

5种柚汁中主要抗氧化成分含量及其抗氧化能力的比较

但俊峰, 盛雪飞, 陈健初*

(浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 浙江 杭州 310029)

摘 要: 采用高效液相色谱法测定了5种柚汁中黄酮类物质、VC的含量。并用FRAP、DPPH及ABTS三种方法对其抗氧化能力做出评价。通过比较, 得出佛柚汁中的柚皮苷含量、VC含量和总酚含量均为最高; 除胡柚汁外, 其他柚汁均未检测到橙皮苷和新橙皮苷; 佛柚汁的抗氧化能力最强。酚类物质和VC则是柚汁中最主要的抗氧化物质。

关键词: 高效液相色谱; 果汁; 黄酮类物质; VC; 抗氧化

Determination of Bioactive Compounds in Five Kinds of Pummelos Juices and Their Antioxidant Capacities

DAN Jun-feng, SHENG Xue-fei, CHEN Jian-Chu*

(College of Biosystem Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: The contents of flavonoids and vitamin C in 5 kinds of pummelo juices were detected by HPLC method. And their antioxidant capacities were evaluated by methods of FRAP, DPPH and ABTS. Comparison results indicated that the contents of naringin, vitamin C and total phenolics in Foyou juice are the highest. Hesperidin and neohesperidin are not detected in pummelo juices except Huyou juice. The antioxidant capacity of Foyou juice is the highest. The most important antioxidant compounds are phenolics and vitamin C.

Key words: HPLC; juice; flavonoids; VC; antioxidant

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)07-0094-04

柚子(*Citrus grandis* (L.) Osbeck)是我国南方盛产的一种水果, 是柑橘类水果中的一员, 具有很高的营养价值。不仅风味可口, 还有益于健康。中医药学认为柚子味甘、酸、生寒, 有健胃化食、下气消痰、轻身悦色等功用。柚子中富含黄酮苷类物质(包括柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷等)^[1]和VC等多种生物活性物质, 其中主要的黄酮苷类物质是柚皮苷(全称为柚皮素-7-O-新橙皮糖苷)。近年来的研究表明, 柚皮苷具有抗氧化、抗突变、抗癌等多种生物活性^[2-3], 在食品、医药领域的应用前景广泛。而国内对柚子汁中活性物质的检测及抗氧化能力的研究较少, 本实验以浙江省几种常见的柚子为研究对象, 用HPLC法检测几种柚子汁中的黄酮类物质等的含量并对柚子汁的抗氧化能力进行评价。

1 材料与方法

1.1 材料

蜜柚、文旦、胡柚 杭州水果市场; 水晶文旦、佛柚 衢州。

1.2 试剂

橙皮苷(纯度≥98%)、柚皮苷(纯度95%)、新橙皮苷(纯度90%) Sigma公司; VC 国药集团化学试剂有限公司。

TPTZ、DPPH、ABTS Sigma公司; 甲醇(色谱纯)、甲醇(AR) 杭州双林化工试剂厂。

1.3 仪器与设备

2696-2996 高效液相色谱仪(含PDA检测器) Waters公司; UV-2550 紫外/可见分光光度计 日本岛津公司; 移液枪 瑞士Socorex公司; 离心机 德国Eppendorf公司。

1.4 样品处理

柚子经洗净后, 去皮, 用4层纱布手工榨汁。将果汁置于-60℃下冷冻, 直至取样时常温下解冻。

收稿日期: 2007-08-10

作者简介: 但俊峰(1984-), 男, 硕士研究生, 研究方向为柚的功能性成分分析和综合利用。E-mail: fireboy1984@tom.com

* 通讯作者: 陈健初(1964-), 男, 副教授, 博士, 研究方向为农产品加工。E-mail: jc@zju.edu.cn

1.5 抗氧化物质的测定

1.5.1 总酚的测定^[4]

标准曲线的制作: 准确称取 10mg 没食子酸用蒸馏水定容于 50ml 的容量瓶中, 备用。取 6 只试管, 分别加入 0、0.25、0.5、0.75、1.0、1.25ml 的没食子酸标准溶液于 25ml 比色管中, 加入蒸馏水至 1ml, 1.0ml Folin-酚试剂, 漩涡振荡, 暗处放置 5min, 加入 5ml 5%Na₂CO₃ 溶液, 蒸馏水定容至 25ml, 充分混合后, 室温放置 2h, 于 760nm 处测定吸光度, 得到质量(x)与吸光度(y)之间回归方程。

果汁样品的测定: 取 4ml 果汁和 4ml 甲醇混合, 在 4500r/min 下离心 20min, 取 0.5ml 清液, 按上述方法加入试剂, 在 760nm 处测定吸光度。

1.5.2 柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的测定^[5]

色谱条件: 流动相为甲醇:4% 乙酸溶液(37:63), 流速为 1ml/min。C₁₈ 柱(250mm × 4.6mm, 5 μm), 柱温为 40℃。检测波长为 283nm。

标准曲线的制作: 准确称取柚皮苷 9.0mg, 新橙皮苷 7.8mg, 橙皮苷 4.4mg, 用色谱级甲醇溶解, 并完全转移到 50ml 容量瓶中用甲醇定容制成混标。分别取混标储备液 0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0ml 于 6 只 10ml 的容量瓶中, 用甲醇定容。得到混标中柚皮苷的质量浓度为: 0、36、72、108、144、180g/ml; 新橙皮苷的质量浓度为: 0、31.2、62.4、93.6、124.8、156g/ml; 橙皮苷的质量浓度为: 0、17.6、35.2、52.8、70.4、88g/ml。分别用进样针吸取 2ml 左右, 经微孔滤膜(0.45 μm)过滤转入 1.5ml 进样瓶中待测, 进样量为 10 μl。用 HPLC 测得质量(x)与峰面积(y)之间的回归曲线。

果汁样品的测定: 取 4ml 果汁和 4ml 甲醇混合, 在 4500r/min 下离心 20min, 经微孔滤膜(0.45 μm)过滤转入 1.5ml 进样瓶中, 进样量为 10 μl。

1.5.3 VC 含量的测定^[6]

色谱条件: 流动相为 1% 的草酸溶液, 流速为 1ml/min。C₁₈ 柱(250mm × 4.6mm, 5 μm), 柱温为 25℃。检测波长为 254nm。

标准曲线的制作: 准确称取 4.5mg VC 标准品, 用去离子水溶解后定容到 100ml 容量瓶中, 分别取 VC 标准储备液 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0ml 于 5 只 10ml 容量瓶中, 用去离子水定容, 得到质量浓度为: 9、18、27、36、45 μg/ml 的 VC 系列标准液。分别用进样针吸取 2ml 左右, 经微孔滤膜(0.45 μm)过滤转入 1.5ml 进样瓶中待测, 进样量为 10 μl。用 HPLC 测得质量(x)与峰面积(y)之间的回归曲线。

果汁样品的测定: 取 1ml 果汁溶液和 7ml 0.1% 草酸溶液混合, 在 4500r/min 下离心 20min, 经微孔滤

膜(0.45 μm)过滤转入 1.5ml 进样瓶中, 进样量为 5 μl。

1.6 抗氧化能力的测定

1.6.1 FRAP 法测定抗氧化能力^[5]

FRAP 试剂为 0.1mol/L 醋酸缓冲液(pH3.6):10mmol/L TPTZ(溶于 40mmol/L 盐酸):20mmol/L 三氯化铁(10:1:1, V/V/V)。取 4.9ml FRAP 试剂与 0.1ml 经甲醇稀释的 20 μl 果汁混合, 反应 10min 后在 593nm 下测吸光度。分别以溶于甲醇的 Trolox 溶液和溶于水的 VC 溶液为标样作标准曲线, 样品抗氧化能力分别用 TEAC(trolox equivalent antioxidant capacity)和 VCEAC(vitamin C equivalent antioxidant capacity)来表示, 空白为 0.1ml 甲醇, 分别得到吸光度(y)与 Trolox 含量(x)之间和吸光度(y)与 VC 含量(x)之间的回归方程。

1.6.2 DPPH 法测定抗氧化能力^[7]

取 3.9ml 0.1mmol/L DHHP · 乙醇溶液与 0.1ml 经甲醇稀释的 20 μl 果汁, 混合均匀在暗处放置 30min 后于 515nm 下测吸光度。分别以溶于甲醇的 Trolox 溶液和溶于水的 VC 溶液为标样作标准曲线, 样品抗氧化能力分别用 TEAC 和 VCEAC 来表示, 空白为 0.1ml 甲醇, 分别得到清除率(y)与 Trolox 含量(x)之间和清除率(y)与 VC 含量(x)之间的回归方程。

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_i - A_j}{A_i} \times 100$$

式中, A_i 为加空白乙醇的 DPPH · 吸光度; A_j 为加样品反应后的 DPPH · 吸光度。

1.6.3 ABTS 法测定抗氧化能力^[8]

取过 140mmol/L 硫酸钾溶液 440 μl 与 mmol/L ABTS⁺ · 溶液 25ml 混合避光反应 12~16h, 然后用乙醇稀释 ABTS 溶液至吸光度为 0.7 ± 0.02, 取 4.9ml ABTS⁺ · 溶液与 0.1ml 经甲醇稀释的 10 μl 果汁混合, 反应 10min 后于 734nm 下测吸光度。分别以溶于甲醇的 Trolox 溶液和溶于水的 VC 溶液为标样作标准曲线, 样品抗氧化能力分别用 TEAC 和 VCEAC 来表示, 空白为 0.1ml 甲醇, 分别得到清除率(y)与 Trolox 含量(x)之间和清除率(y)与 VC 含量(x)之间的回归方程。

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{A_0 - A_i}{A_0} \times 100$$

式中, A₀ 为加空白甲醇的 ABTS⁺ 的吸光度, A_i 为样品与 ABTS⁺ 反应后的吸光度。

1.7 统计分析

用 Excel2000 分析软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 抗氧化物质含量的比较

表 1 5 种果汁中黄酮类物质、VC、总酚的含量 ($\mu\text{g/ml}$)
Table 1 Contents of flavonoids, VC and total phenols in juice ($\mu\text{g/ml}$)

	柚皮苷	橙皮苷	新橙皮苷	VC	总酚
蜜柚	89.73 ± 3.68	—	—	269.29 ± 2.42	476.2 ± 2.83
文旦	68.49 ± 2.65	—	—	181.64 ± 0.78	601.2 ± 9.89
胡柚	119.2 ± 6.84	4.37 ± 0.86	44.72 ± 2.64	293.6 ± 5.29	643.2 ± 15.56
水晶文旦	53.85 ± 0.38	—	—	201.15 ± 14.11	566.2 ± 12.73
佛柚	199 ± 7.09	—	—	487.64 ± 2.76	845.2 ± 4.24

5 种柚子果汁中黄酮类物质、VC、总酚含量见表 1。

经统计分析可知,不同果汁中柚皮苷、VC、总酚的含量差异性是其显著的($p < 0.0001$)。由表 1 可以看出,柚皮苷在佛柚果汁中含量最高,达到 $199 \mu\text{g/ml}$,在水晶文旦果汁中含量只有 $53.85 \mu\text{g/ml}$;而橙皮苷和新橙皮苷都只有在胡柚果汁中含有,分别为 $4.37 \mu\text{g/ml}$ 和 $44.72 \mu\text{g/ml}$,其他果汁均未检出;佛柚果汁中的 VC 含量最高,文旦果汁中的 VC 含量最少;总酚含量则是在佛柚果汁中最高,在蜜柚果汁中最低。

2.2 总抗氧化能力的比较

如前所述,抗氧化能力分别用 TEAC 和 VCEAC 表示。用 3 种体系评价的总抗氧化能力见图 1、2。

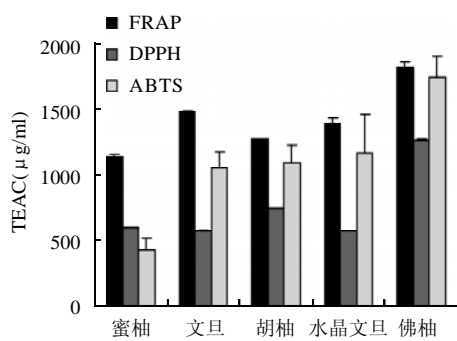


图 1 3 个体系下的 TEAC
Fig.1 TEAC in 3 systems

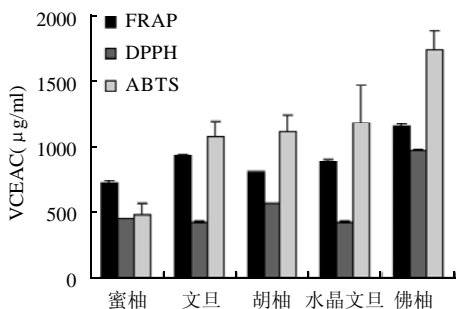


图 2 3 个体系下的 VCEAC
Fig.2 VCEAC in 3 systems

由图 1~2 可以看出,3 种抗氧化方法的评价结果是不尽相同的。每种抗氧化能力的测定方法都有其局限性的,有的甚至还会得到趋势完全不同的结果^[9]。在 FRAP 体系中,抗氧化能力强弱顺序为:佛柚汁 > 文旦汁 > 水晶文旦汁 > 胡柚汁 > 蜜柚汁;在 DPPH 体系下,

抗氧化能力强弱顺序为:佛柚汁 > 胡柚汁 > 蜜柚汁 > 文旦汁 > 水晶文旦汁;在 ABTS 体系下,抗氧化能力强弱顺序为:佛柚汁 > 水晶文旦汁 > 胡柚汁 > 文旦汁 > 蜜柚汁。但是在 3 种方法评价下,佛柚果汁的抗氧化能力都是最高的,FRAP 中 TEAC 为 $1816.77 \mu\text{g/ml}$,DPPH 中 TEAC 为 $1255.61 \mu\text{g/ml}$,ABTS 中 TEAC 为 $1732.25 \mu\text{g/ml}$ 。并且在 3 种方法下,5 种果汁的抗氧化能力差异性是其显著的(FRAP、DPPH 下, $p < 0.0001$; ABTS 下, $p < 0.01$)。明显可以看出,DPPH 法评价出的抗氧化能力比其他两种要低。尽管 DPPH 法被认为是一种简单、精确的测定果蔬汁的方法,但是它可能对亲水性的抗氧化物质不太敏感^[10]。所以在评价抗氧化能力时,仅用一种方法来测定是不够完善的。

2.3 相关性分析

将 3 种方法下评价得到的抗氧化能力分别与总酚含量、VC 含量作相关性分析,结果如图 3、4 所示。

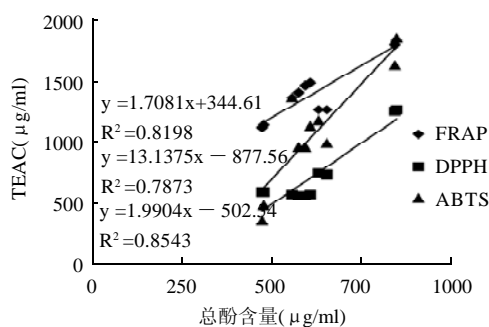


图 3 抗氧化能力与总酚的线性分析
Fig.3 Correlation between total antioxidant capacity and content of total phenols

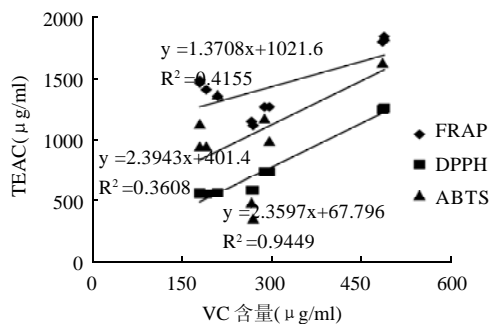


图 4 抗氧化能力与 VC 的线性分析
Fig.4 Correlation between total antioxidant capacity and content of VC

由图3~4可以看出,3种方法测得的抗氧化能力与总酚含量之间具有良好的相关性。FRAP为 $R^2=0.8198(p < 0.001)$, DPPH为 $R^2=0.8543(p < 0.001)$, ABTS为 $R^2=0.7873(p < 0.001)$ 。而在与VC作相关性分析时,仅在DPPH法下得到很高的相关性($R^2=0.9449, p < 0.001$)。有学者指出大部分的柑橘水果中主要的抗氧化能力不是来自VC或膳食纤维,而是其他抗氧化化合物^[11],也有学者报道VC是柑橘类果汁中最主要的抗氧化物质,抗氧化贡献率达50%以上^[12],这可能与原料处理及分析方法的不同有关。在DPPH法下,VC很高的相关性可能与其在DPPH体系下较高的抗氧化贡献率有关(贡献率为42.3%~59.6%,计算方法按参考文献[13]),VC的贡献率如图5所示。

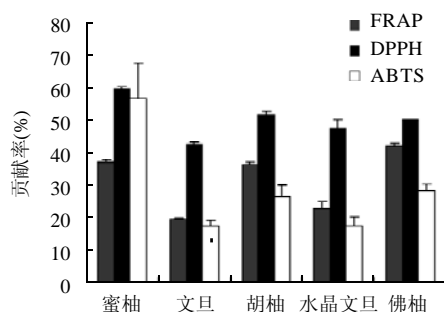


图5 VC的抗氧化贡献率

Fig.5 Contribution of VC to total antioxidant capacity

由图5可以看出,蜜柚汁中的VC抗氧化贡献率最高。从本实验的研究中可以看出,在果汁中主要的抗氧化物质是酚类物质和VC。当然,还有其他的生物活性物质也在起作用,并且抗氧化物质之间的协同作用也不可忽视。

3 结 论

通过对5种柚子汁的实验结果进行比较,得知佛柚汁中柚皮苷、VC、总酚含量均最多;除胡柚汁以外,其他柚汁均不含橙皮苷和新橙皮苷;佛柚汁的抗氧化能

力最高。

参考文献:

- [1] ROUSEFF R L, MARTIN S F, YOUTSEY C O. Quantitative survey of naringin, naringin, hesperidin, and neohesperidin in Citrus[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1987, 35: 1027-1030.
- [2] 冯宝民, 苑艳光, 裴月湖. 柚的化学与药理研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2001, 18 (3): 228-232.
- [3] 张甘良, 汪钊, 朱国孟. 柑桔生物类黄酮柚皮苷生物活性的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17: 117-120.
- [4] CAI Y Z, LUO Q, SUN M, et al. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer[J]. Life Science, 2004, 74: 2157-2184.
- [5] XU G H, YE X Q, CHEN J C, et al. Effect of heat treatment on the phenolic compounds and antioxidant capacity of citrus peel extract[J]. J Agric Food Chem, 2007, 55: 330-335.
- [6] 韩雅珊. 食品化学实验指导[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1996.
- [7] BOUAZIZ M, SAYADI S, DAMAK M, et al. Identification and antioxidant potential of flavonoids and low molecular weight phenols in olive cultivar Chemlali growing in Tunisia[J]. J Agric Food Chemistry, 2005, 53: 236-241.
- [8] GORINSTEIN S, CVIKROVA M, MACHACKOVA I, et al. Characterization of antioxidant compounds in Jaffa sweets and white grapefruits[J]. Food Chemistry, 2004, 84: 503-510.
- [9] GORINSTEIN S, ZACHWIEJA Z, KATRICH E, et al. Comparison of the contents of the main antioxidant compounds and the antioxidant activity of white grapefruit and his new hybrid[J]. Lebensm-Wiss u-Technol 2004, 37: 337-343.
- [10] CARO A D, PIGA A, VACCA V, et al. Changes of flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity in minimally processed citrus segments and juices during storage[J]. Food Chemistry, 2004, 84: 99-105.
- [11] GORINSTEIN S, MARTIN-BELLOSO O, PARK Y S, et al. Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits[J]. Food Chemistry, 2001, 74: 309-315.
- [12] GARDNER P T, WHITE T A C, MCPHAIL D B, et al. The relative contributions of vitaminC, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices[J]. Food Chemistry, 2000, 68: 471-474.
- [13] ABEYSINGHE D C, LI X, SUN C D, et al. Bioactive compounds and antioxidant capacities in different edible tissues of citrus fruit of four species[J]. Food Chemistry, 2007, 104: 1338-1344.