

## Über die antioxidative Aktivität von Zitrusfruchtschalen

G. Kroyer

Mitteilung aus dem Institut für Lebensmittelchemie und -technologie der Technischen Universität Wien

**Zusammenfassung:** Die antioxidativen Eigenschaften von gefriergetrockneten Schalen von Zitrusfrüchten (Orangen, Zitronen, Grapefruits) sowie von deren methanolischen Extrakten wurden untersucht. Gefriergetrocknete Orangenschalen zeigten die höchste, Zitronenschalen eine etwas geringere und Grapefruitschalen relativ die geringste, jedoch noch immer bemerkenswerte antioxidative Aktivität. Durch Herstellung eines methanolischen Extraktes konnte diese jeweils beachtlich verbessert werden. Vergleichende Untersuchungen und Autoxidations-tests mit den Flavanonglykosiden Hesperidin und Naringin sowie deren Aglykonen Hesperetin und Naringenin lassen erkennen, daß erstere größtenteils für die antioxidative Aktivität der Zitrusfruchtschalen bzw. -extrakte verantwortlich sind. Um eine den handelsüblichen natürlichen Antioxidantien  $\alpha$ -Tocopherol und Ascorbylpalmitat vergleichbare antioxidative Aktivität entfalten zu können, sollten die gefriergetrockneten Zitrusfruchtschalen bzw. deren methanolische Extrakte in erhöhter Einsatzmenge unter Berücksichtigung ihrer arttypischen Eigenschaften und komplexen natürlichen Zusammensetzung Anwendung finden. Weiter wurde der Zusammenhang zwischen der antioxidativen Aktivität und der Molekülstruktur der Flavanone diskutiert.

**Summary:** The antioxidant properties of freeze-dried citrus fruit peels (orange, lemon, grapefruit) and methanolic extracts from the peel were studied. Freeze-dried orange peel showed the highest, lemon peel somewhat less and grapefruit peel the lowest but still remarkable antioxidant activity. This could be significantly improved by preparing methanolic extracts of the peels. Comparative examinations and autoxidation studies with the flavanon glycosides hesperidin and naringin as well as with their aglycones hesperetin and naringenin showed that the former are mainly responsible for the antioxidant activity of the citrus peel and extracts. In order to compare their antioxidative activity with that of the commercially available natural antioxidants  $\alpha$ -tocopherol and ascorbylpalmitate, the freeze-dried citrus peels and their methanolic extracts should be used in higher concentrations, in consideration of their peculiar properties and complex natural composition. Furthermore, aspects of the correlation between antioxidant activity and molecular structure of the flavanones were discussed.

**Schlüsselwörter:** Zitrusfruchtschale, Antioxidationswirkung

### Einleitung

Öle, Fette und fetthaltige Lebensmittel unterliegen während ihrer Lagerung relativ rasch oxidativen Veränderungen, vor allem bei Einwirkung von Sauerstoff (Luft) und Wärme. Dieser autoxidative Verderb der Öle

und Fette ist ein komplexer Vorgang, bei dem zunächst aus ungesättigten Fettsäuren Peroxide und Hydroperoxide entstehen, wodurch ein Radikal-Kettenmechanismus eingeleitet wird und es demzufolge zur Bildung sekundärer Produkte, wie Alkohole, Aldehyde, Ketone, Epoxide, Carbonsäuren usw., kommt. Dem autoxidativen Verderb wird u. a. durch den Einsatz von Antioxidantien zu begegnen versucht. Vom ernährungsphysiologischen Standpunkt muß gewährleistet sein, daß hierbei nur physiologisch unbedenkliche Stoffe in Nahrungsfetten verwendet werden sollen. Weitverbreitete Anwendung finden heutzutage synthetisch hergestellte Stoffe, deren physiologische Unbedenklichkeit als erwiesen angesehen wird, jedoch sollte man auch bestrebt sein, aus natürlichen Ausgangsstoffen hergestellte Antioxidantien einzusetzen.

In jüngster Zeit beschäftigen sich einige Studien mit der antioxidativen Wirkung von Gewürzen und Kräutern (1-6) sowie den darin vorkommenden phenolischen Inhaltsstoffen. Über den Einsatz von in natürlichen Rohstoffen vorkommenden Polyhydroxy-Flavonoiden als antioxidativ wirksamen Zusatzstoffen zu Nahrungsfetten oder Ölen wird mehrfach berichtet (7-10). Dabei wurden vor allem Polyhydroxy-Flavone und -Flavanole hinsichtlich ihrer antioxidativen Wirkung untersucht. Dziedzic und Hudson (11) untersuchten synthetisch hergestellte Polyhydroxy-Chalcone und Flavanone. Die antioxidative Wirkung der Polyphenole beruht darauf, daß sie als Wasserstoffdonatoren die als Kettenreaktion ablaufende Autoxidation unterbrechen und dabei die als Träger der Reaktionskette fungierenden Radikale abfangen. Die Polyphenole selbst unterliegen dabei primär der Oxidation.

Schalen von Zitrusfrüchten, die bei der Produktion von Fruchtsäften anfallen, zeichnen sich durch einen hohen Gehalt an flavonoiden Substanzen aus (12) und können aus diesem Grunde eine allfällige antioxidative Wirkung ausüben.

In der vorliegenden Studie wurde die antioxidative Aktivität von pulverisierten gefriergetrockneten Schalen von Zitrusfrüchten (Orangen, Zitronen, Grapefruits) untersucht. Gleichfalls wurde ein methanolischer Extrakt hiervon getestet. In Ergänzung zu diesen Untersuchungen wurden die in den Zitrusfruchtschalen hauptsächlich vorkommenden Polyhydroxy-Flavanone Hesperidin und Naringin in glykosidischer Form sowie auch die Aglykone Hesperetin und Naringenin den Autoxidationstests unterworfen. Ein Vergleich mit den handelsüblichen natürlichen Antioxidantien  $\alpha$ -Tocopherol sowie Ascorbylpalmitat wurde hergestellt.

## Material und Methodik

Zur Untersuchung gelangten:

- die pulverisierten gefriergetrockneten Schalen von  
Orangen (*Citrus sinensis*)  
Zitronen (*Citrus medica*)  
Grapefruit (*Citrus paradisi*)
- methanolische Extrakte gefriergetrockneter Zitrusfruchtschalen
- die in Zitrusfrüchten hauptsächlich vorkommenden Flavanonglykoside Hesperidin und Naringin sowie deren Aglykone Hesperetin und Naringenin (Standardsubstanzen)

– die handelsüblichen natürlichen Antioxidanten  $\alpha$ -Tocopherol und Ascorbylpalmitat

Herstellung der gefriergetrockneten Zitrusfruchtschalen: Um eine schonende Pulverisierung der Zitrusfruchtschalen zu gewährleisten und um Verluste an Inhaltsstoffen und wirksamen Substanzen weitgehend zu vermeiden, wurden die frischen Schalen zuerst gefriergetrocknet und anschließend pulverisiert: Frische, mit keinerlei Zusatzstoffen behandelte Schalen (Albedo und Flavedo) von Orangen (*Citrus sinensis*), Zitronen (*Citrus medica*) und Grapefruits (*Citrus paradisi*) wurden fein zerkleinert und bei  $5 \cdot 10^{-1}$  Torr 24 h lang gefriergetrocknet (Lyovac GT, Fa. Leybold Heraeus). Die gefriergetrockneten Schalen wurden pulverisiert und sofort bzw. nach 3 Monaten Lagerung bei Raumtemperatur zum Test eingesetzt.

Herstellung eines methanolischen Extraktes der gefriergetrockneten Zitrusfruchtschalen: Die pulverisierten gefriergetrockneten Schalen der Zitrusfrüchte wurden in der fünffachen Menge Methanol gelöst, kurz aufgeköcht, und 2 h lang bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Abfiltrieren des unlöslichen Rückstandes wurde das Filtrat zur Trockene eingengt (40 °C, Vakuum) und der Rückstand anschließend für die Tests eingesetzt.

Bestimmung der antioxidativen Aktivität: Als Maß für die antioxidative Aktivität diente die Bestimmung der zeitlichen Zunahme der Peroxidzahl von Schweineschmalz mit den diversen Zusätzen bei einer bestimmten Temperatur (Schalentest). Zur Untersuchung wurde frisch hergestelltes Schweineschmalz, frei von Zusätzen, mit folgenden Kennzahlen verwendet: Säurezahl 0,9; Veresterungszahl 195; Jodzahl 60,4; Peroxidzahl 0,9; Ölsäuregehalt 41,7 %; Linolsäuregehalt 4,4 %; Linolensäuregehalt 0,3 %. Die pulverisierten, gefriergetrockneten Zitrusfruchtschalen bzw. die methanolischen Extrakte wurden in einer Konzentration von 200 mg/20 g Schweineschmalz, die phenolischen Standardsubstanzen sowie die handelsüblichen natürlichen Antioxidantien in einer Konzentration von 20 mg/20 g Schweineschmalz eingesetzt. Die mit den diversen Zusätzen versetzten Schweineschmalzproben wurden zusammen mit reinem unversetztem Schweineschmalz in Petrischalen in dünner Schicht offen im Dunkeln bei 60 °C gelagert. Nach bestimmten Zeiten wurde von den Proben die Peroxidzahl nach Wheeler (13) bestimmt. Jeder einzelne Lagerversuch wurde dreifach durchgeführt, und jede Bestimmung erfolgte als Doppelbestimmung, wobei sich bei den Meßwerten keine signifikanten Unterschiede ergaben. Die gemittelten Meßwerte wurden tabelliert.

Dünnschichtchromatographische Analyse der Flavanone in den Zitrusfruchtschalen: Der Gehalt an den Flavanonglykosiden Hesperidin und Naringin sowie der Aglykone Hesperetin und Naringenin wurde dünnschichtchromatographisch bestimmt: Sorptionsschicht: Kieselgel G F<sup>254</sup>. Laufmittel: a) Ethylacetat: Ethylmethylethylketon: Ameisensäure: Wasser (50:30:10:10) (Hesperetin, Naringenin) b) Toluol: Chloroform: Aceton (40:25:35) (Hesperidin, Naringin). Auswertung: Messung der Fluoreszenzlösung mittels eines Dünnschichtspektralphotometers (Scanner) bei  $\lambda = 254$  nm.

## Ergebnisse und Diskussion

Die Gefriertrocknung von Zitrusfruchtschalen bietet die Möglichkeit, auf schonende Weise ein lagerungsfähiges Produkt zu erhalten, in dem sämtliche Inhaltsstoffe weitgehend in ihrer ursprünglichen Form und Menge erhalten bleiben. Die hier beschriebenen Untersuchungen wurden unmittelbar nach Herstellung des Produkts (Gefriertrocknung) durchgeführt. Analoge Untersuchungen und Tests wurden mit den drei Monate lang bei Raumtemperatur gelagerten Produkten wiederholt, wobei praktisch die gleichen Resultate erhalten wurden.

In Tabelle 1 sind die Ausbeuten bei der Gefriertrocknung von Zitrusfruchtschalen angeführt.

Die Messung der zeitlichen Zunahme der Peroxidzahlen von Schweineschmalz mit den diversen Zusätzen stellt ein rasches und einfaches standardisiertes Verfahren dar, antioxidative Aktivitäten der Zusätze zu messen und zu vergleichen. In Tabelle 2 ist der Einfluß der untersuchten Substanzen auf die Peroxidzahl nach Wheeler als Maß für deren antioxidogene Wirkung verzeichnet. Die gefriergetrockneten Zitrusfruchtschalen zeigen unterschiedliche, jedoch bemerkenswerte antioxidative Aktivitäten. Gefriergetrocknete pulverisierte Schalen von Orangen zeigen die höchste antioxidative Wirksamkeit, Zitronenschalen eine etwas geringere und Grapefruitschalen vergleichsweise die geringste, jedoch noch immer nachweisbare Aktivität. Eine weitere Verbesserung der antioxidativen Aktivität konnte durch Herstellung eines methanolischen Extraktes aus den gefriergetrockneten Zitrusfruchtschalen erzielt werden. Bei einem alkohollöslichen Anteil von ca. 50–60 % der gefriergetrockneten Schalen (Tab. 1) wurde dadurch eine Konzentrierung antioxidativ wirksamer Inhaltsstoffe erzielt, resultierend in einem vergleichsweise erhöhten Schutz von Lipiden vor Oxidation. Wie aus den Untersuchungen mit gefriergetrockneten Zitrusfruchtschalen zu erwarten, zeigt der methanolische Extrakt von gefriergetrockneten Orangenschalen die höchste antioxidative Aktivität, verglichen mit dem Zitronen- bzw. Grapefruitextrakt, bei denen auch eine beachtliche Aktivitätssteigerung infolge der Aufarbeitung festgestellt werden kann (Tab. 2).

Flavonoide Substanzen kommen in relativ hoher Konzentration und in angereicherter Form im Albedo von Zitrusfruchtschalen vor (14). Die festgestellte antioxidative Aktivität von Zitrusfruchtschalen scheint zum Großteil auf flavonoide Substanzen zurückzuführen zu sein, deren antioxidative Eigenschaften mehrfach in der Literatur beschrieben werden (7–10). Orangen und Zitronen besitzen als flavonoiden Inhaltsstoff hauptsächlich das Flavanonglykosid Hesperidin (Hesperetin-7-rutinosid), Grapefruits hingegen das Flavanonglykosid Naringin (Naringenin-7-neohesperidosid), die bis zu 90 % in der Schale vorkommen (15). In Tabelle 3 ist der durch dünnschichtchromatographische Analyse bestimmte Gehalt der gefriergetrockneten Zitrusfruchtschalen bzw. des methanolischen Extraktes an den Flavanonglykosiden verzeichnet.

Unter Berücksichtigung der Konzentrationsverhältnisse der Flavanonglykoside in den gefriergetrockneten Zitrusfruchtschalen bzw. in deren

Tab. 1. Trockensubstanz der Fruchtschalen nach Gefriertrocknung sowie methanollöslicher Anteil der gefriergetrockneten Fruchtschalen.

Fruchtschalen	Trockensubstanz nach Gefriertrocknung (%)	Methanollöslicher Anteil (%) der gefriergetrockneten Fruchtschalen
Orangen	24,4	55,4
Zitronen	23,3	53,2
Grapefruits	23,1	61,5

Tab. 2. Der Einfluß der untersuchten Zusätze zu frischem Schweineschmalz auf die Peroxidzahl nach Wheeler bei Lagerung bei 60 °C. Zitrusfruchtschalen und -extrakte: 200 mg/20 g Flavanone,  $\alpha$ -Tocopherol, Ascorbylpalmitat: 20 mg/20 g.

Zusatz	Peroxidzahl nach Lagerung (h)						
	12	24	36	48	72	96	120
ohne Zusatz	1,6	3,5	7,8	47,2	182,5		
Orangenschalen	1,2	1,6	2,0	2,4	3,5	10,9	116,6
Zitronenschalen	1,3	1,8	2,3	3,3	5,0	76,5	202,8
Grapefruitschalen	1,3	1,9	2,5	5,2	17,0	131,2	
Orangen-Extrakt	1,2	1,6	2,0	2,5	2,6	6,5	94,0
Zitronen-Extrakt	1,3	1,7	2,0	2,8	4,3	11,1	110,1
Grapefruit-Extrakt	1,3	1,7	2,2	3,0	5,2	15,2	124,5
Hesperidin	1,4	1,8	2,5	3,5	13,5	110,1	
Hesperetin	1,3	1,8	2,3	3,2	7,2	107,8	
Naringin	1,4	1,9	2,5	6,3	18,3	149,0	
Naringenin	1,4	1,8	2,4	5,1	15,1	123,5	
$\alpha$ -Tocopherol	1,2	1,6	2,1	2,6	3,9	17,9	153,2
Ascorbylpalmitat	1,2	1,8	2,2	2,5	4,3	22,7	148,7

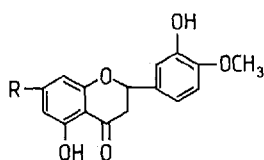
methanolischen Extrakten wurde zweckmäßigerweise in weiteren Autoxidationsversuchen der Einfluß eines 0,1%igen Zusatzes von Hesperidin und Naringin sowie auch deren Aglykone Hesperetin und Naringenin auf den zeitlichen Verlauf der POZ-Zunahme von Schweineschmalz getestet. Wie aus Tabelle 2 zu entnehmen ist, zeigen sämtliche Reinsubstanzen bemerkenswerte antioxidative Aktivität. Hesperidin bzw. Hesperetin weisen größere antioxidative Aktivität als Naringin bzw. Naringenin auf, wodurch die bessere Wirksamkeit von Orangen- und Zitronenschalen gegenüber den Naringin enthaltenden Grapefruitschalen erklärt werden kann. Weiter weisen die Flavanone in glykosidischer Form eine etwas verminderte antioxidative Wirksamkeit auf.

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse bei den Flavanonen und Flavanonglykosiden lassen einen engen Zusammenhang zwischen der antioxidativen Aktivität und der Molekülstruktur erkennen. Die antioxi-

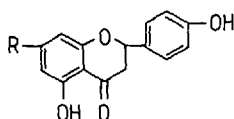
Tab. 3. Gehalt der gefriergetrockneten Zitrusfruchtschalen bzw. deren Extrakte an Flavanonglykoside.

Schalen	Gehalt an Flavanonglykoside (g/100 g)	
	Hesperidin	Naringin
Orangen, gefriergetrocknet	5,9	Spuren (< 0,1)
Zitronen, gefriergetrocknet	5,4	—
Grapefruits, gefriergetrocknet	—	6,7
Orangen, Extrakt	8,9	Spuren (< 0,1)
Zitronen, Extrakt	8,3	—
Grapefruits, Extrakt	—	10,0

dativen Eigenschaften der Flavanone beruhen auf ihrem Gehalt an Hydroxylgruppen, die als Wasserstoffdonatoren die als Kettenreaktion ablaufende Autoxidation unterbrechen und dabei die als Träger der Reaktionskette fungierenden Radikale abfangen (primäre Antioxidantien). Hesperetin und Naringenin besitzen je 3 OH-Gruppen in 3', 5,7-Stellung bzw. 4', 5,7-Stellung, wohingegen bei Hesperidin und Naringin die 7-OH-Gruppe glykosidisch an Rhamnosyl-glucose gebunden ist, wodurch ein wirksames, antioxidatives Moment fehlt und somit die Flavanonglykoside auch schwächer antioxidativ wirksam sind. Hesperetin bzw. Hesperidin besitzen im Vergleich zu Naringenin bzw. Naringin eine zusätzliche Methoxygruppe in 4'-Stellung, die als inerte funktionelle Gruppe die benachbarte 3'-OH-Gruppe in der Weise beeinflusst, daß eine erhöhte antioxidative Aktivität resultiert. Dies konnte durch die vorliegenden Untersuchungen bestätigt werden und wurde auch bereits von Dziedzic und Hudson (16) bei der Untersuchung der antioxidativen Eigenschaften von phenolischen Säuren festgestellt. Ebenso scheint die 4-CO-Gruppe der Flavanone von großer Bedeutung für die antioxidative Aktivität zu sein, vor allem im Hinblick auf die Inhibierung einer schwermetallkatalysierten Autoxidation, indem prooxidativ wirkende Schwermetalle durch Bildung eines Enolat-Innerkomplexes durch die 4-CO- und 5-OH-Gruppe gebunden werden.



Hesperetin: R = OH  
Hesperidin: R = Rutinose



Naringenin: R = OH  
Naringin: R = Neohesperidose

Von besonderem Interesse erscheint der Vergleich mit handelsüblichen Antioxidantien, insbesondere mit denen natürlichen Ursprungs. Vergleichende Untersuchungen wurden mit Ascorbylpalmitat und  $\alpha$ -Tocopherol in anwendungsüblichen Konzentrationen (0,1 %) durchgeführt. Die Autoxidationstests ergaben, daß diese zwar den Flavanonglykosiden (Aglykone) in vergleichbaren Konzentrationen (0,1 %) in ihren antioxidativen Eigenschaften überlegen sind, jedoch das aus Orangenschalen hergestellte gefriergetrocknete Pulver sowie sämtliche methanolischen Extrakte aus den Zitrusfruchtschalen ähnliche, oft sogar höhere antioxidative Aktivität aufweisen, wenngleich letztere vergleichsweise in 10facher Konzentration (1 %) eingesetzt wurden; eine erhöhte Einsatzmenge erscheint jedoch insofern gerechtfertigt, da es sich hierbei um weitgehend natürliches biologisches Material mit komplexer Zusammensetzung handelt. Auch sei in diesem Zusammenhang darauf hingewiesen, daß beim praktischen Einsatz der beschriebenen gefriergetrockneten Produkte bzw. Extrakte als Antioxidantien dem Lebensmittel zugleich die den Zitrusfrüchten arttypischen Farb-, Aroma- und Geschmackskomponenten beigegeben werden, wodurch die aus natürlichen Rohstoffen gewonnenen Zusatzstoffe in mehrfacher Hinsicht wirksam sind.

Die durchgeführten vergleichenden Untersuchungen zur antioxidativen Aktivität lassen demnach erkennen, daß die Wirksamkeit der gefriergetrockneten Zitrusfruchtschalen bzw. deren methanolischen Extrakte hauptsächlich auf flavonoide Komponenten zurückzuführen sind, jedoch scheinen noch weitere Inhaltsstoffe entweder als primäre Antioxidantien oder wahrscheinlicher als Synergisten für die hohe antioxidative Aktivität verantwortlich zu sein. So ist bekannt, daß die auch in Zitrusfruchtschalen in geringer Menge vorkommenden organischen Säuren wie Zitronen-, Malein- oder Ascorbinsäure antioxidative Eigenschaften vor allem als Synergisten aufweisen (17).

#### *Literatur*

1. Chipault JR, Mizuno GR, Lundberg WO (1956) Food Technol 10:209
2. Chipault JR (1957) Food Eng 29:134
3. Bishov SJ, Masuoka Y, Kapsalis JG (1977) J Food Proc & Pres 1:153
4. Lea CH, Swoboda PAT (1957) Chem & Ind, Aug, 1073
5. Pratt DC, Watts BM (1974) Food Sci 29:27
6. Hirahara F, Takai Y, Iwau H (1974) The Japanese J of Nutr 32:1
7. Hudson BJB, Lewis JI (1983) Food Chem 10:47
8. Herrmann K (1976) J Food Technol 11:433
9. Hudson BJB, Mahgoub SEO (1980) J Sci Food Agric 31:646
10. Hudson BJB, Mahgoub SEO (1981) J Sci Food Agric 32:208
11. Dziedzic SZ, Hudson BJB (1983) Food Chem 12:205
12. Cohen E, Sharon R, Volman L, Hoenig R, Saguy I (1984) J Food Sci 49:987
13. Wheeler DH (1932) Oil and Soap 9:89
14. Albrigo LG, Carter RD (1977) Citrus Science and Technology, Vol 1, Ch 2, Avi Publishing Co, Westport CT
15. Kefford JF (1959) Advanc Food Res 9:285
16. Dziedzic SZ, Hudson BJB (1984) Food Chem 14:45
17. Chipault JR (1962) Autoxidation and Antioxidants Vol 2, Ch 12, Interscience Publishers, New York

Eingegangen am 20. Januar 1986

#### *Anschrift des Verfassers:*

Dr. Gerhard Kroyer, Institut für Lebensmittelchemie und -technologie der Technischen Universität, Getreidemarkt 9, A-1060 Wien, Austria