

# 不同苹果多酚提取物体外清除自由基及抗脂质过氧化的研究

陈维军<sup>1</sup>, 方琳<sup>2</sup>, 戚向阳<sup>1</sup>, 张俐勤<sup>1</sup>, 杨尔宁<sup>1</sup>, 谢笔钧<sup>1</sup>

(1. 华中农业大学食科学院, 湖北 武汉 430070)

2. 浙江医药高等专科学校实验室, 浙江 宁波 315016)

**摘 要:** 目的: 研究了不同苹果多酚提取物清除羟基自由基、超氧阴离子自由基和脂质体过氧化产生的丙二醛的效果。方法: 采用 D-脱氧核糖法, 试剂盒法及改良的 TBA 比色法分别测定苹果多酚提取物清除羟基自由基、超氧阴离子自由基和脂质体过氧化产生的丙二醛的效果。结果: 在这三种抗氧化体系中, 不同的苹果多酚提取物均有抗氧化效果, 但其抗氧化效果因体系的不同而不同, 以 AP I, AP II 的抗氧化活性较强。结论: 苹果多酚提取物具有抗氧化活性, 其主要的抗氧化成分为分子量较小的酚类单体及原花青素低聚体。

**关键词:** 苹果多酚提取物; 清除; 自由基; 脂质过氧化

## Research on Scavenging Effect on Radical and Inhibiting Effect on Lipid Peroxidation of Different Apple Polyphenol Extracts in vitro

CHEN Wei-jun<sup>1</sup>, FANG Lin<sup>2</sup>, QI Xiang-yang<sup>1</sup>, ZHANG Li-qin<sup>1</sup>, YANG Er-ning<sup>1</sup>, XIE Bi-jun<sup>1</sup>

(1. Department of Food Science, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

2. Laboratory of Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo 315016, China)

**Abstracts:** Objective: To study the scavenging effects on hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ ), superoxidized anion radical ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) and malondialdehyde (MDA) generated by lipid peroxidation of different apple polyphenol extracts. Methods: The DR spectrophotometry and improved TBA spectrophotometry and solvent box method were used to determine the scavenging effects on  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{O}_2\cdot^-$  and MDA. Results: Different apple polyphenol extracts all had antioxidant effects, but in different antioxidant systems, different apple polyphenol extracts had different antioxidant effects, and the antioxidant effects of AP I and AP II showed better. Conclusion: Apple polyphenol extracts had antioxidant activity. The main antioxidant components were phenols and proanthocyanidins oligomer with low molecular weight.

**Key words:** apple polyphenol extract; scavenging effect; radical; lipid peroxidation

中图分类号: R155.54

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)12-0212-04

自由基是在生物体内呈游离状态, 带有不成对电子的分子、原子或离子。在生理情况下, 活性氧处于较低的水平, 其产生和清除处于动态的平衡, 但在某些病理情况下, 其产生与清除的平衡被打破, 将导致机体损伤。活性氧一方面本身就可以造成对生物大分子蛋白质、DNA 等的损伤, 另一方面可促发多不饱和脂肪酸的脂质过氧化 (LPO), LPO 反应的终产物丙二醛 (MDA) 可使含氨基的蛋白质、核酸、脑磷脂发生交连并丧失其活性, 其中羟基自由基的作用更强<sup>[1]</sup>。近年

来, 大量研究表明, 氧自由基诱导的 LPO 反应与许多疾病的发生有密切的关系<sup>[2]</sup>。因此, 寻找利于人体吸收的能清除体内过量自由基的外源植物活性清除剂目前正成为人们研究关注的热点。

苹果为我国产量最大的水果, 资源十分丰富, 有着很好的营养价值和特殊的保健作用, 富含糖、蛋白质、有机酸、维生素和多种酚类化合物。其中, 原花青素、酚酸及黄酮类物质为苹果中主要的酚类成分<sup>[3~5]</sup>。许多药理研究均表明, 原花青素、酚酸及黄酮类物质

收稿日期: 2004-12-28

作者简介: 陈维军 (1969-), 男, 在读博士生, 研究方向为天然产物研究与开发。

具有多种生物活性, 有着很强的抗氧化效果。近年来我国苹果产量迅速增长, 产量已达2000多万吨, 又多以鲜销为主, 只有极少部分用于加工, 从而经常出现卖果难等问题。因此, 本文以苹果为原料, 制备不同的苹果多酚提取物, 并对其清除自由基的效果以及对小鼠肝组织脂质体过氧化生成丙二醛的影响进行研究, 为苹果的深加工及新型高效安全的天然抗氧化剂的研究提供一定的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

苹果多酚粗提取物(APC): 本实验室自制。

### 1.2 试验用动物

Wistar大鼠, 雄性, 180~200g, 购于湖北省医学科学院实验动物中心。

### 1.3 试剂

维生素C、三氯化铁、硫代巴比妥酸、双氧水、正丁醇、三氯乙酸等均为分析纯; D-脱氧核糖(DR), 生化试剂, Sigma公司, USA; 葡聚糖凝胶LH-20, Sigma公司, USA; 抗超氧阴离子试剂盒, 南京建成生物工程研究所。

### 1.4 仪器

Shimadzu紫外一可见分光光度计, 日本; SCR20B低温高速离心机, 日本。

### 1.5 方法

#### 1.5.1 不同苹果多酚提取物的制备

将一定量的苹果多酚粗提物(APC)用少量乙醇溶解后, 上葡聚糖LH-20凝胶柱, 依次用50%乙醇、80%乙醇及60%丙酮进行洗脱, 收集各部分洗脱液, 经浓缩、冷冻干燥得不同苹果多酚提取物, 分别记为: AP I、AP II、AP III。

#### 1.5.2 苹果多酚提取物对羟基自由基清除作用的研究<sup>[6]</sup>

在干净磨口试剂管中依次加入0.4ml 50mmol/L pH7.5KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-KOH缓冲液, 一定浓度样品, 0.1ml 1.04mmol/L EDTA溶液液, 0.1ml 10mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.1ml 60mmol/L DR(对照不加), 0.1ml 2mmol/L VC, 以及0.1ml 1mmol/L FeCl<sub>3</sub>, 各试管终体积为1.0ml。37℃保温1h后取出, 加入1ml 25%HCl终止反应, 再加1.0ml 1.0%TBA, 将每个试管中溶液混合均匀, 于沸水浴上煮沸15min, 立即冷却, 加入3ml正丁醇萃取, 取上清液在波长532nm处比色。按下列公式计算样品对·OH的清除率:

$$S(\text{清除率})\% = [A_0 - (A_1 - A_2)] / A_0 \times 100\%$$

其中: A<sub>0</sub>、A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>分别代表空白、样品及对照的吸光度。

#### 1.5.3 苹果多酚提取物对超氧阴离子自由基清除作用的研究

抗超氧阴离子试剂盒法: 分别取不同浓度的样品, 按试剂盒所标明操作方法进行试验。按下式计算样品对O<sub>2</sub>·的清除率:

$$S(\text{清除率})\% = [A_0 - (A_1 - A_2)] / A_0 \times 100\%$$

其中: A<sub>0</sub>、A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>分别代表空白、样品及对照的吸光度。

#### 1.5.4 苹果多酚提取物对大鼠肝组织匀浆丙二醛(MDA)生成的影响

##### 1.5.4.1 10%肝组织匀浆的制备<sup>[7]</sup>

取肝组织块0.5g在冰冷的生理盐水中漂洗, 除去血液, 称重, 放入5~10ml的小烧杯内。取总量(总量为4.5ml)2/3的生理盐水于烧杯中, 用眼科小剪尽快剪碎组织块。将剪碎的组织倒入匀浆管中, 再将剩余的1/3生理盐水用来冲洗残留在烧杯中的碎组织块, 一起倒入匀浆管中进行匀浆, 使组织匀浆化。将匀浆液以3000r/min离心10~15min。取适量上清液进行各种测定。

##### 1.5.4.2 大鼠肝匀浆丙二醛(MDA)含量的测定<sup>[8]</sup>

每支试管加入0.20ml 10%肝匀浆, 给药组每管分别加入不同浓度的样品100μl, 对照组加入等体积生理盐水, 37℃温浴1h后分别加入10%TCA 1.0ml、0.67%TBA1.0ml, 充分混合均匀, 沸水浴15min后立即冷却, 用改良的TBA比色法测MDA含量, 以吸光值表示MDA含量, 并计算清除率。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同苹果多酚的制备

表1 苹果多酚各组分的分离与纯化

Table 1 The isolation and purification of different components extracts of apple polyphenol

洗脱相	洗脱物重量(g)	得率(%)
50%乙醇	1.790	44.4
80%乙醇	0.4523	11.22
60%丙酮	0.7977	19.79

注: 上样量4.0310g。

不同苹果多酚提取物的得率见表1。从表1可知, 由柱层析法分离所得三种苹果多酚提取物中得率最高的是50%乙醇洗脱液(AP I), 达44.4%; 其次是60%丙酮洗脱液(AP III), 为19.79%; 最后是80%乙醇洗脱液(AP II), 为11.22%。

根据有关的文献[3~5][9], AP I中主要为小分子的酚类物质; AP II中主要为原花青素二聚体和三聚体, 而AP III则主要是一些较大分子量的酚类物质, 如高聚体原花青素等。

## 2.2 苹果多酚的抗氧化性能的研究

### 2.2.1 不同苹果多酚提取物对羟基自由基的清除作用

#### 2.2.1.1 苹果多酚 I (AP I) 对 $\cdot\text{OH}$ 自由基的清除作用

由图 1 可知, AP I 与清除羟基自由基的效果呈现良好的量效关系。AP I 在  $0\sim 1000\mu\text{g/ml}$  的浓度范围内, 表现出良好的清除羟基自由基的活性, 其清除率随着浓度的增大而提高, 最高清除率达 87.1%。特别是样品浓度在  $100\sim 1000\mu\text{g/ml}$  范围内, 清除率提高很快, 从 5.8% 提高到 87.1%。

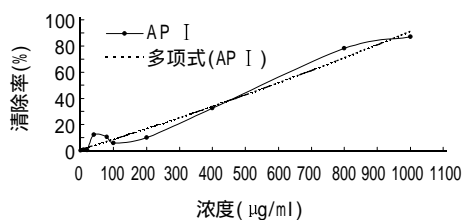


图 1 AP I 对  $\cdot\text{OH}$  自由基清除作用的量效关系

Fig.1 The relationship of scavenging  $\cdot\text{OH}$  effect of AP I with their doses

#### 2.2.1.2 苹果多酚 II (AP II) 对 $\cdot\text{OH}$ 自由基的清除作用

由图 2 可知, 在浓度较低时 ( $10\sim 125\mu\text{g/ml}$ ), 苹果多酚 II (AP II) 对  $\cdot\text{OH}$  自由基的产生具有激发作用。当浓度超过  $125\mu\text{g/ml}$  后, AP II 对体系中  $\cdot\text{OH}$  自由基的产生开始表现出明显的抑制作用, 且在  $125\sim 400\mu\text{g/ml}$  浓度范围内, 随着浓度的增大, AP II 对体系中  $\cdot\text{OH}$  自由基的清除率急剧上升, 同时, 多项回归分析表明, 在此浓度范围内, AP II 对体系中  $\cdot\text{OH}$  自由基的清除作用与其浓度之间具有较好的线性增大关系。在  $400\sim 800\mu\text{g/ml}$  浓度范围内, 随着浓度的增大, AP II 对体系中  $\cdot\text{OH}$  自由基的清除效果变化不大, 当浓度超过  $800\mu\text{g/ml}$  后, AP II 对体系中  $\cdot\text{OH}$  自由基的清除又开始表现出显著的增大趋势, 浓度为  $1000\mu\text{g/ml}$  时其清除率可达 96.4%。

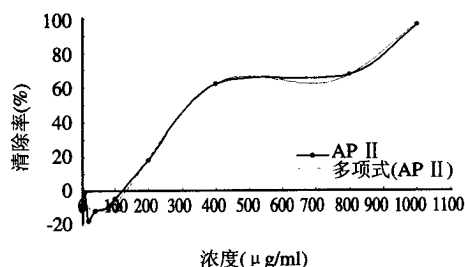


图 2 AP II 对  $\cdot\text{OH}$  自由基清除作用的量效关系

Fig.2 The relationship of scavenging  $\cdot\text{OH}$  effect of AP II with their doses

#### 2.2.1.3 苹果多酚 III (AP III) 对 $\cdot\text{OH}$ 自由基的清除作用

图 3 表明, 在较低浓度下, AP III 可促进体系中  $\cdot\text{OH}$  自由基的产生, 当浓度高于  $250\mu\text{g/ml}$  时, AP

III 可较好地抑制  $\cdot\text{OH}$  自由基的产生, 且随其浓度的增大, 清除率升高, 在  $1000\mu\text{g/ml}$  时其对羟基自由基的清除率可达 62.5%。

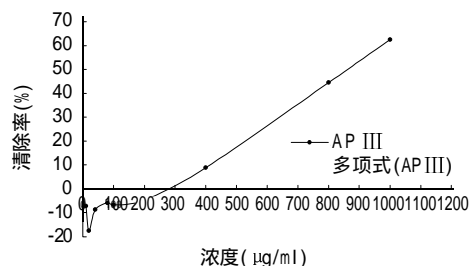


图 3 AP III 对  $\cdot\text{OH}$  自由基清除作用的量效关系

Fig.3 The relationship of scavenging  $\cdot\text{OH}$  effect of AP III with their doses

综上所述, 不同苹果多酚提取物对  $\cdot\text{OH}$  自由基的清除效果不同, 在低浓度条件下 ( $10\sim 100\mu\text{g/ml}$ ), AP I 清除  $\cdot\text{OH}$  自由基的效果较好, 且对自由基的没有激发作用, 当浓度大于  $100\mu\text{g/ml}$ , AP II 清除  $\cdot\text{OH}$  自由基的效果较好, 随浓度的升高, 其清除自由基的效果增加, 在浓度为  $1000\mu\text{g/ml}$  时, 清除率可高达 96.4%。在相同条件下, AP III 清除  $\cdot\text{OH}$  自由基的效果最差。该结果表明, 苹果多酚提取物中清除  $\cdot\text{OH}$  自由基的成分主要为小分子的酚类物质及原花青素低聚体。

### 2.2.2 苹果多酚各组分对超氧阴离子自由基的清除作用

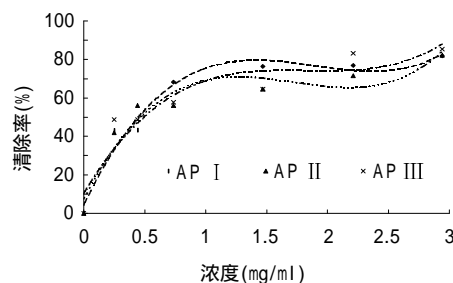


图 4 苹果多酚各组分对超氧阴离子自由基清除效果

Fig.4 Scavenging effects of different apple polyphenol extracts on  $\text{O}_2^{\cdot-}$

不同苹果多酚提取物对超氧阴离子自由基清除效果见图 4, 从图 4 可以看出, 随着样品浓度的增大, 不同苹果多酚提取物对超氧阴离子自由基的清除率呈显著的上升趋势, 在  $0\sim 1\text{mg/ml}$  浓度范围内这种上升趋势尤为明显, 随着样品浓度的进一步增大, 苹果多酚各组分对超氧阴离子的清除率变化不大, 在样品浓度为  $2.94\text{mg/ml}$  时, AP I、AP II、AP III 对超氧阴离子自由基的清除率基本相当, 分别为 81.87%、82.22%、83.27%, 多项回归分析表明 (表 2), AP I、AP II、AP III 对超氧阴离子自由基的清除率具有良好的正向剂量-效应多项线性关系。

表2 苹果多酚各组分对超氧阴离子自由基清除作用的剂量效应关系  
Table 2 The relationship of scavenging  $O_2^{\cdot-}$  effect of different apple polyphenol extracts with their doses

样品	方程	相关系数
AP C	$Y=13.408x^3-72.353x^2+128.5x+4.903$	0.9881
AP I	$Y=13.258x^3-75.174x^2+133.05x+4.2989$	0.9823
AP II	$Y=14.953x^3-77.303x^2+124.07x+7.42$	0.9644
AP III	$Y=10.727x^3-58.864x^2+106.71x+10.358$	0.9441

### 2.2.3 苹果多酚各组分对小鼠肝组织丙二醛(MDA)生成的影响

丙二醛生成的多少代表了脂质过氧化反应的程度<sup>[10]</sup>。不同苹果多酚提取物对小鼠肝组织匀浆丙二醛生成的影响见图5。在自发氧化条件下, 苹果多酚可抑制丙二醛的生成, 即具有抑制自发氧化条件下的脂质过氧化作用。

从图5还可以看出, 在浓度较低时(0~0.1mg/ml), AP I、AP II、AP III三种苹果多酚提取物对小鼠肝匀浆自发氧化生成MDA均有较好的抑制效果, 当浓度超过0.1mg/ml后, AP I对MDA的清除率随浓度的升高而下降, 而AP II、AP III对体系中MDA的清除率则随浓度的升高而升高, 在相同条件下, AP II清除MDA的效果比AP III强。

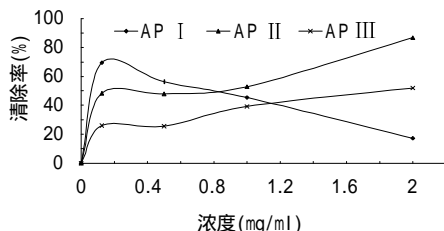


图5 苹果多酚各组分对小鼠肝组织自氧化生成MDA的影响  
Fig.5 Effects of different apple polyphenol extracts on MDA formation of rat liver incubated in vitro

## 3 结论

3.1 不同苹果多酚提取物对 $\cdot OH$ 自由基的清除效果不同, 在低浓度条件下(10~100 $\mu g/ml$ ), AP I清除 $\cdot OH$

自由基的效果较好, 且对自由基没有激发作用, 当浓度大于100 $\mu g/ml$ , AP II清除 $\cdot OH$ 自由基的效果最好, 表明, 苹果多酚提取物中清除 $\cdot OH$ 自由基的成分主要为小分子的酚类物质及原花青素低聚体。

3.2 不同苹果多酚提取物对超氧阴离子自由基的猝灭均表现出较好的剂量一效应线性关系, 在相同条件下, 不同苹果多酚提取物对超氧阴离子自由基的猝灭效果差别不大。

3.3 不同苹果多酚提取物对脂质体过氧化生成丙二醛均有一定的抑制作用, 但剂量一效应关系复杂。

### 参考文献:

- [1] 赵保路. 氧自由基和天然抗氧化剂[M]. 北京: 科学出版社. 1999. 77-153.
- [2] Marx J L. Oxygen free radicals linked to many diseases[J]. Science, 1987, 235: 529-531.
- [3] M M. Buck. 抗氧生物的可可提取物及其制备方法和应用[P]. 中国专利: 9519695, 1997.
- [4] 戚向阳, 王小红, 陈维军. 苹果中原花青素的提取分离研究[J]. 中国食品学报, 2001, 1(1): 30-35.
- [5] L.Yeap Foo, Yinrong lu. Isolation and identification of procyanidins in apple pomace[J]. Food Chemistry, 1999, 64: 511-518.
- [6] Barry H, John M, Okezie I. The deoxyribose method: A simple "Test-Tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals[J]. Analytical Biochemistry, 1987, 165: 215-219.
- [7] 许俊杰, 孟庆黎. 当归补血汤对人及大鼠血小板聚集性的影响[J]. 中药药理与临床, 1990, 6(5): 40-41.
- [8] 黄成钢, 蔡育军, 陈晓明, 等. 天门冬多糖的化学结构及体外抗氧化活性[J]. 药学学报, 2000, 35(5): 358-362.
- [9] Benoit Labarbe, Veronique Cheynier, et al. Quantitative fractionation of grape proanthocyanidins according to their degree of polymerization[J]. J Agric Food Chem, 1999, 47: 2719-2723.
- [10] 郭英, 蔡秀成, 陈秋丽, 等. 葡萄籽提取物的体外抗脂质过氧化作用[J]. 卫生研究, 2002, 31(1): 28-30.



## 美国采用回收聚酯料用于食品包装新工艺

美国古德伊尔公司采用一种新工艺对回收的聚酯饮料容器进行再加工, 使其重新用于食品包装。其方法是: 把粉碎的聚酯料清洗干净以后, 输送到一台高温低压反应器中, 在重新聚合之前, 将它原有的粘度作破坏处理后, 再进行加工。由于聚酯料被熔化并处于极其严格的反应条件下, 在重新聚合后所得到的产品能够达到食品容器的要求。