

文章编号:1673-1689(2010)02-0189-04

## 山楂提取物的抗氧化活性研究

黄优生<sup>1,2</sup>, 谢明勇<sup>\*1</sup>, 聂少平<sup>1</sup>, 李昌<sup>1</sup>

(1. 食品科学与技术国家重点实验室,南昌大学,江西 南昌 330047; 2. 江西省分析测试研究所,江西 南昌 330029)

**摘要:** 采用不同提取方法提取山楂活性成分,分别用 DPPH 法、邻苯三酚自氧化法测定了不同提取物的抗氧化作用。结果表明,不同提取物均有抗氧化活性,提取物量与抗氧化活性呈正相关,不同提取物抗氧化活性强弱为:醇提物 > 超临界 CO<sub>2</sub> 提取物 > 水提物。山楂提取物中乙酸乙酯萃取部分抗氧化活性最强。

**关键词:** 山楂;抗氧化;DPPH;邻苯三酚自氧化

**中图分类号:** R 284. 2

**文献标识码:** A

### Anti-Oxidative Activity of Extracts from Hawthorn

HUANG You-sheng<sup>1,2</sup>, XIE Ming-yong<sup>\*1</sup>, NIE Shao-ping<sup>1</sup>, LI Chang<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China; 2. Analytical and Testing Research Institute of Jiangxi Province, Nanchang 330029, China)

**Abstract:** The anti-oxidative effect of hawthorn extracts origin from different process were study by using DPPH and pyrogallol autooxidation methods in this manuscript. The results showed that all of them had anti-oxidative activity, and exhibit a positive correlation with the concentration and the anti-oxidative activity of the extracts. Among of them, the order of anti-oxidative effect was listed as follows: obtained from ethanol bath > SFE-CO<sub>2</sub> > water. The ethyl acetate part of hawthorn extracts demonstrated the strongest anti-oxidative activity.

**Key words:** hawthorn, antioxidation, DPPH, pyrogallol autooxidation

自由基是指带有未成对电子的分子、原子或离子,其中与人体关系最为密切的是氧自由基,如超氧自由基(O<sup>2-</sup>·)、羟基自由基(·OH)、脂自由基(ROO·)等,其中以O<sup>2-</sup>·形成最早,·OH作用最强<sup>[1]</sup>。衰老、癌症及炎症等疾病与体内脂质过氧化和自由基有直接关系。因此,有关抗氧化剂清除自由基的研究得到普遍关注。抗氧化剂分为合成抗

氧化剂和天然抗氧化剂,目前,广泛使用的合成抗氧化剂主要有BHT(2,6-二叔丁基对甲酚)、BHA(叔丁基-4-羟基茴香醚)和TBHQ(2,4,5-三羟基苯基丁酮)等,然而,动物实验表明它们有一定的毒性<sup>[2-3]</sup>,因此天然抗氧化剂取代合成类抗氧化剂是一种必然的趋势,近年来,从天然动植物,尤其是从具有悠久历史的中草药中寻找高效的自由基清除剂,

收稿日期:2009-04-13

基金项目:基金项目:教育部长江学者和创新团队发展计划项目(IR T0540)。

\*通信作者:谢明勇(1957-),男,江西宜春人,博士,教授,博士生导师,主要从事天然产物研究与开发。Email: myxie@ncu.edu.cn

引起国内外学者的极大兴趣<sup>[4-5]</sup>。

现代药理研究表明,山楂具有抗动脉粥样硬化,降低血压,抗癌、防癌等作用<sup>[6-7]</sup>。也有研究表明,山楂具有抗氧化作用,如赵二芳等<sup>[8]</sup>比较了山楂提取物、VC和槲皮素的抗氧化能力,结果表明,山楂提取物具有较强的抗氧化能力,抗氧化能力 VC > 槲皮素 > 山楂提取物。回瑞华等<sup>[9]</sup>用流动注射化学发光法测定了山楂果的抗氧化性能,发现山楂果具有较强的抗氧化性能,并且抗氧化性能随着浓度的增加而增加。

本文采用不同提取方法提取山楂活性成分,分别用 DPPH 法、邻苯三酚自氧化法测定了不同提取物的抗氧化作用,并与合成抗氧化剂 BHT 和抗坏血酸清除自由基能力进行比较,以此来评价其抗氧化能力,对于寻找新型高效的抗氧化剂及进一步开发利用山楂资源有一定意义。

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料和试剂

山楂:山东莱芜产大金星品种;二苯基苦味酰基苯肼(DPPH);邻苯三酚;BHT 乙醇溶液:Tris-HCl 缓冲液;抗坏血酸、BHT 均为食品级;其它试剂均为分析纯。

### 1.2 主要仪器和设备

TU-1900 双光束紫外可见分光光度计:北京普析通用仪器有限公司产品,Spe-ed SFE-2 超临界萃取仪:Applied separation, Inc. 产品;FA1104 电子天平:上海精天电子仪器厂产品;电子恒温不锈钢水浴锅:上海宏兴机械仪器实业制造公司产品;旋转蒸发仪:上海申生科技有限公司产品;DGG-9140B 电热恒温鼓风干燥箱:上海森信实验仪器有限公司产品。

## 2 实验方法

### 2.1 不同提取方法提取山楂活性成分

**2.1.1 乙醇回流提取法** 准确称取干燥山楂 20.00 g,于 70 ℃ 按固液比 1:20 加入体积分数 70%乙醇回流提取 2 h,重复 1 次,合并提取液,滤液真空浓缩至浸膏,40 ℃ 真空干燥,称重,体积分数 95%乙醇溶解,定容至一定浓度,备用。

**2.1.2 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取法** 选取 100 mL 萃取釜,准确称取干燥山楂 20.00 g,放入萃取釜,于 36.6 MPa、47.8 ℃ 下萃取 4 次,每次按 1:1 加入体积分数 95%乙醇作为夹带剂萃取 30 min,收集萃取液,真空干燥,称重,体积分数 95%乙醇溶解,定容至

一定浓度,备用。

**2.1.3 水提取法** 准确称取干燥山楂 20.00 g,按固液比 1:20 加水提取 2 h,重复 1 次,合并提取液,滤液真空浓缩至浸膏,40 ℃ 真空干燥,称重,水溶解,定容至一定浓度,备用。

**2.1.4 不同极性部分的制备** 称取干燥山楂适量,按 2.1.1 和 2.1.2 方法提取,提取液经真空浓缩至小体积,依次用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取,得到乙酸乙酯、正丁醇和萃余层三部分,各部分浓缩、干燥、称重,定容至一定浓度,备用。

### 2.2 山楂活性成分的抗氧化活性试验

**2.2.1 山楂提取物对 DPPH·自由基的清除作用试验** 将 1 mL 不同浓度的样品溶液加入 2 mL 0.1 mg/mL DPPH 溶液中,用溶剂定容至 5 mL,迅速混匀,30 min 后于 517 nm 下测定其吸光度 A。根据下列公式计算清除率<sup>[10]</sup>:

$$\text{清除率} = [1 - (A - A_2) / A_0] \times 100\%$$

A<sub>0</sub> 为未加样的 DPPH 吸光度;A 为样品与 DPPH 反应后的吸光度;A<sub>2</sub> 为样品的空白的吸光度。

**2.2.2 半清除率的测定** 半清除率指清除率为 50% 时所需样品的浓度,根据不同浓度样品对有机自由基 DPPH 的清除率作曲线求出。所需浓度越低,表明半清除率越高。

### 2.2.3 山楂提取物抑制邻苯三酚自氧化作用试验

在 10 mL 容量瓶中加入 5 mL Tris-HCl 缓冲液,一定量的待测液或 BHT 溶液,于 25 ℃ 恒温水浴中放置 20 min 后,加入 0.1 mL 的 25 ℃ 预热的邻苯三酚溶液,迅速混匀,在 5 min 内,每隔 30 s 于 420 nm 处测定溶液的吸光度(以 Tris-HCl 缓冲液为空白对照)。计算吸光度随时间的变化率,并与空白溶液比较,便可得出被测物抑制 O<sup>2·-</sup> 作用的能力<sup>[11-12]</sup>。清除率计算式:

$$\text{清除率} = [(F_0 - F_x) / F_0] \times 100\%$$

式中, F<sub>0</sub> 和 F<sub>x</sub> 分别表示空白溶液和被测液的吸光度随时间的变化率。

## 3 结果与讨论

### 3.1 山楂提取物对 DPPH·自由基的清除作用

对自由基的清除能力以清除率表示,清除率越高,提取物抗氧化能力越强。按 2.2.1 方法测定了不同提取方法所得山楂提取物、VC 及 BHT 对 DPPH·自由基的清除能力,结果如图 1 所示。

从图 1 可以看出,3 种不同提取方法所得山楂提取物都具有一定的清除自由基活性的能力,且随

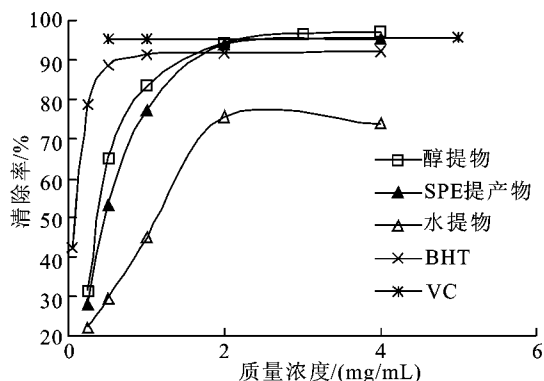


图 1 不同提取方法所得山楂提取物对 DPPH 自由基的清除作用

Fig. 1 Scavenging effect on DPPH radicals of hawthorn extracts origin from different process

随着提取物浓度增加,清除率逐渐升高,当浓度增加到一定值后,清除率趋于平缓。在一定浓度范围内,醇提取物的抗氧化能力最强,超临界  $\text{CO}_2$  提取物次之,水提物的清除能力最弱。其原因可能是由于不同提取方法所得粗提物成分不同,所提取的抗氧化物质的总量和种类也不同,而且其中各物质的协同作用也不一致,导致了不同提取方法所得山楂提取物的抗氧化能力不同。对于 DPPH· 自由基的清除率,当山楂醇提取物和 SFE 提取物浓度达到 2 mg/mL 时已超过 4 mg/mL BHT 的抗氧化效果,相当于 0.5 mg/mL 的抗坏血酸的抗氧化效果,表明山楂醇提取物和 SFE 提取物均具有较强的抗氧化能力。

半清除率浓度是自由基清除率在 50% 时的浓度,以  $\text{EC}_{50}$  表示,常用来比较清除 DPPH 自由基的能力大小(图 2)。图 2 从图中可见,对自由基清除能力以醇提取物最强 ( $\text{EC}_{50} = 0.39 \text{ mg/mL}$ ),超临界  $\text{CO}_2$  提取物略低,水提物最弱。

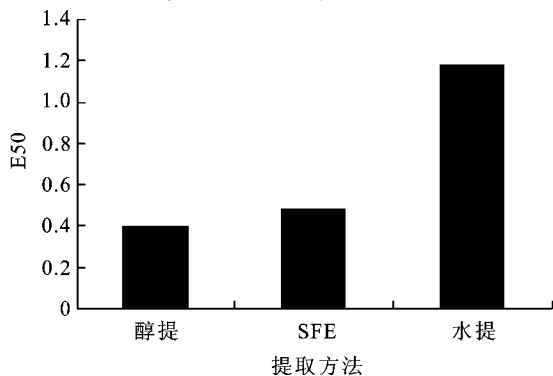


图 2 不同山楂提取物的  $\text{EC}_{50}$  比较

Fig. 2 Comparison of  $\text{EC}_{50}$  of hawthorn extracts origin from different process

### 3.2 不同极性部分对 DPPH· 自由基的清除作用

按 2.1.4 方法将回流提取和超临界  $\text{CO}_2$  提取

物分成极性不同的 3 个部分:乙酸乙酯萃取部分、正丁醇萃取部分及萃余物部分,各部分按方法 2.2.1 测定,结果见图 3、图 4。

由图 3、4 可知,在乙酸乙酯、正丁醇和萃余物三个萃取部分中,乙酸乙酯萃取部分清除 DPPH· 自由基能力最强。该极性部分含有黄酮类化合物、绿原酸和原花青素等<sup>[13]</sup>,这类化合物具有较强的清除自由基和抗氧化活性,因此,山楂提取物中乙酸乙酯萃取部分抗氧化活性最强。

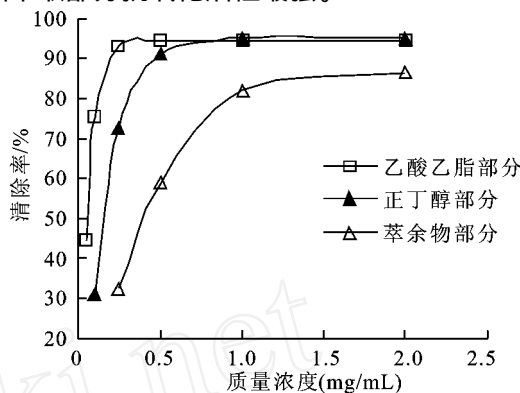


图 3 醇提取物各萃取部分清除 DPPH 自由基的作用

Fig. 3 Scavenging effect of ethanol extracts fractions on DPPH radicals

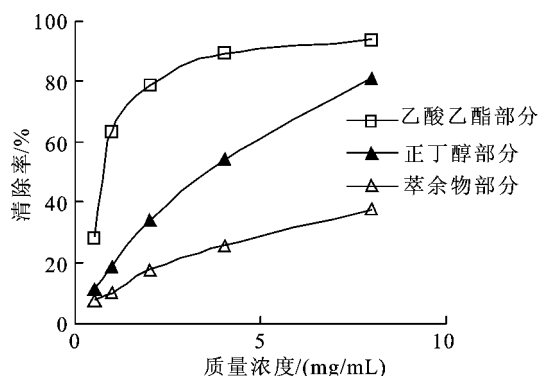


图 4 超临界  $\text{CO}_2$  提取物各萃取部分清除 DPPH 自由基的作用

Fig. 4 Scavenging effect of different fractions of SFE  $\text{CO}_2$  extracts on DPPH radicals

### 3.3 山楂提取物抑制邻苯三酚自氧化的作用

邻苯三酚 (PR) 在碱性条件下会发生自氧化,生成有色中间产物和超氧阴离子自由基 ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ),  $\text{O}_2^{\cdot -}$  自由基对自氧化有催化作用,提取物对邻苯三酚自氧化的抑制率可作为它对  $\text{O}_2^{\cdot -}$  自由基的清除率的表征,据自氧化速率变化来计算提取物对  $\text{O}_2^{\cdot -}$  自由基的清除率。

由图 5 可知,提取物能明显降低邻苯三酚自氧化的速率,随着提取物浓度增加,抑制率逐渐增高,但当浓度增加到一定值后,抑制率呈平缓趋势。

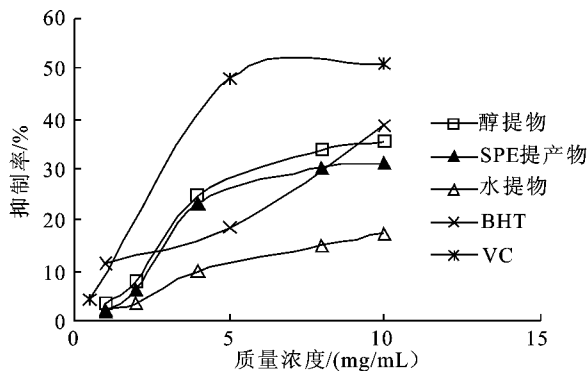


图 5 不同山楂提取物抑制 PR 自氧化的作用

Fig. 5 Inhibition for PR of different hawthorn extracts

如图 5 所示,不同提取方法提取物对  $O^{\cdot-}$  自由基的清除能力不同,醇提取物和 SFE 提取物对  $O^{\cdot-}$  自由基的清除能力与 BHT 相当,其中醇提取物略高于超临界  $CO_2$  提取物,水提取物较低。由此可见,山楂醇提取物和超临界  $CO_2$  提取物对  $O^{\cdot-}$  自由

基也有较强的清除能力。

## 4 结 语

综上所述,山楂不同提取物抗氧化能力不同,醇提取物最高,超临界  $CO_2$  提取物次之,水提取物较低。其原因可能是由于不同提取物成分不同,所提取的抗氧化物质的总量和种类也不同,而且其中各物质的协同作用也不一致,导致了不同方法提取的山楂提取物的抗氧化能力不同。其机理还有待进一步深入研究,这也是今后研究的目标。

山楂具有药食两用的特点,将山楂提取物添加至食品中即可以增加食品的营养成分,又可起到抗氧化的功效,从这一点可以看到山楂产品的开发具有广阔的应用前景。

## 参考文献(References):

- [1] 王建英,任引哲,王迎新. 氧自由基与人体健康[J]. 化学世界, 2006, (1): 61 - 63.  
WANG Jian-ying, Ren yin-zhe, Wang ying-xin. Oxygen-derived free radical and human health[J]. *Chemical World*, 2006, (1): 61 - 63. (in Chinese)
- [2] Jayalakshmi C P, Sharma J D. Effect of butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) on rat erythrocytes[J]. *Environmental Research*, 1986, 41(1): 235 - 238.
- [3] Sang-Hee Jeong, Byung-Yong Kim, Hwar-Goo Kang, et al. Effects of butylated hydroxyanisole on the development and functions of reproductive system in rats[J]. *Toxicology*, 2005, 208: 49 - 62.
- [4] SUN Jian, YAO Jinyan, HUANG Shaoxi, et al. Antioxidant activity of polyphenol and anthocyanin extracts from fruits of *Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith[J]. *Food Chemistry*, 2009, 117(2): 276 - 281.
- [5] 许钢. 红薯中黄酮提取及抗氧化研究[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(4): 22 - 27.  
XU Gang. Studies on the extracting and antioxidant activities of flavonoids in sweet potatoes [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2007, 26(4): 22 - 27 (in Chinese).
- [6] Ernesto Dalli, Javier Milara, Julio Cortijo, et al. Hawthorn extract inhibits human isolated neutrophil functions[J]. *Pharmacological Research*, 2008, 57(6): 445 - 450.
- [7] Vierling W, Brand N, Gaedcke F, et al. Investigation of the pharmaceutical and pharmacological equivalence of different Hawthorn extracts[J]. *Phytomedicine*, 2003, 10: 8 - 16.
- [8] 赵二芳,王丽娟,李满秀. 山楂提取物抗氧化能力的研究[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(11): 19 - 21.  
ZHAO Er-lao; WANG Li-juan; LI Man-xiu. Study on antioxidant activity of extracts of hawthorn [J]. *Food Research and Development*, 2008, 29(11): 19 - 21. (in Chinese)
- [9] 回瑞华,侯冬岩,刘晓媛等. 山楂果中黄酮化合物的光谱分析及抗氧化性能测定[J]. 食品科学, 2006, 27(1): 199 - 202.  
HUI Rui-hua; HOU Dong-yan; LIU Xiao-yuan, et al. Determination of flavonoids and the antioxidation effect in *C. pinatifida* Bunge[J]. *Food Science*, 2006, 27(1): 199 - 202. (in Chinese)
- [10] 陈奕,谢明勇,弓晓峰. 黑灵芝提取物清除 DPPH 自由基的作用[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18: 917 - 921.  
CHEN Yi, XIE Ming-yong, GONG Xiao-feng. DPPH radical scavenging effect of *Ganoderma atrum*[J]. *Natural Product Research and Development*, 2006, 18: 917 - 921. (in Chinese)
- [11] LI Chang, XIE Ming-yong, NIE Shao-ping, et al. Study on free radical scavenging in vitro and antioxidative activity of Extracts from Cook Noni (*Morinda citrifolia*) Juice[J]. *Nat Prod Res*, 2006, 18: 373 - 377.
- [12] 储鸿,程珊,倪忠斌等. 白芷活性提取物清除自由基与抗氧化作用[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(2): 201 - 205.  
HONG Chu, SHAN Cheng, NI Zhong-bin, et al. Study on scavenging free radical and antioxidation effects of extracts from *Angelica dahurica*[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2009, 28(2): 201 - 205. (in Chinese)
- [13] Zhang Ze-sheng, Chang Qi, Zhu Min, et al. Characterization of antioxidants present in hawthorn fruits[J]. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2001, 12: 144 - 152.

(责任编辑:杨萌)