

用清除羟自由基法评价竹叶提取物抗氧化能力

郭雪峰¹, 岳永德^{1*}, 孟志芬², 汤 锋¹, 王 进¹, 姚 曦¹, 荀 航¹, 孙 赅¹

1. 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
2. 河南科技学院化学化工学院, 河南 新乡 453003

摘 要 进行了 Fe^{2+} 与邻二氮菲生成红色配合物的吸收光谱, 抗氧化剂 TBHQ 及竹叶提取物样品对清除羟自由基能力的研究。分光光度法测定抗氧化剂清除羟自由基能力的测定波长为 509.1 nm。以 IC_{50} 值(清除率为 50% 时, 抗氧化剂的浓度值)作为评价抗氧化剂清除羟自由基能力的指标, 测得合成抗氧化剂和效果最好竹叶提取物样品 IC_{50} 值分别为 0.040(TBHQ), 0.378(M20), 0.323(M40), 0.334(M60), M20, M40, M60 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; 羟自由基; 清除率; IC_{50} 值

中图分类号: TS201.2 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2010)02-0508-04

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。目前, 国内外用于评价植物抗氧化能力的方法已有很多, 如硫氰酸盐法^[1]、硫代巴比妥酸法^[2]、抗氧化能力指数法^[3]、化学发光法、清除有机自由基 DPPH 法、清除超氧阴离子自由基法^[4-5]、还有很多清除自由基的检测评价方法^[6], 这些方法都有各自的不足之处。羟自由基是一种氧化能力很强的自由基, 可使糖类、氨基酸、蛋白质、核酸和脂类发生氧化, 与许多疾病的产生有关。检测羟自由基方法有电子自旋共振法^[7]、化学发光法^[8]、分光光度法^[9]、高效液相色谱法^[10]、荧光法^[11]等, 这些方法要求的仪器试剂昂贵, 操作复杂, 使其应用受到限制。 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ 体系可通过 Fenton 反应产生羟自由基, 邻二氮菲- Fe^{2+} 水溶液被羟自由基氧化为邻二氮菲- Fe^{3+} 后, 使最大吸收波长处的吸光度强烈减小甚至消失, 最大吸收波长吸光值的变化反映了羟自由基氧化作用的大小。此法简便易行, 适于广泛使用, 但其准确性、灵敏度和可行性还需进一步的研究。

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; 邻二氮菲(1,10-Phenanthroline), $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 广东汕头市西陇化工厂; 叔丁基对苯二酚(TBHQ), 北京科华特种试剂联合开发中心; 乙醇、AB-8 大孔树脂、硫酸亚铁铵($(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$)、Tris、盐酸、双氧水等试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 竹叶材料及前处理方法

毛竹叶于 2005 年 11 月采自浙江安吉。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%, 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,

收稿日期: 2009-02-26, 修订日期: 2009-05-28

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(1632008003)资助

作者简介: 郭雪峰, 1972 年生, 国际竹藤网络中心副研究员 e-mail: gxf71622@icbr.ac.cn

* 通讯联系人 e-mail: yueyd@icbr.ac.cn

得到溶液质量浓度值分别为 TBHQ: $2.669 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, BHT $3.186 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 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 反应溶液的配制

邻二氮菲溶液: 准确称取 0.19822 g 邻二氮菲, 用少量乙醇溶解, 用超纯水定容至 100 mL 容量瓶, 配成 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的邻二氮菲溶液。硫酸亚铁铵溶液: 准确称取 0.39214 g 硫酸亚铁铵, 用超纯水定容至 100 mL 容量瓶, 配成 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硫酸亚铁铵溶液。双氧水溶液: 准确量取体积分数为 30% 的双氧水 2 mL , 用超纯水定容至 1000 mL 容量瓶, 配成体积分数为 0.06% 的双氧水溶液。pH 7.4 的 Tris-HCl: 量取 125 mL $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Tris 125 mL , 再量取 120 mL $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HCl, 调 pH 7.4, 用超纯水定容至 250 mL 容量瓶, 配成 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Tris-HCl。

1.4 清除羟自由基能力的测定步骤

(1) 取编号为 1~5 的 5 支 10 mL 比色管, 分别在 5 支试管中加入 pH 7.4 的 Tris-HCl 缓冲液各 2 mL 。

(2) 向 2, 4, 5 号试管中分别各加入 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 邻二氮菲溶液 1 mL , $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸亚铁铵溶液 1 mL 。

(3) 向 2, 3 号试管中分别加入一定体积的抗氧化剂溶液。

(4) 向 2, 5 号试管中分别加入 0.06% (体积分数) H_2O_2 溶液 0.50 mL 。

(5) 所有比色管均用超纯水定容至 10 mL , 置于 37°C 水浴中反应 1 h 。

(6) 以 1 号试管溶液为参比, 在 $200\sim 700 \text{ nm}$, 对 3 号管溶液进行扫描, 得最大吸收波长, 并在此波长下测定吸光度。

(7) 以 1 号试管溶液为参比, 在最大吸收波长处, 分别测 2、3、4、5 号溶液吸光度, 得 $A_{\text{样}}$ 、 $A_{\text{提}}$ 、 $A_{\text{未提}}$ 、 $A_{\text{损}}$, 按(1)式计算样品对羟自由基的清除率。

$$Y(\%) = \frac{(A_{\text{样}} - A_{\text{提}}) - A_{\text{损}}}{A_{\text{未提}} - A_{\text{损}}} \times 100 = \frac{(A'_{\text{样}} - A_{\text{损}})}{A_{\text{未提}} - A_{\text{损}}} \times 100 \quad (1)$$

式(1)中: $A_{\text{样}}$ 为加入提取液的羟自由基体系(即 Fe^{2+} -邻二氮菲 + H_2O_2 + 竹叶提取物)的吸光度, $A_{\text{提}}$ 为竹叶提取物溶液的吸光度, $A_{\text{损}}$ 为加入 H_2O_2 的羟自由基体系(即 Fe^{2+} -邻二氮菲 + H_2O_2)的吸光度, $A_{\text{未提}}$ 为不加入 H_2O_2 的羟自由基体系(即 Fe^{2+} -邻二氮菲溶液)的吸光度, $A'_{\text{样}} = A_{\text{样}} - A_{\text{提}}$ 。

2 结果与分析

2.1 Fe^{2+} 与邻二氮菲配合物的吸收光谱与测定波长的确定

在 Fenton 反应体系中, Fe^{2+} 与邻二氮菲生成红色配合物, 在 $200\sim 700 \text{ nm}$ 的范围内扫描, 测得此红色配合物溶液最大吸收波长为 509.1 nm (图 1), 故确定测定波长为 509.1 nm , 这与郭亚力^[12]报道的 510 nm 基本一致。如果在此溶液中加入 H_2O_2 将发生 Fenton 反应: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} = \cdot\text{OH} +$

$\text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$, 产生的羟自由基氧化 Fe^{2+} -邻二氮菲为 Fe^{3+} -邻二氮菲, 使最大吸收波长处的吸光度强烈减小甚至消失。由于在此反应体系中加入竹叶提取物后, 竹叶提取物中的活性成分优先与羟自由基作用, 减弱了羟自由基对 Fe^{2+} -邻二氮菲的氧化作用, 从而减弱最大吸收波长处的吸光度的变化, 通过吸光度, 可反应竹叶提取物清除羟自由基能力的大小。

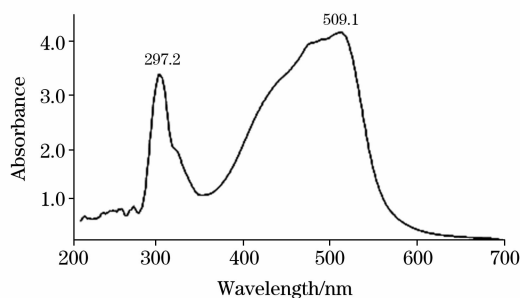


Fig. 1 Absorbance spectra of red compound

2.2 抗氧化剂 TBHQ 清除羟自由基能力的测定

把人工合成的抗氧化剂叔丁基对苯二酚(TBHQ)逐级稀释成 $0.120, 0.080, 0.040, 0.020 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。按上述方法进行测定, 计算抗氧化剂对羟自由基的清除率, 以清除率 Y 对抗氧化剂浓度 c 作图。从图 2 可以看出, TBHQ 浓度在 $0.020\sim 0.120 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内, 抗氧化剂对羟自由基的清除率在 $41\%\sim 67\%$ 范围内, 清除率与浓度呈良好的线性关系。根据图 2, 计算出清除率为 50% 时的浓度值, 即为 IC_{50} 值, 用 IC_{50} 值作为评价抗氧化剂的自由基清除能力的指标, IC_{50} 值越低, 抗氧化剂的自由基清除能力越强。采用此法测定的 TBHQ 的 IC_{50} 值为 0.040 , 可知 TBHQ 清除羟自由基能力很强。

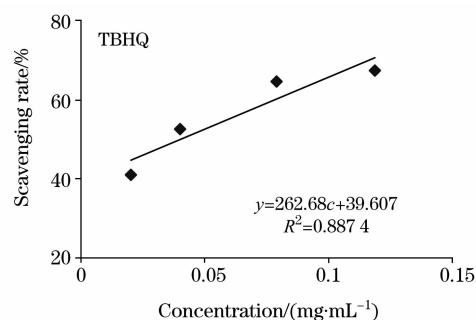


Fig. 2 Linearity correlation between scavenging rate of hydroxyl free radical and TBHQ concentration

2.3 竹叶提取物清除羟自由基能力的测定

按上述方法测定和计算, 得各竹叶提取物样品清除率 Y 与浓度 c 之间关系(图 3), 计算出 IC_{50} 值分别为 0.378 (M20), 0.323 (M40), 0.334 (M60), 0.543 (M80), 3.178 (MA), 根据 IC_{50} 值, 各样品清除羟自由基能力由强到弱依次为 $\text{M40} > \text{M60} > \text{M20} > \text{M80} > \text{MA}$, 其中以 M40, M60, M20 清除羟自由基能力较强。

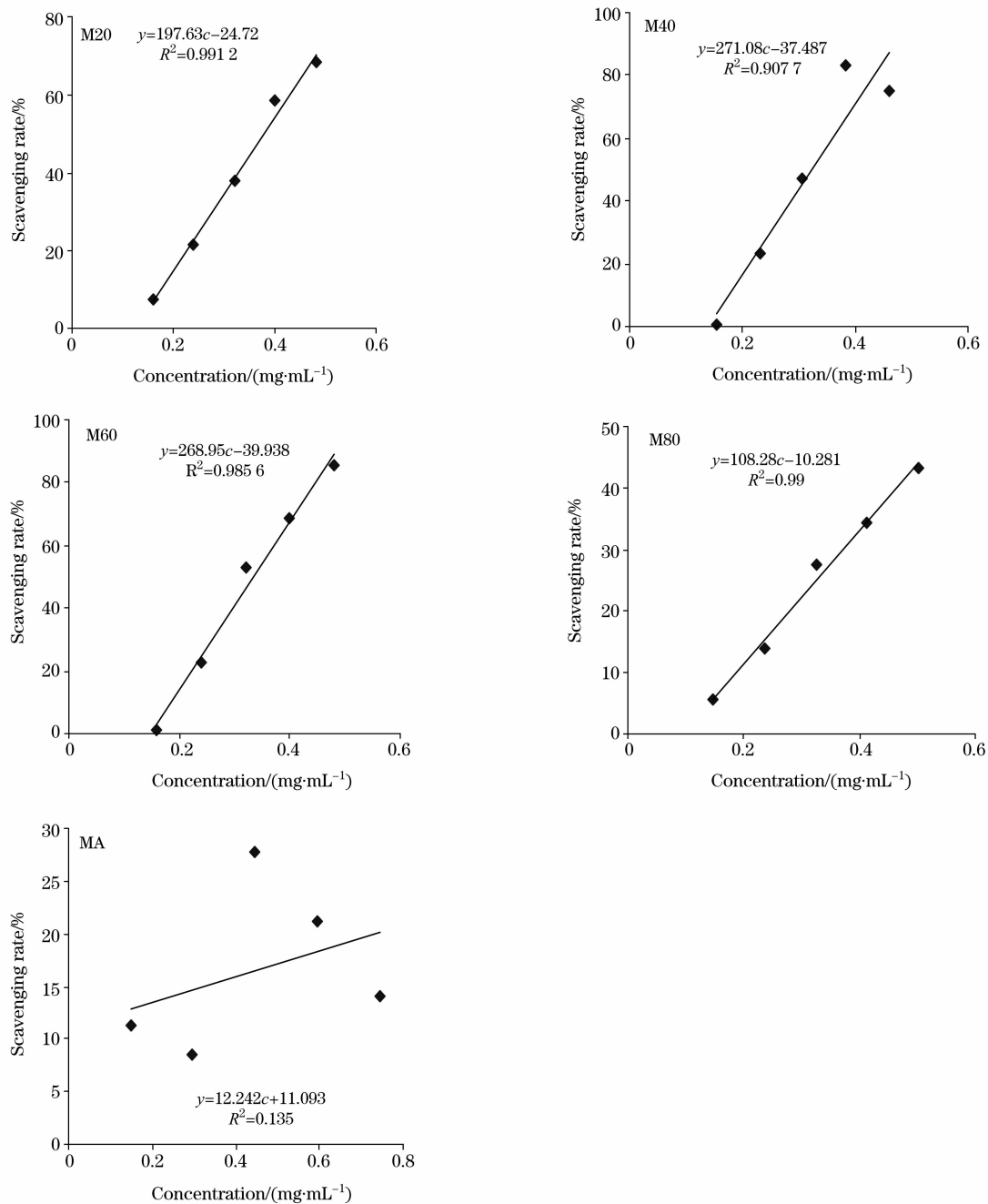


Fig. 3 Linearity correlation between scavenging rate of hydroxyl free radical and concentration of bamboo leaf extract

3 结 论

研究了 Fe^{2+} 与邻二氮菲生成红色配合物的吸收光谱, 抗氧化剂 TBHQ 及竹叶提取物样品对清除羟自由基的能力。采用分光光度法测定抗氧化剂清除羟自由基能力的测定波长

为 509.1 nm。以 IC_{50} 值作为评价抗氧化剂清除羟自由基能力的指标, 测定了竹叶提取物抗氧化能力, 得出 M20, M40, M60 抗氧化能力较强, 接近人工合成的抗氧化剂抗氧化剂叔丁基对苯二酚 (TBHQ) 抗氧化能力, 且成本较低, 属纯天然, 所以, M20, M40, M60 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. 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] 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)*, 2008, 28(8): 1823.
- [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] Stokes N J, Tabner B J, Hewitt C N. *Chemosphere*, 1994, 28(5): 999.
- [8] CHEN Ji-wu, HU Tian-xi(陈季武, 胡天喜). *Progress in Biochemistry and Biophysics(生物化学与生物物理进展)*, 1992, 19(2): 136.
- [9] JIA Zhi-shen, WU Jian-min, TANG Meng-cheng(贾之慎, 邬建敏, 唐孟成). *Progress in Biochemistry and Biophysics(生物化学与生物物理进展)*, 1996, 23(2): 184.
- [10] Kaur H, Hallinell B. *Anal. Biochem.*, 1994, 220(1): 11.
- [11] XU Xiang-rong, WANG Wen-hua(徐向荣, 王文华). *Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学)*, 1998, 26(12): 1460.
- [12] GUO Ya-li, LI Cong, OU Ling-cheng, et al(郭亚力, 李 聪, 欧灵澄, 等). *Physical Testing and Chemical Analysis Part B(Chemical Analysis)(理化检验·化学分册)*, 2006, 42(8): 630.

Detection of Antioxidative Capacity of Bamboo Leaf Extract by Scavenging Hydroxyl Free Radical

GUO Xue-feng¹, YUE Yong-de^{1*}, MENG Zhi-fen², TANG Feng¹, WANG Jin¹, YAO Xi¹, XUN Hang¹, SUN Jia¹

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

2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China

Abstract By studying on absorption spectrum of red compound coming from the reaction system of Fe^{2+} and 1,10-phenanthroline and the capacity of antioxidant TBHQ and bamboo leaf extract for scavenging hydroxyl free radical, some results were drawn as follows: the determining wavelength of bamboo leaf extract for scavenging hydroxyl free radical by spectrophotometric method is 509.1 nm, and IC_{50} (the value of antioxidant concentration at scavenging half of hydroxyl free radical) was used as the index to evaluate scavenging capacity. The determined IC_{50} values were TBHQ(0.040), M20(0.378), M40(0.323), M60(0.334), and bamboo leaf extract could be used as natural antioxidant.

Keywords Bamboo leaf extract; Hydroxyl free radical; Scavenging rate; IC_{50} value

(Received Feb. 26, 2009; accepted May 28, 2009)

* Corresponding author