

板栗花粗提物的抗氧化活性研究

吴雪辉¹, 张喜梅², 李廷群¹, 林燕¹, 梅灿辉¹

(1. 华南农业大学食品学院, 广东 广州 510642) (2. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640)

摘要: 采用微波、超声波和常规加热回流三种不同方法提取板栗花中有效成分, 通过自由基体系和亚硝酸盐体系研究板栗花粗提物的抗氧化性能。结果表明, 三种提取方法获得的板栗花粗提物都具有良好的抗氧化活性, 均能有效清除 DPPH·和·OH, 其最高清除率分别达 92.8%和 54.3%; 3 种提取物对清除亚硝酸盐及阻隔亚硝胺合成也有较好的效果, 最高可达 72.9%和 89.9%, 但对 O₂^{-·}的清除作用都不明显。

关键词: 板栗花; 提取物; 抗氧化; 自由基; 亚硝酸盐

中图分类号: S664.2; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)01-0014-04

Study on Antioxidant Activity of Crude Extract from Chestnut Flower

WU Xue-hui¹, ZHANG Xi-mei², LI Ting-qun¹, LIN Yan¹, MEI Can-hui¹

(1. College of Food Science, South China Agricultural of University, Guangzhou 510642, China)

(2. College of Light Industry and Food Science South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The effective component was extracted from chestnut flower by three methods, including microwave, ultrasound and conventional reflux extraction. The antioxidant activities of the crude extracts were studied through free radical system and nitrite system. The results showed that all of the crude extracts of chestnut flower obtained by the three extraction methods had good antioxidant activity, which could effectively eliminate DPPH· and ·OH with the maximal elimination-rate being of 92.8% and 54.3%, respectively. Besides, the three kinds of extracts could eliminate the nitrite and block the synthesis of nitrosamine with the highest elimination rate and blocking rate being of 72.9% and 89.9%, respectively, while they had little effect on the elimination of O₂^{-·}.

Key words: chestnut flower; extract; antioxidant; free radical; nitrite

板栗花为壳斗科 (Fagaceae) 栗属植物栗 (*Castanea mollissima* Blume) 的雄性花序。板栗是雌雄异花同株果树, 雌花少, 雄花多, 同一植株的雌雄花比达 1:349, 为了提高板栗的产量, 常需要疏除雄花, 疏雄后只保留树冠边缘部分 5%~10%的雄花序, 足够授粉所需^[1]。

近年来, 随着板栗种植面积的扩大, 板栗雄花日益增多, 成为板栗生产中的废弃物, 造成极大的资源浪费。据《中药大辞典》记载, 板栗花具有治泻痢、便血、瘰疬、日久赤白痢疾、大肠下血、小儿消化不良及腹泻等功效^[2], 民间用于治疗久治不愈的腹泻。唐文照等对板栗花的化学成分进行了研究, 从乙酸乙酯部位分离鉴定出杨梅树皮素、槲皮素、没食子酸 (III)、4-喹啉酮-2-羧酸和 (+)-异落叶松树脂醇-9'-0- α -L-鼠李糖苷等 5 个化合物^[3]。本文作者的初步研究表明, 板栗花中含有丰富的花黄酮类物质, 在探讨其提取工艺的基础上^[4], 进一步研究其提取物的抗氧化作用, 以期板栗花的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器设备

板栗花: 采集于华南农业大学经济林研究中心板栗园, 经干燥、粉碎后过筛, 备用。

芸香叶苷 (芦丁 Rutin): 中国医药 (集团) 上海化学试剂公司, 生化试剂 (BR)。

无水乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、DPPH· (1,1-二苯基-2-苦肼基自由基)、硫酸亚铁、双氧水、水杨酸、邻苯三酚、Tris (三羟甲基氨基甲烷)、对氨基苯磺酸、盐酸萘己二胺、二甲胺、 α -苯胺: 均为分析纯。

UV755B 紫外可见分光光度计: 上海精密科学仪器有限公司; DK-8D 电热恒温水浴锅: 上海森信实验仪器有限公司; 78-1 磁力加热搅拌器: 杭州仪表电机厂; pHs-3C 酸度计: 上海雷磁仪器厂; 旋转蒸发器: 上海亚荣生化仪器厂; SHZ-D(III) 循环水式真空泵: 巩义市英峪予华仪器厂; NP-B-38-250 型旋转式超声波聚焦处理器: 广州新栋力超声电子设备有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 板栗花提取物的制备

采用加热回流、微波和超声波 3 种不同方法进行提取, 取一定粉碎度的板栗花粉末 4.000 g, 加入 200 mL 60%乙醇溶液, 分别在 90 °C 水浴回流提取 2 h、480 W 微波功率下提取 2 min、250 W 功率下超声提取 15 min, 抽滤、定容, 取 50 mL 用旋转蒸发仪浓缩到一定体积(有效成分黄酮类化合物含量相同), 即得板栗花提取液, 备用。

1.2.2 板栗花提取物对 DPPH·抑制率测定^[5]

精确吸取不同质量浓度的板栗花提取液 0.20 mL, 加入 4 mL 5×10^{-5} mol/L 的 DPPH·溶液, 摇匀后放置 30 min, 以样品溶剂作对照, 测定 517 nm 处的吸光值 A, 同时测定样品溶液在 517 nm 处的吸光值 A_0 , DPPH·溶液在 517 nm 处的吸光值 A_1 , 按下式计算其抑制率。

$$\text{抑制率}/\% = \left(1 - \frac{A - A_0}{A_1}\right) \times 100\%$$

其中, A -样品组与 DPPH·溶液混合后的吸光值; A_0 -样品组的吸光值; A_1 -DPPH·溶液的吸光值。

1.2.3 板栗花提取物对·OH 清除率的测定^[6]

利用 Fenton 反应法产生·OH, 以·OH 氧化水杨酸产生有色物质, 该产物在 510 nm 处有强吸收峰。若体系中加入清除·OH 的物质, 则会减少有色物质生成, 降低吸光度^[6]。具体操作为: 取若干支 25 mL 的比色管, 加入 9 mmol/L FeSO_4 1 mL、9 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液 2 mL, 不同浓度的板栗花提取液 2 mL, 最后加入 8.8 mmol/L H_2O_2 2 mL 启动反应, 于室温下反应 1 h。以蒸馏水调零, 在 510 nm 处测定样品的吸光度 A。按下式计算其清除率。

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

式中, A_0 -空白对照液的吸光度; 以蒸馏水代替样品液的吸光度; A -样品组的吸光度; A_1 -样品溶液本身的吸光度, 以蒸馏水代替显色剂的吸光度。

1.2.4 板栗花提取物对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除率的测定^[7]

采用邻苯三酚氧化法^[5]。具体操作为: 在 25 mL 的比色管中加入 3 mL Tris-HCl 缓冲液 (pH=8.2), 0.1 mL 不同浓度的板栗花提取液, 25 °C±0.5 °C 水浴平衡 20 min 后, 加入 0.3 mL 7 mmol/L 的邻苯三酚准确反应 4 min, 加入 1 mL 10 mol/L HCl 终止反应, 在 420 nm 处测吸光度 A, 按下式计算清除率。

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

式中, A_0 -空白对照液的吸光度; 以蒸馏水代替样品液的吸光度; A -样品组的吸光度; A_1 -样品溶液本身的吸光度, 以蒸

馏水代替显色剂的吸光度。

1.2.5 板栗花提取物对亚硝酸盐清除率的测定^[8]

取已知浓度的板栗花提取液 2 mL 于 25 mL 容量瓶, 加入 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 NaNO_2 标准溶液 3 mL, 加入柠檬酸-磷酸缓冲溶液 (pH=3.0) 5 mL, 37 °C 下反应 30 min, 立即加入 2 mL 0.4% 对氨基苯磺酸溶液, 混匀, 静置 3~5 min 后, 加入 1 mL 0.2% 盐酸萘己二胺溶液, 加蒸馏水至刻度, 混匀, 静置 15 min, 以 5 mL 提取液为空白, 在 544 nm 处测吸光度。按下式计算 NO_2^- 的清除率。

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

式中, A_0 - NO_2^- 的溶液吸光度; A -样品组的吸光度。

1.2.6 板栗花提取物对亚硝胺合成的阻隔试验^[9]

在 25 mL 容量瓶中加入 2 mL 不同浓度板栗花提取物, 模拟胃液 12.5 mL, 1 mmol/L NaNO_2 1.25 mL, 1 mmol/L 二甲胺 1.25 mL, 用蒸馏水定容到刻度, 在 37 °C 下恒温 1 h, 用移液管吸取 1.0 mL 上述反应液到试管中, 加入 0.5% 的 NaCO_3 溶液 0.5 mL, 紫外灯照射 15 min, 取出后加入 1% 对氨基苯磺酸溶液 1.5 mL, 0.1% 的 α -苯胺 1.5 mL, 加蒸馏水至溶液体积精确为 5.0 mL, 摇匀放置 15 min 后, 用分光光度计在 525 nm 处测吸光度。按下式计算亚硝胺阻隔率。

$$\text{亚硝胺阻隔率}/\% = [A_0 - (A - A_1)]/A_0 \times 100\%$$

式中, A_0 -空白对照溶液吸光度; A -样品组溶液吸光度; A_1 -样品本身的吸光度。

2 结果与分析

2.1 板栗花提取物对 DPPH·的清除作用

DPPH·是一种人工合成稳定自由基, 不同提取方法得到的板栗花提取物清除 DPPH·效果如图 1 所示。

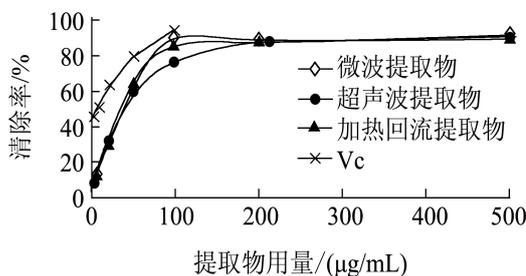


图 1 提取物用量对 DPPH·清除作用的影响

图 1 显示, 不同方法提取的板栗花粗提取物对 DPPH·有很好的清除作用, 开始时随着提取物用量的增大, 三种提取物对 DPPH·的清除作用迅速增强。当提取物用量达到 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 微波、超声波和常规加回流三种提取物对 DPPH·清除率分别为 89.4%、75.6%和 85.8%, 但当提取物的用量超过 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$

时,对 DPPH· 的清除作用变化很小。

2.2 板栗花提取物对·OH 的清除作用

羟基自由基 (·OH) 是最活泼、毒性最大的自由基,它可与活细胞中的任何分子发生反应,引发组织细胞病变,导致各种疾病发生和加速机体衰老,且反应速度非常快。三种板栗花提取物对·OH 的清除效果如图 2 所示。

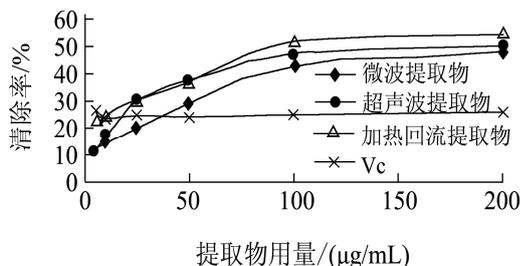


图 2 提取物用量对·OH 清除作用的影响

由图 2 可知,三种板栗花提取物都具有清除·OH 的作用,其清除能力均高于同等用量的 Vc。且随着提取物用量的增大,清除效果都增加,当提取物添加量为 200 μg/mL 时,微波、超声波和常规加回流三种提取物对·OH 的清除率分别为 48.1%、49.3%和 54.3%。

2.3 板栗花提取物对 O₂^{-·} 的清除作用

生物体内氧化还原反应中,大约有 2%~5%的氧会产生 O₂^{-·},O₂^{-·} 是活性氧的一种,是机体内寿命最长的自由基,通常作为自由基链式反应的引发剂,产生活性更强的 H· 自由基,进一步给机体造成危害。本文通过邻苯三酚自氧化产生 O₂^{-·},来考察板栗花提取物在体外对 O₂^{-·} 的清除作用,结果如表 1 所示。

表 1 板栗花提取物对 O₂^{-·} 清除作用

提取物用量/(mg/mL)	清除率/%			
	微波提取物	超声波提取物	常规加热回流提取物	Vc
0.2	6.6	0.7	10.5	3.8
0.5	8.8	10.7	15.1	5.1
1.0	8.2	10.1	13.2	7.0
2.0	2.5	7.4	15.1	6.3
3.0	6.3	10.1	13.3	6.3
4.0	5.3	8.1	10.0	8.9

由表 1 可以看出,三种板栗花提取物对 O₂^{-·} 自由基都有一定的清除能力,其清除效果普遍比 Vc 好,但提取物对 O₂^{-·} 的清除效果与提取物用量之间不呈量效关系。

2.4 板栗花提取物对亚硝酸盐的清除作用

亚硝酸盐与仲胺在人体中易合成强致癌物质亚硝

胺,板栗花提取物清除亚硝酸盐的效果如图 3 所示。

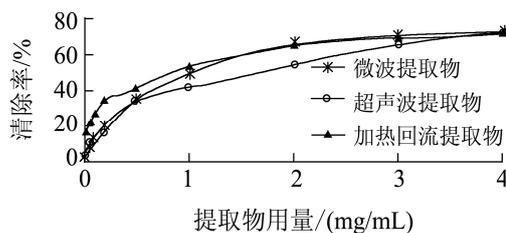


图 3 提取物用量对亚硝酸盐清除作用的影响

由图 3 可见,随着提取物用量的增大,三种板栗花提取物对亚硝酸盐的清除率增加。当用量为 4 mg/mL 时,微波、超声波和常规加回流三种提取物对亚硝酸盐的清除率分别为 72.9%、70.1%和 61.4%。

2.5 板栗花提取物对亚硝胺合成的阻隔作用

亚硝胺能引起人体和动物的肝脏等多种器官的恶性肿瘤,是一类令人关注的化学致癌物。它不仅存在于食品、烟草和饮用水中,也可由其前体仲胺和亚硝酸盐合成,尤其是在人和动物胃中更适于合成亚硝胺。因此,在体内外清除亚硝酸盐或阻断亚硝胺合成是防治癌症的有效途径之一,板栗花提取物对亚硝胺合成的阻隔效果如图 4 所示。

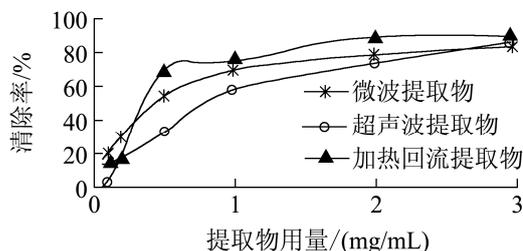


图 4 提取物用量对亚硝胺合成阻隔作用的影响

由图 4 可知,三种板栗花提取物对阻隔亚硝胺合成的效果随提取物用量的增大而增加,当添加量为 3 mg/mL 时,微波、超声波和常规加回流三种提取物对亚硝胺合成的阻隔率分别为 87.8%、85.1%和 78.4%。

3 结论

采用自由基体系和亚硝酸盐体系研究表明,不同提取方法获得的板栗花提取物均有较好的抗氧化性能,三种提取物都能有效清除 DPPH· 和·OH,其最高清除率分别达 92.8%和 54.3%;三种提取物对亚硝酸盐的清除及亚硝胺合成的阻隔也有较好效果,对亚硝酸盐的清除率和亚硝胺的阻隔率最高可达 72.9%和 89.9%,但三种板栗花提取物对 O₂^{-·} 的清除作用都不明显。

(下转第 19 页)