

## 4 种甜橙皮黄酮类化合物体外抗氧化活性及降糖降脂功能研究

姚旭, 郦萍, 顾青\*

(浙江工商大学食品与生物工程学院 浙江省食品微生物技术研究重点实验室 杭州 310018)

**摘要** 为发掘甜橙加工副产物的潜在利用价值,本文提取血橙、伦晚脐橙、埃及橙和新奇士晚橙果皮中的黄酮类化合物,采用 HPLC 法分析其中 11 种黄酮类化合物的组分含量,通过体外抗氧化能力、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率和胆酸盐结合量探究甜橙皮黄酮类化合物的抗氧化活性及降糖降脂功能。结果表明,甜橙皮中含有丰富的圣草次苷、柚皮苷、橙皮苷等黄酮类化合物,甜橙黄酮、川陈皮素等多甲氧基黄酮类化合物的含量相对黄酮类化合物来说较低。甜橙皮黄酮类化合物抗氧化活性良好,综合 APC 指数在 86.20%~99.47%之间, $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率变幅为 46.16%~70.18%,胆酸盐吸附量在 0.359~0.460  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  范围。4 种甜橙果皮中,新奇士晚橙果皮黄酮类化合物的生物活性较出色。甜橙皮黄酮的抗氧化活性及降糖降脂功能与 11 种黄酮类化合物总含量呈线性正相关。本研究结果为甜橙皮高值化利用,开发具有抗氧化及降糖降脂作用的功能性产品提供参考。

**关键词** 甜橙皮黄酮类化合物;组分含量;抗氧化活性;降糖降脂

**文章编号** 1009-7848(2022)01-0049-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.01.006

甜橙 [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] 是重要的芸香科柑橘属植物。我国是甜橙主产国和消费大国,而果皮作为甜橙鲜食、加工过程中的主要副产物,除小部分用作开发畜禽饲料、生产有机肥和制取香精油以外,大部分被填埋处理,若处理不当则易腐败变质,污染环境。据报道,柑橘皮<sup>[1]</sup>、石榴皮<sup>[2]</sup>、番薯皮<sup>[3]</sup>等果蔬加工副产物富含果胶、多糖、多酚、黄酮等多种生物活性物质,是天然抗氧化剂的来源,特别是其中的黄酮类化合物,在疾病治疗<sup>[4-5]</sup>和膳食健康<sup>[5-6]</sup>等方面具有重要作用。

研究发现,柑橘皮黄酮类化合物与抗氧化能力<sup>[7]</sup>及缓解炎症反应的能力<sup>[8]</sup>密切相关,Barreca 等<sup>[9]</sup>指出柑橘皮中黄酮类化合物可提高机体的氧化应激能力,降低心血管疾病、动脉粥样硬化的发病率,对机体健康发挥有益作用。目前,有报道称柑橘黄酮类化合物具有降糖潜力,可通过调节葡萄糖代谢和与胰岛素敏感性相关的信号通路来缓解 2 型糖尿病及其相关并发症对机体造成的损害,或有望开发为防治 2 型糖尿病的药物<sup>[10]</sup>。胆酸在脂质代谢过程中发挥着必不可少的作用,胆固

醇在肝脏中转化为胆酸,随胆汁进入肠腔参与脂肪消化,在回肠重吸收经门静脉返还肝脏再被利用,即胆酸的“肠肝循环”<sup>[11-12]</sup>。若胆汁酸在肠道被其它物质结合,则胆汁酸无法完成肠肝循环,肝脏就会将更多的胆固醇转化为胆汁酸。有研究表明,红树莓籽黄酮具有良好的体外胆酸盐结合能力<sup>[13]</sup>,然而甜橙皮黄酮类化合物体外结合胆酸盐能力的研究鲜有报道,有必要通过体外胆酸盐结合试验初步评价甜橙皮黄酮的降血脂能力。

本文分析 4 种甜橙皮中 11 种黄酮类化合物的含量,通过体外试验初步评价甜橙皮黄酮类化合物的抗氧化活性、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶结合能力及胆酸盐吸附能力,为实现甜橙加工副产物的高值化利用提供理论参考。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与试剂

甜橙原料:血橙,产地四川资中;伦晚脐橙,产地湖北秭归;埃及橙,产地埃及;新奇士晚橙,产地美国。

主要试剂:黄酮类化合物标准品、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶(来源于酿酒酵母)、4-硝基苯- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷(*p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside, *p*NPG)、阿卡波糖,上海叶源生物科技有限公司;2,2-联苯基-1-苦基肼基(DPPH)、奎诺二甲基丙烯酸

收稿日期:2021-01-05

基金项目:国家重点研发计划项目(2017YFE0122300)

作者简介:姚旭(1996—),女,硕士生

通信作者:顾青 E-mail: guqing2002@hotmail.com

(Trolox)、2,9-二甲基-1,10-邻菲洛啉(Neocuproine)、二水合氯化铜、乙酸铵、胆酸钠、牛黄胆酸钠、甘胆酸钠、胃蛋白酶(生物技术级)、胰蛋白酶(生物技术级),上海麦克林生化科技有限公司;ABTS试剂盒、FRAP试剂盒,南京建成生物工程研究所。

## 1.2 仪器与设备

Mili-Q® Biocel™ 超纯水仪,美国 Millipore 公司;700Y 摇摆式粉碎机,武义海纳电器有限公司;GZX-9240MBE 电热鼓风干燥箱、数显恒温水浴锅,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;Spectra Max 190 酶标仪,美谷分子仪器(上海)有限公司;Alpha 1-4 LSC 真空冷冻干燥机,德国 Martin Christ 公司;JY 92-IIIN 超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司;R-300 旋转蒸发器,瑞士 BUCHI 公司;e2695 高效液相色谱仪,美国 Waters 公司。

## 1.3 试验方法

1.3.1 原料预处理 4种新鲜甜橙皮 40℃烘干 48 h,粉碎机粉碎过 40 目筛,冷冻干燥,于-80℃冰箱保存备用。

1.3.2 甜橙皮总黄酮样品的制备 称取 4 种甜橙皮冻干粉各 10.00 g,乙醇体积分数 52%,液料比 42 mL/g,超声功率 325 W 条件下超声提取 17 min,收集提取液减压浓缩至 50 mL,加入乙醇溶液使提取液中乙醇体积分数高于 80%,4℃层析柜静置 12 h,弃沉淀,取上清,初步除杂。将上清减压浓缩至无醇味,XAD-16 大孔树脂纯化,50%乙醇溶液洗脱,收集洗脱液减压浓缩,冷冻干燥,得到甜橙皮黄酮粉末,用于组分含量分析及抗氧化、降糖降脂功能评价。

1.3.3 HPLC 法测定甜橙皮中 11 种黄酮类化合物

11 种黄酮类化合物标准曲线绘制:称取枸橼苷 2.8 mg,圣草次苷、柚皮素各 4.0 mg,去甲基川陈皮素 4.4 mg,川陈皮素 4.8 mg,香蜂草苷、甜橙黄酮、柚皮苷、桔皮素各 5.0 mg,橙皮素 6.0 mg,充分溶解于 5 mL 甲醇-水(1:1,V/V)溶液,梯度稀释成不同质量浓度的标准溶液,0.22 μm 针头式过滤器过滤至液相小瓶中待用。参考张元梅<sup>[14]</sup>的方法并适当修改,建立 HPLC 分析甜橙皮黄酮组分含量的方法:流动相 A:0.1%乙酸-水溶液,流动

相 B:100%乙腈,梯度洗脱程序见表 1,Sun Fire™ C18 柱(5 μm,4.6 mm×150 mm),柱温 25℃,进样量 20 μL,检测波长 283 nm(黄烷酮)和 330 nm(多甲氧基黄酮),重复进样 3 次,分别以标准品质量浓度为横坐标,对应的峰面积为纵坐标,绘制 11 种黄酮类化合物标准曲线。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program

时间/ min	流量/ mL·min <sup>-1</sup>	流动相 A/ %	流动相 B/ %
0	0.7	85	15
5	0.7	75	25
15	0.7	70	30
25	0.7	60	40
35	0.7	45	55
40	0.7	40	60
45	0.7	85	15

甜橙皮 11 种黄酮类化合物的组分含量测定:称取 4 种甜橙皮黄酮粉末各 0.1 g,充分溶解于 2 mL 甲醇-水(1:1,V/V)溶液,0.22 μm 针头式过滤器过滤至液相小瓶中待用。按照 1.3.3 节中建立的方法测定甜橙皮中 11 种黄酮类化合物组分含量。

1.3.4 甜橙皮黄酮抗氧化活性测定 DPPH 法:参照 Liu 等<sup>[15]</sup>的方法稍加修改,取 80 μL 样品液(5 mg/mL)与 1 mL DPPH(0.2 mmol/L)涡旋振荡混匀,室温(25℃)避光反应 30 min,取 200 μL 加入 96 孔板于 517 nm 波长处测定 OD 值。

ABTS 法:参考试剂盒提供的试验方法,在 96 孔板中加入混合的 ABTS 工作液 180 μL,再加入 10 μL 样品液(5 mg/mL),室温反应 6 min,于 405 nm 波长处测定 OD 值。

FRAP 法:参考试剂盒提供的试验方法,在 96 孔板上依次加入 FRAP 工作液 180 μL、样品液(5 mg/mL)5 μL,37℃恒温水浴 5 min 于 593 nm 波长处测定 OD 值。

CUPRAC 法:参照 Frond 等<sup>[16]</sup>的测定方法,稍加改动,依次取 500 μL CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (0.01 mol/L)、500 μL Neocuproine 溶液(0.075 mol/L)、500 μL 乙酸铵缓冲液(1 mol/L)和 60 μL 样品液(5 mg/mL)加入试管,涡旋振荡混匀,室温暗处反应 1

h, 取 200  $\mu\text{L}$  加入 96 孔板于 450 nm 波长处测 OD 值。

以上 4 种方法抗氧化能力均以 Trolox 当量 (Trolox equivalent, TE) 表示, 重复试验 3 次。

### 1.3.5 甜橙皮黄酮对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制能力

参考 Padilla-Camberos 等<sup>[17]</sup>和谭青云等<sup>[18]</sup>的方法, 取 50  $\mu\text{L}$  样品液 (10 mg/mL) 与 250  $\mu\text{L}$   $\alpha$ -葡萄糖苷酶 (2 U, 溶于 0.1 mol/L PB, pH 6.8) 混匀, 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴 10 min, 加入 250  $\mu\text{L}$  *p*NPG (5 mmol/L), 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴 10 min, 加入 450  $\mu\text{L}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液 (0.2 mmol/L) 终止反应。取 200  $\mu\text{L}$  加入 96 孔板于 405 nm 波长处测定 OD 值, 以阿卡波糖 (6.25  $\mu\text{mol/L}$ ) 为阳性对照, 按公式 (1) 计算  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率, 重复试验 3 次。

$\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率 (%) =

$$\left[1 - \frac{(\text{OD}_{\text{样品}} - \text{OD}_{\text{背景}}) - \text{OD}_{\text{阿卡波糖}}}{\text{OD}_{\text{样品}} - \text{OD}_{\text{背景}}}\right] \times 100 \quad (1)$$

式中,  $\text{OD}_{\text{样品}}$ ——样品 +  $\alpha$ -葡萄糖苷酶 + *p*NPG +  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  反应后的 OD 值;  $\text{OD}_{\text{背景}}$ ——样品 +  $\alpha$ -葡萄糖苷酶 + PB 缓冲液 +  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  反应后的 OD 值;  $\text{OD}_{\text{阿卡波糖}}$ ——阿卡波糖 +  $\alpha$ -葡萄糖苷酶 + *p*NPG +  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  反应后的 OD 值。

1.3.6 甜橙皮黄酮胆酸盐结合能力 胆酸盐标准曲线的绘制: 将胆酸钠、牛磺胆酸钠、甘胆酸钠母液 (1 mmol/L) 用 0.1 mol/L PB 缓冲液 (pH 6.3) 稀释成不同梯度, 分别取上述不同梯度的胆酸盐标准溶液 2.5 mL 于 10 mL 具塞试管中, 加入 7.5 mL 60%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 70  $^{\circ}\text{C}$  水浴 25 min, 随后置于冰上冷却, 取 200  $\mu\text{L}$  加入 96 孔板, 于 387 nm 波长处测定 OD 值。以各胆酸盐的物质的量浓度为横坐标, 测得 OD 值为纵坐标, 绘制 3 种胆酸盐标准曲

线。

胆酸盐结合能力测定: 参照文献 [19]~[20] 中的方法略加修改, 依次将 1 mL 样品液 (10 mg/mL)、1 mL 胃蛋白酶 (10 mg/mL) 加入 10 mL 具塞试管, 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温摇床 120 r/min 振荡 1 h 模拟胃部消化。NaOH (0.1 mol/L) 调 pH 值至 6.3, 加入 4 mL 胰蛋白酶 (10 mg/mL), 振荡 1 h 模拟肠道消化。向每个具塞试管中分别加入 4 mL 的 3 种胆酸盐 (1 mmol/L), 37  $^{\circ}\text{C}$  振荡 1 h, 4000 r/min 离心 20 min, 取上清, 按 1.3.6 节绘制胆酸盐标准曲线的步骤测定胆酸盐含量, 重复试验 3 次, 按公式 (2) 计算胆酸盐结合能力。

$$\text{胆酸盐结合量} (\mu\text{mol/mg}) = C_1 - C_2 \quad (2)$$

式中,  $C_1$ ——原始胆酸盐物质的量浓度;  $C_2$ ——残留的胆酸盐物质的量浓度。

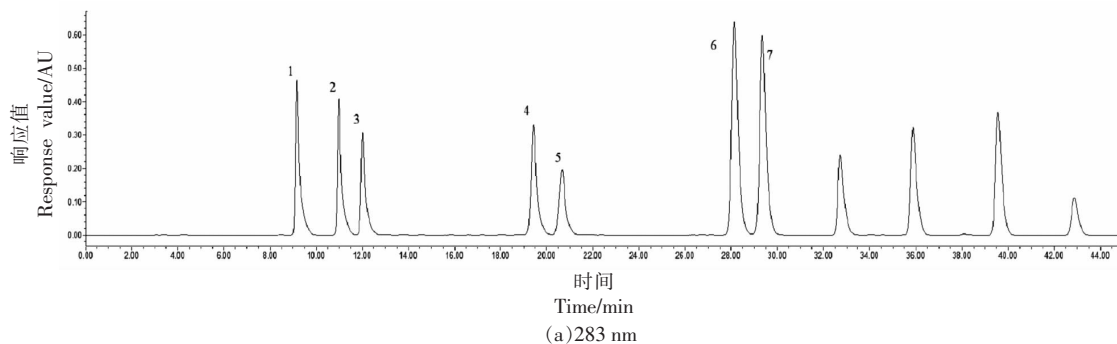
## 1.4 数据处理

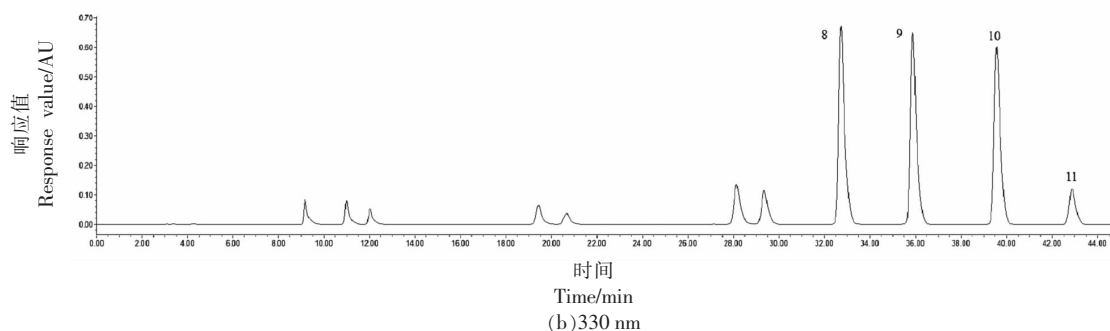
采用 SPSS 24.0 软件进行数据统计, ANOVA 单因素方差分析及 Tukey's 多重检验, 使用 Pearson 相关性分析, 结果以“平均值  $\pm$  标准差”表示, 使用 Excel 和 GraphPad Prism 8.0.1 软件作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 11 种黄酮类化合物标准品 HPLC 分析结果

11 种黄酮类化合物标准品 HPLC 色谱图如图 1 所示, 图 1a 峰 1~7 为 283 nm 波长下 7 种黄酮类化合物, 图 1b 峰 8~11 为 330 nm 波长下 4 种多甲氧基黄酮类化合物。11 种黄酮类化合物标准物质在 45 min 内可以较好的分离, 峰形良好, 满足有效检测黄酮类化合物的条件, 可以用来定性。





注:(a)为 283 nm 波长,其中,峰 1:圣草次苷(Eriocitrin),峰 2:柚皮苷(Naringin),峰 3:橙皮苷(Hesperidin),峰 4:香蜂草苷(Didymin),峰 5:枸橼柑(Poncirin),峰 6:柚皮素(Naringenin),峰 7:橙皮素(Hesperitin);(b)为 330 nm 波长,其中,峰 8:甜橙黄酮(Sinensetin),峰 9:川陈皮素(Nobiletin),峰 10:桔皮素(Tangeretin),峰 11:去甲基川陈皮素(5-O-Demethylnobiletin)。

图 1 11 种黄酮类化合物标准品 HPLC 图谱

Fig.1 HPLC chromatograms of 11 flavonoid compounds

表 2 列出了 11 种黄酮类化合物标准品回归方程、相关系数及保留时间,各标准品质量浓度与峰面积线性关系良好,相关系数  $R^2$  在 0.9992~

1.000 范围内,符合外标法定量,保留时间定性的要求。

表 2 黄酮类化合物标准曲线的回归方程和相关系数

Table 2 Regression equation and correlation coefficient of standard curve of flavonoids

序号	名称	回归方程	相关系数( $R^2$ )	保留时间/min
1	圣草次苷(Eriocitrin)	$y=541256x+17915$	1.0000	9.163
2	柚皮苷(Naringin)	$y=619977x+52335$	0.9999	10.986
3	橙皮苷(Hesperidin)	$y=705725x+17096$	0.9998	12.019
4	香蜂草苷(Didymin)	$y=693663x-14757$	0.9999	19.425
5	枸橼柑(Poncirin)	$y=582696x+93153$	0.9992	20.664
6	柚皮素(Naringenin)	$y=1620516x+110767$	0.9999	28.134
7	橙皮素(Hesperitin)	$y=1400311x+81452$	0.9999	29.349
8	甜橙黄酮(Sinensetin)	$y=1662208x-73510$	0.9998	32.721
9	川陈皮素(Nobiletin)	$y=1412171x+164272$	0.9999	35.874
10	桔皮素(Tangeretin)	$y=1716523x+113775$	0.9997	39.562
11	去甲基川陈皮素(5-O-Demethylnobiletin)	$y=1149358x-31096$	0.9996	42.874

## 2.2 甜橙皮黄酮组分含量差异结果分析

4 种甜橙皮样品黄酮类化合物组分含量结果见表 3。4 种甜橙皮中含量最多的是橙皮苷,枸橼柑在供试样品中均未检测到,与钱井<sup>[21]</sup>在不同橙类果皮中未检测到枸橼柑的结果相一致,或可推测橙类果皮中枸橼柑的含量较少。11 种黄酮类化合物含量总和从高到低依次为新奇士晚橙>埃及橙>血橙>伦晚脐橙,总体来看,7 种黄酮类化合物的含量总和高于 4 种多甲氧基黄酮类化合物的总和。

## 2.3 甜橙皮黄酮抗氧化能力比较

4 种甜橙皮黄酮类化合物抗氧化活性试验结果见表 4。新奇士晚橙果皮黄酮对 DPPH 自由基清除能力、ABTS 自由基清除能力和 CUPRAC 铜离子还原能力最强;血橙果皮黄酮的 FRAP 铁离子还原能力最好,新奇士晚橙次之,二者之间不存在显著性差异( $P > 0.05$ )。根据 Seeram 等<sup>[22]</sup>方法计算综合 APC 指数(Antioxidant potency composite index)并对其排序,结果见表 4。综合 APC 指数变幅为 86.20%~99.47%,4 种甜橙皮样品的综合抗氧化



能力从强至弱依次为:新奇士晚橙>埃及橙>血橙>伦晚脐橙,新奇士晚橙果皮黄酮基于 4 种抗氧化评价方法表现出的抗氧化活性优于其它 3 种甜橙样品。

表 3 甜橙皮中黄酮类化合物组分含量(mg/g DW)

Table 3 Content of flavonoids in sweet orange peels (mg/g DW)

标准品	样品			
	血橙	伦晚脐橙	埃及橙	新奇士晚橙
圣草次苷(Eriocitrin)	1.065 ± 0.063 <sup>b</sup>	0.162 ± 0.008 <sup>c</sup>	1.642 ± 0.056 <sup>a</sup>	1.547 ± 0.088 <sup>a</sup>
柚皮苷(Naringin)	4.936 ± 0.074 <sup>c</sup>	2.561 ± 0.077 <sup>d</sup>	5.711 ± 0.155 <sup>b</sup>	7.712 ± 0.152 <sup>a</sup>
橙皮苷(Hesperidin)	42.484 ± 1.352 <sup>b</sup>	36.520 ± 0.806 <sup>c</sup>	46.497 ± 1.775 <sup>ab</sup>	49.179 ± 1.949 <sup>a</sup>
香蜂草苷(Didymin)	2.259 ± 0.034 <sup>b</sup>	1.86 ± 0.044 <sup>c</sup>	1.831 ± 0.086 <sup>c</sup>	2.595 ± 0.025 <sup>a</sup>
枸橼柑(Poncirin)	-	-	-	-
柚皮素(Naringenin)	0.101 ± 0.005 <sup>a</sup>	0.086 ± 0.004 <sup>b</sup>	0.043 ± 0.006 <sup>c</sup>	0.076 ± 0.002 <sup>b</sup>
橙皮素(Hesperitin)	1.215 ± 0.006 <sup>b</sup>	0.854 ± 0.004 <sup>c</sup>	1.365 ± 0.009 <sup>a</sup>	0.816 ± 0.025 <sup>d</sup>
甜橙黄酮(Sinensetin)	0.641 ± 0.012 <sup>d</sup>	3.44 ± 0.088 <sup>a</sup>	1.632 ± 0.029 <sup>c</sup>	2.775 ± 0.073 <sup>b</sup>
川陈皮素(Nobiletin)	0.559 ± 0.013 <sup>d</sup>	1.267 ± 0.010 <sup>c</sup>	1.314 ± 0.015 <sup>b</sup>	1.576 ± 0.025 <sup>a</sup>
桔皮素(Tangeretin)	0.056 ± 0.009 <sup>d</sup>	1.168 ± 0.003 <sup>a</sup>	0.708 ± 0.006 <sup>b</sup>	0.239 ± 0.013 <sup>c</sup>
去甲基川陈皮素(5-O-Demethylnobiletin)	0.007 ± 0.000 <sup>b</sup>	0.056 ± 0.001 <sup>a</sup>	-	-

注: -, 未检出; 同列不同字母表示样品间差异显著( $P < 0.05$ ); mg/g DW: 意为每 g 冻干样品中含有 mg 标准品物质质量。

表 4 甜橙皮黄酮的抗氧化能力

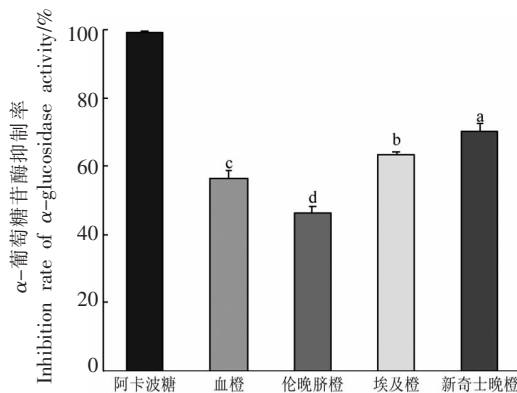
Table 4 The antioxidant capacity of flavonoids in sweet orange peels

样品	抗氧化能力/mg TE·g <sup>-1</sup> DW				综合 APC 指数/%	综合 APC 指数排序
	DPPH	ABTS	FRAP	CUPRAC		
血橙	36.027 ± 0.129 <sup>b</sup>	20.357 ± 0.060 <sup>c</sup>	66.995 ± 1.204 <sup>a</sup>	21.021 ± 0.104 <sup>b</sup>	95.01	3
伦晚脐橙	32.674 ± 0.162 <sup>c</sup>	21.042 ± 0.156 <sup>b</sup>	53.592 ± 0.431 <sup>c</sup>	18.868 ± 0.122 <sup>d</sup>	86.20	4
埃及橙	38.463 ± 0.287 <sup>a</sup>	21.863 ± 0.163 <sup>a</sup>	61.459 ± 1.047 <sup>b</sup>	20.354 ± 0.367 <sup>c</sup>	95.45	2
新奇士晚橙	39.072 ± 0.518 <sup>a</sup>	22.033 ± 0.094 <sup>a</sup>	65.587 ± 0.232 <sup>a</sup>	22.026 ± 0.189 <sup>a</sup>	99.47	1

注: 同列不同字母表示样品间存在显著性差异,  $P < 0.05$ 。

#### 2.4 甜橙皮黄酮对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制能力比较

黄酮类化合物作为  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂可通过竞争抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶延缓碳水化合物的吸收<sup>[23]</sup>,也可提高胰岛素敏感性<sup>[24]</sup>,从而有效降低餐后血糖。4 种甜橙皮黄酮对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制率结果见图 2。结果表明,以阿卡波糖为阳性对照,供试样品对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制活性存在显著差异 ( $P < 0.05$ ),从高到低依次为新奇士晚橙(70.18%)>埃及橙(63.12%)>血橙(56.46%)>伦晚脐橙(46.16%),甜橙皮黄酮具有一定的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制作用,新奇士晚橙果皮黄酮类化合物对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制效果在 4 种样品中表现最为突出,或可作为  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的重要来源。



注: 不同字母表示品种间差异显著( $P < 0.05$ )。

图 2 甜橙皮黄酮对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制活性  
Fig.2 Inhibition effects of flavonoids in sweet orange peels on  $\alpha$ -glucosidase

## 2.5 甜橙皮黄酮胆酸盐结合能力结果比较

根据 1.3.6 节的方法以胆酸盐浓度为横坐标, 对应 OD 值为纵坐标, 绘制胆酸盐标准曲线如图 3 所示, 波长 397 nm 处的 OD 值与 3 种胆酸盐浓度有良好的线性关系, 胆酸钠、牛磺胆酸钠和甘胆酸钠回归方程及相关系数  $R^2$  分别为:  $y=6.2965x+0.0132, R^2=0.9977$ ;  $y=5.8662x+0.002, R^2=0.9992$ ;  $y=6.2075x+0.0117, R^2=0.9975$ 。

4 种甜橙皮黄酮结合胆酸盐能力的测定结果见表 5。供试样品对胆酸钠、牛磺胆酸钠、甘胆酸钠吸附量变幅分别为  $(0.359 \pm 0.004) \sim (0.386 \pm 0.006) \mu\text{mol}/\text{mg}$ ,  $(0.383 \pm 0.004) \sim (0.460 \pm 0.005) \mu\text{mol}/\text{mg}$  和  $(0.372 \pm 0.008) \sim (0.455 \pm 0.017) \mu\text{mol}/\text{mg}$ , 总体来看, 4 种甜橙皮样品对后牛磺胆酸钠、甘胆酸钠的吸附能力的均值相对高于胆酸钠吸附量, 新奇士晚橙样品对 3 种胆酸盐均表现出较好的体外结合效果, 试验结果表明 4 种甜橙皮黄酮

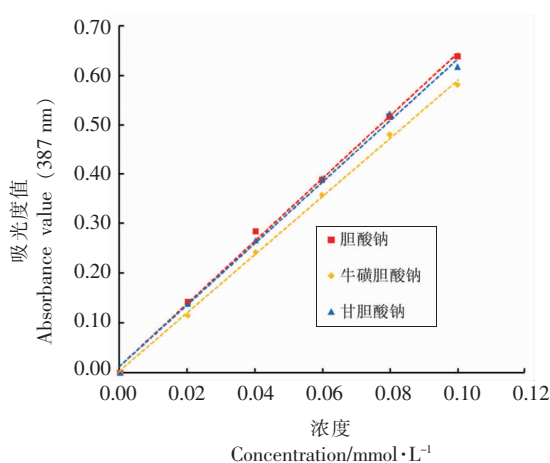


图 3 胆酸盐标准曲线

Fig.3 Standard curve of bile acid salts

类化合物或可在胆酸盐结合过程中发挥重要作用。

表 5 甜橙皮黄酮胆酸盐结合量

Table 5 Banding of bile salts of flavonoids in sweet orange peels

品种	胆酸盐结合量/ $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$		
	胆酸钠	牛磺胆酸钠	甘胆酸钠
血橙	$0.359 \pm 0.004^b$	$0.383 \pm 0.004^c$	$0.411 \pm 0.009^b$
伦晚脐橙	$0.345 \pm 0.004^c$	$0.435 \pm 0.006^b$	$0.372 \pm 0.008^c$
埃及橙	$0.372 \pm 0.007^b$	$0.444 \pm 0.008^b$	$0.417 \pm 0.019^b$
新奇士晚橙	$0.386 \pm 0.006^a$	$0.460 \pm 0.005^a$	$0.455 \pm 0.017^a$

注: 同列不同字母之间表示存在显著性差异,  $P < 0.05$ 。

## 2.6 甜橙皮黄酮与体外抗氧化、降糖降脂能力相关性分析

11 种黄酮类化合物含量总和与抗氧化活性、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率和胆酸盐结合能力 Pearson 相关性分析见表 6。DPPH 自由基清除能力、ABTS 自由基清除能力、CUPRAC 铜离子还原能力、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率、胆酸钠结合量和甘胆酸钠结合量与 11 种黄酮总含量之间存在极显著线性正相关 ( $P < 0.01$ ); FRAP 铁离子还原能力与 11 种黄酮总含量呈显著相关 ( $P < 0.05$ ); 牛磺胆酸钠结合量与 11 种黄酮总含量相关性不显著 ( $P > 0.05$ ), 试验结果与陈浩南等<sup>[25]</sup>对高良姜水黄酮含量与自由基及  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制能力呈正相关的结果相一致。相关性分析结果表明甜橙皮中的 11 种黄酮

表 6 甜橙皮黄酮与生物活性 Pearson 相关性分析结果  
Table 6 Pearson correlation analysis between flavonoids and biological activity

生物活性指标	11 种总黄酮相关系数 ( $r$ )
DPPH	0.939**
ABTS	0.745**
FRAP	0.584*
CUPRAC	0.799**
$\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率	0.923**
胆酸钠结合量	0.973**
牛磺胆酸钠结合量	0.573
甘胆酸钠结合量	0.877**

注: \*,  $P < 0.05$  (双侧) 显著相关; \*\*,  $P < 0.01$  (双侧) 极显著相关。

总含量与体外抗氧化、降糖降脂功能存在紧密联系。

### 3 结论

果皮作为甜橙生产加工过程中的主要副产物,是回收利用黄酮类化合物的优良原料。本研究利用 HPLC 法测定 4 种甜橙皮中包括 7 种黄酮类和 4 种多甲氧基黄酮在内的 11 种黄酮类化合物,供试样品中橙皮苷的含量最为丰富,4 种甜橙皮中 11 种黄酮类化合物总含量从高到低依次为新奇士晚橙>埃及橙>血橙>伦晚脐橙。体外抗氧化结果显示甜橙皮黄酮的综合 APC 指数在 86.20%~99.47%之间,新奇士晚橙综合 APC 指数排名居首位,表现出较强的抗氧化活性。以阿卡波糖为阳性对照,甜橙皮黄酮类化合物表现出抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的能力,抑制率变幅为 46.16%~70.18%。甜橙皮黄酮类化合物具有一定的体外结合胆酸盐结合能力,对牛磺胆酸钠和甘胆酸钠结合量的均值要高于胆酸钠结合量。相关性分析结果表明,除牛磺胆酸钠与 11 种黄酮类化合物总含量未表现出显著相关性( $P>0.05$ ),其余几项生物活性评价结果均与 11 种黄酮类化合物总含量呈显著性正相关( $P<0.05$ )。本试验为甜橙皮黄酮类化合物开发出具有抗氧化及降糖降脂作用的功能性产品提供了研究基础,同时为甜橙皮副产物变废为宝以期实现高值化利用提供参考。

### 参 考 文 献

- [1] LIEW S S, HO W Y, YEAP S K, et al. Phytochemical composition and *in vitro* antioxidant activities of *Citrus sinensis* peel extracts[J]. PeerJ, 2018, 6: e5331.
- [2] EL-HADARY A E, RAMADAN M F. Phenolic profiles, antihyperglycemic, antihyperlipidemic, and antioxidant properties of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract[J]. Journal of Food Biochemistry, 2019, 43(4): e12803.
- [3] DAS G, PATRA J K, BASAVEGOWDA N, et al. Comparative study on antidiabetic, cytotoxicity, antioxidant and antibacterial properties of biosynthesized silver nanoparticles using outer peels of two varieties of *Ipomoea batatas* (L.) Lam[J]. International Journal of Nanomedicine, 2019, 14: 4741-4754.
- [4] RENGASAMY K R R, KHAN H, GOWRISHANKAR S, et al. The role of flavonoids in autoimmune diseases: Therapeutic updates[J]. Pharmacology & Therapeutics, 2019, 194: 107-131.
- [5] OTEIZA P I, FRAGA C G, MILLS D A, et al. Flavonoids and the gastrointestinal tract: Local and systemic effects[J]. Molecular Aspects of Medicine, 2018, 61: 41-49.
- [6] PEREZ-VIZCAINO F, FRAGA C G. Research trends in flavonoids and health[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2018, 646: 107-112.
- [7] CHEN Q, WANG D, TAN C, et al. Profiling of flavonoid and antioxidant activity of fruit tissues from 27 Chinese local citrus cultivars[J]. Plants (Basel), 2020, 9(2): 196.
- [8] CHEN X, TAIT A R, KITTS D D. Flavonoid composition of orange peel and its association with antioxidant and anti-inflammatory activities [J]. Food Chemistry, 2017, 218: 15-21.
- [9] BARRECA D, GATTUSO G, BELLOCCO E, et al. Flavanones: Citrus phytochemical with health-promoting properties[J]. BioFactors (Oxford, England), 2017, 43(4): 495-506.
- [10] GANDHI G R, VASCONCELOS A B S, WU D, et al. Citrus flavonoids as promising phytochemicals targeting diabetes and related complications: A systematic review of *in vitro* and *in vivo* studies[J]. Nutrients, 2020, 12(10): 2907.
- [11] ALPHONSE P A S, JONES P J H. Revisiting human cholesterol synthesis and absorption: The reciprocity paradigm and its key regulators[J]. Lipids, 2016, 51(5): 519-536.
- [12] CHIANG J Y L. Bile acid metabolism and signaling [J]. Comprehensive Physiology, 2013, 3(3): 1191-1212.
- [13] 芦宇, 吕长鑫, 焦天慧, 等. 聚酰胺纯化红树莓籽黄酮及其结合胆酸盐能力评价[J]. 中国食品学报, 2019, 19(10): 172-178.
- LU Y, LÜ C X, JIAO T H, et al. Ability of bile salt-binding of red raspberry seed flavonoids purification by polyamide[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(10): 172-178.

- [14] 张元梅. 中国野生宽皮柑橘酚类物质的检测及其抗氧化活性研究[D]. 重庆: 西南大学, 2013.  
ZHANG Y M. Phenolic compositions and antioxidant capacities of the Chinese wild mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) fruits [D]. Chongqing: Southwest University, 2013.
- [15] LIU X, CUI C, ZHAO M, et al. Identification of phenolics in the fruit of emblica (*Phyllanthus emblica* L.) and their antioxidant activities[J]. Food Chemistry, 2008, 109(4): 909-915.
- [16] FROND A D, IUHAS C I, STIRBU I, et al. Phytochemical characterization of five edible purple-red-dish vegetables: Anthocyanins, flavonoids, and phenolic acid derivatives[J]. Molecules, 2019, 24(8): 1536.
- [17] PADILLA -CAMBEROS E, LAZCANO -DÍAZ E, FLORES -FERNANDEZ J M, et al. Evaluation of the inhibition of carbohydrate hydrolyzing enzymes, the antioxidant activity, and the polyphenolic content of citrus limetta peel extract[J]. The Scientific World Journal, 2014, 2014: 1-4.
- [18] 谭青云, 袁永俊, 王丹, 等. 不同提取方式对铁皮石斛多糖及体外降血糖的影响[J]. 食品科技, 2019, 44(6): 202-206.  
TAN Q Y, YUAN Y J, WANG D, et al. Effects of different extraction methods on polysaccharide from *Dendrobium candidum* and hypoglycemic effect *in vitro* [J]. Food Science and Technology, 2019, 44(6): 202-206.
- [19] 樊溢. 铁皮石斛多糖体内外降糖降脂功能初探[D]. 太原: 山西大学, 2018.  
FAN Y. Preliminary study on the function of hypoglycemic and hypolipidemic of *Dendrobium officinale* polysaccharides *in vivo* and *in vitro* [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2018.
- [20] 刘淑敏. 不同茶类浸提液及茶多酚的生物活性和机理研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2016.  
LIU S M. Study on the biological activities and functional mechanisms of different tea extracts and tea polyphenols [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2016.
- [21] 钱井. 柑橘黄酮类化合物组分鉴定与抗氧化活性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2017.  
QIAN J. Determination and antioxidant evaluation of flavonoids compounds from different citrus cultivars [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2017.
- [22] SEERAM N P, AVIRAM M, ZHANG Y, et al. Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(4): 1415-1422.
- [23] ASSEFA S T, YANG E, CHAE S, et al. Alpha glucosidase inhibitory activities of plants with focus on common vegetables [J]. Plants (Basel, Switzerland), 2019, 9(1): 2.
- [24] JIA Y, MA Y, CHENG G, et al. Comparative study of dietary flavonoids with different structures as  $\alpha$ -glucosidase inhibitors and insulin sensitizers [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(37): 10521-10533.
- [25] 陈浩南, 李姣, 王婉愉, 等. 高良姜水提物的体外抗氧化和胰脂肪酶、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制功能研究[J]. 中国调味品, 2019, 44(4): 43-47.  
CHEN H N, LI J, WANG W Y, et al. Antioxidant activities and inhibitory effects against pancreatic lipase and  $\alpha$ -glucosidase of galangal aqueous extracts *in vitro* [J]. China Condiment, 2019, 44(4): 43-47.

### Studies on Antioxidant Activity, Hypoglycemic and Lipid-lowering Capacity of Flavonoids in Sweet Orange Peels *in Vitro*

Yao Xu, Li Ping, Gu Qing\*

(College of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Key Laboratory for Food Microbial Technology of Zhejiang Province, Hangzhou 310018)

**Abstract** This study aims to explore the potential utilization of sweet orange peels. In this paper, flavonoid compounds in the peels of blood orange, navel orange, egyptian orange, and sunkist orange were extracted, and the contents of 11 flavonoid compounds were analyzed by HPLC. Then the bioactive functions in four sweet orange peels were investigated



*in vitro*. The results manifested that there were abundant flavanone compounds in the sweet orange peels, such as eriocitrin, narirutin, and hesperidin, and the contents of polymethoxyflavonoids were less than that of flavanone compounds. The comprehensive APC index of flavonoids in sweet orange peels ranged from 86.20% to 99.47%. The inhibitory ratio of  $\alpha$ -glucosidase varying from 46.16% to 70.18%. Moreover, the bile acid salt binding experiment indicated that sweet orange peels flavonoids could bind bile acid sodium, sodium taurocholate, and sodium glycocholate. The adsorption capacity was within the range of 0.359 to 0.460  $\mu\text{mol}/\text{mg}$ . Pearson correlation analysis showed positive correlations between the biological activity and the total content of 11 flavonoids. This study provided theoretical support for the development of antioxidative, hypoglycemic, and lipid-lowering functional products using sweet orange peels.

**Keywords** sweet orange peels flavonoids; component content; antioxidant activity; hypoglycemic and lipid-lowering