

研究简报

用清除有机自由基 DPPH 法评价植物抗氧化能力*

彭长连 陈少薇 林植芳 林桂珠

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

摘要 几种抗氧化剂的浓度与其清除 1, 1-二苯基苦基苯肼 (DPPH) 能力呈显著的线性相关. 不同抗氧化剂清除 DPPH 能力差异明显. 抗坏血酸与 DPPH 反应的灵敏性高于其抑制肾上腺素氧化的能力. 用 DPPH 法和亚油酸氧化法同时测定了生长在不同光强下植物叶片抗氧化能力的变化, 两种方法所得结论相一致. 结果表明清除有机自由基法是一种快速、简便、灵敏的评估植物抗氧化能力的可行方法.

关键词 1, 1-二苯基苦基苯肼 (DPPH), 植物, 抗氧化能力, 自由基

学科分类号 Q946

生物的抗氧化能力与其抗病性、抗逆性及延缓衰老密切相关. 因而从天然植物中寻找有效的抗氧化剂应用于医药、食品、保健品、饮料、化妆品等之中, 或从氧化与抗氧化代谢的平衡来探讨生物对变化环境条件的适应性机理, 都是当前的研究热点之一.

迄今用于评价植物抗氧化能力的方法虽已有诸如硫氰酸盐 (thiocyanate) 法^[1]、硫代巴比妥酸 (TBA) 法^[2]、ORAC 法 (automated oxygen radical absorbance capacity assay)^[3]等. 但这些方法或者手续相当繁琐费时, 或者所需试剂或大型仪器的费用昂贵, 尚缺乏一种灵敏、简单易行的有效方法. 1, 1-二苯基苦基苯肼 (1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 是一种稳定的有机自由基, 通过检测生物试剂对 DPPH 自由基的清除能力可以表示其抗氧化性的强弱. 然而对自由基信号的直接检测需要使用顺磁共振仪而使其难以普及. 近年来, 国外已有人初步利用 DPPH 溶液的紫红色吸光度变化作为清除自由基能力的分光光度测定^[4,5], 但对其准确性、灵敏度和可行性尚未有系统的探讨. 本文旨在研究 DPPH 分光光度法用以评价植物抗氧化能力的可行性, 为抗氧化剂的筛选和抗氧化胁迫机理的研究提供新的方法和依据.

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

紫外可见分光光度计 (Beckman DU-7), 二苯基苦基苯肼 (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH), 肾上腺素, 硫代巴比妥酸 (TBA), 亚油酸, 外源

抗氧化剂抗坏血酸 (AsA)、槲皮素 (QCT)、还原型谷胱甘肽 (GSH)、丁基羟基甲苯 (BHT), 为 Sigma 公司产品, α -生育酚 (α -TP) 为 Merck 公司产品. 自由基捕获剂 1, 2-二羟基苯-3, 5-二磺酸钠 (Tiron), 甲醇, 乙醇为国产产品.

1.2 植物材料

试验植物为广东省鼎湖山常绿阔叶林中的乔木 黧蒴 (Castanopsis fissa) 和林下灌木 九节 (Psycotria rubra). 盆栽幼苗生长于本所试验地的自然光强 (100% 光) 和遮阴降低光强为自然光的 36% 和 16% 条件下. 0.2 g 叶片用 50% 乙醇浸提, 研磨和离心 ($5\,000 \times g$, 15 min), 定容至 10 ml.

1.3 有机自由基 (DPPH) 消除能力的测定

参考 Larrauri 和 Yokozawa 等^[4,5]的方法进行修改. 利用 DPPH 溶液的特征紫红色团的吸收峰, 以分光光度法测定加抗氧化剂或植物提取液后 A_{525} 吸收的下降表示其对有机自由基消除能力. 反应体积 2 ml, DPPH 溶于少量甲醇后, 以 50% 乙醇配制为 $120\ \mu\text{mol/L}$. 植物提取液稀释 10 倍, 反应时加 0.1 ml 稀释的提取液及 1.9 ml DPPH. 室温下静置 20 min 后测吸光度变化. 样品对 DPPH 的清除百分比 = $1 - [(A - B) / A_0] \times 100\%$, 这里 A_0 为未加样的 DPPH (1.9 ml DPPH + 0.1 ml 50% 乙醇) 的吸光度, A 为样品与 DPPH 反应后的吸光度, B 为样品的空白 (样品 0.1 ml + 1.9 ml

* 中国科学院广州分院及广东省科学院测试基金和中国科学院“九五”重点基金 (KZ952-J1-105) 联合资助.

Tel: (020) 87705626-405, E-mail: pengchl@scib.ac.cn

收稿日期: 1999-11-20, 修回日期: 2000-04-02

50% 乙醇) 的吸光度. 然后用公式: $[(\text{清除率} \times \text{反应加入的 DPPH 量}) / \text{样品质量} (\mu\text{g})]$ 求得单位质量的外源抗氧化剂或植物样品对 DPPH 的实际清除量.

1.4 抑制亚油酸氧化能力的测定

最终浓度为 0.38 mmol/L 的亚油酸加 0.33 mmol/L H_2O_2 加速氧化, 在有或无植物提取液下置于室温放置 5 h, 不时摇动, 随后用硫代巴比妥酸 (TBA) 法测定所产生的丙二醛 (MDA)^[6]. 用抑制 MDA 形成的百分数表示抗氧化能力.

1.5 抑制肾上腺素氧化

参照翁元凯等的方法^[7], 以碱性连二亚硫酸钠产生 O_2^- , 用不同浓度的 AsA 抑制 O_2^- 对肾上腺素的氧化, 480 nm (肾上腺素红的特征吸收峰) 检测吸收的下降.

2 结果与讨论

2.1 DPPH 的吸收光谱

有机自由基 DPPH 溶液有两个特征吸收峰 330 nm 和 525 nm, 加入抗氧化剂抗坏血酸 (AsA) 和槲皮素 (QCT) 后两个吸收峰皆降低 (图 1), 但 525 nm 吸收的降低较显著, 故选用可见光 525 nm 的吸收来表示 DPPH 含量的变化, 这与 Larrauri 等^[4]报道 DPPH 吸收峰在 517 nm 有点差异.

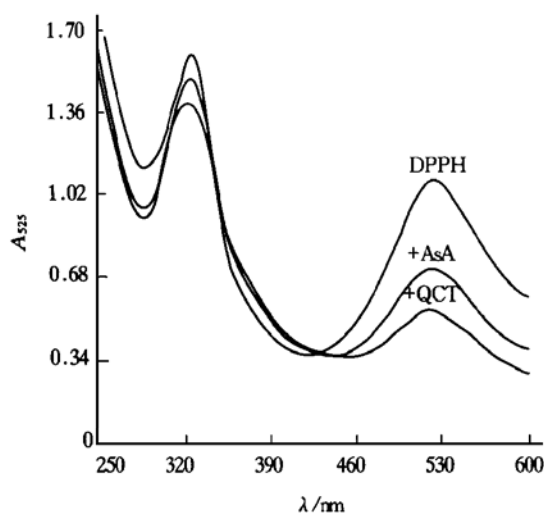


图 1 DPPH 的吸收光谱

2.2 抗氧化剂浓度与其清除 DPPH 的关系

没食子酸 (GIP)、槲皮素 (QCT)、还原型谷胱甘肽 (GSH) 和 α -生育酚 (α -TP) 是植物体内常见的抗氧化剂, BHT 是人工合成的常用食品抗

氧化剂, Tiron 则是人工合成的自由基捕获剂. 图 2 可见这几种抗氧化剂的浓度皆与 DPPH 的光吸收呈显著的线性负相关 (图 2), 相关系数 r 除 BHT 为 0.8977 (图 2 b) 外, 其余都在 0.9670~0.9935 之间. 抗氧化剂浓度越高, 清除 DPPH 的能力越大. 结果说明无论是植物的内源抗氧化剂还是人工合成的抗氧化剂, 其抗氧化性都可用 DPPH 法作定量评价.

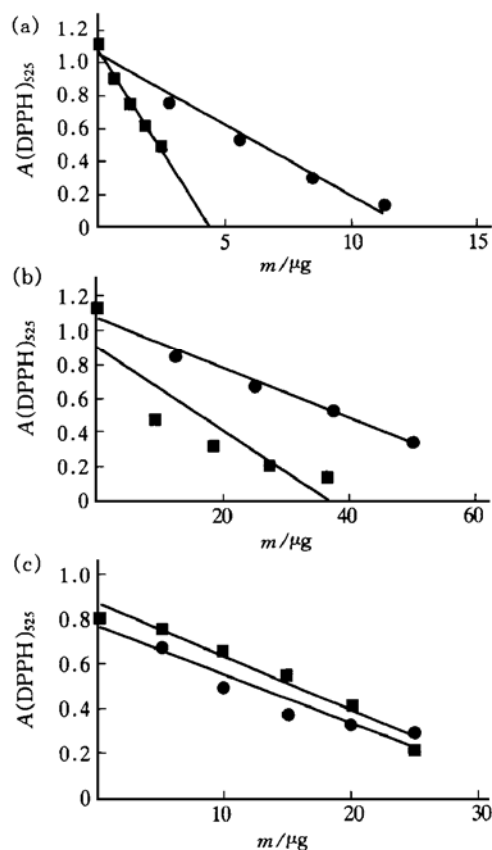


图 2 几种抗氧化剂与 DPPH 吸收峰 (A_{525}) 下降的关系

(a) ■—■: QCT, $y_1 = -0.0872x + 1.0543$, $r = 0.9904$; ●—●: GIA, $y_2 = -0.2485x + 1.0843$, $r = 0.9935$; (b) ■—■: BHT, $y_3 = -0.0245x + 0.9008$, $r = 0.8977$; ●—●: GSH, $y_4 = -0.0149x + 1.0715$, $r = 0.9918$; (c) ■—■: α -TP, $y_5 = -0.0233x + 0.8558$, $r = 0.9788$; ●—●: Tiron, $y_6 = -0.0212x + 0.7586$, $r = 0.9670$.

2.3 不同抗氧化剂清除 DPPH 能力的比较

表 1 看出计算降低 DPPH 吸收 50% 时抗氧化剂的浓度 (IC_{50} 值) 或每微克抗氧化剂实际清除 DPPH 的数量皆表明, 没食子酸的清除能力最强, 槲皮素次之, 而 GSH、 α -TP 和两种人工合成的抗氧化剂 BHT 及 Tiron 则较低. 这与 Cao 等^[8]利用 ORAC 法的测定指出一些类黄酮比 ASA、 α -TP 和 GSH 有更强的抗氧化活性结果相一致.

表 1 几种抗氧化剂清除 DPPH 自由基能力的变化

抗氧化剂	IC_{50} (DPPH 吸收降低 50% 时抗氧化剂的量)		DPPH 清除量/ $g \cdot g^{-1}$
	$\rho/\mu g$	$c/\mu mol \cdot L^{-1}$	
GIP	2.11	6.23	24.22
QCT	5.67	9.31	7.70
AsA	8.41	26.53	5.07
BHT	13.90	35.13	2.83
GSH	34.36	62.12	1.30
α -TP	19.50	22.63	1.19
Tiron	16.80	38.12	1.87

2.4 抗坏血酸清除 DPPH 与抑制肾上腺素氧化的比较

抑制肾上腺素氧化也常用作测定抗氧化能力的一种方法。图 3 比较了肾上腺素法与 DPPH 法用于评价抗坏血酸 (AsA) 抗氧化能力的灵敏度。结果看出 AsA 含量与 DPPH 吸收之间的斜率为 -0.0638 , 相关系数为 0.9986 (图 3b), 而 AsA 含量与抑制肾上腺素氧化之间的斜率为 -0.0011 , 相关系数为 0.9775 (图 3a), 即 DPPH 法的直线斜率与 AsA 含量的相关性皆大于肾上腺素法, 表明其更为灵敏与准确。此外, 肾上腺素法需在碱性条件下反应, 其活性氧 ($O_2^{\cdot -}$) 源也需通过化学反应产生, 而 DPPH 法则可直接检测 DPPH 自由基的变化。

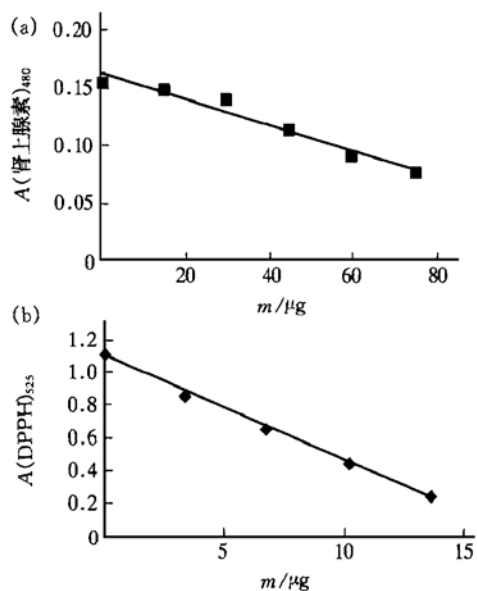


图 3 抗坏血酸抑制肾上腺素氧化 (a) 和清除 DPPH (b) 的比较

$$(a) y_1 = -0.0011x + 0.1619, r = 0.9775;$$

$$(b) y_2 = -0.0638x + 1.0962, r = 0.9986.$$

2.5 DPPH 法和亚油酸氧化法测定植物叶片抗氧化能力的比较

亚油酸氧化法也是测定植物抗氧化能力的常用

方法。用它和 DPPH 法比较生长在不同光强下森林植物蕨类和九节叶片的抗氧化能力 (图 4), 可以看出两种方法的结果基本一致。随生长光强的增加, 两种植物抗氧化能力都提高。自然光照下九节叶片的抗氧化能力大于蕨类, 而且光强对九节抗氧化能力的影响较蕨类大, 显示前者对光强的敏感性较高。由此结果进一步表证了 DPPH 法研究植物抗氧化能力与植物种类及外界环境因子之间关系的可行性。

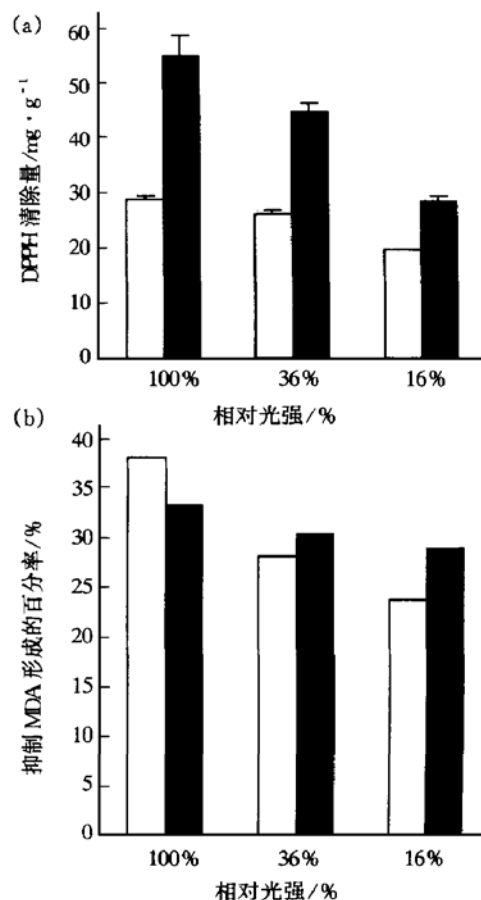


图 4 生长在不同光强下的植物提取物清除 DPPH (a) 和抑制亚油酸自动氧化 (b) 的变化

□: 蕨类; ■: 九节。

综上所述, 应用 DPPH 法来评价外源抗氧化剂和植物抗氧化能力是一种快速 (反应时间仅需

20 min 左右)、简便(操作简单,且用一般的分光光度计即可测定)、灵敏(只需要少量的植物样品)、直接(抗氧化剂直接作用于 DPPH 自由基,测定 DPPH 吸收的变化,而其他许多方法都是间接测定氧化产物的减少)可行的方法。

参 考 文 献

- 1 Osawa T, Namiki M A. Novel type of antioxidant isolated from leaf wax of *Eucalyptus* leaves. *Agric Biol Chem*, 1981, **45** (3): 735~ 739
- 2 Ottolenghi A. Interaction of ascorbic acid and mitochondrial lipides. *Arch Biochem Biophys*, 1959, **79**: 355~ 363
- 3 Cao G, Alessio H M, Culter R G. Oxygen radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biol Med*, 1993, **14** (3): 303~ 311
- 4 Larrauri J A, Sanchez Moreno C, Saura-Calixto F. Effect of temperature on the free radical scavenging capacity of extracts from red and white grape pomace peels. *J Agric Food Chem*, 1998, **46** (7): 2694~ 2697
- 5 Yokozawa T, Dong E, Ntagawa T, *et al.* *In vitro* and *in vivo* studies on the radical-scavenging activity of tea. *J Agric Food Chem*, 1998, **46** (6): 2143~ 2150
- 6 林植芳,李双顺,林桂珠,等.水稻叶片衰老与超氧歧化酶、脂质过氧化物的关系,植物学报,1984, **26** (6): 605~ 615
Lin Z F, Li S S, Lin G Z, *et al.* *Acta Bot Sin*, 1984, **26** (6): 605~ 615
- 7 翁元凯,黄 山,翁念宇.用碱性连二硫酸钠水溶液产生超氧阴离子自由基,生物化学与生物物理进展,1989, **16** (3): 209
Wong Y K, Huang S, Wong L Y. *Prog Biochem Biophys*, 1989, **16** (3): 209
- 8 Cao G, Sofic E, Prior R L. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *J Agric Food Chem*, 1996, **44** (11): 3426 ~ 3431

Detection of Antioxidative Capacity in Plants by Scavenging Organic Free Radical DPPH. PENG Chang-Lian, CHEN Shao-Wei, LIN Zhi-Fang, LIN Gu-Zhu (*South China Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China*).

Abstract A very significant linear relationship was found between the capacity of scavenging DPPH free radical and concentrations of six antioxidants ($r = 0.898 \sim 0.994$) determined by spectrophotometry. There was an obvious difference in the capacity of scavenging DPPH free radical among different antioxidants. Both scavenging DPPH and inhibiting the oxidation of adrenalin were closely related with the concentration of ascorbic acid. The change of DPPH levels is more sensitive than that of adrenalin in the presence of ascorbate. The antioxidative ability in leaves extracts of two woody plants grown under different light intensities was measured by either scavenging DPPH or inhibiting the oxidation of linoleic acid. The same conclusion was drawn through these two assays. It is suggested that scavenging DPPH free radical is a rapid, simple, sensitive and practical assay for the evaluation of antioxidative capacity in plants.

Key words 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), plant, antioxidative capacity, free radical

中国生物化学与分子生物学会简讯

由中国生物化学与分子生物学会承办的第十五届亚洲大洋洲生物化学家和分子生物学家联合会 (FAOBMB) 学术会议于 10 月 21 日至 24 日在北京举行。

1992 年诺贝尔生理医学奖获得者、华盛顿大学 Fischer 教授,1997 年诺贝尔化学奖获得者、洛杉矶加州大学 Boyer 教授,1975 年诺贝尔生理医学奖获得者、加州理工学院 Baltimore 教授,以及中国科学院院士、中国生物化学与分子生物学会理事长、中国科学院生物物理研究所邹承鲁教授等应邀做了大会报告。另有二十多位活跃在生命科学前沿的来自亚洲大洋洲的生物化学与分子生物学家接受邀请做了大会或分组报告。来自海内外的三百多名学者围绕会议的主题“21 世纪生物化学与分子生物学研究展望”,对蛋白质结构与功能、生物工程和生物技术、生化制药、功能基因与基因治疗等领域的研究成果、研究现状及发展趋势进行了研讨。本次会议还专门组织专家就研究生的生物化学教育及博士生标准进行了专题讨论。与会专家建议在我国推广国际生物化学与分子生物学家联合会 (IUBMB) 于 1999 年 10 月颁布的《分子生物科学博士学位的标准》,以推动我国生命科学教育与国际的接轨。

这是 21 世纪在我国召开的生命科学领域的一次国际盛会,促进了国际合作交流,推动了我国生命科学的发展。

此次学术会议的顺利召开,得到了中国科学院生物物理研究所生物大分子国家重点实验室的大力协助,并获得了中国科协、国家自然科学基金委、中国科学院的支持。在此,中国生物化学与分子生物学会谨向上述单位表示衷心的感谢。

有意购买本次学术会议论文集的同志,请与中国生物化学与分子生物学会秘书处联系。

地址:北京市朝阳区大屯路 15 号 邮编:100101 电话:010-64889892 电子信箱:csbmb@sun5.ibp.ac.cn