 提高红细胞中 GSH-Px、SOD、CAT 活性, 且呈剂量效应性关系。苏健裕等^[13]发现杨梅酮处理会导致 ROS 和 MDA 含量的降低以及 SOD 和 GSH-Px 的酶活性的增加, 且具有一定的剂量依赖性。说明杨梅酮对红细胞的保护主要是通过增强 SOD 和

GSH-Px 酶活性来清除过多 ROS。在前期的研究中, 发现 CF 能直接清除自由基, 控制自由基引起的氧化损伤, 使酶促抗氧化与非酶促抗氧化保持平衡, 从而抑制 AAPH 引起的红细胞溶血^[9]。

本研究通过制备液相色谱仪进一步纯化 CF 得到含量最高的组分 PF, 并使用高效液相色谱-电喷雾质谱 (HPLC-ESI-MS/MS) 联用技术^[14-16]鉴定 PF 的化学成分; 构建红细胞抗氧化模型评价体系, 探讨 PF 的抗氧化活性及其机理, 本研究为金柚幼果黄酮开发利用提供数据支持; 为柚子副产物综合利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

金柚幼果采自广东省梅州市五华县金柚种植园。分析纯级无水乙醇购自天津市大茂化学试剂厂; 甲醇、乙腈和甲酸均为色谱纯, 购买于美国天地公司; 2,2'-偶氮二异丁基脒二盐酸盐 (AAPH) 购自上海瑞永生生物科技有限公司; PBS 磷酸缓冲液 (pH=7.2) 购自北京雷根生物技术有限公司; 6% O 型红细胞, 抗氧化指标检测试剂盒 (LDH、MDA、SOD、GSH-Px、CAT、GSH) 均购买于南京建成生物工程研究所。

1.2 设备

XO-SM 超声波-微波协同反应系统, 南京西安欧仪器制造有限公司; PHS-25 数显 pH 计, 上海仪电科学仪器股份有限公司; FA1204B 分析天平, 上海精科天美科学仪器有限公司; SC-3610 低速离心机, 安徽中佳科学仪器有限公司; Waters I class 液相色谱串联 Q-Tof 质谱, 美国 Agilent 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 金柚幼果黄酮的分离与纯化

金柚幼果切碎后, 在 -40 $^{\circ}\text{C}$ 真空冷冻干燥后磨碎成粉并经过 60 目筛网, 得到的金柚粉避光存放于干燥器中。根据王琴^[6]的方法提取金柚幼果粗黄酮: 使用 60%乙醇作为溶剂进行超声-微波协同提取, 提取过程中温度控制在 60 ± 2 $^{\circ}\text{C}$ 以内, 提取完成后以 4000 r/min 进行离心, 时间为 10 min, 得上清液。将黄酮水提上清液缓慢加入 AB-8 大孔树脂柱, 避光吸附 4 h, 洗脱

水溶性杂质后用 40%乙醇水溶液进行洗脱并收集后，真空浓缩，冷冻干燥得粗黄酮 CF。

1.3.2 制备型高效液相色谱制备分离黄酮类化合物 PF

将 CF 充分溶解后上样于制备液相色谱柱，制备色谱柱为美国沃特斯 Symmetry Prep C18 柱 (300 mm×7.8 mm, 10 μm)；流动相为 0.1%甲酸水-乙腈，线性梯度洗脱程序如表 1 所示；流速为 1.0 mL/min。流动相在使用前需经 0.45 μm 微孔滤膜抽滤，超声脱气；进样量为 400 μL；柱温为 30 °C；检测波长为 280 nm。收集峰面积最大的组分，真空浓缩冷冻干燥后得金柚幼果黄酮 (PF)。

表 1 制备液相梯度洗脱程序

Table 1 Preparation of liquid phase gradient eluting procedure

时间/min	A 相/%	B 相/%
0	85	15
20	70	30
30	20	80
40	20	80
50	10	90

1.3.3 ESI-LC-MS/MS 分析

液相色谱条件如下 Waters Cortecs C18 色谱柱 (2.1 mm×50 mm, 1.7 μm)，流动相为 0.1%甲酸水 (A)-乙腈 (B) 梯度洗脱程序如表 2 所示；流速为 0.3 mL/min，进样量 20 μL；柱温 40 °C。

质谱条件如下，离子方式：EIS+；毛细管电压：2.98 kV；锥孔电压：25 V；离子源温度：100 °C；脱溶剂气温度：350 °C；质量范围：50~1200 m/z；分析仪真空度：3.25e-7 mBar；锥孔气体流量：49 L/h；脱溶剂气体流量：790 L/h。

表 2 ESI-LC-MS/MS 液相梯度洗脱程序

Table 2 Gradient eluting procedure of ESI-LC-MS/MS

时间/min	A 相/%	B 相/%
0	90	10
1	90	10
8	10	90
12	10	90
12.1	90	10
13	90	10

1.3.4 PF 对红细胞氧化损伤的保护作用

1.3.4.1 红细胞氧化损伤模型的建立

参考刘玮帆等^[17]的方法，使用 PBS 溶解 PF 后分别配成浓度为 600、700、800、900、1000 μg/mL 的待测液。红细胞悬液在 4 °C 下以 3000 r/min 离心 5 min 去除上清液，再加入适量 PBS 溶液后离心，此步骤重

复三次后将红细胞配成体积比为 6% 的红细胞悬液。取 0.2 mL 红细胞悬液并加入 200 μL 待测液，AAPH 组加入等体积 AAPH 溶液，空白对照组加入等体积 PBS 溶液，与红细胞充分混匀，37 °C 下避光缓和震荡孵育 30 min 后，加入 AAPH 溶液，混匀，相同条件下孵育 2.5 h 后测定实验结果。实验设计三次平行取平均。

1.3.4.2 红细胞溶血率的计算

将孵育结束后的反应液在 4 °C 条件下以 3000 r/min 离心 10 min，上清液使用酶标仪测定 540 nm 处吸光值 A。取相同浓度的红细胞悬液加入等体积的水进行裂解，同样在 540 nm 处测得吸光值 B。

$$\text{溶血率} / \% = \frac{A}{B} \times 100\%$$

1.3.4.3 红细胞氧化损伤实验

将孵育结束后的红细胞用 PBS 洗涤 2~3 次，加入 4 倍体积超纯水裂解细胞，冰浴后于 4 °C、3000 r/min 离心 5 min，上清液保存于 -40 °C 冰箱备用。采用未稀释的裂解液按照试剂盒的操作方法测定 GSH-Px 和 LDH，测定 GSH-Px 和 LDH 的酶活。GSH 的含量测定时，用超纯水将裂解液稀释 5 倍，具体操作按照试剂盒的指示进行。将裂解液稀释 20 倍后，按照试剂盒的方法测定 MDA 的含量。将裂解液稀释 80 倍，按照试剂盒表明的方法测定 SOD 的酶活。以上所有实验重复 3 次。

1.4 数据处理

使用 SPSS 25.0 对实验数据进行单因素方差分析，结果表示为平均值±标准差 (mean±SD)，以 Duncan 多边检验对实验均值进行差异显著分析 (p<0.05)。用 Origin 2018 对分析数据作图。

2 结果与讨论

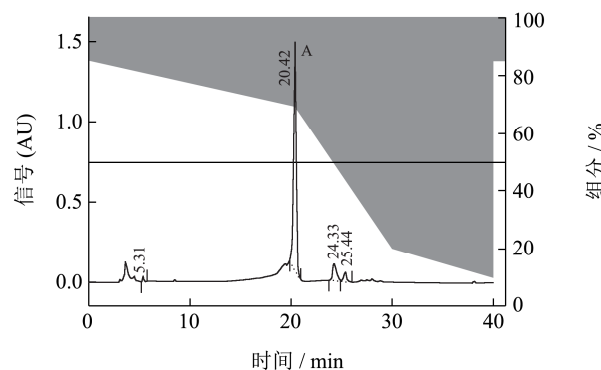


图 1 PF 的制备液相色谱图

Fig.1 Chromatogram of crude flavonoids by preparative RP-HPLC

表 3 PF 化学成分鉴定表

Table 3 Table of chemical constituents from young fruit extract of golden pomelo

名称	化学式	保留时间/min	m/z	含量/%	化合物类型	活性
四羟基查尔酮	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	1.586	272.0685	15.57	黄酮	抗氧化 ^[18] 、抗肿瘤活性 ^[19]
美鼠李苷 A	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	0.815	580.1792	12.62	黄酮甙	抗氧化活性 ^[20]
2-O-咖啡基熊果苷	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	1.36	434.1213	1.60	多酚	抗氧化活性 ^[21]
四氢异喹啉	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂	1.269	193.1103	3.62	生物碱	抗肿瘤活性 ^[22]
(-)-乙酰胆碱	C ₂₂ H ₂₆ O ₆	1.359	386.1729	2.14	生物碱	
石杉碱	C ₂₀ H ₂₅ NO ₆	0.77	375.1682	0.61	生物碱	抑制胆碱酯酶活性 ^[23]
太可斯塔宁	C ₁₁ H ₂₁ NO	0.544	183.1623	0.15	生物碱	
甜菜碱	C ₅ H ₁₁ NO ₂	0.906	117.079	0.13	生物碱	抗氧化活性 ^[11,24]
荷拉林	C ₂₄ H ₄₀ N ₂ O	0.453	372.3141	0.07	生物碱	
水苏碱	C ₇ H ₁₃ NO ₂	1.088	143.0946	1.15	生物碱	抗栓、抗凝 ^[25]
甲基十四酸甲酯	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	1.269	256.2402	19.99	有机酸酯	
乙酸肉桂酯	C ₁₁ H ₁₂ O ₂	1.269	176.0837	3.71	有机酸酯	
乙酸癸酯	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	1.224	200.1776	1.13	有机酸酯	风味物质 ^[26]
甲基十六酸	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	1.994	270.2559	12.16	有机酸	
十四酸	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	1.631	228.2089	2.05	有机酸	
花生酸	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	1.541	312.3028	1.58	有机酸	
芥酸	C ₂₂ H ₄₂ O ₂	1.542	338.3185	0.54	有机酸	
多辛酸	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	1.541	340.3341	0.49	有机酸	
L-丙戊酸酐	C ₁₀ H ₂₀ N ₂ O ₃	1.178	216.1474	0.30	有机酸	
惕格酸	C ₅ H ₈ O ₂	0.906	100.0524	0.13	有机酸	
9,10-二羟基硬脂酸	C ₁₈ H ₃₆ O ₄	0.952	316.2614	0.11	脂肪酸	促胰岛素敏感性 ^[27]
十三烯	C ₁₃ H ₂₆	1.587	182.2034	0.06	烯烃	
十四烯	C ₁₄ H ₂₈	1.631	196.2191	0.10	烯烃	
壬烯醛	C ₉ H ₁₆ O	1.632	140.1201	6.75	烯醛	
薄荷烷	C ₁₀ H ₂₀	5.213	140.1565	4.23	环烷烃	
2-环己烷	C ₁₆ H ₃₂	2.665	224.2504	0.06	环烷烃	
苦树素 a	C ₂₁ H ₂₈ O ₁₀	1.586	440.1682	1.01	其他	
芳香素 A	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₈	1.314	724.2215	0.89	其他	
N-3-甲基-2-丁烯基脒	C ₆ H ₁₂ N ₂ O	1.405	128.095	1.96	其他	
麝香醇	C ₁₆ H ₃₂ O	0.956	240.2453	0.13	其他	
乙氧基-葡萄糖内酯	C ₁₉ H ₁₄ O ₆	0.951	338.079	0.28	其他	
马塔比醚	C ₁₁ H ₁₈ O	0.589	166.1358	0.21	其他	
二甲基精氨酸	C ₁₀ H ₂₃ N	5.394	157.183	4.43	其他	

2.1 金柚幼果黄酮 PF 的制备及化合物种类分析

如图所示,经梯度洗脱后的 CF 共有 6 个明显的尖峰。其中,19.852~20.942 min 的峰面积为 27532.896,标记为峰 A。收集峰 A,冻干后得到 PF。

PF 经 LC-MS 分析后发现共有 33 种物质,含量最高为 12-甲基十四酸甲酯,经鉴定比对,PF 中含有 8

种有机酸、3 种有机酸酯、7 种生物碱以及 2 种黄酮类物质。详细结果如表 2 所示。物质相对含量如图 2a 所示,PF 中有机酸及有机酸酯相对含量最高;黄酮类化合物占 PF 物质含量的 28.19%,两种黄酮类化合物分别为四羟基查尔酮及美鼠李苷,相对含量分别为 15.57%、12.62%。

四羟基查尔酮是 PF 中含量最高的黄酮类化合物,其相对含量为 15.57%。如图 3a 所示,其化合物分子结构独特,含有多个反应中心,可以与多种受体结合,从

而表现出广泛的生物活性, 可以作为有机合成及药物合成中间体^[28], 天然产物提取的查尔酮类化合物具有抗肿瘤、抗菌、抗炎等作用^[19,29]。Zhong 等^[30]使用四羟基查尔酮作为中间体合成出的查尔酮类抗白癜风药物表现出较高的黑素生成能力、抗氧化活性及较低的毒性。小鼠李苷是一种黄酮甙类化合物, 具有一定的抗氧化活性^[20,31]。黄酮甙类物质具有良好的 DDPH 自由基清除能力, 且能够抑制 α -糖苷酶的活性影响糖代谢, 从而对糖尿病小鼠血糖指标有改善作用^[32-34]。

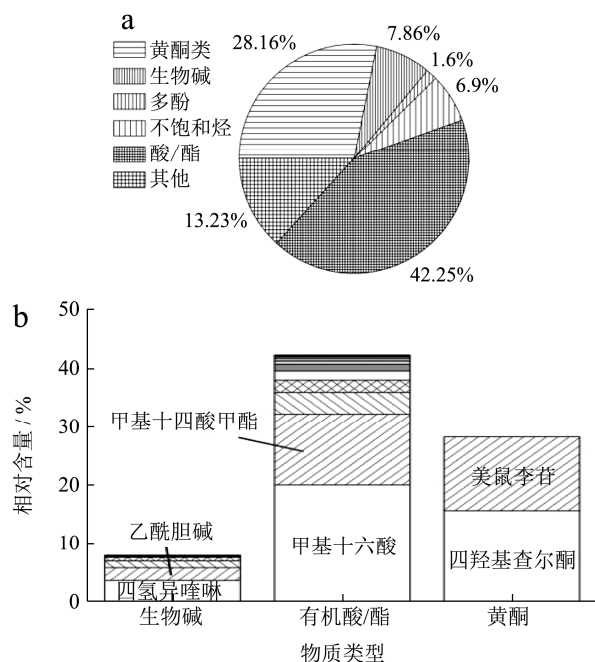


图2 PF 成分相对含量图

Fig.2 Relative content diagram of PF components

2-O-咖啡酰基熊果苷是一种多酚类物质, 最初发现于杜鹃花科熊果属小灌木植物中^[35], 其 DPPH 自由基清除率效果略差于 Vc^[21]。熊果苷能治疗由紫外线诱导的各种皮肤色素作用, 控制羟基自由基的产生熊果苷是酪氨酸酶抑制剂。它阻断多巴及多巴醌的合成, 从而抑制黑素的生成^[36], 在护肤品和发用制品方面有广泛的用途^[37]。水苏碱和甜菜碱为生物碱, 具有抗菌消炎的作用^[38-40]。水苏碱是益母草抗栓、抗凝、降脂的主要有效成分^[25], 已有相关报道表明其对大鼠急性心肌缺血再灌注损伤的保护作用^[41,42], 对 CCl₄ 所致小鼠肝损伤的保护作用^[43,44]。水苏碱主要通过抑制炎症因子的表达和氧化应激以及调节 MMPs/TIMPs 系统来抵抗肝纤维化。水苏碱有望成为治疗肝纤维化的候选药物^[45]。甜菜碱可以保护细胞在高渗透条件下免受损伤。甜菜碱并不能直接清除 AAPH 自由基, 却可以使机体抗氧化酶活力恢复至正常水平, 从而提高植物在逆境中的抵抗能力^[11]。Zhang 等^[24]的研究发现甜菜碱能通过蛋氨酸-同型半

胱氨酸循环提高腺苷甲硫氨酸和蛋氨酸的水平, 提高系统清除活性氧簇的能力。PF 具有多种活性物质, 故推测其具有较好的抗氧化活性, 为下一步 PF 的红细胞抗氧化模型评价奠定基础。

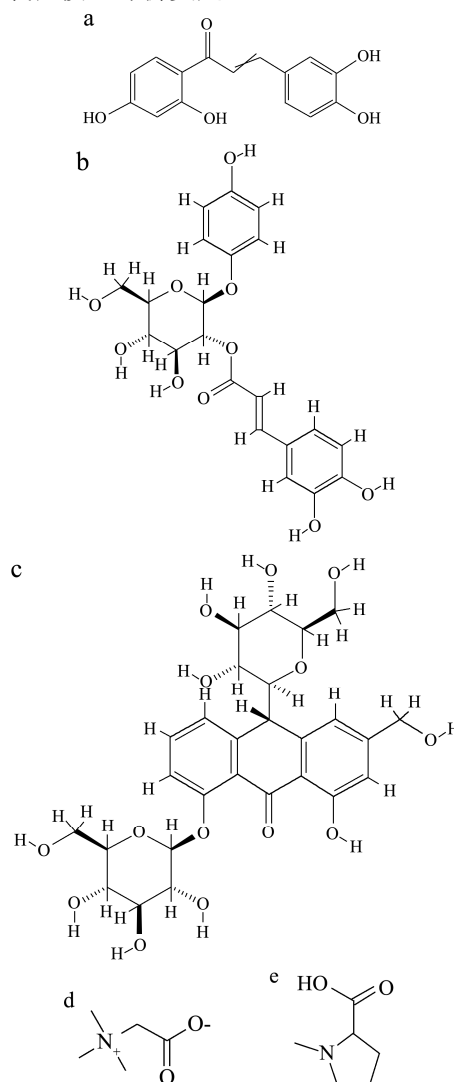


图3 PF 中功能性成分四羟基查尔酮 (a)、熊果苷 (b)、美鼠李苷 (c)、甜菜碱 (d)、水苏碱 (e) 的结构式

Fig.3 Structural formula of tetrahydroxychalcone (a), arbutin (b), Cascaroside (c), betaine (d), stachydrine (e) in PF

2.2 PF 的红细胞抗氧化模型评价

通过 PF 对 AAPH 诱导红细胞溶血模型的保护作用研究发现, 不同浓度 PF 下对 AAPH 诱导的红细胞溶血保护效果表现出剂量反应, 如图 4 所示。在相同的孵育条件下, 阴性组添加 PBS 而不经 AAPH 处理, 自然产生的溶血率为 20.83%, 而 AAPH 组的溶血率为 52.79%, 显著高于经 PF 处理后的实验组 ($p < 0.01$)。当 PF 的含量为 1000 $\mu\text{g/mL}$ 时, 溶血率为 31.63% 与 900 $\mu\text{g/mL}$ 的实验组无显著差异。在陈华敏等^[46]的研究中, 使用 AB-8 大孔树脂纯化高粱糠多酚提取物并

得到五种类别酚, 其中游离酚、束缚型酚和可溶性酯型酚浓度达到 200 $\mu\text{g/mL}$ 时, 红细胞溶血率已降至 10% 与空白组无显著性差异而可溶性苷型酚的溶血率仍为 28.84%, 其中可溶性苷型酚和束缚型苷型酚的抗溶血活性相对较弱, 黄酮与苷酚结构相似, 酯型酚类化合物抗溶血活性更高。

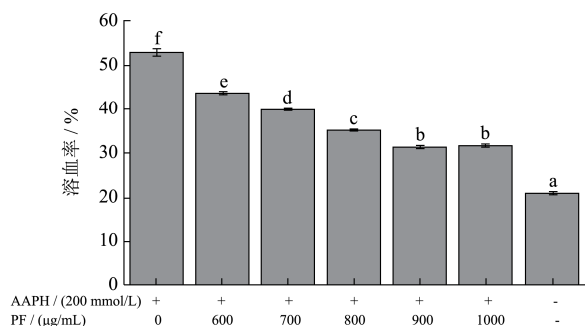


图 4 红细胞受 PF 作用的溶血率

Fig.4 Protective effects of PF on hemolysis of erythrocytes

2.2.1 PF 对非酶促抗氧化体系的影响

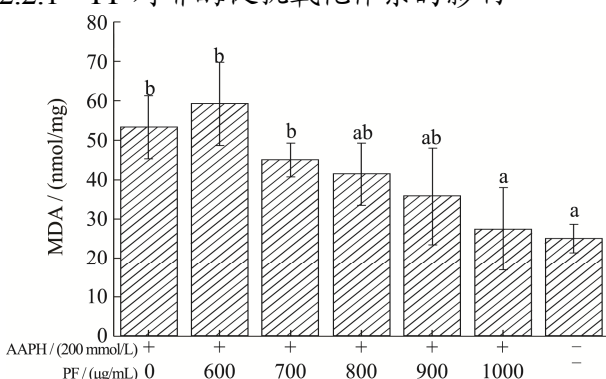


图 5 PF 对氧化应激状态下红细胞中 MDA 的含量的影响

Fig.5 Effect of PF on the content of MDA in erythrocytes under oxidative stress

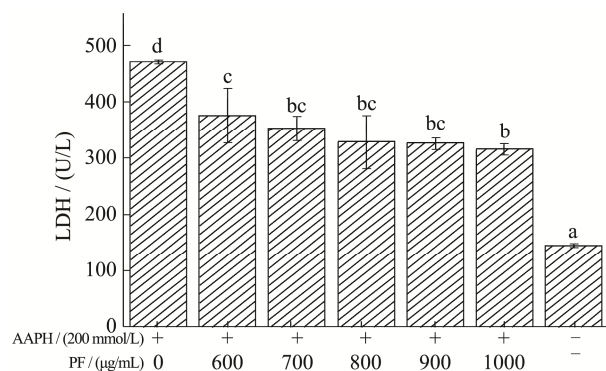


图 6 PF 对氧化应激状态下红细胞中 LDH 的酶活的影响

Fig.6 Effect of PF on enzyme activity of LDH in erythrocytes under oxidative stress

在红细胞氧化溶血模型中, 自由基攻击细胞会造成脂质过氧化反应的产生, 丙二醛 (MDA) 则是脂质过氧化反应中的副产物之一, MDA 的含量被用作胁迫

反应过程的生物标志^[10,47,48]。各组 MDA 的含量如图 5 所示: AAPH 组 MDA 含量显著高于阴性组, 在经过 1000 $\mu\text{g/mL}$ 的 PF 处理后, MDA 的含量为 27.39 nmol/mg 与阴性组 25.01 nmol/mg 无显著差异且在不同浓度实验组之间表现出剂量反应。

乳酸脱氢酶 (LDH) 参与丙酮酸的代谢, 该酶的酶活性与细胞内释放到细胞外的量有关进而可用于表示细胞的受损程度。如图 6 所示, LDH 的酶活随 PF 的浓度升高而降低, AAPH 组 LDH 酶活为 470.85 U/L, 明显高于实验组。当 PF 浓度为 1000 $\mu\text{g/mL}$ 时的 LDH 的酶活为 314.85 U/L, 显著高于浓度为 600 $\mu\text{g/mL}$ 的实验组, 而与 AAPH 组有显著差异, 当 PF 浓度为 1000 $\mu\text{g/mL}$ 时, LDH 的释放量显著高于阴性组。

GSH 广泛存在于细胞中, 既能维持正常的免疫系统功能, 同时参与非酶促抗氧化体系, 可以在 GSH-Px 的催化下与 GSSG 相互转化从而应对氧化应激^[10,49]。GSH 的含量水平可以表征自由基对细胞氧化胁迫反应的程度。图 7 可知, AAPH 组 GSH 含量为 258.40 $\mu\text{mol/L}$, 显著低于经过 PF 处理的实验组, 且实验组在不同浓度下存在一定的剂量反应, 其中 PF 含量大于 900 $\mu\text{g/mL}$ 时, 可以较好维持细胞内 GSH 含量。

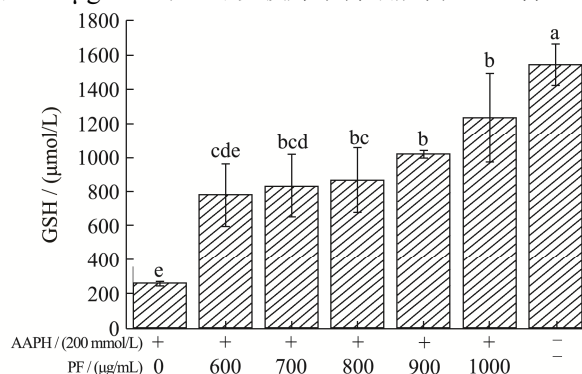


图 7 PF 对氧化应激状态下红细胞中 GSH 的含量的影响

Fig.7 Effect of PF on the content of GSH in erythrocytes under oxidative stress

PF 浓度为 1000 $\mu\text{g/mL}$ 可以阻止细胞膜脂质的过氧化反应, 缓解非酶促抗氧化体系的氧化应激; 在 AAPH 诱发的氧化应激下, 细胞膜的完整性随着 PF 浓度的变化受到不同程度的保护, PF 浓度为 1000 $\mu\text{g/mL}$ 细胞膜仍受到损伤, 但其保护作用表现出与 AAPH 对照组显著的差异, 同时 GSH 的含量随 PF 浓度上升而提高, 说明 PF 具有一定的清除自由基的作用。MDA 的含量下降, LDH 的释放降低, 说明细胞膜完整性上升, PF 对细胞膜具有保护作用, 在王荣等^[50]设计的 AAPH 诱导红细胞溶血模型中, 亚麻木酚素表现出相似的作用机理, 在林恋竹等人^[51]的研究中, 在 250、625、1250 $\mu\text{g/mL}$ 三个浓度下处理的红细胞溶

血率、SOD 酶活、MDA 含量并未表现出明显剂量反应，与多酚黄酮的作用机理不同。

2.2.2 PF 对酶促与抗氧化体系的影响

在红细胞清除自由基的过程中，SOD 是最先发挥作用的抗氧化酶之一，SOD 能催化超氧阴离子发生歧化反应，生成毒性相对较低 H_2O_2 ，再经过 GSH-Px 酶和 CAT 酶的催化后分解^[10,11,49]。由图 8 可知，经 PF 处理后的实验组 SOD 酶活均与阴性组无显著差异，酶活均小于 241.04 U/L；AAPH 组中 SOD 酶活为 1146.21 U/L，差异明显 ($p < 0.01$)，无剂量反应，说明在 AAPH 诱导红细胞氧化系统中，经 PF 处理的实验组红细胞的自由基平衡不通过酶促抗氧化体系完成。

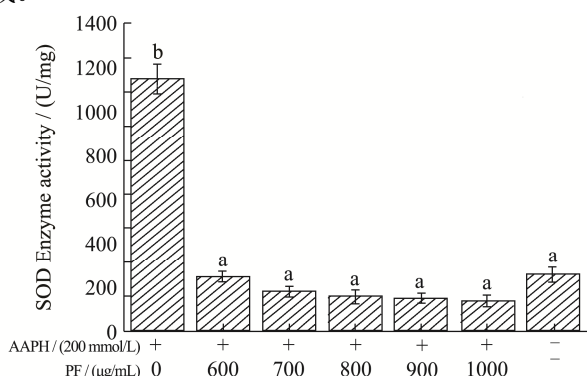


图 8 PF 对氧化应激状态下红细胞中 SOD 的酶活的影响

Fig.8 Effect of PF on enzyme activity of SOD in erythrocytes under oxidative stress

AAPH 自由基诱导剂在水溶液中经热分解会形成相对稳定的过氧自由基，并且会引发自由基链式反应， H_2O_2 也是其中的子产物之一^[11]。由图 9 可知经 AAPH 处理的实验组 CAT 酶活显著高于阴性组 CAT 酶活 (16.99 U/L)，而低于 AAPH 组 CAT 酶活 (198.55 U/L)，说明 AAPH 诱导红细胞氧化的模型中参与过氧化氢分解而导致活性上升。CAT 酶活性的测试与 SOD 酶活实验组相似，并未表现出剂量反应。

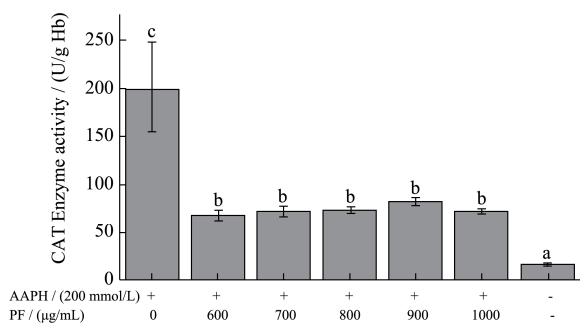


图 9 PF 对氧化应激状态下红细胞中 CAT 的酶活的影响

Fig.9 Effect of PF on enzyme activity of CAT in erythrocytes under oxidative stress

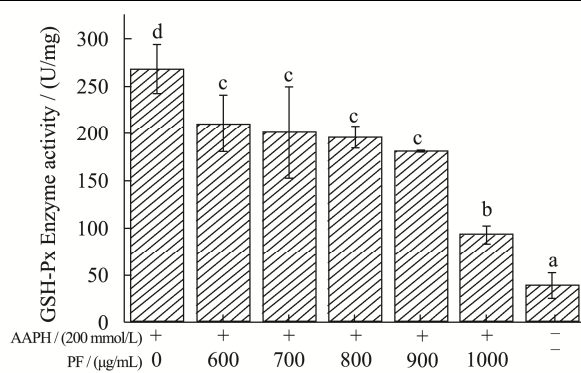


图 10 PF 对氧化应激状态下红细胞中 GSH-Px 的酶活的影响

Fig.10 Effect of PF on enzyme activity of GSH-Px in erythrocytes under oxidative stress

由图 10 可知，在 AAPH 的刺激下，红细胞内的 GSH-Px 活性被激发，AAPH 组的酶活显著高于实验组以及阴性组，当 PF 浓度为 1000 $\mu\text{g/mL}$ 时，GSH-Px 酶活显著低于其余实验组且高于未经 AAPH 处理的阴性组。GSH-Px 参与红细胞内的酶促抗氧化体系^[52]，同时参与催化 GSH 与 GSSG 的相互转化。结合 SOD 酶活和 CAT 酶活的结果，酶促抗氧化体系并不是此模型中应对氧化应激的主要通路，所以主要是 GSH 与 GSSG 的相互转化使得 GSH-Px 的需求量增加。

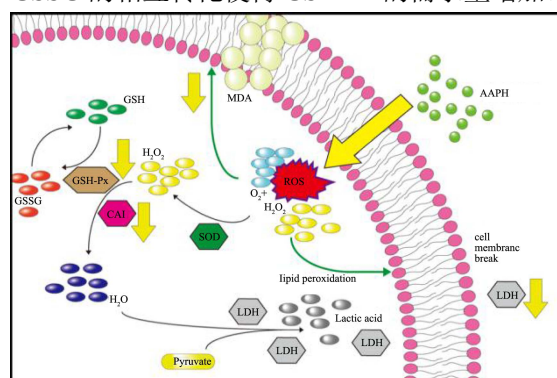


图 11 经 PF 处理后抑制 AAPH 引起的氧化损伤的红细胞内抗氧化机理

Fig.11 Mechanism of intracellular antioxidant in red blood cells after PF treatment to inhibit oxidative damage induced by AAPH

综上所述，经 PF 处理的实验组在 AAPH 诱导红细胞氧化模型中可以起到抑制红细胞溶血的作用。1000 $\mu\text{g/mL}$ 时 MDA 含量为 27.39 nmol/mL 与阴性组 25.01 nmol/mL 无明显差异，LDH 酶活为 314.75 U/L 高于阴性组 144.96 U/L，说明在模型中，细胞膜受到影响，PF 可以起到保护细胞膜的作用。SOD 酶活在不同浓度 PF 处理后未产生剂量反应，说明细胞超氧阴离子并非经 SOD 分解。细胞内 H_2O_2 含量增加导致 CAT 酶活增加；GSH 含量降低而导致 GSH-Px 酶活增加，说明细胞内自由基主要经过非酶促抗氧化体系清除。

综合上述指标,红细胞溶血率降低,完整性得到保护。其内在原因是 PF 缓解了 AAPH 诱导的氧化应激, GSH 含量高于 AAPH 组, SOD 酶活性与对照组无明显差异说明 PF 能直接清除自由基,并以此缓解自由基引起的氧化损伤。PF 中美鼠李苷和 2-O-咖啡酰基熊果苷为抗氧化活性物质,具有清除自由基的能力,在 AAPH 诱导红细胞氧化溶血的模型中,推测可以缓解 GSH 为主的非酶促抗氧化体系氧化应激,减少氧化应激自由基的产生。水苏碱与甜菜碱两种生物碱在 PF 中的含量较低,推测在模型中起到提升酶促体系中 GSH-Px 酶活的作用,从而缓解氧化应激。

3 结论

本研究以金柚幼果为对象,采用制备液相收集黄酮类物质 PF,并使用 ESI-LC-MS 在 PF 中鉴定多种活性物质。通过构建 AAPH 诱导红细胞氧化溶血模型,研究了实验组不同浓度 PF 处理后溶血抑制率的变化,测定了细胞内抗氧化体系中的关键指标,从而推断 PF 的抗氧化作用机理。PF 具有一定的自由基清除能力,可以缓解 AAPH 诱导的红细胞氧化应激,且主要通过非酶促抗氧化体系清除自由基。黄酮提取物中具有抗氧化活性的主要成分为美鼠李苷和 2-O-咖啡酰基熊果苷。该研究为金柚幼果中抗氧化物质综合利用提供新思路,为天然产物开发与应用提供理论依据。

参考文献

- [1] 张鹰,王满生,曾新安,等.金柚柚皮精油提取条件优化及其抑菌性能研究[J].食品工业,2014,5:54-58
ZHANG Ying, WANG Mansheng, ZENG Xin'an, et al. Study on extractive condition optimization of essential oil in pomelo peel of golden-pomelo and antibacterial activity [J]. Food Industry, 2014, 5: 54-58
- [2] Liu H, Zeng X, Huang J, et al. Dietary fiber extracted from pomelo fruitlets promotes intestinal functions, both *in vitro* and *in vivo* [J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 252: 117186
- [3] 林诺怡,刘祎帆,王琴,等.金柚幼果多糖的结构鉴定与免疫调节作用[J].现代食品科技,2020,9:1-8
LIN Nuoyi, LIU Huifan, WANG Qin, et al. Structural characterization and immunomodulatory activity of polysaccharide extracted from pomelo fruitlets [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 9: 1-8.
- [4] 刘祎帆,梁嘉熹,王琴.超声波辅助提取金柚柚皮中柚皮苷的工艺优化及其抗氧化能力研究[J].食品研究与开发,2019, 13
LIU Huifan, LIANG Jiayi, WANG Qin. Study on extraction of naringin from pomelo peel by ultrasound-assisted and its antioxidant ability [J]. Food Research and Development, 2019, 13
- [5] Characterisation of antibacterial peptide fractions extracted from pomelo nucleus co-incubated with *Lactobacillus* [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2020, 55(5)
- [6] 王琴,罗洁莹,柳建良,等.响应面法优化超声-微波协同辅助提取金柚幼果总黄酮工艺[J].食品研究与开发,2020,41(2): 83-91
WANG Qin, LUO Jieying, LIU Jianliang, et al. Optimization of ultrasonic-microwave-assisted extraction of total flavonoids from pomelo young fruit by response surface methodology [J]. Food Research and Development, 2020, 41(2): 83-91
- [7] 陈源.金柑等柑橘类果实黄酮类化合物提取、纯化及分离鉴定[D].福州:福建农林大学,2011
CHEN Yuan. Studies on extraction, purification, isolation and identification of flavonoids from citrus cultivars fruit including *Fortunella crassifolia* Swing [D]. Fuzhou: Fujian University of Agriculture and Forestry, 2011
- [8] 阳梅芳,曾新安,杨星.沙田柚中不同部位黄酮类物质的分布及含量探讨[J].食品工业科技,2013,34(1):89-91
YANG Meifang, ZENG Xinan, YANG Xing. Study on the distribution and content of flavonoids in various parts of Shatian grapefruit [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(1): 89-91
- [9] Wang Q, Luo J, Liu H, et al. Protective effects of the flavonoid fraction obtained from pomelo fruitlets through ultrasonic-associated microwave extraction against AAPH-induced erythrocyte hemolysis [J]. RSC Advances, 2019, 9: 16007-16017
- [10] 何佳易.红细胞氧化模型评价抗氧化活性的方法学研究[D].扬州:扬州大学,2013
HE Jiayi. Methodological study on evaluation of antioxidant activity by erythrocyte oxidation model [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2013
- [11] 张虹,张猛猛,赖富饶,等.甜菜碱保护细胞免受 AAPH 损伤的研究[J].现代食品科技,2016,6:18-23
ZHANG Hong, ZHANG Mengmeng, LAI Furao, et al. Protective effects of betaine on 2,2-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced oxidative stress in cells [J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 6: 18-23
- [12] 张艳梅,敖长金,萨茹丽,等.沙葱总黄酮对过氧化氢诱导的红细胞氧化损伤的保护作用[J].动物营养学报,2019,31(2):

- 858-864
ZHANG Yanmei, AO Changjin, SA Ruli, et al. Protective effect of total flavonoids of *Allium mongolicum* on oxidative damage of red blood cells induced by hydrogen peroxide [J]. Journal of Animal Nutrition, 2019, 31(2): 858-864
- [13] 苏健裕,胡茵,吴萍,等.杨梅酮的体外抗氧化及抗肿瘤活性[J].华南理工大学学报(自然科学版),2019,47(3):107-114,58
SU Jianyu, HU Han, WU Ping, et al. Antioxidation and antitumor activity of myricetin *in vitro* [J]. Journal of South China University of Technology (Natural Science Edition), 2019, 47(3): 107-114, 58
- [14] 于金英,王云红,刘国强,等.HPLC-ESI-MS/MS 分析鉴定茛菪中黄酮类成分[J].中成药,2015,37(3):556
YU Jinying, WANG Yunhong, LIU Guoqiang, et al. Identification of flavonoids in pennillae by HPLC-ESI-MS/MS [J]. Proprietary Chinese Medicine, 2015, 37(3): 556
- [15] 张晓霞,李晓妮,胡爽,等.HPLC-ESI-MS/MS 同时测定四神丸中9种有效成分[J].中草药,2018,49(9):2070-2075
ZHANG Xiaoxia, LI Xiaoni, HU Shuang, et al. Simultaneous determination of nine bioactive components in Sishen pills by HPLC-ESI-MS/MS [J]. Chinese Herbal Medicine, 2018, 49(9): 2070-2075
- [16] Jwa B, Rui Z A, A J, et al. Flavan-3-ols in vitis seeds: their extraction and analysis by HPLC-ESI-MS/MS [J]. Food Research International, 2020, 139
- [17] Huifan, Liu, Hui, et al. The variations, including structures and attenuation to hemolysis, of peptide purified from *Dendrobium aphyllum* during *in vitro* gastro-intestinal digestion and Caco-2 uptake and transportation [J]. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2019, 25(4): 1319-1331
- [18] 段志芳,樊美杉,梁启丽.3种新型查尔酮衍生物的合成及抗氧化活性[J].食品科学,2016,37(23):38-44
DUAN Zhifang, FAN Meishan, LIANG Qili. Synthesis and antioxidant activities of three classes of new chalcone derivatives [J]. Food Science, 2016, 37(23): 38-44
- [19] 林玉萍,虎春艳,郑喜,等.新型4'-(N-取代-1-哌嗪基)查尔酮衍生物的合成及其抗肿瘤活性[J].有机化学,2017,37(1):237-241
LIN Yuping, HU Chunyan, ZHENG Xi, et al. Synthesis and anti-tumor activities of novel 4'-(N-substitued-1-piperaziny) chalcone derivatives [J]. Organic Chemistry, 2017, 37(1): 237-241
- [20] 赵宏亮,杨晓红,张伟敏.诺丽果渣成分分析及抗氧化性研究[J].食品安全质量检测学报,2019,10(2):88-94
ZHAO Hongliang, YANG Xiaohong, ZHANG Weimin. Primary functional components and antioxidant activity of different solvents extracts of noni pomace [J]. Journal of Food Safety and quality Inspection, 2019, 10(2): 88-94
- [21] 付士慧,朱文学.梨花熊果苷提取工艺及体外抗氧化性初步研究[J].河南科技大学学报:自然科学版,2017,38(5):55-59
FU Shihui, ZHU Wenxue. Preliminary study on extraction technology and antioxidant activity of pear arbutin *in vitro* [J]. Journal of Henan University of Science and Technology: Natural Science Edition, 2017, 38(5): 55-59
- [22] 杨扬,郭举,刘站柱.抗肿瘤活性双四氢异喹啉生物碱类似物的合成研究进展[J].有机化学,2019,39(7):1913-1922
YANG Yang, GUO Ju, LIU Zhanzhu. Progress in the synthesis of analogues of bistetrahydro-isoquinoline antitumor alkaloids [J]. Organic Chemistry, 2019, 39(7): 1913-1922
- [23] 许明,宋新波,张丽娟.石杉碱甲的研究进展[J].药物评价研究,2010,33(6):442-446
XU Ming, SONG Xinbo, ZHANG Lijuan. Advances in ressearch on huperzine A [J]. Drug Evaluation Study, 2010, 33(6): 442-446
- [24] Meng Meng, Zhang, Hong, et al. Antioxidant mechanism of betaine without free radical scavenging ability [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(42): 7921-7930
- [25] 陈少如,郑鸿翔,陈韩秋,等.益母草制剂治疗心肌缺血及其机制研究[J].中国危重病急救医学,2002,14(1):19-19
CHEN Shaoru, ZHENG Hongao, CHEN Hanqiu, et al. Curative effect of *Herba leonuri* on myocardial ischemia and its mechanism [J]. Emergency Medicine for Critical Diseases in China, 2002, 14(1): 19-19
- [26] Oliveira M V, Rebocho S F, Ribeiro A S, et al. Kinetic modelling of decyl acetate synthesis by immobilized lipase-catalysed transesterification of vinyl acetate with decanol in supercritical carbon dioxide [J]. Journal of Supercritical Fluids, 2009, 50(2): 138-145
- [27] 于晓明,张月红,刘英华,等.9,10-二羟基硬脂酸对糖尿病小鼠糖代谢的影响[J].卫生研究,2010
YU Xiaoming, ZHANG Yuehong, LIU Yinghua, et al. Effects of 9,10-dihydroxysteatic acid on gulcose metabolism in KKAY mice [J]. Health Research, 2010
- [28] Kim K N, Ko Y J, Yang H M, et al. Anti-inflammatory effect of essential oil and its constituents from fingered citron (*Citrus medica* L. var. *sarcodactylis*) through blocking JNK, ERK and NF- κ B signaling pathways in LPS-activated RAW 264.7 cells [J]. Food & Chemical Toxicology, 2013,

- 57(Complete): 126-131
- [29] 方线文,周丽珍,成昭,等.含氮芥基查尔酮类衍生物的合成、晶体结构及抗肿瘤活性[J].有机化学,2013,33(3):523-529
FANG Xianwen, ZHOU Lizhen, CHENG Zhao, et al. Synthesis, crystal structures and antitumor activity of novel nitrogen mustard-linked chalcones [J]. Organic Chemistry, 2013, 33(3): 523-529
- [30] Zhong H, Zhou J, An X H, et al. Natural product-based design, synthesis and biological evaluation of 2',3,4,4'-tetrahydrochalcone analogues as antivittiligo agents [J]. Bioorganic Chemistry, 2019, 87: 523-533
- [31] 张磊,张媛娥,夏辛珂,等.UPLC-MS/MS 快速鉴定柑橘醋渣中黄酮类成分及其生物活性研究[J].食品科技,2020,348(10):305-311
ZHANG Lei, ZHANG Yuane, XIA Xinke, et al. Rapid identification of the flavonoids from citrus vinegar residue by UPLC-MS/MS and research on its antioxidant activities [J]. Food Science and Technology, 2020, 348(10): 305-311
- [32] 杨文娟,马养民,王兰,等.裂叶荨麻对II型糖尿病小鼠肾脏损伤的保护作用[J].现代食品科技,2019,35(6):24-29
YANG Wenjuan, MA Yangmin, WANG Lan, et al. Protective effect of *Urtica fissa* on kidney injury in type 2 diabetic mice [J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(6): 24-29
- [33] 杨文娟,何亚娟,毛跟年,等.裂叶荨麻醇提物体外抗氧化及 α -葡萄糖苷酶抑制作用的研究[J].食品研究与开发,2020,41(3):1-6
YANG Wenjuan, HE Yajuan, MAO Gennian, et al. Protective effect of *Urtica fissa* on kidney injury in type 2 diabetic mice [J]. Food Research and Development, 2020, 41(3): 1-6
- [34] Liu A, Huang B, Lei L, et al. Production of high antioxidant activity flavonoid monoglucosides from citrus flavanone with immobilised α -L-rhamnosidase in one step [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2019
- [35] 李晓娇,刘忆明. α -熊果苷合成研究进展[J].保山学院学报,2014,2:18-21
LI Xiaojiao, LIU Yiming. Progress in synthesis of α -arbutin [J]. Journal of Baoshan University, 2014, 2: 18-21
- [36] 李安良,杨淑琴,郭秀茹,等.熊果苷的进展[J].日用化学工业,2000,30(2):62-65
LI Anliang, YANG Shuqin, GUO Xiuru, et al. Progress of arbutin [J]. Daily Chemical Industry, 2000, 30(2): 62-65
- [37] 李咏悦,陈雅英.熊果苷在化妆品中的用途[J].日用化学工业,1995,6:31-33
LI Yongyue, CHEN Yaying. The use of arbutin in cosmetics [J]. Daily Chemical Industry, 1995, 6: 31-33
- [38] 鲍守民,贾红梅,邹忠梅,等.马齿苋生物碱的研究进展[J].药物评价研究,2020,43(6):203-211
BAO Shoumin, JIA Hongmei, ZOU Zhongmei, et al. Research progress on alkaloids from whole herb of *Portulaca oleracea* L [J]. Drug Evaluation Study, 2020, 43(6): 203-211
- [39] 陈曦,戚进.荷叶中黄酮和生物碱的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(18):211-214
CHEN Xi, QI Jin. Flavonoids and alkaloids in lotus leaves [J]. Chinese Journal of Experimental Prescription, 2015, 21(18): 211-214
- [40] 周贤春,何春霞,苏力坦·阿巴白克力.生物碱的研究进展[J].生物技术通讯,2006,17(3):476-479
ZHOU Xianchun, HE Chunxia, SULITAN Ababaikeli. Research progress of alkaloids [J]. Biotechnology Newsletter, 2006, 17(3): 476-479
- [41] 马玉红,杨解人.水苏碱对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J].中国实验方剂学杂志,2006,5:40-42
MA Yuhong, YANG Jieren. Protective effect of stachydrine on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats [J]. Chinese Journal of Experimental Prescription, 2006, 5: 40-42
- [42] Miao M, Wang T, Lou X, et al. The influence of stachydrine hydrochloride on the reperfusion model of mice with repetitive cerebral ischemia [J]. Saudi Journal of Biological Ences, 2017, 24(3): 658
- [43] 郭书凯,周艳丽,吕茂盛,等.水苏碱对四氯化碳致小鼠急性损伤的保护作用[J].泰山医学院学报,2018,39(12):1357-1359
GUO Shukai, ZHOU Yanli, LYU Maosheng, et al. Protective effects of stachydrine on acute hepatic injury induced by CCl_4 in mice [J]. Journal of Taishan Medical College, 2018, 39(12): 1357-1359
- [44] 叶绿萍.水苏碱的药理作用研进展[J].河北医药,2016,1:118-121
YE Lyuping. Research advances in pharmacological effects of stachydrine [J]. Hebei Medicine, 2016, 1: 118-121
- [45] Zhang J, Yang A, Wu Y, et al. Stachydrine ameliorates carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis by inhibiting inflammation, oxidative stress and regulating MMPs/TIMPs system in rats [J]. Biomedicine and Pharmacotherapy, 2018, 97: 1586-1594