

## 用清除有机自由基 DPPH 法评价竹叶提取物抗氧化能力

郭雪峰, 岳永德\*, 汤 锋, 王 进, 姚 曦

国际竹藤网络中心, 国家林业局竹藤科学与技术重点开放实验室, 北京 100102

**摘 要** 通过对 1,1-二苯基苦基苯肼(DPPH)溶液吸收光谱、DPPH 溶液反应体系的研究, 得出以下结论, 分光光度法测定 DPPH 溶液反应体系的测定波长为 518.4 nm, 反应体系为 4.00 mL 257.7 mg · L<sup>-1</sup> 的 DPPH 溶液中加 1 mL 不同浓度的抗氧化剂, 反应体系加入抗氧化剂后反应时间为 40 min; 用上述方法研究评价合成抗氧化剂叔丁基对苯二酚(TBHQ)和 2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)对 DPPH 自由基清除率和浓度的关系, 以 IC<sub>50</sub> 值(清除率为 50%时, 抗氧化剂的浓度值)作为评价指标, 测得合成抗氧化剂和效果最好竹叶提取物样品 IC<sub>50</sub> 值分别为, TBHQ(21.14 mg · L<sup>-1</sup>), BHT(42.09 mg · L<sup>-1</sup>), M40(108.40 mg · L<sup>-1</sup>), M40 等竹叶提取物可以作为天然抗氧化剂进行开发。

**关键词** 竹叶提取物; 1,1-二苯基苦基苯肼; 清除率; IC<sub>50</sub> 值

**中图分类号**: TS201.2 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-0593(2008)07-1578-05

## 引 言

竹叶作为一种“药食两用的天然植物”已被广大消费者所接受, 竹叶提取物主要功能性成分为竹叶黄酮糖苷, 具有抗氧化和抑菌活性, 可以作为一种生物黄酮类保健营养素进行开发, 前景广阔。迄今为止, 国内外用于评价植物抗氧化能力的方法已有很多, 如硫氰酸盐(thiocyanate)法<sup>[1]</sup>、硫代巴比妥酸(thiobarbituric acid, TBA)法<sup>[2]</sup>、抗氧化能力指数法(oxygen radical absorbance capacity, ORAC)<sup>[3]</sup>、化学发光法<sup>[4]</sup>等, 还有很多清除自由基的检测评价方法<sup>[5-8]</sup>, 这些方法都有各自的不足之处。1,1-二苯基苦基苯肼(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)检测法是通过分子中 1 个稳定的 DPPH 自由基与抗氧化剂提供的 1 个电子配对结合, 使 DPPH 的特征紫色消失, 因此可用于抗氧化剂清除自由基能力的评价。近年来, 国内外已有人初步利用 DPPH 溶液的紫色吸光度变化作为清除自由基能力的分光光度测定<sup>[9-12]</sup>, 但其准确性、灵敏度和可行性还需进一步系统的探讨。

## 1 材料和方法

## 1.1 仪器和试剂

Ultrospec 3300 pro 分光光度计, 英国 Biochrom 公司; 1,1-二苯基苦基苯肼(DPPH), Fluka 公司; 叔丁基对苯二酚

(TBHQ), 北京科华特种试剂联合开发中心; 2,6-二叔丁基对甲酚(BHT), 国药集团化学试剂有限公司; 乙醇、AB-8 大孔树脂等均为国产分析纯试剂。

## 1.2 竹叶材料及前处理方法

毛竹(*Phyllostachys edulis*)叶于 2006 年 9 月采自江苏南京林业大学竹种园。取 6 000 g 毛竹叶粉, 95%乙醇, 温度 60 °C, 回流提取 4 次, 提取液过滤浓缩得竹叶提取物浸膏。竹叶提取物浸膏溶解于 95%乙醇后过 AB-8 大孔树脂柱, 分别用纯水、20%乙醇、40%乙醇、60%乙醇、80%乙醇、丙酮洗脱, 水洗脱组分弃用, 其他洗脱组分浓缩得干膏, 备用。各洗脱组分分别简称如下: M20, 毛竹叶提取物浸膏过 AB-8 大孔树脂柱, 水洗脱后, 20%乙醇洗脱下组分; M40, 20%乙醇洗脱后, 40%乙醇洗脱下组分; M60, 40%乙醇洗脱后, 60%乙醇洗脱下组分; M80, 60%乙醇洗脱后, 80%乙醇洗脱下组分; MA, 80%乙醇洗脱后, 丙酮洗脱下组分。

## 1.3 溶液配制

## 1.3.1 样品试液的配制

分别称取合成抗氧化剂叔丁基对苯二酚(TBHQ)0.266 9 g, 2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)0.318 6 g; 再分别称取样品 M20 0.320 7 g, M40 0.307 3 g, M60 0.320 0 g, M80 0.295 2 g, MA 0.297 4 g, 用 95%乙醇定容到 100 mL, 得到溶液质量浓度值分别为, TBHQ 2.669 mg · mL<sup>-1</sup>, BHT 3.186 mg · mL<sup>-1</sup>, M20 3.207 mg · mL<sup>-1</sup>, M40 3.073 mg · mL<sup>-1</sup>, M60 3.200 mg · mL<sup>-1</sup>, M80 2.952 mg · mL<sup>-1</sup>, MA 2.974

收稿日期: 2007-09-08, 修订日期: 2007-12-18

基金项目: 国家“十一五”科技支撑项目(2006BAD19B08)和国际竹藤网络中心基本科研业务费专项资金(06/07-B14)资助

作者简介: 郭雪峰, 1972 年生, 国际竹藤网络中心讲师 \* 通讯联系人 e-mail: yueyd@icbr. ac. cn

mg · mL<sup>-1</sup>, 待测。

### 1.3.2 DPPH 溶液的配制

准确称取 DPPH 试剂 0.128 8 g, 用 95% 乙醇溶解定容至 500 mL 容量瓶中, 得浓度为 257.7 mg · L<sup>-1</sup> DPPH 贮备液 (6.5 × 10<sup>-4</sup> mol · L<sup>-1</sup>), 摇匀置于冰箱中冷藏备用。

### 1.4 清除 DPPH 自由基能力的测定步骤

(1) 在 10 mL 比色管中依次加入 4.0 mL 257.7 mg · L<sup>-1</sup> DPPH 溶液和 1.0 mL 95% 乙醇, 混匀反应稳定后, 以 95% 乙醇液为参比, 在 λ<sub>max</sub> 处测吸光值, 记为 A<sub>0</sub>。

(2) 在 10 mL 比色管中依次加入 4.0 mL 257.7 mg · L<sup>-1</sup> DPPH 溶液的溶剂 (95% 的乙醇溶液) 和 1.0 mL 待测试样溶液, 混匀反应稳定后, 以 95% 乙醇液为参比, 在 λ<sub>max</sub> 处测吸光值, 记为 A<sub>r</sub>。

(3) 在 10 mL 比色管中依次加入 4.0 mL 257.7 mg · L<sup>-1</sup> DPPH 溶液和 1.0 mL 待测试液, 混匀反应稳定后, 以 95% 乙醇液为参比, 在 λ<sub>max</sub> 处测吸光值, 记为 A<sub>s</sub>。

(4) 计算自由基清除率 (Y), 按式 (1) 计算。

$$Y(\%) = \left(1 - \frac{A_s - A_r}{A_0}\right) \times 100 \quad (1)$$

## 2 结果与分析

### 2.1 DPPH 的吸收光谱与测定波长的确定

每个 DPPH 分子在溶液中可生成一个稳定的含氮自由基, 具有典型紫色, 当它与提供 1 个电子的自由基清除剂作用时, 生成无色产物, 使溶液的典型紫色变浅。对有机自由基 DPPH 溶液在 200~700 nm 处进行全波长扫描。从图 1 可以看出, 有机自由基 DPPH 溶液有两个特征吸收峰 327.9 和 518.4 nm, 加入抗氧化剂叔丁基对苯二酚 (TBHQ)、2,6-二叔丁基对甲酚 (BHT) 后两个吸收峰皆降低, 加入 M40 后 327.9 nm 吸收峰被 M40 成分吸收峰覆盖, 但 518.4 nm 吸收的降低较显著, 故 518.4 nm 处吸收峰的变化可以反应抗氧化剂清除自由基的情况, 选用可见光 518.4 nm 的吸收峰的变化来表示 DPPH 含量的变化, 用以评价竹叶提取物的抗氧化能力, 这与 Larrauri<sup>[9]</sup> 等和陈丛瑾<sup>[13]</sup> 等报道 DPPH 吸收峰在 517 nm 基本一致, 与彭长连等<sup>[14]</sup> 报道的 525 nm 略有差异。

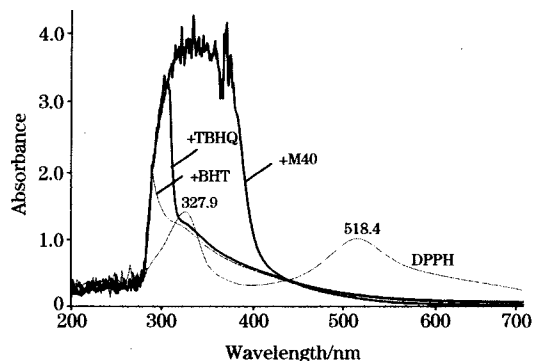


Fig. 1 Absorbance spectra of DPPH

### 2.2 DPPH 溶液吸光值与浓度关系

分别取 257.7 mg · L<sup>-1</sup> DPPH 贮备液 4, 2, 1 mL, 稀释 5 倍的 DPPH 贮备液 4, 2 和 1 mL, 用 95% 乙醇稀释定容至 5 mL, 配成浓度梯度为 206.16, 103.08, 51.54, 41.23, 20.62 和 10.31 mg · L<sup>-1</sup> 的 DPPH 溶液, 测吸光值 (A)。以 A 对 DPPH 浓度 (c) 作图, 得 A 与 c 线性关系方程 A = 0.024 3c - 0.057 4, r<sup>2</sup> = 0.995 3。由图 2 可以看出, DPPH 的吸光值和它的浓度有很好线性相关, 吸光值可以反应其浓度的变化。

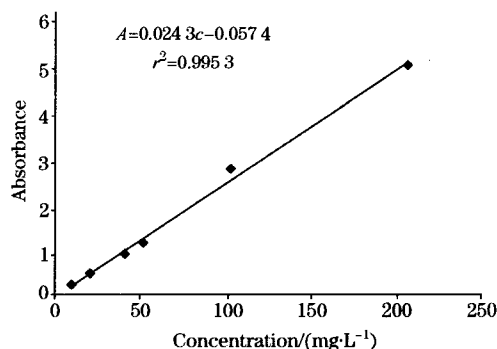


Fig. 2 Linearity correlation between DPPH concentration and absorbance

### 2.3 DPPH 溶液稳定性试验

为了解 DPPH 反应体系在加入抗氧化剂和 M40 后吸光值 (A<sub>518.4</sub>) 随时间的变化规律, 用高浓度和低浓度 DPPH 反应体系进行测定。高浓度体系是在 3 个 4.0 mL DPPH (257.7 mg · L<sup>-1</sup>) 溶液中分别加入 1.0 mL TBHQ (1.335 mg · mL<sup>-1</sup>), BHT (1.593 mg · mL<sup>-1</sup>), M40 (1.537 mg · mL<sup>-1</sup>), A<sub>518.4</sub> 值随时间变化规律 (图 3); 低浓度体系是在 3 个 4.0 mL DPPH (51.54 mg · L<sup>-1</sup>) 溶液中分别加入 1.0 mL TBHQ (0.266 9 mg · mL<sup>-1</sup>), BHT (0.318 6 mg · mL<sup>-1</sup>), M40 (0.307 3 mg · mL<sup>-1</sup>), A<sub>518.4</sub> 值随时间变化规律 (图 4)。从图 3 和图 4 可以看出, 加入 TBHQ 后, DPPH 反应体系的 A<sub>518.4</sub> 很快达到稳定状态; 加入 BHT 或 M40 后, DPPH 反应体系 A<sub>518.4</sub> 值在最初 20 min 内下降较快, 在 20~30 min 内 A<sub>518.4</sub> 值变化缓慢, 40 min 后 A<sub>518.4</sub> 值达到稳定状态, 说明无

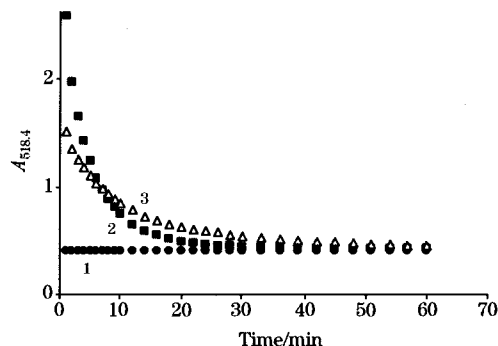


Fig. 3 Curves of high concentration DPPH absorbance with respect to time after addition of antioxidant

1; TBHQ; 2; BHT; 3; M40

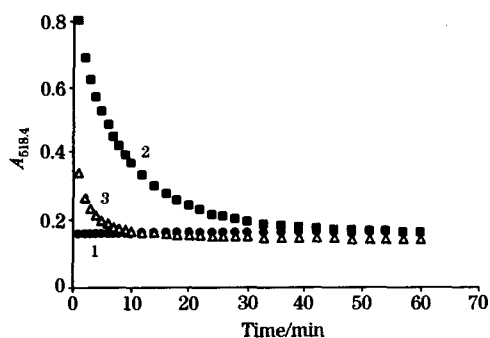


Fig. 4 Curves of low concentration DPPH absorbancy with respect to time after addition of antioxidant  
1: TBHQ; 2: BHT; 3: M40

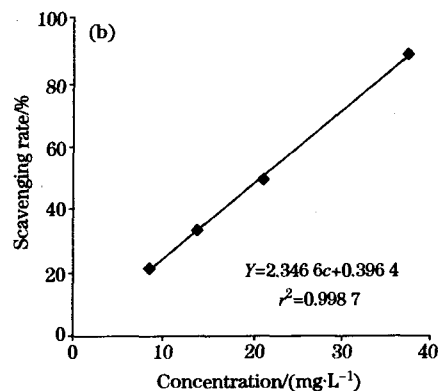
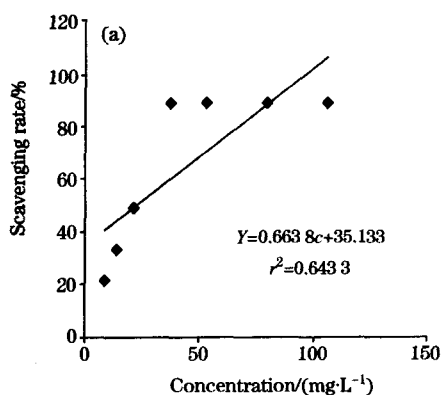


Fig. 5 Linearity correlation between DPPH scavenging rate and TBHQ concentration

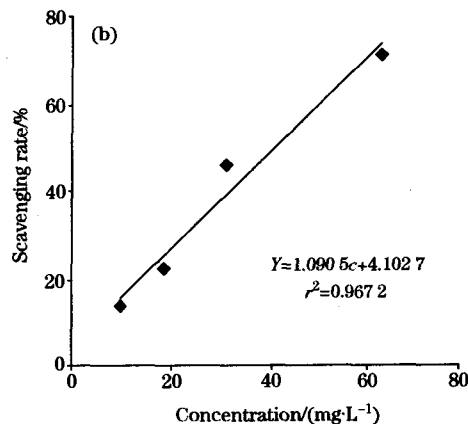
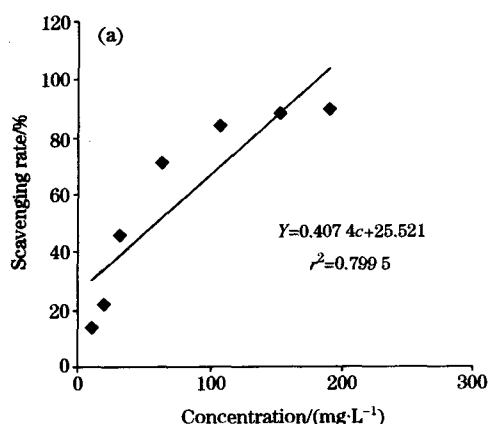


Fig. 6 Linearity correlation between DPPH scavenging rate and BHT concentration

由于抗氧化剂浓度较高时,其浓度与 DPPH 清除率不成线性关系,因此,清除率不能很好地表示抗氧化剂的活性,也不能很好地对不同的抗氧化剂进行比较。为了便于比较说明不同抗氧化剂的抗氧化性强弱,选用  $IC_{50}$  值作为抗氧化剂的自由基清除能力的测定指标。将待测抗氧化剂配制成系列溶液,测定各浓度抗氧化剂对 DPPH 自由基清除率,在清除率 20%~80% 的范围内,绘制清除率对浓度曲线,计算出清除率为 50% 时的浓度值,即为  $IC_{50}$  值。采用此法测定的 TB-

论加入哪种抗氧化剂,40 min 后反应体系的  $A_{518.4}$  值都趋于稳定,所以选择 DPPH 与抗氧化剂反应的时间为 40 min,由于 DPPH 反应体系在加入抗氧化剂后,吸光值降低,所以选浓度高的反应体系。

#### 2.4 两种合成抗氧化剂的抗氧化能力及其评价方法

分别对合成抗氧化剂叔丁基对苯二酚(TBHQ)、2,6-二叔丁基对甲酚(BHT),逐级稀释,按 1.4 节方法进行测定,计算抗氧化剂对 DPPH 的清除率,以清除率  $Y$  对抗氧化剂浓度  $c$  作图。从图 5 和图 6(a)图可以看出:在 TBHQ 浓度大于  $37.37 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , BHT 浓度大于  $63.72 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  之后,它们对 DPPH 的清除率基本上维持在一个稳定的水平上,导致线性关系很差;从图 5 和图 6(b)图可以看出:两种抗氧化剂对 DPPH 的清除率在 20%~80% 范围内,清除率与浓度呈良好的线性关系。

HQ, BHT 的  $IC_{50}$  值分别为 21.14, 42.09,  $IC_{50}$  值越低,抗氧化剂的自由基清除能力越强,可见 TBHQ 清除 DPPH 自由基能力强于 BHT。

#### 2.5 竹叶提取物抗氧化能力的评价

按 1.4 节方法测定和计算,得各竹叶提取物样品清除率  $Y$  与浓度  $c$  之间关系(图 7),计算出  $IC_{50}$  值分别为: M20 ( $141.11 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), M40 ( $108.40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), M60 ( $177.38 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), M80 ( $268.21 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), MA ( $837.67 \text{ mg} \cdot$

$L^{-1}$ ), 根据  $IC_{50}$  值, 各样品清除 DPPH 自由基能力由强到弱依次为:  $M40 > M20 > M60 > M80 > MA$ , 其中以 M40,

M20, M60 清除 DPPH 自由基能力较强, M40 最强。

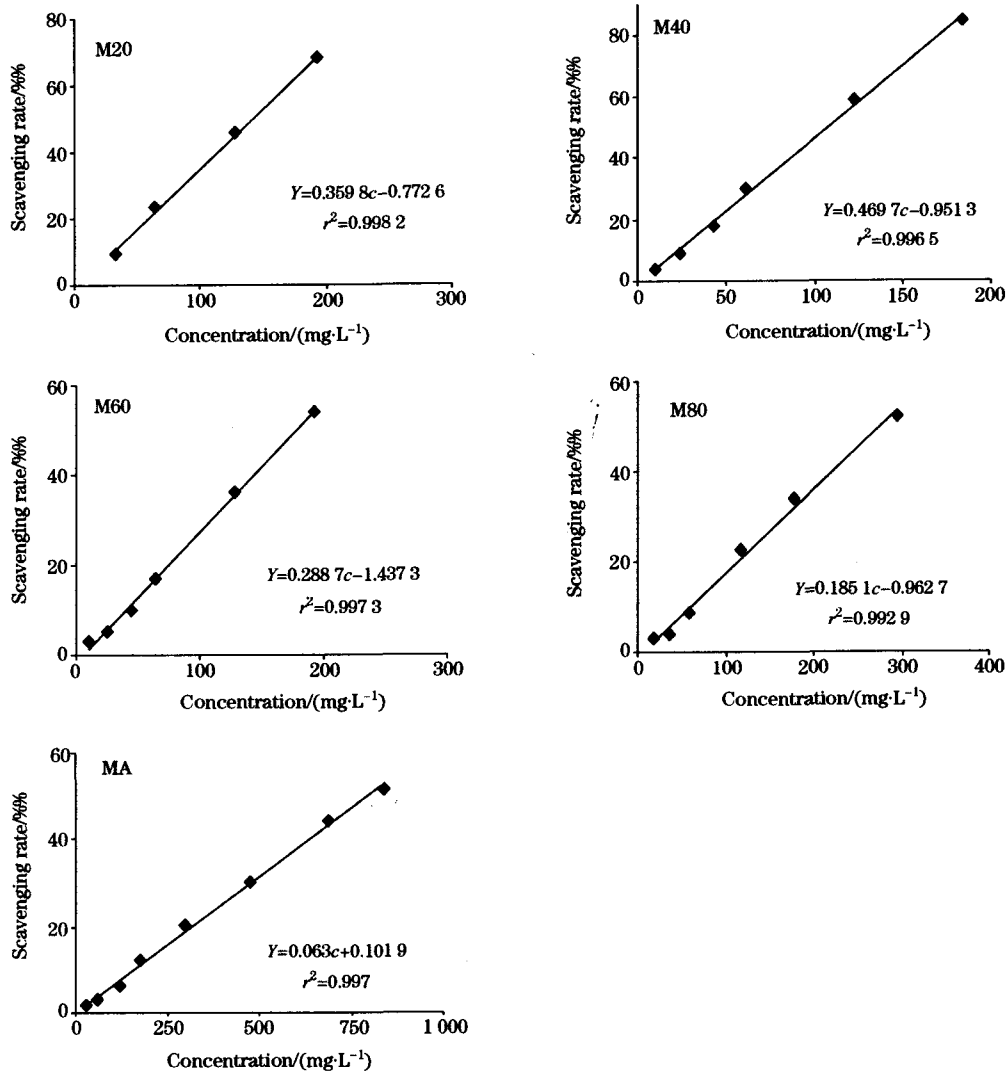


Fig. 7 Linearity correlation between DPPH scavenging rate and concentration of bamboo leaf extract

### 3 结论

通过研究 DPPH 溶液吸收光谱, 质量浓度与吸光值的关系, 以及高和低浓度 DPPH 溶液体系中加入 TBHQ, BHT, M40 后的吸光值变化等, 得出以下结论, 采用分光光度法测定抗氧化剂清除 DPPH 自由基能力的测定波长为 518.4 nm, 反应体系为  $257.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 DPPH 4.00 mL 溶液中加

1 mL 不同浓度抗氧化剂, 反应时间 40 min, 以  $IC_{50}$  值作为评价抗氧化剂清除 DPPH 自由基能力的指标。用此法测定竹叶提取物抗氧化能力, 得出 M20, M40, M60 抗氧化能力较强, M40 最强, 尽管比合成抗氧化剂 TBHQ 和 BHT 稍差一些, 但考虑到竹叶提取物只是个粗提物, 可以说明竹叶提取物 M40 等样品具有很好的抗氧化能力,  $IC_{50}$  值可以作为评价抗氧化能力的指标。

## 参 考 文 献

- [1] Osawa T, Namiki M A. *Agric. Biol. Chem.*, 1981, 45(3): 735.
- [2] Ottolenghi A. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1959, 79: 355.
- [3] Cao G H, Alessio H M, Culter R G. *Free Radic. Biol. Med.*, 1993, 14(3): 303.
- [4] WU Yong-jun, SHI Jie, QU Ling-bo, et al(吴拥军, 石杰, 屈凌波, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2006, 26(9): 1688.
- [5] SONG Huai-en, WEN Ren(宋怀恩, 闻韧). *Chinese Journal of Medicinal Chemistry(中国药物化学杂志)*, 2003, 13(2): 119.
- [6] ZHENG Jing-quan(郑晶泉). *Foreign Medical Sciences(Section of Hygiene)(国外医学: 卫生学分册)*, 2000, 27(1): 37.
- [7] LIANG Ai-hui, JIANG Zhi-liang, ZHOU Su-mei, et al(梁爱惠, 蒋治良, 周苏梅, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2006, 26(11): 2113.
- [8] ZHANG Li-wei, WANG Jin-shan, JIANG Chong-qiu(张立伟, 王金山, 江崇球). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2004, 24(9): 1103.
- [9] Larrauri J A, Sanchez M C, Saura C F. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, 46(7): 2694.
- [10] Yokozawa T, Dong E, Natagawa T. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, 46(6): 2143.
- [11] Hideyuki L, Kahara T. *Bioscience, Biotechnology and Biochem.*, 2001, 65(10): 2162.
- [12] Ostrakhovich E A, Carles C. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 2000, 44(3): 507.
- [13] CHEN Cong-jin, HUANG Ke-ying, LI De-liang, et al(陈丛瑾, 黄克瀛, 李德良, 等). *Chemistry and Industry of Forest Products(林产化学与工业)*, 2006, 26(3): 69.
- [14] PENG Chang-lian, CHEN Shao-wei, LIN Zhi-fang, et al(彭长连, 陈少薇, 林植芳, 等). *Progress in Biochemistry and Biophysics(生物化学与生物物理进展)*, 2000, 27(6): 658.

## Detection of Antioxidative Capacity of Bamboo Leaf Extract by Scavenging Organic Free Radical DPPH

GUO Xue-feng, YUE Yong-de\*, TANG Feng, WANG Jin, YAO Xi

International Centre for Bamboo and Rattan, State Forestry Administration Key Open Laboratory on Bamboo and Rattan Science and Technology, Beijing 100102, China

**Abstract** By studying on absorption spectrum of DPPH solution and DPPH reaction system, the conclusion was drawn as follows, the wavelength for the determination of DPPH reaction system by spectrophotometric method was chosen to be 518.4 nm, DPPH reaction system was 4.00 mL of 257.7 mg · L<sup>-1</sup> DPPH+1 mL of antioxidant solution with the reaction time of DPPH reaction system of 40 min. The relation between DPPH radical scavenging rate and the concentration of TBHQ and BHT was studied, and IC<sub>50</sub> (the value of antioxidant concentration for scavenging half of DPPH radical) was used as the index to evaluate scavenging capacity. The determining IC<sub>50</sub> values were as follows: TBHQ(21.14 mg · L<sup>-1</sup>), BHT(42.09 mg · L<sup>-1</sup>) and M40(108.40 mg · L<sup>-1</sup>). Bamboo leaf extract could be used as natural antioxidant.

**Keywords** Bamboo leaf extract; DPPH; Scavenging rate; IC<sub>50</sub> value

(Received Sep. 8, 2007; accepted Dec. 18, 2007)

\* Corresponding author