

麻疯树籽壳乙醇提取物的 抗氧化活性研究

马 博,张婷婷,刘细祥,李荣峰,农定确*

(百色学院 化学与生命科学系,广西百色 533000)

摘要:本实验以麻疯树籽壳乙醇提取物中黄酮质量浓度为内标,以维生素 C(V_C)和 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT)为对照,通过超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)、1,1-二苯基-2-苦基肼自由基(DPPH \cdot)和亚硝酸盐(NO_2^-)的清除能力,以及还原力和总抗氧化能力的测定,评价了麻疯树籽壳乙醇提取物的抗氧化活性。实验结果表明,麻疯树籽壳乙醇提取物的 $O_2^{\cdot-}$ 清除率的半数抑制浓度(IC_{50})为 0.502mg/mL,小于 V_C 的 0.654mg/mL;其 DPPH \cdot 与 NO_2^- 清除率的 IC_{50} 分别为 0.185、0.494mg/mL,均小于 BHT;麻疯树籽壳乙醇提取物中黄酮质量浓度在 0.7~1.0mg/mL 时,其还原力与同质量浓度 V_C 相当,大于 BHT;在测定范围时,其总抗氧化能力随质量浓度增加而增强,且大于同质量浓度的 BHT,而小于 V_C 。由此说明,麻疯树籽壳乙醇提取物具有较强的抗氧化活性。

关键词:麻疯树,籽壳,乙醇提取物,抗氧化活性

Antioxidant activity of ethanol extracts from *Jatropha curcus* L. seed shell

MA Bo, ZHANG Ting-ting, LIU Xi-xiang, LI Rong-feng, NONG Ding-que*

(Department of Chemistry and Life Science, Baise College, Baise 533000, China)

Abstract: Antioxidant activity of ethanol extracts from *Jatropha curcus* L. seed shell was determined by evaluating the scavenging activity of superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH \cdot) and nitrite (NO_2^-), reducing power and total antioxidant capacity, taking the flavonoids concentration of its ethanol extracts for internal standard and comparing to vitamin C (V_C) and Butylated hydroxytoluene (BHT). The results showed that the half inhibitory concentration (IC_{50}) values of ethanol extracts from *Jatropha curcus* L. seed shell on $O_2^{\cdot-}$ was 0.502mg/mL, lower than that of V_C (0.654mg/mL). The IC_{50} values of ethanol extracts on DPPH \cdot and NO_2^- were 0.185 and 0.494mg/mL, respectively; both of them were lower than BHT's. When the flavonoids concentration of ethanol extracts in the range of 0.7 to 1.0 mg/mL, its reducing power was equal to that of V_C , but stronger than that of BHT. In addition, the total antioxidant power increased with increasing of flavonoids concentration from 0.1mg/mL to 1.0mg/mL, which was higher than that of BHT, lower than that of V_C at the same concentration though. All of above indicated that ethanol extracts from *Jatropha curcus* L. seed shell had stronger antioxidant activity.

Key words: *Jatropha curcus* L.; seed shell; ethanol extracts; antioxidant activity

中图分类号: TS229

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)21-0073-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2014.21.006

活性氧和自由基是生物体新陈代谢过程中的副产物,过高水平会造成细胞结构及其生物大分子破坏,引起慢性疾病和衰老效应,故寻找和开发天然抗

氧化药品和保健食品日益引起人们的关注。麻疯树 (*Jatropha curcas* L.) 为麻疯树属多年生植物,广泛分布在世界热带和亚热带地区,在我国主要分布在云南、四川、广西、广东及海南等省份。麻疯树在我国少数民族地区用于医药和农药领域,进行治病和杀虫,具有良好效果^[1]。研究表明,麻疯树属植物中含有萜类、黄酮类、香豆素类、甾醇类及生物碱等多种生物活性物质,具有抗氧化、抗病毒、抗炎及抑菌等作用^[1-2]。此外,麻疯树作为非粮木本油料作物,因其“不与粮争地,不与人争粮”,加上抗逆性强、生长迅速,且种子含油量高,成为一种优良的生物柴油原料生产树种之一^[3]。据报道,2015年我国麻疯树种

收稿日期: 2014-03-20

作者简介: 马博(1983-),男,硕士,讲师,研究方向:非粮油料作物废弃物资源化利用。

*通讯作者: 农定确(1957-),男,学士,讲师,研究方向:粮油作物栽培。

基金项目: 广西自然科学基金(2011GXNSFB018044); 广西教育厅科研项目(201203YB171); 广西高等学校特色专业及课程一体化建设项目(GXTSZY224); 广西高等学校优势特色专业建设项目(桂教高教[2014]52号)。

植面积将达 800 万顷,届时将有大量的麻疯树种子产生^[4]。而麻疯树籽壳就是其种子硬化种皮,课题组前期实验发现麻疯树籽壳中含有较高的黄酮类物质^[4],但有关麻疯树籽壳的生物活性还鲜有报道,故本实验通过超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)、1,1-二苯基-2-苦基肼(DPPH)和亚硝酸盐(NO_2^-)的清除能力,以及还原力和总抗氧化能力的测定,对麻疯树籽壳乙醇提取物(JCF)的抗氧化活性进行了初步评价,以期为麻疯树籽壳的高值化利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

麻疯树籽 购买于广西南宁富民达生物科技有限公司。麻疯树籽去杂除尘后脱仁,籽壳置于电热鼓风干燥箱内 50℃ 干燥 72h,粉碎、过 60 目筛,石油醚索氏回流脱脂 12h、挥干石油醚,将其 4℃ 冷藏、备用。

1,1-二苯基-2-苦基肼(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, DPPH) 和 2,4,6-三吡啶基-S-三嗪(ferric-tripyridyltiazine, TPTZ) Sigma 公司;2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(Butylated hydroxytoluene, BHT)(GC, >99.0%) 阿拉丁公司;芦丁 国药集团化学试剂有限公司;邻苯三酚、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、抗坏血酸(V_C)、无水对氨基苯磺酸、盐酸萘乙二胺、硝酸铝、亚硝酸钠、无水乙醇、石油醚(30~60℃)及柠檬酸等均为分析纯。

1.2 仪器与设备

UV-2700 紫外可见分光光度计 日本岛津;FA2004 电子分析天平 上海舜宇恒平科学仪器有限公司;TGL-16M 高速冷冻离心机 湘仪离心机仪器有限公司;HH-S₂ 数显恒温水浴锅 金坛市医疗仪器厂;DHG-9146A 型鼓风干燥箱 上海精宏实验设备有限公司;LD-200 中药粉碎机 长沙常宏制药机械设备厂。

1.3 实验方法

1.3.1 麻疯树籽壳乙醇提取物制备 取麻疯树籽壳粉,按照料液比 1:25,溶于 70% (V/V) 的乙醇溶液中,85℃ 回流提取 2.5h,抽滤,滤液减压除去乙醇,定容。

1.3.2 麻疯树籽壳乙醇提取物中总黄酮含量测定 采用亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠显色法绘制标准曲线^[5]。分别精密量取 0.2mg/mL 芦丁溶液(30% 乙醇制)0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0mL,置入 25mL 容量瓶中,各加 1.0mL 5% 的 $NaNO_2$ 溶液,混匀后静置 6min;再各加 1.0mL 10% 的 $Al(NO_3)_3$ 溶液,混匀,静置 6min;最后各加 10mL 4% 的 $NaOH$ 溶液,混匀,30% 乙醇溶液定容,静置 15min。以空白试剂为对照,在 510nm 处测定各自吸光度,再以吸光度(A)为纵坐标、以芦丁的不同质量浓度为横坐标,绘制标准曲线,所得回归方程为 $Y_1 = 10.993x - 0.0005$, $R^2 = 0.9998$,线性范围为 8~40 $\mu g/L$ 。取 1.0mL 麻疯树籽壳乙醇提取物,置入 25mL 容量瓶中,按照上述方法进行测定总黄酮提取液的吸光度,并代入回归方程,求出麻疯树籽壳乙醇提取物中总黄酮的质量浓度。代入公式(1)计算麻疯树籽壳乙醇提取物中总黄酮的含量。

$$R(\%) = \frac{c \times v \times n}{m \times 1000} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

式中, R 为总黄酮含量(%); c 为提取液中黄酮浓度(mg/mL); v 为黄酮提取液体积(mL); n 为稀释倍数; m 为麻疯树籽壳质量(g)。

1.3.3 超氧阴离子自由基清除实验 采用邻苯三酚自氧化法^[6]。量取不同黄酮质量浓度的麻疯树籽壳乙醇提取物 1.0mL 于 10mL 试管中,加入 0.05mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH8.2)4.5mL,混匀,25℃ 恒温水浴 20min;后取出立即加入 25mmol/L 邻苯三酚溶液 0.3mL,迅速摇匀,再 25℃ 恒温水浴 5min;取出后加入 8mmol/L 的 HCl 溶液 1.0mL,终止反应,并于 320nm 测吸光度,记录为 $A_{\#}$,用蒸馏水代替不同黄酮质量浓度的麻疯树籽壳乙醇提取物,其余步骤同上,320nm 测吸光度,记录为 $A_{\#}$ 。 $O_2^{\cdot-}$ 清除率为: $\eta_2(\%) = (A_{\#} - A_{\#})/A_{\#} \times 100$ 。

1.3.4 DPPH 自由基清除实验 DPPH·是一种较为稳定的以氮为中心的芳香族自由基,其醇溶液呈紫色,在 517nm 处有特征峰。抗氧化剂通过传递电子或氢原子来中和 DPPH·,使其在 517nm 下吸光度下降,进而评价供试物抗氧化能力。按照参考文献^[7],稍作修改。6.5mmol/L 的 DPPH 溶液(无水乙醇配制)4.0mL,加无水乙醇 1.0mL,混匀、反应 40min 后,于 517nm 测吸光度,记录为 A_0 ;用不同黄酮质量浓度的麻疯树籽壳乙醇提取物代替 1.0mL 无水乙醇,其余步骤同上,于 517nm 测吸光度,记录为 A_1 ;用 4.0mL 无水乙醇代替 DPPH 溶液,并用不同黄酮质量浓度的麻疯树籽壳乙醇提取物代替无水乙醇,混匀、反应 40min 后,于 517nm 测吸光度,记录为 A_2 。DPPH·清除率 $\eta_3(\%) = [1 - (A_1 - A_2)/A_0] \times 100$ 。

1.3.5 亚硝酸盐清除实验 采用盐酸萘乙二胺法^[8]。标准曲线绘制:在 10mL 比色管中,依次加入 pH3.0 的柠檬酸缓冲溶液 2.0mL、蒸馏水 1.0mL 和不同浓度质量浓度的 $NaNO_2$ 标准液 2.0mL,混匀、加塞,37℃ 恒温水浴 1h 后,取出立即加入 2.0mL 浓度为 4g/L 的对氨基苯磺酸溶液,混匀、静置 5min 后,加入 2g/L 盐酸萘乙二胺溶液 1.0mL,再混匀、静置 5min,最后以蒸馏水为空白,在 540nm 下测定吸光值。以吸光度为纵坐标、以 $NaNO_2$ 质量浓度为横坐标,绘制标准曲线。样品测定:用 1.0mL 不同黄酮质量浓度的麻疯树籽壳提取液代替蒸馏水, $NaNO_2$ 质量浓度为 10mg/L,相应黄酮质量浓度的麻疯树籽壳乙醇提取物做空白对照,其余操作同上,并在标准曲线上求出 NO_2^- 残留量。 NO_2^- 清除率计算公式为: $\eta_4(\%) = (1 - \text{残留量}/\text{标准量}) \times 100$ 。

1.3.6 还原力的测定实验 采用普鲁士蓝法。按照参考文献^[6],稍作修改。取 2.5mL 不同黄酮质量浓度的麻疯树籽壳乙醇提取物,加入 0.2mol/L 的 PBS (pH6.6) 2.5mL,混匀,再加入 1% (m/V) 的 $K_3Fe(CN)_6$ 2.5mL,混匀,50℃ 水浴 20min 后,再加入 10% (V/V) 三氯乙酸 2.5mL,混匀,3000r/min 离心 10min,取上清液 5mL 加入 0.1% 的 $FeCl_3$ 溶液 1mL,后用蒸馏水补至 10mL,混匀并静置 10min,在 700nm 处测吸光值。

1.3.7 总抗氧化能力实验 采用铁离子还原/抗氧化能力分析法 (Ferric reducing/antioxidant Power, FRAP) 法^[10]。先用 0.04mol/L 的 HCl 溶液配制 0.01mol/L 的 TPTZ 溶液, 然后与 0.3mol/L 的醋酸钠缓冲液 (pH3.6)、0.02mol/L 的 FeCl₃ 溶液按照 10:1:1 的体积比混合得到 TPTZ 工作溶液。再分别取不同黄酮质量浓度的麻疯树籽壳乙醇提取物 0.1mL, 加入 1.8mL 预热至 37℃ 的 FRAP 工作液, 用蒸馏水补至 5mL, 混匀, 37℃ 下反应 20min, 于 593nm 处测定其吸光度, 并在 FeSO₄ 标准曲线上查得 FRAP 值 (以 mmol/L 的 Fe²⁺ 表示)。用不同摩尔浓度 FeSO₄ 溶液代替麻疯树籽壳乙醇提取物, 其余操作同上, 以吸光度为纵坐标, 以不同摩尔浓度 FeSO₄ 为横坐标, 标准曲线绘制。

1.4 数据统计与分析

利用 SPSS13.0 软件包进行数据统计分析, 并借助 Excel 2003 进行作图。

2 结果与分析

2.1 麻疯树籽壳乙醇提取物中总黄酮的测定

麻疯树籽壳乙醇提取物中总黄酮含量为 6.61%。

2.2 超氧阴离子清除作用

O₂⁻ 是基态氧得到一个电子后形成的第一个氧自由基, 可由机体自氧化产生。虽然 O₂⁻ 是一种弱氧化剂, 但可以形成可生成 ·OH 和单线态氧等其它氧自由基, 造成机体氧化胁迫, 引发多种疾病。麻疯树籽壳乙醇提取物对 O₂⁻ 清除能力如图 2 所示。在测定的质量浓度范围内, 麻疯树籽壳乙醇提取物对 O₂⁻ 清除能力随着浓度增加而增强, 其半数抑制浓度 (IC₅₀) 为 0.502mg/mL, 分别小于 V_c 和 BHT 的 0.654、0.567mg/mL。除质量浓度 0.6mg/mL 和 0.8mg/mL 外, 麻疯树籽壳乙醇提取物的 O₂⁻ 清除率均高于同质量浓度 BHT; 当麻疯树籽壳乙醇提取物中黄酮质量浓度为 1.0mg/mL 时, 其清除率达 85.51%, 表明麻疯树籽壳乙醇提取物具有很强 O₂⁻ 清除能力。

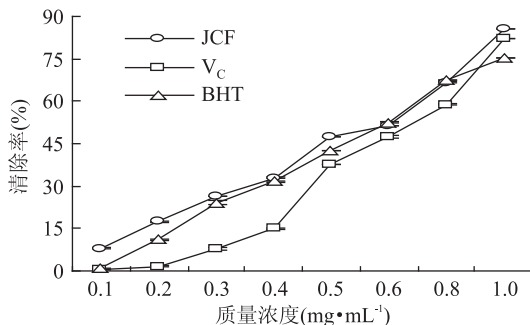


图 2 麻疯树籽壳乙醇提取物对超氧阴离子的清除作用

Fig.2 Scavenging activity of ethanol extracts from *Jatropha curcus* L. seed shell on superoxide anion radicals

2.2 DPPH 自由基清除作用

由于 DPPH· 实验敏感性强、重现性好、操作简单、短时间内能做多个样品, 目前已被广泛用于评价抗氧化剂的抗氧化性能^[10-11]。由图 3 所示。在质量浓度 0.05~0.3mg/mL 范围内, 麻疯树籽壳乙醇提取物和 BHT 对 DPPH· 清除率都随质量浓度的增大而增

加, 而后二者清除率均不再显著增加。另外, 从质量浓度 0.2mg/mL 起, 麻疯树籽壳乙醇提取物的 DPPH· 清除率大于 BHT, 但麻疯树籽壳乙醇提取物的 DPPH· 清除率在测定浓度范围内明显均低于 V_c。麻疯树籽壳乙醇提取物的黄酮半数抑制浓度 (IC₅₀) 为 0.185mg/mL, 大于 V_c 的 0.085mg/mL, 略低于 BHT 的 0.186mg/mL, 可见麻疯树籽壳乙醇提取物具有较强的 DPPH· 清除能力。

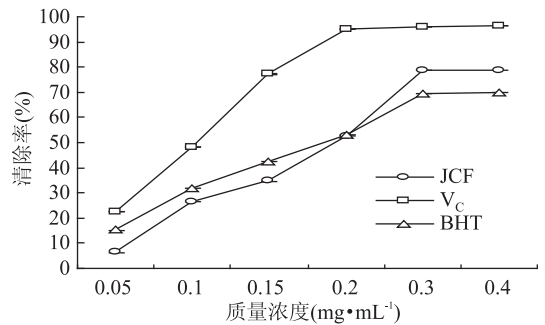


图 3 麻疯树籽壳乙醇提取物对 DPPH· 的清除作用

Fig3 Scavenging activity of ethanol extracts from *Jatropha curcus* L. seed shell on DPPH radicals

2.3 亚硝酸盐清除作用

亚硝胺是已知致癌性最强的化学物质之一, 它可由亚硝酸盐和胺类在人及动物的胃中合成。因此, 清除体内亚硝酸盐是防止癌症的重要途径。结果表明, NaNO₂ 的回归方程为 Y₂ = 0.1151x + 0.0616, R² = 0.9966, 线性范围为 5~20mg/L。由图 4 可知, 在测定的黄酮质量浓度范围内, 麻疯树籽壳乙醇提取物的亚硝酸盐清除率与其黄酮质量浓度密切相关, 其半数抑制浓度 (IC₅₀) 为 0.494mg/mL, 大于 V_c 的 0.115mg/mL, 但其黄酮质量浓度超过 0.5mg/mL 后, 其亚硝酸盐清除率开始高于 BHT, 而 BHT 清除率在测定范围内均小于 50%。当麻疯树籽壳乙醇提取物中黄酮的质量浓度为 1.0mg/mL 时, 其清除率达到 81.63%。由此说明麻疯树籽壳乙醇提取物具有较强的亚硝酸盐清除能力。

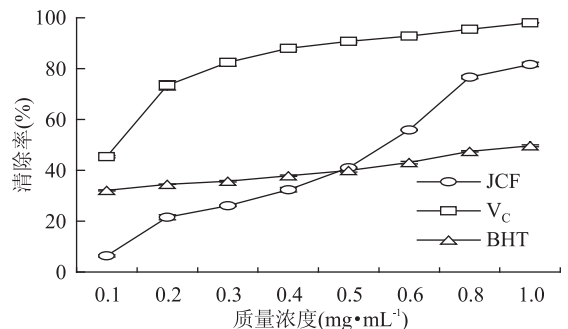


图 4 麻疯树籽壳乙醇提取物对亚硝酸盐的清除作用

Fig.4 Scavenging activity of ethanol extracts from *Jatropha curcus* L. seed shell on nitrite

2.4 还原力

抗氧化剂通过自身还原作用供给电子而使自由基变为稳定分子, 失去活性, 故还原力是反映抗氧化剂提供电子能力的重要指标。待测物的还原力与吸光度大小相关, 吸光度越大, 还原力越强, 抗氧化性

越强,还原力可通过待测物吸光度大小来表示^[10]。由图5可知,麻疯树籽壳乙醇提取物中黄酮的质量浓度在0.1~0.5mg/mL范围时,其吸光度与质量浓度之间存在剂量依赖关系;在0.7~1.0mg/mL范围时,其吸光度基本稳定,并与同质量浓度的对照V_c吸光度相当;当麻疯树籽壳总黄酮质量浓度超过0.3mg/mL时,其吸光度大于BHT。可见麻疯树籽壳乙醇提取物在高质量浓度下具有较强的还原力。

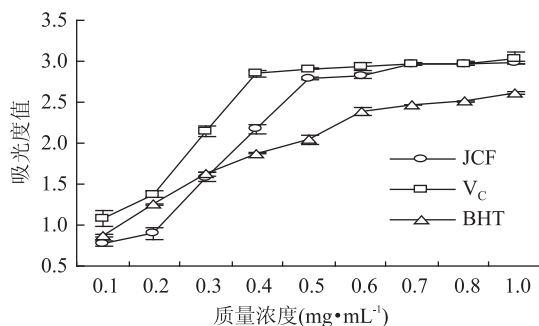


图5 麻疯树籽壳乙醇提取物的还原力

Fig.5 Reducing power of ethanol extracts from *Jatropha curcus* L. seed shell

2.5 总抗氧化能力

FRAP作为最简单、快速、廉价的常规分析方法之一,目前已发展成一种直接测定供试物抗氧化能力的方法^[11]。结果显示,FeSO₄的线性回归方程为 $Y_3 = 2.2045x + 0.0935$, $R^2 = 0.9999$,线性范围为0.025~0.8mmol/L。麻疯树籽壳乙醇提取物的抗氧化能力如图6所示。在测定浓度范围内,其FRAP值随着质量浓度增加而增强,且均大于BHT而小于V_c。在麻疯树籽壳乙醇提取物的黄酮质量浓度为1.0mg/mL时,其FRAP值为1.08mmol/L,表明麻疯树籽壳乙醇提取物具有较强的抗氧化能力。

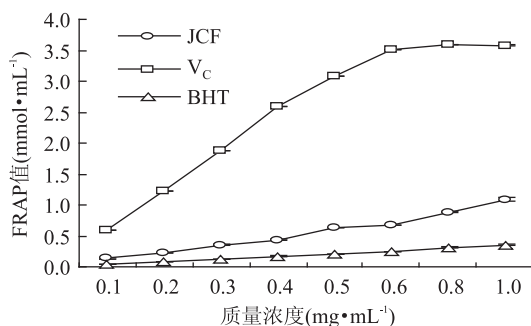


图6 麻疯树籽壳乙醇提取物的总抗氧化能力

Fig.6 Total antioxidant ability of ethanol extracts from *Jatropha curcus* L. seed shell

3 结论

本实验通过5种体外抗氧化活性测定的结果可知,麻疯树籽壳乙醇提取物具有较强的O₂⁻·、DPPH·及NO₂⁻清除能力,且由其半数抑制浓度(IC₅₀)可以判定麻疯树籽壳乙醇提取物对O₂⁻·(0.502mg/mL)、NO₂⁻(0.494mg/mL)及DPPH·(0.185mg/mL)的清除能力依次增大。此外,乙醇提取物中黄酮质量浓度在0.7~1.0mg/mL时,其还原力大于BHT,且与同质量浓度V_c相当;麻疯树籽壳乙醇提取物的总抗氧化能力在测定范围内随其黄酮质量浓度增加而增强,且大于同质量浓度的BHT。以上结果表明,麻疯树籽壳乙醇提取物的抗氧化性能较好。进而,麻疯树籽壳可以用作天然抗氧化剂生产原料。

参考文献

- [1] 全治国,赵静峰,羊晓东,等.小桐子的化学成分及药理作用研究进展[J].云南化工,2009,36(2):39-43.
- [2] 李玲,李晓帆,吴慧星,等.麻疯树种子中抗氧化活性成分的研究[J].中草药,2010,41(12):1932-1936.
- [3] 马博,兰翠玲,李力,等.麻疯树籽粕饲用品质改良及其深加工技术研究进展[J].中国油脂,2011,36(5):26-30.
- [4] 刘细祥,马博,张婷婷,等.响应面法优化麻疯树籽壳总黄酮工艺的研究[J].食品工业科技,2014,35(6):284-287,291.
- [5] 张婷婷,马博,李荣峰,等.桂西野生蕨菜黄酮提取工艺的研究[J].北方园艺,2013,16:163-165.
- [6] 宣丽,刘长江.不同提取方法对软枣猕猴桃多糖单糖组成及抗氧化活性的影响[J].天然产物研究与开发,2013,25:1260-1265.
- [7] 郭峰,岳永德,汤峰,等.用清除有机自由基DPPH法评价竹叶提取物抗氧化能力[J].光谱学与光谱分析,2008,28(7):1578-1582.
- [8] 李利华.马铃薯块茎粗多分体外抗氧化活性[J].食品与发酵工业,2013,37(9):176-179.
- [9] Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay [J]. Analytical Biochemistry, 1996, 239(1): 70-76.
- [10] Choe JH, Jang A, Choi JH, et al. Antioxidant Activities of Lotus Leaves (*Nelumbo nucifera*) and Barley Leaves (*Hordeum vulgare*) Extracts [J]. Food Science Biotechnology, 2010, 19(3): 831-836.
- [11] Jagtap UB, Panaskar SN, Bapat VA. Evaluation of Antioxidant Capacity and Phenol Content in Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) Fruit Pulp [J]. Plant Foods for Human Nutrition, 2010, 65: 99-104.

(上接第72页)

2010,120(3):817-824.

[14] Nalinanon Sithipong, Benjakul Soottawat. Use of pepsin for collagen extraction from the skin of big eye snapper (*Priacanthus tayenus*) [J]. Food Chemistry, 2007, 104(2): 593-601.

[15] Wang Lingzhao. Optimization of conditions for extraction of acid-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)

by response surface methodology [J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2008, 9(4): 604-607.

[16] 户业丽,程波,吕中,等.人工养殖鲟鱼皮中羟脯氨酸含量的测定[J].食品研究与开发,2008,29(1):117-119.

[17] 郭恒斌,曾庆祝,闫磊,等.分光光度法测定鱼皮中羟脯氨酸含量[J].现代食品科技,2007,23(7):81-83.