

板栗花纯露的抗氧化活性研究

邵明辉¹, 王雪青^{1*}, 宋文军¹, 赵国强², 付庆伟²

¹天津市食品与生物技术重点实验室 天津商业大学生物技术与食品科学学院, 天津 300134;

²唐山迁西县板栗产业研究发展中心, 唐山 064300

摘要:以板栗花纯露清除 DPPH 自由基、羟基自由基和亚硝酸盐能力及其还原能力为指标, 以市售两种驱蚊花露水和 Vc 为对照, 研究板栗花纯露的抗氧化活性。当板栗花纯露浓度为 0.5 mg/mL 时, DPPH 自由基的清除率最高, 达到 80.64%, IC₅₀ 为 0.25 mg/mL, 清除率分别高于同浓度的六神 (70.21%) 和隆力奇花露水 (60.14%) 而小于 Vc (90.04%) ($P < 0.01$); 当浓度为 0.1 mg/mL 和 4 mg/mL 时, 羟基自由基和亚硝酸盐的清除率最大, 分别为 74.03% 和 84.77%, 显著高于花露水和 Vc 对照组 ($P < 0.01$); 当浓度为 0.1 mg/mL 时, 板栗花纯露的还原力最强, 但小于 Vc 而高于市售花露水 ($P < 0.01$)。此结果证实了板栗花纯露在一定浓度范围内具有良好的抗氧化能力, 将为后续板栗花纯露的开发和利用提供技术支持。

关键词:板栗花; 纯露; 抗氧化活性; 自由基

中图分类号: R915

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.02.013

Study on the Antioxidant Activity of Hydrosol from Chestnut Flower

SHAO Ming-hui¹, WANG Xue-qing^{1*}, SONG Wen-jun¹, ZHAO Guo-qiang², FU Qing-wei²

¹Tianjin Key Laboratory of Food Biotechnology, College of Biotechnology and Food Science, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China; ²Qianxi Chestnut Industry Research and Development Center, Hebei Tangshan 064300, China

Abstract: The antioxidant activity of hydrosol from chestnut flower was investigated by determining DPPH radical scavenging ability, reducing power, hydroxyl radical scavenging ability and nitrite scavenging ability, using commercially available toilet water repellents and Vc as the controls. The results showed that when the concentration of chestnut flower hydrosol was 0.5 mg/mL, the scavenging ability of DPPH radical was the highest and scavenging rate was 80.64%, higher than that of Liu Shen (70.21%) and Long Li Qi (60.14%) toilet water and less than that of Vc (90.04%), the value of IC₅₀ was 0.25 mg/mL. When the concentrations of chestnut flower hydrosol were 0.1 mg/mL and 4 mg/mL, the scavenging rates of hydroxyl radical and nitrite were 74.03% and 84.77%, respectively, which were the highest in the same levels of all samples. The reducing power of chestnut flower hydrosol was the highest at the concentration of 1.5 mg/mL, lower than Vc and higher than commercial toilet waters. The results confirmed that chestnut flower hydrosol exhibited the excellent antioxidant ability. It provided basis for the further development and utilization of chestnut flower hydrosol.

Key words: chestnut flower; hydrosol; antioxidant ability; free radicals

紫外线辐射能引起皮肤变黑、红斑和光敏等急性反应或导致皮肤干燥、起皱失去弹性和色素沉着等慢性反应, 甚至有可能诱发皮肤癌^[1], 由紫外线辐射引起的皮肤氧化是导致皮肤损伤、老化的重要原因^[2,3]。因此, 在阳光充足的夏季, 护肤产品的抗氧化和防紫外线功能显得越来越重要。目前在医疗、食品和化妆品领域广泛应用的多为化学合成抗

氧化剂, 如丁基羟基茴香醚 (BHA)、二丁基羟基甲苯 (BHT) 等。研究发现, 长期使用合成抗氧化剂, 对生物体有潜在的毒副作用^[4]。因此, 开发以天然植物成分为主的抗氧化产品是近年来的研究热点。

板栗花为壳斗科 (*Fagaceae*) 栗属植物栗 (*Castanea mollissima* Blume) 的雄性花序, 香气怡人、柔和、开阔, 形状为圆柱状茱萸花序^[5]。近年来, 伴随着板栗种植面积的不断增长, 其副产物板栗花的产量也十分可观, 但大多被当作废物丢弃或燃料燃烧, 造成资源的极大浪费。据报道, 板栗花中含有丰富的活性物质, 不仅具有显著的抗氧化作用^[6], 而且还

有比较明显的驱蚊效果^[7]。目前,针对板栗花抗氧化性研究主要集中在黄酮类化合物上,其挥发性成分的抗氧化性研究甚少。因此,本研究选取提取板栗花精油过程中产生的副产物纯露为研究对象,研究其抗氧化性并与夏季常用的花露水产品作对比,为板栗花的天然抗氧化性研究提供理论依据,为开发抗氧化新型花露水提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

板栗花纯露,由河北省唐山市迁西县板栗研究中心提供(在蒸汽压力为 0.04 MPa,液固比为 6,蒸馏 2.5 h 条件下制得)。板栗花纯露通过复蒸的方式经油水分离器得挥发油,约占板栗花纯露的 0.0621%,所获得的板栗花精油为浅黄色油状液体,具有浓郁的板栗花的特殊香气。挥发油经 GC-MS 分析,鉴定出 19 种化合物,占挥发油总量的 98.21%,其中主要成分为 α -甲基苯甲醇(11.88%)、芳樟醇(9.46%)、壬醛(11.73%)、松油醇(5.42%)、棕榈酸(10.69%)和 9,12-十八碳二烯酸(8.01%)等;隆力奇驱蚊花露水,其主要成分为乙醇、二乙基甲苯甲酰胺(5%)、二苯酮-4、三乙醇胺、蛇胆提取物、CI42090 等;六神驱蚊花露水,其主要成分为乙醇、丁基乙酰氨基丙酸乙酯(4.5%)、薄荷醇、EDTA 二钠、蛇胆提取物、CI42090 等,均购于当地超市;DPPH, Sigma 公司;实验所用其他试剂均为市售分析纯。

1.2 仪器与设备

Alpha-1500 型紫外可见分光光度计,上海谱元仪器有限公司;722N 型可见分光光度计,北京晶弘精密仪器有限公司;ZK-82A 型真空干燥箱,天津远方实验仪器厂;KQ2200B 型超声波清洗机,南京市超声仪器有限公司;Perkin Elmer UV/VIS, Spectrometer Lambda 25。

1.3 实验方法

1.3.1 板栗花纯露清除 DPPH 自由基能力的测定^[8,9]

将板栗花纯露稀释成不同浓度的溶液,同样将六神、隆力奇花露水和 Vc 稀释成相同浓度作为样品溶液。分别向一系列 10 mL 比色管中加入 3.5 mL 用乙醇稀释浓度为 1.0×10^{-4} mol/L 的 DPPH 溶液和 0.5 mL 样品液,摇匀,避光反应 30 min,以乙醇作为参比,测定 517 nm 下的吸光度 A,同样方法测

定 3.5 mL 无水乙醇和 0.5 mL 样品液混合后在 517 nm 下的吸光度 A_0 ,再测定 3.5 mL DPPH 溶液和 0.5 mL 无水乙醇混合后在 517 nm 下的吸光度 A_1 ,平行测定三次,取平均值,并按以下公式计算不同浓度的样品液对 DPPH 自由基的清除率。利用不同浓度样品溶液的清除率绘制曲线图,由曲线拟合回归方程计算 DPPH 自由基清除率为 50% 时所需板栗花纯露浓度,记为 IC_{50} ,以 IC_{50} 值表示板栗花纯露清除 DPPH 自由基能力。

$$\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A - A_0}{A_1}\right) \times 100$$

1.3.2 板栗花纯露还原能力的测定^[10]

分别配制不同浓度的板栗花纯露,同样方法配制相同浓度的 Vc 溶液、隆力奇和六神样品液作为对阳性对照组。分别加入 0.2 mol/L 的磷酸缓冲液 2 mL,质量分数为 1% 的铁氰化钾 $[K_3Fe(CN)_6]$ 溶液 2 mL,混合均匀,50 °C 水浴下保温 20 min,再加入质量分数为 10% 的三氯乙酸(TCA)溶液 2 mL,震荡混匀后离心。取离心后的上清液 2 mL,加入 2 mL 去离子水和 0.4 mL 质量分数为 0.1% 的氯化铁($FeCl_3$)溶液,震荡混匀后在 50 °C 水浴下保温 10 min,体系溶液由黄色变为蓝色,在 700 nm 下测定吸光度,进行比色。以去离子水代替样品作为空白对照。平行测定三次,取平均值。

1.3.3 板栗花纯露清除羟基自由基能力的测定^[11]

以板栗花纯露作为样品液,配制好的 Vc 溶液、隆力奇和六神样品液作为对阳性对照组。在一系列 10 mL 比色管中分别加入 0.3 mL 浓度为 0.4 mmol/L 的结晶紫溶液、1.2 mL 浓度为 1.0 mmol/L 的硫酸亚铁($FeSO_4$)溶液和 0.6 mL 浓度为 2.0 mmol/L 过氧化氢(H_2O_2)溶液,用 pH = 4.0 的磷酸柠檬酸缓冲溶液将上述溶液定容至 10 mL,摇匀后静置 30 min,在 580 nm 处,测其吸光度 A_b ,同时测定以上体系加过氧化氢之前,分别加入 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mL 的样品液后体系在 580 nm 处的吸光度 A_x ,测定不加过氧化氢前体系在 580 nm 处的吸光度 A_0 。平行测定三次,取平均值。按以下公式计算清除率。

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_x - A_b}{A_0 - A_b} \times 100$$

1.3.4 板栗花纯露对亚硝酸盐清除率的测定^[12]

取已知浓度的板栗花纯露 2 mL 于 25 mL 容量瓶中,加入 0.005 mg/mL 的亚硝酸钠($NaNO_2$)标准溶液 3 mL,加入 pH = 3.0 的磷酸柠檬酸缓冲溶液 5

mL, 37 °C 下反应 30 min, 立即加入 2 mL 质量浓度为 0.4% 的对氨基苯磺酸溶液, 混匀, 静置 3 ~ 5 min 后, 加入 1 mL 质量浓度为 0.2% 的盐酸萘己二胺溶液, 加蒸馏水至刻度, 混匀, 静置 15 min, 以 5 mL 样品液为空白组, 在 544 nm 处, 测定吸光度为 A, 测定 NaNO₂ 标准溶液的吸光度为 A₀, 按以下公式计算样品液对 NO₂ 的清除率。

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

1.4 数据处理与分析

实验数据采用样本均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 形式表示, 并用 SPSS16.0 软件对其显著性进行单因素方差分析。

2 结果与讨论

2.1 板栗花纯露清除 DPPH 自由基的能力

不同浓度的板栗花纯露、六神、隆力奇和 Vc 样品液清除 DPPH 自由基能力见图 1。由图 1 可以看出, 样品液对 DPPH 自由基的清除率随浓度的增加而增大, 当样品液浓度达到 0.5 mg/mL 时, 清除率趋于稳定。此时板栗花纯露的清除率为 80.64%; 六神样品液的清除率为 70.21%; 隆力奇样品液的清除率为 60.14%; Vc 溶液的清除率为 90.04%。

许多学者对天然产物中的黄酮类^[13,14]和多酚类^[15]化合物清除 DPPH 自由基能力进行了研究, 而鲜见对其他类物质的研究报道, 特别是植物纯露清除 DPPH 自由基方面的研究仅见 2014 年孟慧报道^[16], 她在研究四种芳香植物纯露体外抗氧化活性中发现, 当浓度为 0.376 mg/mL 时, 薰衣草纯露、肉豆蔻纯露、沉香纯露和降香纯露对 DPPH 自由基的清除率分别为 58.217%、52.098%、9.016% 和 8.525%。由 DPPH 自由基清除率/样品液浓度曲线的拟合回归方程可知, 当板栗花纯露的浓度为 0.376 mg/mL 时, DPPH 自由基的清除率为 66.325% ,

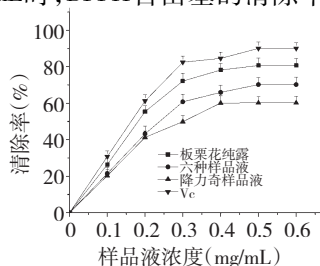


图 1 板栗花纯露对 DPPH 自由基的清除能力

Fig. 1 DPPH radical scavenging ability of the hydrosol from chestnut flower

而且当板栗花纯露浓度为 0.5 mg/mL 时, 与六神、隆力奇样品液相比, DPPH 自由基的清除率分别提高了 15% ($P < 0.01$) 和 34% ($P < 0.01$), 由此可见, 板栗花纯露较报道的其他植物纯露抗氧化性更强, 显示出板栗花纯露具有较强的清除 DPPH 自由基能力。

由板栗花纯露、六神、隆力奇和 Vc 样品液的拟合线性回归方程计算各个样品液清除 DPPH 自由基的 IC₅₀ 值分别为 0.25、0.32、0.38 mg/mL 和 0.21 mg/mL。板栗花纯露清除 DPPH 自由基的 IC₅₀ 为 0.25 mg/mL, 明显优于两种市售花露水但略小于 Vc ($P < 0.01$)。实验各组样品清除 DPPH 自由基能力大小顺序依次为: Vc > 板栗花纯露 > 六神样品液 > 隆力奇样品液。

2.2 板栗花纯露的还原能力

不同浓度的板栗花纯露、六神、隆力奇和 Vc 样品液的还原能力见图 2。由图 2 可知, 板栗花纯露的吸光度随浓度的增大而增加, 当浓度为 1.5 mg/mL 时, 吸光度达到最大值为 0.88, 之后略有下降, 即板栗花纯露的还原能力随浓度也是先增加后降低, 浓度为 1.5 mg/mL 时, 还原能力最强。同样, 隆力奇和六神样品液的吸光度随浓度呈现相同的趋势, 但没有板栗花纯露还原力那样稳定, 同等浓度下, 板栗花纯露的还原能力相对较大, 抗氧化能力相对较强。实验结果反映出板栗花纯露的还原能力虽然不及同浓度的 Vc 但却远大于六神、隆力奇样品液 ($P < 0.01$), 这可能是板栗花纯露中存在某些具有抗氧化活性的多酚类物质, 充当了供电子的还原剂, 从而表现出较强的还原能力^[17]。

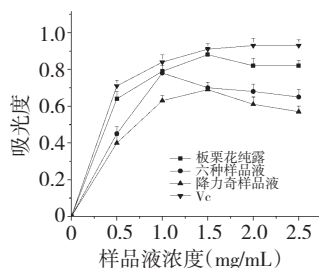


图 2 板栗花纯露的还原能力

Fig. 2 Reducing power of the hydrosol from chestnut flower

2.3 板栗花纯露清除羟基自由基的能力

不同浓度的板栗花纯露、六神、隆力奇和 Vc 样品液清除羟基自由基能力见图 3。由图 3 可知, 样品液对羟基自由基的清除率随浓度的增大而增加,

当浓度为 0.1 mg/mL 时,清除率达到最大值,之后保持稳定。此时,板栗花纯露的清除率为 74.03%,六神样品液的清除率为 61.24%,隆力奇样品液的清除率为 64.84%,Vc 的清除率为 29.98%。相比,板栗花纯露对羟基自由基的清除率最大且分别提高了 21% ($P < 0.01$)、14% ($P < 0.01$) 和 147% ($P < 0.01$)。

生物体在氧化呼吸过程中,伴随着能量的产生,会形成一定量的活性氧(ROS),然而生物在进化过程中,自身拥有一套完整的抗氧化防御体系,能及时清除产生的 ROS,从而保证细胞正常的能量和物质代谢的顺利进行^[18]。当细胞受到紫外线等射线的辐射胁迫时,能诱导产生超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)、过氧化氢(H_2O_2)和羟基自由基($OH\cdot$)等活性氧^[19],使细胞内 ROS 不断积累,当超过自身清除能力时,过多的 ROS 积累则导致迸发现象的发生。同时 ROS 能氧化细胞膜中有多个不饱和双键的脂类物质,形成丙二醛(MDA);MDA 与蛋白质、核酸或脂类发生交联,破坏细胞结构与功能,造成细胞的氧化损伤^[20]。在体外实验体系中,环境中的 Fe^{3+} 和 Fe^{2+} 能催化过氧化氢和超氧阴离子反应生成羟基自由基,羟基自由基是活性氧中反应能力最强的一种,它几乎可以和细胞内的一切有机物反应,它能杀死红细胞,降解细胞膜、DNA 和多糖类化合物,引起组织细胞病变,导致疾病发生和加速机体衰老^[21]。本实验利用此原理,测定板栗花纯露清除羟基自由基能力,以反映板栗花纯露的抗氧化性能。实验结果证实板栗花纯露具有较强的抗氧化性,可作为潜在的防晒产品。

许多天然抗氧化剂常显示出强有力的清除羟基自由基能力,其原因可能正是由于天然产物中含有化学结构复杂且浓度很低的多种物质,如板栗花纯露中包含精油的一些组分,如芳樟醇、香叶醇等。混合的抗氧化剂较单一的合成抗氧化剂有更多的还原基团,具有提供氢质子的能力,可使具有高度氧化性的自由基还原,从而终止自由基连锁反应,起到清除或抑制自由基反应的目的。李荣^[22]等在研究肉豆蔻精油抗氧化性能时,发现天然抗氧化剂的羟基自由基清除能力强于 2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)和没食子酸丙酯(PG)等合成抗氧化剂。这一结果与我们的一致。

2.4 板栗花纯露清除亚硝酸盐的能力

不同浓度的板栗花纯露、六神、隆力奇和 Vc 样品液清除亚硝酸盐的能力见图 4。由图 4 可见,板

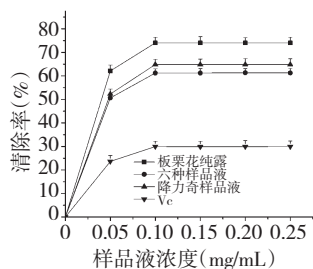


图 3 板栗花纯露对羟基自由基的清除能力

Fig. 3 Hydroxyl radical scavenging ability of the hydrosol from chestnut flower

栗花纯露对亚硝酸盐清除率随着浓度的增大而增加,当浓度为 4 mg/mL 时,清除率达到最大值为 84.77%,之后略有降低。

人摄食亚硝酸盐含量高的食物后,患癌症的风险会显著增加,这是由于胃中的食物处在酸性条件下,亚硝酸盐可与食物中的仲胺、叔胺和酰胺等反应生成强致癌物亚硝胺,该物质具有较强的致癌作用^[23]。板栗花纯露对亚硝酸盐的清除能力明显优于其他三种样品液,这说明了板栗花纯露不仅具有开发成为新型防晒花露水的潜力,同时也具备作为一种天然抗氧化剂应用于食品行业的可能性。

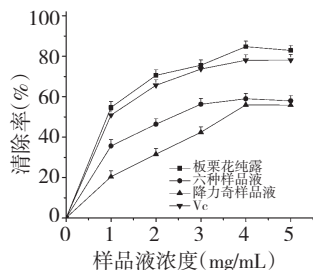


图 4 板栗花纯露对亚硝酸盐的清除能力

Fig. 4 Nitrite scavenging ability of the hydrosol from chestnut flower

3 结论

板栗花纯露在一定浓度范围内具有良好的抗氧化活性,当板栗花纯露浓度为 0.5 mg/mL 时,清除 DPPH 自由基能力最强,清除率为 80.64%, IC_{50} 为 0.25 mg/mL;浓度为 1.5 mg/mL 时,还原能力最强;浓度为 0.1 mg/mL 时,清除羟基自由基能力最强,清除率为 74.03%;浓度为 4 mg/mL 时,清除亚硝酸盐能力最强,清除率为 84.77%。在实验各处理组相同浓度下,板栗花纯露清除羟基自由基和亚硝酸盐能力最好;而清除 DPPH 自由基能力和还原能力弱于 Vc。板栗花纯露抗氧化机理复杂,还有待进一步

步地讨论和研究。

参考文献

- Athar M, Kim AL, Ahmad N, *et al.* Mechanism of ultraviolet B-induced cell cycle arrest in G2/M phase in immortalized skin keratinocytes with defective p53. *Biochem Bioph Res Co*, 2000, 277:107-111.
- Black HS. Reassessment of a free radical theory of cancer with emphasis on ultraviolet carcinogenesis. *Integr Cancer Ther*, 2004, 3:279-293.
- Kang SA (康顺爱), Wang ZC (王志成), Li YB (李艳博), *et al.* Curcumin on oxidative damage of UV-protective effect of human keratinocytes cells. *Chin J Gerontol* (中国老年学杂志), 2008, 28:1688-1690.
- Cheng XY (成喜雨), Cui Q (崔馨), Liu CC (刘春朝), *et al.* Recent advances of antioxidant activity of Chinese herbal medicines. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2006, 18:514-518.
- Zhang JW (张建旺). Studies on flavonoids and volatile substances from *Chestnut flower*. Qinhuangdao: Hebei Normal University of Science and Technology (河北科技师范学院), MSc. 2012.
- Zhang LY (张利燕), Chang H (常虹), Zhao LQ (赵丽芹), *et al.* Research on influence of physical and chemical factors to flavonoid extract of the male *Chestnut flowers*'s scavenging ability to DPPH free radical. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2012, 33:81-88.
- Wang HR (王浩然). Comprehensive utilization of *Chestnut flower*. Shijiazhuang: Hebei University of Science and Technology (河北科技大学), MSc. 2010.
- Wang XQ (王笑晴). Evaluation on anti-oxidant activity of *Curcuma longa* extracts based on DPPH free radical scavenging capability. *Drug Eva Res* (药物评价研究), 2011, 15:360-363.
- Xue ZH (薛照辉), Wu MC (吴谋成), Luo ZY (罗祖友), *et al.* Studies on free radical scavenging action of the *Rape-seed peptide*. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2005, 21:71-75.
- Wu HC, Chen HM, Shiao CY. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel. *Food Res Int*, 2003, 36:949-957.
- Liu J (刘骏). Crystal violet spectrophotometric determination of hydroxyl radical in Fenton reaction. *J Wuhan Polytechnic Univ* (武汉工业学院学报), 2005, 24:52-55.
- Xue CH (薛长晖), Wang PW (王佩维), Yao CZ (姚晨之). *In vitro* study on scavenging effect of NO₂ from *Buckwheat flour* extraction. *Grain Oil Pro* (粮油加工), 2002, 10:48-49.
- Zhang ZG (张志国), Chen JP (陈锦屏), Shao XZ (邵秀芝), *et al.* Study on DPPH free radical scavenging efficiency of flavonoids from *Jujube Pit*. *Food Sci* (食品科学), 2007, 28:67-70.
- Yang (杨虎), Zhang ST (张生堂), Gao GQ (高国强). Extraction and DPPH radical scavenging activity of flavonoids from *Rose Flower Buds*. *Food Sci* (食品科学), 2012, 33:152-155.
- Lu J (陆健), Fan W (樊伟), Kong WB (孔维宝), *et al.* Study on the extraction of total polyphenol in barley and its ability on scavenging DPPH free radical. *J Food Sci Biotechnol* (食品与生物技术学报), 2008, 27:57-61.
- Meng H (孟慧), Liu YY (刘洋洋), Yang Y (杨云). Studies on the antioxidant activity of the hydrosol from four kinds of aromatic plants. *Chem Bio* (化学与生物工程), 2014, 31:22-24.
- Li L (李林), Zhang DS (张大顺). Comparative study on fatty acid composition and DPPH free radical scavenging activity of oat oils extracted by different methods. *Food Sci* (食品科学), 2010, 31:146-149.
- Qiu XZ (邱小忠), Chen Y (陈媛), Zhou M (周玫). Mitochondrial oxidative stress injury defense system. *Chem Life* (生命的化学), 2001, 21:141-143.
- Berton TR, Pavone A, Fischer SM. Ultraviolet-B irradiation alters the cell cycle machinery in murine epidermis *in vivo*. *J Invest Dermatol*, 2001, 117:1171-1178.
- Wen W (文雯), Hu QL (胡庆柳), Pu YJ (朴英杰). The protective effects of five antioxidants against UVB damage to cell membrane. *J First Mil Med Univ* (第一军医大学学报), 2000, 20:347-348.
- Smirnoff N, Cumbes QJ. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 1989, 28:1057-1060.
- Li R (李荣), Sun JP (孙健平), Jiang ZT (姜子涛). Investigation of antioxidant activities and free radical scavenging of *nutmeg* essential oil. *Food Res Dev* (食品研究与开发), 2009, 30:75-80.
- Song R (宋茹), Wei RB (韦荣编), Hu JS (胡金申), *et al.* *In vitro* nitrite scavenging capacity of *Litchi pericarp* pigment. *Food Sci* (食品科学), 2010, 31:104-107.