

## 温州蜜柑果皮提取物总酚·总黄酮含量测定及其抗氧化活性研究

左龙亚<sup>1,2</sup>, 于杰<sup>1,2\*</sup>

(1. 西南大学园艺园林学院, 重庆 400715; 2. 南方山地园艺学教育部重点实验室, 重庆 400716)

**摘要** [目的]研究温州蜜柑果皮不同溶剂提取物总酚、总黄酮含量及其抗氧化活性, 筛选最佳提取试剂。[方法]依次用甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯及蒸馏水对温州蜜柑果皮进行提取, 检测不同溶剂提取物体外抗氧化活性, 并对不同溶剂提取物总酚、总黄酮含量进行测定。[结果]温州蜜柑不同溶剂提取物均具有一定的抗氧化活性, 其中甲醇、丙酮提取物的抗氧化活性较强, APC 指数位居前 2 位。不同溶剂提取物的抗氧化活性与其总酚、总黄酮的含量呈极显著正相关关系, 相关系数  $r$  分别为 0.905<sup>\*\*</sup>、0.583<sup>\*\*</sup>、0.948<sup>\*\*</sup>、0.849<sup>\*\*</sup>、0.760<sup>\*\*</sup>、0.955<sup>\*\*</sup> ( $P < 0.01$ )。[结论]对温州蜜柑不同溶剂提取物总酚、总黄酮含量测定及其抗氧化活性研究确定甲醇为其最优提取试剂。

**关键词** 温州蜜柑; 提取物; 酚类物质; 抗氧化活性

**中图分类号** S666 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)28-0089-03

Detection of Total Phenols and Total Flavonoids Content in Extracts of *Citrus unshiu* Peel and Its Antioxidant Activities

ZUO Long-ya<sup>1,2</sup>, YU Jie<sup>1,2\*</sup> (1. College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400715; 2. Key Laboratory of Southern Mountain Horticulture, Ministry of Education, Chongqing 400716)

**Abstract** [Objective] The aim was to compare and study content of total phenols and total flavonoids in *Citrus unshiu* peel and antioxidant activity by different solvents, to screen out optimal extraction reagent. [Method] Methanol, ethanol, acetone, ethyl acetate and distilled water was used to get extracts from *Citrus unshiu* peel. The antioxidant activity was detected. The content of total phenol, total flavonoids in different solvents was determined. [Result] The different solvents from *Citrus unshiu* all had some antioxidant activity. The extracts from methanol and acetone had more stronger antioxidant activity than others, APC index was in top 2. The antioxidant activity had extremely significant positive correlation with the content of total flavonoids, total phenols ( $r = 0.905^{**}, 0.583^{**}, 0.948^{**}, 0.849^{**}, 0.760^{**}, 0.955^{**}$  ( $P < 0.01$ )). [Conclusion] The extracts of methanol of *Citrus unshiu* show the best in antioxidant activities and contents of total flavonoids and phenols from different solvent extracts of *Citrus unshiu*.

**Key words** *Citrus unshiu*; Extracts; Phenolics; Antioxidant activity

温州蜜柑 (*Citrus unshiu*) 隶属于芸香科 (Rutaceae) 柑橘属 (*Citrus* L.) 植物, 主产于浙江省温州市, 又称无核橘, 现为世界性主要柑橘之一<sup>[1]</sup>。温州蜜柑抗逆性强, 适应性广, 能早产、高产、稳产, 品质好, 易栽培, 在我国柑橘产业发展中占据重要地位。相关性研究表明, 温州蜜柑具有较高的营养价值, 富含多种生物活性物质<sup>[2-4]</sup>, 其中生物类黄酮有较高的研究价值, 对机体抗氧化、抗癌、提高免疫能力等有显著作用<sup>[5]</sup>。笔者以温州蜜柑果皮干粉为材料, 对比分析 5 种不同溶剂提取物总酚、总黄酮含量及其抗氧化活性, 旨在筛选温州蜜柑活性物质最佳提取试剂, 为温州蜜柑果皮活性物质综合利用提供科学参考。

## 1 材料与与方法

**1.1 材料** 温州蜜柑干品, 采自重庆市北碚区柑橘研究所, 洗净剥皮放入 50 °C 烘箱中干燥至恒重, 粉碎, 过 60 目筛备用。主要试剂: 1,1-二苯基苦基苯肼 (DPPH)、2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸) 二铵盐 [ABTS]、三吡啶基三嗪 [TPTZ]、6-羟基-2,5,7,8-四甲基色烷-2-羧酸 (Trolox)、没食子酸 (Gallic Acid), 均购自 Sigma 公司 (St Louis, MO, USA)。甲醇、碳酸钠、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、冰醋酸、盐酸、氯化铁、过硫酸钾、二甲亚砜 (DMSO)、无水

乙醇等试剂, 均为国产分析纯试剂, 试验用水为二次蒸馏水。芦丁 (纯度 ≥ 95%)、福林酚, 购于上海如吉生物科技发展有限公司。

主要仪器设备: 电热恒温鼓风干燥箱 (DHG-9240A 型), 上海齐欣科学仪器有限公司; 小型粉碎机 (ZN-04A 型), 北京兴时利和科技发展有限公司; 超声清洗器 (KQ-500DE 型), 昆山市超声仪器有限公司; 数显恒温水浴锅, 国华电器有限公司; 旋转蒸发仪 (EYELA N-1100 型), 东京理化器械株式会社; 台式低速大容量离心机 (TDL-5A 型), 上海菲恰尔分析仪器有限公司; 紫外可见分光光度计 (PerkinElmer Lambda 25), 美国珀金埃尔默公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 温州蜜柑果皮提取物的制备。**准确称取温州蜜柑果皮粉末 1.0 g 置于 50 mL 离心管中, 按料液比 1:20 g/mL 分别加入甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯、蒸馏水, 振荡器摇匀, 50 °C 超声波辅助提取 1 h, 5 000 r/min 离心 10 min 后转移上清液, 残渣加 20 mL 相应提取液, 振荡器摇匀, 重复提取 2 次, 合并 3 次上清液真空减压浓缩至油膏状, 用甲醇溶解并定容至 10 mL, 即得相应温州蜜柑果皮提取物, 于 -20 °C 冰箱中存储、备用。

**1.2.2 提取物抗氧化活性检测。**ABTS、DPPH 自由基抗氧化活性测定参照张华等<sup>[6]</sup>的方法。亚铁还原能力试验 (fluorescence recovery after photobleaching, FRAP) 值检测参考 Benzie 等<sup>[7]</sup>的方法略加修改。取 25 μL 提取物, 加入 6 mL 已经预先混合的 FRAP 反应试剂 [0.1 mol/L pH 3.6 醋酸缓冲液、10 mmol/L TPTZ (溶于 40 mmol/L 盐酸)、20 mmol/L 氯化

**基金项目** 国家自然科学基金面上项目 (31171930); 重庆市自然科学基金资助项目 (CSTC2013JCYJA8002); 中央高校基本科研业务费专项 (XDJK2014C091); 重庆市北碚区科技计划项目 (2015-35)。

**作者简介** 左龙亚 (1991-), 女, 重庆人, 硕士研究生, 研究方向: 果品营养与质量安全。\* 通讯作者, 副教授, 从事果品营养研究。

**收稿日期** 2016-08-15

铁以体积比 10:1:1 混合], 振荡 30 s, 反应 10 min, 混合均匀后在 593 nm 波长处测定吸光度。以  $V_c$  为标样制作标准曲线, 样品的 FRAP 值(还原  $Fe^{3+}$  的抗氧化活性)用  $V_c$  含量表示(mg/g)。每个样品重复测定 3 次。

**1.2.3 总酚、总黄酮含量的测定。**总酚测定参考 Singleton 等<sup>[8]</sup>的方法略加修改。准确吸取 25  $\mu$ L 柠檬皮提取液于 10 mL 试管中, 加蒸馏水至 2 mL 摇匀; 加 0.5 mL 福林酚试剂, 混匀后暗处放置 5 min; 加入 1.0 mL 5% 碳酸钠溶液, 蒸馏水定容至 5 mL, 充分混合后室温放置 60 min, 于波长 750 nm 处测吸光值。以没食子酸做标样制作标准曲线, 总酚含量用 GAE(Gallic Acid Equivalent) 含量表示。

总黄酮测定参考 Kim 等<sup>[9]</sup>的方法略加修改。准确吸取 50  $\mu$ L 提取液于 20 mL 试管中, 加 30% 乙醇至 2.5 mL, 加 0.2 mL 5% 亚硝酸钠溶液摇匀放置 5 min; 加 0.2 mL 10% 硝酸铝溶液, 摇匀放置 6 min; 加 1 mol/L 氢氧化钠溶液 0.2 mL, 用 30% 乙醇定容至 5 mL 放置 15 min, 于波长 510 nm 处测其吸光度。以芦丁做标样制作标准曲线, 总黄酮含量用芦丁含量表示。

**1.2.4 数据处理。**采用 SPSS 17.0 和 Excel 2007 对试验数据进行分析, 并参照 Zhang 等<sup>[10]</sup>的方法引用 APC 综合指数来评价其综合抗氧化能力。

APC 综合指数 =  $\Sigma[(\text{样品抗氧化值}/\text{最大抗氧化值}) \times 100\%]$

## 2 结果与分析

**2.1 没食子酸、芦丁标准曲线绘制** 没食子酸标样标准曲线见图 1, 芦丁标样标准曲线见图 2。

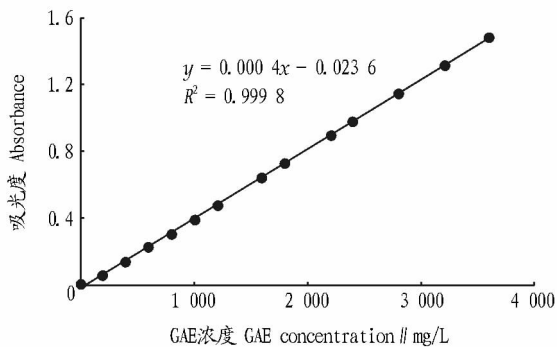


图 1 没食子酸标准曲线

Fig. 1 Standard curve of gallic acid

**2.2 不同溶剂提取物总酚、总黄酮含量** 总酚、总黄酮含量测定结果显示, 不同溶剂提取物总酚、总黄酮含量差异性显著(表 1)。5 种溶剂提取物总酚含量在  $(0.60 \pm 0.02) \sim (16.47 \pm 1.65)$  mg/g, 甲醇提取物总酚含量最高, 乙酸乙酯提取物总酚含量仅为其 3%。不同溶剂提取物总酚含量由大到小的顺序依次为甲醇、丙酮、乙醇、蒸馏水、乙酸乙酯。不同溶剂提取物总黄酮含量在  $(4.63 \pm 0.10) \sim (10.36 \pm 0.21)$  mg/g, 其中丙酮提取物总黄酮含量最高, 甲醇次之, 乙酸乙酯提取物总黄酮含量最低。不同溶剂提取物总黄酮含量提取由大到小的顺序依次为丙酮、甲醇、乙醇、蒸馏水、乙酸乙酯, 几种溶剂提取物之间最大差异达 1.24 倍。

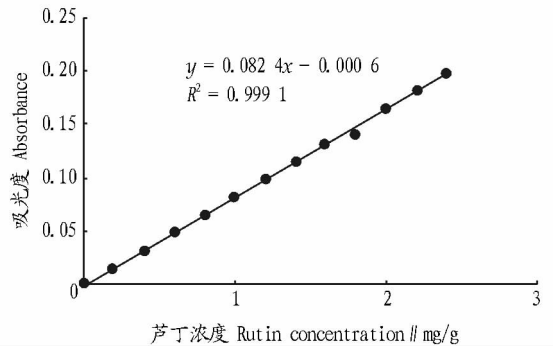


图 2 芦丁标准曲线

Fig. 2 Standard curve of rutin

表 1 不同溶剂提取物总酚、总黄酮含量

Table 1 Total phenols, total flavonoids content of different solvent extracts

溶剂 Solvents	总酚 Total phenol	总黄酮 Total flavonoids
甲醇 Methanol	16.47 ± 1.65 a	9.34 ± 0.79 b
乙醇 Ethanol	11.34 ± 0.32 c	7.56 ± 0.16 c
丙酮 Acetone	15.19 ± 0.05 b	10.36 ± 0.21 a
乙酸乙酯 Ethyl acetate	0.60 ± 0.02 e	4.63 ± 0.10 d
蒸馏水 Distilled water	9.67 ± 0.17 d	7.31 ± 0.30 c

注: 同列不同字母为差异显著 ( $P < 0.05$ )。

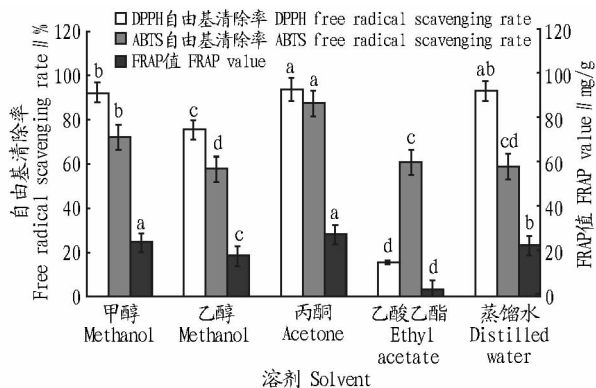
Note: Different letters in the same column stand for significant difference ( $P < 0.05$ ).

**2.3 温州蜜柑果皮不同溶剂提取物抗氧化活性** 由图 3 可知, 温州蜜柑果皮不同溶剂提取物对 DPPH、ABTS 自由基及 FRAP 值 3 种抗氧化检测均表现出一定的差异性 ( $P < 0.05$ )。其中丙酮提取物对 DPPH 自由基清除表现出较高的抗氧化活性, 清除率达  $(93.85 \pm 0.28)\%$ , 蒸馏水、甲醇提取物次之, 清除率分别为  $(92.93 \pm 0.23)\%$ 、 $(92.15 \pm 0.49)\%$ , 乙酸乙酯提取物对 DPPH 自由基清除率仅为  $(15.68 \pm 51.55)\%$ 。不同溶剂提取物对 ABTS 自由基均表现出一定的抑制率且差异性显著, 对 ABTS 自由基清除率在  $(58.83 \pm 0.85)\% \sim (87.46 \pm 0.83)\%$ 。5 种不同溶剂温州蜜柑果皮提取物均对 ABTS 自由基表现出较高的抑制率, 大小顺序依次为丙酮、甲醇、乙酸乙酯、蒸馏水、乙醇。FRAP 铁离子还原反应表明, 5 种提取物均有一定的还原性, 且不同溶剂提取物对 FRAP 抗氧化还原能力存在差异性。试验数据显示, 丙酮、甲醇 2 种试剂温州蜜柑果皮提取物在 FRAP 氧化反应中表现出较高的抗氧化活性 [ $(28.06 \pm 0.61)$ 、 $(26.55 \pm 3.10)$  mg/g], 同比乙酸乙酯抗氧化能力高出 7 倍。FRAP 值在  $(3.27 \pm 0.22) \sim (28.06 \pm 0.61)$  mg/g。

**2.4 不同溶剂提取物抗氧化活性综合评价** 5 种温州蜜柑果皮提取物 APC 指数显示(图 4), 不同溶剂提取物的抗氧化活性差异明显  $(32.58\% \sim 100\%)$ 。温州蜜柑果皮 5 种不同溶剂提取物中丙酮提取物的综合抗氧化指数最高, 其次是甲醇提取物、蒸馏水提取物  $(91.70\% \sim 82.77\%)$ 。乙酸乙酯提取物综合抗氧化指数最低, 仅为 32.58%, 温州蜜柑果皮不同溶剂提取物综合抗氧化能力大小顺序依次为丙酮、甲醇、蒸馏水、乙醇、乙酸乙酯。

**2.5 酚类物质含量与抗氧化活性之间的相关性** 从相关性

分析看出(表 2),总酚含量与 DPPH、ABTS 自由基和 FRAP 值,总黄酮含量与 DPPH、ABTS 自由基和 FRAP 值都呈极显



注:不同字母为差异显著( $P < 0.05$ )。

Note: Different letters stand for significant difference ( $P < 0.05$ ).

图 3 温州蜜柑果皮不同溶剂提取物抗氧化能力比较

Fig. 3 The antioxidant capacity of different solvent extracts of *Citrus unshiu* peel

表 2 酚类物质含量与抗氧化活性之间的相关性

Table 2 Correlation between the content of phenolic compounds and antioxidant activity

酚类物质 Phenolic compounds	DPPH 自由基 DPPH free radical	ABTS 自由基 ABTS free radical	FRAP 值 FRAP value	总酚 Total phenol	总黄酮 Total flavonoids
总酚 Total phenol	0.905 **	0.583 **	0.948 **	1	0.956 **
总黄酮 Total flavonoids	0.849 **	0.760 **	0.955 **	0.956 **	1

注: \*\* 为差异极显著( $P < 0.01$ ); \* 为差异显著( $P < 0.05$ )。

Note: \*\* stands for extremely significant difference ( $P < 0.01$ ); \* stands for significant difference ( $P < 0.05$ ).

### 3 结论与讨论

该试验对温州蜜柑果皮不同溶剂提取物酚类物质及其抗氧化活性检测发现,不同溶剂对温州蜜柑果皮总酚、总黄酮含量提取存在显著差异,同时在 DPPH、ABTS 自由基和 FRAP 值 3 种抗氧化体外检测中也表现出不同抗氧化性能。综合抗氧化 APC 指数显示,蒸馏水提取物具有较强的体外抗氧化能力,这一现象可能与水提取物中含有较多的多糖物质以及一些具有抗氧化活性的多肽类物质有关<sup>[12]</sup>; 5 种试剂对同一物质中总酚、总黄酮、抗氧化活性差异可能与其试剂自身极性相关<sup>[13]</sup>。

5 种不同溶剂温州蜜柑果皮提取物酚类物质含量测定及其抗氧化活性对比研究发现,丙酮、甲醇为溶剂所得温州蜜柑果皮提取物比乙醇、蒸馏水、乙酸乙酯所得提取物具有更高的抗氧化活性和酚类物质得率,这 2 种溶剂提取物在抗氧化活性和总酚、总黄酮含量上无显著差异。由于丙酮具有较强毒性,长期使用会对机体产生较大的伤害,因此该试验中选用毒性相对较小的甲醇作为温州蜜柑果皮总酚、总黄酮及抗氧化活性物质提取的最佳试剂。

### 参考文献

[1] 章恢志. 温州蜜柑的来龙去脉[J]. 柑桔科技通讯, 1978, 7(4): 1-8.

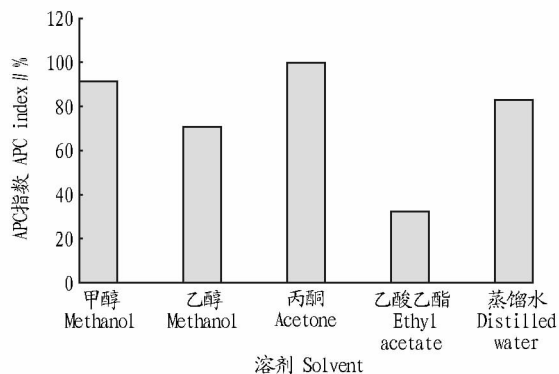


图 4 温州蜜柑果皮不同溶剂提取物抗氧化活性 APC 指数

Fig. 4 APC indexes for antioxidant activities of different solvent extracts of *Citrus unshiu* peel

著性的正相关关系,相关系数  $r$  分别为 0.905、0.583、0.948、0.849、0.760 和 0.955。试验相关性系数分析显示,总酚含量较总黄酮含量在温州蜜柑果皮提取物综合抗氧化活性检测中发挥作用较大,与前人研究结果基本一致<sup>[11]</sup>。

- [2] 邹英宁,吴强盛,饶贵珍. 贮藏方式对温州蜜柑果实抗氧化性能的影响[J]. 中国南方果树, 2014, 43(5): 36-38.
- [3] 苏东林,李高阳,何建新,等. 温州蜜柑皮中氨基酸及脂肪酸的组成分析研究[J]. 食品工业科技, 2012, 48(2): 100-102.
- [4] 王菁,蒲彪,伍红梅. 柑橘果皮中主要功能性成分含量测定[J]. 食品工业科技, 2010(3): 367-369.
- [5] 张余,阙建全,陈宗道. 生物类黄酮抗癌作用研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2003(3): 17-20.
- [6] 张华,周志钦,席万鹏. 15 种柑橘果实主要酚类物质的体外抗氧化活性比较[J]. 食品科学, 2015, 36(11): 64-69.
- [7] BENZIE I F F, STRAIN J J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay[J]. Analytical biochemistry, 1996, 239(1): 70-76.
- [8] SINGLETON V L, ORTHOFER R, LAMUELA-RAVENTOS R M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent[J]. Methods in enzymology, 1999, 299: 152-178.
- [9] KIM D O, CHUN O K, KIM Y J, et al. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums[J]. Food chemistry, 2011, 124: 1561-1566.
- [10] ZHANG Y M, SUN Y J, XI W P, et al. Phenolic compositions and antioxidant capacities of Chinese wild mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) fruits[J]. Food chemistry, 2014, 145: 674-680.
- [11] 李欣,薛治浦,朱文学. 丹参不同部位总酚酸和总黄酮含量分析及其抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2011, 32(3): 108-110.
- [12] 尹秀莲,游庆红,蒋中海,等. 松茸不同溶剂提取物及其抗氧化活性[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(5): 194-198.
- [13] 涂宗财,傅志丰,王辉,等. 红薯叶不同溶剂提取物抗氧化性及活性成分鉴定[J]. 食品科学, 2015, 36(17): 1-6.