

山茱萸果核不同产地间的抗氧化活性研究^{*}

张婷¹ 姜海慧¹ 冯石卜¹ 宋小妹^{1,2} 姜祎^{1,2} 张化为^{1,2} 邓翀^{1,2**}

(1. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046; 2. 陕西省中药基础与新药研究重点实验室, 陕西 咸阳 712046)

摘要: **目的** 比较来自陕西省内的三个不同产地山茱萸果核的抗氧化活性, 为山茱萸果核资源的综合开发提供参考。 **方法** 以汉中市宁强县、汉中市洋县和宝鸡市凤县三个产地的山茱萸果核为原料, 分别以石油醚、无水乙醇和水为提取溶剂, 通过测定上述不同提取部位对 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 自由基的清除能力评价其抗氧化活性。 **结果** 来自宁强县、凤县和洋县的山茱萸果核石油醚部位清除 DPPH 自由基能力较低; 无水乙醇部位清除 DPPH 自由基的 IC₅₀ 值分别为 0.0038 mg·mL⁻¹, 0.0231 mg·mL⁻¹, 0.0207 mg·mL⁻¹; 水部位清除 DPPH 自由基的 IC₅₀ 值分别 0.0134 mg·mL⁻¹, 0.0437 mg·mL⁻¹, 0.0250 mg·mL⁻¹。 **结论** 来自三个产地的山茱萸果核的三个提取部位均有抗氧化活性, 其中汉中市宁强县山茱萸果核的无水乙醇提取部位活性最佳。

关键词: 山茱萸; 果核; 抗氧化活性; 提取部位

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 2096-1340(2023)02-0023-04

DOI: 10.13424/j.cnki.jscetcm.2023.02.004

Study on Antioxidant Activity of Fructus Corni Fruit Core from Different Places of Origin

ZHANG Ting¹ JIANG Haihui¹ FENG Shibub¹ SONG Xiaomei^{1,2}

JIANG Yi^{1,2} ZHANG Huawei^{1,2} DENG Chong^{1,2}

(1. Shaanxi University of Chinese Medicine, Shaanxi Xianyang 712046, China; 2. Shaanxi Provincial

Key Laboratory of Basic and New Drug Research of Chinese Medicine, Shaanxi Xianyang 712046, China)

Abstract: **Objective** To compare the antioxidant activity of cornus officinalis from three different areas in Shaanxi Province, and provide reference for the comprehensive development of cornus officinalis seed resources. **Methods** Fructus corni Fruit Core from Ningqiang County, Yangxian County, Hanzhong City and Fengxian County, Baoji City were used as raw materials, and petroleum ether, anhydrous ethanol and water were used as extraction solvents respectively. The antioxidant activity of the extracts was evaluated by measuring the scavenging ability of the different extracts to 1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine (DPPH) free radicals. **Results** The petroleum ether fraction of Fructus corni Fruit Core from Ningqiang County, Fengxian County and Yangxian County had low ability to scavenge DPPH free radicals; The IC₅₀ values of DPPH free radical scavenging in anhydrous ethanol were 0.0038 mg·mL⁻¹, 0.0231 mg·mL⁻¹ and 0.0207 mg·mL⁻¹, respectively; The IC₅₀ values of DPPH free radical scavenging in water were 0.0134 mg·mL⁻¹, 0.0437 mg·mL⁻¹ and 0.0250 mg·mL⁻¹, respectively. **Conclusion** The three extracts of Fructus corni Fruit Core from three producing areas have antioxidant activity, and the ethanol extract of cornus officinalis from Ningqiang County, Hanzhong City has the best activity.

Key words: Cornus officinalis Sieb. et Zucc.; Core; Antioxidant activity; Extraction site

* 基金项目: 陕西省科技厅重点科研项目(2021SF-367); 陕西省教育厅重点科研项目(18JS028); 陕西中医药大学学科创新团队项目(2019-YL12)

** 通讯作者: 邓翀, 教授。E-mail: 2051079@sntcm.edu.cn

山茱萸果核系山茱萸科山茱萸属植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果核。山茱萸果核里面有多种成分,分别有多酚类、脂类、有机酸类、环烯醚萜类、鞣制类和五环三萜酸类等^[1-8],其果核在抗病毒、抗炎症和抗氧化等方面都有着显著的功效^[9-10]。其中的多酚类、没食子酸、熊果酸、莫诺昔和马钱子苷等都具有抗氧化作用^[11-15],对于研究山茱萸果核在抗氧化的作用有潜在意义。

唐凯等^[16]通过对比河北、山西和陕西等地 14 批次的山茱萸果核,以没食子酸、莫诺昔、5-羟甲基糠醛和原儿茶酸为评价指标,主成分分析结果排序前 5 名的产地均为陕西省汉中和宝鸡两市,故本研究采集陕西省汉中市和宝鸡市的山茱萸果核,以 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)清除自由基能力为评价指标,进一步对三个产地的山茱萸果核进行差异分析^[17-20]。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 98-1-B 型电子调温电热套(天津市泰斯特仪器有限公司);DZKW-4 型电子恒温水浴锅(北京中兴伟业仪器有限公司);N-1300 型旋转蒸发仪(上海爱郎仪器有限公司);KQ-500DE 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);A-1000S 型水流抽气机(上海爱郎仪器有限公司);EX125ZH 型电子分析天平(奥豪斯仪器有限公司);ELX800 型酶标仪(美国伯腾仪器有限公司)。

1.2 试剂 山茱萸果核分别采集于陕西省汉中市宁强县、洋县和宝鸡市凤县三个产地(经陕西中医药大学王薇教授鉴定为山茱萸科山茱萸属植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 干燥的成熟果核);DPPH(批号:D9132,美国 Sigma 公司);维生素 C 对照品(批号:DH030-1,科昊生物工程有限公司);石油醚(60~90℃)(天津市天力化学试剂有限公司);无水乙醇(天津市天力化学试剂有限公司);纯净水。

2 方法和结果

2.1 供试品溶液的制备 分别称取宁强县、宝鸡凤县、洋县三种不同产地干燥的山茱萸果核,粉碎,过 1 号筛,加入 10 倍量石油醚回流提取 5 h,将提取液抽滤、浓缩得到石油醚提取物,收率分别为 6.31%、7.74% 和 6.54%。将石油醚提取过的山茱萸果核干燥后,加 10 倍量无水乙醇回流提取 5 h,抽滤,滤液旋转蒸发得无水乙醇提取物,收率

分别为 22.06%、20.85% 和 17.66%。将用石油醚和无水乙醇提取过的山茱萸果核干燥后,加 10 倍量的水回流提取 5 h,抽滤,滤液直接蒸发后得水提取物,收率分别为 4.73%、6.77% 和 6.34%。

2.2 DPPH 清除自由基活性的测定方法^[21-22] 在 DPPH 自由基活性测定中,本实验采用天然的抗氧化剂 VC 作阳性药^[23-24],按清除率公式进行计算:清除率(%) = $(1 - (A_1 - A_2) \div A_0) \times 100\%$ (A_0 :无水乙醇 + DHHP 溶液; A_1 :DPPH 溶液 + 样品; A_2 :无水乙醇 + 样品)。

2.3 DPPH 浓度的确定 分别将 2 mmol·L⁻¹、1 mmol·L⁻¹、0.5 mmol·L⁻¹、0.25 mmol·L⁻¹、0.125 mmol·L⁻¹ 不同浓度的 DPPH 溶液(200 μL)和无水乙醇溶液(200 μL)进行 1:1 混合,精密吸取 200 μL 到 96 孔板中,避光反应 30 min,在 517 nm 处测定吸光度(A),每组平行三次取平均值,A 取值在 1.2~1.3 之间最佳。不同浓度的混合溶液对应的吸光度值分别为 2.979,1.498,1.257,0.774,0.616,0.508,其中 0.5 mmol·L⁻¹ DPPH 所对应的吸光度 A 为 1.257,因此本次实验采取的 DPPH 浓度为 0.5 mmol·L⁻¹,需现配现用。

2.4 不同浓度 VC 对清除 DPPH 自由基的影响 精密称取 0.0010 g 的 VC 粉末,置于 10 mL 的容量瓶中,无水乙醇定容,即得浓度为 0.1000 mg·mL⁻¹ 的 VC 溶液,并将该溶液依次稀释为 0.0500 mg·mL⁻¹,0.0250 mg·mL⁻¹,0.0125 mg·mL⁻¹,0.0062 mg·mL⁻¹,0.0031 mg·mL⁻¹,0.0015 mg·mL⁻¹,将稀释的溶液(200 μL)与无水乙醇(200 μL)1:1 混合,避光反应 30 min,测定吸光度。以浓度为横坐标,以清除率为纵坐标,绘制曲线,如图 1 所示。

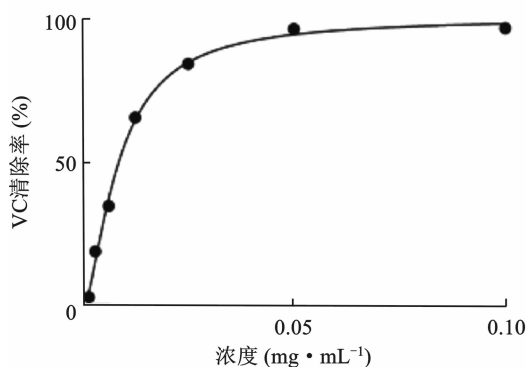


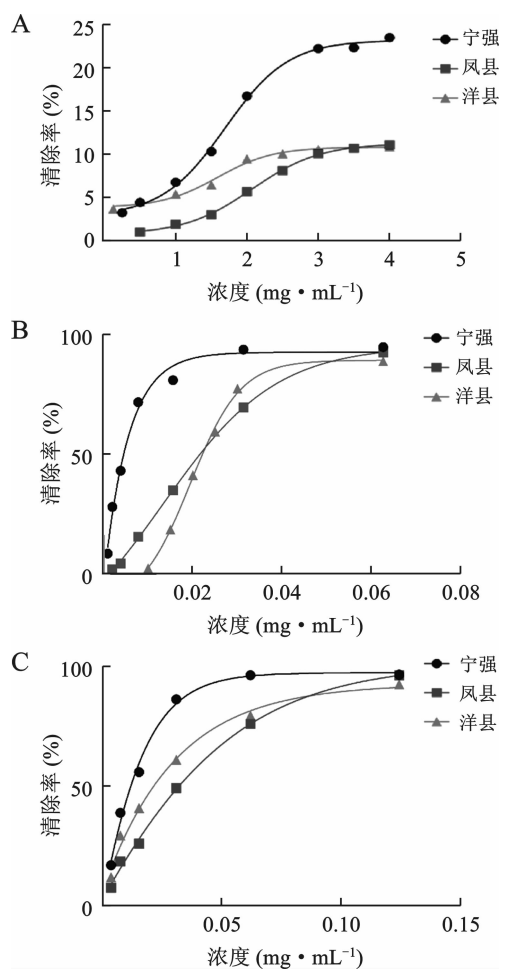
图 1 不同浓度 VC 对 DPPH 自由基清除率的影响

2.5 不同产地的山茱萸果核对 DPPH 自由基清除率的影响 分别精密称取来自三个不同产地的山茱萸果核的石油醚部位,无水乙醇部位和水部位的提取物 100 mg,依次加入无水乙醇,定容至 25 mL,按照一定的比例分别进行稀释,稀释的样品溶液(200 μ L)与无水乙醇(200 μ L)1:1混合,精密吸取 200 μ L 到 96 孔板中,避光反应 30 min,测定吸光度,计算清除率,结果如图 2 所示。

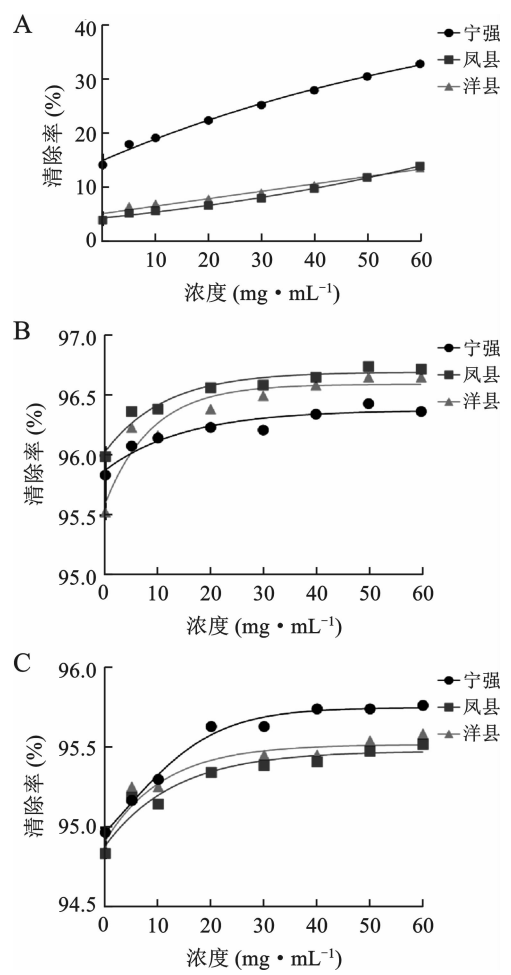
2.6 不同产地的山茱萸果核及 VC 清除 DPPH 自由基的 IC₅₀ 分析 IC₅₀(50% inhibiting concentration,半抑制浓度),它是指当自由基的清除率达到 50%时样品的浓度,IC₅₀ 值越小,说明样品对自由基清除的效果越好。本研究采用 Graphpad Prism 8 软件计算 IC₅₀ 值。因宁强县、凤县和洋县的山茱萸果核石油醚部位对 DPPH 的清除率未达到

50%,故无法计算 IC₅₀ 值。经过数据计算分析,宁强县、凤县和洋县的山茱萸果核无水乙醇部位清除 DPPH 的 IC₅₀ 值分别为 0.0038 mg \cdot mL⁻¹, 0.0231 mg \cdot mL⁻¹,0.0207 mg \cdot mL⁻¹;水部位清除 DPPH 的 IC₅₀ 值分别为 0.0134 mg \cdot mL⁻¹,0.0437 mg \cdot mL⁻¹,0.0250 mg \cdot mL⁻¹。

2.7 不同产地的山茱萸果核与 DPPH 反应时间对 DPPH 清除率的影响 分别精密称取来自三个不同产地的山茱萸果核的石油醚部位,无水乙醇部位和水部位的提取物 100 mg,依次加入无水乙醇,定容至 25 mL,精密吸取 200 μ L,加入到 96 孔板中,分别在 0 min,5 min,10 min,20 min,30 min,40 min,50 min,60 min 时间测定其吸光度,计算清除率^[25]。结果如图 3 所示。



注:A. 石油醚部位;B. 无水乙醇部位;C. 水部位
图2 不同产地山茱萸果核的各提取部位对 DPPH 自由基清除率的影响



注:A. 石油醚部位;B. 无水乙醇部位;C. 水部位
图3 不同产地山茱萸果核的各提取部位与 DPPH 反应时间对清除率的影响

3 讨论

本实验采用 DPPH 法,以 VC 为阳性对照,对不同产地山茱萸果核的石油醚部位、无水乙醇部位和水部位进行体外抗氧化活性研究,其方法灵敏,快速。实验结果表明,三个产地的山茱萸果核各提取部位均有抗氧化活性。从 IC₅₀ 结果分析可以得出:三个产地的抗氧化性强弱为:宁强县 > 洋县 > 凤县,且宁强县山茱萸果核的无水乙醇部位的抗氧化活性最强。

山茱萸果核的抗氧化活性可能与多酚类、没食子酸、熊果酸、莫诺昔和马钱子苷等成分相关,其无水乙醇部位具有较好的抗氧化活性,表明山茱萸果核是具有一定活性的物质,其可以在山茱萸使用后继续加以利用,而不是被当作废物直接丢弃^[26]。实验结果也为进一步开发,利用山茱萸果核奠定了基础,对其在抗氧化方面的用途提供了依据。

参考文献

- [1] 南美娟,唐凯,崔银萍,等. 山茱萸果核的研究进展[J]. 陕西中医药大学学报,2018,41(5):149-151,155.
- [2] 李军,姜华,路西明,等. 山茱萸果核化学成分研究[J]. 中国药理学杂志,2021,56(15):1210-1214.
- [3] 周迎春,张廉洁,张燕丽. 山茱萸化学成分及药理作用研究新进展[J]. 中医药信息,2020,37(1):114-120.
- [4] 李筱玲,邓寒霜,吴瑞宁. 超声法提取山茱萸果核多酚工艺研究[J]. 商洛学院学报,2017,31(4):62-65.
- [5] 杨晖,和素娜,李杰,等. HPLC 法测定山茱萸果核中 5 种有机酸的含量[J]. 河南科技大学学报(医学版),2015,33(3):161-163.
- [6] 彭勃,季玉荣. 山茱萸果核与果肉化学成份的对比分析[J]. 河南中医药学刊,1999,14(2):13-14.
- [7] 徐丽珍,李慧颖,田磊,等. 山茱萸化学成分的研究[J]. 中草药,1995,26(2):62-65.
- [8] 梁晋如. 山茱萸的化学成分及其生物活性研究[D]. 西安:西北大学,2014.
- [9] 付桂香,李建民,周勇,等. 山茱萸总苷抗炎免疫抑制作用及其机理的大鼠实验研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2007,27(4):316-320.
- [10] 朱丹,徐少军,杜梨果,等. 山茱萸及其果核的研究现状[J]. 河南科技大学学报(医学版),2011,29(4):312-315.
- [11] 李军,姜华,张宁,等. 山茱萸果核中白桦脂酸和熊果酸含量测定[J]. 中国民族民间医药,2021,30(16):45-48.
- [12] 南美娟,邓肿,张化为,等. 山茱萸果核不同提取物体外抗氧化活性[J]. 辽宁中医药大学学报,2019,21(3):64-67.
- [13] 胡志红,林搏浩,王晓娜,等. 山茱萸果核水提取物对 D-半乳糖衰老老模型小鼠抗氧化能力的影响[J]. 中国老年学杂志,2016,36(16):3906-3908.
- [14] 李晓明,姜华,李军,等. 山茱萸果核中多酚的抗氧化活性研究[J]. 时珍国医国药,2012,23(4):902-903.
- [15] 温媛媛,王雷,王硕,等. 山茱萸中活性成分的提取分离及其抗氧化活性研究综述[J]. 世界最新医学信息文摘,2018,18(92):44-46,48.
- [16] 唐凯,南美娟,张化为,等. HPLC 法同时测定不同产地山茱萸果核中 4 种成分[J]. 中成药,2020,42(3):670-675.
- [17] 贺维涛,年婧,赵重博. 不同产地黄精多糖含量、多糖红外光谱及抗氧化活性研究[J]. 现代中医药,2022,42(6):51-55.
- [18] 陈细钦,王灿红,冯剑,等. 6 种代表性沉香精油的化学成分及抗氧化、抗炎活性比较分析[J]. 中草药,2022,53(18):5720-5730.
- [19] 王燕萍,贾旭森,牛伟霞,等. 新鲜党参酵母菌固体发酵工艺优化及其有效成分、抗氧化活性研究[J]. 中成药,2022,44(11):3428-3433.
- [20] 冀频,翟鹏涛,张梦璇,等. 野葛总黄酮的提取工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 中国酿造,2022,41(10):172-176.
- [21] 冀麟麟,王欣,钟祥健,等. 山茱萸的化学成分及其抗氧化活性[J]. 现代食品科技,2019,35(5):137-143,36.
- [22] 冯改利,宋小妹,邓肿,等. DPPH 法筛选大血藤抗氧化活性有效部位[J]. 陕西中医,2011,32(9):1233-1235.
- [23] 张远芳,周宝莹,张云智,等. 枫杨叶不同极性部位体外抗氧化活性研究[J]. 湘南学院学报,2022,43(5):14-18.
- [24] 李艳荣,杜义龙,赵胜男,等. 基于指纹图谱及体外抗氧化活性试验的灯盏花标准汤剂的质量评价[J]. 天然产物研究与开发,2022,34(6):941-953.
- [25] 冯改利,邓肿,董媛媛. 柚子内外果皮的抗氧化活性研究[J]. 陕西中医学院学报,2012,35(5):92-93.
- [26] 王韶君,王耀辉,李成海,等. 不同产地山茱萸种子中油脂含量及脂肪酸组成分析[J]. 植物资源与环境学报,2016,25(3):112-114.

(修回日期:2022-12-06 编辑:崔春利)