

古红橘皮精油挥发性成分分析及清除自由基活性成分筛选

冉春霞^{1,2} 胡 江³ 邓惠玲⁴

(1. 重庆三峡医药高等专科学校公共卫生与管理学院, 重庆 404120; 2. 三峡库区道地药材开发利用重庆市重点实验室, 重庆 404120; 3. 重庆市科学技术研究院, 重庆 401121; 4. 重庆医药高等专科学校附属第一医院实验医学中心, 重庆 400042)

摘要: [目的] 分析古红橘新鲜橘皮精油的挥发性成分, 评价其总体自由基清除活性, 在不分离单体的情况下快速筛选其中自由基清除活性较强的成分。[方法] 以古红橘新鲜橘皮为原料, 分别采用共水蒸馏法和在水蒸气蒸馏提取橘皮精油, 分析不同方法提取精油的挥发性成分, 筛选特征挥发性差异成分, 并采用 GC-MS 和化学方法筛选自由基清除活性成分。[结果] 2 种提取方法所得精油的挥发性成分的种类、相对含量、特征挥发性成分及总体自由基清除活性差异极显著 ($P < 0.001$), 共水蒸馏为最优的古红橘皮精油提取方法; 各挥发性成分的自由基清除活性存在较大差异, 柠檬醛 (86.54%)、甜橙醛 (81.20%)、 α -法尼烯 (70.29%) 等表现出很强的 DPPH 自由基清除活性, 而橙花醇 (95.02%)、甜橙醛 (83.09%) 表现出极强的 ABTS⁺ 自由基清除活性。[结论] 古红橘新鲜橘皮提取的精油的挥发性成分和自由基清除活性受到提取方法的影响, 各挥发性成分的相对含量与其自由基清除活性之间没有直接的相关性。

关键词: 古红橘; 新鲜橘皮; 精油; GC-MS; 挥发性成分; 自由基清除活性成分; 筛选

Analysis of volatile components and screening of free radical-scavenging active components in fresh Guhong tangerine peel essential oil

RAN Chunxia^{1,2} HU Jiang³ DENG Huiling⁴

(1. Department of Public Health and Management, Chongqing Three Gorges Medical College, Chongqing 404120, China; 2. Chongqing Key Laboratory of Development and Utilization of Genuine Medicinal Materials in Three Gorges Reservoir Area, Chongqing 404120, China; 3. Chongqing Academy of Science and Technology, Chongqing 401121, China; 4. Experimental Medical Center, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 400042, China)

Abstract: [Objective] To analyze the volatile components of fresh Guhong tangerine peel essential oil, evaluate its overall free radical scavenging activity, quickly screen the components with strong free radical scavenging activity without separating individual compounds. [Methods] Using fresh Guhong tangerine peel as raw material, this study extracts tangerine peel essential oil through water distillation and steam distillation. It analyzes the volatile components of the essential oil extracted by different methods, determines the characteristic volatile components, and screen free radical-scavenging active components by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) combined with a chemical method. [Results] There are highly significant differences in volatile components, their relative content, characteristic volatile components, and overall free radical scavenging activity between the two extraction methods ($P < 0.001$). Water distillation is the best method for essential oil extraction from fresh Guhong tangerine peel. The free radical scavenging activities of various volatile components are quite different. Citral (86.54%), sinensal (81.2%), and α -farnesene (70.29%) show strong DPPH[•] scavenging activity, while nerol (95.02%) and sinensal (83.09%) show highly strong ABTS⁺ scavenging activity. [Conclusion] The volatile components and free radical scavenging activity of essential oil extracted from fresh Guhong tangerine peel are influenced by extraction methods, and there is no

基金项目: 重庆市教委科学技术研究项目 (编号: KJQN202202710)

通信作者: 冉春霞 (1985—), 女, 重庆三峡医药高等专科学校副教授, 硕士。E-mail: chunxian@126.com

收稿日期: 2024-04-16 改回日期: 2025-02-11

direct correlation between the relative content of volatile components and their free radical scavenging activity.

Keywords: Guhong tangerine; fresh tangerine peel; essential oil; GC-MS; volatile components; free radical-scavenging active components; screening

古红橘是重庆市万州区的特色柑橘品种之一,有4 000多年的栽培历史,是国家地理标志产品。重庆市万州区现有古红橘林约0.7万 hm^2 ,占中国红橘产量的50%左右^[1],是中国最大的红橘产地。古红橘除鲜食外,还被加工成果汁、果酒、陈皮、精油等产品。大量研究^[2-6]证实,柑橘精油含有萜烯、萜烯类含氧衍生物等化学成分而使其具有良好的抗菌、抗氧化、抗炎等生物活性,但这些化学成分的种类、含量及生物活性受柑橘品种、生长地域环境、加工方式及精油提取方法等因素的影响。

精油常用提取方法有压榨法、溶剂提取法、蒸馏法、超(亚)临界流体萃取法^[7-10]等。其中:压榨法提取率较低、杂质多,含较多光敏性或不稳定性成分,如胡萝卜素、呋喃香豆素类等,可加速食品基质氧化,降低其在食品领域的适应性;溶剂提取会造成溶剂、色素、不良气味残留,应用于食品中存在安全隐患;超(亚)临界流体萃取产品成本较高,也限制其工业化应用;蒸馏法是商业化生产常用方法,其工艺、设备、操作等均较成熟,且通过蒸馏可有效除去精油中的光敏性或不稳定成分。

抗氧化是防止食品氧化变质和抑制部分微生物生长繁殖从而延长货架寿命的重要手段,而自由基清除能力是柑橘精油体现抗氧化活性的重要原因。目前大多数文献只评价了精油总抗氧化能力的大小,并不能反映单个成分对自由基的清除活性,不利于对活性成分的深入研究,但按常规方法对单个成分进行筛选和评价需要经过分离、纯化、鉴定、活性测定等繁琐且费时费力的操作步骤。随着色谱技术的发展,现已有文献采用HPLC、GC-E-nose等结合化学方法开展了马粪海胆^[11]、栽培菊苣籽总黄酮^[12]及荜茇精油^[13]中抗氧化活性成分的快速识别。目前还未见有关万州古红橘橘皮精油挥发性成分及自由基清除活性成分筛选方面的报道。

研究拟采用气相色谱质谱联用仪(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)分析比较2种蒸馏提取方法所得古红橘新鲜橘皮精油的挥发性成分差异;采用化学方法评价古红橘新鲜橘皮精油对DPPH自由基、ABTS⁺自由基的清除活性;利用GC-MS结合化学方法在无需分离单体的情况下分析比较精油中单个挥发性成分的自由基清除活性,并尝试阐明挥发性成分自由基清除活性的反应机制,以期为古红橘新鲜橘皮精油自由基清除活性成分的进一步分离及深度开发提供科学参考和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜古红橘:重庆万州古红橘园;

DPPH 自由基清除能力试剂盒(分光光度法):南京建成生物工程研究所;

ABTS⁺自由基清除能力检测试剂盒(分光光度法):北京索莱宝科技有限公司;

ABTS:超级纯,福州飞净生物科技有限公司;

DPPH:分析纯,福州飞净生物科技有限公司;

氯化钠、无水硫酸钠、过硫酸钾、硫酸亚铁、无水乙醇、过氧化氢(3%)等:分析纯,重庆川东化工有限公司。

1.2 主要仪器与设备

气相色谱质谱联用仪:7890B-5977A型,美国Agilent公司;

紫外-可见分光光度计:TU-1810型,北京普析通用仪器有限责任公司;

电子天平:BSA224S型,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;

料理机:JYL-C91T型,九阳股份有限公司;

漩涡振荡器:VORTEX-5型,海门市其林贝尔仪器制造有限公司;

数显式电热恒温水浴锅:XMTD-204型,上海跃进医疗器械有限公司;

挥发油提取装置:轻油2 000 mL,重庆莱格尔生物技术有限公司;

水蒸气蒸馏装置:2 000 mL,重庆莱格尔生物技术有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 古红橘皮精油提取

(1)原料预处理:古红橘新鲜果皮洗净、自然晾干,倒入破壁机均匀粉碎,于4℃左右贮藏备用。

(2)共水蒸馏法:取100 g均匀粉碎的橘皮置于挥发油提取装置的蒸馏瓶中,按水料比12:1(mL/g)加入质量浓度为10.30 g/L的NaCl溶液,在100℃下蒸馏提取挥发油61 min,收集液经水油分离后得到的油层,无水硫酸钠脱水干燥,用0.45 μm 有机滤膜过滤,滤液置于棕色样品瓶中冷藏(4℃左右)备用。

(3)水蒸气蒸馏法:取100 g均匀粉碎的橘皮装入水蒸气蒸馏装置的样品瓶中,添加0.90% NaCl固体试剂、混匀,在106℃蒸馏提取挥发油120 min,收集水油分离得到的油层,无水硫酸钠脱水干燥,用0.45 μm 有机滤膜过滤,置于棕色样品瓶中冷藏(4℃左右)备用。

1.3.2 GC-MS测定古红橘皮精油挥发性组分

(1) 样品前处理:称取 0.1 g 精油于容量瓶中,经无水乙醇溶解后定容至 10 mL、摇匀,用 0.22 μm 有机滤膜过滤后上机测定。

(2) GC 条件:HP-5ms 色谱柱(30 m $\times$ 250 $\mu\text{m}\times$ 0.25 μm);进样量 1 μL 、不分流;进样口温度 230 $^{\circ}\text{C}$;载气为高纯氮气,流速 1 mL/min;升温程序为初始温度 45 $^{\circ}\text{C}$,以 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 100 $^{\circ}\text{C}$ 保持 10 min,以 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 150 $^{\circ}\text{C}$ 保持 2 min,以 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 250 $^{\circ}\text{C}$ 保持 1 min。

(3) MS 条件:接口温度 250 $^{\circ}\text{C}$;离子源类型 EI;发射能量 70.0 eV;离子源温度 230 $^{\circ}\text{C}$;MS 四极杆温度 150 $^{\circ}\text{C}$;选择全扫模式,扫描质量范围为 50~550 (m/z);溶剂延迟 4.00 min。

1.3.3 古红橘皮精油自由基清除能力测定

(1) DPPH 自由基清除能力:按试剂盒说明书的步骤绘制 DPPH 自由基清除率的标准曲线为 $y=7.8585x$ ($R^2=0.9980$),然后分别测定对照管、测定管和空白管的吸光度值,按式(1)计算样品对 DPPH 自由基的清除率。

$$R_c = \left(1 - \frac{A_T - A_c}{A_0}\right) \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

R_c ——自由基清除率,%;

A_T ——测定管的吸光度值;

A_c ——对照管的吸光度值;

A_0 ——空白管的吸光度值。

(2) ABTS⁺自由基清除能力:按试剂盒说明书的步骤绘制 ABTS⁺自由基清除率的标准曲线, $y=844.19x$ ($R^2=0.9989$),然后分别测定对照管、测定管和空白管的吸光度值,按式(1)计算样品对 ABTS⁺自由基的清除率。

1.3.4 古红橘皮精油自由基清除活性成分筛选

(1) 清除 DPPH 自由基活性成分:准确称取 DPPH 试剂 0.394 3 g,加入无水乙醇溶解并定容至 100 mL 得到浓度为 0.010 mol/L 的储备液,避光保存备用。取 1.0 mL 储备液稀释至 100 mL 即得 1.0×10^{-4} mol/L 工作液^[12]。吸取 750 μL 10.0 mg/mL 的古红橘皮精油溶液于避光反应管中,再加入等体积 DPPH 自由基工作液,混匀,室温下反应 30 min 作为试验组;以等体积无水乙醇代替 DPPH 自由基工作液作为对照组,按照 1.3.2 的方法进行 GC-MS 分析,然后对比色谱峰面积的变化情况,单个色谱峰面积减小说明对应的单体组分具有自由基清除活性。以古红橘皮精油与工作液反应前后的峰面积变化按式(2)计算清除率,以表征精油各挥发性组分对 DPPH 自由基的清除活性强弱^[10-11]。

$$R = \frac{A_0 - A_i}{A_0} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

R ——清除率,%;

A_0 ——对照组各挥发性组分的峰面积;

A_i ——试验组各挥发性组分的峰面积。

(2) 清除 ABTS⁺自由基活性成分:准确称取 ABTS 试剂 0.406 0 g,加入煮沸冷却的蒸馏水溶解并定容至 100 mL,即得 7.4 mmol/L 的储备液;准确称取 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 试剂 0.070 4 g,加入煮沸冷却的蒸馏水溶解并定容至 100 mL,即得 2.6 mmol/L 的储备液。将上述两种储备液等体积混合并稀释 10 倍作为工作液^[12]。吸取 750 μL 10.0 mg/mL 的古红橘皮精油溶液于避光反应管中,再加入等体积 ABTS⁺自由基工作液,混匀,室温下反应 30 min 作为试验组;以等体积无水乙醇代替 ABTS⁺自由基工作液作为对照组,按照 1.3.2 的方法进行 GC-MS 分析,然后对比色谱峰面积的变化情况,单个色谱峰面积减小说明对应的单体组分具有自由基清除活性。以古红橘皮精油与工作液反应前后的峰面积变化按式(2)计算清除率,以表征精油各挥发性组分对 ABTS⁺自由基的清除活性强弱。

1.4 数据处理

运用 Agilent MassHunter Qualitative Analysis B.07.00 软件将古红橘皮精油中挥发性成分的质谱碎片信息与 NIST14.L 图谱库(匹配度 $\geq 80\%$)、碎片精确质量数对比鉴定并结合相关文献得到化合物信息,同时将化合物的保留指数(retention index, RI)与在相同色谱条件下分析所得正构烷烃($\text{C}_6\sim\text{C}_{20}$)标准品的 RI 值对比验证(通常二者差值的绝对值 ≤ 30 为可接受)进行定性分析,采用面积归一化法进行定量分析;每组试验重复操作 3 次,结果以“ $\bar{X} \pm S$ ”表示,采用 SIMCA14.1 软件建立 OPLS-DA 模型并进行 P 值、VIP 值分析。

2 结果与分析

2.1 提取方法对古红橘皮精油挥发性成分的影响

结合图 1 和表 1 可知,共水蒸馏法提取的古红橘皮精油中共检测到 50 种挥发性成分,包括萜烯类 23 种、醛类 13 种、醇类 5 种、酯类 4 种、酚类 3 种、酮类和醚类各 1 种,其中萜烯类占挥发性物质种类总数的 46.0%、醛类占 26.0%、醇类占 10.0%、酯类占 8.0%、酚类占 6.0%、酮类和醚类各占 2.0%;在水蒸气蒸馏法提取的古红橘皮精油中共检测到 44 种挥发性成分,包括萜烯类 21 种、醛类 10 种、醇类 6 种、酚类 3 种、酯类 2 种、酮类和醚类各 1 种,其中萜烯类占挥发性物质种类总数的 47.73%、醛类占 22.73%、醇类占 13.64%、酚类占 6.82%、酯类占 4.54%、酮类和醚类各占 2.27%。共水蒸馏法提取的精油中检测到了甲酸香茅酯、乙酸橙花酯、反式氧化柠檬烯等成分,其中甲酸香茅酯具有强烈的类似玫瑰及甜瓜的香气和水果

的甜味,乙酸橙花酯呈现水果香、甜香、花香,反式氧化柠檬烯呈现新鲜、柑橘香、青香等,可能是因为共水蒸馏是将橘皮原料与水充分混合后,在高温有氧条件下,橘皮中的各成分相互作用发生了酯化、环氧化及异构化反应。经显著性差异分析,2种方法提取的精油中(1R)-(+) -

α -蒎烯、 α -蒎烯、左旋- β -蒎烯、 β -蒎烯、 β -月桂烯、正辛醛、萜品油烯、*D*-柠檬烯、 β -罗勒烯、 γ -松油烯、异松油烯、芳樟醇、癸醛、香茅醛、2-异丙基-5-甲基茴香醚的相对含量差异极显著($P<0.01$); α -松油醇、香茅醇、紫苏醛、百里香酚的相对含量差异显著($P<0.05$)。

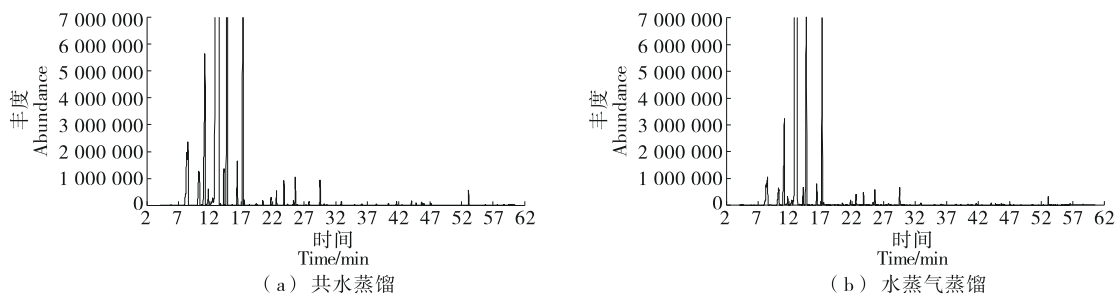


图1 古红橘新鲜橘皮精油挥发性成分的GC-MS总离子流色谱图

Figure 1 GC-MS total ion chromatogram of volatile components in fresh Guhong tangerine peel essential oil

表1 两种蒸馏方法提取新鲜古红橘橘皮精油的挥发性成分对比[†]

Table 1 Comparison of volatile components of fresh Guhong tangerine peel essential oil extracted by water distillation and steam distillation

保留时间/min	化合物	分子式	相对含量/%		VIP 值
			共水蒸馏	水蒸气蒸馏	
4.636	正己醛	C ₆ H ₁₂ O	0.01±0.00	—	—
5.872	(<i>E</i>)-2-己烯醛	C ₆ H ₁₀ O	0.01±0.00	—	—
8.321	(1R)-(+) - α -蒎烯	C ₁₀ H ₁₆	1.97±0.01	1.02±0.01**	1.640
8.533	α -蒎烯	C ₁₀ H ₁₆	2.31±0.01	1.51±0.01**	1.505
9.122	蒎烯	C ₁₀ H ₁₆	0.01±0.00	—	—
10.278	左旋- β -蒎烯	C ₁₀ H ₁₆	1.27±0.01	0.84±0.00**	1.421
10.341	β -蒎烯	C ₁₀ H ₁₆	0.55±0.01	0.36±0.01**	0.732
10.702	巴豆酸丁酯	C ₈ H ₁₄ O ₂	0.01±0.00	0.02±0.00	0.148
11.222	β -月桂烯	C ₁₀ H ₁₆	4.94±0.02	3.62±0.02**	1.933
11.766	正辛醛	C ₈ H ₁₆ O	0.18±0.01	0.11±0.01**	0.442
12.481	萜品油烯	C ₁₀ H ₁₆	0.21±0.01	0.15±0.01**	0.407
13.042	<i>D</i> -柠檬烯	C ₁₀ H ₁₆	68.41±0.50	75.37±0.52**	4.427
13.706	反式- β -罗勒烯	C ₁₀ H ₁₆	0.02±0.01	0.01±0.00	0.116
14.232	β -罗勒烯	C ₁₀ H ₁₆	0.42±0.01	0.31±0.01**	0.556
14.776	γ -松油烯	C ₁₀ H ₁₆	12.67±0.08	9.71±0.06**	2.898
16.372	异松油烯	C ₁₀ H ₁₆	0.41±0.01	0.30±0.00**	0.556
17.271	芳樟醇	C ₁₀ H ₁₈ O	4.32±0.02	3.69±0.02**	1.335
17.448	壬醛	C ₉ H ₁₈ O	0.05±0.00	0.04±0.01	0.141
19.313	反式氧化柠檬烯	C ₁₀ H ₁₆ O	0.01±0.00	—	—
19.456	(3E,5E)-2,6-二甲基-1,3,5,7-辛四烯	C ₁₀ H ₁₄	0.01±0.01	0.01±0.00	0.066
20.423	香茅醛	C ₁₀ H ₁₈ O	0.05±0.01	0.03±0.01**	0.180
21.711	4-萜烯醇	C ₁₀ H ₁₈ O	0.08±0.01	0.07±0.01	0.204
22.586	α -松油醇	C ₁₀ H ₁₈ O	0.16±0.02	0.18±0.02*	0.245
23.782	癸醛	C ₁₀ H ₂₀ O	0.20±0.02	0.15±0.01**	0.385

续表 1

保留时间/min	化合物	分子式	相对含量/%		VIP 值
			共水蒸馏	水蒸气蒸馏	
24.343	乙酸辛酯	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	0.01±0.01	0.01±0.01	0.048
25.173	橙花醇	C ₁₀ H ₁₈ O	0.01±0.01	0.01±0.00	0.064
25.293	香茅醇	C ₁₀ H ₂₀ O	0.05±0.01	0.04±0.01*	0.150
25.590	2-异丙基-5-甲基茴香醚	C ₁₁ H ₁₆ O	0.57±0.02	0.46±0.01**	0.551
25.922	L-香芹酮	C ₁₀ H ₁₄ O	0.01±0.01	0.01±0.01	0.046
26.946	2,6-壬二烯醇	C ₉ H ₁₆ O	—	0.01±0.00	—
27.295	Z-2-癸烯醛	C ₁₀ H ₁₈ O	0.01±0.01	0.01±0.00	0.066
27.753	紫苏醛	C ₁₀ H ₁₄ O	0.03±0.00	0.01±0.00*	0.238
27.868	柠檬醛	C ₁₀ H ₁₆ O	0.01±0.00	—	—
29.527	百里香酚	C ₁₀ H ₁₄ O	0.59±0.01	0.61±0.01*	0.223
30.174	香芹酚	C ₁₀ H ₁₄ O	0.03±0.00	0.02±0.00	0.168
30.626	十一醛	C ₁₁ H ₂₂ O	0.01±0.00	0.01±0.00	0.046
31.146	2,4-癸二烯醛	C ₁₀ H ₁₆ O	0.01±0.01	0.01±0.00	0.066
32.914	δ-榄香烯	C ₁₅ H ₂₄	0.05±0.01	0.04±0.01	0.151
34.980	甲酸香茅酯	C ₁₁ H ₂₀ O ₂	0.01±0.00	—	—
36.124	乙酸橙花酯	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	0.03±0.00	—	—
38.476	β-榄香烯	C ₁₅ H ₂₄	0.01±0.01	0.01±0.00	0.066
40.353	月桂醛	C ₁₂ H ₂₄ O	0.02±0.01	0.01±0.01	0.158
41.680	γ-榄香烯	C ₁₅ H ₂₄	0.02±0.00	0.02±0.01	0.112
42.567	α-石竹烯	C ₁₅ H ₂₄	0.01±0.01	0.01±0.00	0.064
44.055	大根香叶烯 D	C ₁₅ H ₂₄	0.03±0.01	0.02±0.00	0.183
44.782	双环大根香叶烯	C ₁₅ H ₂₄	0.01±0.00	0.01±0.01	0.112
45.652	α-法尼烯	C ₁₅ H ₂₄	0.02±0.01	0.01±0.00	0.158
45.812	2,4-二叔丁基酚	C ₁₄ H ₂₂ O	0.02±0.01	0.02±0.01	0.048
46.029	δ-杜松烯	C ₁₅ H ₂₄	0.01±0.01	0.01±0.00	0.064
47.116	大根香叶烯 B	C ₁₅ H ₂₄	0.01±0.01	0.01±0.00	0.066
53.119	甜橙醛	C ₁₅ H ₂₂ O	0.05±0.01	0.04±0.01	0.166

† “—”表示未检出;“*”表示不同方法之间差异显著($P<0.05$);“**”表示不同方法之间差异极显著($P<0.01$)。

以提取方法为自变量,挥发性成分为因变量,建立正交偏最小二乘法判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis,OPLS-DA)模型(见图 2)。由图 2(a)可知,共水蒸馏(GS)橘皮精油均分布在横轴的负半轴,水蒸气蒸馏(ZQ)橘皮精油均分布于横轴的正半轴,说明 2 种提取方法对精油的挥发性成分有一定影响。经 200 次

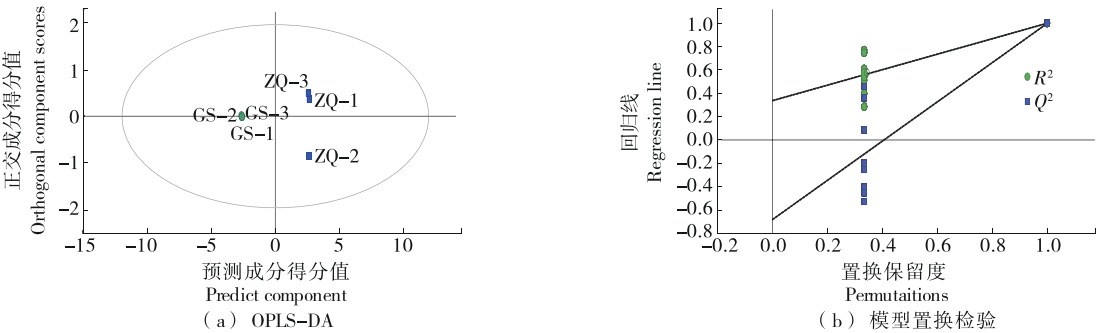


图 2 不同提取方法下新鲜古红橘橘皮精油的 OPLS-DA 和模型置换检验结果

Figure 2 OPLS-DA and model permutation test results of essential oil extracted from fresh Guhong tangerine peel by different methods

置换检验以验证 OPLS-DA 模型的可靠性,验证结果[图 2(b)]显示, $R^2=0.341$, $Q^2=-0.661$, R^2 在 Y 轴的截距 <0.40 , Q^2 在 Y 轴的截距 <0.05 ,说明该模型数据未出现过拟合现象,具有稳健可靠的预测性,可用于新鲜古红橘橘皮精油不同提取方法的鉴别分析。

VIP 值(variable influence on projection)反映了每一个变量对模型的贡献程度,其值越大代表某挥发性成分在样品间差异越大,对可用于筛选特征挥发性差异成分,通常认为 $VIP>1$ 的变量是重要的。以 $P<0.05$ 、 $VIP>1$ 为筛选条件得到 7 种差异成分(见表 1),其对模型贡献率大小依次为 D-柠檬烯、 γ -松油烯、 β -月桂烯、(1R)-(+) - α -蒎烯、 α -蒎烯、左旋- β -蒎烯、芳樟醇,上述化合物可作为判别不同提取方法所得橘皮精油的特性挥发性差异成分。

2.2 蒸馏提取方法对新鲜古红橘橘皮精油总体自由基清除能力的影响

由表 2 可知,将精油原液稀释 1 倍后,共水蒸馏法提取古红橘橘皮精油的 DPPH 自由基、ABTS⁺自由基清除率分别为 87.00%,83.18%,均高于水蒸气蒸馏法(82.70%,79.98%)且差异极显著($P<0.01$)。两种方法提取精油的自由基清除率出现差异的原因可能是挥发性成分的种类和含量不同,不同成分对自由基的清除能力不同。

2.3 新鲜古红橘橘皮精油自由基清除活性成分筛选

结合新鲜古红橘橘皮精油在不同提取方式下特征挥发性成分及总体自由基清除活性的差异,选择以共水蒸馏法提取的精油样品作为研究对象,根据表 3 和图 3 可

表 2 不同蒸馏提取方法所得新鲜古红橘橘皮精油的自由基清除率对比[†]

Table 2 Comparison of free radical scavenging rate of essential oil extracted from fresh Guhong tangerine peel by different distillation methods

精油提取方式	清除率/%	
	DPPH 自由基	ABTS ⁺ 自由基
共水蒸馏	87.00±0.00 ^a	83.18±0.01 ^a
水蒸气蒸馏	82.70±0.01 ^b	79.98±0.01 ^b

[†] 字母不同表示组间有显著性差异($P<0.01$)。

知,精油各挥发性成分中除巴豆酸丁酯外,均对 DPPH 自由基有清除效果,但清除活性有较大差异。23 种萜烯类成分中对 DPPH 自由基的清除活性较强的主要为 α -法尼烯(70.29%)、大根香叶烯 D(67.58%)、 β -榄香烯(67.43%);13 种醛类成分中对 DPPH 自由基的清除活性较强的主要为柠檬醛(86.54%)、甜橙醛(81.20%)、正己醛(78.88%)、月桂醛(71.21%);6 种醇类成分中对 DPPH 自由基的清除活性较强的主要为香茅醇(60.83%)、橙花醇(56.57%);4 种酯类成分中对 DPPH 自由基的清除活性较强的主要为乙酸辛酯(68.03%)、甲酸香茅酯(60.14%);3 种酚类成分中对 DPPH 自由基的清除活性依次为香芹酚(53.11%)、百里香酚(47.83%)、2,4-二叔丁基酚(40.30%);2 种醚类和酮类对 DPPH 自由基的清除活性依次为 L-香芹酮(59.71%)、2-异丙基-5-甲基茴香醚(36.98%)。

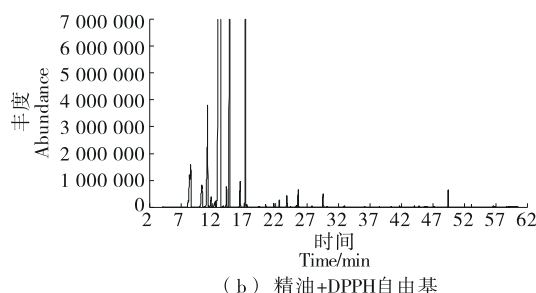
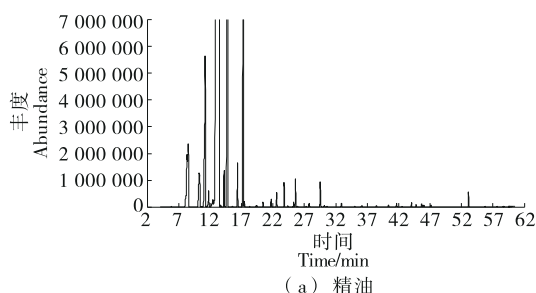


图 3 新鲜古红橘橘皮精油清除 DPPH 自由基的 GC-MS 总离子流色谱图对比

Figure 3 Comparison of GC-MS total ion chromatograms of fresh Guhong tangerine peel essential oil before and after DPPH scavenging

萜类化合物清除 DPPH 自由基的主要机制是 H 原子转移(HAT)反应,这些化合物均含有碳碳或碳氧双键($C=C$ 或 $C=O$),且具有共轭双键($-C=C-C=C-$ 或 $-C=C-C=O-$)时清除自由基的活性更强,其原因可能是当化合物中只含孤立的 $C=C$ 或 $C=O$ 时,与其相邻的 α -C 原子上的 H 因排电子作用较活泼,使得 C—H 键容易断裂而发生 HAT 反应,DPPH 自由基与 H 结合形成稳定的化合物,

同时产生抗氧化剂自由基,可能传播自由基链式反应;当化合物中含有共轭双键时,因 π 键共轭的存在产生电荷离域,生成的抗氧化剂自由基形成了稳定化共振结构,可快速终止自由基链反应。此外,在没有 π 键的化合物中,双键数量增加自由基清除能力增强^{[14][15]38,48}。 α -法尼烯、柠檬醛、甜橙醛等均含有 $-C=C-C=C-$ 或 $-C=C-C=O-$,因此体现出更强的自由基清除活性,以 α -法尼烯为例阐述其清除

表 3 新鲜古红橘橘皮精油中挥发性成分对 DPPH 自由基、ABTS⁺ 自由基清除率的比较[†]

Table 3 Comparison of DPPH and ABTS⁺ scavenging rates of volatile components in fresh Guhong tangerine peel essential oil

类别	活性成分名称	清除率/%		类别	活性成分名称	清除率/%	
		DPPH 自由基	ABTS ⁺ 自由基			DPPH 自由基	ABTS ⁺ 自由基
萜烯类	(1R)-(+) - α -蒎烯	47.87 $\pm$ 0.02	26.42 $\pm$ 0.00	醛类	正辛醛	42.78 $\pm$ 0.01	46.25 $\pm$ 0.03
	α -蒎烯	35.68 $\pm$ 0.01	54.70 $\pm$ 0.04		壬醛	54.04 $\pm$ 0.02	57.88 $\pm$ 0.02
	蒎烯	60.14 $\pm$ 0.03	39.49 $\pm$ 0.01	香茅醛	香茅醛	54.20 $\pm$ 0.04	60.53 $\pm$ 0.03
	左旋- β -蒎烯	34.94 $\pm$ 0.01	17.61 $\pm$ 0.01		癸醛	54.13 $\pm$ 0.02	59.30 $\pm$ 0.09
	β -蒎烯	44.33 $\pm$ 0.02	ND	Z-2-癸烯醛	Z-2-癸烯醛	63.80 $\pm$ 0.03	69.61 $\pm$ 0.02
	β -月桂烯	38.08 $\pm$ 0.01	42.95 $\pm$ 0.03		紫苏醛	65.43 $\pm$ 0.05	58.41 $\pm$ 0.01
	蒎品油烯	47.05 $\pm$ 0.03	34.69 $\pm$ 0.02	柠檬醛	柠檬醛	86.54 $\pm$ 0.10	66.94 $\pm$ 0.06
	D-柠檬烯	34.36 $\pm$ 0.01	30.60 $\pm$ 0.01		十一醛	59.28 $\pm$ 0.06	65.04 $\pm$ 0.05
	反式- β -罗勒烯	29.87 $\pm$ 0.01	23.30 $\pm$ 0.01	2,4-癸二烯醛	2,4-癸二烯醛	69.83 $\pm$ 0.04	72.34 $\pm$ 0.07
	β -罗勒烯	39.55 $\pm$ 0.02	43.41 $\pm$ 0.02		月桂醛	71.21 $\pm$ 0.06	72.16 $\pm$ 0.04
	γ -松油烯	39.90 $\pm$ 0.02	44.53 $\pm$ 0.02	甜橙醛	甜橙醛	81.20 $\pm$ 0.09	83.09 $\pm$ 0.10
	异松油烯	38.74 $\pm$ 0.01	40.90 $\pm$ 0.01	醇类	芳樟醇	44.71 $\pm$ 0.04	49.56 $\pm$ 0.06
	反式氧化柠檬烯	58.36 $\pm$ 0.04	66.81 $\pm$ 0.05		4-蒎烯醇	47.66 $\pm$ 0.03	52.41 $\pm$ 0.04
	(3E,5E)-2,6-二甲基-1,3,5,7-辛四烯	48.37 $\pm$ 0.02	57.11 $\pm$ 0.05	松油醇	松油醇	51.08 $\pm$ 0.05	55.66 $\pm$ 0.03
	δ -榄香烯	58.58 $\pm$ 0.03	61.94 $\pm$ 0.03		橙花醇	56.57 $\pm$ 0.05	95.02 $\pm$ 0.10
	β -榄香烯	67.43 $\pm$ 0.05	62.24 $\pm$ 0.03	香茅醇	香茅醇	60.83 $\pm$ 0.04	73.17 $\pm$ 0.05
	γ -榄香烯	59.18 $\pm$ 0.04	67.21 $\pm$ 0.04	酯类	巴豆酸丁酯	ND	4.79 $\pm$ 0.00
	α -石竹烯	56.46 $\pm$ 0.02	60.55 $\pm$ 0.04		乙酸辛酯	68.03 $\pm$ 0.03	65.79 $\pm$ 0.07
	大根香叶烯 D	67.58 $\pm$ 0.01	71.59 $\pm$ 0.07	甲酸香茅酯	甲酸香茅酯	60.14 $\pm$ 0.04	68.75 $\pm$ 0.06
	双环大根香叶烯	55.76 $\pm$ 0.04	54.50 $\pm$ 0.05		乙酸橙花酯	55.08 $\pm$ 0.03	62.35 $\pm$ 0.04
	α -法尼烯	70.29 $\pm$ 0.08	72.69 $\pm$ 0.08	酚类	百里香酚	47.83 $\pm$ 0.01	48.15 $\pm$ 0.02
	δ -杜松烯	47.35 $\pm$ 0.03	48.04 $\pm$ 0.02		香芹酚	53.11 $\pm$ 0.03	54.03 $\pm$ 0.03
	大根香叶烯 B	57.43 $\pm$ 0.05	65.40 $\pm$ 0.04	2,4-二叔丁基酚	2,4-二叔丁基酚	40.30 $\pm$ 0.05	35.55 $\pm$ 0.01
醛类	正己醛	78.88 $\pm$ 0.09	68.50 $\pm$ 0.04	醚类	2-异丙基-5-甲基茴香醚	36.98 $\pm$ 0.01	41.18 $\pm$ 0.03
	(E)-2-己烯醛	53.16 $\pm$ 0.03	65.89 $\pm$ 0.05	酮类	L-香芹酮	59.71 $\pm$ 0.06	53.94 $\pm$ 0.02

† ND 表示未检出。

DPPH 自由基的机理(见图 4)。

化合物的自由基清除活性还受到 α -H 位置、溶剂及相互作用的影响,通常认为 C—H 键能小的丙烯基且位于 3-、6-的 α -H 原子更易失去;醚键(—C—O—C—)与乙醇溶剂作用生成醇,—O—H 易断裂供氢;酯、酮、醚、酚类物质可与醇类溶剂的—OH 形成氢键,在一定程度上阻碍了 DPPH 自由基的接近和夺取 H 原子^{[15]140—141,162}。上述原因可以解释醚、酮、酯类体现出相对较弱的 DPPH 自由基清除活性和 D-柠檬烯氧化为反式氧化柠檬烯后的 DPPH 自由基清除活性增强现象,其可能的反应机理见图 5。

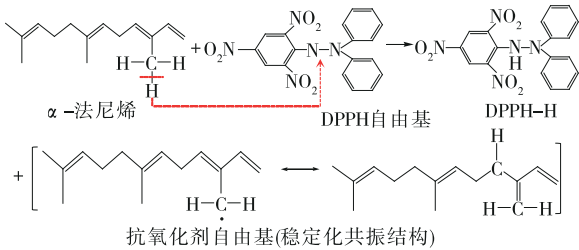


图 5 具有共轭双键的萜类化合物清除 DPPH 自由基的反应机理

Figure 5 Reaction mechanism of DPPH scavenging by terpenes with conjugated double bonds

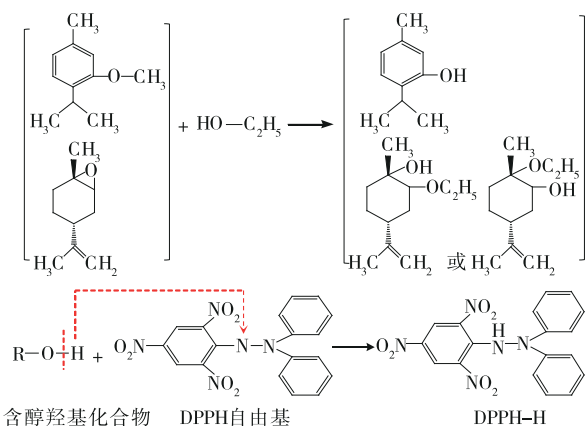


图5 含醚键的萜类化合物清除DPPH自由基的反应机理
Figure 5 Reaction mechanism of DPPH scavenging by terpenoids containing ether bonds

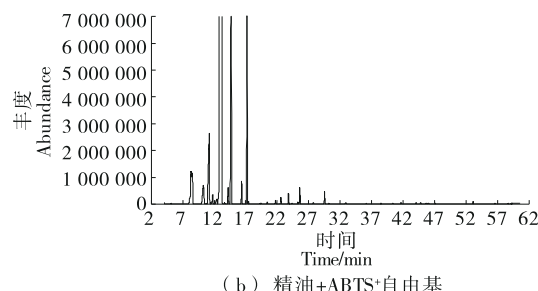
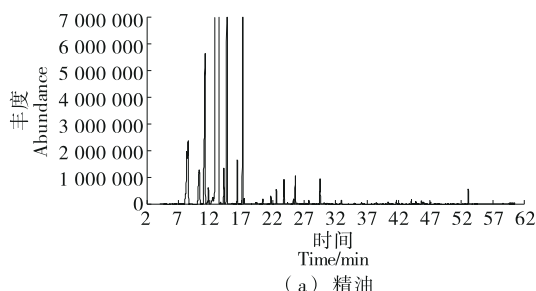


图6 新鲜古红橘橘皮精油清除ABTS⁺自由基的GC-MS总离子流色谱图对比

Figure 6 Comparison of GC-MS total ion chromatograms of fresh Guhong tangerine peel essential oil before and after ABTS⁺ scavenging

萜类化合物清除ABTS⁺自由基的反应机制主要是电子转移(ET)反应。橙花醇和甜橙醛表现出极强的自由基清除活性,橙花醇为烯醇式化合物,甜橙醛在酸性条件下与醇发生加成反应生成烯醇式半缩醛,其羟基氧原子的未共用电子对与双键发生共轭作用,从而降低了氧原子上的电子云密度,使得O—H的极性增强而易电离出H⁺[15]173—174[16],其反应机理见图7。

3 结论

通过分析不同提取方法所得新鲜古红橘橘皮精油的挥发性成分、特征挥发性差异成分及总体自由基清除活性,得出共水蒸馏为最优精油提取方法。以共水蒸馏精油为研究对象,采用化学方法结合GC-MS快速测定了各挥发性成分的自由基清除率并筛选出自由基清除活性较强的成分,同时从分子角度阐述了单个成分清除自由基可能的反应机制,以解释不同成分在自由基清除活性上的差异,结果表明各挥发性成分的相对含量多少与其自由基清除活性并没有直接的相关性,因此,为更充分开发利用挥发性成分,后续研究将尝试将VIP>1的成分与自

根据表3和图6可知,新鲜古红橘橘皮精油各挥发性成分中除 β -蒎烯外,均对ABTS⁺自由基有清除效果,但清除活性各有不同。23种萜烯类成分中对ABTS⁺自由基的清除活性较强的主要为 α -法尼烯(72.69%)、大根香叶烯D(71.59%)、 γ -榄香烯(67.21%)、反式氧化柠檬烯(66.81%);13种醛类成分中对ABTS⁺自由基的清除活性较强的主要为甜橙醛(83.09%)、2,4-癸二烯醛(72.34%)、月桂醛(72.16%);6种醇类成分中对ABTS⁺自由基的清除活性较强的主要为橙花醇(95.02%)、香茅醇(73.17%);4种酯类对ABTS⁺自由基的清除活性较强的主要为甲酸香茅酯(68.75%)、乙酸辛酯(65.79%);3种酚类成分对ABTS⁺自由基的清除活性依次为香芹酚(54.03%)、百里香酚(48.15%)、2,4-二叔丁基酚(35.55%);2种醚类和酮类对ABTS⁺自由基的清除活性依次为L-香芹酮(53.94%)、2-异丙基-5-甲基茴香醚(41.18%)。

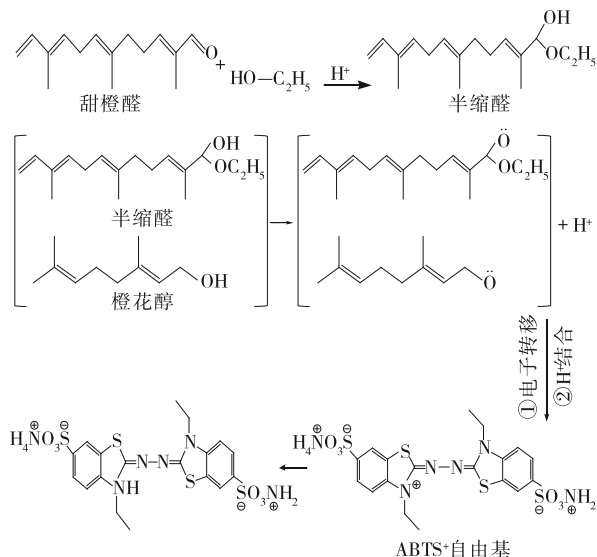


图7 清除ABTS⁺自由基的反应机理

Figure 7 Reaction mechanism of scavenging ABTS⁺

由基清除活性强的成分进行具有协同增效作用的组合筛选以增强精油的抗氧化活性。

参考文献

- [1] 视界网/重庆网络广播电视台. 2024农产品区域公用品牌名单公示[EB/OL]. (2024-11-26) [2025-02-05]. <https://jlpwmsj.cbg.cn/show/1078-4419205.html>.
CBG/CQBNTV. Announcement of the 2024 list of regional public brands for agricultural products[EB/OL]. (2024-11-26) [2025-02-05]. <https://jlpwmsj.cbg.cn/show/1078-4419205.html>.
- [2] 李雪青. 金佛手挥发性成分及精油生物活性研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2014: 2-3.
LI Q X. Research on the volatile compounds and essential oil bioactivities of jin bergamot[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2014: 2-3.
- [3] 黄娜娜. 柑橘精油抗氧化特性及对皮肤细胞氧化损伤的保护作用研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016: 5.
HUANG N N. Antioxidant property of citrus essential oil and research on the protective effect on skin fibroblast oxidative damage[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016: 5.
- [4] 钟炼军, 钱敏, 任文彬, 等. 不同种类柑橘精油香气成分分析[J]. 农产品加工, 2018(19): 55-59.
ZHONG L J, QIAN M, REN W B, et al. Study on the aroma components of different varieties of citrus[J]. Farm Products Processing, 2018(19): 55-59.
- [5] 肖娟. 柠檬果皮精油的提取及其抗氧化和清除亚硝酸盐的作用研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2019: 7-8.
XIAO J. Study of extraction essential oil from lemon peel and its antioxidant and scavenging effect of nitrite[D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2019: 7-8.
- [6] 崔歆印. 三种柑橘的精油提取及其活性研究[D]. 上海: 上海应用技术大学, 2020: 46.
CUI X A. Study on extraction and activity of essential oils of three kinds of citrus[D]. Shanghai: Shanghai Institute of Technology, 2020: 46.
- [7] 何凤平, 雷朝云, 范建新, 等. 植物精油提取方法、组成成分及功能特性研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(3): 307-320.
HE F P, LEI C Y, FAN J X, et al. Research progress of extraction methods, components and functional characteristics in essential oil[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(3): 307-320.
- [8] 杨永胜. 植物精油的主要提取技术、应用及研究进展[J]. 当代化工研究, 2021(4): 153-154.
YANG Y S. Main extraction technology, application and research progress of plant essential oil[J]. Modern Chemical Research, 2021(4): 153-154.
- [9] 张艳东, 张艳俊, 李腾飞. 植物精油的提取及其生理活性研究进展[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(9): 203-210.
ZHANG Y D, ZHANG Y J, LI T F. Plant essential oil extraction and physiological activities[J]. Food Research and Development, 2023, 44(9): 203-210.
- [10] 刘西岭, 郭俊芳, 程楠, 等. 超声—微波辅助提取柑橘皮精油工艺及抗氧化活性研究[J]. 贵州师范大学学报(自然科学版), 2023, 41(2): 47-55.
LIU X L, GUO J F, CHENG N, et al. Study on ultrasonic-microwave assisted extraction of essential oil from citrus peel and its antioxidant activity[J]. Journal of Guizhou Normal University (Natural Sciences), 2023, 41(2): 47-55.
- [11] 赵恒强, 陈军辉, 耿岩玲, 等. 基于 DPPH-HPLC 技术的马粪海胆抗氧化活性指纹图谱初步研究[J]. 山东科学, 2014, 27(3): 7-11.
ZHAO H Q, CHEN J H, GENG Y L, et al. DPPH-HPLC based preliminary research on antioxidant-activity fingerprint for *Hemicentrotus pulcherrimus* (A. Agassiz) [J]. Shandong Science, 2014, 27(3): 7-11.
- [12] 赵月, 李荣, 姜子涛. 栽培菊苣籽总黄酮的提取、成分鉴定及抗氧化活性成分的识别[J]. 食品科学, 2016, 37(16): 36-42.
ZHAO Y, LI R, JIANG Z T. Extraction, identification and screening for antioxidant activity of total flavonoids from *Cichorium endivia* L. seeds[J]. Food Science, 2016, 37(16): 36-42.
- [13] 王婵. 荜茇精油化学成分及清除游离基活性的评价[D]. 天津: 天津商业大学, 2020: 11-13.
WANG C. Chemical constituents and evaluation of free radical scavenging activity of essential oil from *Piper longum*. L.[D]. Tianjin: Tianjin University of Commerce, 2020: 11-13.
- [14] WOJTUNIK K A, CIESLA L M, WAKSMUNDZKA-HAJNOS M. Model studies on the antioxidant activity of common terpenoid constituents of essential oils by means of the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(37): 9 088-9 094.
- [15] 汪小兰. 有机化学[M]. 5版. 北京: 高等教育出版社, 2017.
WANG X L. Organic chemistry [M]. 5th ed. Beijing: Higher Education Press, 2017.
- [16] MA Y Y, MI C X, CHEN J, et al. Contribution of amino acid composition and secondary structure to the antioxidant properties of tilapia skin peptides[J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2024, 18(2): 1 483-1 498.