

pH 及 β -環狀糊精對白柚果皮萃取物之抗氧化能力的影響

李金燕 左艷芳 陳怡君 吳幸娟 趙育漳*

中華醫事科技大學 食品營養系

摘要

本研究主要是探討 pH 及 β -環狀糊精對白柚果皮萃取精油之水溶性萃取物抗氧化能力的影響。結果顯示，在熱水萃取物中，未熟果之總多元酚量顯著高於成熟果，分別為 62.4 ± 0.4 及 37.7 ± 0.7 (mg GAE/TSC g) ($p < 0.05$)。未熟果總類黃酮含量顯著低於成熟果，分別為 13.1 ± 0.4 及 14.6 ± 0.7 (mg RE/TSC g) ($p < 0.05$)。在維生素 C 含量上，未成熟果顯著高於成熟果，依序為 7.4 ± 0.1 及 5.9 ± 0.1 (mg AAE/TSC g)。比較清除 DPPH 自由基之能力，未成熟果顯著高於成熟果，分別為 75.5 ± 0.7 及 $67.8 \pm 0.9\%$ (scavenging effect %)。以 formic acid 調整萃取液 pH 值及添加不同量之 β -環狀糊精 (β -CD) 進行萃取時，結果顯示，pH 調整至 3.00 時，未熟果與成熟果之水溶性萃取物中含有最高量的總多元酚、總類黃酮及維生素 C。添加 0.05~0.5 % β -CD 時，水溶性萃取物之總多酚、總類黃酮及維生素 C 的含量顯著性增加。在 0.5% β -CD 添加時，總多酚含量在未熟果及成熟果，分別增加 57% 及 81%，總類黃酮上分別增加 91% 及 126%，維生素 C 分別增加 108% 及 102%，同時也提高 DPPH 自由基清除能力。比較調整 pH 和添加 β -CD 對氧化物質抽取量及抗氧化能力之效果，發現添加 0.5% 高濃度 β -CD 之效果，遠高於調整 pH 效果。

關鍵字：抗氧化能力、白柚果皮、總多元酚、 β -環狀糊精

Effects of pH and β -cyclodextrin on Antioxidant Activity of Water Extracts of *Citrus grandis* (L.) Osbeck Peel During Essential Oil Extraction

Cin-Yen Lee, Yen-Fang Chou, Yi-Chun Chen, Shin-Jiuan Wu and Yu-Chang Chao*

Department of Food Nutrition, Chung Hwa University of Medical Technology

ABSTRACT

The effects of pH and β -cyclodextrin on the extract efficiency and antioxidant activity of water extract of *citrus grandis(L)* Osbeck peel were studied. Results showed that total polyphenols of water extract of unripe fruit peel was significantly higher than those of ripe fruit peel, 62.4 ± 0.4 and 37.7 ± 0.7 (mg GAE/TSC g)($p < 0.05$). Total flavonoids of immature fruit was significantly lower than ripe fruit, 13.1 ± 0.4 and 14.6 ± 0.7 (mg RE / TSC g) ($p < 0.05$). On the vitamin C content, immature fruit was significantly higher than the ripe fruit, 7.4 ± 0.1 and 5.9 ± 0.1 (mg AAE / TSC g). Comparison of DPPH radical scavenging capacity, immature fruit was significantly higher than the ripe fruit, 75.5 ± 0.7 and $67.8 \pm 0.9\%$ (scavenging effect%). The effects of pH value and β -cyclodextrin (β -CD) on the compositions of the extracts showed that total polyphenols, total flavonoid and vitamin C had the highest extraction efficiency at pH 3.00 for immature and the ripe fruit. Adding 0.05 ~ 0.5% β -CD, total polyphenol content, total flavonoids and vitamin C significantly increased with β -CD. In 0.5% β -CD is added, the total polyphenol content of immature fruit and ripe fruit, increased by 57% and 81%, total flavonoids increased 92% and 125%, respectively, vitamin C increased 108% and 102%, respectively. Except the extraction efficiency of β -CD significantly increase but also improve the DPPH radical scavenging ability. Compare the effect of adjusting pH and adding β -CD on the radical scavenging ability, found that adding 0.5% β -CD was much higher than the adjustment of the pH.

Keywords: antioxidant activity, *citrus grandis(L)* Osbeck, β -cyclodextrin, polyphenols, flavonoids

壹、前言

精油是柑橘類 (citrus fruit) 水果果皮之重要副產物，使用相當廣泛，可作為飲料、冰品、蛋糕等食品的香料或空氣芳香劑等多方用途。長久以來，柑橘類水果的攝取對健康有正面意義，是因其含多種植化素(phytochemicals)，其中包括類黃酮類 (flavonoids)、維生素 C、類胡蘿蔔素 (carotenoids) 及檸檬苦素 (limonoids) 等活性物質(Ladaniya, 2008)。柑橘類水果類黃酮類已被報導具有抗氧化、抗糖尿、抗癌及抗發炎等活性(Bocco, 1998)。其中 hesperidin 可促進大腸癌細胞的凋亡(Park, 2008)。檸檬苦素 (limonin) 已發現可提高麩胱甘肽轉移酶 (Glutathione S-Transferase ; GST) 的活性，降低因化學性致腫瘤之發生 (Lam, 1989)。類黃酮在水果中之含量隨種類、品種及季節等因素的不同有很大的差異，抗氧化活性也有差異(Rice-Evans, Miller, & Paganga, 1997)。

精油之萃取有多種方法，包括水蒸餾法、蒸汽蒸餾法、溶劑萃取法、冷吸法、冷壓法及超臨界流體法等等，其中因水蒸餾法所需設備簡單，但俱有精油在萃取過程中，受熱破壞的缺點(Babu & Kaul, 2005)。

β -環狀糊精為 7 個葡萄糖所聚合，因環狀中央具有疏水性內腔，外部表面較具親水性(Astray, Gonzalez-Barreiro, Mejuto, Rial-Otero, & Simal-Gándara, 2009)，能與類黃酮化合物形成包覆化合物 (inclusion complex)，改善 hesperetin 及 naringenin 之溶解度及化學安定性等(Tommasini et al., 2004)。能與 rutin 形成包覆化合物，在儲藏過程中，減少受熱及紫外光照射裂解，保護抗氧化能力(Nguyen, Liu, Zhao, Thomas, & Hook, 2013)。且 β -環狀糊精在酸鹼溶液中都相當穩定，只有部分的環狀糊精會在酸性環境下產生水解反應(Astray, Gonzalez-Barreiro, Mejuto, Rial-Otero, & Simal-Gándara, 2009)。多元酚兒茶素在萃取過程中之安定性會隨著 pH 值的降低，穩定性增加(Yoshida, Kiso, & Goto, 1999)，因此利用調整 pH 可增加類黃酮在萃取階段或儲藏期間的安定性。

柑橘類水果在生長期間，會有自然落果現象，這些落果經收集後可作為傳統中藥(Ye et al., 2011)，白柚是柑橘類水果果實較大之水果，因田間管理的需要，有疏果或落果情形，所產生的廢果鮮少利用，造成環境的問題，因白柚果皮富含精油及多元酚類化合物等具生理活性物質，可利用加熱蒸餾方式萃取精油，在萃取過程水溶性萃取物因加熱，可能造成多酚類化合物的破壞。故本研究主要是探討不同 pH 及添加不同量 β -環狀糊精對白柚廢果果皮之熱萃取過程中，對可萃取總多元酚、總類黃酮及維生素 C 的保護效果及其抗氧化能力的影響，以提供白柚廢果利用之參考。

貳、材料與方法

一、樣品製備 (Sample preparation)

白柚採自佳里地區，分為未熟與成熟果，未熟果是結果後五個月之果實，重量約 200 ~ 350 g，柚皮約重 40 ~ 60 g。成熟果是結果九個月之果實，重量約 1500 ~ 2500 g，柚皮約重 140 ~ 240 g。果皮主要是外果皮(flavedo)和部分中果皮(albedo)，外果皮平均取樣厚度約 20 ~ 30 mm。

二、萃取(Extraction)

果皮經粉碎機 30 秒打碎後，秤取 100 g 並添加 1000 mL 去離子水，或利用甲酸 (formic acid)調整 pH，或添加不同量之 β -CD 後，將樣品置入 5 L 圓底玻璃瓶內進行蒸餾，冷凝管以 15°C 冷卻水循環冷凝，進行一個半小時 (90 分鐘) 循環萃取。萃取溶液經過濾並收集，樣品於 -18 °C 保存，並於一周內完成分析。

三、總多元酚測定 (Determination of total polyphenols contents)

採用 Folin-ciocalteu colorimetric 法 (Singleton, Orthofer, & Lamuela-Raventós, 1999)，樣品取 125 μ l 加入去離子水 0.5ml 震盪混和均勻，加入 125 μ l 2N Folin-Ciocalteu phenol reagent，於室溫下靜置 6 分鐘後，加入 1.25 ml 7% Na₂CO₃，加入 1 ml 去離子水震盪混和均勻，測定波長 760nm 吸光。標準品使用沒食子酸 (gallic acid)。總多元酚以 mg (gallic acid equivalents)/g (total solid contents) 表示。

四、總類黃酮測定 (Determination of total flavonoids contents)

取 250 μ l 樣品，各加入 1 ml 去離子水，再加入 75 μ l 5% NaNO₂ 混勻，於室溫下靜置 5 分鐘後，加入 75 μ l 10% AlCl₃，靜置 6 分鐘後，加入 500 μ l 1M NaOH，以去離子水調整終體積為 2.5ml，測定 510 nm 吸光值。以芸香苷(rutin)為標準品。總類黃酮是以 mg (rutin equivalents)/g (total solid contents) 表示。

五、維生素 C 測定 (Determination of vitamin C contents)

取 1 mL 的萃取液加入 1 mL 0.2M NaOH 溶液，混勻後，加入 1mL 0.1% 4-Chloro-7- nitrobenzofurazane (NBD-Cl) 丙酮溶液，最後以 50% 丙酮定量至 10mL，測 582nm 吸光值。

六、清除 DPPH 自由基能力測定(Determination of antioxidant activity)

參考 Shimada 等人(1992)的方法，樣品經適當後稀釋後，取 1.0 ml，加入 1.0 ml 新鮮配製 0.2 mM 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)甲醇溶液，混合均勻，在室溫下靜置 30 分鐘後，測定 517nm 吸光值 (Shimada, 1992)。清除率計算依照下列公式:

$$\text{清除率(scavenging effect) (\%)} = ((\text{空白組 } A_{517 \text{ nm}} - \text{實驗組 } A_{517 \text{ nm}}) / \text{空白組 } A_{517 \text{ nm}}) \times 100\%$$

七、統計分析(Statistical analysis)

實驗數據是二重複數的平均值和標準偏差(mean $\pm$ SD)表示。處理間的統計分析是利用 SAS 軟體 (Version 2.1.40, SAS Institute Inc. Cary NC, USA) 進行 ANOVA 分析。平均值差異之顯著性是以鄧肯式多變域測驗(Duncan's Multiple Range test)檢定，顯著水準 $p < 0.05$ 。

參、結果與討論

一、成熟度的影響

表一結果顯示，未熟果與成熟果未經調整 pH(pH 5.0)下萃取，水溶性可萃物之總多元酚及維生素 C 含量，未熟果皆高於成熟果，依序高出 66%及 25% ($p < 0.05$)，但總類黃酮含量則是成熟果高於未熟果 11%，而在抗氧化能力上未熟果高於成熟果 12% ($p < 0.05$)。Xu 等人也發現在極柑未熟果皮中總酚酸含量最高 (Xu, Ye, Liu, Ma, & Chen, 2008)，在本實驗中也有相同的趨勢。柑橘類水果其類黃酮含量在生長的早期會達到最高後，會隨著水果大小及成熟度的增加而減少 (Ladaniya, 2008)，在白柚果皮中卻有相反結果，其原因尚需要進行個別類黃酮化合物的測定，才能瞭解是否因測定方法所造成的差異。一般在柑橘及葡萄柚中未熟果之維生素 C 含量較高，隨著成熟度及大小而減少 (Ladaniya, 2008)，本研究也相同的趨勢。Abeyasinghe 等人比較不同品種及不同部位之柑橘類水果之維生素 C、柚苷及橘皮苷對整體抗氧化性之貢獻度，結果發現維生素 C 之貢獻度隨著品種與部位有很大的差異。(Abeyasinghe et al., 2007)

二、pH 的影響

以 formic acid 調整溶液至 pH 2.0、3.0 及 4.0 下進行萃取，未調整時溶液 pH 5.0，經加熱萃取 90 分鐘，由表一結果顯示，以 pH 3.0 進行萃取時，在未熟果或成熟果中，其總多元酚、總類黃酮及維生素 C 的可萃取量顯著高於其他 pH，且隨著 pH 降低，顯著增加($p < 0.05$)，但在 pH 2.0 有降低趨勢。同樣地，在抗氧化能力上也有相同的情形。與 pH 5.0 比較，在 pH 3.0 時，未成熟果與成熟果之總多元酚類、總類黃酮及維生素 C 含量，依次增加 10~36%、45~68% 及 66~39% ($p < 0.05$)。萃取物之 DPPH 自由基去除能力分別增加 14 及 20% ($p < 0.05$)。

三、添加 β -CD 的影響

以添加 0~0.5% β -CD 於萃取液中，經 90 分鐘萃取後，比較其可溶性萃取物中總多元酚、總類黃酮及維生素 C 含量，結果如表二所示，未熟果及成熟果皆隨著 β -CD 濃度的增加而顯著增加($p < 0.05$)，總多元酚、總類黃酮及維生素 C 含量依次增加 57~81%、91~126%及 108~102%，但抗氧化能力只增加 15~21%。 β -CD 因結構中內部具疏水性，外部具親水性，因此若空間結構能進入結構者，除了具有增加水溶性外，也俱有包覆保護效果。在本研究中添加 β -CD 雖然有較高的總多元酚、總類黃酮及維生素 C 萃取率，但其總體抗氧化能力表現，並沒有依照比率增加，其可能的原因是部分多元酚類化合物，和 β -CD 所形成的包覆化合物(inclusion complexes)之捕捉自由基能力降低所致。Nguyen 等人以 rutin 為例，形成 rutin-CD 複合物的 DPPH 自由基去除能力較自由態為高。以 ^1H NMR 分析複合物結構，認為結構上的 A 環進入環狀糊精的中空部分，形成穩定複合體，因 rutin C 環所含配糖體太大所造成(Nguyen, Liu, Zhao, Thomas, & Hook, 2013)。Liu 等人以 flavanone 為包覆對象，結果顯示，環狀糊精中空部分的 side group 可能和 flavanone 的 B 環形成氫鍵，穩定複合物的結構(Liu, 2012)。在本研究中白柚果皮在長時間加熱下如 rutin 等類似含配糖體的化合物遠低於非配糖體，因此，可能是 B 環上的-OH 和 β -CD 形成氫鍵，所造成的遮蔽效應，導致去除自由基能力沒有依照可萃取率的比率增加而增加。

四、調整 pH 及添加 β -CD 的影響

由上述表一結果得知，在萃取時調整 pH 3.0 時保護效果最佳，以 pH 3.0 下，進行添加不同濃度的 β -CD，進行萃取，結果如表三，比較未調整 pH 及添加 β -CD 時，總多元酚、總類黃酮及維生素 C 含量依次最高增加 10~82%、131~138%及 132~107%，且抗氧化能力增加 18~23%。由此可知，同時調整 pH 及添加 β -CD，對水溶性萃取物的抗氧化物質之保護效果並沒有加成效應。且比較添加 0.5% 高濃度 β -CD 之效果，遠高於調整 pH 效果。其原因主要是本實驗中萃取溶液，在未經調整 pH 時之 pH 值約 5.0，呈現酸性，對於多元酚類的熱破壞效果較低。

肆、結論

本研究以調整 pH 及添加 β -CD 於萃取溶液中，結果顯示，在 pH3.0 及添加 0.5% β -CD 時水溶性可萃物有最高的總多元酚、總類黃酮及維生素 C 含量，且兩種處理沒有加成效果，在本研究中添加高量的 β -CD 效果高於調整 pH。由於在以水蒸餾法萃取精油時，所產生的溶液廢棄物鮮少加以利用，雖經長時間的蒸餾加熱，但仍然具有相當高的自由基去除能力之抗氧化活性，但因水溶性萃取物俱有高苦味，如何降低苦味且不改變其抗氧化能力，以增加其利用，仍需要更進一步研究。

參考文獻

- Astray, G., Gonzalez-Barreiro, C., Mejuto, J. C., Rial-Otero, R., & Simal-Gándara, J. (2009). A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1631-1640. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.01.001>
- Babu, K. G. D., & Kaul, V. K. (2005). Variation in essential oil composition of rose-scented geranium (*Pelargonium* sp.) distilled by different distillation techniques. *Flavour and Fragrance Journal*, 20, 222-231.
- Bocco, A., Cuvelier, M.E., Richard, H., and Berset, C. (1998). Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2123-2129.
- Espina, L., Somolinos, M., Lorán, S., Conchello, P., García, D., & Pagán, R. (2011). Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food Control*, 22(6), 896-902. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.11.021>
- Han, Y.-L., Yu, H.-L., Li, D., Meng, X.-L., Zhou, Z.-Y., Yu, Q., . . . Guo, C. (2011). Inhibitory effects of limonin on six human cytochrome P450 enzymes and P-glycoprotein in vitro. *Toxicology in Vitro*, 25(8), 1828-1833. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2011.09.023>
- Hertog, M. G., Feskens, E. J., Hollman, P. C., Katan, M. B., & Kromhout, D. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*, 342, 1007-1011.
- Jang, H.-D., Chang, K.-S., Huang, Y.-S., Hsu, C.-L., Lee, S.-H., & Su, M.-S. (2007). Principal phenolic phytochemicals and antioxidant activities of three Chinese medicinal plants. *Food Chemistry*, 103(3), 749-756. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.026>
- Kim, G.-N., Shin, J.-G., & Jang, H.-D. (2009). Antioxidant and antidiabetic activity of Dangyuja (*Citrus grandis* Osbeck) extract treated with *Aspergillus saitoi*. *Food Chemistry*, 117(1), 35-41. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.072>
- Ladaniya, M. S. (2008). 6 - Fruit biochemistry *Citrus Fruit* (pp. 125-190). San Diego: Academic Press.
- Lam, L. K. T., Li, Y. and Hasegawa, S. (1989). Effects of citrus limonoids in glutathione S-transferase in mice. *J. Agric. Food Chem.*, 37(4), 878-880.

- Liu, B., Li, W., Nguyen, T. A. and Zhao, J. (2012). Empirical, thermodynamic and quantum-chemical investigations of inclusion complexation between flavanones and (2-hydroxypropyl)-cyclodextrins. *Food Chemistry*, 134, 926-932.
- Najla, G., & Elzbieta, K. (2000). Anticancer and Cholesterol- Lowering Activities of Citrus Flavonoids *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods*: CRC Press.
- Nguyen, T. A., Liu, B., Zhao, J., Thomas, D. S., & Hook, J. M. (2013). An investigation into the supramolecular structure, solubility, stability and antioxidant activity of rutin/cyclodextrin inclusion complex. *Food Chemistry*, 136(1), 186-192. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.104>
- Park, H. J., Kim, M. J., Ha, E., & Chung, J. H. . (2008). Apoptosis effect of hesperidin through caspase 3 activation in human colon cancer cells, SNU-C4. *Phytomedicine*, 15, 147-151.
- Ramful, D., Tarnus, E., Aruoma, O. I., Bourdon, E., & Bahorun, T. (2011). Polyphenol composition, vitamin C content and antioxidant capacity of Mauritian citrus fruit pulps. *Food Research International*, 44(7), 2088-2099. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.056>
- Rice-Evans, C. (1999). 16 - Screening of Phenolics and Flavonoids for Antioxidant Activity. In P. Lester, H. Midori, M. H. Toshikazu YoshikawaA2 - Lester Packer & Y. Toshikazu (Eds.), *Antioxidant Food Supplements in Human Health* (pp. 239-253). San Diego: Academic Press.
- Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. (1997). antioxidant properties of phenolic compounds. *Trend in Plant Sci.*, 2(4), 152-159.
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K. and Nakamura, T. (1992). antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 945-948.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In P. Lester (Ed.), *Methods in Enzymology* (Vol. Volume 299, pp. 152-178): Academic Press.
- Tommasini, S., Raneri, D., Ficarra, R., Calabrò, M. L., Stancanelli, R., & Ficarra, P. (2004). Improvement in solubility and dissolution rate of flavonoids by complexation with β -cyclodextrin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35(2), 379-387. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0731-7085\(03\)00647-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0731-7085(03)00647-2)
- Xu, G., Ye, X., Liu, D., Ma, Y., & Chen, J. (2008). Composition and distribution of phenolic acids in Ponkan (*Citrus poonensis* Hort. ex Tanaka) and Huyou (*Citrus*

- paradisi Macf. Changshanhuoyou) during maturity. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(5), 382-389. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2008.03.003>
- Ye, X.-Q., Chen, J.-C., Liu, D.-H., Jiang, P., Shi, J., Xue, S., . . . Kakuda, Y. (2011). Identification of bioactive composition and antioxidant activity in young mandarin fruits. *Food Chemistry*, 124(4), 1561-1566. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.013>
- Yoshida, Y., Kiso, M., & Goto, T. (1999). Efficiency of the extraction of catechins from green tea. *Food Chemistry*, 67(4), 429-433. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00148-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00148-X)
- Abeyasinghe, D. C., Li, X., Sun, C., Zhang, W., Zhou, C., & Chen, K. (2007). Bioactive compounds and antioxidant capacities in different edible tissues of citrus fruit of four species. *Food Chemistry*, 104(4), 1338-1344. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.047>