

潘乔丹, 黄元河, 杜清华, 等. 核桃根和枝不同极性成分的抗氧化活性[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(10): 262–264.

核桃根和枝不同极性成分的抗氧化活性

潘乔丹, 黄元河, 杜清华, 陈文东, 熊圆圆

(右江民族医学院, 广西百色 533000)

摘要: 为了研究核桃根和枝不同极性成分体外抗氧化活性, 采用 Fe^{3+} 还原/抗氧化能力 (FRAP) 以及清除羟自由基 ($\text{OH} \cdot$)、2,2'-联氮-(3-乙基苯并噻唑林-6-磺酸) 二氢盐自由基 (ABTS $^+$) 测定法, 评价核桃根和枝不同极性成分的抗氧化能力, 并与阳性对照抗坏血酸和茶多酚相比较。结果表明, 核桃根和枝不同极性成分的 Fe^{3+} 还原/抗氧化能力均弱于抗坏血酸 (FRAP = 31 469 $\mu\text{mol/g}$), 强于茶多酚 (FRAP = 1 310.8 $\mu\text{mol/g}$); 除核桃根正丁醇层弱于茶多酚外, 其他不同极性成分对 $\text{OH} \cdot$ 的清除能力均强于抗坏血酸 ($\text{IC}_{50} = 0.044 \text{ mg/mL}$) 和茶多酚 ($\text{IC}_{50} = 0.032 \text{ mg/mL}$); 各不同极性成分清除 ABTS $^+$ 的能力均强于茶多酚 ($\text{IC}_{50} = 0.416 \text{ mg/mL}$), 且核桃根乙酸乙酯层 ($\text{IC}_{50} = 0.010 \text{ mg/mL}$) 强于抗坏血酸 ($\text{IC}_{50} = 0.011 \text{ mg/mL}$)。得出结论, 核桃根和枝不同极性成分有较强的抗氧化能力, 为其生物活性的深入研究提供了参考依据。

关键词: 核桃; 抗氧化; FRAP; ABTS; 羟自由基 ($\text{OH} \cdot$)

中图分类号: R284.1; S664.101

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2013)10-0262-03

核桃 (*Juglans regia* L.) 别称胡桃, 为胡桃科 (Juglandaceae) 核桃属 (*Juglans*) 植物。核桃果是世界上著名的四大干果之一, 含有丰富的脂肪、蛋白质、维生素和钙、铁等多种矿物质元素, 营养价值较高, 具有健脑、益智、强体、美容的特殊功能。据《本草纲目》和《中国木本药用植物》记载, 核桃叶、枝、青果皮、树皮都有药用价值, 具温补肺肾、解毒消肿、抗肿瘤、杀虫止痒等功效。中医认为, 核桃根 (皮) 味苦涩, 有小毒, 有止泻、止痛、祛风止痒之功。现代药书《重庆草药》曾提及核桃根能“杀虫, 攻毒, 治老年牙痛, 兼能补气”。药理研究表明:

核桃根、茎、皮提取物对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌及致病性酵母均有抑制作用^[1]。试验证明, 核桃枝具有抗肿瘤活性, 且民间用其水煎液防治癌症^[2-3]。迄今为止, 对核桃青皮及核桃仁药理的研究较为透彻, 而对其枝条及根的研究较少。广西西北部富产核桃, 为合理开发利用核桃的根和枝, 本试验采用 FRAP 法、水杨酸法、ABTS 法对核桃的根和枝的抗氧化性能进行检测, 为核桃树的进一步开发利用提供有益的数据支持。

1 材料与方法

1.1 样品溶液的提取和制备

称取核桃根和枝干燥粉末各 100.0 g, 用 250 mL 95% 乙醇加热回流提取 2 h, 重复提取 3 次, 合并提取液, 浓缩干燥得总提取物 (EE); 将总提取物依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取, 浓缩干燥得石油醚层 (PEE)、乙酸乙酯层 (EAE)、正丁

收稿日期: 2013-02-01

基金项目: 第四次全国中药资源普查 (广西) 试点普查项目资助 (编号: 20120705-450000); 右江民族医学院项目 (编号: 201011)。

作者简介: 潘乔丹 (1980—), 女, 海南乐东人, 硕士, 讲师, 主要从事天然产物化学研究。E-mail: panqiao112@163.com。

适 pH 值 6.0。在此条件下培养 48 h 时, 雌激素的降解效率达 84% 以上, 培养 72 h 时, 雌激素几乎完全被降解。试验方法与结果为生物降解激素类污染物提供了可靠的依据, 也为今后的研究打下了基础。

参考文献:

- [1] 王小芳, 曾文芳, 杨忠乔, 等. 高效液相色谱荧光检测法测定鸡蛋中三种雌激素[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(10): 2420–2421.
- [2] 苏少泉. 长残留除草剂对后茬作物安全性问题[J]. 农药, 1998, 37(12): 4–7.
- [3] 李依韦, 潘大仁, 宫雅琴, 等. 睾丸酮丛毛单胞菌降解胆固醇的培养条件研究[J]. 内蒙古民族大学学报: 自然科学版, 2006, 21(3): 308–310.
- [4] Möbus E, Maser E. Molecular cloning, overexpression, and characterization of steroid-inducible 3α -Hydroxysteroid dehydrogenase/car-

bonyl reductase from *Comamonas testosteroni*. A novel member of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(47): 30888–30896.

- [5] Maser E, Xiong G, Grimm C, et al. 3α -Hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from *Comamonas testosteroni*: biological significance, three-dimensional structure and gene regulation[J]. Chemico-Biological Interactions, 2001, 130/131/132 (1/2/3): 707–722.
- [6] Xiong G, Maser E. Regulation of the steroid-inducible 3α -Hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase gene in *Comamonas testosteroni*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2001, 276: 9961–9970.
- [7] 陈建秋, 潘大仁, 周以飞, 等. *tac* 启动子碱基突变对睾丸酮丛毛单胞菌 (*Comamonas testosteroni*) 降解能力的影响[J]. 农业生物技术学报, 2008, 16(2): 336–340.
- [8] 崔明超. 睾丸酮丛毛单胞菌降解喹啉的影响因素分析[J]. 广州大学学报: 自然科学版, 2005, 4(5): 403–406.

醇层 (BE) 和水层 (WE) 的不同极性成分。取不同极性成分样品 0.10 g, 用无水乙醇稀释至 0.050 mg/mL 的溶液备用。各不同极性成分备用液用无水乙醇逐级稀释成浓度为 0.005、0.010、0.015、0.020、0.025 mg/mL 的受试溶液。

1.2 材料

DF-15 台式连续投料粉碎机 (浙江省温岭市林大机械有限公司); DHG-9070A 型电热恒温鼓风干燥箱 (上海精宏实验设备有限公司); HHS-21-4 电热式恒温水浴锅 (江苏金坛宏凯仪器厂); 755B 紫外可见分光光度计 (上海精密科学仪器有限公司); FA1104 型电子天平 (上海良平仪器仪表有限公司); KQ5200DB 型数控超声波清洗器; RE-52AA 旋转蒸发仪 (上海亚荣仪器厂)。

三吡啶三𪔐嗪 (tripirydyl-triazine, TPTZ, Aladdin)、2,2'-联氨-(3-乙基苯并噻唑林-6-磺酸) 二氢盐 (ABTS, 生工生物工程公司)、抗坏血酸 (天津博迪化工股份有限公司)、茶多酚 (广东广州食品添加剂公司); 其他试剂均为分析纯; 核桃根、核桃枝采于广西壮族自治区乐业县。

1.3 方法

1.3.1 总抗氧化能力的测定 (FRAP 法) 参照 Benzie 等的方法^[4-5], 分别移取不同浓度、不同极性成分的溶液 1.0 mL 于试管中, 加入 1.0 mL FRAP 工作液, 以溶剂代替样品加入 FRAP 工作液作空白, 测吸光度 D , 各组试验 3 次平行, 取平均值。结果以 FeSO_4 当量 (即 1 g 样品的总抗氧化能力相当于 FeSO_4 的微摩尔数) 表示。

1.3.2 清除羟自由基 ($\text{OH}\cdot$) 能力的测定 (水杨酸法) 使用 Fenton 反应法^[6-7]。分别移取不同浓度、不同极性成分的溶液 2.0 mL 于试管中, 加入 0.01 mol/L FeSO_4 1.0 mL, 0.01 mol/L 水杨酸-乙醇溶液 2.0 mL, 最后加入 30% H_2O_2 2.0 mL 启动反应, 于室温下反应 1 h。以蒸馏水调零, 在波长 510 nm 处测定样品的吸光度。考虑到试剂与提取物溶液的协同增色效应, 以蒸馏水 2.0 mL 替代 30% H_2O_2 2.0 mL, 其

他试剂与样品组相同。每份样品平行操作 3 次, 取平均值, 计算公式为:

$$\text{清除率} = \frac{D_1 - (D_1 - D_1')}{D_0} \times 100\%,$$

式中: D_0 为以溶剂代替样品液的吸光度; D_1 为样品组的吸光度; D_1' 为蒸馏水代替 H_2O_2 的空白对照组吸光度。

1.3.3 清除 ABTS^+ 能力的测定 (ABTS 法) 参考 Re 等的方法^[8], 分别移取不同浓度的各不同极性成分溶液 2.0 mL 于试管中, 各试管中加入 4.0 mL ABTS^+ 测定液, 准确振荡 30 s, 反应一定时间, 于 734 nm 波长处测定其吸光度, 每份样品平行操作 3 次, 取平均值, 计算公式为:

$$\text{清除率} = \frac{D_0 - D_1}{D_0} \times 100\%,$$

式中: D_0 为 ABTS^+ 测定液的吸光度; D_1 为样品组的吸光度。

1.3.4 半清除率浓度计算 根据回归方程计算清除率为 50% 时的浓度 (IC_{50} , mg/mL)。

2 结果与分析

2.1 总抗氧化能力的测定

在 593 nm 处, FeSO_4 浓度 (x) 与吸光度 (y) 在一定范围内呈线性关系, 线性回归方程为: $y = 0.0005x - 0.0099$ ($r = 0.9989$)。根据不同极性成分反应后的 D , 在标准曲线上求得相应的 FeSO_4 当量 ($\mu\text{mol/g}$)。

表 1 显示, 核桃根和枝不同极性成分的 Fe^{3+} 还原/抗氧化能力均弱于抗坏血酸 ($\text{FRAP} = 31469.0 \mu\text{mol/g}$), 强于茶多酚 ($\text{FRAP} = 1310.8 \mu\text{mol/g}$)。核桃根对 Fe^{3+} 的还原能力顺序为抗坏血酸 > 石油醚层 > 正丁醇层 > 水层 > 乙酸乙酯层 > 总提取物 > 茶多酚; 核桃枝对 Fe^{3+} 的还原能力顺序为抗坏血酸 > 乙酸乙酯层 > 正丁醇层 > 总提取物 > 水层 > 石油醚层 > 茶多酚。

表 1 不同极性成分的抗氧化活性

不同极性成分	根			枝		
	FRAP 法 ($\mu\text{mol/g}$)	水杨酸法 IC_{50} (mg/mL)	ABTS 法 IC_{50} (mg/mL)	FRAP 法 ($\mu\text{mol/g}$)	水杨酸法 IC_{50} (mg/mL)	ABTS 法 IC_{50} (mg/mL)
石油醚层	9297.4	0.013	0.020	1871.6	0.025	0.023
乙酸乙酯层	7720.8	0.002	0.010	8762.8	0.016	0.014
正丁醇层	9228.4	0.037	0.057	8126.8	0.010	0.015
水层	8054.0	0.024	0.078	4103.4	0.030	0.076
总提取物	7702.8	0.030	0.029	5936.8	0.026	0.017
茶多酚	1310.8	0.032	0.416	1310.8	0.032	0.416
抗坏血酸	31469.0	0.044	0.011	31469.0	0.044	0.011

2.2 清除羟基自由基作用

羟自由基可以与生物体内的多种分子作用, 加速细胞凋亡, 引起机体衰老, 是对生物体毒性很强的一种自由基, 羟自由基的清除率是反映活性物质抗氧化能力的重要指标^[9]。

由图 1 可以看出, 核桃根和枝不同极性成分对 $\text{OH}\cdot$ 都表现出较高的清除能力, 并在试验浓度范围内呈明显的量效关系, 在浓度在 0.025 mg/mL 时, 核桃根石油醚层和乙酸乙酯层的清除率大于 70%。由表 1 可知, 核桃根不同极性成分对羟自由基的清除能力顺序为乙酸乙酯层 > 石油醚层 > 水层 >

总提取物 > 茶多酚 > 正丁醇层 > 抗坏血酸; 核桃枝不同极性成分对羟自由基的清除能力顺序为正丁醇层 > 乙酸乙酯层 > 石油醚层 > 总提取物 > 水层 > 茶多酚 > 抗坏血酸。由此可见, 除核桃根正丁醇层弱于茶多酚外, 核桃根和枝的其他不同极性成分对 $\text{OH}\cdot$ 的清除能力均强于抗坏血酸和茶多酚。

2.3 清除 ABTS^+ 作用

由图 2 可以看出, 核桃根和枝不同极性成分对 ABTS^+ 都表现出一定程度的清除能力, 并在试验浓度范围内呈明显的量效关系。在浓度小于 0.01 mg/mL 时, 核桃根乙酸乙酯层

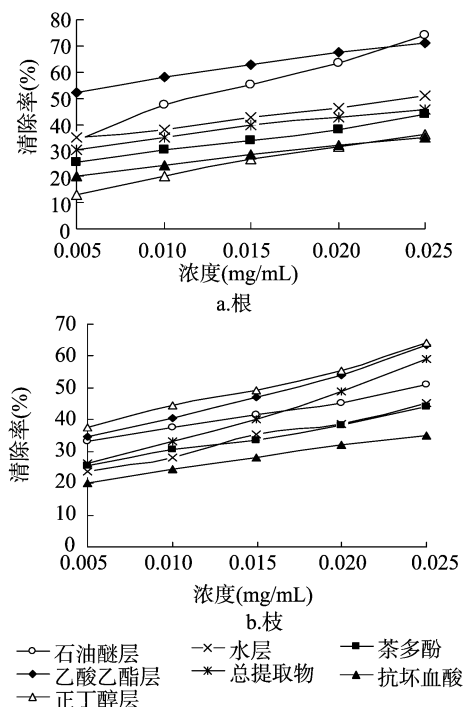
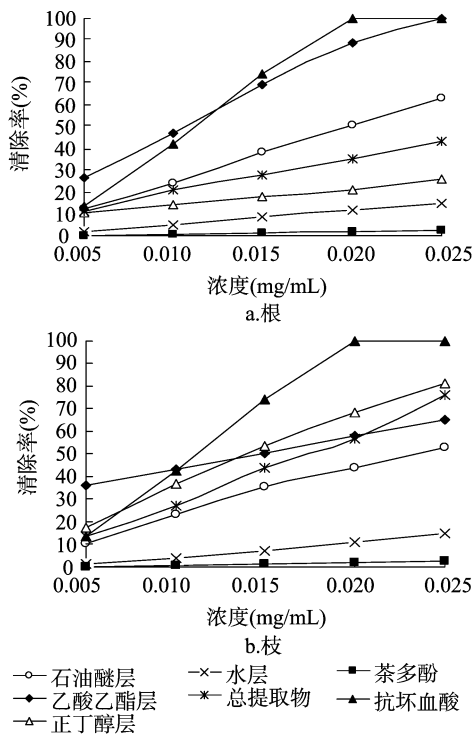


图1 不同极性成分清除羟自由基作用

图2 不同极性成分清除ABTS⁺作用

对ABTS⁺的清除率均超过抗坏血酸,而浓度在0.020 mg/mL时抗坏血酸对ABTS⁺的清除率已达100%,当浓度再增大时,其清除率保持不变。由表1可知,核桃根不同极性成分对ABTS⁺的清除能力顺序为乙酸乙酯层>抗坏血酸>石油醚层>总提取物>正丁醇层>水层>茶多酚;核桃枝不同极性成分对ABTS⁺的清除能力顺序为抗坏血酸>乙酸乙酯层>正丁醇层>总提取物>石油醚层>水层>茶多酚。由此

可见,核桃根乙酸乙酯层清除ABTS⁺的能力强于抗坏血酸,其他不同极性成分弱于抗坏血酸,但都强于茶多酚。

3 结论

研究表明,自由基和人类多种疾病有着密切的关系。当机体内自由基产生过多或机体清除自由基能力下降时,这些自由基对DNA、蛋白质和脂质等生物大分子产生氧化损伤作用,引起机体组织器官发生各种病变,因此,增强机体清除自由基的能力,可以预防和治疗与自由基相关的疾病^[10-13]。

本试验采用FRAP法、水杨酸法和ABTS法对核桃根和枝的不同极性成分进行体外抗氧化活性研究,通过比较半清除率浓度IC₅₀判断其对OH·、ABTS⁺的清除能力,并与抗坏血酸和茶多酚这2种常用的抗氧化剂相比较。结果表明,核桃根和枝不同极性成分总抗氧化能力虽比抗坏血酸弱,但都比茶多酚强;除核桃根正丁醇层弱于茶多酚外,其他不同极性成分对OH·的清除能力均强于抗坏血酸和茶多酚;核桃根乙酸乙酯层清除ABTS⁺的能力强于抗坏血酸,其他不同极性成分弱于抗坏血酸,但都强于茶多酚。这一研究为核桃根和枝的开发和应用提供了科学依据,为核桃根和枝成为一种新的抗氧化药物提供了一定的理论基础。

参考文献:

- [1] 吕明杰,蒲昭和. 核桃树根治牙龈肿痛[J]. 家庭医药,2008(10):22.
- [2] 李生正,王云彩,蒋东风,等. BSLB法筛选青龙衣与核桃枝抗肿瘤作用有效部位[J]. 西北药学杂志,2000,15(3):114.
- [3] 董永悦,罗丽. 核桃枝治疗食道癌[J]. 中国民间疗法,2000,8(6):46.
- [4] Benzie I F, Strain J J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay[J]. Analytical Biochemistry, 1996, 239(1): 70-76.
- [5] 宫智勇,方敏,王耀峰,等. 番茄乙醇提取物体外抗氧化活性研究[J]. 中国食物与营养,2008(8):31-33.
- [6] Zheng W, Wang S Y. Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(2): 502-509.
- [7] 王威. 常用天然色素抗氧化活性的研究[J]. 食品科学, 2003, 24(6): 97.
- [8] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay[J]. Free Radical Biology & Medicine, 1999, 26(9-10): 1231-1237.
- [9] 黄凌,黎继烈,杨杰,等. 宽叶缙草酯提取物体外抗氧化活性研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(9): 2214-2216.
- [10] 赵克然,杨毅军,曹道俊. 氧自由基与临床[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2000: 48.
- [11] 林燕如. 金毛狗叶总黄酮的提取及抗氧化性[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(11): 322-325.
- [12] 罗超,刘露明,邢雅青,等. 石参总黄酮抗氧化活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(13): 198-201.
- [13] 张丽霞,周剑忠,顾振新,等. 黑莓花色苷的分离纯化与抗氧化活性研究[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(8): 244-247.