

金柚柚皮多甲氧基黄酮化合物的提取分离及其油脂抗氧化稳定性

张雅欣¹, 马路凯¹, 吴晖², 成坚¹, 刘祎帆^{1*}

(1. 仲恺农业工程学院轻工食品学院, 广东广州 510550)

(2. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 该研究采用超声辅助结合大孔吸附树脂及制备液相色谱法对金柚柚皮中的多甲氧基黄酮(Polymethoxy Flavonoids, PMFs)物质进行提取分离, 通过液相色谱-质谱(LC-MS)分析柚皮PMFs组分, 结果表明: 金柚柚皮中含有5种PMFs, 分别为川陈皮素、橘皮素、3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮、5-羟基-3,6,7,8,3',4'-六甲氧基黄酮和5-羟基-3,3',7,8-四甲氧基-4',5'-亚甲二氧基黄酮, 含量分别为5.12%、4.29%、4.33%、4.10%和3.07%。金柚柚皮PMFs提取物活性实验表明, 在质量浓度达到2 mg/mL时, 对DPPH、ABTS⁺自由基清除率最大分别为75.90%、78.85%; 在APPH诱导的红细胞溶血模型中, 与APPH组80.20%相比, 0.05 mg/mL PMFs溶血率显著下降为48.89%; 柚皮PMFs提取物对180 °C, 油炸1~5 h油饼中的油脂有抗氧化作用, 与空白组(过氧化值0.16~0.28 g/100 g, 酸价0.36~1.42 mg/g, 茴香胺值4.49~7.08)相比, 添加面粉质量分数1.00%的柚皮PMFs提取物的理化指标变化量较小(过氧化值0.15~0.19 g/100 g, 酸价0.34~1.25 mg/g), 添加面粉质量分数0.50% PMFs使油脂茴香胺值(AV)明显下降(茴香胺值0.91~5.50)。综上所述, 金柚柚皮中含有5种PMFs, 且对自由基有一定的清除效果还具有显著的抑制油脂氧化作用。

关键词: 柚皮多甲氧基黄酮; 结构鉴定; 抗氧化活性

文章编号: 1673-9078(2023)05-89-98

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.5.0726

Extraction and Isolation of Polymethoxylated Flavonoids from Pomelo Peels and the Antioxidant Stability of Its Oils

ZHANG Yaxin¹, MA Lukai¹, WU Hui², CHENG Jian¹, LIU Huifan^{1*}

(1.College of Light Industry and Food Science, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510550, China) (2.School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Polymethoxylated flavonoids (PMFs) were extracted from pomelo (*Citrus maxima*) peels and separated using ultrasound-assisted technology combined with macroporous adsorption resins and preparative liquid chromatography. The PMF components were then analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). The results showed that pomelo peels contained five types of PMFs: citrin, tangerine, 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxy flavonoid, 5-hydroxy-3,6,7,8,3',4'-hexamethoxy flavonoid, 5-hydroxy-3,3',7,8-tetramethoxy-4', and 5'-methylenedioxy flavonoid, with their contents being 5.12%, 4.29%, 4.33%, 4.10%, and 3.07%, respectively. Furthermore, when the PMF concentration reached 2 mg/mL, DPPH and ABTS⁺ free radicals showed maximum scavenging rates of 75.90% and 78.85%, respectively. In the APPH-induced RBC hemolysis model, the hemolysis rate was significantly reduced from 80.20% to 48.89% with 0.05 mg/mL PMFs. In addition, the PMF extract of pomelo peels had an antioxidant effect on oils and fats in oil cake fried at 180 °C for 1~5 h. Compared with the blank group (peroxide value of 0.16~0.28 g/100 g, acid value of 0.36~1.42 mg/g, anisidine value of 4.49~7.08), the physical and chemical indices of the PMF

引文格式:

张雅欣,马路凯,吴晖,等.金柚柚皮多甲氧基黄酮化合物的提取分离及其油脂抗氧化稳定性[J].现代食品科技,2023,39(5):89-98.

ZHANG Yaxin, MA Lukai, WU Hui, et al. Extraction and isolation of polymethoxylated flavonoids from pomelo peels and the antioxidant stability of its oils [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(5): 89-98.

收稿日期: 2022-06-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(32001622; 31771895)

作者简介: 张雅欣(1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: 1261685664@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

extract from pomelo peels with 1% flour content showed little change (peroxide value (0.15~0.19 g/100 g), acid value (0.34~1.25 mg/g), whereas the lipid anisidine value (AV) decreased significantly with 0.5% flour content of PMFs (anisidine value 0.91~5.5). In conclusion, the five types of PMFs in pomelo peels have an optimal scavenging effect on free radicals and exhibit resistance towards lipid oxidation.

Key words: pomelo peel polymethoxylated flavonoid; structural identification; antioxidant activity

柚作为芸香科柑橘属水果,不仅具有较高的营养价值,而且具有较高的药用价值^[1]。柚皮占整个柚子的43%~48%,含有大量有益于人体健康的非营养生理活性成分,如酚类化合物、类黄酮、多糖、类柠檬苦素、香精油、天然色素、膳食纤维等含量均高于柚子果实^[2]。柚子是人们喜爱的水果之一,不但清香、酸甜、凉润,还具有显著的营养和健康促进作用,这与其含有的天然活性物质密切相关。

类黄酮化合物是存在于植物中的一种天然物质,由于生物活性强,毒副作用小,被广泛应用于医药和食品领域,成为国内外天然药物和保健产品的研究热点。柑橘类黄酮一般分为:黄酮、黄烷酮、黄酮醇、异黄酮、花青素和黄烷醇^[3]。黄酮类物质种类丰富,多甲氧基黄酮(Polymethoxy Flavones, PMFs)是柑橘种属中特有的一种黄酮类化合物,具有更多的甲氧基,当接近癌细胞并进入癌细胞时具有更高的疏水性,使其具有更强的生物活性^[4],也是更好的脂溶性物质。不同种质间PMFs含量差异显著,39份宽皮柑橘种质果皮中PMFs的总质量分数变化范围为15.81~3660.94 mg/kg(以鲜质量计)^[5],目前对于柑橘种属中PMFs的研究主要集中在清见蜜柑、陈皮、锦橙皮等。对于柚皮PMFs提取物的成分及抗氧化活性尚不清楚。

柚子盛产于南方,广东、广西、福建三省是国内柚子的主产区,近几年来国内柚子年产量高达近500万t。柚子主要用于鲜销,柚皮中许多活性成分无法合理利用,导致资源浪费和环境污染^[6]。本研究将提取柚皮PMFs,制备型高效液相色谱制备分离柚皮PMFs物质,利用超高效液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)分析柚皮PMFs类物质,得到主成分;测定不同质量浓度柚皮PMFs提取物对清除DPPH自由基、ABTS⁺自由基、红细胞溶血率取的影响,并研究柚皮PMFs对高温下油炸饼中油脂抗氧化稳定性的影响,以期对提高柚皮副产物综合利用率、开发出柚皮基天然抗氧化剂提供指导。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

柚子来源于广东省梅州市五华县金柚种植园。食

用级大豆油,中粮粮油工业有限公司。甲醇、乙腈、甲酸,均为色谱纯,美国天地公司;无水乙醇、茴香胺试剂、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、2,2-二氮-双(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)、过硫酸钾、2,2'-偶氮二异丁基脒二盐酸盐AAPH、氢氧化钾、碘化钾、可溶性淀粉、石油醚30~60℃、乙酸、异辛烷,均为分析纯,上海阿拉丁有限公司。

1.2 仪器与设备

RE-52AA 旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂;SCIENTZ-18 ND 型冷冻干燥机,宁波新芝生物科技股份有限公司;P3500 制备型液相色谱,依利特(苏州)分析仪器有限公司;Waters I class 液相色谱串联Q-ToF 质谱,美国Agilent公司;Infinite M1000 Pro 型酶标仪,TECAN公司;HYG-C 型培养箱,苏州培英实验设备有限公司;JP-020 超声波,深圳市洁盟清洗设备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 多甲氧基黄酮的提取及富集

在清洁和去除杂质后,剥去柚子皮。将柚皮精选洗净,切成1~2 cm大小的小块,在60℃烘箱中烘干,磨粉,过80目筛。根据赵梓燕^[7]的方法提取柚皮PMFs:在41℃的温度下,用90%的乙醇/水溶液作为溶剂(料液比为1:20)进行超声辅助提取,单次提取时间34 min,提取两次。采用HPD300型大孔树脂富集纯化柚皮PMFs,上样质量浓度为10.00 mg/mL,上样流量为4.00 BV/h,上样体积为11 BV;用体积分数7%的乙醇溶液初步洗脱6 BV进行除杂,然后用90%乙醇/水(V/V)溶液以4.00 BV/h的流量洗脱,洗脱5 BV,最后旋转蒸发去除乙醇,冷冻干燥得到柚皮PMFs粗提物。

1.3.2 提取物得率计算公式

$$Y = \frac{m_1}{m_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

Y——得率, %;

m_1 ——提取物干质量, mg;

m_0 ——原料干质量, mg。

1.3.3 制备型高效液相色谱制备分离 PMFs

参考文献方法^[7], 将柚皮多甲氧基黄酮提取物充分溶解后上样于制备液相, 色谱柱: 美国沃特斯 Symmetry Prep C₁₈ 柱 (300 mm×7.80 mm, 10 μm); 流动相: A 相, 0.10% 甲酸/乙腈; B 相, 0.10% 甲酸/水; 流速为 20 mL/min; 洗脱梯度: 0~6 min, 82%~70% B; 6~35 min, 70%~58% B; 35~45 min, 58%~40% B; 45~50 min, 40%~82% B; 流速为 20 mL/min。流动相使用前需经 0.45 μm 微孔滤膜抽滤, 超声脱气; 进样量为 0.65 mL; 柱温为 30 °C; 检测波长为 330 nm。收集峰面积最大的组分。

1.3.4 主要 PMFs 组分的 HPLC/MS 分析

液相色谱条件: 色谱柱为 ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ 1.7 μm (2.1 mm×100 mm); 流动相为 0.10% 甲酸水 (A₂) -0.1% 甲酸乙腈 (B₂)。洗脱梯度: 0~1 min, 80% A₂; 1~9 min, 80%~50% A₂; 9~12 min, 50%~2% A₂; 12~13.50 min, 2% A₂; 13.5~14 min, 2%~80% A₂; 14~17 min, 80% A₂。柱温 40 °C, 进样量: 0.002 mL; 紫外检测波长扫描范围为 200~400 nm。

质谱条件: 使用电喷雾离子源 (ESI), 正负离子模式, 正离子喷雾电压为 3.50 kV, 负离子喷雾电压为 2.50 kV, 质谱鞘气流量 20 mL/min, 辅助气 6.67 mL/min。毛细管温度 325 °C, 以分辨率 70 000 进行全扫描, 扫描范围 150~1 000。

1.3.5 对 DPPH 自由基的清除作用

参照魏鑫悦等^[8]方法并稍作修改。配制 0.25、0.50、1、1.50、2 mg/mL 的柚皮 PMFs 溶液, 以 Vc 溶液 (相同质量浓度) 为对照, 在试管中加入 4 mL 提取液及 4 mL 的 0.20 mmol/L DPPH 溶液, 混匀后于暗处反应 30 min, 测定 517 nm 波长下吸光度 (A₀); 4 mL 无水乙醇和 4 mL DPPH 溶液, 混匀后于暗处反应 30 min, 在 517 nm 处测定吸光度 (A₂); 测定不同浓度 4 mL 样品溶液和 4 mL 无水乙醇的吸光度 (A₁)。

$$C_1 = \left(1 - \frac{A_0 - A_1}{A_2}\right) \times 100\% \quad (2)$$

式中:

C₁——DPPH 自由基清除率, %;

A₀——提取液+DPPH 溶液的吸光度值;

A₂——无水乙醇+DPPH 溶液的吸光度值;

A₁——样品溶液+无水乙醇的吸光度值。

1.3.6 对 ABTS⁺ 自由基的清除作用

按 Zhang 等^[9]的方法并稍作修改。用去超纯水制备 7 mmol/L 的 ABTS 与 2.45 mmol/L 的 K₂S₂O₈ 等体积混合。将混合物置于室温下黑暗 12 h, 用无水乙醇稀释至 734 nm 处的吸光度为 (0.70±0.01)。分别取

2 mL 不同质量浓度 (0.25、0.50、1、1.50、2 mg/mL) 的样品加入 8 mL 上述混合液, 摇匀, 于室温下暗反应 8 min 后在 734 nm 波长下测吸光度 (A_j); 用无水乙醇代替样品测吸光度 (A_i)。用 Vc 替代样品作为对照。

$$C_2 = \frac{A_i - A_j}{A_i} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

A_i——用无水乙醇代替样品的吸光度;

A_j——不同质量浓度的样品加入 ABTS 混合液在 734 nm 波长下的吸光度;

C₂——ABTS⁺ 自由基清除率, %。

1.3.7 对红细胞溶血率的测定

参照刘祎帆等^[10]的方法, 用 PBS 溶解样品, 制备质量浓度分别为 0.05、0.1、0.25、0.5、0.75、1.00 和 1.5 mg/mL 的待测液, 红细胞悬浮液在低温下以 3 000 r/min 的速度离心 10 min 去除悬浮液, 添加适量 PBS 溶液并在相同条件下离心洗涤 3 次后去除上清液, 再用 4 倍的 PBS 稀释红细胞悬浮液。

正常组: 0.40 mL PBS 加入 0.40 mL 的红细胞悬浮液, 在 37 °C 下孵育 30 min。然后添加 0.60 mL PBS 孵育 2 h, 最后加入 6.40 mL PBS 并在 4 °C 下以 3 000 r/min 的速度离心 10 min。

全溶血组: 以蒸馏水代替 PBS 按上述进行相同的处理。

AAPH 组: 在 0.40 mL 的红细胞悬浮液中加入 0.40 mL PBS, 在 37 °C 下孵育 30 min。然后加入 0.80 mL AAPH, 在 37 °C 下孵育 2 h, 最后加入 6.40 mL PBS, 4 °C 下以 3 000 r/min 离心 10 min。

AAPH 诱导的样品组: 在 0.40 mL 的红细胞悬浮液中加入 0.40 mL 不同浓度的样品, 在 37 °C 下孵育 30 min。然后加入 0.80 mL 0.40 mmol/L 的 AAPH, 在 37 °C 下孵育 2 h, 最后加入 6.40 mL PBS 并在 4 °C 下以 3 000 r/min 离心 10 min。

分别取正常组、AAPH 组、样品组的上清液在 540 nm 处测吸光值 (A), 取全溶血组的上清液测吸光值 (B)。溶血率 (%) 按以下公式计算:

$$H = \frac{A}{B} \times 100\% \quad (4)$$

式中:

H——溶血率, %;

A——正常组、AAPH 组、样品组的上清液的吸光值;

B——全溶血组的上清液的吸光值。

1.3.8 对油饼抗氧化性稳定性的影响

以面粉质量计算, 分别加入其质量分数 0.05%、0.10%、0.25%、0.50%、1% 的柚皮 PMFs 提取物, 与

面粉充分混匀做成饼,以空白组作对照。取一定量的油在 180 °C 的油温下连续加热 5 h,在此期间每隔 1 h 加入面饼,煎炸 10 min 后捞出。然后将油饼切成小块于广口瓶中,加入样品体积 2~3 倍的 30~60 °C 石油醚,混匀,静置浸提 1 h 以上,过滤后,并于 35 °C 水浴中旋转蒸发去除有机溶剂,残留油脂即为待测样品。测定 1、2、3、4 和 5 h 油饼中油脂的过氧化值、酸价和茴香胺值 (Anisidine Value, AV) 分别参照 GB 5009.227-2016 滴定法、GB 5009.229-2016 冷溶剂指示剂滴定法和 GB/T 24304-2009 《动植物油脂茴香胺值的测定》,每组测 3 次取平均值。

1.4 数据分析

使用 SPSS 25.0 对实验数据进行单因素方差分析,实验表示为平均值±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 结果与分析

2.1 柚皮提取物得率计算

柚皮经提取及富集后,提取物得率为 4.12%。

2.2 柚皮中 PMFs 的制备及化合物种类分析

图 1 为柚皮 PMFs 提取物的制备色谱图,使用乙腈-水作为流动相进行梯度洗脱,分离各目标化合物。

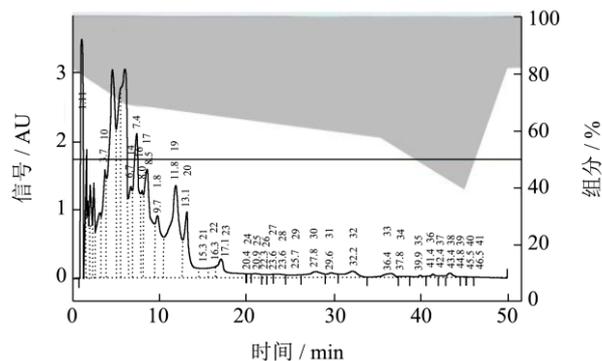


图 1 柚皮 PMFs 的制备液相色谱图

Fig.1 Chromatographic diagram of preparation of pomelo peel polymethoxy flavonoids

如图 1 所示,经梯度洗脱后的柚皮 PMFs 共有 17 个明显的尖峰。其中, 1.09~17.11 min 的峰面积为 1 017 258.80,标记为峰 A。收集峰 A,冻干后得到 PMFs 化合物。

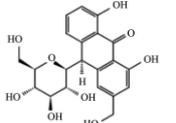
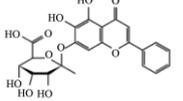
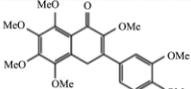
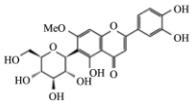
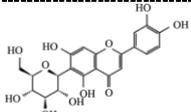
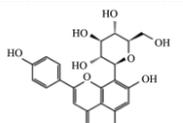
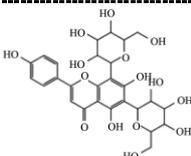
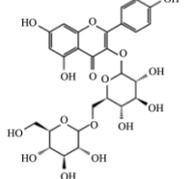
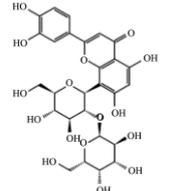
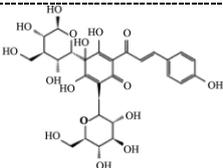
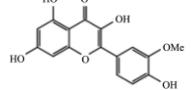
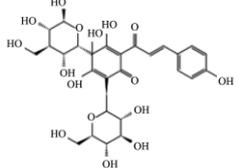
金柚柚皮 PMFs 化合物经 LC-MS 分析后发现共有 27 种物质,主要包括查尔酮类 4 种、碳苷类 1 种,类黄酮 22 种。其中类黄酮物质相对含量最高为 73.64%,类黄酮物质中,黄酮和黄烷酮含量相对较高,分别为 47.07% 和 19.43%;黄酮中含有的 PMFs 类物质有 5 种分别为川陈皮素、橘皮素、3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮、5-羟基-3,6,7,8,3',4'-六甲氧基黄酮和 5-羟基-3,3',7,8-四甲氧基-4',5'-亚甲二氧基黄酮,含量分别为 5.12%、4.29%、4.33%、4.10% 和 3.07%。详细结果如表 1 所示。

表 1 PMFs 化学成分鉴定表

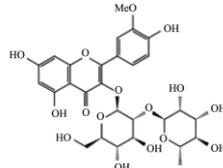
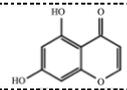
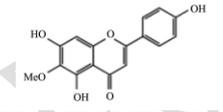
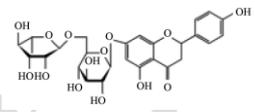
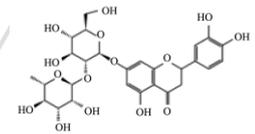
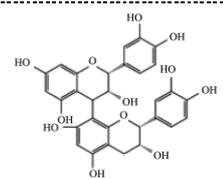
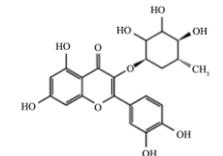
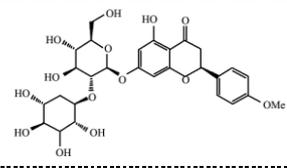
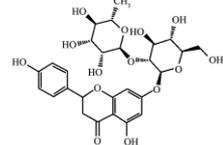
Table 1 Identification table of chemical composition of polymethoxy flavonoids

名称	化学式	保留时间/min	m/z	含量/%	化合物类型	结构式
6,7,4'-三羟基异黄酮	$C_{15}H_{10}O_5$	187.31	271.06	0.52	异黄酮/类黄酮	
5-羟基-3,3',7,8-四甲氧基-4',5'-亚甲二氧基黄酮	$C_{20}H_{18}O_9$	388.36	753.15	3.07	黄酮/类黄酮	
5-羟基-3,6,7,8,3',4'-六甲氧基黄酮	$C_{21}H_{22}O_9$	913.04	829.51	4.10	黄酮/类黄酮	
黄腐醇	$C_{21}H_{22}O_5$	811.70	355.15	0.66	查耳酮	
橘皮素	$C_{20}H_{20}O_7$	684.19	373.13	4.28	黄酮/类黄酮	
川陈皮素	$C_{21}H_{22}O_8$	620.48	403.14	5.12	黄酮/类黄酮	

续表 1

名称	化学式	保留时间/min	<i>m/z</i>	含量/%	化合物类型	结构式
芦荟苷	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	466.32	419.14	3.27	碳苷类	
黄芩苷	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	854.67	429.09	1.82	黄酮醇/类黄酮醇	
3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮	C ₂₂ H ₂₄ O ₉	659.18	433.15	4.33	黄酮醇/类黄酮醇	
日当药黄素	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	853.43	445.12	3.64	黄酮/类黄酮	
异荭草苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	91.41	449.11	2.51	黄酮/类黄酮	
牡荆素	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	104.88	565.16	4.00	黄酮/类黄酮	
维采宁-2	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	75.63	577.16	0.58	黄酮/类黄酮	
山柰酚-3-O-龙胆二糖苷	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	230.41	593.15	10.66	黄酮醇/类黄酮醇	
荭草素-2'-O-β-L-半乳糖苷	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	81.70	611.16	1.70	黄酮/类黄酮	
羟基红花黄色素 A	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₆	873.41	758.22	3.97	查尔酮	
异鼠李素-3-O-新橙皮苷	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	72.06	787.23	0.37	黄酮醇/类黄酮醇	
野漆树苷	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	103.44	827.23	3.85	黄酮/类黄酮	

续表 1

名称	化学式	保留时间/min	<i>m/z</i>	含量/%	化合物类型	结构式
异鼠李素	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	461.78	315.05	2.25	黄酮醇/类黄酮醇	
5,7-二羟基色原酮	C ₉ H ₆ O ₄	115.68	177.02	4.34	查尔酮	
高车前素	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	443.82	299.06	0.01	黄酮/类黄酮	
芸香柚皮苷	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	199.98	579.17	1.30	黄酮/类黄酮	
新北美圣草苷	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₅	137.23	595.17	3.92	黄酮/类黄酮	
原花青素 B2	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	232.11	753.19	4.22	花青素/类黄酮	
槲皮苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	71.02	771.20	4.30	黄酮类/类黄酮	
枸橼苷	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₄	540.25	885.28	4.69	黄酮/类黄酮	
柚皮苷	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	359.12	871.28	2.41	双氢黄酮/类黄酮	

如表 1 所示，柚皮 PMFs 化合物中类黄酮物质含量为 73.64%。柑橘类黄酮是多酚类化合物的次生代谢产物，主要存在于柑橘属果实的皮、肉、籽中，通常皮含有更多的类黄酮，它们有一个共同的基本骨架，包括两个芳香环（A 环和 B 环）和一个吡喃环（C 环）（图 2a）^[11]。C6-C3-C6 基本骨架被不同位点和数量的羟基、甲氧基、糖苷等官能团取代，构成了类黄酮的多样性和多同分异构性^[12]。国内外研究表明，柑橘属类黄酮具有抗炎、抗氧化、抗癌、抗高血压、降血脂、保护心脏、预防动脉粥样硬化、抗菌等活性^[13]。

如表 1 所示，柚皮中 PMFs 含量为 20.91%。以间苯二酚为原料，经过八步反应合成了柑橘皮中常见的类黄酮化合物，如川陈皮素、橘皮素、3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮等，虽然它们的含量不高，但其生物活性高于普通类黄酮化合物，因此受到了更多的关注。川陈皮素结构式如图 2b 所示，黄酮核上有六个甲氧基，分布于 A 环的 5、6、7、8 位和 B 环的 3'、4'位，具有抗氧化、抗癌、抗炎、调节脂质代谢等多种活性。王景翔等^[14]研究了陈皮提取物黄酮类化合物（主要是川陈皮素）总抗氧化能力、对有机自由基、羟自由基

的抑制与提取物黄酮类化合物浓度有很强的量效关系。柑橘中的川陈皮素具有很高的清除自由基和抗脂质过氧化物的活性, 可以对抗大多数代谢性疾病中脂质氧化, 在糖尿病大鼠中, 心脏抗氧化酶如 SOD、CAT、GPx 和 GR 显著降低, 并在川陈皮素治疗后显著恢复正常^[15]。研究表明川陈皮素能强烈对抗新陈代谢以时钟基因依赖的方式出现综合症, 饮食诱导肥胖在小鼠中, 川陈皮素提高了时钟蛋白水平, 并引起显著的反应, 通过直接激活维甲酸重建基因表达受体相关的孤儿受体。研究表明 50、200 mg/kg 柑橘皮提取物中分别含 13.50、54.00 mg/kg 川陈皮素, 处理胆管结扎雄性 ICR 小鼠 (5~6 周龄), 4 周后血浆中 IL-2、IL-4、IL-6、TNF- α 、AMPK 等促炎细胞活性明显降低, 说明柑橘皮提取物对胆汁淤积症具有抗炎作用^[16]。在体外和体内进行的大量研究表明, 川陈皮素及其衍生物在不同细胞和分子水平上具有成为有效癌症化学预防剂的巨大潜力^[17]。橘皮素结构式如图 2c 所示, 含有 5 个甲氧基。研究表明橘皮素具有多种药理活性, 包括抗炎、抗氧化、抗癌、抗代谢失调、神经保护等^[18]。Li 等^[19]评估了橘皮素在牛 II 型胶原诱导的关节炎大鼠中的抗氧化和抗炎特性; 结果表明, 橘皮素上调 NF-2 信号通路, 从而抑制氧化应激和炎症。Miyata 等^[20]经实验发现橘皮素可以降低小鼠前脂肪细胞系 3T3-L1 上的细胞内甘油三酯。

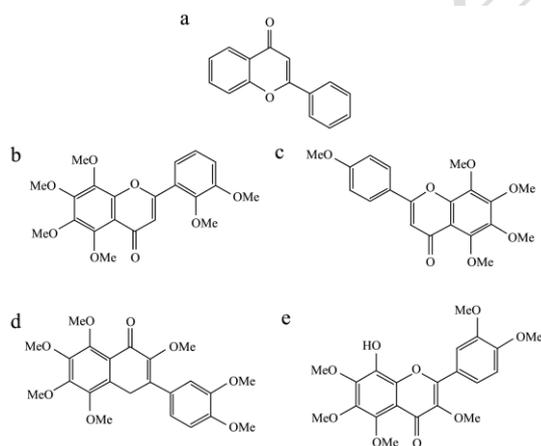


图 2 柚皮类黄酮化合物中类黄酮骨架 (a)、橘皮素 (b)、橘皮素 (c)、3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮 (d)、5-羟基-3,5,6,7,8,3',4'-六甲氧基黄酮 (e) 的结构式

Fig.2 The structural formulas of flavonoids, flavonoid skeleton (a), Nobiletin (b), Tangeretin (c), 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone (d), 5-Hydroxy-3,5,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone (e) in pomelo peel

研究表明 3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮具有一定的抗肿瘤、抗氧化的作用^[21], 其结构式如图 2d, 含有 7 个甲氧基。胡燕飞等^[22]从柑皮低极性部分中分离得到

3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮, 可抑制白血病细胞的生长。评估了柑橘果皮分离的所有化合物对 RANKL 诱导的 BMM 破骨细胞生成受体激活剂的抑制作用, 结果表明, 3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮通过抑制 RANKL 介导的 c-Fos 信号传导减弱破骨细胞分化, 此外, 它可能在治疗或预防骨吸收相关疾病方面具有治疗潜力, 如骨质疏松^[23]。

研究表明 5-羟基-3,5,6,7,8,3',4'-六甲氧基黄酮参与人 AGS 癌细胞中死亡受体相关凋亡介质的诱导^[24]; 有研究显示其有抗 HIV-1 的活性并抑制 HIV-1 逆转录酶^[25]; 研究表明其可通过 p53 和 BAX 依赖性方式诱导细胞凋亡和细胞周期停滞^[26]。

柚皮 PMFs 具有多种活性物质, 推测 PMFs 具有良好的抗氧化活性, 这为下一步柚皮 PMFs 抗氧化模型评价奠定了基础。

2.3 柚皮 PMFs 抗氧化活性的测定

2.3.1 不同浓度对柚皮 PMFs 提取物抗氧化活性的影响

DPPH 自由基是一种合成的稳定的自由基。PMFs 溶液和 Vc 可提供与 DPPH 自由基结合的电子, 减少 DPPH 自由基, 从而改变溶液的颜色和吸光度。由图 3a 可以看出, 在 0.25~1.50 mg/mL 的 PMFs 溶液范围内, DPPH 自由基的清除率为 41.22%~72.58%, 清除能力逐渐增强并迅速增加; 2.00 mg/mL 的 PMF 清除率最大为 75.90%。而 Vc 对 DPPH 自由基清除能力较稳定 2.00 mg/mL 的 Vc 清除率最大为 74.17%, 略低于 PMFs。在低浓度下, 柚皮 PMFs 和 Vc 的清除率相差较大, 但随着浓度的增加差异逐渐减小。总的来说, 柚皮 PMFs 对自由基也有很好的清除能力。研究表明, 柑橘皮黄酮提取物具有抗氧化特性, 是清除自由基的天然成分^[27]。

ABTS 与过二硫酸钾反应可以生成绿色的 ABTS⁺ 自由基, 其最大吸收波长为 734 nm, 其浓度可通过测量 734 nm 处的吸光度来确定。在 ABTS 溶液中添加该物质后, 如果溶液褪色且在 734 nm 处吸光度降低, 则该物质具有抗氧化能力。如图 3b 可知, 在 0.25~1.50 mg/mL 的 PMFs 溶液范围内, 其 ABTS⁺ 自由基清除率显著提高, 而当 PMFs 浓度为 0.50~2.00 mg/mL 时, 对 ABTS⁺ 自由基清除能力没有显著差异, 此时大多数自由基可能已被清除, 2.00 mg/mL 柚皮 PMFs 对 ABTS⁺ 自由基清除率最大为 78.85%。在试验的浓度范围内, Vc 对 ABTS⁺ 自由基的清除能力更强, 这可能是由于多种 PMFs 的拮抗作用, 削弱了 PMFs 清除 ABTS⁺ 自由基的能力^[28]。

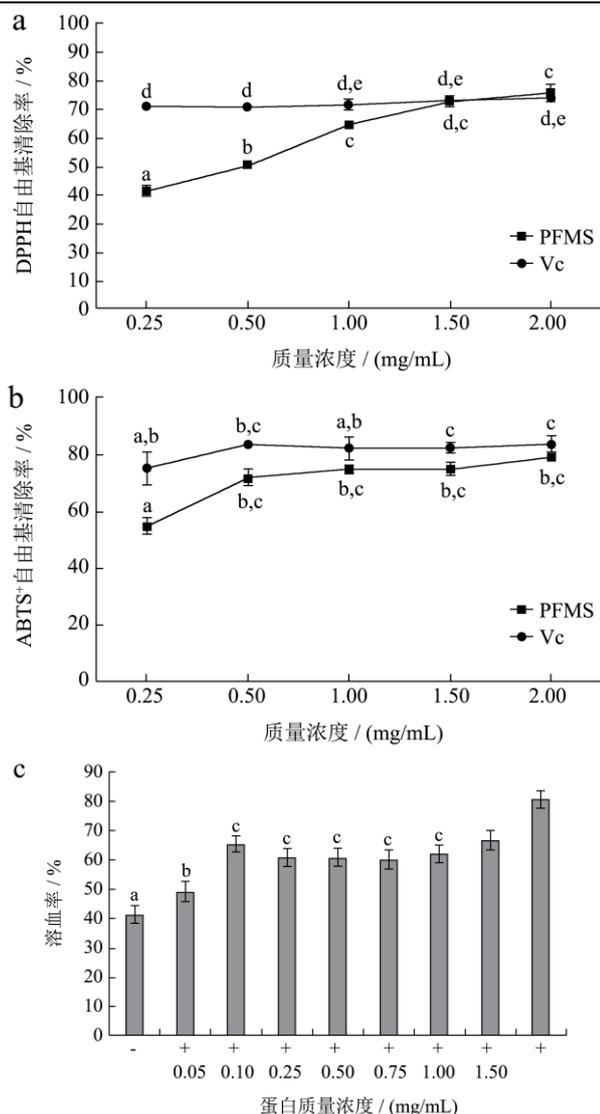


图3 柚皮 PMFs 提取物浓度对抑制 DPPH 自由基 (a)、ABTS⁺ 自由基 (b) 和红细胞溶血率 (c) 的影响

Fig.3 Effects of PMFs extract concentration on inhibition of DPPH free radical (a), ABTS free radical (b) and hemolysis rate of red blood cells (c) in pummelo peel

注: 图上字母不同表示组间差异显著 ($P < 0.05$), 下同。

红细胞在 APPH 作用下产生大量的自由基, 其细胞膜表面含有多种不饱和脂肪酸, 容易引起脂质过氧化现象, 破坏细胞膜的完整性, 导致溶血。一些抗氧化剂, 如黄酮和多酚等可以保护细胞膜免受损伤, 并抑制溶血现象的产生^[29]。因此, 通过模拟 AAPH 引起的红细胞损伤, 研究了 PMFs 对红细胞的保护功能和抗氧化活性。如图 3c 所示, 样品组的溶血率与 AAPH 组相比有显著差异, 经不同浓度的 PMFs 处理后, 溶血率降低了 13.75%~31.31%, 其中 0.05 mg/mL 的 PMFs 的溶血率最低, 达到 48.89%, 表明 PMFs 对氧化应激的红细胞具有保护作用。然而, PMFs 浓度的增加会降低对红细胞的保护作用, 其中的机制需要进

一步实验探索。在纳雨农等^[30]的研究中, 金柚柚果黄酮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。

综上所述, 柚皮 PMFs 其具有一定的抗氧化活性。结果与千里香中 PMFs 具有抗氧化活性一致^[31]。

2.3.2 对油饼抗氧化性稳定性的影响

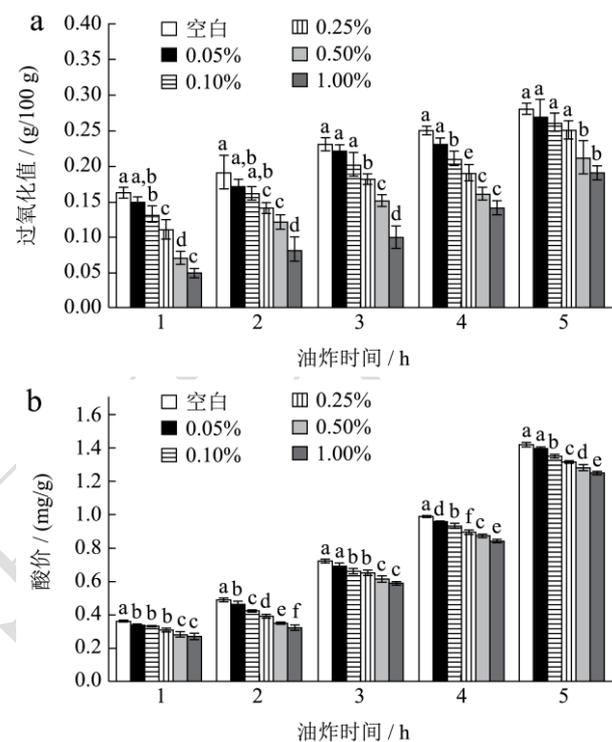


图4 180 °C 连续加热煎炸 5 h 条件下油饼中油脂过氧化值 (a) 和酸价 (b) 随时间的变化比较

Fig.4 Comparison of oil peroxide value (a) and acid value (b) of oil cake with time under continuous heating and frying for 5 h at 180 °C

过氧化值、酸价是评价油脂质量的重要指标^[32]。过氧化值是测定油脂氧化初期的指标, 酸价是测定脂肪酸等化合物中羧酸根的含量, 随着贮藏期的延长和油脂的酸败, 过氧化值、酸价也呈上升趋势。由图 4 可知, 180 °C 下随着油炸时间的延长, 各组样品的过氧化值和酸价逐渐增加。与空白组相比, 添加不同浓度的 PMFs 提取物对油饼中的油脂氧化都有一定的延缓作用, 其添加水平与油脂的抗氧化能力存在量效关系, 这可能与柚皮 PMFs 总的纯度及其含有 PMFs 的种类有关。空白组油饼中油脂的过氧化值和酸价的变化量分别为 (过氧化值 0.16~0.28 g/100 g, 酸价 0.36~1.42 mg/g), 而添加 1.00% 柚皮 PMFs 提取物的理化指标变化量较小 (过氧化值 0.15~0.19 g/100 g, 酸价 0.34~1.25 mg/g)。如图 4a 所示, 在相同煎炸时间和相同添加物的不同添加水平下, 在 3、5 h 时, 0.05%、0.10%

的添加量之间没有显著差异,而高浓度的添加量 0.50%、1.00% 的抗氧化能力显著优于低浓度下的抗氧化能力。如图 4b 所示,在 1、3 h 时,1.00% 和 0.50%、0.25% 和 0.10% 的添加量之间没有显著差异。有研究表明,柚皮中的总黄酮可以提高食用油的抗氧化能力,并显著延缓油脂氧化变质^[33]。单杨等^[34]研究了 PMFs 单体的抗氧化功能,结果表明 PMFs 具有一定的抗亚油酸氧化能力。

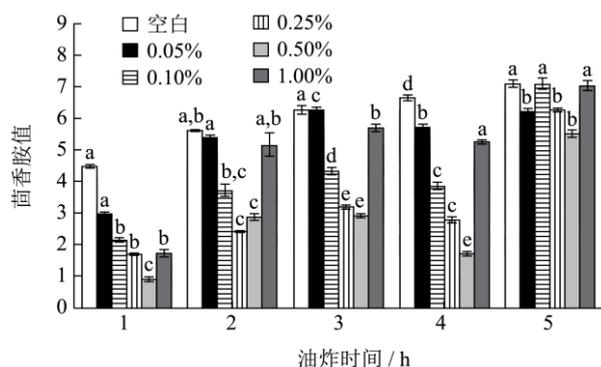


图 5 180 °C 连续加热煎炸 5 h 条件下油饼茴香胺值随时间的变化比较

Fig.5 Comparison of anisidine value of oil cake with time under the condition of continuous heating and frying at 180 °C for 5 h

茴香胺值反映了油脂中非挥发的次级氧化产物,是脂肪酸氢过氧化物特别是油脂中非挥发性醛含量的一个指标^[35]。柚皮 PMFs 提取物对油饼中油脂产生醛类的影响见图 5,空白组油样产生的醛类化合物含量随着煎炸时间的增加而增加,PMFs 能降低油脂 AV 增长速度,并导致 AV 明显增加、减少、再增加的趋势。这是正常现象,抗氧化剂导致 AV 明显呈上升、下降、再上升的波浪式上升结果^[36]。添加柚皮 PMFs 提取物可有效抑制醛类化合物产生,与空白组(茴香胺值 4.49~7.08)相比,添加面粉质量的 0.50% 柚皮 PMFs (茴香胺值 0.91~5.50) 使油脂 AV 明显下降。

3 结论

本研究以金柚柚皮为对象,采用制备液相色谱法对 PMFs 物质进行提取分离,并使用 LC-MS 在柚皮 PMFs 中鉴定多种活性物质,柚皮 PMFs 提取物中类黄酮化合物含量为 73.64%。其中多甲氧基黄酮类物质有 5 种分别为川陈皮素、橘皮素、3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮、8-羟基-3,5,6,7,3',4'-六甲氧基黄酮和 5-羟基-3,3',7,8-四甲氧基-4',5'-亚甲二氧基黄酮,含量分别为 5.12%、4.29%、4.33%、4.10% 和 3.07%。

体外抗氧化实验表明,柚皮 PMFs 对 DPPH 和 ABTS⁺ 自由基具有一定的清除能力,在一定的范围内存在量效关系,对 AAPH 诱导红细胞溶血率有抑制作

用。当 PMFs 浓度达到 2.00 mg/mL 时,对 DPPH、ABTS⁺ 自由基清除率最大,分别为 75.90%、78.85%;一定浓度的柚皮多甲氧基黄酮可以缓解 AAPH 诱导的红细胞氧化应激。油脂抗氧化试验表明,在测试时间内,柚皮 PMFs 提取物可显著减缓高温下脂质的氧化速度。与空白组相比,质量分数为 1.00% 的柚皮 PMFs 对油脂酸价和过氧化值降低有显著性差异,而质量分数 0.50% 的柚皮 PMFs 抑制油脂茴香胺值有显著性差异。因此,研究和开发柚皮 PMFs 物质成为合成抗氧化剂替代品,具有重要意义。

参考文献

- [1] 郭畅,傅曼琴,徐玉娟,等.沙田柚皮精油分子蒸馏分离及成分分析[J].现代食品科技,2018,34(6):260-266.
- [2] 曾心悦,黄嘉泳,袁显和,等.梅州金柚柚皮膳食纤维的理化性质分析[J].现代食品科技,2020,36(4):73-81,303.
- [3] 单杨,刘娟,王振,等.生物合成柑橘类黄酮研究进展[J].中国食品学报,2019,19(11):1-13.
- [4] He B, Nohara K, Park N, et al. The small molecule nobilentin targets the molecular oscillator to enhance circadian rhythms and protect against metabolic syndrome [J]. Cell Metabolism, 2016, 23(4): 610-621.
- [5] 王彤,叶子茂,刘梦雨,等.多甲氧基黄酮在不同宽皮柑橘品种组织中的积累变化规律[J].浙江大学学报(农业与生命科学版),2021,47(6):729-735.
- [6] 石敏,何春玫,胡金贵,等.柚皮中黄酮类化合物提取工艺研究进展[J].大众科技,2021,23(4):41-44.
- [7] 赵梓燕.柑橘果实多甲氧基黄酮的提取、富集与分离纯化方法研究[D].重庆:西南大学,2018.
- [8] 魏鑫悦,陈克保,关统伟.攀枝花黑松露多糖的抗氧化和降血糖活性[J].现代食品科技,2022,38(3):1-7.
- [9] ZHANG Shilin, DENG Peng, XU Yuchao, et al. Quantification and analysis of anthocyanin and flavonoids compositions, and antioxidant activities in onions with three different colors [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2016, 15(9): 2175-2181.
- [10] Huifan, Liuhui, 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.
- [11] 黄睿,沈淑好,陈虹霖,等.柑橘类黄酮的生物学活性及提高生物利用度技术研究进展[J].食品科学,2019,40(1):319-326.
- [12] 宋博.柑橘类黄酮 PMFs 的生物节律紊乱调节能力及其机

- 理研究[D].杭州:浙江大学,2021.
- [13] 梁曾恩妮,苏瑾,付复华,等.柑橘类黄酮的抗炎机制研究进展[J].湖南农业科学,2020,3:113-116.
- [14] 王景翔,于宏伟,胡瑞省.川陈皮素研究进展[J].安徽农业科学,2011,39(13):7731-7733.
- [15] Sundaram R, Shanthi P, Sachdanandam P. Effect of tangeretin, a polymethoxylated flavone on glucose metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Phytomedicine*, 2014, 21(6): 793-799.
- [16] Lim S W, Lee D R, Choi B K, et al. Protective effects of a polymethoxy flavonoids-rich *Citrus aurantium* peel extract on liver fibrosis induced by bile duct ligation in mice [J]. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2016, 9(12): 1158-1164.
- [17] Wu Y, Cheng C S, Li Q, et al. The application of *Citrus folium* in breast cancer and the mechanism of its main component nobiletin: a systematic review [J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021, 2021(73): 1-15.
- [18] 潘红波,王衬衬,谢典,等.橘皮素药理作用及其机制研究进展[J].江西科技师范大学学报,2020,6:80-84.
- [19] Li X, Xie P, Hou Y, et al. Tangeretin inhibits oxidative stress and inflammation via upregulating Nrf-2 signaling pathway in collagen-induced arthritic rats [J]. *Pharmacology*, 2019, 104(3-4): 187-195.
- [20] A Y M, A H T, A A S, et al. Regulation of adipocytokine secretion and adipocyte hypertrophy by polymethoxyflavonoids, nobiletin and tangeretin [J]. *Life Sciences*, 2011, 88(13-14): 613-618.
- [21] 任洪民,张金莲,罗雪晴,等.HPLC 法测定不同枳壳饮片中 3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮的含量[J].时珍国医国药,2018, 29(11):2604-2605.
- [22] 胡燕飞,王长海.微波法提取陈皮中 3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮及其含量测定[J].烟台大学学报(自然科学与工程版), 2005,1:45-49.
- [23] Vu T O, Tran P T, Seo W, et al. Flavonoids from the peels of *Citrus unshiu* Markov. and their inhibitory effects on RANKL-induced osteoclastogenesis through the downregulation of c-Fos signaling *in vitro* [J]. *Bioorganic Chemistry*, 2021, 107(33): 104613.
- [24] Min Jeong Kim, Hye Hyeon Lee, Min Jeong Seo, et al. Identification of 5-hydroxy-3,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone from *Hizikia fusiforme* involved in the induction of the apoptosis mediators in human AGS carcinoma cells [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012, 22(12): 1665-1672.
- [25] Ortega J T, Serrano M L, Al Su árez, et al. Methoxyflavones from *Marcelia taxifolia* as HIV-1 reverse transcriptase inhibitors [J]. *Natural Product Communications*, 2017, 12(11): 1677-1680.
- [26] Qiu P, Guan H, Ping D, et al. Hydroxylated polymethoxyflavones induce p53 and Bax dependent apoptosis and cell cycle arrest [J]. *The FASEB Journal*, 2010, 24: 1b484-1b484.
- [27] Huang R, Zhang Y, Shen S, et al. Antioxidant and pancreatic lipase inhibitory effects of flavonoids from different citrus peel extracts: An *in vitro* study [J]. *Food Chemistry*, 2020, 326: 126785.
- [28] 王谢祎.黄酮和黄酮醇结构特性、相互作用与抗氧化效应(协同、拮抗或加成)间的关系研究[D].南昌:南昌大学,2016.
- [29] 贺萍,王倩,张猛猛,等.东革阿里多糖对红细胞氧化溶血的保护作用[J].现代食品科技,2019,35(6):30-38.
- [30] 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.
- [31] 向方桃,陈封政,陈建明,等.千里香中黄酮类成分的分离鉴定及抗氧化活性研究[J].天然产物研究与开发,2020,32(10): 1683-1687.
- [32] 高牡丹,师景双,胡明燕.用于测定芝麻酱、花生酱酸价、过氧化值的油脂提取方法研究[J].中国油脂:1-9 [2022-07-10].
- [33] 林洁.柚子皮总黄酮对食用油脂的抗氧化作用[J].江苏农业学报,2020,36(4):1054-1059.
- [34] 单杨,李高阳,李忠海.柑橘皮中多甲氧基黄酮的体外抗氧化活性研究[J].食品科学,2007,8:100-103.
- [35] ZHOU Qi, JIA Xiao, DENG Qianchun, et al. Quality evaluation of rapeseed oil in Chinese traditional stir-frying [J]. *Food Science & Nutrition*, 2019, 7(11): 3731-3741
- [36] 栾霞,王瑛瑶,张蕊,等.油脂储藏过程中茴香胺值、过氧化值的变化研究[J].粮油加工,2009,12:77-79.