

用清除超氧阴离子自由基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 通过对邻苯三酚反应体系的吸收光谱, 对自氧化速率及邻苯三酚浓度和缓冲液 pH 值对反应体系产生的超氧阴离子自由基清除率的影响进行了研究。分光光度法测定邻苯三酚反应体系的检测波长为 319.5 nm, 反应体系体积 10 mL, 反应时间为 9 min, $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 邻苯三酚加入量为 0.3 mL, Tris-HCl 缓冲液 pH 值为 8.2, 自氧化速率为 0.035; 用上述方法研究合成抗氧化剂叔丁基对苯二酚(TBHQ)和竹叶提取物样品浓度和清除率的关系, 以 IC_{50} 值(清除率为 50%时的浓度值)作为评价指标, 测得 TBHQ 和效果最好样品的 IC_{50} 值分别为 TBHQ($95.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)和 M40($298.69 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 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; 超氧阴离子自由基; 清除率; IC_{50} 值

中图分类号: TS201.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2008)08-1823-04

引言

竹叶为“药食两用的天然植物”, 其竹叶提取物可以作为一种生物黄酮类保健营养素进行开发。迄今为止, 国内外用于评价植物抗氧化能力的方法有硫氰酸盐法^[1]、硫代巴比妥酸法^[2]、抗氧化能力指数法^[3]、化学发光法^[4]、清除自由基法^[5-8]等, 这些方法各有利弊。邻苯三酚自氧化的机理极为复杂, 至今研究的还不是十分清楚。近年来, 国内外也有一些利用邻苯三酚自氧化产生超氧阴离子自由基法评价抗氧化能力的报道^[9-15], 但方法体系需进一步系统的研究。本文对影响邻苯三酚自氧化法的诸多因子进行了系统的研究, 建立了一种完善的评价清除超氧阴离子自由基能力的方法, 并用其评价了竹叶提取物的抗氧化能力。

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; BP301S 电子天平, 德国 Sartorius 公司; MP3002 电子天平, 上海恒平科学仪器有限公司; 邻苯三酚(Pyrogallol acid), 国药集团化学试剂有限公司; 叔丁基对苯二酚(TBHQ), 北京科华特种试剂联合开发中心; 三羟甲基氨基甲烷(Tris)、盐酸(HCl)、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 月采自江苏省南京林业大学竹种园。

取 6 000 g 毛竹叶粉, 95%乙醇, 料液比 1:10, 温度 60 °C, 热回流提取 4 次, 提取液过滤浓缩得浸膏; 浸膏用尽量少 95%乙醇溶解后上 AB-8 大孔树脂柱, 分别用纯水, 20%, 40%, 60%, 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。各洗脱组分简称如下: 浸膏上大孔树脂柱, 水洗脱后, 20%乙醇洗脱下组分(M20); 20%乙醇洗脱后, 40%乙醇洗脱下组分(M40); 40%乙醇洗脱后, 60%乙醇洗脱下组分(M60); 60%乙醇洗脱后, 80%乙醇洗脱下组分(M80); 80%乙醇洗脱后, 丙酮洗脱下组分(MA)。

1.3 溶液配制

1.3.1 样品试液配制

分别称取合成抗氧化剂(TBHQ)和样品, 并用 95%乙醇定容到 100 mL, 得各样品试液质量浓度分别为: TBHQ: $2.669 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, M20: $3.207 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, M40: $3.073 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, M60: $3.200 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, M80: $2.952 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, MA: $2.974 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 待测。

1.3.2 反应体系溶液配制

Tris 溶液: 称取 Tris 12.11 g, 用水溶解定容至 1 000 mL, 得 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris 溶液。HCl 溶液: 量取 36%~38% HCl 4.29 mL, 用水溶解定容至 1 000 mL, 得 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 溶液, 将其稀释 5 倍得 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 溶液。

收稿日期: 2008-01-06, 修订日期: 2008-03-26

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项目(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

不同 pH 值 Tris-HCl 缓冲液: 取 5 个 250 mL 烧杯, 分别加入 50 mL $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris 溶液和 45 mL $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 溶液, 混匀, 用 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 溶液调到 pH 值分别为 7.4, 7.8, 8.2, 8.6, 9.0 即可。邻苯三酚溶液: 称取 0.0378 g 邻苯三酚, 用 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 溶解定容至 100 mL, 得 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 邻苯三酚溶液。

2 结果与分析

2.1 邻苯三酚反应体系的吸收光谱与测定波长确定

邻苯三酚在碱性条件下发生自氧化反应, 产生稳定浓度的超氧阴离子自由基($\text{O}_2 \cdot^-$)与中间物, 中间物又与超氧阴离子自由基($\text{O}_2 \cdot^-$)反应, 得到一种带有颜色的中间产物, 此物在紫外有吸收, 引起某一波长处吸光值的线性积累, 来反应抗氧化剂的清除能力的大小。量取 pH 值为 8.2 的 Tris-HCl 缓冲液 5 mL 与 4.7 mL 双蒸水, 置于 10 mL 比色管中混均, 在 25°C 水浴中保温 20 min, 取出后立即加入在 25°C 预热过的 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 邻苯三酚 0.3 mL, 迅速摇匀后倒入比色皿中, 用 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 为空白液, 在 250~450 nm 波长处, 分别在反应 1, 3, 6, 9, 17, 25, 33, 39 min 后进行 8 次扫描。从图 1 可以看出: 在 1 min 时, 反应体系在最大吸收波长 319.5 nm 处吸光值最低, 并且随反应时间延长而增加, 说明反应体系产生有颜色中间产物积累越来越多; 反应体系最大吸收波长不随反应时间而变化, 可以用 319.5 nm 作为邻苯三酚自氧化反应体系的检测波长, 这与蒋柳云^[9]和樊志^[10]报道的 319.9 nm 基本一致。

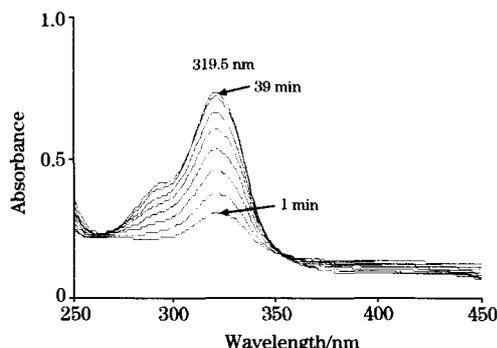


Fig. 1 Absorption spectrum of reaction system at different wavelength and time

2.2 邻苯三酚反应体系反应时间和自氧化速率的确定

用 2.1 配制方法配制邻苯三酚反应体系, 在 319.5 nm 处, 每反应 1~3 min(前期间隔 1 min, 后期间隔 3 min)测一次吸光值, 反应 40 min, 以吸光值 A 对反应时间 t 作线性关系图。从图 2(a)可以看出: 反应体系前期的吸光值随反应时间延长而稳定增加, 后期的吸光值趋于稳定, 在整个 40 min 反应时间内, 吸光值和反应时间线性关系较差; 从图 2(b)可以看出: 在前 9 min 的反应间内, 反应体系吸光值和反应时间线性关系良好, 相关系数达 0.994 2, 说明反应体系在前 9 min 的反应时间内, 稳定积累有颜色中间产物, 邻苯三酚自氧化速率稳定, 所以确定反应时间为 9 min, 取反应前 9 min

的吸光值 A 对反应时间 t 作线性关系图, 以斜率为邻苯三酚自氧化速率 V_0 (0.035)。

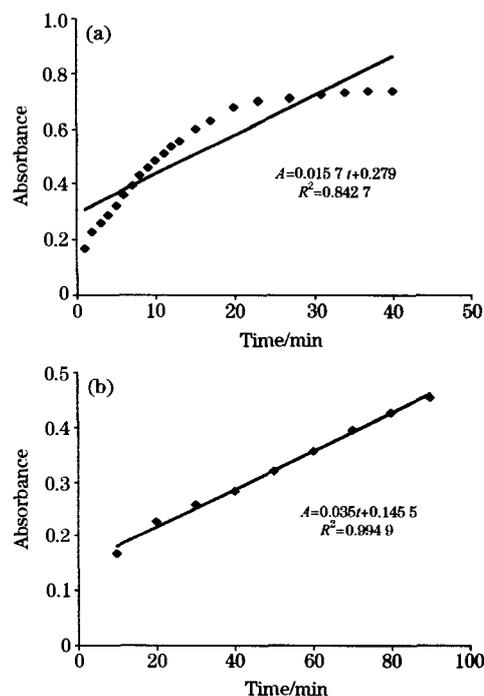


Fig. 2 Linearity correlation between reaction time and absorbance of reaction system

(a): 40 min; (b): 9 min

2.3 抗氧化剂清除超氧阴离子能力的评价方法

量取 pH 值为 8.2 的 Tris-HCl 缓冲液 5 mL 与一定体积的抗氧化剂溶液, 用双蒸水补充至 9.7 mL, 置于 10 mL 比色管中混均, 在 25°C 水浴中保温 20 min, 取出后立即加入在 25°C 预热过的 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 邻苯三酚 0.3 mL, 迅速摇匀后倒入比色皿中, 用 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 为空白液, 在 319.5 nm 波长处, 每间隔 1 min 测吸光值一次, 共反应 9 min, 以吸光值 A 对反应时间 t 作线性关系图, 斜率即为 V_t , 代入式 (1), 计算出抗氧化剂对超氧阴离子的清除率 (Y)。

根据加入抗氧化剂的体积和浓度, 按定容至 10 mL, 计

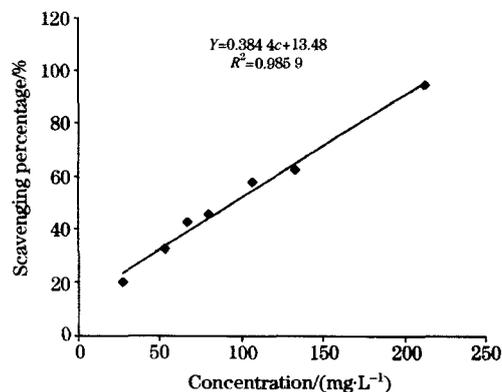


Fig. 3 Linearity correlation between scavenging rate and TBHQ concentration

算出抗氧化剂的反应浓度 c , 由式(1)计算出 c 对应的 Y 。由于反应体系加入抗氧化剂的体积不同, 得到不同的 c 和 Y , 以 Y 对 c 作线性关系图, 在 Y 为 50% 时的 c 值即为 IC_{50} 值, IC_{50} 值越小说明抗氧化剂清除超氧阴离子能力越强。

$$Y(\%) = \left(1 - \frac{V_t}{V_0}\right) \times 100 \quad (1)$$

2.4 合成抗氧化剂 TBHQ 清除超氧阴离子能力的测定

在邻苯三酚反应体系中分别加入 $2.669 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ TBHQ 溶液, 0.1, 0.2, 0.25, 0.3, 0.4, 0.5, 0.8 mL, 按 2.3 方法计算, 以清除率 Y 对 TBHQ 反应浓度 c 作线性关系图。由图 3 可知, TBHQ 对超氧阴离子的清除率与浓度呈很好的线性相关, 其 IC_{50} 值为 $95.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.5 邻苯三酚浓度对清除率的影响

在 5 个邻苯三酚反应体系中分别加入 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 邻苯三酚溶液 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mL, 再分别加入 $2.669 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ TBHQ 0.35 mL, 按 2.3 节方法, 计算出相应的 V_0 和 V_t 以及清除率 Y 。从表 1 可知, 反应体系 1 和 2 的 V_0 和 V_t 都很低, 且基本相等, 清除率均为 0.00, 说明反应体系产生有色氧化中间产物少, 且加入 TBHQ 后没有什么变化, 说明加入邻苯三酚的量少; 反应体系 4 和 5 的 V_0 和 V_t 都相

对较高, 且基本相等, 清除率分别为 0.44、1.00, 说明反应体系产生有色氧化中间产物多, 且加入 TBHQ 后没有什么变化, 说明加入邻苯三酚是过量了, 也可以说是加入 TBHQ 量太少; 反应体系 3 的清除率为 34.25, 反应良好, 加入 0.3 mL 邻苯三酚为宜。

2.6 Tris-HCl 缓冲液 pH 值对清除率的影响

在 5 个邻苯三酚反应体系中分别加入 pH 值为 7.4, 7.8, 8.2, 8.6, 9.0 的 Tris-HCl 缓冲溶液 5 mL, 再分别加入 $2.669 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ TBHQ 0.35 mL, 按 2.3 节方法, 计算出相应的 V_0 , V_t 和清除率。从表 2 可知, 反应体系 1 和 2 的 V_0 和 V_t 都很低, 且基本相等, 清除率分别为 0.00 和 2.96, 说明反应体系产生有色氧化中间产物少, 且加入 TBHQ 后没有什么变化, 说明 pH 值为 7.4 和 7.8 的缓冲液不利产生有色中间产物; 反应体系 4 和 5 的 V_0 和 V_t 出现负值现象, 清除率分别是 112.90 和 16.48, 说明反应体系氧化速率过快, 吸光值很快达到最大值, 然后降低, 以致 V_0 和 V_t 出现负值, 无法进行测定; 反应体系 3 的清除率为 44.44, 反应体系反应良好。所以, 实验取邻苯三酚反应体系中加入 pH 值为 8.2 的 Tris-HCl 缓冲液。

Table 1 Relation between scavenging rate and pyrogalllic acid volume of reaction system

Different reaction system	Volume of pyrogalllic acid $\cdot \text{mL}^{-1}$	V_0	V_t	Scavenging rate/%
1	0.1	0.005 4	0.005 4	0.00
2	0.2	0.010 1	0.010 1	0.00
3	0.3	0.014 6	0.009 6	34.25
4	0.4	0.022 7	0.022 6	0.44
5	0.5	0.029 9	0.029 6	1.00

Table 2 Relation between scavenging rate and pH value of Tris-HCl of reaction system

Different reaction system	pH value of Tris-HCl	V_0	V_t	Scavenging rate/%
1	7.4	0.004	0.005	0.00
2	7.8	0.013 5	0.013 1	2.96
3	8.2	0.018 9	0.010 5	44.44
4	8.6	0.003 1	-0.000 4	112.90
5	9.0	-0.009 1	-0.007 6	16.48

2.7 竹叶提取物抗氧化能力的评价

按 2.3 节方法, 对竹叶提取物样品进行评价, 其清除率 Y 对反应浓度 c 作图, 得线性方程分别为: M20: $Y = 0.160 4c - 14.571$, $R^2 = 0.968 3$; M40: $Y = 0.246 6c - 23.657$, $R^2 = 0.913 6$; M60: $Y = 0.208 2c - 23.429$, $R^2 = 0.928 8$; M80: $Y = 0.189 3c - 10.686$, $R^2 = 0.996 6$; MA: $Y = 0.112 1c - 1.529 6$, $R^2 = 0.928 8$ 。计算出各样品的 IC_{50} 值分别为 M20($402.56 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), M40($298.69 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), M60($352.68 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), M80($320.58 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), MA($459.68 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。根据 IC_{50} 值, 各样品清除超氧阴离子能力由强到弱依次为 M40, M80, M60, M20, MA。

3 结 论

(1) 采用分光光度法测定抗氧化剂清除超氧阴离子自由基能力的检测波长为 319.5 nm; 邻苯三酚反应体系参数为: 反应体系体积为 10 mL, 反应时间为 9 min, 加入 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 邻苯三酚 0.3 mL, Tris-HCl 缓冲液 pH 值为 8.2, 邻苯三酚自氧化速率 V_0 为 0.035; IC_{50} 值可以作为抗氧化性强弱的评价指标。

(2) M40 等竹叶提取物可以作为天然抗氧化剂进行开发。

参 考 文 献

- [1] Osawa T, Namiki M A. *Agric. Biological 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 Radical 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] GUO Xue-feng, YUE Yong-de, TANG Feng, et al(郭雪峰, 岳永德, 汤锋, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 待发表.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] JIANG Liu-yun, LIU Yu-ming(蒋柳云, 刘玉明). *Chinese Journal of Organic Chemistry(有机化学)*, 2005, 25(6): 684.
- [10] FAN Zhi, ZHAO Ru, ZHOU Wei-hong, et al(樊志, 赵茹, 周卫红, 等). *Journal of Tianjin Normal University(Natural Science Edition)(天津师范大学学报·自然科学版)*, 1999, 19(3): 16.
- [11] LI Ping, WANG Yan-hui, MA Run-yu(李平, 王艳辉, 马润宇). *Journal of Beijing University of Chemical Technology(北京化工大学学报)*, 2003, 30(3): 35.
- [12] LIN Gui-lan, XU Xue-shu, LIAN Wen-si(林桂兰, 许学书, 连文思). *Journal of East China University of Science and Technology(Natural Science Edition)(华东理工大学学报·自然科学版)*, 2006, 32(3): 278.
- [13] 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.
- [14] LU Bo-yi, ZHANG Ying, WU Xiao-qin(陆柏益, 张英, 吴晓琴). *Chemistry and Industry of Forest Products(林产化学与工业)*, 2005, 25(3): 120.
- [15] ZHANG Xi-qin(张希琴). *Journal of Qingdao University(Engineering & Technology Edition)(青岛大学学报·工程技术版)*, 2001, 16(2): 6.

Detection of Antioxidative Capacity of Bamboo Leaf Extract by Scavenging Superoxide Anion Free Radical

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 absorption spectrum, oxidation velocity of pyrogallol acid reaction system, the effect of pyrogallol acid concentration and buffer pH value on the scavenging rate for superoxide anion free radical coming from reaction system was investigated, and some results were obtained as follows, the wavelength used for the pyrogallol acid reaction system was determined by spectrophotometric method; 319.5 nm. Some parameters of the reaction system were determined as follows: reaction volume: 10 mL, reaction time: 9 min, volume of pyrogallol acid($3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): 0.3 mL, pH value of buffer: 8.2 and oxidation velocity: 0.035. The relation between scavenging rate for superoxide anion free radical and concentration of TBHQ and bamboo leaf extract samples was studied by our method, and IC_{50} (the value of antioxidant concentration at scavenging half of superoxide anion free radical) was used as the index to evaluate scavenging capacity. IC_{50} value of TBHQ and most effective samples were as follows: TBHQ($95.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) and M40($298.69 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). M40 and other bamboo leaf extract could be used as natural antioxidant.

Keywords Bamboo Leaf Extract; Superoxide anion free radical; Scavenging rate; IC_{50} value

* Corresponding author

(Received Jan. 6, 2008; accepted Mar. 26, 2008)