

茶枝柑果皮类黄酮抑制AGEs的效果及作用机制

王婉婷, 陈婉冰, 朱从一, 杨梦雪, 朱国辉, 曾继吾

Inhibitory Effects of Flavonoids from *Citrus reticulata* 'Chachi' Peel on the Formation of Advanced Glycation End-products

WANG Wanting, CHEN Wanbing, ZHU Congyi, YANG Mengxue, ZHU Guohui, and ZENG Jiwu

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024060404>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

鸢尾苷对晚期糖基化终末产物形成的抑制作用

Inhibitory Effect of Tectoridin on the Formation of Advanced Glycation End Products

食品工业科技. 2024, 45(24): 98-106 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024010275>

产地及肥料对新会茶枝柑果实品质的影响

Influence of Place of Origin and Fertilizer on Fruit Quality of *Citrus reticulata* 'Chachiensis' in Xinhui District

食品工业科技. 2025, 46(5): 267-276 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024040178>

8种别样茶对AGEs抑制能力的筛选及其抑制机制探究

Research of 8 Non-*Camellia* Teas on AGEs Inhibitory Ability and Their Mechanisms

食品工业科技. 2022, 43(24): 32-37 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022020105>

食源性晚期糖基化终末产物对人体的健康危害研究进展

Research on the Harm of Food-derived Advanced Glycation End Products to Human Health

食品工业科技. 2022, 43(6): 443-451 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021030327>

鱼新鲜度对其烤鱼片中晚期糖基化终末产物形成的影响

Effect of Fish Freshness on the Formation of Advanced Glycation End-products(AGEs)in Grilled Fish Fillets

食品工业科技. 2020, 41(17): 13-18,31 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.17.003>

茶枝柑果肉发酵过程中感官特性及抗氧化活性的变化

Changes of Sensory Properties and Antioxidant Activity of *Citrus reticulata* 'chachi' Pulp during Fermentation

食品工业科技. 2020, 41(21): 116-121 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019120311>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

王婉婷, 陈婉冰, 朱从一, 等. 茶枝柑果皮类黄酮抑制 AGEs 的效果及作用机制 [J]. 食品工业科技, 2025, 46(9): 153–164. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024060404

WANG Wanting, CHEN Wanbing, ZHU Congyi, et al. Inhibitory Effects of Flavonoids from *Citrus reticulata* 'Chachi' Peel on the Formation of Advanced Glycation End-products [J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(9): 153–164. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024060404

· 研究与探讨 ·

茶枝柑果皮类黄酮抑制 AGEs 的效果及作用机制

王婉婷^{1,2}, 陈婉冰^{1,*}, 朱从一¹, 杨梦雪¹, 朱国辉^{2,*}, 曾继吾^{1,*}

(1. 广东省农业科学院果树研究所, 农业农村部亚热带果树生物学与遗传资源利用重点实验室,
广东省果树科学与技术研究重点实验室, 广东广州 510640;

2. 华南农业大学生命科学学院, 广东广州 510630)

摘要: 本研究采用牛血清白蛋白-葡萄糖 (bovine serum albumin-glucose, BSA-Glu) 模拟体系, 研究不同生长期的茶枝柑果皮提取物及主要类黄酮化合物川陈皮素、橘皮素和橙皮苷对荧光性 AGEs 的抑制效果, 同时, 借助多光谱技术和计算机分子对接研究类黄酮与 BSA 的相互作用, 探究其抑制 AGEs 的作用机制。结果表明, 4 个不同生长期的茶枝柑果皮提取物均对 AGEs 的生成具有显著抑制作用, 12 月茶枝柑果皮提取物 (2.5 mg/mL) 对荧光性 AGEs 以及蛋白糖氧化产物二酪氨酸、犬尿氨酸和 N^ε-甲酰基犬尿氨酸的最大抑制率分别为 76.33%、71.78%、62.73% 和 66.07%。荧光光谱表明, 川陈皮素、橘皮素和橙皮苷能静态猝灭 BSA 的内源性荧光。同步荧光光谱表明, 川陈皮素、橘皮素和橙皮苷能轻微改变 BSA 的构象以及色氨酸 (TRP) 残基和酪氨酸 (TYR) 残基的微环境。分子对接表明, 川陈皮素、橘皮素和橙皮苷可结合到 BSA 的 TRP-213 残基附近的疏水性口袋并与 BSA 形成复合物, 同时与 BSA 的多个氨基酸残基之间存在氢键和疏水相互作用, 阻碍 BSA 糖基化位点与葡萄糖结合。由此可见, 茶枝柑果皮类黄酮通过减少精氨酸、赖氨酸残基与还原糖的结合的方式抑制 AGEs 的生成, 可用于 AGEs 天然抑制剂的开发。

关键词: 茶枝柑, 类黄酮, 相互作用, 晚期糖基化终产物, 抑制, 分子对接

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2025)09-0153-12

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024060404

本文网刊:



Inhibitory Effects of Flavonoids from *Citrus reticulata* 'Chachi' Peel on the Formation of Advanced Glycation End-products

WANG Wanting^{1,2}, CHEN Wanbing^{1,*}, ZHU Congyi¹, YANG Mengxue¹, ZHU Guohui^{2,*}, ZENG Jiwu^{1,*}

(1. Institute of Fruit Tree Research, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of South Subtropical Fruit Biology and Genetic Resource Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangdong Provincial Key Laboratory of Tropical and Subtropical Fruit Tree Research, Guangzhou 510640, China;

2. College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: This study investigated the inhibitory effects of extracts from *Citrus reticulata* 'Chachi' peels at different growth stages and the primary flavonoid components (nobiletin, hesperetin, and hesperidin) on fluorescent AGEs using the bovine serum albumin-glucose (BSA-Glu) model. To elucidate the underlying mechanisms, the interactions between flavonoids and BSA were analyzed using multi-spectral techniques and computer molecular docking. Results showed that extracts

收稿日期: 2024-06-27 +并列第一作者

基金项目: 国家现代农业 (柑橘) 产业技术体系 (CARS-26); 广东省乡村振兴战略专项 (2022-NPY-00-033, 2022-NBH-00-017)。

作者简介: 王婉婷 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 柑橘加工和功能活性开发, E-mail: wwt271204118@163.com。

陈婉冰 (1993-), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 柑橘加工和功能活性开发研究, E-mail: chenwanbing@gdaas.cn。

* 通信作者: 朱国辉 (1976-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 植物生理及分子生物学, E-mail: ghzhu@scau.edu.cn。

曾继吾 (1975-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 柑橘栽培与遗传育种, E-mail: jiwuzeng@163.com。

from *Citrus reticulata* 'Chachi' peels at four growth stages significantly inhibited AGEs formation. The extracts obtained in December (2.5 mg/mL) showed maximum inhibition rates of 76.33% for fluorescent AGEs and 71.78%, 62.73%, and 66.07% for the protein glycoxidation products dityrosine, kynurenine, and N'-formylkynurenine, respectively. Fluorescence spectroscopy revealed that the fluorescence quenching mechanism of BSA by nobiletin, hesperetin, and hesperidin was via a static quenching procedure. Synchronous fluorescence spectroscopy revealed that these flavonoids slightly altered the conformation of BSA and the microenvironment of tryptophan (TRP) and tyrosine (TYR) residues. Molecular docking studies showed that the flavonoids bound to a hydrophobic pocket near the TRP-213 residue of BSA, forming a complex and disrupting glucose binding to glycation sites on BSA through hydrogen bonds and hydrophobic interactions. In conclusion, flavonoids derived from *Citrus reticulata* 'Chachi' peels effectively inhibited the formation of AGEs by reducing the combination of arginine and lysine residues with reducing sugars, and had potential for use in developing natural AGEs inhibitors.

Key words: *Citrus reticulata* 'Chachi'; flavonoids; interaction; advanced glycation end-products; inhibition; molecular docking

茶枝柑(*Citrus reticulata* 'Chachi', CRC)主产于广东新会, 又称新会柑, 为芸香科(Rutaceae)柑橘属(*Citrus*)植物, 茶枝柑果皮经干燥和陈化后即可制作成广陈皮(新会陈皮)。广陈皮是传统道地中药材^[1-2], 被称为“广东三宝”“广东十大中药”, 也是国家卫健委批准的药食同源品类之一, 具有良好的药用和食疗价值^[3]。相比普通陈皮, 新会广陈皮在原产地环境、品质和临床疗效等方面更为优越^[4]。新会茶枝柑每年 7 月开始分批采摘, 其果皮经过加工后可以制成不同种类的产品, 其中青皮柑呈青黑色, 皮薄质硬不显皱缩, 适合制成柑普茶; 二红柑外表见褐黄色且皮质稍软, 初显皱褶, 大红柑皮色泽棕红, 质软皮厚, 皱缩明显, 两者可制作成药理功效相似的新会陈皮^[5-6]。有关茶枝柑及广陈皮中次生代谢产物的药用价值和生物活性越来越受关注, 其中类黄酮化合物是当下研究的热点。

类黄酮是茶枝柑果皮中的重要次生代谢物, 主要分为两类: 一类是二氢黄酮苷类, 包括橙皮苷、柚皮苷等; 另一类是多甲氧基黄酮类, 包括川陈皮素、橘皮素和 3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮等^[7]。茶枝柑类黄酮具有抗炎^[8]、抗氧化^[9]、抗肿瘤^[10]、降血脂^[11]等生物活性。茶枝柑果皮药食同源, 在广东地区素有陈皮入膳的传统。陈皮既能赋予食品独特的风味, 类黄酮等活性成分还能与食品中的蛋白质、糖、氨基酸、多糖等成分发生反应或者相互作用^[12], 影响食品加工中美拉德反应、脂质氧化和蛋白质变性等反应过程^[13-14]。

晚期糖基化终产物(advanced glycation end-products, AGEs)是美拉德反应形成的一类化合物总称, 现已发现有近 40 种^[15-16], 被认为是一种促进宿主细胞死亡和器官损伤的强毒性分子, 会对人体健康产生不利影响^[17-20]。食源性 AGEs 是人体 AGEs 的主要来源, 人体内食源性 AGEs 的占比高于因葡萄糖代谢异常或脂质过氧化产生的内源性 AGEs^[21]。高糖高蛋白的热加工食物, 例如烤肉、饼干、咖啡等, 由于美拉德反应剧烈, 容易积累高水平的 AGEs。植物提取物中高水平的多酚和黄酮类化合物是安全的

天然 AGEs 抑制剂, 能通过清除自由基、捕获高活性羰基化合物、抑制糖自氧化以及封闭氨基酸位点等方式^[22-23]抑制食品中 AGEs 的生成。现有研究表明, 纽荷尔脐橙中的类黄酮化合物以及从其他柑橘果皮中分离出的 5-去甲基川陈皮素具有抗糖化的作用^[24-25], 目前尚未有茶枝柑作为 AGEs 天然抑制剂的研究。

因此, 本文采用牛血清蛋白-葡萄糖(BSA-Glu)体系模拟食品中美拉德反应, 研究不同生长期的茶枝柑果皮类黄酮提取物及其主要成分对荧光性 AGEs 的抑制效果, 通过分析类黄酮化合物对乙二醛(GO)和甲基乙二醛(MGO)的捕获能力以及类黄酮化合物与 BSA 的相互作用, 阐明茶枝柑果皮类黄酮抑制 AGEs 的作用机制, 为茶枝柑在食品工业中作为 AGEs 抑制剂的潜在应用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

小青柑、青柑、二红柑和大红柑 4 个生长期的茶枝柑果实分别于 2023 年 7 月、9 月、11 月、12 月采摘于广东省江门植保所果园(图 1)。鲜果果皮清洗后真空冷冻干燥, 粉碎成约 60 目的粉末, -80 ℃ 储存; 川陈皮素(nobiletin, NOB)、橘皮素(tangeretin, TAN)、橙皮苷(hesperidin, HES)、甜橙黄酮(sinensetin)、5-去甲基川陈皮素(demethylnobiletin)、4',5,6,7-四甲氧基黄酮、3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮



图 1 茶枝柑鲜果四个生长期概览图

Fig.1 Overview of four growth stages of fresh *Citrus reticulata* 'Chachi'

纯度>98%,上海源叶生物技术有限公司;牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、葡萄糖(glucose, Glu)、氨基胍(aminoguanidine, AG)、L-赖氨酸(L-Lysine, Lys)、乙二醛(glyoxal, GO)、甲基乙二醛(methylglyoxal, MGO) 美国 Sigma-Aldrich 公司;液相和质谱所用乙腈、甲酸 美国 Thermo Scientific 公司;乙醇、石油醚、二氯甲烷、邻苯二甲酸等均为分析纯 上海国药集团化学试剂有限公司。

SQP 电子分析天平 德国赛多利斯科学仪器有限公司; LGJ-25C 真空冷冻干燥机 北京四环福瑞科仪科技有限公司; RV 3 真空旋转蒸发仪 德国 IKA 公司; Spark 多功能酶标仪 瑞士 TECAN 公司; LS-55 荧光分光光度计 美国 PerkinElmer 公司; 1290 Infinity II 超高效液相色谱仪、TOF/QTOF 6500 液质联用仪 美国安捷伦公司。

1.2 实验方法

1.2.1 茶枝柑果皮类黄酮的提取和富集 茶枝柑果皮类黄酮的提取和富集参考 Zheng 等^[26]的方法并稍加修改。称取 50 g 冻干茶枝柑果皮粉末,按料液比 1:20 加入 90% 乙醇(w/w)溶液,45 ℃ 下超声提取 30 min,重复提取 3 次后收集合并提取液,旋转蒸发回收溶剂,得到茶枝柑果皮类黄酮粗提液。将类黄酮粗提液用水稀释一倍后依次用等体积的石油醚和二氯甲烷进行连续萃取,收集二氯甲烷萃取液,旋转蒸发回收溶剂后真空冷冻干燥,得到茶枝柑果皮类黄酮提取物,置于-20 ℃ 保存。

1.2.2 茶枝柑果皮类黄酮提取物成分的质谱定性分析 取 4 个生长期的茶枝柑果皮类黄酮提取物混合,用 50% 甲醇水溶解配制成 300 μg/mL 待测样品。川陈皮素、橘皮素、橙皮苷、甜橙黄酮、5-去甲基川陈皮素、4',5,6,7-四甲氧基黄酮、3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮等标准品用 50% 甲醇水溶液配制成 50 μg/mL 的标准液用于定性分析。采用 Agilent TOF/Q-TOF 6500 液质联用仪, Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm)。色谱条件: A 相为 0.1% 的甲酸水, B 相为含 0.1% 甲酸的乙腈;柱温 40 ℃,流速为 0.4 mL/min,进样量为 2 μL;梯度洗脱程序为 0 min, 90% A; 2 min, 90% A; 12 min, 20% A; 14 min, 20% A; 16 min, 0% A; 18 min, 0% A。质谱条件: 采用电喷雾离子化方式,正离子模式;质谱采集质量-电荷比(m/z)范围为 100~3000;离子化电压 3500 V,气帘气 35 psi,温度 350 ℃^[27]。

1.2.3 茶枝柑果皮类黄酮提取物的液相色谱定量分析 称取 4 个生长期的茶枝柑果皮类黄酮提取物 5 mg,用 50% 甲醇水溶解配制成 20 mL 待测样品。川陈皮素、橘皮素、橙皮苷标准品配制成浓度梯度 6.25~100 μg/mL 的标准液,甜橙黄酮、5-去甲基川陈皮素标准品配制成浓度梯度 0.3125~5 μg/mL 的标准液。采用安捷伦 1290 Infinity II 超高效液相色谱仪,

Hypersil GOLD C₄ 柱(2.1 mm×100 mm, 1.9 μm; Thermo SCIENTIFIC, USA)。液相色谱条件^[28]: 柱温为 30 ℃;进样量为 2 μL;流动相为 0.1% 甲酸水溶液(A)和乙腈(B),梯度洗脱条件: 0 min, 90% A; 2 min, 90% A; 10 min, 70% A; 15 min, 50% A; 20 min, 10% A; 流速为 0.3 mL/min;橙皮苷的检测波长为 280 nm,川陈皮素、橘皮素、甜橙黄酮和 5-去甲基川陈皮素的检测波长为 330 nm。以标品溶液质量浓度(μg/mL)为横坐标、对应峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,测定 4 个生长期的茶枝柑果皮类黄酮提取物中川陈皮素、橘皮素、橙皮苷、甜橙黄酮和 5-去甲基川陈皮素含量。

1.2.4 茶枝柑果皮类黄酮提取物对 AGEs 的抑制 牛血清蛋白-葡萄糖体系(BSA-Glu 体系)在参考前人方法基础上稍加修改^[29-30]。20 mg/mL BSA、1 mol/L 葡萄糖溶解于磷酸盐缓冲溶液 PBS(50 mmol/L, pH7.4)。川陈皮素、橘皮素、橙皮苷标准品以及 4 个时期茶枝柑果皮类黄酮提取物用 DMSO 配制成母液,加入到上述体系中达到最终浓度为 0、0.125、0.25、0.5、1.0、1.5、2.5 mg/mL,并确保 DMSO 小于 1%(V/V),同时,以相同浓度的 AG 为阳性对照。100 ℃ 水浴反应 75 min 后,测定其对荧光性 AGEs 和蛋白质氧化产物的抑制作用。参考 Zhao 等^[31]方法,在 370/440、330/415、365/480 和 325/434 nm 激发/发射波长处分别测定荧光性 AGEs 及蛋白糖氧化产物二酪氨酸、犬尿氨酸和 N'-甲酰基犬尿氨酸的荧光强度^[32]。茶枝柑果皮类黄酮提取物对 AGEs 的抑制率(%)为:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

式中, A_0 为对照组(仅 BSA-Glu 体系)的荧光强度, A_1 为实验组(添加不同浓度提取物或类黄酮化合物标准品)的荧光强度。

1.2.5 类黄酮化合物对 MGO 和 GO 捕集能力的测定 由于食品中二羰基化合物乙二醛(glyoxal, GO)、甲基乙二醛(methylglyoxal, MGO)自身并不稳定且在 200~400 nm 波长下没有紫外吸收,所以对二羰基化合物进行衍生化,稳定形成的喹啉衍生物进行检测^[33-34]。

方法如下: MGO/GO(4 mmol/L)与不同浓度(0、0.0625、0.125、0.25、0.5、1.0、2.0 mg/mL)的类黄酮化合物(NOBI、TAN、HES)在 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 PBS(pH7.0)37 ℃ 孵育 6 h,取 0.5 mL 衍生化试剂 OPD(10 mmol/L)与 0.5 mL 上述孵育样品 37 ℃ 反应 0.5 h,过 0.22 μm 膜后用 HPLC-DAD 检测生成的 MGO/GO 衍生物。Hypersil GOLD C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm; Thermo SCIENTIFIC, USA)色谱柱,进样量为 10 μL,流量比为 1 mL/min,柱温 30 ℃,流动相为 0.1% 的乙酸水溶液(A)和甲醇(B),梯度洗脱程序为: 0~20 min, 30%~70% B。检测波长

为 315 nm。MGO/GO 捕获率(%)的计算公式为:

$$\text{MGO/GO 捕获率}(\%) = \frac{F_0 - F_1}{F_0} \times 100 \quad \text{式 (2)}$$

式中, F_0 为对照组(仅 BSA-Glu 体系)的 MGO/GO 浓度, F_1 为实验组(添加不同浓度类黄酮化合物标准品)的 MGO/GO 浓度。

1.2.6 荧光光谱测定 在 25 °C 下, 将 BSA 溶液与不同浓度的类黄酮化合物(NO₂、TAN、HES)混合, 最终混合液中 BSA 浓度均为 1×10^{-6} mol/L。用比色皿(10×10 mm)测量, 荧光分光光度计扫描, 测定荧光淬灭曲线。光谱条件: 激发波长为 280 nm, 发射波长为 300~500 nm, 电压 400 V, 扫描速度 1200 nm/min, 狭缝宽度 5 nm^[35]。根据经典 Stern-Volmer 方程确定 NO₂、TAN、HES 与 BSA 之间的猝灭常数:

$$F_0/F = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad \text{式 (3)}$$

$$\log[(F_0 - F)/F] = \log K_a + n \log [Q] \quad \text{式 (4)}$$

式中, F_0 和 F 分别为无类黄酮和有类黄酮时 BSA 的荧光强度, $[Q]$ 为类黄酮的浓度, K_q 和 K_{sv} 分别为双分子猝灭速率常数和 Stern-Volmer 猝灭常数, τ_0 为荧光分子的平均寿命(约 10^{-8} s), K_a 和 n 分别为结合常数和结合位点数^[36]。

1.2.7 同步荧光光谱测定 样品制备同 1.2.6, 在 260~340 nm($\Delta\lambda=15$ nm)和 220~360 nm($\Delta\lambda=60$ nm)范围内记录含类黄酮化合物和不含类黄酮化合物的 BSA 的同步荧光光谱。激发和发射狭缝宽度均设为 5.0 nm, 扫描速率设为 1200 nm·min⁻¹。

1.2.8 分子对接分析 BSA 的晶体结构来自蛋白质数据库(PDB id: 4F5S)^[37], 为了获得稳定的蛋白质和受体, 使用 PyMOL 软件去除 BSA 的 B 链和所有水分子与配体以产生单体结构。使用 ChemDraw (v.19.0) 软件描绘并优化 NO₂、TAN、HES 的 2D 和 3D 立体化学结构。然后, 使用 AutoDock Tools (1.5.7 版本)向受体 BSA 和类黄酮配体添加极性氢, 每个配体中的所有可旋转键都保持自由, 而受体保持刚性, 并分配氢原子和 Gasteiger 电荷, 确保以最低能量的结合姿势进行分析。对接盒子的中心坐标为 $x=-3.615$, $y=23.022$, $z=107.822$, 大小为 $60 \times 60 \times 60$, 网格空间为 0.375 Å。对接采用全盲对接, 对接时采用 AutoDock Vina 力场, 搜索前 20 个得分最高的构象。用 PLIP 在线工具分析茶枝柑类黄酮化合物与 BSA 结合位点的疏水相互作用和形成的氢键。最后, 在 PyMOL 软件中绘制 BSA 蛋白分子的表面结构图, 并展示茶枝柑类黄酮化合物与其结合的情况。

1.3 数据处理

所有实验进行三次重复, 结果数据采用 Excel 2010 处理, 以平均值±标准差(SD)表示。使用单因素方差分析(ANOVA)进行统计分析, 然后使用 IBM SPSS Statistics 16.0 软件进行数据统计分析, 采用 Duncan 检验, $P < 0.05$ 。采用 Origin 2021 软件作图。

2 结果与分析

2.1 茶枝柑果皮类黄酮提取物成分鉴定

为明确茶枝柑果皮类黄酮提取物的化学组成, 采用 UPLCMS/MS 对其主要化学成分进行鉴定, 其总离子流图如图 2 所示。质谱峰 1、7、8、9、10、11、12 通过与标准物质比对保留时间、准分子离子和二级离子碎片质荷比分别确定为橙皮苷、甜橙黄酮、川陈皮素、4',5,6,7-四甲氧基黄酮、3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮、橘皮素和 5-去甲基川陈皮素。多甲氧基黄酮质谱裂解规律主要是连续丢失 $\text{CH}_3\cdot$, 失去 C 环中的羰基、 CO_2 、中性水分子 H_2O , 偶见黄酮母核发生 C 环逆狄尔斯-阿尔德(RDA)裂解^[38]。质谱峰 2 准分子离子峰为 329.1021 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 推测其化学式为 $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_6$, 二级质谱的特征片段离子包括 m/z 314.0777 ($[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3]^+$)、 m/z 299.0543 ($[\text{M}+\text{H}-2\text{CH}_3]^+$), 结合文献 [38] 中广陈皮化学成分的质谱信息推断其为 7-H-5,3',4'-三甲基黄酮。质谱峰 3 其准分子离子峰为 359.1122 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 二级质谱的特征片段离子包括 m/z 344.0872 ($[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3]^+$)、 m/z 326.0771 ($[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3-\text{H}_2\text{O}]^+$)、 m/z 315.0878 ($[\text{M}+\text{H}-\text{CO}_2]^+$), 结合文献 [38-39] 推断其为 5-H-3',4',7,8-四甲氧基黄酮。相似的, 质谱峰 5、13 推测为 2',3',4',5,7-五甲氧基黄酮和 2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-5-hydroxy-6,7-dimethoxy-4H-chromen-4-one。质谱峰 4、6 的准分子离子为 389.12 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 推测其分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_8$, 并且二级碎片离子符合羟基-五甲氧基黄酮的断裂方式, 应为两个同分异构体, 根据文献 [38-40] 中保留时间先后, 分别推测为 5-H-3,6,7,8,4'-五甲氧基黄酮、5-H-3,7,8,3',4'-五甲氧基黄酮。以上 13 种类黄酮化合物的质谱信息见表 1。

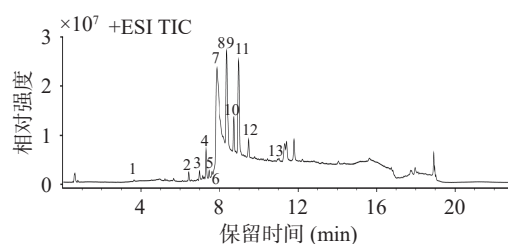


图 2 茶枝柑果皮提取物的总离子流图

Fig.2 Total ion current chromatogram of *Citrus reticulata* 'Chachi' peel extract

2.2 茶枝柑果皮提取物类黄酮含量动态变化

采用高效液相色谱法对不同生长期的茶枝柑果皮提取物中橙皮苷、甜橙黄酮、川陈皮素、橘皮素、5-去甲基川陈皮素共 5 种主要类黄酮化合物进行定量分析, 4',5,6,7-四甲氧基黄酮、3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮等其他类黄酮成分含量较低, 未达定量检出限。以上化合物随生长时期的动态变化如图 3。

茶枝柑果皮提取物中川陈皮素的含量最高, 其次是橘皮素。橙皮苷含量随生长发育呈显著上升趋势($P < 0.05$), 从 0.156 mg/g 增加至 1.012 mg/g。川

表 1 茶枝柑果皮提取物的主要化学成分
Table 1 Main chemical components of *Citrus reticulata* 'Chachi' peel extract

峰	保留时间 (min)	鉴定化合物	分子式	[M+H] ⁺	误差 (ppm)	MS/MS碎片	鉴定依据
1	5.26	橙皮苷(Hesperidin)	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	611.1962	-1.54	449.1397; 303.0857; 153.0174	标准品
2	6.57	7-H-5,3',4'-三甲基黄酮(7-Hydroxy-5,3',4'-trimethoxyflavone)	C ₁₈ H ₁₆ O ₆	329.1021	0.07	314.0777; 299.0543; 268.0726	[38]
3	6.90	5-H-3',4',7,8-四甲氧基黄酮(5-Hydroxy-3',4',7,8-tetramethoxyflavone)	C ₁₉ H ₁₈ O ₇	359.1122	-1.2	344.0872; 326.0771; 315.0878	[38-39]
4	7.23	5-H-3,6,7,8,4'-五甲氧基黄酮(5'-Hydroxy-3,6,7,8,4'-pentamethoxyflavone)	C ₂₀ H ₂₀ O ₈	389.1240	1.69	374.0988; 359.0756; 341.0644; 197.0078	[38,40]
5	7.35	2',3',4',5,7-五甲氧基黄酮(2',3',4',5,7-Pentamethoxyflavone)	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	373.1296	3.09	358.1043; 343.0816	[38]
6	7.52	5-H-3,7,8,3',4'-五甲氧基黄酮(5-Hydroxy-3,7,8,3',4'-pentamethoxyflavone)	C ₂₀ H ₂₀ O ₈	389.1230	-0.05	374.0986; 359.0757; 341.0646	[38]
7	7.84	甜橙黄酮(Sinensetin)	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	373.1291	2.1	358.1042; 344.0840; 329.1017; 312.0988	标准品
8	8.38	川陈皮素(Nobiletin)	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	403.1459	-4.1	388.1158; 373.0956; 355.0818; 342.1096	标准品
9	8.48	4',5,6,7-四甲氧基黄酮(4',5,6,7-Tetramethoxyflavone)	C ₁₉ H ₁₈ O ₆	343.118	3.22	328.0935; 313.0706; 282.0884	标准品
10	8.76	3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮(3,5,6,7,8,3',4'-Heptamethoxyflavone)	C ₂₂ H ₂₄ O ₉	433.1506	2.74	418.1262; 403.1030; 385.0917	标准品
11	9.01	橘皮素(Tangeritin)	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	373.1307	13.5	358.1055; 343.0830; 325.0712	标准品
12	9.52	5-去甲基川陈皮素(5-Demethylnobiletin)	C ₂₀ H ₂₀ O ₈	389.1240	2.11	359.0761; 341.0651	标准品
13	10.16	2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-5-hydroxy-6,7-dimethoxy-4H-chromen-4-one	C ₁₉ H ₁₈ O ₇	359.1129	0.76	344.0895; 329.0652; 311.0540	[38]

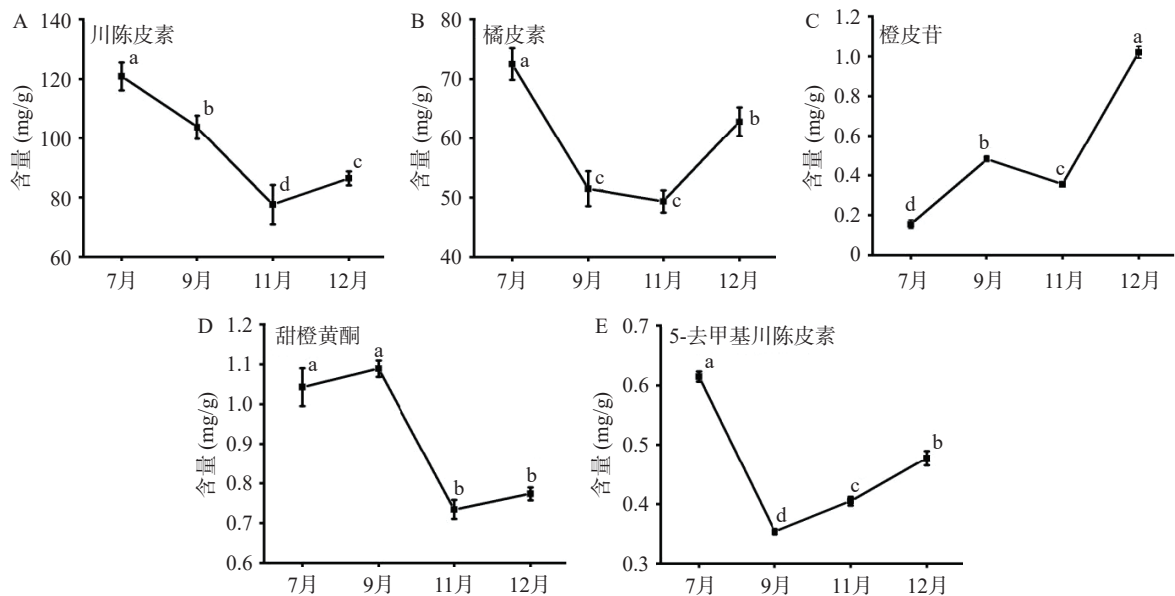


图 3 四个生长期茶枝柑果皮提取物中 5 种类黄酮化合物含量
Fig.3 Contents of five flavonoids in *Citrus reticulata* 'Chachi' peel extract at four growth stages
注: 小写字母表示化合物在不同生长期含量具有显著差异($P<0.05$)。

陈皮素、橘皮素、5-去甲川陈皮素和甜橙黄酮大致呈下降趋势,但在 12 月成熟期时,多甲氧基黄酮类化合物含量较未成熟期(9 月、11 月)略高($P<0.05$)。由此可见,茶枝柑生长发育过程中,小青柑时期(7 月)多甲氧基黄酮在果皮中大量积累,在二红柑时期前(9 月)出现明显下降(图 3)。以上结果与前人研究结果相似,Liang 等^[9]通过检测发现 7~12 月份茶枝柑果皮中类黄酮化合物含量呈现动态变化,橙皮苷在成熟期高于未成熟期,而多甲氧基黄酮在未成熟期

高于成熟期。
2.3 茶枝柑类黄酮对荧光性 AGEs 形成的影响
茶枝柑果皮提取物中含有类黄酮化合物,不同生长期茶枝柑类黄酮提取物对荧光性 AGEs 形成的抑制作用如图 4 所示。同一浓度(2.5 mg/mL)下对比 4 个生长期的结果,12 月采摘的大红柑果皮提取物对 BSA-Glu 体系中荧光性 AGEs 生成的抑制率最高达 76.33%,显著优于阳性对照 AG($P<0.05$)。说明不同生长期的茶枝柑对荧光性 AGEs 的抑制效

果存在差异,12月大红柑最适宜用作糖基化抑制剂产品的开发。Zhang等^[24]发现从纽荷尔脐橙分离出的17种黄酮类化合物中甜橙黄酮可作为效果最佳的糖基化抑制剂;Upadhyay等^[25]从其他柑橘果皮中分离出的5-O-去甲氧基-川陈皮素也具有抗糖化的作用。但甜橙黄酮和5-去甲基川陈皮素在茶枝柑中含量较低,说明虽然不同柑橘品种的果皮都具有抗糖化作用,但其发挥作用的主要活性成分可能并不一致。

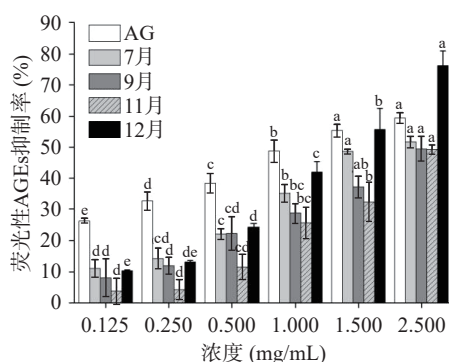


图4 四个生长期茶枝柑类黄酮提取物对BSA-Glu体系中荧光性AGEs的抑制效果

Fig.4 Inhibitory effects of *Citrus reticulata* 'Chachi' peel extracts at four growth stages on fluorescent AGEs in BSA-Glu model

注:不同小写字母表示同一生长期茶枝柑在不同浓度下抑制率具有显著性差异($P<0.05$)。

为明确茶枝柑类黄酮提取物中发挥抗糖化作用的主要活性成分,对其含量最高的三类黄酮化合物(NO、TAN、HES)抑制BSA-Glu体系中AGEs生成的效果进行研究,其结果如图5所示。类黄酮化合物和AG的加入显著降低了荧光性AGEs的形成,且与浓度呈正相关。阳性对照AG对荧光性AGEs形成的抑制效果显著强于三类黄酮化合物($P<0.05$),同一浓度(2.5 mg/mL)下,AG可抑制体系中65.02%的荧光性AGEs生成,而NO、TAN和

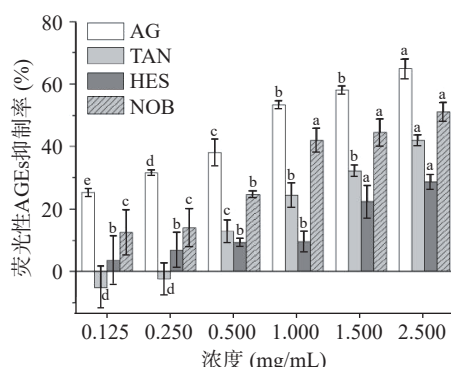


图5 三类黄酮化合物对BSA-Glu体系中荧光性AGEs的抑制效果

Fig.5 Inhibitory effect of three flavonoids on fluorescent AGEs in BSA-Glu model

注:不同小写字母表示同一化合物在不同浓度下抑制率具有显著性差异($P<0.05$)。

HES对荧光性AGEs的抑制率分别为51.11%、41.94%和28.81%。由此表明,三类黄酮化合物的抑制效果为NOB>TAN>HES。但三类黄酮化合物在相同浓度下对荧光性AGEs的抑制效果都不及12月份茶枝柑类黄酮提取物,由此推测,茶枝柑类黄酮提取物中不同类黄酮化合物在抑制AGEs的过程中可能存在协同作用。

2.4 茶枝柑果皮类黄酮化合物对蛋白糖氧化产物形成的影响

蛋白在糖基化过程中同时会发生氧化反应,二酪氨酸、N'-甲酰基犬尿氨酸和犬尿氨酸等蛋白糖氧化产物也可以反映蛋白质糖基化的程度^[41]。色氨酸残基被修饰为二酪氨酸和N'-甲酰基犬尿氨酸,而酪氨酸残基被转化为犬尿氨酸。由图6可知,4个时期的茶枝柑果皮提取物中,当浓度为2.5 mg/mL时,12月大红柑果皮对二酪氨酸、犬尿氨酸和N'-甲酰基犬尿氨酸的抑制效果最佳,其最大抑制率分别为71.78%、62.73%和66.07%;3类黄酮化合物中,NOB对犬尿氨酸的抑制效果最佳,达到66.85%,TAN对二酪氨酸和N'-甲酰基犬尿氨酸的抑制效果最佳,其最大抑制率分别是84.90%和78.47%。糖氧化是一种非酶促反应,还原糖与蛋白质的氨基酸残基反应,导致蛋白质结构和功能的改变^[35]。BSA有两个色氨酸和21个酪氨酸残基,并且酪氨酸残基更容易被糖氧化为犬尿氨酸,导致BSA糖氧化产物中犬尿氨酸水平相对较高。因此,茶枝柑类黄酮化合物和AG对犬尿氨酸形成的抑制作用可能弱于二酪氨酸^[42-43]。总之,结果表明茶枝柑类黄酮化合物可以抑制BSA中氨基酸残基的糖氧化。

2.5 类黄酮化合物对MGO和GO的影响

由图7可知,与MGO和GO孵育后TAN、HES和NOB对MGO和GO的捕获率几乎不变,而AG对MGO和GO捕获率显著上升($P<0.05$),在浓度为2.0 mg/mL时MGO和GO的捕获率达90%以上。类黄酮化合物A环上的羟基在捕获MGO和GO中起重要作用,但本研究中所用的三类黄酮化合物缺乏游离羟基,无法与MGO、GO形成加合物^[44]。说明TAN、HES和NOB这三种茶枝柑中主要类黄酮化合物无法通过捕获MGO与GO这一途径抑制AGEs的生成。

2.6 茶枝柑果皮中类黄酮化合物与BSA相互作用机理

类黄酮与蛋白分子间的相互作用可改变蛋白的构象,减少蛋白的糖基化位点,是类黄酮抑制AGEs生成的重要途径^[42]。为进一步探究三种茶枝柑主要类黄酮化合物抑制BSA糖基化的分子机制,本研究通过荧光猝灭光谱研究NOB、TAN和HES与BSA的相互作用。蛋白质的荧光猝灭可分为静态猝灭、动态猝灭和静态联合动态猝灭^[45]。动态猝灭过程中,蛋白质吸收峰波长不发生改变,而静态猝灭则

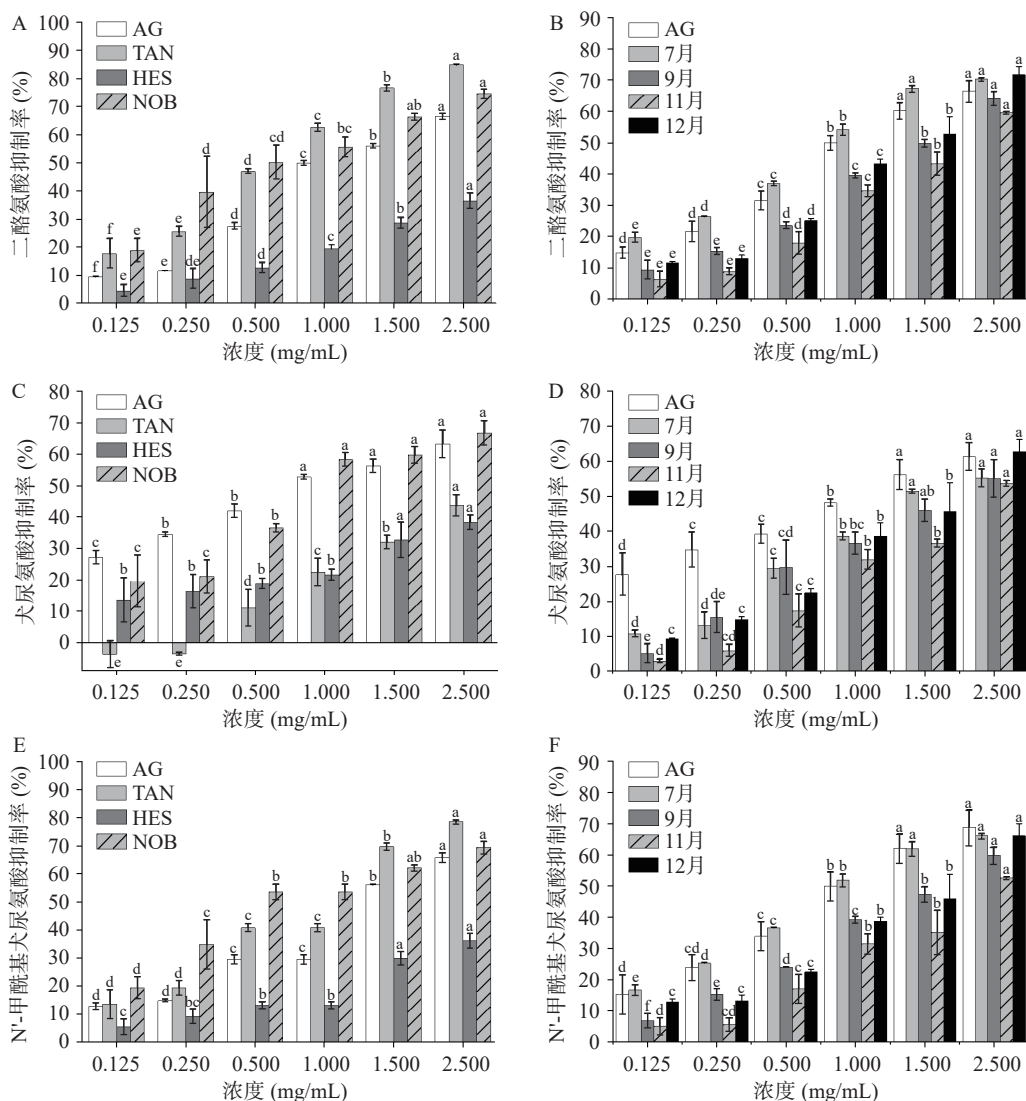


图 6 类黄酮化合物与茶枝柑提取物对 BSA-Glu 体系中蛋白糖氧化产物生成的抑制作用

Fig.6 Inhibitory effects of flavonoids and *Citrus reticulata* 'Chachi' extract on protein glyoxidation products in BSA-Glu model

注: A、C、E 分别为类黄酮化合物对 BSA-Glu 体系中二酪氨酸、犬尿氨酸、N'-甲酰基犬尿氨酸生成的抑制作用; B、D、F 分别为茶枝柑提取物对 BSA-Glu 体系中二酪氨酸、犬尿氨酸、N'-甲酰基犬尿氨酸生成的抑制作用。不同小写字母表示类黄酮化合物或同一时期茶枝柑提取物在不同浓度下抑制率具有显著性差异($P < 0.05$)。

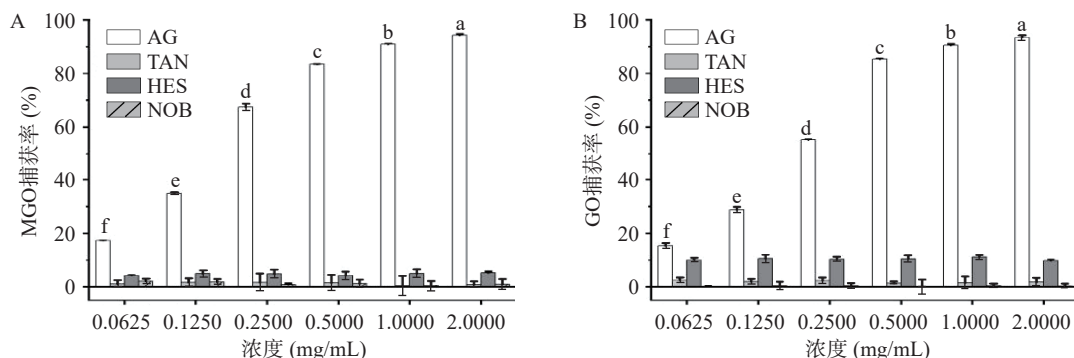


图 7 三种茶枝柑类黄酮化合物的 MGO/GO 捕获能力

Fig.7 MGO/GO capturing capacity of three flavonoids from *Citrus reticulata* 'Chachi'

注: 不同小写字母表示类黄酮化合物在不同浓度下捕获率有显著性差异($P < 0.05$)。

会导致吸收峰波长改变^[46]。

如图 8 所示, BSA 在 353 nm 处有特征荧光峰, 随着 NOB、TAN 以及 HES 的浓度升高, BSA 的荧光强度逐渐降低并且出现红移, 表明 NOB、TAN 和

HES 均与 BSA 发生相互作用, 并且诱导 BSA 的构象改变, 推测是类黄酮化合物中的芳香环与 BSA 中的色氨酸、酪氨酸残基等荧光基团结合, 导致荧光强度下降。因此, 初步判断 NOB、TAN 和 HES 对 BSA

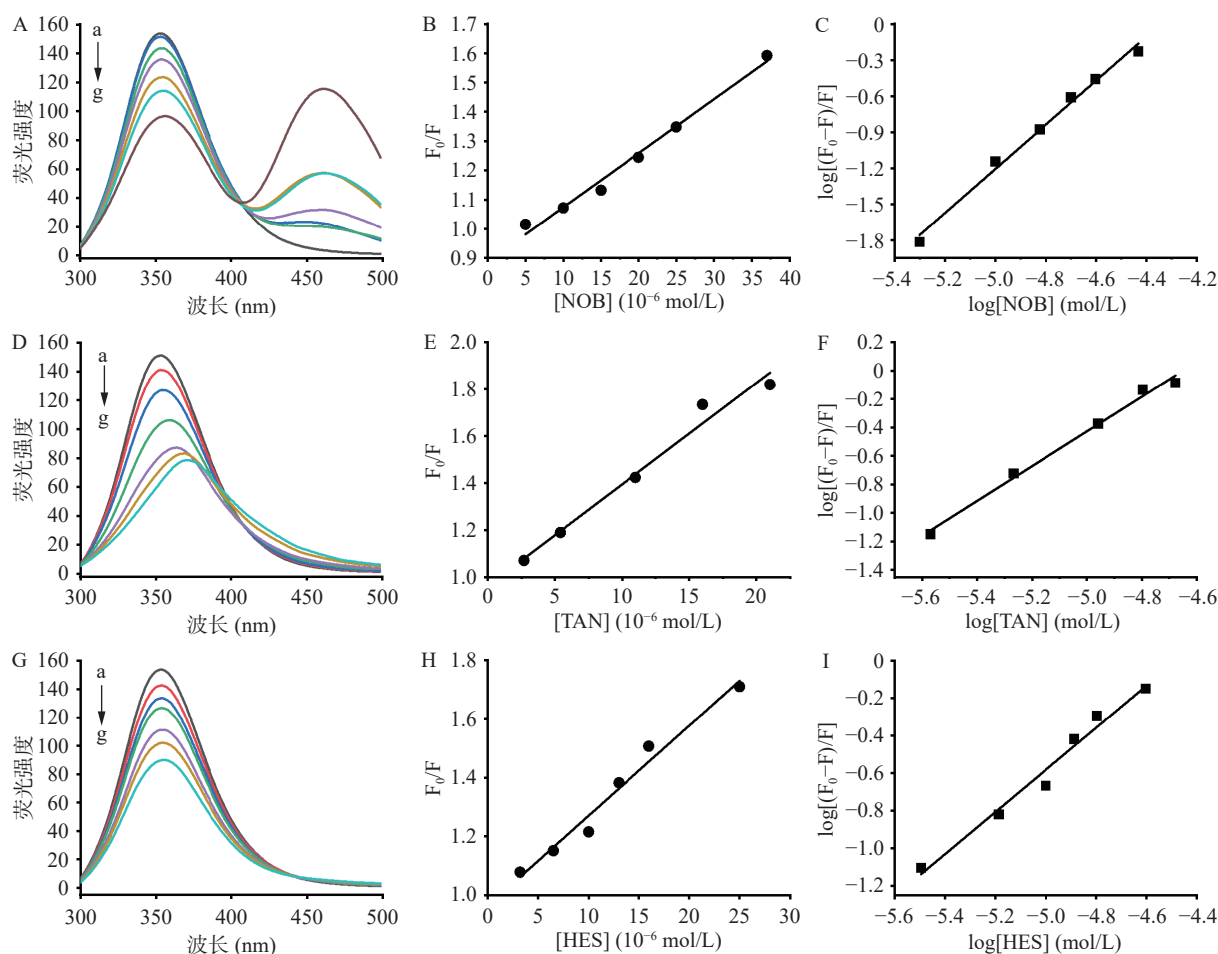


图 8 不同浓度茶枝柑类黄酮化合物与 BSA 的荧光光谱

Fig.8 Fluorescence spectra of BSA with different concentrations of *Citrus reticulata* 'Chachi' flavonoids

注: A、D、G 为 NOB、TAN、HES 对 BSA 荧光光谱的影响, B、E、H 分别为 NOB、TAN、HES 与 BSA 相互作用的 Stern-Volmer 方程曲线图, C、F、I 分别为 NOB、TAN、HES 与 BSA 相互作用的双对数曲线; a~g: $c(\text{BSA})=1.0 \mu\text{mol/L}$, $c(\text{NOB})=0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.7(\times 10^{-5} \text{ mol/L})$, $c(\text{TAN})=0, 0.27, 0.54, 1.1, 1.6, 2.1, 2.7(\times 10^{-5} \text{ mol/L})$, $c(\text{HES})=0, 0.32, 0.65, 1.0, 1.3, 1.6, 2.5(\times 10^{-5} \text{ mol/L})$ 。

的淬灭过程为静态淬灭。

不同浓度 NOB、TAN 和 HES 与 BSA 相互作用的 Stern-Volmer 曲线呈线性关系(图 8), 结果显示三类黄酮化合物对 BSA 的双分子淬灭速率常数 (K_q) 远高于各类淬灭剂对生物大分子的最大扩散淬灭常数 ($2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), 表明类黄酮和 BSA 的结合涉及单一淬灭机制, 且静态淬灭可能是主要的淬灭方式^[45]。结合常数 K_a 和结合位点数 n 也是研究小分子和蛋白质相互作用中常用的定量依据, 结果如表 2 所示。TAN 和 HES 与 BSA 的结合位点数 n 接近于 1, 表明 BSA 对这两种类黄酮有一类结合位

表 2 BSA 与类黄酮相互作用的淬灭常数、结合常数及结合位点数

Table 2 Quenching constants, binding constants and number of binding sites of BSA interaction with flavonoids

反应体系	K_{sv} ($\times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$)	K_q ($\times 10^{13} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	n	K_a ($\times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$)
BSA+NOB	0.185	0.185	1.8359	933.25
BSA+TAN	0.432	0.432	1.2195	4.6773
BSA+HES	0.306	0.306	1.1221	1.0715

点, 而 NOB 得到的 n 接近 2, BSA 对川陈皮素可能存在两类结合位点。 K_a 是评价蛋白质和配体分子间结合亲和力的重要参数, BSA 对不同类黄酮化合物的结合亲和力不同。BSA-NOB/TAN/HES 的 K_a 范围在 $10^5 \sim 10^7 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 表明蛋白与配体小分子之间存在较强的结合力^[47]。

2.7 类黄酮化合物对 BSA 构象的影响

BSA 中含有的芳香族氨基酸使其具有内源性荧光, 当波长为 $285 \pm 5.0 \text{ nm}$ 时, BSA 中的酪氨酸 (TYR) 和色氨酸 (TRP) 残基贡献出大部分的荧光发射, 其中 TRP 残基的贡献大约是 TYR 残基的 10 倍以上^[48]。同步荧光光谱可反映出配体对蛋白质构象的影响, 提供分子微环境信息^[49]。当波长间隔 ($\Delta\lambda$) 为 15 nm 和 60 nm 时, 分别可以得到 TYR 和 TRP 残基的特征信息, 最大发射波长的变化揭示 TYR 或 TRP 残基周围极性微环境的变化^[50]。由图 9 可知, NOB、TAN 和 HES 使 BSA 的 TYR 和 TRP 残基均发生荧光淬灭, 并且最大特征荧光峰呈现轻微蓝移, 表明类黄酮化合物的加入改变了 BSA 上的 TYR 和 TRP 残基周围极性微环境。比较 BSA 和三类黄

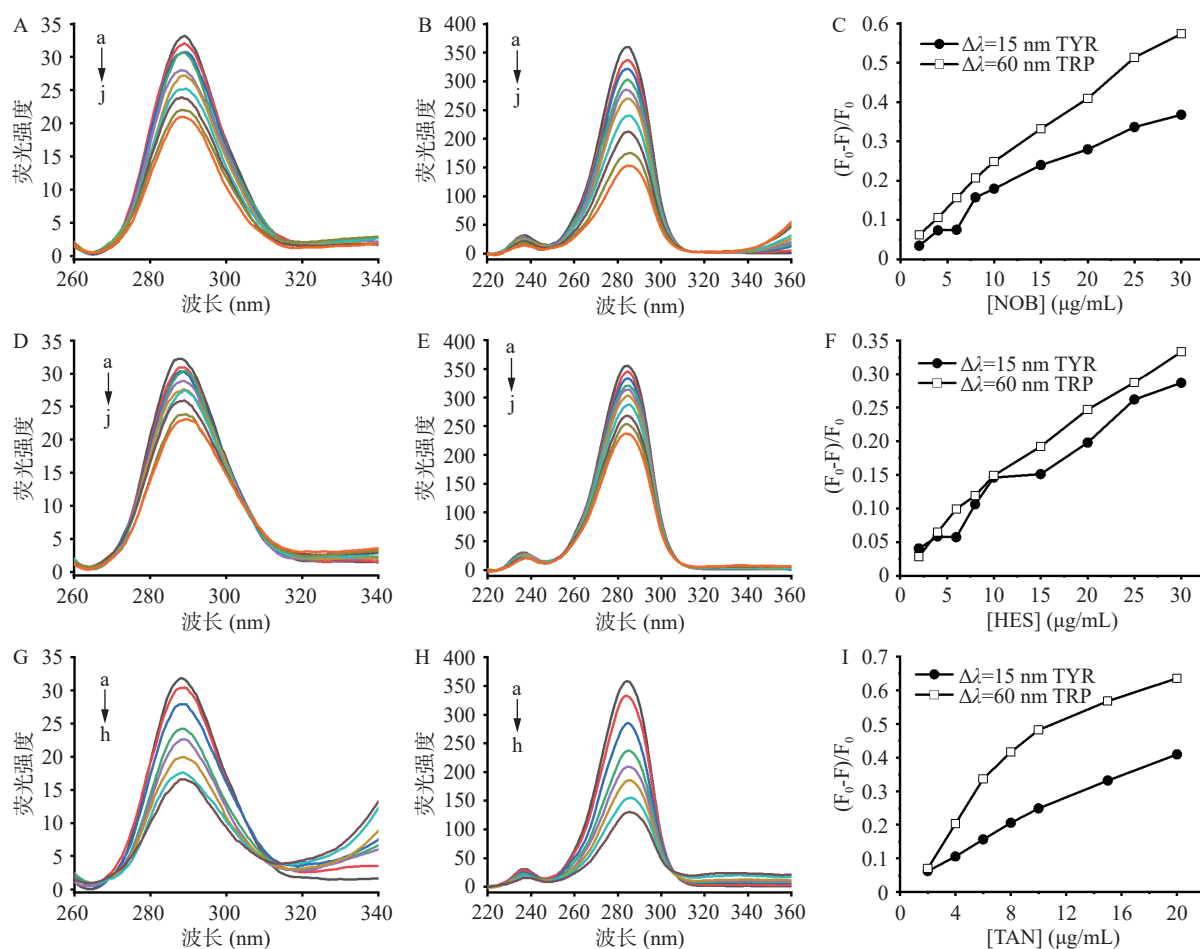


图 9 不同浓度茶枝柑类黄酮化合物与 BSA 的同步荧光光谱

Fig.9 Synchronous fluorescence spectra of BSA with different concentrations of *Citrus reticulata* 'Chachi' flavonoids

注: A.NOB, D.HES, G.TAN, $\Delta\lambda=15$ nm; B.NOB, E.HES, H.TAN, $\Delta\lambda=60$ nm; a→j: c(NOBS/HES/TAN)=0、2、4、6、8、10、15、20、25、30 $\mu\text{g/mL}$ 。

酮在不同扫描间隔($\Delta\lambda$)下的同步荧光特性后发现,随着类黄酮化合物浓度的增加,BSA 的荧光强度有规律地降低。

通过比较三类黄酮化合物对蛋白的同步荧光猝灭比,揭示不同类黄酮化合物对 TRP 和 TYR 残基的影响。随着 NOB 浓度的增加,TRP 残基的荧光强度下降 40.93%,比 TYR 残基的荧光强度下降(27.94%)更为显著;同样浓度的 TAN 则降低了 TRP 残基(63.59%)和 TYR 残基(47.83%)的荧光强度;HES 降低了 TRP 残基(24.71%)和 TYR 残基(19.80%)的荧光强度,表明 TRP 残基对相互作用的贡献大于 TYR 残基,推测 TRP 残基应比 TYR 残基更靠近结合位点,而三类黄酮化合物具有相似的荧光猝灭,说明茶枝柑类黄酮化合物可通过与 BSA 的 TRP 残基和 TYR 残基结合而影响其构象。

2.8 分子对接分析类黄酮化合物与 BSA 相互作用机理

三类黄酮化合物均可与 BSA 相互作用,表明其可能通过竞争糖基化位点和改变蛋白质构象抑制 AGEs 生成。因此,通过计算机分子对接更直观地识别和可视化类黄酮化合物与 BSA 的结合位点和相

互作用方式^[51]。三类黄酮化合物与 BSA 的结合位点和作用方式如图 10 所示,三类黄酮化合物与 BSA 的相互作用位点位于蛋白质分子亚结构域 II A 与 III A 之间的疏水空腔内。NOB 能与 BSA 的 ARG-194、TRP-213、ARG-217、LYS-294、SER-343 和 SER-453 残基形成氢键,与 BSA 的 ALA-341、VAL-342 和 ASP-450 残基存在疏水相互作用。TAN 能与 TRP-213、ARG-217、LYS-294、VAL-342 和 ARG-198 残基形成氢键,也与 TRP-213、VAL-342 和 ASP-450 残基之间存在疏水相互作用。同样, HES 与 BSA 的 SER-453、ARG-217、ARG-198、ARG-194 和 VAL-342 残基形成氢键,与 BSA 的 TRP-213 和 VAL-342 残基存在疏水相互作用,并且 ARG-194、ARG-198 和 ARG-217 与 HES 分子之间形成盐桥。

氢键加强了类黄酮小分子化合物与 BSA 之间的非共价作用力,疏水相互作用可减少结合过程中水的介入,均有助于两者结合为稳定的复合物。三类黄酮化合物均可与 BSA 上的 TRP-213 存在一种作用力,证明了 2.7 中提到的 BSA 中 TRP 残基更靠近结合位点并形成稳固的结合,因此降低了 TRP 残基

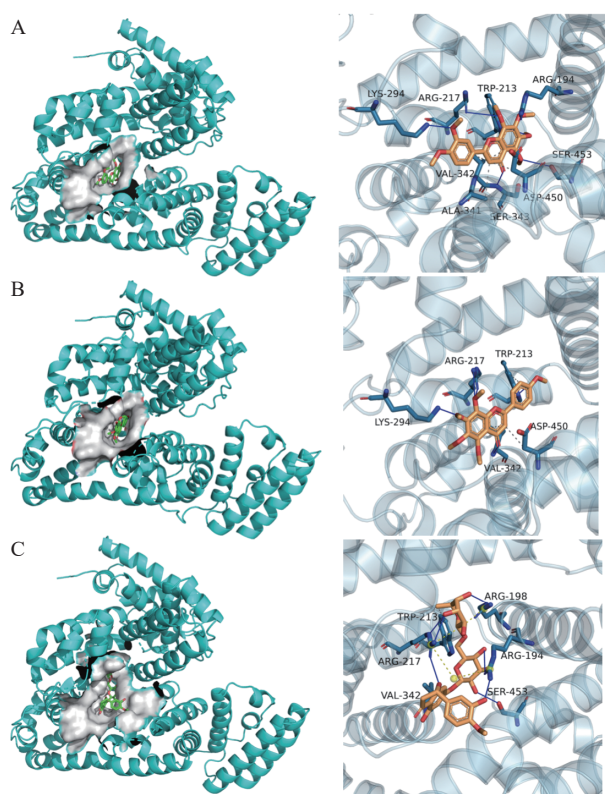


图 10 BSA 与 NOB(A)、TAN(B)及 HES(C)的分子对接图

Fig.10 Molecular docking simulation diagrams of BSA with NOB (A), TAN (B), and HES (C)

的荧光强度。研究表明,赖氨酸、精氨酸和半胱氨酸残基具有较高的亲核活性,是蛋白质糖化的主要位点^[52]。Sobhy 等^[41]发现黑芥子苷、亚麻酸和异香草酸可通过与 BSA 的 ARG 194、ARG 185、ARG 198、ARG 217、LYS 190、LYS 434 和 LYS 350 残基结合抑制 AGEs 的形成。而三类黄酮化合物在与 BSA 相互作用过程中均存在不同程度地封闭精氨酸(ARG)与赖氨酸(LYS)并阻断葡萄糖与这些活性位点发生反应,故能在一定程度抑制 AGEs 生成。

3 结论

考虑到陈皮在制作和陈化过程中,自身会积累一定的 AGEs,可能干扰体系中 AGEs 的测定,因此本研究选用茶枝柑鲜果为材料。结果表明,茶枝柑果皮提取物及其主要成分橙皮苷、川陈皮素和橘皮素能明显抑制 BSA-Glu 体系中荧光性 AGEs 和蛋白糖氧化产物的形成。茶枝柑类黄酮可以与 BSA 相互作用并静态猝灭 BSA 的内源荧光,两者的结合导致 BSA 轻微的构象和微环境变化。分子对接分析显示,类黄酮化合物可结合到 BSA 的疏水空腔并与 BSA 的 ARG-194、TRP-213、ARG-217、LYS-294、VAL-342 和 ARG-198 等残基相互作用。总之,茶枝柑果皮中川陈皮素、橘皮素、橙皮苷可以通过减少精氨酸、赖氨酸残基与还原糖的结合,阻断部分糖基化位点来保护 BSA 免受糖基化。

茶枝柑果皮药食同源,在广东地区也常用作食品调味剂,但目前有关茶枝柑类黄酮功能活性和药理

作用的研究较为深入,在食品加工中的应用研究较少。本研究揭示了茶枝柑类黄酮抑制 AGEs 的作用机制,为陈皮入膳提供科学依据,为茶枝柑类黄酮 AGEs 抑制剂的开发奠定了理论基础。但本研究采用 BSA-Glu 化学体系,无法还原真实食品加工过程中的复杂变化,后续可进一步在食品体系中研究茶枝柑对 AGEs 的抑制作用,并揭示其对于食品香气、风味和质构的影响,开发出用于食品加工的茶枝柑抗糖化产品。

© The Author(s) 2025. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China(中华人民共和国药典)[S]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 199.
- [2] 裴昆,夏放高,陈海芳,等. 陈皮、化橘红和枳壳研究概况[J]. 江西中医药, 2015, 46(4): 71-74. [PEI K, XIA F G, CHEN H F, et al. Research situation of *Pericarpium citri reticulatae*, *Citrus grandis* Tomentosa and *Fructus aurantii*[J]. Jiangxi Traditional Chinese Medicine, 2015, 46(4): 71-74.]
- [3] 温宝莹,韩雪,张秀权,等. 广陈皮黄酮类主成分分析及其代谢转化研究[J]. 药学报, 2023, 58(1): 193-200. [WEN B Y, HAN X, ZHANG X Q, et al. Content assay and metabolic study of flavonoids from *Citrus reticulata* 'Chachi'[J]. Journal of Pharmacy, 2023, 58(1): 193-200.]
- [4] 赖昌林,吴鸿,倪根金. 中药广陈皮与新会皮药名出现年代考[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(4): 789-794. [LAI C L, WU H, NI G J. Tradisional Chinese medicine *Pericarpium citri reticulatae* from Guangdong and Xinhui textual criticism[J]. Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine, 2017, 42(4): 789-794.]
- [5] 林林. 陈皮总黄酮、橙皮苷和挥发油的动态分析研究[D]. 广州: 广东药学院, 2009. [LIN L. Study on dynamic state analysis of the total flavone, the hesperidin and the volatile oil for *Pericarpium citri reticulatae*[D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University, 2009.]
- [6] 陈玉婷,傅曼琴,吴继军,等. 不同生长时期茶枝柑果实品质分析[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(10): 251-258. [CHEN Y T, FU M J, WU J J, et al. Analysis of *Citrus reticulata* 'Chachi' quality during different growth periods[J]. Food and Fermentation Industry, 2023, 49(10): 251-258.]
- [7] 李昕琪. 茶枝柑果实生长发育过程中主要次生代谢物变化规律分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2023. [LI X Q. Study on the change regularity of primary secondary metabolites in *Citrus reticulata* 'Chachi'[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2023.]
- [8] LIANG P L, CHEN X L, GONG M J, et al. Guang Chen Pi (the pericarp of *Citrus reticulata* Blanco's cultivars 'Chachi') inhibits macrophage-derived foam cell formation[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2022, 293: 115328.
- [9] LIANG S, ZHANG J, LIU Y, et al. Study on flavonoids and bioactivity features of pericarp of *Citrus reticulata* 'Chachi' at different harvest periods[J]. *Plants*, 2022, 11: 3390.
- [10] YANG W L, LIANG Y Y, LIU Y J, et al. The molecular mechanism for inhibiting the growth of nasopharyngeal carcinoma

cells using polymethoxyflavonoids purified from pericarp of *Citrus reticulata* ‘Chachi’ via HSCCC[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2023, 14: 2023.

[11] GAO Z, WANG Z Y, GUO Y, et al. Enrichment of polymethoxyflavones from *Citrus reticulata* ‘Chachi’ peels and their hypolipidemic effect[J]. *Journal of Chromatography B*, 2019, 1124: 226–232.

[12] 于海飞. 类黄酮—蛋白质复合体系的制备、表征及应用[D]. 南昌: 南昌大学, 2023. [YU H F. Preparation, characterization and application of flavonoid-protein complex system[D]. Nanchang: Nanchang University, 2023.]

[13] 叶倩. 黄酮醇影响饼干中丙烯酰胺、羟甲基糠醛形成的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2023. [YE Q. Effect of flavonols on the formation of acrylamide and hydroxymethylfurfural in biscuit[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2023.]

[14] 滕静. 典型黄酮在热加工中的变化及其对 AGEs 形成和毒性的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2020. [TENG J. The changes of representative flavonoids during thermal processing and their impacts on formation and toxicity of AGEs[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020.]

[15] HELLWIG M, HUMPF H U, HENGSTLER J, et al. Quality criteria for studies on dietary glycation compounds and human health[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(41): 11307–11311.

[16] SHARMA C, KAUR A, THIND S S, et al. Advanced glycation end-products(AGEs): An emerging concern for processed food industries[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2015, 52(12): 7561–7576.

[17] TESSIER F J, The Maillard reaction in the human body. The main discoveries and factors that affect glycation[J]. *Pathologie Biologie*, 2010, 58(3): 214–219.

[18] JIA G H, HILL M A, SOWERS J R. Diabetic cardiomyopathy: an update of mechanisms contributing to this clinical entity[J]. *Circulation Research*, 2018, 122(4): 624–638.

[19] SIFUENTES FRANCO S, PADILLA TEJEDA D E, CARRILLOIBARRA S, et al. Oxidative stress, apoptosis, and mitochondrial function in diabetic nephropathy[J]. *International Journal of Endocrinology*, 2018, 2018: 1–13.

[20] GOLDRING M B, OTERO M. Inflammation in osteoarthritis[J]. *Current Opinion in Rheumatology*, 2011, 23(5): 471–478.

[21] LUEVANO CONTRERAS C, GARAY SEVILLA M E, CHAPMANNOVAKOFSKI K. Role of dietary advanced glycation end products in diabetes mellitus[J]. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 2013, 18(1): 50–66.

[22] KOCADAGLI T, ZILIC S, TAS N G, et al. Formation of a-dicarbonyl compounds in cookies made from wheat, hull-less barley and colored corn and its relation with phenolic compounds, free amino acids and sugars[J]. *European Food Research and Technology*, 2015, 242(1): 51–60.

[23] SYLWIA M S, ALEKSANDER S, ARTUR S, et al. Phenolic compounds reduce formation of N ϵ -(carboxymethyl)lysine and pyrazines formed by Maillard reactions in a model bread system[J]. *Food Chemistry*, 2017, 231: 175–184.

[24] ZHANG J, ZHANG L Y, LAI C L, et al. Nutraceutical potential of navel orange peel in diabetes management: The chemical profile, antioxidant, α -glucosidase inhibitory and antiglycation effects of its flavonoids[J]. *Food Bioscience*, 2022, 49: 101943.

[25] UPADHYAY A, TUENTER E, AMIN A, et al. 5-O-Demethylnobiletin, a polymethoxylated flavonoid, from *Citrus de-*

pressa Hayata peel prevents protein glycation[J]. *Journal of Functional Foods*, 2014, 11: 243–249.

[26] ZHENG G D, CHAO Y X, LIU M S, et al. Evaluation of dynamic changes in the bioactive components in Citri Reticulatae Pericarpium (*Citrus reticulata* ‘Chachi’) under different harvesting and drying conditions[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2021, 101(8): 3280–3289.

[27] 王中宛, 郑晓燕, 艾斌凌, 等. 亲水胶体对海绵蛋糕中晚期糖基化终末产物的抑制作用[J]. *食品科学*, 2022, 43(20): 34–43.

[WANG S W, ZHENG X Y, AI B L, et al. Inhibitory effects of hydrocolloids on the formation of advanced glycation end products in sponge cakes[J]. *Journal of Food Science*, 2022, 43(20): 34–43.]

[28] ZHAO L H, ZHAO H Z, ZHAO X, et al. Simultaneous quantification of seven bioactive flavonoids in citri reticulatae pericarpium by ultra-fast liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry[J]. *Phytochemical Analysis*, 2016, 27(3-4): 168–173.

[29] 王光宁, 谢思敏, 戴依婷. 广陈皮陈化过程中主要成分的变化及美拉德褐变反应的初步研究[J]. 广州: 广东药科大学学报, 2023, 39(2): 73–81. [WANG G N, XIE S M, DAI Y T. Study on the change of compositions and Maillard browning reaction in Guang citri reticulatae pericarpium during ageing[J]. Guangzhou: Journal of Guangdong Pharmaceutical University, 2023, 39(2): 73–81.]

[30] BLASZCZAK W, JEZ M, SZWENGIEL A. Polyphenols and inhibitory effects of crude and purified extracts from tomato varieties on the formation of advanced glycation end products and the activity of angiotensin converting and acetylcholinesterase enzymes[J]. *Food Chemistry*, 2020, 314: 126181.

[31] ZHAO L, ZHU X L, YU Y, et al. Comprehensive analysis of the anti-glycation effect of peanut skin extract[J]. *Food Chemistry*, 2021, 362: 130169.

[32] EZE F N, TOLA A J. Protein glycation and oxidation inhibitory activity of *Centella asiatica* phenolics (CAP) in glucose-mediated bovine serum albumin glycooxidation[J]. *Food Chemistry*, 2020, 332: 127302.

[33] OU J Y, TENG J, HANI S E N, et al. Impact of resveratrol, epicatechin and rosmarinic acid on fluorescent AGEs and cytotoxicity of cookies[J]. *Journal of Functional Foods*, 2018, 40: 44–50.

[34] 翁婷. L-半胱氨酸盐酸盐对饼干感官品质和活泼羰基化合物的影响[D]. 广州: 暨南大学, 2022. [WENG T. Effect of L-cysteine hydrochloride on the sensory qualities and reactive carbonyl species in biscuits[D]. Guangzhou: Jinan University, 2022.]

[35] ZHAO L, JIN X E, LI Y B, et al. Effects of A-type oligomer procyanidins on protein glycation using two glycation models coupled with spectroscopy, chromatography, and molecular docking[J]. *Food Research International*, 2022, 155: 111068.

[36] SHI J H, PAN D Q, JIANG M, et al. *In vitro* study on binding interaction of quinapril with bovine serum albumin (BSA) using multi-spectroscopic and molecular docking methods[J]. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2017, 35: 2211–2223.

[37] 于湛, 张微, 吴迪, 等. 柚皮素、柚皮苷与牛血清白蛋白相互作用的机理分析[J]. 沈阳师范大学学报(自然科学版), 2023, 41(2): 108–113. [YU Z, ZHANG W, WU D, et al. Mechanistic analysis the binding interactions of naringenin and naringin with bovine serum albumin[J]. Journal of Shenyang Normal University (Natural Science Edition), 2023, 41(2): 108–113.]

[38] LUO Y, ZENG W, HUANG K E, et al. Discrimination of *Citrus reticulata* Blanco and *Citrus reticulata* ‘Chachi’ as well as the

- Citrus reticulata* 'Chachi' within different storage years using ultra high performance liquid chromatography quadrupole/time-of-flight mass spectrometry based metabolomics approach[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2019, 171: 218–231.
- [39] MAXIME B, TANIA N, MART T, et al. Identification and quantification of polymethoxylated flavonoids in different Citrus species using UPLC-QTOF-MS/MS and HPLC-DAD[J]. *Planta Medica*, 2021, 87(12/13): 1080–1088.
- [40] WANG P, ZHANG J, ZHANG Y T, et al. Chemical and genetic discrimination of commercial Guangchenpi (*Citrus reticulata* 'Chachi') by using UPLC-QTOF-MS/MS based metabolomics and DNA barcoding approaches[J]. *RSC Advances*, 2019, 9: 23373–23381.
- [41] SOBH Y R, ZHAN F, MEKAWI E, et al. The noncovalent conjugations of bovine serum albumin with three structurally different phytosterols exerted antiglycation effects: A study with AGEs-inhibition, multispectral, and docking investigations[J]. *Bioorganic Chemistry*, 2020, 94: 103478.
- [42] BANDYOPADHYAY P, GHOSH A K, GHOSH C. Recent developments on polyphenol-protein interactions: Effects on tea and coffee taste, antioxidant properties and the digestive system[J]. *Food & Function*, 2012, 3(6): 592–605.
- [43] ASHOKA S, SEETHARAMAPPA J, KANDAGAL P B. Investigation of the interaction between trazodone hydrochloride and bovine serum albumin[J]. *Journal of Luminescence*, 2006, 121(1): 179–186.
- [44] SHAO X, CHEN H, ZHU Y, et al. Essential structural requirements and additive effects for flavonoids to scavenge methylglyoxal[J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2014, 62(14): 3202–3210.
- [45] YUE Y, SUN Y, DONG Q, et al. Interaction of human serum albumin with novel imidazole derivatives studied by spectroscopy and molecular docking[J]. *Luminescence*, 2016, 31: 671–681.
- [46] 梁鑫富, 董庆亮. 光谱法结合分子对接技术研究柠檬苦素与牛血清白蛋白的相互作用[J]. *食品工业科技*, 2024, 45(21): 37–44. [LIANG X F, DONG Q L. Spectroscopic method combined with molecular docking technique to study the interaction of limonin with bovine serum albumin[J]. *Food Industry Science and Technology*, 2024, 45(21): 37–44.]
- [47] 杨雯雁, 马秀兰, 张宇. 荧光光谱法结合分子对接研究邻苯二甲酸单环己酯与牛血清白蛋白的相互作用[J]. *分析试验室*, 2023, 42(9): 1236–1241. [YANG W Y, MA X L, ZHANG Y. Intermolecular interactions between monocyclohexyl phthalate and bovine serum albumin[J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2023, 42(9): 1236–1241.]
- [48] SHI J H, LOU Y Y, ZHOU K L, et al. Elucidation of intermolecular interaction of bovine serum albumin with Fenhexamid: A biophysical prospect[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-biology*, 2018, 180: 125–133.
- [49] JIA J, GAO X, HAO M, et al. Comparison of binding interaction between beta-lactoglobulin and three common polyphenols using multi-spectroscopy and modeling methods[J]. *Food Chemistry*, 2017, 228: 143–151.
- [50] LIN H, LAN J F, GUAN M, et al. Spectroscopic investigation of interaction between mangiferin and bovine serum albumin[J]. *Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2009, 73(5): 936–941.
- [51] 王晓萌. 四种植物活性成分与血清蛋白相互作用机理研究[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2020. [WANG X M. The study of binding mechanism between four plant active ingredients of ecotope and serum albumin[D]. Hangzhou: Zhejiang Agriculture&Forestry University, 2020.]
- [52] HUMENY A, KISLINGER T, BECKER C M, et al. Qualitative determination of specific protein glycation products by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry peptide mapping[J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2002, 50(7): 2153–2160.