

苹果皮不同溶剂提取物抗氧化活性研究

李利华

(陕西理工学院化学与环境科学学院, 陕西汉中 723000)

摘要: 研究苹果皮不同溶剂提取物的抗氧化活性。依次用蒸馏水、60%乙醇、无水乙醇、乙酸乙酯提取苹果皮中的活性物质, 用Folin-Ciocalteu法测定提取物中总酚含量, 并以Vc为阳性对照, 通过测定对羟自由基($\cdot\text{OH}$)、超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)、亚硝酸盐(NO_2^-)的清除作用及总还原力, 比较评价4种提取物的抗氧化活性。苹果皮60%乙醇提取物总酚含量显著高于其他提取物; 在不同的抗氧化体系中, 苹果皮的4种不同溶剂提取物均具有不同程度的抗氧化活性且与质量浓度呈明显的量效关系, 60%乙醇提取物的抗氧化活性始终最强, 其清除 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 活性弱于Vc, 而清除 NO_2^- 活性和还原能力较强且高于Vc。苹果皮抗氧化活性物质主要是60%乙醇提取物。

关键词: 苹果皮; 抗氧化活性; 总酚

文章编号: 1673-9078(2012)11-1470-1473

Antioxidant Activities of Different Solvents Extracts from Apple Peels

LI Li-hua

(Chemical and Environmental Sciences, Shanxi University of Technology, Hanzhong 723000, China)

Abstract: To explore the antioxidant activities of different solvent extracts from apple peels. The extracts of the antioxidants from apple peels were extracted with distilled water, 60% ethanol, anhydrous ethanol and ethyl acetate, respectively. Using Vc as a positive control, antioxidant activities of the extracts were tested and compared by hydroxyl radicals($\cdot\text{OH}$) scavenging activity, superoxide radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$) scavenging activity, nitrite radical (NO_2^-) scavenging activity and reducing power, and the total phenols contents of the extracts were also determined by the Folin-Ciocalteu method. The contents of total phenols from the 60% ethanol extract were significantly higher than those in the other three extracts. All the four extracts exhibited antioxidant capacities in a significant dosage-dependent manner. The 60% ethanol extract had the strongest antioxidant activities, the scavenging capacity to $\cdot\text{OH}$ and $\text{O}_2^{\cdot-}$ of 60% ethanol extracts were weaker than Vc, but the scavenging capacity to $\text{O}_2^{\cdot-}$ and the reducing power were stronger than Vc. The antioxidant substances from apple peels were main in the 60% ethanol extract.

Key words: apple peels; antioxidant activities; total phenols

苹果 (*Malus domestica*), 蔷薇科苹果属, 是世界四大水果之一^[1], 在世界和我国果品市场中占有重要的地位。苹果富含钙、多种维生素和酸类物质, 同时还含有苹果多酚、果胶、类黄酮等, 具有很好的营养、保健作用, 近年来文献报道其具有很好的抗氧化和抗癌作用^[2-4]。苹果皮是蔷薇科植物苹果的果皮。已有研究表明, 苹果皮较果肉含有更多的酚类物质, 苹果皮具有更强的抗氧化性, 其抗氧化性较其他水果、蔬菜都高, 普通大小的苹果果皮抗氧化能力相当于820 mg Vc的抗氧化能力^[5-7]。但由于农药残留、空气污染等诸多不利因素, 人们在食用苹果时多将果皮弃去, 却不知在去除果皮的同时也丢弃了苹果最有营养价值的部

收稿日期: 2012-07-03

基金项目: 陕西理工学院校级重点资助科研项目 (SLGKY11-09)

作者简介: 李利华(1977-), 女, 硕士, 实验师, 研究方向: 天然产物有效成分的分析、检测

分。

目前, 有关苹果皮提取物抗氧化活性的研究报道较少^[8-9]。本研究分别选用4种不同的溶剂提取苹果皮中的抗氧化活性物质, 采用Folin-Ciocalteu法测定提取物中总酚含量, 通过测定提取物对羟自由基($\cdot\text{OH}$)、超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)、亚硝酸盐自由基(NO_2^-)的清除作用以及总还原力, 评价4种提取物的抗氧化活性, 并与合成抗氧化剂Vc进行比较; 旨在为苹果皮作为新型天然抗氧化剂的开发利用提供理论依据。

1 实验部分

1.1 材料、仪器与试剂

苹果, 市购, 将苹果清洗干净, 用不锈钢刀将果皮削下来, 放入40℃烘箱中干燥至恒质量, 粉碎, 过40目筛备用。

没食子酸对照品(纯度 $\geq 98\%$)中国药品生物制品检

定所；无水乙醇、乙酸乙酯、邻二氮菲、硫酸亚铁、邻苯三酚、铁氰化钾、亚硝酸钠、盐酸萘己二胺、抗坏血酸（Vc）等皆为国产分析纯，实验用水为二次蒸馏水。

TU-1810紫外-可见分光光度计，北京普析通用仪器有限公司；RE-52AA旋转蒸发器，上海亚荣生化仪器厂；TDL-5台式离心机，上海安亭科技仪器厂；电热鼓风干燥箱101型，北京科伟永兴仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品溶液的制备

准确称取苹果皮屑4份各10.0 g，分别加入蒸馏水、60%乙醇、无水乙醇、乙酸乙酯200 mL，50℃回流浸提3 h，过滤，滤液减压浓缩至干，用无水乙醇定容于25 mL容量瓶中，-4℃冷藏备用。

1.2.2 总酚含量的测定

采用Folin-Ciocalteu法^[10]。以没食子酸为标准品，得标准曲线方程为： $y=0.0424+3.9633x$ ， $R=0.9991$ ，线性范围为0.125~2.25 μg/mL。

样品测定方法：准确吸取待测样液1.0 mL于25 mL棕色容量瓶，加入FC试剂1.0 mL，充分混匀后加入7%碳酸钠溶液10 mL，用蒸馏水定容至刻度，30℃避光放置1 h，于766 nm测定吸光度值。平均测定3次，取平均值。根据标准曲线计算多酚类化合物的没食子酸当量(GAE)，计算公式如下：

$$GAE=(Y \times 25 \times n)/(m \times 1000)$$

式中：Y为根据标准曲线算得样品浓度值(mg/mL)；n为提取液稀释倍数；m为果皮称样量(g)。

1.2.3 清除羟基自由基($\cdot\text{OH}$)测定

采用邻二氮菲- Fe^{2+} 氧化法^[11]。向反应管中依次加入5 mmol/L邻二氮菲溶液1.0 mL，PBS缓冲液(pH 7.4) 3.8 mL和不同浓度样液1.0 mL，充分混匀，加5 mmol/L硫酸亚铁1.5 mL，混匀，加0.1%的过氧化氢1.0 mL，加水稀释至10 mL，37℃保持30 min，536 nm下测定其吸光度，记作 $A_{\text{样}}$ ；同上操作，不加双氧水作为未损伤管，测吸光值记为 $A_{\text{未损}}$ ；不加样品液作为损伤管，测吸光度为 $A_{\text{损}}$ 。配置同度浓度的Vc做阳性对照，按下式计算对 $\cdot\text{OH}$ 清除率：

$$\cdot\text{OH清除率}(\%)=(A_{\text{样品}}-A_{\text{损伤}})/(A_{\text{未损}}-A_{\text{损伤}}) \times 100$$

1.2.4 清除超氧阴离子自由基($\text{O}_2\cdot^-$)测定

采用邻苯三酚自氧化法^[12]。向反应管中依次加入0.05 mol/L pH 8.2的Tris-HCl缓冲液6.0 mL和不同浓度样液1.0 mL(空白管以1.0 mL蒸馏水代替)，充分混匀后于25℃水浴恒温25 min，加入8 mmol/L的邻苯三酚溶液1.0 mL，迅速混匀，准确反应4 min后加入浓HCl两滴溶液终止反应，于325 nm下测定吸光度。配置同度浓

度的Vc做阳性对照，按下式计算 $\text{O}_2\cdot^-$ 清除率：

$$\text{O}_2\cdot^-清除率/\%=(A_{\text{空白}}-A_{\text{样品}})/A_{\text{空白}} \times 100$$

1.2.5 清除亚硝酸盐(NO_2^-)测定

采用盐酸萘乙二胺法^[13]。向反应管中依次加入5 μg/mL的亚硝酸钠3.0 mL，pH 3.0柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液5.0 mL和不同浓度样液2.0 mL，混匀，于37℃保温15 min，取出后立即加入0.4%对氨基苯磺酸2 mL，摇匀，静置3~5 min，加入0.2%盐酸萘乙二胺1.0 mL，混匀，静置15 min，在538 nm波长处测定吸光度。分别以相应浓度样液做空白试验。配置同度浓度的Vc做阳性对照，按下式计算清除率：

$$\text{清除率}(\%)=(A_{\text{空白}}-A_{\text{样品}})/A_{\text{空白}} \times 100$$

1.2.6 总还原力测定

采用普鲁士蓝法^[14]。向反应管中依次加入0.2 mol/L磷酸钠缓冲液(pH 6.6) 2.5 mL，1%铁氰化钾溶液2.5 mL和不同浓度样液1.0 mL，混匀后于50℃保温20 min，快速冷却，加入2.5 mL 10%三氯乙酸之后混匀，于5000 r/min转速下离心10 min，取上层液体2.5 mL，加入2.5 mL去离子水和0.5 mL 0.1%三氯化铁，混匀，在700 nm下测定吸光度，吸光度越大，还原力越强。以同浓度样品溶液代替样品做空白试验。

1.2.7 数据处理

采用SPSS 16.0进行数据处理。每个实验重复3次，结果以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果与分析

2.1 总酚含量测定

苹果果皮4种不同溶剂的提取物中总酚的含量测定结果见表1。

表1 不同溶剂提取物的总酚含量 ($\bar{x} \pm s$, n=3)

Table 1 Contents of total phenol in different solvent extracts

from apple peels	
样品	总酚含量/(mg/g)
蒸馏水提取物	14.21±0.62
60%乙醇提取物	22.03±0.74
无水乙醇提取物	17.52±1.05
乙酸乙酯提取物	3.76±0.03

由表1可看出，苹果皮4种不同溶剂提取物总酚含量差异较大，60%乙醇提取物中总酚含量显著高于其他提取物，各提取物中总多酚含量依次为：60%乙醇提取物>无水乙醇提取物>蒸馏水提取物>乙酸乙酯提取物。

2.2 羟基自由基($\cdot\text{OH}$)清除作用实验结果

苹果皮提取物对 $\cdot\text{OH}$ 清除作用实验结果见表2。

表 2 苹果皮提取物对·OH的清除率 (% , x±s, n=3)

Table 2 Scavenging rates of different solvent extracts from apple peels on ·OH free radicals

样品	质量浓度/(mg/mL)				
	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
蒸馏水提取物	25.70±1.07	26.09±0.99	34.74±0.85	37.45±0.82	50.09±1.38
60%乙醇提取物	37.75±0.95	41.99±1.03	46.01±1.25	54.68±0.88	58.98±0.96
无水乙醇提取物	30.36±1.21	39.35±0.80	43.31±0.70	48.36±1.12	55.54±1.04
乙酸乙酯提取物	24.34±0.88	27.81±0.96	28.71±1.12	29.10±0.90	29.66±0.75
Vc	39.90±1.19	45.61±1.33	52.44±0.81	60.34±0.85	63.66±1.01

由表 2 可看出, 在实验浓度范围内, 各提取物对邻二氮菲-Fe²⁺-H₂O₂产生的·OH均有一定的清除作用, 且随其浓度的增加清除率逐渐增大, 4 种提取物清除·OH的强弱顺序为: 60%乙醇提取物>无水乙醇提取物>蒸馏水提取物>乙酸乙酯提取物; 对比 Vc 可见,

苹果皮 4 种不同溶剂提取物·OH 的清除作用均不及 Vc。

2.3 超氧自由基 (O₂⁻) 清除作用实验结果

苹果皮提取物对 O₂⁻清除作用的实验结果见表 3。

表 3 苹果皮提取物对 O₂⁻的清除率 (% , x±s, n=3)

Table 3 Scavenging rates of different solvent extracts from apple peels on O₂⁻ free radicals

样品	质量浓度/(mg/mL)				
	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
蒸馏水提取物	33.23±1.36	37.39±0.88	40.19±1.59	46.61±1.22	48.92±0.94
60%乙醇提取物	42.09±0.51	46.49±1.64	56.93±1.45	59.71±0.67	67.05±2.06
无水乙醇提取物	31.48±1.30	33.44±0.91	36.54±1.58	38.50±1.06	41.92±1.79
乙酸乙酯提取物	38.90±0.48	41.10±0.94	51.65±1.23	54.49±1.84	57.95±0.97
Vc	49.50±2.12	57.50±0.63	64.51±1.42	83.67±0.76	86.17±1.44

由表 3 可知, 各提取物对 O₂⁻均有一定的清除作用, 且与浓度呈量效关系; 在实验范围内, 各提取物对 O₂⁻最大清除率分别为: 48.89% (水提取物), 67.05% (60%乙醇提取物), 41.42% (无水乙醇提取物), 57.95% (乙酸乙酯提取物), 清除 O₂⁻强弱顺序为: 60%乙醇提取物>乙酸乙酯提取物>蒸馏水提取物>无水乙

醇提取物。与 Vc 比较, 实验范围内 Vc 对 O₂⁻最大清除率为 86.17%, 可得出同等条件下 4 种提取物·OH 的清除作用均低于 Vc。

2.4 亚硝酸盐 (NO₂⁻) 清除作用实验结果

苹果皮提取物对 NO₂⁻清除作用的实验结果见表 4。

表 4 苹果皮提取物对 NO₂⁻的清除率 (% , x±s, n=3)

Table 4 Scavenging rates of different solvent extracts from apple peels on NO₂⁻ radicals

样品	质量浓度/(mg/mL)				
	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
蒸馏水提取物	44.69±0.72	57.50±0.95	65.31±1.22	74.06±1.50	76.88±0.36
60%乙醇提取物	58.24±0.69	71.18±1.40	82.94±2.15	85.00±0.71	88.24±1.35
无水乙醇提取物	47.01±2.17	60.88±1.30	69.12±0.74	76.35±1.03	78.41±0.65
乙酸乙酯提取物	33.33±0.53	39.64±1.54	45.74±1.80	50.14±0.38	56.55±0.58
Vc	50.02±0.67	66.47±1.63	79.57±1.70	82.66±0.55	86.69±1.68

由表 4 可看出, 各提取物对 NO₂⁻均有一定的清除作用, 且清除效果与样品浓度量效关系显著; 在实验浓度范围内, 4 种提取物清除 NO₂⁻强弱顺序为: 60%乙醇提取物>无水乙醇提取物>蒸馏水提取物>乙酸乙酯提取物, 其中无水乙醇提取物与蒸馏水提取物对

NO₂⁻的清除能力相近; 比较 Vc 可见, 同等条件下 60%乙醇提取物对 NO₂⁻的清除能力略强于 Vc, 其他 3 种提取物对 NO₂⁻的清除能力不及 Vc。

2.5 总还原力实验结果

苹果皮提取物总还原力测定的实验结果见表 5。

表5 苹果皮提取物的还原能力 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 5 Reducing power of different solvent extracts from apple peels

样品	质量浓度/(mg/mL)				
	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
蒸馏水提取物	0.377±0.002	0.602±0.004	0.988±0.001	1.061±0.003	1.255±0.004
60%乙醇提取物	0.570±0.003	0.984±0.002	1.438±0.001	1.699±0.002	2.232±0.003
无水乙醇提取物	0.469±0.004	0.786±0.001	1.151±0.003	1.467±0.002	1.834±0.002
乙酸乙酯提取物	0.244±0.002	0.395±0.004	0.526±0.000	0.618±0.002	0.748±0.003
Vc	0.328±0.003	0.485±0.005	0.723±0.002	0.903±0.004	1.111±0.001

由表5可知,在实验浓度范围内各提取物的还原力均随其样品浓度的增大而增强,4种提取物总还原力强弱顺序为:60%乙醇提取物>无水乙醇提取物>蒸馏水提取物>乙酸乙酯提取物;与Vc比较可见,苹果皮的蒸馏水提取物、60%乙醇提取物和无水乙醇提取物的还原能力强于Vc,乙酸乙酯的提取物的还原能力不及Vc。

3 结论

3.1 本研究选取蒸馏水、60%乙醇、无水乙醇、乙酸乙酯4种不同溶剂提取苹果皮中活性物质,在测定提取物中总酚含量的基础上,通过测定提取物对羟自由基($\cdot\text{OH}$)、超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)、亚硝酸盐(NO_2^-)的清除作用及总还原力,评价4种提取物的抗氧化活性,并与合成抗氧化剂Vc进行比较。结果表明:不同溶剂提取物多酚含量差异较大,4种提取物中60%乙醇提取物中总酚含量最高,为 $22.03 \pm 0.74 \text{ mg/g}$,显著高于其他提取物;在不同的抗氧化体系中,4种不同溶剂提取物均具有不同程度的抗氧化活性且与其质量浓度呈量效关系,但抗氧化活性强弱顺序各不相同,就本实验所选的4种体系来说,苹果皮60%乙醇提取物的活性始终是最强的,其清除 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 活性弱于Vc,而清除 NO_2^- 活性和还原能力较强且高于Vc,这就进一步证实了苹果皮中的抗氧化活性物质主要存在于60%乙醇提取物中。

3.2 本研究结果揭示,苹果皮提取物具有较强的抗氧化活性;这预示着它在医学及人类保健事业上有潜在的利用价值,为苹果皮抗氧化物质的进一步研究与开发奠定了基础。

参考文献

[1] 宋焱.苹果加工品种生物学特性研究[D].泰安:山东农业大

学,2006

- [2] WU Jihong, GAO Haiyun, ZHAO Lei, et al. Chemical compositional characterization of some apple cultivars [J]. Food Chemistry, 2007, 103(1): 88-93
- [3] 裴迎新.苹果提取物与叶黄素对食管癌细胞的抗癌活性及标志物筛选[D].成都:四川大学,2007
- [4] 丁秀玲,张京芳,韩明玉.不同品种苹果化学成分及抗氧化活性比较[J].食品科学,2011,32(21):41-47
- [5] 藏靖魏,陈宗道,赵国华,等.苹果皮的研究进展[J].中国食品添加剂,2004,1:24-26
- [6] 郭建丽,夏道宗,潘东曼.苹果皮复合袋泡茶的研发及其抗氧化特性研究[J].粮油食品科技,2011,19(1):59-61
- [7] Reagan-Shaw S, Eggert D, Mukhtar H, et al. Antiproliferative effects of apple peel extract against cancer cell [J]. Nutrition and Cancel, 2010, 62 (4): 517-524
- [8] 王萍,梁申,杨顶成.苹果皮提取物中抗氧化物质的研究[J].食品工业科技,2007,28(8):97-99
- [9] Kelly Wolfe, Xianzhong Wu, Ruihai Liu. Antioxidant Activity of Apple Peels [J]. J Agric Food Chem, 2003, 51: 609-614
- [10] 曹炜,索志荣.Folin-Ciocalteu 比色法测定蜂蜜中总酚酸的含量[J].食品与发酵工业,2003,29(12):80-82
- [11] 吕明生,王淑军,房耀维,等.超声波提取雪莲薯多糖工艺优化及其对羟自由基的清除[J].食品科学,2011,32(2):24-27
- [12] 张兴茂,吴辉,赖富饶.酱油渣蛋白水解产物抗氧化性研究[J].现代食品科技,2011,27(10):1200-1204
- [13] 郭艳华,胡思前.葶苈皮提取物对亚硝化反应抑制作用研究[J].食品与机械,2008,24(3):64-66
- [14] TUNG Yutang, WU Jhyhorng, HUANG Chihyu, et al. Antioxidant activities and phytochemical characteristics of extracts from *Acacia confusa* bark [J]. Bioresource Technology, 2009, 100(1): 509-514