

文章编号:1673-1689(2010)01-0077-04

# 山楂叶和果中类 SOD 的提取与研究

张兰杰, 辛广, 杨琳

(鞍山师范学院 化学系, 辽宁 鞍山 114007)

**摘要:** 实验对山楂叶、果中类 SOD(Superoxide disutase like 简称 SOD-L)进行了提取与研究。通过连苯三酚自氧化法对山楂叶、果中 SOD-L 活性进行分析,测得山楂叶提取物中 SOD-L 的活力为 630.14 u/mg;山楂果提取物中 SOD-L 的活力为 252.05 u/mg;在 280 nm 有特征性吸收峰;在  $Mg^{2+}$  和  $Cu^{2+}$  的存在时 SOD-L 的活性有着不同程度的增强。SOD-L 的最适温度在 40 ;最适 pH 值在 8.0。

**关键词:** 山楂叶;山楂果;SOD-L;抗氧化性

**中图分类号:** TS 2

**文献标识码:** A

## Extraction and Characteristics of Superoxide Disutase from Hawthorn Leaves and Fruit

ZHANG Lan-jie, XIN Guang, YANG Lin  
(114007, China)

**Abstract:** The manuscript described the extraction of the category SOD-L in hawthorn leaves and fruit. This experiment extract and analysis is through using pyrogallol since the oxidation of hawthorn in leaves and fruit category SOD-L, we measured extract of SOD-L vigor in hawthorn leaves and fruit was 630.14 u/mg and 252.05 u/mg, respectively. SOD-L in the bran has a typical absorption at 280 nm. And it was found that the activity of SOD increase with the presence of  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ . SOD-L activity of hawthorn in leaves and fruit in the bran had an obvious optimum stability at the condition of 40 and pH 8.0.

**Key words:** hawthorn leaves, hawthorn fruit, Superoxide disutase like, Anti-oxidation

超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, EC 1.15.1.1, SOD)是一类广泛存在于各类生物体内的氧化还原酶,至 1969 年由 McCord 和 Fridovich<sup>[1]</sup>发现此酶以来,有关 SOD 在生物界的分布及特性的研究倍受重视。近年来,人们对具有 SOD 同样功能而非 SOD 的一类化合物进行了大量研究,这类化合物称为 SO-L(Superoxide dismutase

like 简称 SOD-L),其清除  $O_2^-$  的作用称为 SOD-L 活性(SOD-Like Activity)。目前,SOD-L 活性已经成为抗衰老药物和保健食品的一个重要指标<sup>[2]</sup>。

山楂为蔷薇科山楂属(*Crataegus*. L)植物,在我国具有悠久的保健与药用历史。

自 20 世纪 50 年代,人们开始对山楂叶、果的化学成分进行了研究<sup>[3-6]</sup>,证明其含有大量的黄酮以及

收稿日期:2008-12-25

基金项目:辽宁省教育厅科学研究计划资助项目(200502)。

作者简介:张兰杰(1957-),女,辽宁鞍山人,教授,主要从事生物化学的教学与科研。Email: zhanglanjieas@163.com。

绿原酸、山楂酸、胆碱、挥发油等。但对山楂叶、果中的黄酮类物质具有 SOD-L 活性未见报道,我们采用鞍山地区盛产的野生山楂叶、果,用连苯三酚自氧化法,测定其 SOD-L 活性,并对其部分性质进行了研究,旨在为山楂叶、果的进一步利用提供理论依据。

## 1 材料与仪器

山楂叶、果:采自千山乡摩云山,由鞍山林业所孙忠诚教授鉴定;连苯三酚:分析纯,贵州遵义化学试剂厂产品,用 0.01 mol/L HCl 配制成 50 mmol 的连苯三酚溶液;三羟甲基氨基甲烷:分析纯,沈阳市医药公司化玻站试剂,配制成 pH 值 8.2;50 mmol Tris-HAc 缓冲液;pHS-3C 型数字酸度计:上海精密科学仪器有限公司;U-1810 紫外可见分光光度计:北京普析通用仪器有限责任公司。

## 2 实验方法

### 2.1 山楂叶、果中 SOD-L 的提取

取烘干、粉碎的山楂叶、果各 50 g 放入索氏提取器中,加入乙醚,回流至无色,回收乙醚,然后用体积分数 70% 乙醇加热提取 6 h,浓缩后,用乙酸乙酯萃取 3 次,合并萃取液,再经大孔吸附树脂 AB-8 进行分离纯化、减压浓缩、干燥,得粉末状 SOD-L。精密称取 SOD-L 50 mg,用双蒸水配制成质量浓度为 1 mg/mL 水溶液待用。

### 2.2 SOD-L 活性的测定

**2.2.1 连苯三酚自氧化速率的测定** 采用谢卫华等人的方法<sup>[7]</sup>略有改动。取两支干燥、洁净的试管,一支为空白对照管,另一支为测定管,分别在两支试管中加入 pH 值为 8.2;50 mol/L MTris-HAc 缓冲液 3 mL,混匀置于 25℃ 的恒温水浴中 20 min,然后在测试管中加入 7 μL 的连苯三酚,加入瞬间开始计时,用 U-1810 紫外可见分光光度计,测定波长为 325 nm,以对照管调零,记录测定管的吸光度  $A_0$ ,换算  $A_0 = 0.070/\text{min}$ , $A_0$  的值为每分钟连苯三酚自氧化速率的吸光度。

**2.2.2 SOD-L 活性的测定** 取两支试管加入 50 mmol/L Tris-HAc 缓冲液 3 mL,在测试管中加入适量的 SOD-L 待测液,置于 25℃ 的恒温水浴中保温 20 min,然后在测定管中加入 7 μL 的连苯三酚,加入瞬间开始计时,以对照管调零,记录测定管的吸光度  $A_1$ ,换算  $A_1 = 0.034/\text{min}$ , $A_1$  的值为每分钟 SOD-L 吸光度。

SOD-L 的活性按下式计算:

$$\text{SOD 活性 (U/mL)} = \frac{A_0 - A_1}{50\%} \times \frac{\text{反应液总体积}}{\text{加酶液体积}} \times \text{酶液稀释倍数}$$

抑制率按下式进行计算:

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

式中  $A_0$  为连苯三酚的自氧化率,  $A_1$  为加入待测液后连苯三酚的自氧化率。

## 3 结果与讨论

### 3.1 山楂叶果中 SOD-L 的紫外吸收光谱

将精制的 SOD-L 溶液,与 HCl-Mg, AlCl<sub>3</sub>, Pb(Ac)<sub>2</sub> 反应均为阳性,表明其中含有黄酮类化合物。将芦丁标准液及山楂叶、果 SOD-L 稀释,在 240~350 nm 范围内进行光谱扫描,其最大吸收峰都在 280 nm,如图 1。以芦丁作标准品,制作工作曲线,测定其黄酮类化合物的纯度达到 95.56%。

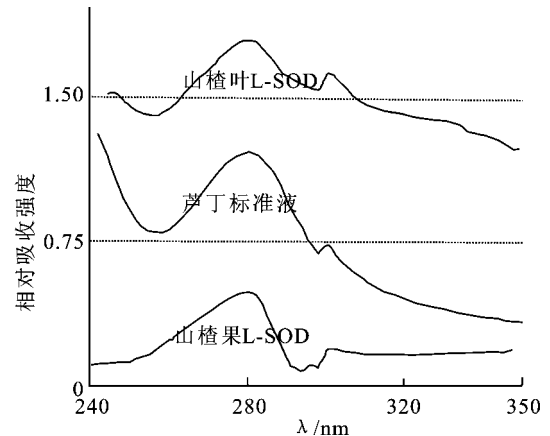


图1 山楂叶、果中 SOD-L 及芦丁标准液的紫外吸收光谱

Fig. 1 Absorption spectrometry of SOD-Like in hawthorn leaves and fruit

### 3.2 山楂叶、果中 SOD-L 的活性测定

**3.2.1 测定光谱的选择** 在 3 mL 的缓冲液中,加入 7 μL 连苯三酚,溶液由无色变成淡黄色,随后再变成淡绿色,最后转变为深黄色,经测定在 325 nm 处有最大吸收峰如图 2 所示。

图 2 表明其在 325 nm 和 420 nm 均有吸收峰,325 nm 处的吸收峰随放置时间延长而迅速增高,24 min 以后,吸收峰开始降低,420 nm 处的吸收峰则是缓慢增高,这与连苯三酚自氧化生成的中间产物不断氧化有关。文献<sup>[8]</sup>报道的连苯三酚自氧化法中检测波长不尽相同,根据检测结果对 325 nm 和 420 nm 波长进行比较结果表明:波长为 325 nm 时,

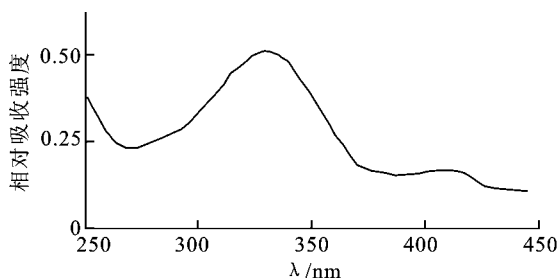


图 2 连苯三酚 325 nm 的吸收峰

Fig. 2 Peak of even phloroglucinol in 325 nm

吸光度值比较大。在 3 mL 的缓冲液中加入山楂叶、果 SOD-L 溶液, 然后再加入连苯三酚, 经测定在 325nm 处仍有最大吸收峰, 说明两种 SOD-L 的加入对最大吸收峰的波长没有改变, 故可选择 325 nm 为测定波长。

**3.2.2 SOD-L 的活性测定** 在碱性条件下 (pH 值 8.20), 连苯三酚发生自氧化反应, 生成  $O_2^-$  和有色中间产物, 该有色中间产物在  $\lambda = 325\text{ nm}$  处有一特征性吸收峰。当加入山楂叶、果 SOD-L 时,  $O_2^-$  的生成受到抑制, 连苯三酚自氧化过程受阻, 溶液在  $\lambda = 325\text{ nm}$  处吸收减弱。故通过测定  $A_{325}$  可以推断山楂叶、果 SOD-L 的活性。结果表明: 山楂叶 SOD-L 的活性为 630.14 u/mg; 山楂果 SOD-L 的活性为 252.05 u/mg, 山楂叶中的 SOD-L 含量是山楂果中的 2.5 倍。

**3.3 山楂叶、果中 SOD-L 的性质**

**3.3.1 不同 pH 值对山楂叶、果 SOD-L 活性的影响** 在 25 °C 条件下, 分别配制 0.05 mol/L, pH 值为 3.0~12.0 缓冲溶液, 用连苯三酚自氧化法测定不同 pH 条件 SOD-L 对  $O_2^-$  的抑制率。结果表明: 山楂叶、果 SOD-L 的最适 pH 在 8.0 左右, pH 值稳定范围在 6.0~10.0 之间, 其结果见表 1。

表 1 不同缓冲液 pH 值对 SOD-L 活性的影响

Tab. 1 Influence of SOD-Like competence at different buffer solution pH

pH 值	山楂叶 SOD-L 抑制率/ %	山楂果 SOD-L 抑制率/ %
3.0	8.23	7.32
4.0	12.13	10.86
5.0	20.56	17.24
6.0	44.68	40.51
7.0	48.55	46.45
8.0	50.12	49.31
9.0	49.01	48.87
10.0	48.23	47.15
11.0	40.25	37.48
12.0	34.18	32.57

**3.3.2  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  对山楂叶、果 SOD-L 的**

**影响** 配制浓度为 0.005 mol/L 的  $MgCl_2$ 、 $CuCl_2$  和  $FeCl_2$  溶液与一定浓度的山楂叶、果的 SOD-L 液混合, 在 25 °C、pH 值 8.2 条件下, 测定不同离子对  $O_2^-$  的抑制率。分别用 0.005 mol/L、50 μL  $MgCl_2$ 、 $GuCl_2$  和  $FeCl_2$  与一定浓度的山楂叶、果中 SOD-L 混合, 在 25 °C 条件下测定不同离子对 SOD-L 活性的影响, 结果表明  $Mg^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$  对山楂叶、果中 SOD-L 有一定的激活的作用, 对  $Fe^{2+}$  则不敏感, 实验结果见表 2。

表 2  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  对山楂叶、果中 SOD-L 的影响

Tab. 2 Effect  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  on SOD-L activity in hawthorn leaves and fruit

金属离子	山楂叶 SOD-L 对 $O_2^-$ 抑制率/ %	山楂叶 SOD-L 对 $O_2^-$ 抑制率/ %
对照	50.12	49.31
$Mg^{2+}$	65.12	64.28
$Cu^{2+}$	67.41	66.24
$Fe^{2+}$	49.97	48.45

**3.3.3 不同温度对山楂叶、果 SOD-L 活性的影响**

以牛血 SOD 为对照, 测定不同温度条件下, 山楂叶、果 SOD-L 对  $O_2^-$  抑制率的影响, 结果见表 3。实验表明: 山楂叶、果 SOD-L 的最适温度在 40 °C 左右, 与牛血 SOD 的最适温度相类似。当温度达 60 °C 时, 其 SOD-L 对  $O_2^-$  抑制率略有下降, 温度提高到 80 °C, 其对  $O_2^-$  抑制率为原初抑制率的 80.36%。而在同样温度条件下, 牛血 SOD 对  $O_2^-$  抑制率仅保留 30.21% 左右。可见山楂叶、果 SOD-L 所表现出的活性比牛血 SOD 有着更高的热稳定性。

表 3 不同温度对山楂叶、果 SOD-L 的影响

Tab. 3 Effect of different temperature on SOD-L activity in hawthorn leaves and fruit

T/ °C	牛血 SOD 对 $O_2^-$ 抑制率/ %	山楂叶 SOD-L 对 $O_2^-$ 抑制率/ %	山楂果 SOD-L 对 $O_2^-$ 抑制率/ %
25	50.47	40.12	32.53
40	56.89	47.24	33.65
50	51.28	46.84	35.26
60	45.32	42.21	31.15
70	30.58	41.24	29.36
80	15.25	32.09	26.02

**4 结 语**

实验表明: 山楂叶、果 SOD-L 与牛血 SOD 在清除自由基方面有着相同的作用, 在紫外吸收光谱上

也表现出与牛血 SOD 的类似特征。在一定浓度  $Mg^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$  存在时,山楂叶、果 SOD-L 对  $O_2$  具有较强的抑制作用,而对  $Fe^{2+}$  的存在表现不敏感;它们对温度的稳定性则优于 SOD,笔者认为这是由于其化学组成和分子结构不同于酶蛋白分子所造成的,对其机理的研究,有待于进一步探讨。

山楂叶、果 SOD-L 主要是黄酮类化合物,它是一类具有广泛生物活性、低分子的植物次生代谢物。一些研究已证明,SOD 具有清除  $O_2$  的能力,作

为靶标具有选择性杀死肿瘤细胞的作用<sup>[9]</sup>,但它是大分子的蛋白质且在体内半衰期短,使其应用受到一定的限制。而黄酮类物质同样具有清除  $O_2$  的效果<sup>[10]</sup>,利用黄酮 SOD-L 性质及波谱学特征,来筛选具有良好抗氧化作用的天然药物具有实际意义。鞍山地区山楂叶、果的资源十分丰富,为廉价的天然抗氧化剂的制备提供了优越的条件。

## 参考文献(References):

- [1] McCord J M, Fridovich I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte protein[J]. **J Biol Chem**,1969,244:6049 - 6055.
- [2] McCord J M, Fridovich I. 超氧化物歧化酶的现状研究进展[J]生物化学杂志,1969,244:6049 - 6055.  
张尔贤. 植物 SOD 和 SOD-L 活性物质研究进展[J]. 汕头大学学报 1992,7(2):16 - 29.  
Zhang Erxian. Advances in the Study of Superoxide Dismutase and SOD-Like Active Matter Derived from Plants[J]. **Shantou University**,1992,7(2):16 - 29. (in Chinese)
- [3] 刘荣华,邵峰,邓雅等. 山楂化学成分研究进展[J]. 中药材. 2008,31(7):1100 - 1103.  
Liu Ronghua, Shao Feng, Dengya, et al. Research advance of hawthorn berry chemical composition[J]. **Chinese Medicinal Materials**, 2008,31(7):1100 - 1103. (in Chinese)
- [4] 王超群,郭敏,易敏之,等. 山楂化学成分及高效液相色谱分析方法研究进展[J]. 中国中医药信息杂志,2006,13(11)93 - 95.  
Wang Chaoqun, Guo Min, Yi Minzhi, et al. Research advance of hawthorn berry chemical composition and high performance liquid chromatographic method for analysis[J]. **Chinese journal of information on traditional Chinese medicine**,2006,13(11)93 - 95. (in Chinese)
- [5] 梁淑芳,马耀光,马柏林. 山楂黄酮的色谱分离鉴定研究[J]. 林产化学与工业,2003,23(4):86 - 88.  
Liang Sufang, Ma Raoguang, Ma Bolin. A study on Chromatography Analysis of the Flavonoids in Hawthorn Berry [J]. **Chemistry and Industry of Forest Products**,2003,23(4):86 - 88. (in Chinese)
- [6] 李冬菊,林阳. 山楂叶黄酮的提取及其鉴定[J]. 辽宁中医杂志,2003,30(7):578 - 579.  
Li Dongju, Lin Yang. The Extraction and Identification of Hawthorn Leaf Flavonoids[J]. **Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine**,2003,30(7):578 - 579. (in Chinese)
- [7] 谢卫华,姚菊芳,袁勤生. 连苯三酚自氧化法测定超氧化物歧化酶活性的改进[J]. 医药工业,1988,19(5):217 - 219.  
Xie Weihua, Yao Jufang, Yuan Qinsheng. Modification of Pyrogallol Autoxidation Method for Assay of Superoxide Dismutase[J]. **Chinese Journal of Pharmaceuticals**,1988,19(5):217 - 219. (in Chinese)
- [8] 张宏,谭竹筠. 四种邻苯三酚自氧化法测定超氧化物歧化酶活性方法的比较[J]. 内蒙古大学学报,2002,33(6):677 - 681.  
Zhang Hong, Tan zhuyn. The Comparison of four Methods of Pyrogallol Self-Oxidation for Assay of Superoxide Dismutase[J]. **Journal of Inner Mongolia University**, 2002, 33(6):677 - 681. (in Chinese)
- [9] Huang P, Li F, Elizabeth A O 等. 2-甲氧基雌二醇对骨髓瘤细胞系 CZ-1 细胞诱导分化作用初探[J]. 自然,2000,407:390.  
Huang P, Li F, Elizabeth A O, et al. Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells[J]. **Nature**, 2000. 407:390 - 394. (in Chinese)
- [10] Croft KD. The chemical and biological effects of flavonoids and phenolic acids[J]. **Ann NY Acad Sci**,1998,854:435 - 439.

(责任编辑:杨萌)