

## 采用 DPPH 法测定 26 种植物的抗氧化活性

勾明玥, 刘梁, 张春枝

(大连工业大学 生物与食品工程学院, 辽宁 大连, 116034)

**摘 要** 抗氧化剂在预防疾病和延缓衰老等方面的作用, 已广泛引起人们的关注, 寻找更好更高效的抗氧化剂更为重要。文中采用 DPPH 法研究了 26 种植物的抗氧化活性, 测定了它们的提取液对 DPPH 自由基的清除能力。实验结果表明: 植物的抗氧化活性成分存在于醇溶液中而非水溶液中; 在所选 26 种植物中, 地榆、鸡血藤、赤芍、虎杖 4 种植物的抗氧化活性较高, 其中地榆的抗氧化活性最高, 其  $IC_{50}$  为  $8.89 \mu\text{g/mL}$ 。

**关键词** DPPH, 植物, 抗氧化活性

随着分子生物学和医学的深入发展, 人们逐渐认识到, 自由基在一定外界环境下对机体的各个方面产生影响, 而适当补充外源性抗氧化剂或给予能促使机体内源性抗氧化物质恢复到一定水平的药物, 可以改善这一状况<sup>[1]</sup>。抗氧化剂是指在低浓度下能有效延缓或阻止底物氧化的物质<sup>[2]</sup>。被氧化的底物包括蛋白质、脂质、糖和 DNA<sup>[3]</sup>。天然抗氧化剂因其具有无毒副作用、无残留、无污染、稳定、安全等优点而越来越受到人们的关注。天然抗氧化物质的研究在医药学、保健与功能食品、美容养颜护肤等领域均有非常重要的意义<sup>[4]</sup>。有报道表明某些天然植物具有明显的抗氧化活性, 因此, 寻找高效、天然抗氧化植物资源非常必要。高活性植物的筛选是近年来开始兴起的新技术, 在寻找活性成分等方面起着重要的作用。

DPPH(1,1-二苯基-2-苦肟基自由基)在有机溶剂中是一种稳定的自由基, 其醇溶液呈深紫色, 具有单一电子, 故能够接受一个电子或是氢离子, 在波长为 514 nm 下具有最大光吸收。有自由基清除剂存在时, DPPH 的单电子被捕捉而使其颜色变浅, 在最大光吸收波长处的吸光值下降, 且下降程度呈线性关系, 从而以评价试验样品的抗氧化能力<sup>[5]</sup>。此抗氧化能力用抑制率来表示, 抑制率越大, 抗氧化性越强。DPPH 法是用以评价天然抗氧化剂抗氧化活性的一种快速、简便、灵敏可行的方法<sup>[6]</sup>。

本研究室曾经从 100 种植物中筛选出有明显抗氧化活性的 37 种, 本文从这 37 种植物中进一步选取药食两用或无毒性的 26 种作为研究对象, 进行抗氧

化活性的研究, 这对天然抗氧化剂开发和利用有重要意义。本文首先比较水提物和醇提物的抗氧化活性, 筛选出有较高抗氧化活性的植物, 并进一步复筛, 测定其  $IC_{50}$ , 最终筛选出抗氧化活性最高的一种。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料

原料: 选择 26 种植物(见表 1)作为研究对象进行抗氧化筛选。这些原料购置于大连同仁堂大药房。

试剂: DPPH(美国 Sigma 公司, 分析纯), 体积分数为 95% 的乙醇(大连酒精厂), 甲醇(天津市科密欧化学试剂有限公司, 分析纯)。

仪器: 752 型紫外可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司), SL-202 型电子天平(上海长桥精密科学仪器有限公司), 恒温水浴锅(巩义市英峪予华仪器厂), 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), 电热恒温干燥器(上海精密科学仪器有限公司)。

## 1.2 方法

## 1.2.1 提取物的制备

水提物的制备: 称取植物 0.05 g, 粉碎后加 25 mL 去离子水, 沸水浴煎煮 1 h, 倾出上清液后重复提取一次, 合并 2 次煎煮的上清液, 将其浓缩至 10 mL, 得水提物药液浓度为 5 mg/mL。

醇提物的制备: 称取植物 0.05 g, 粉碎后加 10 mL 体积分数 95% 乙醇, 50℃ 超声振荡提取 30 min, 得上清液, 并定容至 10 mL, 得醇提物浓度为 5 mg/mL。

第一作者: 硕士研究生(张春枝教授为通讯作者)。

收稿日期: 2009-10-30, 改回日期: 2009-12-18

### 1.2.2 DPPH 法测定抗氧化活性

DPPH 溶液的配制:准确称取 1.972 mg DPPH, 用甲醇溶解并定容于 10 mL 容量瓶中, DPPH 浓度为 0.5 mmol/mL, 避光保存(0-4℃)。

### 1.2.3 提取物清除 DPPH 活性的测定

(1)取植物提取液 1 mL 及浓度为 0.5 mmol/mL 的 DPPH 溶液 0.25 mL 先后加入同一具塞试管中, 摇匀, 在黑暗中 37℃ 放置 20 min, 以甲醇为空白在 514 nm 测定其吸光度  $A_i$ 。

(2)取 0.25 mL 0.5 mmol/mL 的 DPPH 溶液与 1 mL 甲醇混合, 摇匀, 在黑暗中 37℃ 放置 20 min, 以甲醇为空白在 514 nm 测定其吸光度  $A_0$ 。

(3)取 1 mL 植物提取液与 0.25 mL 甲醇混合, 摇匀, 在黑暗中 37℃ 放置 20 min, 以甲醇为空白在 514 nm 测定其吸光度  $A_j$ 。

根据下列公式计算植物提取液对 DPPH 的抑制率, 即

$$\text{抑制率}/\% = \{ [1 - (A_i - A_j)] / A_0 \} \times 100$$

式中:  $A_i$  为加抗氧化剂后 DPPH 溶液的吸光度;  $A_0$  为未加抗氧化剂时 DPPH 溶液的吸光度;  $A_j$  为植物浸提液在测定波长的吸光度。

公式中引入  $A_j$  是为了消除浸提液本身颜色对测定的干扰<sup>[7]</sup>。抑制率越大, 抗氧化活性越高。IC<sub>50</sub> 是指 DPPH 的抑制率为 50% 时的提取物溶液浓度<sup>[8]</sup>。IC<sub>50</sub> 越小, 抗氧化能力越强。将试验重复 3 次, 求得抑制率的平均值。

## 2 结果与讨论

### 2.1 植物抗氧化活性的初筛

对地榆、五味子、百合、甘草、钩藤、赤芍、菟丝子、鸡血藤、白芍、巴戟天、丹参、川芎、桑葚、虎杖、草豆蔻、麦冬、石斛、知母、玉竹、锁阳、山茱萸、女贞子、何首乌、仙茅、黄精、决明子 26 种植物进行初筛, 测定其抗氧化活性, 并将水提物和醇提物抗氧化活性进行比较, 结果见表 1。

从表 1 可以看出, 当提取物浓度为 5 mg/mL 时地榆、甘草、赤芍、鸡血藤、白芍、虎杖、草豆蔻、锁阳、山茱萸、女贞子、何首乌、仙茅 12 种植物醇提物对 DPPH 的抑制率达 90% 以上, 具有较高的抗氧化活性, 而水提物的活性相对没有醇提物的抗氧化活性高。可知抗氧化活性成分存在于醇溶液中而非水溶液中。因此确定提取方式为醇提取, 并且确定这 12 种植物作为复筛对象。

表 1 26 种植物的抗氧化活性

| 植物名称 | 水提物平均抑制率/% | 醇提物平均抑制率/% | 植物名称 | 水提物平均抑制率/% | 醇提物平均抑制率/% |
|------|------------|------------|------|------------|------------|
| 地榆   | 51.96      | 94.28      | 草豆蔻  | 43.17      | 95.36      |
| 五味子  | 50.85      | 82.28      | 麦冬   | 37.53      | 16.91      |
| 百合   | 44.21      | 6.73       | 石斛   | 62.41      | 1.19       |
| 甘草   | 51.70      | 93.61      | 知母   | 41.84      | 89.12      |
| 钩藤   | 50.00      | 78.19      | 玉竹   | 36.74      | 5.97       |
| 菟丝子  | 41.18      | 71.54      | 锁阳   | 42.89      | 94.00      |
| 鸡血藤  | 47.26      | 94.38      | 山茱萸  | 48.98      | 95.24      |
| 白芍   | 44.72      | 95.23      | 女贞子  | 54.24      | 95.31      |
| 巴戟天  | 40.05      | 19.30      | 何首乌  | 59.43      | 96.31      |
| 丹参   | 42.71      | 44.69      | 仙茅   | 51.78      | 94.13      |
| 川芎   | 46.95      | 76.90      | 黄精   | 35.25      | 53.14      |
| 桑葚   | 60.81      | 86.80      | 赤芍   | 56.14      | 95.69      |
| 虎杖   | 65.72      | 95.03      | 决明子  | 53.28      | 84.02      |

### 2.2 植物抗氧化活性的复筛

对地榆、甘草、赤芍、鸡血藤、白芍、虎杖、草豆蔻、锁阳、山茱萸、女贞子、何首乌、仙茅 12 种植物醇提液进行浓度稀释至 1 mg/mL, 分别测定其对抗氧化活性。结果见表 2。

表 2 12 种植物的抗氧化活性

| 植物  | 醇提物平均抑制率/% | 植物  | 醇提物平均抑制率/% |
|-----|------------|-----|------------|
| 赤芍  | 95.56      | 甘草  | 82.12      |
| 地榆  | 94.42      | 何首乌 | 32.74      |
| 鸡血藤 | 93.02      | 仙茅  | 73.98      |
| 虎杖  | 91.05      | 山茱萸 | 71.83      |
| 锁阳  | 75.51      | 女贞子 | 34.39      |
| 白芍  | 33.25      | 草豆蔻 | 11.68      |

从表 2 可以看出, 当提取物浓度为 1 mg/mL 时地榆、鸡血藤、虎杖、赤芍 4 种植物的醇提物对 DPPH 的抑制率达 90% 以上, 具有较高的抗氧化活性, 而其他植物的抗氧化活性相对较低。因此确定这 4 种植物作为研究对象, 并计算 IC<sub>50</sub>。

### 2.3 4 种植物抗氧化活性 IC<sub>50</sub> 的测定

对地榆、鸡血藤、虎杖、赤芍 4 种植物的醇提液进行浓度梯度稀释。分别测定其抗氧化活性, 并计算 IC<sub>50</sub>, 其值见表 3。

表 3 半抑制浓度测定结果

| 植物  | IC <sub>50</sub> /(μg · mL <sup>-1</sup> ) |
|-----|--|
| 地榆  | 8.89                                       |
| 赤芍  | 58.39                                      |
| 虎杖  | 90.27                                      |
| 鸡血藤 | 97.74                                      |

由于 IC<sub>50</sub> 越小, 抗氧化活性越高。由表 3 可知, 地榆、鸡血藤、虎杖、赤芍 4 种植物中, 地榆的 IC<sub>50</sub> 最

小,其值为  $8.89 \mu\text{g/mL}$ ,所以在所选植物中,地榆的抗氧化活性最高。

### 3 结论

植物醇提物的抗氧化活性相对较高。通过初筛和复筛发现,当提取物浓度为  $1\text{mg/mL}$  时,地榆、鸡血藤、虎杖、赤芍 4 种植物的抗氧化活性较高,而其他植物的抗氧化活性相对较低。在所选植物中,地榆的抗氧化活性最高,其  $\text{IC}_{50} = 8.89 \mu\text{g/mL}$ 。因此地榆是抗氧化物质的良好来源,有进一步研究和开发的价值。

#### 参 考 文 献

- [1] 张尊听,贺云,刘谦光,等. 分光光度法测定太白山 20 种中草药的抗氧化活性[J]. 分析试验室,2002,21(2): 50-53.
- [2] Halliwell B. Antioxidant characterization: methodology and mechanism[J]. Biochem. Pharmacol, 1995, 49: 1 341 - 1 348.
- [3] 王会,郭立,谢文磊. 抗氧化剂抗氧化活性的测定方法(一)[J]. 食品与发酵工业,2006,32(3):92-98.
- [4] 赵艳红,李建科,李国秀. 天然抗氧化物体外活性评价方法的优选与优化[J]. 食品科学,2008,29(6):64-69.
- [5] 柳爱莲,刘绣华. 天然产物抗 DPPH 自由基活性研究[J]. 周口师范学院学报,2007,24(5):80-82.
- [6] 彭长连,陈少薇. 用清除有机自由基 DPPH· 法评价植物抗氧化能力[J]. 生物化学与生物物理进展,2000,27(6):658-661.
- [7] 叶汉侠,王甫才. 18 种中草药抗氧化活性的比较研究[J]. 浙江万里学院学报,2004,17(5):111-113.
- [9] Lin Liyun, Liu Hsiuman, Yu Yawen, et al. Quality and antioxidant property of buckwheat enhanced wheat bread [J]. Food Chemistry,2009,112:987-991

## Determination of Antioxidant Activity in 26 Plants by DPPH Method

Gou Mingyue, Liu Liang, Zhang Chunzhi

(Dalian Polytechnic University, College of Bio & Food Technology, Dalian 116034, China)

**ABSTRACT** The effect of antioxidant in respect of preventing diseases and delaying aging has been paid attention. Searching better and higher effective antioxidant was even more important. In this article, antioxidant activity of 26 plants samples were studied by DPPH method, and DPPH free radical scavenging capability of extracts were determined. Experimental results showed that the antioxidant components were soluble in alcoholic solution but not in water; among these 26 plants, *Radix sanguisorbae*, *Caulis spatholobi*, *Radix paeoniae Rubra* and *Polygonum cuspidate* had higher antioxidant activities than other plants. *Radix sanguisorbae* was the highest with  $\text{IC}_{50}$  of  $8.89 \mu\text{g/mL}$ .

**Key words** DPPH, plant, antioxidant activity

#### 信 息 窗

### 日本开发用绿色微藻生产乙醇

日本先进工业科技研究院(AIST)下属生物质技术研究中心的研究人员正在研究用绿色微藻(如海藻)生产乙醇的潜力。

研究人员从泰国、越南和日本采集了 10 种绿色微藻物种,分成 3 大家族,测定了其单糖组成。其中从越南采集到的 *Cheatomorpha* 微藻品种是这些试样中含葡萄糖最高的试样,约为  $300\text{mg}$  葡萄糖/ $\text{g}$ (有机物)。

采用在日本采集到的 *Ulva* spp. 对酶糖化和乙醇发酵进行了试验,在压热器( $120^\circ\text{C}$ , 20 min)中进行预处理后,使用 Acremonium 纤维素素可得到葡萄糖产率约为 95%。

在酶糖化后采用 *S. cerevisiae* IR-2 可使乙醇发酵效率约为 90%。大于  $40\text{g/L}$  的 NaCl 浓度会抑制乙醇发酵,而 NaCl 浓度对糖化的影响很小。