

柑橘皮中多甲氧基黄酮的体外抗氧化活性研究

单 杨^{1,2}, 李高阳², 李忠海¹

(1. 中南林业科技大学食品科学与工程学院, 湖南 长沙 410004

2. 湖南省农产品加工研究所柑桔工程技术研究中心, 湖南 长沙 410125)

摘 要: 通过体外抗氧化实验对柑橘皮中五种多甲氧基黄酮单体的抗氧化功能进行研究。结果表明: 柑橘皮中五种黄酮单体均有一定抗亚油酸氧化能力, 且均强于芦丁; 类黄酮单体抑制脂质体氧化能力均表现出一定的浓度依赖关系; 清除 $\cdot\text{OH}$ 自由基能力与相应浓度也存在正相关关系。

关键词: 柑橘皮; 黄酮; 抗氧化活性

In vitro Antioxidation Activity of Multimethoxyl Flavonoids from Citrus Peel

SHAN Yang^{1,2}, LI Gao-yang², LI Zhong-hai¹

(1. School of Food Science and Engineering Technology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China 2. Centre for Citrus Engineering Technology Research, Institute of Hunan Agricultural Product Processing, Changsha 410125, China)

Abstract: The antioxidant properties of five multimethoxyl flavonoids from citrus peel were determined respectively by ferric thiocyanate method and phospholipids peroxidation in liposome. The results showed that five flavonoids are able to inhibit linoleic acid peroxidation, and the inhibiting capacity is better than rutin. The inhibiting capacities of flavonoids to liposome are relative with their concentrations. And the physiological functions of scavenging $\cdot\text{OH}$ increase also significantly with increases of their concentrations.

Key words citrus peel; flavonoids; antioxidant activity

中图分类号: TS209

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)08-0100-04

20 世纪 60 年代末, 人们就发现黄酮类化合物有抗炎、抗病毒、利胆、强心、镇静和镇痛等作用^[1]。到了 70 年代, 又发现它们有抗氧化、抗衰老、免疫调节、抗癌的作用, 后来又发现能降低动物的甘油三酯, 总胆固醇、LDL、VLDL 水平的降血压、降血脂、减

低毛细血管通透性等功效^[2-6], 部分黄酮类物质对凝血因子也有影响^[7-8]。而近几年又发现生物类黄酮具有抗肿瘤、抗 HIV 和减弱组织损伤等生物活性^[9-11]。

近年来, 随着研究方法和技术的不断提高, 许多新的种类和生理作用被发现, 特别是抗自由基及抗癌、

收稿日期: 2007-05-11

作者简介: 单杨(1963-), 男, 研究员, 博士, 研究方向为农产品综合深加工。

进一步的研究。

参考文献:

- [1] 华泽钊, 李云飞, 刘宝林. 食品冷冻冷藏原理与设备[M]. 北京: 机械工业出版社, 1999.
- [2] SLADE L, LEVINE H. Glass transitions and water-food structure interactions[J]. Advanced in food and Nutrition Research, 1994, 38: 120-126.
- [3] RASANEN J. Properties of frozen wheat doughs at subzero temperatures [J]. J Journal of Cereal Science, 1998, 28: 1-14.
- [4] ROOS Y. Melting and glass transition of low molecular weight carbohydrates[J]. J Carbohydrate Research, 1993, 23: 39-48.
- [5] ALEX P, HANS Z. Preservation mechanisms of trehalose in food and biosystems[J]. J Colloids AND Surfaces B: Biointerfaces, 2005, 40: 107-113.
- [6] SALVADOR A, SANZ T, FISZMAN S M. Dynamic rheological characteristics of wheat flour-water doughs. Effect of adding NaCl, sucrose and yeast [J]. J Food Hydrocolloids, 2005 (5): 1-7.
- [7] RIBOTTA P D, PE' REZA G T, LEO' NA A E, et al. Effect of emulsifier and guar gum on micro structural, rheological and baking performance of frozen bread dough [J]. J Food Hydrocolloids, 2004, 18: 305-313.

防癌、抗病毒的作用,使生物类黄酮的研究进入了一个新的阶段,掀起了生物类黄酮的研究、开发利用热潮,其在医药、食品领域的应用具有广阔的前景。本研究进行柑橘类黄酮化合物的活性研究,为下一步柑橘类黄酮活性物质在医药和保健食品中的应用提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

1.1.1 材料与试剂

柑橘类黄酮单体:化合物A(3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮,下同)、化合物B(5,6,7,8,4'-五甲氧基黄酮即柑橘黄酮,下同)、化合物C(3-羟基-5,6,7,8,3',4'-六甲氧基黄酮,下同)、化合物D(5,6,7,8,3',4'-六甲氧基黄酮,下同)、化合物E为橙皮苷,由实验室制备。

2.5%亚油酸的乙醇溶液;含3.5% HCl的0.02mol/L硫酸亚铁水溶液;0.05mol/L磷酸盐缓冲液(pH7.0);30%的硫氰酸铵水溶液;0.05mol/L的硫酸铜水溶液;TBA 0.5%、三氯乙酸15%的硫代巴比妥酸(TBA)试剂;含有0.1mmol/L EDTA的0.05mol/L pH7.8磷酸盐缓冲液(Pb);1mmol/L 鲁米诺;0.05mol/L pH6.2的磷酸盐缓冲液配制的0.1mmol/L VC溶液;0.05mol/L pH6.2的磷酸盐缓冲液配制的33.3mmol/L过氧化氢溶液;1mmol/L 邻菲罗啉;1mmol/L 硫酸铜缓冲液;0.05mol/L pH9.0的硼酸硼砂盐缓冲液(BB)。上述所用试剂均为AR级。双蒸水为实验室自制。

1.1.2 仪器

XMT-DA数显恒温水浴锅 余姚市亚星仪器仪表有限公司;UV-1700型紫外可见分光光度计 日本岛津公司;TGL-16M台式高速冷冻离心机 长沙平凡仪器仪表有限公司;SK2200 LH型台式超声波清洗器 上海科导超声仪器有限公司;DHG-9240A型电热恒温鼓风干燥箱 上海精宏试验设备有限公司;SHG-C型生物化学发光测定仪 上海上立检测仪器厂。

1.2 体外抗氧化活性方法

1.2.1 柑橘类黄酮对亚油酸氧化抑制能力

柑橘类黄酮单体的抗亚油酸氧化采用Pin-Der Duh等^[12-13]报道的硫氰酸铁法(Ferric Thiocyanate Method, FTC法)并略加修改进行测定。分别配制反应液(2.5%亚油酸3.0ml、40mmol/L pH7.0磷酸盐缓冲液9.0ml、无水乙醇1.5ml、蒸馏水1.5ml、100μg/ml乙醇相样液0.5ml)于25ml具试管中,混匀器混匀,置37℃恒温箱中避光保温,每隔12h。取反应液0.1ml,依次加入75%乙醇9.7ml和30%硫氰酸铵0.1ml,最后加入20mmol/L硫酸亚铁溶液0.1ml,准确反应3min后,以蒸馏水为空白在500nm处比色测定吸光度 A_{500nm} 。该实验以槲皮素和芦

丁作为对照,且所有测定值均设两次重复。

1.2.2 柑橘皮中类黄酮对脂质体过氧化的抑制能力

抑制脂质体过氧化能力的测定参照Gow-Chin报道的脂质体氧化法^[14]。脂质体的制备:将大豆卵磷脂分散于水中配成0.8%的水溶液,经过超声波处理30min,形成均匀的乳状液。

精确移取10ml脂质体放入50ml三角瓶中,加入定量乌饭树叶黄酮类色素单体(预先用甲醇溶解,浓度为0.4mg/ml),对照组加入等体积的甲醇,再加入0.05mol/L的硫酸铜2.0μl,放入水浴恒温振荡器中振荡,速度为100次/min,温度为37℃。分别采用紫外吸收测定法和TBA法定时测定吸光度。

紫外测定法测定脂质体过氧化物:取0.1ml氧化液于玻璃试管中,精确加入5ml甲醇,混匀后,以甲醇为空白,用1cm石英比色皿在234nm处测定吸光度。恒温震荡前测定一次,作为本底。以后每12h测定一次吸光度值,当对照样出现最大值后,再测定1~2次。

1.2.3 OH·清除活性测定

各组分清除羟基自由基能力实验参照文献^[15~16]进行,取0.15mmol/L pH7.4磷酸缓冲液1ml、40μg/ml 番红花红1ml、3%过氧化氢1ml(新鲜配制)、0.945mmol/L EDTA-Fe(II)1ml(新鲜配制),加入一定体积的柑橘皮提取液,混合后在37℃水浴中反应30min后在520nm处测吸光度。空白组以对应体积的蒸馏水代替柑橘皮提取液,对照组用对应体积的蒸馏水代替EDTA-Fe(II)和柑橘皮提取液,蒸馏水调零,测各组吸光度。计算羟自由基清除率:

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}} \times 100$$

以半抑制率(IC₅₀)表示清除活性。

1.3 统计学方法

采用SPSS 11.5软件、Pearson法进行相关系数分析。

2 结果与分析

2.1 柑橘皮中类黄酮组分抗亚油酸氧化能力

从图1可以看出,亚油酸的氧化诱导期约为196h,即9d。化合物D和化合物C表现出很强的抗氧化性,对亚油酸氧化的抑制能力很强,在进行实验的288h(13d)内没有表现出出峰的迹象,也就是说亚油酸的氧化在这段时间内基本被抑制了。相比较之下,化合物B的抑制能力要比这两者差,和槲皮素的抑制能力基本一致,在试验时间内已经出峰。化合物A的抑制效果要更差一点,而化合物E的抑制亚油酸氧化能力最差,仅比芦丁

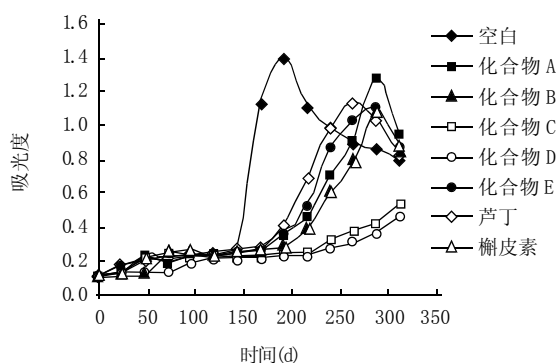


图1 不同受试物抗亚油酸氧化能力的比较(500nm)
Fig.1 Effects of antioxidation on linoleic acid oxidation measured as absorption of ferric thiocyanate at 500 nm

略强。总的抗氧化程度从高到低为：化合物D > 化合物C > 化合物B ≈ 槲皮素 > 化合物A > 化合物E > 芦丁。

2.2 柑橘皮中类黄酮组分对脂质体过氧化的影响

本研究中利用紫外测定方法考察了分离纯化后的柑橘类黄酮对脂质体过氧化的影响，同时还用常见的生物活性物质(芦丁、槲皮素)进行了对照实验，具体结果见图2。

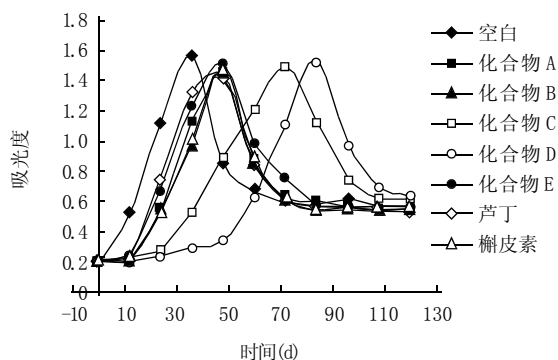


图2 不同测试样品对脂质体过氧化的影响(紫外测定法)
Fig.2 Effects of antioxidants on the oxidation of phospholipid liposome measured as absorption of lipid oxidation products at 234 nm

从图2可以看出，随着时间的增加，吸光度随之增加，最后达到最大值。接着随着时间的增加，吸光度值渐渐下降，最后趋于稳定。开始脂质体被氧化时，共轭二烯产生的量逐渐增加，但是由于共轭二烯不稳定，随着氧化的进行，分解也加快，所以在吸光度达到最大值时，产生与分解也达到动态平衡，之后分解的速度快于生成速度，所以吸光度随之下降。抗氧化剂在其中所起到的作用就是阻止自由基的传递，减缓氧化的进程，反映在吸光度上就是推迟吸光度吸收峰的推迟。物质的抗氧化能力越强，反映出来就是吸光度吸收峰出现得越晚，从图2的实验结果可以看出，各提取物都具有一定的抗氧化能力，对于脂质体的氧化能够起到

抑制作用。但是同时也可以看出不同的物质抑制能力也不同，抑制能力的强弱顺序为：化合物D > 化合物C > 化合物B > ≈ 槲皮素 > 化合物A > 化合物E > 芦丁。

同时，对上述几种柑橘皮类黄酮进行抑制脂质氢过氧化物形成的抑制率计算，利用拟合方程算出半抑制浓度(IC_{50})。结果见图3和表3。

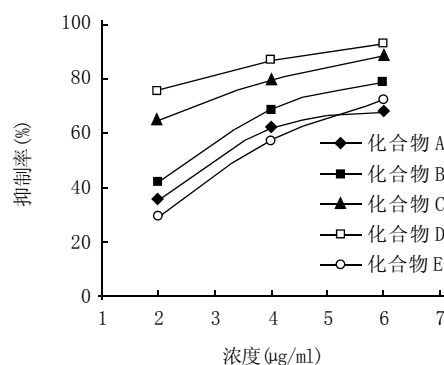


图3 柑橘类黄酮抗脂质体氧化抑制率的比较(234nm)
Fig.3 Effects of flavonoids from citrus in phospholipid liposome suspension on ratio of lipid oxidation inhibition at 234 nm

表1 柑橘类黄酮对脂质体氧化的半抑制率(234nm)
Table 1 Effects of flavonoids from citrus in phospholipid liposome suspension on ratio of lipid oxidation inhibition at 234 nm

提取物	A	B	C	D	E
$IC_{50}(\mu\text{g/ml})$	3.11	2.65	0.96	0.35	3.52

从图3和表1可以看出，几种化合物的抗氧化活性的强弱顺序为：化合物D > 化合物C > 化合物B > 化合物A > 化合物E。抗氧化活性最强的化合物D半抑制浓度达到0.35 $\mu\text{g/ml}$ ，与BHT的 IC_{50} (0.37 $\mu\text{g/ml}$)^[17]相近。次之为化合物C，半抑制浓度为0.96 $\mu\text{g/ml}$ 。化合物E的抗氧化活性相对最弱， IC_{50} 为3.52 $\mu\text{g/ml}$ ，与芦丁的 IC_{50} (3.8 $\mu\text{g/ml}$)^[18]相近。化合物D和化合物C具有较强的抗脂质体氧化活性。

2.3 柑橘类黄酮清除·OH自由基能力

从不同浓度的受试物对·OH自由基的清除动力学曲线(图4)和对·OH自由基的半抑制率 IC_{50} (表2)可以看出，对·OH自由基的清除能力随受试物浓度的增大而增强，在柑橘类黄酮的五个提取组分中以化合物D和化合物C对·OH自由基的清除能力较强， IC_{50} 分别为3.2 $\mu\text{g/ml}$ 和5.6 $\mu\text{g/ml}$ ，化合物E对·OH自由基的清除能力最弱， IC_{50} 为13.6 $\mu\text{g/ml}$ 比芦丁(IC_{50} =16.8 $\mu\text{g/ml}$)强。不同受试物对·OH自由基清除能力的强弱顺序为：化合物D > 化合物C > 化合物B > 化合物A > 化合物E > 芦丁。

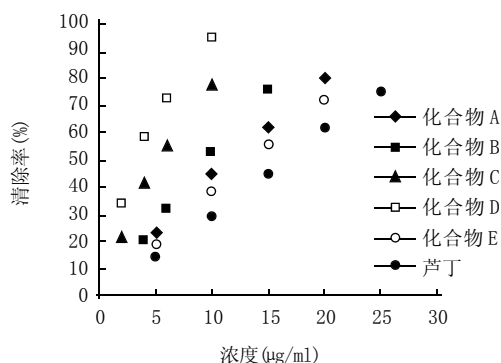


图4 不同受试物对羟基自由基·OH的清除效果

Fig.4 Effects of different fraction concentration on ratio of ·OH free radical

表2 不同受试物清除·OH自由基的半抑制率IC₅₀Table 2 IC₅₀ of different fractions on elimination of ·OH free radical

种类	化合物A	化合物B	化合物C	化合物D	化合物E	芦丁
IC ₅₀ (μg/ml)	11.5	9.6	5.6	3.2	13.6	16.8

3 结论

3.1 3-羟基-5, 6, 7, 8, 3', 4'-六甲氧基黄酮和5, 6, 7, 8, 3', 4'-六甲氧基黄酮表现出很强的抗亚油酸氧化的能力, 柑橘黄酮的抑制能力次之, 和槲皮素的抑制能力基本一致。而橙皮苷的抑制亚油酸氧化能力最差, 仅比芦丁略强。

3.2 抑制脂质体氧化能力最强的5, 6, 7, 8, 3', 4'-六甲氧基黄酮半抑制浓度达到0.35 μg/ml, 与BHT的IC₅₀(0.37 μg/ml)相近。次之为3-羟基-5, 6, 7, 8, 3', 4'-六甲氧基黄酮, 半抑制浓度为0.96 μg/ml。橙皮苷的抗氧化活性相对最弱, 半抑制浓度为3.52 μg/ml。

3.3 在柑橘类黄酮的五个提取组分中对·OH自由基清除能力的强弱顺序为: 5, 6, 7, 8, 3', 4'-六甲氧基黄酮>3-羟基-5, 6, 7, 8, 3', 4'-六甲氧基黄酮>柑橘黄酮>3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-七甲氧基黄酮>橙皮苷>芦丁。5, 6, 7, 8, 3', 4'-六甲氧基黄酮和3-羟基-5, 6, 7, 8, 3', 4'-六甲氧基黄酮清除·OH自由基的IC₅₀分别为3.2 μg/ml和5.6 μg/ml, 橙皮苷对·OH自由基的清除能力最弱, IC₅₀为13.6 μg/ml比芦丁(IC₅₀=16.8 μg/ml)强。

参考文献:

- [1] 黄池宝, 罗宗铭, 宾丽英. 类黄酮化合物抗氧化性与其结构关系的研究[J]. 广东工业大学学报, 2000, 17(2): 71-73.
- [2] BOEEO A, CUVELIER M E, RICHARD H, et al. Antioxident activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46: 2123-2129.
- [3] MALTERUD K E, RYDLAND K M. Inhibitors of 15-lipoxygenase from orange peel[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48: 5576-5580.
- [4] BENAVENTE-GARCIA O, CASTILLO J, MARIN F, et al. Uses and properties of citrus flavonoids[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997, 45: 4505-4515.
- [5] MIDDLETON E, KANDASWAMI C. Potential health-promoting properties of citrus flavonoids[J]. Food Chemistry, 1994(11): 115-119.
- [6] BRAEKE M E, BRUYNEEL A, VERMEULEN S J, et al. Citrus flavonoids effect on tumor invasion and metastasis[J]. Food Technology, 1994, 11: 121-123.
- [7] JAHROMI MAF. Anti-hyperlipidemic effect of flavonoids from *pterocarpus marsupium*[J]. Journal of Natural Products, 1993, 56(7): 989-994.
- [8] TRITANA T. Effect of *eupatorium odoratum* on blood coagulation[J]. J Med Assoc Thai, 1991, 74(5): 283-287.
- [9] 李红, 敖海英, 赵征. 柑橘类黄酮功能及应用的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2003, 24(1): 18-20.
- [10] 张甘良, 汪钊, 鄢洪德. 生物类黄酮化合物的结构与生物活性的关系[J]. 生物学杂志, 2005, 22(1): 4-7.
- [11] SHAHIDI F, JANITHA P K. Phenolic antioxidants[J]. Crit Rev Food Sci Nutri, 1992, 32: 67-103.
- [12] DUH P D, YEH D B, YEN G C. Extraction and identification of an antioxidative component from peanut hulls[J]. JAACS, 1992, 69(8): 814-818.
- [13] 李高阳, 丁霄霖. 亚麻籽双液相萃取中醇相组分体外抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2006, 27(10): 143-146.
- [14] GOW C Y, PIN D D, DA Y C. Antioxidant activity of anthraquinones and anthrone[J]. Food Chemistry, 2000, 70: 437-441.
- [15] 张小强, 浦跃朴, 等. 冬虫夏草及人工虫草菌丝对超氧阴离子自由基和羟自由基清除作用的实验研究[J]. 中国老年学杂志, 2003(11): 773-775.
- [16] SANCHEZ M, CONCEPCION A, LARRAURI, et al. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents[J]. Food Research International, 1999, 32: 407-412.
- [17] 任顺成. 玉米须类黄酮的分离、纯化、结构鉴定及生物活性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2004.
- [18] ALESSANDRA D C, ANTONIO P, VINCENZO 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.