

化橘红黄酮深共熔溶剂提取工艺优化 及抗氧化活性研究

Optimization of deep eutectic solvent extraction process and antioxidant activities of flavonoids from exocarpium *Citri grandis*

梁泳仪¹ 肖冬悦¹ 王 宏¹ 梁一柱² 曾晓房¹

LIANG Yongyi¹ XIAO Dongyue¹ WANG Hong¹ LIANG Yizhu² ZENG Xiaofang¹

(1. 仲恺农业工程学院轻工食品学院, 广东 广州 510225; 2. 化州市农业推广技术推广中心, 广东 茂名 525100)

(1. College of Light Industry and Food Technology, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou, Guangdong 510225, China; 2. Huazhou Agricultural Extension Technology Extension Center, Ltd., Maoming, Guangdong 525100, China)

摘要: [目的] 提高化橘红在功能食品及医药等领域的应用。[方法] 选取深共熔溶剂体系、深共熔溶剂含水率、料液比、提取温度和提取时间为试验因素, 以黄酮得率为指标进行单因素试验, 从中筛选出具有显著性差异的因素, 并采用响应面法优化深共熔溶剂提取化橘红黄酮工艺; 以 DPPH 自由基、ABTS 自由基和羟自由基清除能力评价化橘红黄酮提取液的抗氧化活性。[结果] 氯化胆碱—乙二醇体系提取的化橘红黄酮得率最高。深共熔溶剂含水率、料液比、提取温度对化橘红黄酮的得率有显著影响, 以此为基础进行响应面分析得到化橘红黄酮的最优提取工艺: 深共熔溶剂含水率 43%、料液比 1 : 21 (g/mL)、提取温度 60 °C, 化橘红黄酮得率为 (19.31 ± 0.47) mg/g。对最优工艺条件下得到的化橘红黄酮提取液进行抗氧化活性研究, 结果显示, 化橘红黄酮提取液对 DPPH 自由基、ABTS 自由基和羟自由基清除率的半最大效应质量浓度分别为 (117.61 ± 1.71), (36.91 ± 0.46), (387.52 ± 1.85) μg/mL。[结论] 深共熔溶剂提取化橘红黄酮的得率显著优于传统水提法和乙醇溶剂提取法 ($P < 0.05$); 化橘红黄酮具有作为天然抗氧化剂来源的潜力。

关键词: 化橘红; 黄酮; 深共熔溶剂; 抗氧化活性

Abstract: [Objective] This study aimed to optimize the process of deep eutectic solvent extraction of flavonoids from exocarpium *Citri grandis* and to evaluate its antioxidant activity. [Methods] The type of deep eutectic solvent system, the water content of deep eutectic solvent, material-to-liquid ratio, extraction temperature, and extraction time were selected as experimental variables, and the yield of flavonoids was used as response variables to conduct single factor experiment. Then the single factors with significant differences were screened to optimize the process of deep eutectic solvent extraction of exocarpium *C. grandis* flavonoids by response surface methods. Finally, the scavenging ability of exocarpium *C. grandis* flavonoid extract on DPPH radicals, ABTS radicals, and hydroxyl radicals was explored to analyze the antioxidant activity. [Results] The highest yield of exocarpium *C. grandis* flavonoid was obtained by the choline chloride-glycol system. The yield of flavonoids was significantly impacted by the deep eutectic solvent's water content, the material-to-liquid ratio, and the extraction temperature. The response surface method was used to determine the ideal flavonoid extraction procedure, which included the deep eutectic solvent's water content of 43%, the material-to-liquid ratio of 1 : 21 (g/mL), and the extraction temperature of 60 °C. The yield of exocarpium *C. grandis* flavonoids was (19.31 ± 0.47) mg/g. The results of antioxidant activity showed that the concentration for 50% of maximal effect values of DPPH radical, ABTS radical, and hydroxyl radical scavenging were (117.61 ± 1.71), (36.91 ± 0.46), (387.52 ± 1.85) μg/mL. [Conclusion] The extraction of exocarpium *C. grandis* flavonoids using deep eutectic solvent resulted in significantly higher yields compared

基金项目: 广东省茂名市化州市现代农业产业园项目 (编号: 农办规[2023]25 号); 广州市科技计划项目一般项目 (编号: 202201010268); 广东省研究生教育创新计划项目 (编号: 2023SFKC_057)

作者简介: 梁泳仪, 女, 仲恺农业工程学院在读硕士研究生。

通信作者: 王宏 (1988—), 女, 仲恺农业工程学院特聘副教授, 博士。E-mail: whongaq@163.com

曾晓房 (1979—), 男, 仲恺农业工程学院教授, 博士。

E-mail: xiaofang_zeng2015@163.com

收稿日期: 2023-09-15

改回日期: 2024-04-22

with conventional water and ethanol method. These flavonoid extracts had potential as a source of natural antioxidants.

Keywords: exocarpium *Citri grandis*; flavonoid; deep eutectic solvent extraction; antioxidant activity

化橘红(exocarpium *Citri grandis*)又名化州橘红、化州陈皮、柚皮橘红等,原产于广东化州,为芸香科植物化州柚或柚的未成熟或近成熟的干燥外层果皮^[1-2]。化橘红的药用价值极高,具有止咳化痰、健脾消食、缓解积食等作用^[3]。黄酮类化合物是化橘红的活性成分之一^[4-6],化橘红黄酮类化合物具有抗氧化作用。王雯^[7]对水提取法制得的化橘红黄酮提取液进行抗氧化能力、成分分析等研究,结果表明,化橘红黄酮纯度越高,抗氧化能力越强。He等^[8]通过对柑橘类草本植物的化学成分和抗氧化活性的研究,得出化橘红中的黄酮类物质具有显著的抗氧化能力。Zhu等^[9]发现,化橘红总黄酮能改善PM_{2.5}诱导小鼠的肺部炎症和氧化应激,说明其能改善肺损伤。段志芳等^[10]研究表明,化橘红中对DPPH自由基起到清除作用的成分主要为橙皮苷和柚皮苷。但这些研究大多采用有机溶剂进行提取,相关产品用于医药或功能食品领域时需考虑安全及环保等因素。与甲醇、乙醇等传统有机溶剂萃取法相比,利用深共熔溶剂(DES)进行萃取,具有低毒环保、成本低、易回收、制取简单的优势^[11-12]。目前,深共熔溶剂提取化橘红黄酮的研究尚未见报道。研究拟以化橘红为原料,对5种不同的深共熔溶剂进行筛选,以获得提取化橘红黄酮的最佳溶剂体系,在此基础上优化深共熔溶剂提取化橘红黄酮类物质的工艺,同时对最优条件下获取的黄酮提取液进行抗氧化活性研究,旨在为化橘红在功能食品及医药等领域的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

化橘红:产地广东化州,化州市橘宝橘红制品有限公司;

氯化胆碱、山梨醇、尿素、L-抗坏血酸(V_C)、硝酸铝和亚硝酸钠:分析纯,上海麦克林生化科技有限公司;

乙二醇、乳酸、丙三醇和无水乙醇:分析纯,天津市永大化学试剂有限公司;

芦丁标准品、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、过硫酸钾、2,2'-联氮-(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)、硫酸亚铁和水杨酸:分析纯,上海源叶生物科技有限公司。

1.2 仪器

数显恒温水浴锅:HH-2型,河南恩格窑炉机械设备有限公司;

定时双向数显恒温磁力搅拌器:JB-5型,江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司;

台式高速冷冻离心机:H1650-W型,湘潭湘仪仪器有限公司;

酶标仪:SYNERGY H1型,上海艾研生物科技有限公司;

电子天平:YP502N型,上海舜宇恒平科学仪器有限公司;

粉碎机:FSJ-A03E1型,佛山市小熊厨房电器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 深共熔溶剂制备 配制深共熔溶剂氯化胆碱—丙三醇(V_{氯化胆碱}:V_{丙三醇}=1:2),80℃条件下,在磁力搅拌器上搅拌1~3h,直至形成均匀透明液体。按照同样的比例制备其他深共熔溶剂体系:氯化胆碱—乙二醇、氯化胆碱—乳酸、氯化胆碱—D-山梨醇和氯化胆碱—尿素。

1.3.2 样品预处理 取适量的化橘红片粉碎,过60目筛,得化橘红粉末,备用。

1.3.3 传统水提法提取化橘红黄酮的基础工艺 称取100mg化橘红粉末,按料液比1:25(g/mL)加入超纯水(2.5mL),混匀后于60℃水浴60min,以10000r/min离心10min,取上清液制得化橘红黄酮水提液。

1.3.4 深共熔溶剂提取化橘红黄酮的基础工艺 称取100mg化橘红粉末,按料液比1:25(g/mL)加入含水率30%深共熔溶剂(2.5mL),混匀后于60℃水浴60min,以10000r/min离心10min,取上清液制得化橘红黄酮供试液。

1.3.5 化橘红黄酮得率测定

(1) 芦丁标准曲线绘制:参照Liu等^[13]的方法。通过线性分析,得到标准曲线回归方程: $y = 5.9211x + 0.0219$,相关系数 R^2 为0.9972。

(2) 化橘红黄酮得率测定:取化橘红黄酮供试液40μL,加入360μL的超纯水。其余操作步骤同芦丁标准曲线绘制。测定510nm处的吸光值,按式(1)计算化橘红黄酮得率。

$$P = \frac{C \times A \times V}{m}, \quad (1)$$

式中:

P——黄酮得率,mg/g;

C——样品质量浓度,mg/mL;

A——稀释倍数;

V——提取液体积,mL;

m——化橘红粉末重量,g。

1.3.6 最优深共熔溶剂的确定 以化橘红黄酮得率为评价指标,对5种不同深共熔(氯化胆碱—丙三醇、氯化胆碱—乙二醇、氯化胆碱—乳酸、氯化胆碱—D-山梨醇和氯化胆碱—尿素)进行筛选,得到提取化橘红黄酮的最优深

共熔溶剂。

1.3.7 单因素试验 以化橘红粉末质量为基准,在深共熔溶剂含水率 30%、料液比 1:25 (g/mL)、提取温度 60℃、提取时间 60 min 的基础上进行单因素试验,分别考察深共熔溶剂含水率、料液比、提取温度和提取时间对化橘红黄酮得率的影响。

1.3.8 响应面法优化化橘红黄酮提取工艺 在单因素试验结果基础上,选取深共熔溶剂含水率、料液比、提取温度为自变量;以化橘红黄酮得率为响应值进行响应面试验方案设计。

1.3.9 化橘红黄酮抗氧化活性研究 提取最优工艺条件下的化橘红黄酮提取液,并对其黄酮质量浓度进行测定,随后设计适宜的浓度梯度以评估其清除 DPPH 自由基、ABTS 自由基和羟自由基能力。

(1) DPPH 自由基清除能力:参考宋晓凡等^[14]的方法进行测定,以 V_c 为对照组。按式(2)计算 DPPH 自由基清除率并通过 GraphPad Prism 7 分析得出半最大效应质量浓度(EC_{50} 值)。

$$R = \left(1 - \frac{A_x}{A_0}\right) \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

R ——自由基清除率,%;

A_0 ——空白对照的吸光度值;

A_x ——加入样品后反应液的吸光度值。

(2) ABTS 自由基清除能力:参考徐洪宇等^[15]的方法进行测定,以 V_c 为对照组。按式(2)计算 ABTS 自由基清除率并通过 GraphPad Prism 7 分析得出 EC_{50} 值。

(3) 羟自由基清除能力:参考陈建福等^[16]的方法进行测定,以 V_c 为对照组。按式(3)计算羟自由基清除率并通过 GraphPad Prism 7 分析得出 EC_{50} 值。

$$R_H = \left(1 - \frac{A_x - A_{x_0}}{A_0}\right) \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

R_H ——羟自由基清除率,%;

A_x ——加入样品的吸光度值;

A_{x_0} ——本底对照的吸光度值;

A_0 ——空白对照的吸光度值。

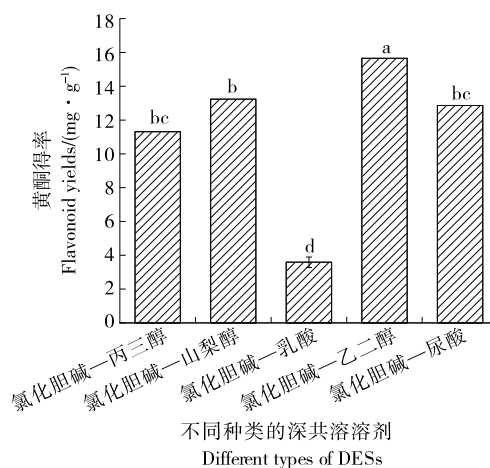
1.4 数据处理与分析

所有试验重复测定 3 次。试验数据显著性分析采用 Duncan's 方法进行分析,运用 Design expert 11 进行响应面设计;通过 Origin 制图并用 GraphPad Prism 7 处理数据。

2 结果与讨论

2.1 最优深共熔溶剂筛选结果

从图 1 可以看出,氯化胆碱—乙二醇体系的深共熔溶剂提取化橘红黄酮得率远高于其他 4 种深共熔溶剂体



字母不同表示具有显著性差异 ($P < 0.05$)

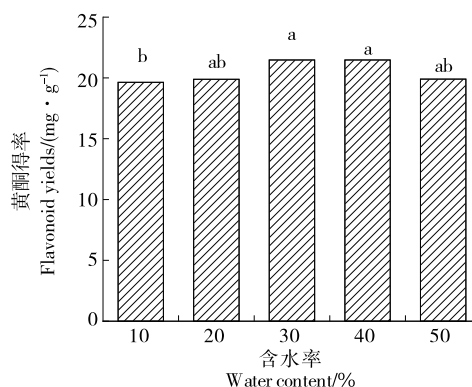
图 1 不同深共熔溶剂的黄酮得率比较

Figure 1 Comparison of flavonoid extraction rates from different deep eutectic solvents

系。深共熔溶剂通常是由氢键受体 (hydrogen bond acceptor, HBA; 如季铵盐) 和氢键供体 (hydrogen bond donors, HBD; 如多元醇、尿素和羧酸) 等组分在共晶状态下组合而成,其熔点远低于单个组分,且拥有优良的生物相容性^[17]。因此,确定氯化胆碱—乙二醇体系的深共熔溶剂提取效果最佳,将其用于后续试验。

2.2 单因素试验

2.2.1 深共熔溶剂含水率对化橘红黄酮得率的影响 由图 2 可知,深共熔溶剂含水率的增加使得化橘红黄酮得率呈先缓慢升高而后降低的趋势,当深共熔溶剂含水率为 30%、40% 时,黄酮得率较高,分别为 (21.47 ± 0.93) 、 (21.47 ± 0.11) mg/g。由于深共熔溶剂的黏度会受到加水量的影响,含水率为 10%~30% 时,随着含水率的增加,深共熔溶剂的黏度下降,增强了传质作用,而且一定



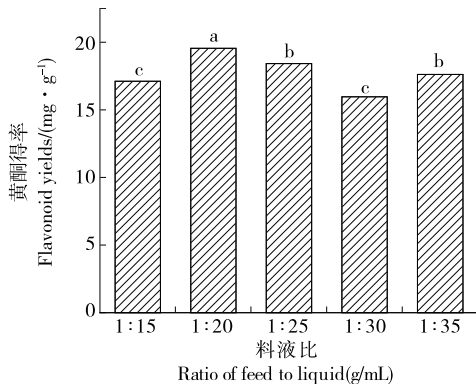
字母不同表示具有显著性差异 ($P < 0.05$)

图 2 深共熔溶剂含水率对化橘红黄酮提取率的影响

Figure 2 Influence of water content on the extraction rate of flavonoids from exocarpium *Citri Grandis*

量的水分有利于黄酮类物质的溶解,使得黄酮得率增加^[18];含水率为40%~50%时,化橘红黄酮得率下降,可能是由于水分含量过高会破坏深共熔溶剂的氢键,导致其提取能力下降^[19],也可能是由于黄酮成分与深共熔溶剂已接触完全,此时继续增大含水率,相当于稀释深共熔溶剂,反而会阻碍黄酮浸出。综合成本考虑,深共熔溶剂含水率选择40%。

2.2.2 料液比对化橘红黄酮得率的影响 由图3可知,黄酮得率随深共熔溶剂增加整体呈先升高后下降的趋势,当料液比为1:20(g/mL)时化橘红黄酮得率达到最大值,为 (19.55 ± 0.25) mg/g。深共熔溶剂较少时,增加溶剂扩大了反应体系中化橘红和深共熔溶剂的接触面积,使得溶剂能均匀、快速地进入细胞内,黄酮类化合物不断溶出^[20];溶剂较多时,黄酮得率总体呈下降趋势,可能是由于其他可溶性物质与黄酮类成分竞争溶剂,使其得率降低^[21-22]。虽然在1:35(g/mL)时黄酮得率有所回升,但溶剂过多成本高。因此,料液比选择1:20(g/mL)。



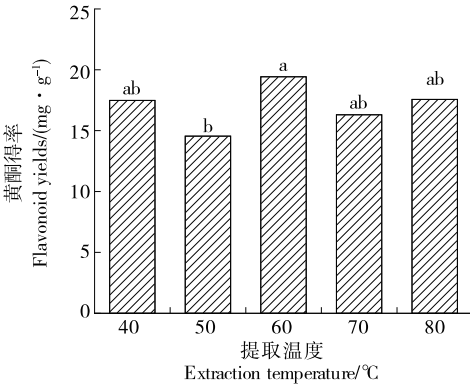
字母不同表示具有显著性差异($P < 0.05$)

图3 料液比对化橘红黄酮提取率的影响

Figure 3 Effects of ratio of feed to liquid on the yield of flavonoids from exocarpium *C. grandis*

2.2.3 提取温度对化橘红黄酮得率的影响 由图4可知,当提取温度为60℃时,化橘红黄酮得率达到最大,为 (19.43 ± 1.99) mg/g,推测是由于适当提高温度有利于深共熔溶剂体系传质^[23],但温度过低,提取率不高,而温度过高(超过80℃)可能会破坏黄酮类物质结构^[24]。因此,提取温度选择60℃。

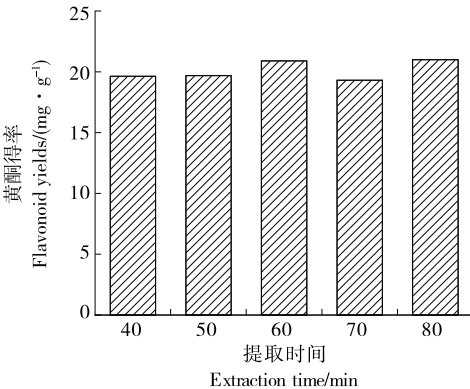
2.2.4 提取时间对化橘红黄酮得率的影响 由图5可知,整体上黄酮得率随提取时间的变化不显著($P > 0.05$),当提取时间为60 min时,黄酮得率达到最高,为 (20.89 ± 0.04) mg/g。而过高的提取时间(超过80 min)会导致溶出的黄酮类物质再次分解。因此,固定提取时间为60 min。



字母不同表示具有显著性差异($P < 0.05$)

图4 提取温度对化橘红黄酮提取率的影响

Figure 4 Influence of extraction temperature on the extraction rate of flavonoids from exocarpium *Citri Grandis*



字母不同表示具有显著性差异($P < 0.05$)

图5 提取时间对化橘红黄酮提取率的影响

Figure 5 Influence of extraction time on the extraction rate of flavonoids from exocarpium *C. grandis*

2.3 响应面法优化化橘红黄酮提取工艺

基于化橘红黄酮单因素试验结果,以黄酮得率为考察指标,选择深共熔溶剂含水率、料液比、提取温度,设计三因素三水平共17个试验组的响应面优化试验。响应面试验因素及水平见表1,试验设计及结果见表2。

对试验结果进行回归拟合,得到化橘红黄酮得率的回归方程:

表1 化橘红黄酮提取试验因素及水平

Table 1 Factors and levels for the extraction of flavonoids from exocarpium *Citri Grandis*

水平	A 深共熔溶剂 含水率/%	B 料液比 (g/mL)	C 提取温度/ ℃
-1	30	1:15	50
0	40	1:20	60
1	50	1:25	70

表 2 化橘红黄酮的响应面分析设计及其结果

Table 2 Response surface analysis design and experimental data of the enzymatic digestion process from exocarpium *Citri Grandis*

试验号	A	B	C	黄酮得率/(mg·g ⁻¹)
1	-1	-1	0	14.86
2	1	-1	0	18.49
3	-1	1	0	15.70
4	1	1	0	17.25
5	-1	0	-1	16.49
6	1	0	-1	16.69
7	-1	0	1	16.59
8	1	0	1	17.01
9	0	-1	-1	15.91
10	0	1	-1	14.56
11	0	-1	1	16.21
12	0	1	1	17.15
13	0	0	0	21.76
14	0	0	0	19.24
15	0	0	0	18.29
16	0	0	0	19.91
17	0	0	0	19.21

$$Y=19.68+0.725A-0.093\ 7B+0.393\ 8C-0.52AB+0.055AC+0.587\ 5BC-1.16A^2-1.94B^2-1.82C^2。$$
 (4)

由表 3 可知:模型的 $F=3.7$ 且 P 值 <0.05 ,表明该回归模型达到显著性水平。模型失拟项 P 值为 0.624 4,不显著。模型的决定系数 $R^2=0.826\ 2$,修订系数 $R^2_{\text{adj}}=0.602\ 8$,表明该模型可以解释 82.62%的响应值,模型准确度高,可用于优化化橘红黄酮得率。自变量一次项 A、B、C 和二次项的 A^2 以及交互项 AB、AC、BC 对黄酮得率的影响均不显著($P>0.05$);二次项中 B^2 、 C^2 对黄酮得率的影响显著($P<0.05$)。根据 F 值可知,三因素对化橘红黄酮得率的影响大小依次为:深共熔溶剂含水率>提取温度>料液比。

由图 6~图 8 可看出,各曲面坡度相对平缓且等高线趋于圆形,表明 AB、AC、BC 之间交互作用对化橘红黄酮得率的影响不显著,与表 3 方差分析结果相一致。

通过 Design Expert 11 软件的数据分析得到最优条件为:料液比 1:20.78 (g/mL)、深共熔溶剂含水率 43.13%、提取温度 59.59 ℃,化橘红黄酮得率达到最大的理论值为 19.68 mg/g。结合试验的可操作性,将化橘红黄酮提取工艺参数修正为:料液比 1:21 (g/mL)、深共熔溶剂含水率 43%、提取温度 60 ℃。在此条件下进行验证,得到化橘红实际得率为 (19.31 ± 0.47) mg/g,同理理论值的相对误差仅为 1.88% ($<5\%$),与预测值吻合度较

表 3 响应面二次模型方差分析[†]

Table 3 Response surface quadratic model analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	方差	F 值	P 值	显著性
模型	47.51	9	5.28	3.70	0.049 3	*
A	4.21	1	4.21	2.95	0.129 8	
B	0.07	1	0.07	0.05	0.830 7	
C	1.24	1	1.24	0.87	0.382 3	
AB	1.08	1	1.08	0.76	0.412 9	
AC	0.01	1	0.01	0.01	0.929 2	
BC	1.38	1	1.38	0.97	0.358 1	
A ²	5.71	1	5.71	4.00	0.085 6	
B ²	15.88	1	15.88	11.13	0.012 5	*
C ²	13.98	1	13.98	9.79	0.016 6	*
残差	9.99	7	1.43			
失拟值	3.27	3	1.09	0.65	0.624 4	不显著
误差	6.73	4	1.68			
总离差	57.50	16				

[†] “*”表示有显著差异($P<0.05$)。

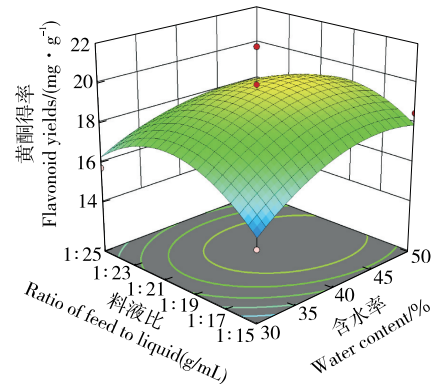


图 6 料液比与含水率交互作用对化橘红黄酮得率的影响

Figure 6 Interactive effects of feed-to-liquid ratio and water content on flavonoid yield from exocarpium *C. grandis*

高,说明该模型的试验设计可行,可以用于深共熔溶剂提取化橘红黄酮优化工艺的预测。采用传统水提法得到的化橘红黄酮得率为 15.24 mg/g。同时,传统溶剂乙醇提取所得黄酮得率为 18.93 mg/g^[7]。与传统水提和传统溶剂乙醇提取相比,深共熔溶剂所得黄酮得率较高。因此,深共熔溶剂在化橘红黄酮的提取中表现出一定优势。

2.4 抗氧化活性

2.4.1 DPPH 自由基清除能力 由图 9 可知, V_c 和化橘红黄酮清除 DPPH 自由基的能力均呈明显的剂量效应。相同质量浓度下 V_c 清除 DPPH 自由基能力优于化橘红

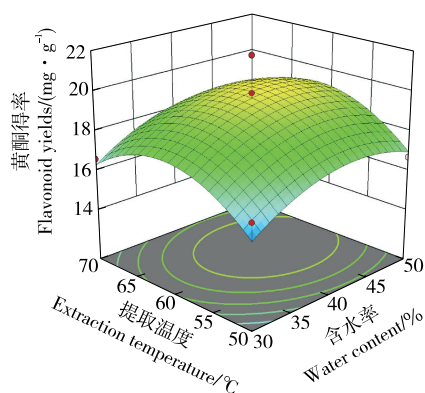


图7 含水率与提取温度交互作用对化橘红黄酮得率的影响

Figure 7 Interactive effects of water content and extraction temperature on flavonoid yield from exocarpium *C. grandis*

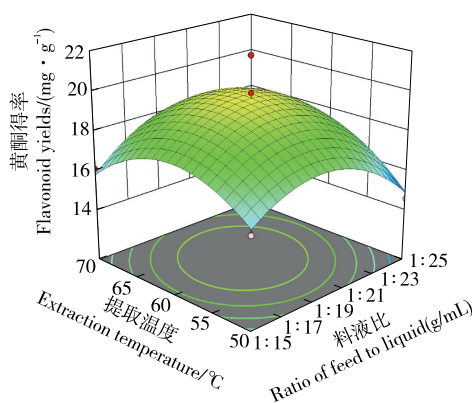


图8 提取温度与料液比交互作用对化橘红黄酮得率的影响

Figure 8 Interactive effects of extraction temperature and feed-to-liquid ratio on flavonoid yield from exocarpium *C. grandis*

黄酮提取液。化橘红黄酮提取液在质量浓度为0.5 mg/mL时,对DPPH自由基的清除率达到最高,为 $(72.34 \pm 0.37)\%$ 。经分析化橘红黄酮提取液对DPPH自由基清除能力的 EC_{50} 值为 $(117.61 \pm 1.71) \mu\text{g/mL}$ 。陈亦璐等^[25]利用高压脉冲电场法提取的化橘红黄酮粗提物对DPPH自由基的 EC_{50} 值为 $(428.16 \pm 37.95) \mu\text{g/mL}$;当化橘红黄酮质量浓度为0.5 mg/mL时,其自由基清除率只有50.58%。相比高压脉冲电场法,深共熔溶剂提取得到的化橘红黄酮具有更强的清除DPPH自由基能力。

2.4.2 ABTS自由基清除能力 由图10可知,化橘红黄酮提取液与 V_C 对ABTS自由基清除率的变化趋势相似,均为先大幅上升后趋于稳定。质量浓度为0.02~0.05 mg/mL时,化橘红黄酮提取液对ABTS自由基的清除率高于 V_C ;质量浓度为0.05~0.50 mg/mL时,黄酮提

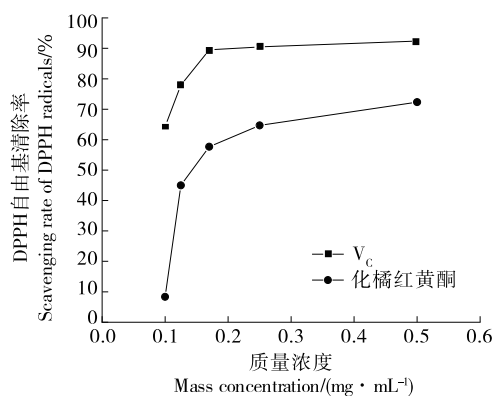


图9 化橘红黄酮提取液对DPPH自由基的清除能力

Figure 9 Influence of the concentration of flavonoids from exocarpium *C. grandis* extract and V_C solution on the scavenging rate of DPPH radicals

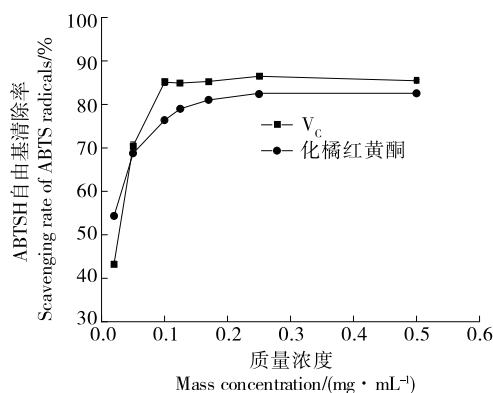


图10 化橘红黄酮提取液对ABTS自由基的清除能力

Figure 10 Influence of the concentration of flavonoids from exocarpium *C. grandis* extract and V_C solution on the scavenging rate of ABTS free radicals

取液对ABTS自由基清除率稍低于 V_C 。其中, V_C 在质量浓度为0.25 mg/mL时对ABTS自由基的清除率达到最大值,为 $(86.47 \pm 0.24)\%$;化橘红黄酮提取液在质量浓度为0.50 mg/mL时对ABTS自由基的清除率达到最大值,为 $(82.54 \pm 0.01)\%$ 。经分析化橘红黄酮提取液对ABTS自由基的 EC_{50} 值为 $(36.91 \pm 0.46) \mu\text{g/mL}$ 。陈亦璐等^[25]利用高压脉冲电场法提取的化橘红黄酮粗提物对ABTS自由基的 EC_{50} 值为 $(50.57 \pm 2.63) \mu\text{g/mL}$ 。相比高压脉冲电场法,深共熔溶剂提取得到的化橘红黄酮具有更强的清除ABTS自由基能力。

2.4.3 羟自由基清除能力 由图11可知,在试验范围内, V_C 对羟自由基的清除率呈先迅速上升后趋于平缓的趋势,而化橘红黄酮提取液则呈先上升后平缓的趋势。经分析化橘红黄酮提取液对羟自由基的 EC_{50} 值为 $(387.52 \pm 1.85) \mu\text{g/mL}$ 。相比DPPH自由基和ABTS自由基,化橘红黄酮清除羟自由基清除能力较弱。

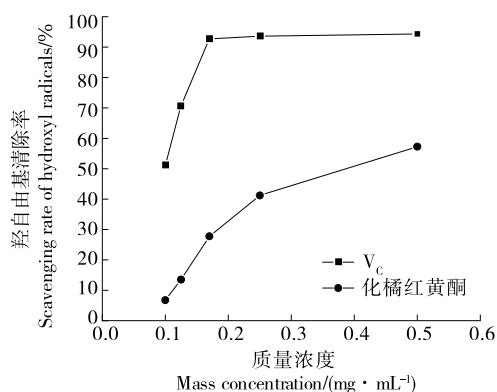


图 11 化橘红黄酮提取液对羟自由基的清除能力

Figure 11 Influence of the concentration of flavonoids from exocarpium *C. grandis* extract and V_C solution concentration on the scavenging rate of hydroxyl radicals

3 结论

化橘红黄酮的最佳工艺参数为:以氯化胆碱—乙二醇体系作为深共熔溶剂、深共熔溶剂含水率 43%、料液比 1:21 (g/mL)、提取温度 60 ℃、提取时间 60 min,在此条件下化橘红黄酮得率为 (19.31 ± 0.47) mg/g,该得率显著优于传统水提法和传统溶剂乙醇提取法。进一步对化橘红黄酮提取液的抗氧化活性进行研究,发现其对 DPPH 自由基、ABTS 自由基和羟自由基具有较好的清除能力,且具有明显的剂量效应关系,其 EC₅₀ 值依次为 (117.61 ± 1.71) , (36.91 ± 0.46) , (387.52 ± 1.85) μg/mL。综上,采用深共熔溶剂提取化橘红黄酮具有较好的应用价值,后续可进一步探究其黄酮物质组成及体内生物活性。

参考文献

- [1] ZENG X, SU W, ZHENG Y, et al. UFLC-Q-TOF-MS/MS-based screening and identification of flavonoids and derived metabolites in human urine after oral administration of exocarpium *Citri grandis* extract[J]. *Molecules*, 2018, 23(4): 895.
- [2] WU X, WU J, HUANG B, et al. The effects of exocarpium *Citri grandis* on the volatile components of green teabased on HS-SPME-GC-MS[J]. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2021, 769(2): 22041.
- [3] FENG F. Research progress on chemical composition and pharmacological action of exocarpium *Citri grandis* [J]. *Highlights in Science, Engineering and Technology*, 2022(2): 222-229.
- [4] 王艳慧. 化橘红的研究进展[J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2017, 19(6): 1 076-1 082.
WANG Y H. Research progress of *Citri grandis* exocarpium[J]. *World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica*, 2017, 19(6): 1 076-1 082.
- [5] LIAO S, SONG F, FENG W, et al. Rhoifolin ameliorates titanium particle-stimulated osteolysis and attenuates osteoclastogenesis via RANKL-induced NF-κB and MAPK pathways [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(10): 17 600-17 611.
- [6] PENG Y, HU M, LU Q, et al. Flavonoids derived from exocarpium *Citri grandis* inhibit LPS-induced inflammatory response via suppressing MAPK and NF-κB signalling pathways[J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2019, 30(1): 564-580.
- [7] 王雯. 化橘红总黄酮提取纯化工艺及其功效研究[D]. 南昌: 江西农业大学, 2013: 49.
WANG W. Studies on extraction, purification and efficacy of total flavonoids from exocarpium *Citri grandis* [D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University, 2013: 49.
- [8] HE Y J, ZHU M, ZHOU Y, et al. Comparative investigation of phytochemicals among ten citrus herbs by ultra highperformance liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry and evaluation of their antioxidant properties[J]. *J Sep Sci*, 2020, 43(16): 3 349-3 358.
- [9] ZHU Z, WU H, SU W, et al. Effects of total flavonoids from exocarpium *Citri grandis* on air pollution particle-induced pulmonary inflammation and oxidative stress in mice[J]. *J Food Sci*, 2019, 84(12): 3 843-3 849.
- [10] 段志芳, 方丹, 李亚梅, 等. 化橘红中清除自由基有效成分的研究[J]. *中国食品添加剂*, 2021, 32(1): 13-17.
DUAN Z F, FANG D, LI Y M, et al. Study on the DPPH radical-scavenging active components in exocarpium *Citri grandis* (ECG) [J]. *China Food Additives*, 2021, 32(1): 13-17.
- [11] 罗蓉, 蔡旭, 薛宏坤, 等. 响应面法优化超声辅助低共熔溶剂提取山楂总黄酮工艺[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(22): 229-237.
LUO R, CAI X, XUE H K, et al. Optimization of ultrasonic-assisted deep eutectic solvent extraction of flavonoids from *Crataegus pinnatifida* using response surface methodology [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(22): 229-237.
- [12] 于秋菊, 耿凤英, 张磊磊. 微波辅助低共熔溶剂提取覆盆子总黄酮的工艺优化及活性研究[J]. *中国食品添加剂*, 2023, 34(2): 43-51.
YU Q J, GENG F Y, ZHANG L L, et al. Optimization of microwave assisted extraction of flavonoids from raspberry with deep eutectic solvents and its activity[J]. *China Food Additives*, 2023, 34(2): 43-51.
- [13] LIU X M, LIU Y, SHAN C H, et al. Effects of five extraction methods on total content, composition, and stability of flavonoids in jujube[J]. *Food Chem: X*, 2022, 14: 100287.
- [14] 宋晓凡, 李岩, 张一茹, 等. 地皮菜总黄酮提取工艺优化及抗氧化活性评价[J]. *食品科技*, 2021, 46(12): 210-216.
SONG X F, LI Y, ZHANG Y R, et al. Optimization of extraction and antioxidant activity evaluation of total flavonoids from *Nostoc commune* [J]. *Food Science and Technology*, 2021, 46(12):

- 210-216.
- [15] 徐洪宇, 蒯宜蕴, 詹壮壮, 等. 果皮中酚类物质含量、抗氧化活性及在体外消化过程中成分的变化[J]. 食品科学, 2019, 40(15): 23-30.
- XU H Y, KUAI Y Y, ZHAN Z Z, et al. Phenolic contents and antioxidant activity of fruit peels and changes in phenolic composition during in vitro simulated digestion[J]. Food Science, 2019, 40(15): 23-30.
- [16] 陈建福, 彭敏. 芦柑叶总黄酮的提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(4): 117-122.
- CHEN J F, PENG M. Optimization of extraction technology of total flavonoids from ponkan leaves and its antioxidant activity[J]. Food Research and Development, 2021, 42(4): 117-122.
- [17] LAMEI N, EZODDIN M, ABDI K. Air assisted emulsification liquid-liquid microextraction based on deep eutectic solvent for preconcentration of methadone in water and biological samples[J]. Talanta, 2017, 165: 176-181.
- [18] VILKOVÁ M, PLOTKA-WASYLKA J, ANDRUCH V. The role of water in deep eutectic solvent-base extraction [J]. Journal of Molecular Liquids, 2020, 304: 112747.
- [19] 王育红, 张晓宇, 钱志伟. 响应面优化低共熔溶剂提取黄精黄酮工艺及其生物活性研究[J]. 中国食品添加剂, 2023, 34(4): 116-123.
- WANG Y H, ZHANG X Y, QIAN Z W. Optimization of extraction of flavonoid from Polygonatum kingianum with deep eutectic solvent by response surface method and its bioactivity[J]. China Food Additives, 2023, 34(4): 116-123.
- [20] 余捷, 李亚娜, 夏瑾瑾, 等. 复合酶辅助提取荷叶多糖工艺优化及其体外抗氧化活性[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(24): 115-121.
- YU J, LI Y N, XIA J J, et al. Optimization of complex enzyme-assisted extraction of polysaccharide from lotus leaves and its antioxidant activity[J]. Food Research and Development, 2023, 44(24): 115-121.
- [21] 刘敏卓, 张小月, 张灵芝, 等. 竹茹总黄酮超声波处理与纤维素酶协同提取工艺优化及其体外抗氧化活性分析[J]. 食品工业科技, 2023, 44(20): 221-229.
- LIU M Z, ZHANG X Y, ZHANG L Z, et al. Optimization of ultrasonic wave and cellulase synergistic extraction technology of total flavonoids from Bambusae caulis in taeniam and their antioxidant capacity in vitro[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(20): 221-229.
- [22] 苏慧慧, 许菲, 吴定坤, 等. 响应面优化三叶木通总黄酮的提取工艺及其抗氧化活性[J]. 北方园艺, 2022(21): 100-105.
- SU H H, XU F, WU D K, et al. Optimization of extraction conditions of flavonoids from Akebia trifoliata by response surface methodology and its antioxidant activity [J]. Northern Horticulture, 2022(21): 100-105.
- [23] ZHANG X, SU J, CHU X, et al. A green method of extracting and recovering flavonoids from Acanthopanax senticosus using deep eutectic solvents [J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2022, 27(3): 923.
- [24] ZUO J, MA P, GENG S, et al. Optimization of the extraction process of flavonoids from Trollius ledebouri with natural deep eutectic solvents[J]. Journal of Separation Science, 2022, 45(3): 717-727.
- [25] 陈亦璐, 徐梦兰, 邓健善, 等. 化橘红黄酮的高压脉冲电场提取及抗氧化活性检测[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2021, 47(3): 305-311.
- CHEN Y L, XU M L, DENG J S, et al. Pulsed electric field extraction of flavonoids from exocarpium Citri grandis and its antioxidant activity detection [J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences), 2021, 47(3): 305-311.

信息窗

日本拟制定食品农产品定量检测方法的一般要求标准

2024年7月1日,日本农林水产省发布了550003965号提案,制定了食品农产品使用相对摩尔灵敏度的定量方法的一般要求标准草案,意见反馈期至2024年7月30日。主要包括:

(1) 当使用色谱法对食品农产品中的成分进行定量分析时,为了获得可靠的定量测定值,需要定值纯度或浓度的定量用标品,由于对各类化学物质的测定需求不断增加,未必有对应的定量用标品,可以利用相对摩尔灵敏度,使用与分析对象物质不同物质的定量用标品,实施可靠性高的定量检测。

(2) 该标准规定了当以某种物质为基准时,分析对象物质相对摩尔灵敏度的确定程序、利用预先确定的相对摩尔灵敏度的分析对象物质的定量方法的开发及其使用的一般要求。

(3) 尽管可以考虑各种方法来确定相对摩尔灵敏度,但定量核磁共振谱(qNMR)和色谱相结合的方法是简便的,两种不同的物质通过检测器分别给出物质固有的响应比的换算,即可以某物质为基准,计算另一物质的物质质量。

(来源: <http://news.foodmate.net>)