

DPPH 法评估火棘提取物抗氧化活性体系的建立

曾丹, 李旭, 高佩, 李宁, 鄢又玉*

(武汉轻工大学 生物与制药工程学院, 武汉 430023)

[摘要] **目的:**建立 DPPH(1,1-二苯基-2-三硝基苯)法火棘提取物抗氧化活性评价体系。**方法:**主要探讨了 DPPH 及乙醇浓度、光照、温度及体系 pH 对 DPPH 乙醇溶液相对吸光度的影响;以及反应时间与温度、体系 pH、光照、稀释样品的乙醇浓度对火棘提取物 DPPH 抗氧化评价体系的影响。**结果:**抗氧化评价用 DPPH 乙醇溶液必须临用新配,浓度应控制在 0.02 ~ 0.2 mmol·L⁻¹,在冰箱中(2 ℃)保存时间不能超过 4 h,且最好避光保存,反应体系适宜的 pH 为 3 ~ 8。评价待检样品最好用无水乙醇稀释,加入 DPPH 于 25 ℃ 避光反应 30 min 后,在波长 517 nm 处测吸光度,通过控制待检样品稀释倍数,使 DPPH 清除率控制在 17.70% ~ 53.43%。**结论:**该实验建立的 DPPH 法抗氧化活性评价体系,结果稳定可信,重复性好。

[关键词] 1, 1-二苯基-2-三硝基苯法; 火棘提取物; 抗氧化活性

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)21-0079-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014210079

Establishment of Antioxidant Activity System from Pyracantha Fortuneana Fruits by DPPH Evaluation Method

ZENG Dan, LI Xu, GAO Pei, LI Ning, YAN You-yu*

(College of Biological and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

[Abstract] **Objective:** To establish evaluation method on antioxidant activity of Pyracantha Fortuneana extract by DPPH. **Method:** The effect of DPPH and ethanol concentration, light, temperature and pH on relative absorbance of DPPH ethanol solution, as well as the effect of reaction time and temperature, pH, light and ethanol concentration diluting Pyracantha Fortuneana extract were both investigated thoroughly. **Result:** DPPH ethanol solution must be prepared just before using and can be saved in the refrigerator (2 ℃) for no more than 4 hours without light, whose concentration should be controlled between 0.02 and 0.2 mmol·L⁻¹. The absorbance of sample solution could be measured at 517nm after being diluted with anhydrous ethanol and reacted for 30 min under 25 ℃ excluding light, along with the optimal pH is from 3 to 8. We had better controlled the sample dilution times and ensured that DPPH clearance ratio is between 17.70% and 53.43%. **Conclusion:** This evaluation method is reliable and stable, as well as good repeatability.

[Key words] DPPH evaluation method; Pyracantha Fortuneana extract; antioxidant activity

火棘是蔷薇科常绿或半常绿灌木,其果实又名火把果、红果、救兵粮、赤阳子等。主要集中在分布于我国东南、西南地区^[1],湖南仅湘西年产鲜果就达 1.1 万吨以上,四川、贵州年产鲜果均在 2.5 万吨以上,湖北年产鲜果近 5 万吨,资源丰富且极易采摘利用。火棘具有极高的食用及药用价值,其提取物具

有美白、抗氧化、降血脂、增强免疫力、止痛等功能,在食品、化妆品和医药领域有广泛的应用^[2]。火棘资源已得到成功开发,如日本 Kenabo 公司的火棘美白系列化妆品,韩国韩束火棘美白系列及中国台湾澳林公司以红果为原料开发的“活力润白露”等,但国内火棘资源的开发仅限于果酒果醋或低端粗提物

[收稿日期] 20140114(012)

[第一作者] 曾丹,学士,从事生物制药专业研究,Tel:13659816265,E-mail:zd1406726526@qq.com

[通讯作者] * 鄢又玉,博士,讲师,从事制药工程专业研究,Tel:027-83943860,E-mail:yanyu75@aliyun.com.cn

应用及出口,资源精深加工提升空间很大,市场前景广阔。火棘提取物抗氧化活性的强弱是评价其应用价值的最重要指标之一。目前检测物质抗氧化功效的方法主要有 DPPH 法^[3-7],羟自由基法^[8],ABTS 法^[9],FRAP 法^[10-11],TBARS 法^[12],ORAC 法^[13-14],超氧自由基法^[15]等。DPPH 法是一种广泛应用于测定生物试样、酚类物质和食品抗氧化能力的方法^[16],目前采用 DPPH 法评价天然植物抗氧化活性的研究报道很多,但国内鲜有论文提及使用 DPPH 须注意的事项及影响反应体系的因素,如此导致结果重复性及重现性差。国外虽有少量相关方面的报道,但研究的出发点及侧重点不一,B. OZCELIK 等^[17]通过简单对比探讨了影响 DPPH 溶液吸光度降低的因素,如 pH、光照、氧及溶剂,指出在应用 DPPH 法评价抗氧化活性时必须认真考虑上述因素,但并没给出切实可行的评估方案;Rodrigo Scherer 等^[18]的研究侧重于提出一个通用性的 DPPH 抗氧化活性评价指标——抗氧化活性指数,关于 DPPH 抗氧化评价影响要素的探讨并不多。为了解决上述问题,我们以火棘提取物为切入点,系统深入探讨了 DPPH 法使用过程中须关注的首要问题及影响体系抗氧化评价的因素,以期明确建立火棘提取物 DPPH 抗氧化活性评价体系,为未来火棘的精深加工提供坚实的理论参考依据。

1 材料

Lambda 25 型紫外-可见分光光度计(美国 PE 公司),DF-101B 型集热式磁力加热搅拌器(金坛市医疗仪器厂),Centrifuge 5424R 型台式高速冷冻离心机(德国 eppendorf 公司),Molelement1018a 型摩尔超纯水机(上海摩勒科学仪器有限公司),Anke LXJ-II B 型低速大容量多管离心机(上海安亭科学仪器厂)。DPPH 对照品(批号 D9132, sigma 公司)。

火棘果,2012 年 11 月中旬采自湖北恩施来凤地区,经我校植物学博士杨悦鉴定为全缘火棘 *Pyracantha atalantioides* 的果实。

2 方法

2.1 火棘果提取物制备 火棘果皮肉粉碎,取过 20 目筛样品粉末 10 g,加 70% 乙醇 100 mL 在 80 ℃ 恒温回流提取 1 h,减压抽滤,滤液定容至 100 mL,离心,上清液冷藏备用。

2.2 相对吸光度公式

相对吸光度 = 待测样品溶液加入 DPPH 反应一段时间后测得的吸光度 / 样品未加入 DPPH 时初始吸光度 × 100%

2.3 清除 DPPH 自由基能力的测定 DPPH 是一种稳定的有机自由基,其乙醇溶液呈紫色,当加入自由基清除剂后,溶液紫色变浅,溶液的吸光度减小,可用于反映自由基的清除程度,从而可用于评价天然产物中活性物质的抗氧化能力。抗氧化能力用自由基清除率表示,清除率越大,抗氧化能力越强。

$$\text{清除率} = [1 - (A_i - A_j) / A_c] \times 100\%$$

式中 A_i 为 2 mL 样品和 2 mL DPPH 无水乙醇溶液混合后的吸光度; A_j 为 2 mL 样品和 2 mL 无水乙醇混合后的吸光度; A_c 为 2 mL 乙醇(浓度和样品中乙醇浓度相同)和 2 mL DPPH 无水乙醇溶液混合后的吸光度。

3 结果与讨论

3.1 DPPH 无水乙醇溶液最大吸收峰的确定 配制 0.05 mmol·L⁻¹ 的 DPPH 无水乙醇溶液,适当稀释后,以无水乙醇为参比,于波长 400 ~ 600 nm 进行全波段扫描,以确定 DPPH 溶液的最大吸收波长。DPPH 无水乙醇溶液在 517 nm 处有特征吸收峰,样品溶液在 517 nm 处无明显特征吸收,故选 517 nm 作为 DPPH 法测定吸光度最大吸收波长。

3.2 DPPH 溶液标准曲线的建立 向 10 个 10 mL 的量瓶中分别加入 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mL 0.2 mmol·L⁻¹ DPPH 无水乙醇溶液,用无水乙醇定容至 10 mL。以无水乙醇为空白,测定各溶液在 517 nm 处的吸光度,以 DPPH 溶液浓度对吸光度作线性回归,以 DPPH 浓度(mmol·L⁻¹)为横坐标,吸光度为纵坐标,可得线性回归方程为 $Y = 11.586X - 0.2672$, ($R^2 = 0.9987$)。结果表明 DPPH 质量浓度在 0.02 ~ 0.2 mmol·L⁻¹ 与吸光度线性关系良好。

3.3 样品对 DPPH 自由基清除率标准曲线的建立 配制 0.2 mmol·L⁻¹ 的 DPPH 无水乙醇溶液。将采用 2.1 项方法制备的火棘果提取液分别稀释 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 倍,用 2.3 项所述方法,分别计算出对 DPPH 的清除率。火棘果提取液清除 DPPH 自由基的清除率在 17.70% ~ 53.43% 时,清除率与火棘果溶液的浓度呈线性关系, $Y = 7664.1X - 2.69$ ($R^2 = 0.9995$)。

3.4 不同因素对 DPPH 乙醇溶液相对吸光度的影响

3.4.1 DPPH 无水乙醇溶液的起始浓度对 DPPH 相对吸光度的影响 配制 0.1 mmol·L⁻¹ 的 DPPH, 分别取 2, 4, 6, 8, 10 mL, 定容至 10 mL, 在室温下避光放置,以无水乙醇为空白对照,在 517 nm 处测其吸光度,每间隔 10 min 测 1 次,共考察 90 min,每组

样品分别重复实验 3 次取平均值,计算相对吸光度。由图 1 可知,当 DPPH 无水乙醇溶液的起始浓度在 $0.04 \sim 0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,其相对吸光度随时间变化缓慢,且基本接近。因此当 DPPH 无水乙醇溶液的起始浓度控制在 $0.04 \sim 0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,对相对吸光度的影响可以忽略。

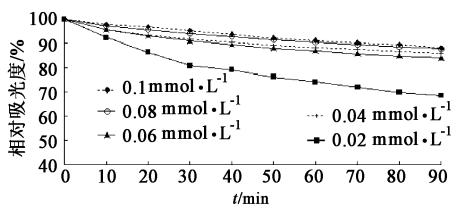


图 1 DPPH 起始浓度对 DPPH 相对吸光度的影响

3.4.2 反应温度对 DPPH 无水乙醇溶液相对吸光度的影响 配制浓度为 $0.08 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DPPH 无水乙醇溶液,避光,一份置于室温下($25 \text{ }^\circ\text{C}$),另一份置于冰箱中($2 \text{ }^\circ\text{C}$),均以无水乙醇作为空白组,在 517 nm 处测其吸光度,冰箱里的样品每 30 min 测 1 次吸光度,共考察 360 min ;室温下的每 10 min 测 1 次结果,一共考察 240 min 。每组测定分别重复 3 次取平均值,计算相对吸光度。

由图 2 可知,将 DPPH 无水乙醇溶液置于冰箱中冷藏,前 240 min 相对吸光度几乎不变, 240 min 后相对吸光度逐渐减小,因此将 DPPH 置于冰箱中冷藏的时间不宜超过 240 min ,即 4 h 。由图 3 可知,DPPH 溶液室温存放时,前 30 min 相对吸光度下降幅度较大, 30 min 后其相对吸光度变化趋势渐缓,因此后期样品与 DPPH 反应时间,尽量选择 30 min 后较好。

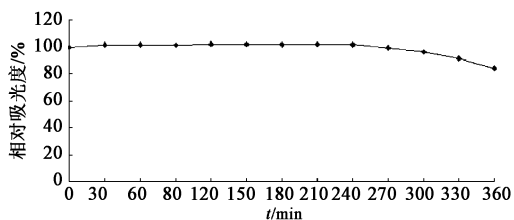


图 2 DPPH 乙醇溶液冷藏时相对吸光度随时间的变化

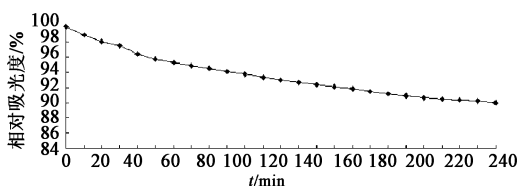


图 3 DPPH 乙醇溶液室温存放时相对吸光度随时间的变化

3.4.3 光照对 DPPH 无水乙醇溶液相对吸光度的影响

影响 配制浓度为 $0.08 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DPPH 无水乙醇溶液,一份置于避光环境下,另一份置于室内自然光照下,控制室内温度在 $25 \text{ }^\circ\text{C}$,均以无水乙醇作为空白组,在 517 nm 处测其吸光度,每 10 min 测 1 次结果,共考察 90 min 。每组分别重复测定 3 次取平均值,计算相对吸光度。

由图 4 可知,置于避光环境中的 DPPH 无水乙醇溶液的相对吸光度随时间变化相对缓慢,而不避光的 DPPH 无水乙醇溶液的相对吸光度随时间变化较大。因此为了减小外因对 DPPH 无水乙醇溶液相对吸光度的影响,应将后期反应考察体系置于避光环境中。

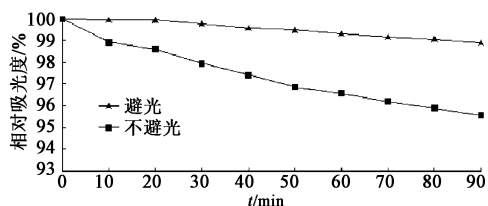


图 4 光照对 DPPH 无水乙醇溶液相对吸光度的影响

3.4.4 乙醇浓度对 DPPH 溶液相对吸光度的影响 配制 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DPPH 无水乙醇溶液,取 6 份 1 mL $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DPPH,分别加入 3 mL 体积分数为 100% , 80% , 60% , 40% , 20% , 0% 的乙醇,混匀,在室温下避光放置,以 1 mL 无水乙醇和 3 mL 相应体积分数的乙醇混合后作为对照,在 517 nm 处测其吸光度,每 10 min 测 1 次,每组分别重复测定 3 次取平均值,共考察 150 min ,计算相对吸光度。

由图 5 可知,随着乙醇体积分数的减小,其对 DPPH 乙醇溶液相对吸光度的影响逐渐增大,为减小非样品因素造成的误差可以尽量选择高浓度乙醇配制及稀释样品,尤以无水乙醇最佳。

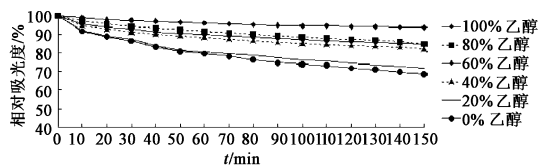


图 5 乙醇浓度对 DPPH 溶液相对吸光度的影响

3.4.5 pH 对 DPPH 无水乙醇溶液相对吸光度的影响 配制 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DPPH 无水乙醇溶液,分别取 2 mL pH 为 $1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ 的缓冲溶液,各加入 2 mL $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DPPH 无水乙醇溶液,以 2 mL 无水乙醇与 2 mL 相应的缓冲溶液混合后作为空白,在 517 nm 处测其吸光度,每 10 min 测 1 次,每组分别重复测定 3 次取平均值,共考察 90 min 。

min, 计算相对吸光度。

实际操作过程中发现向 DPPH 溶液中分别加入 pH 为 1, 2, 9, 10 的缓冲溶液后, 溶液立即变为棕黄色, 因此 DPPH 不适用于测 pH ≤ 2 和 pH ≥ 9 的溶液体系的抗氧化能力。由图 6 可以看出, 当溶液体系 pH 在 3 ~ 8 时, pH 对 DPPH 乙醇溶液吸光度测定影响较小。

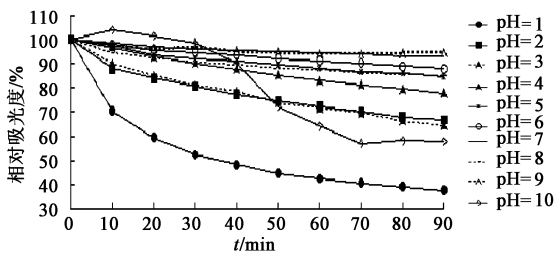


图 6 pH 对 DPPH 无水乙醇溶液相对吸光度的影响

3.5 火棘果提取物清除 DPPH 自由基反应条件的确定

3.5.1 火棘果提取物清除 DPPH 自由基反应动力学监测 以无水乙醇将火棘果提取液稀释 200 倍后, 在室温、避光环境下测试其对 DPPH 自由基的清除率, 在 517 nm 处, 无水乙醇为参比, 测其吸光度, 每 5 min 测 1 次, 每组重复测定 3 次取平均值, 共考察 1 h。

由图 7 可以看出, 反应前 30 min, 清除率上升趋势明显; 30 ~ 60 min, 清除率趋于稳定, 因此可以在反应 30 ~ 60 min, 测定反应体系的吸光度。但是为了加快测定速度, 也可以在准确控制反应时间前提下, 选取 30 min 作为反应时间。

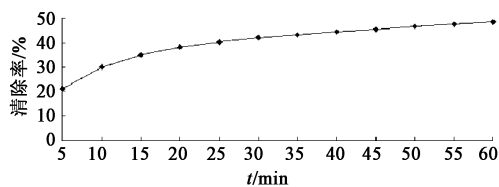


图 7 DPPH 清除率与反应时间的关系

3.5.2 反应体系 pH 的选择 分别向 8 个圆底烧瓶中加入 100 mL pH 为 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 的 70% 乙醇和 10 g 火棘果皮肉粉, 90 °C 回流提取 60 min, 将提取液和火棘果残渣以无水乙醇定容至 200 mL。离心后测得提取 pH 为 1, 2 的两组提取物稀释后 pH 均小于 3, 其他组 pH 均为 4.82 ± 0.02。参照实验 3.4.5 可知 DPPH 法不适用于火棘提取溶液 pH 为 1, 2 的提取物。在提取溶剂 pH ≥ 3 的前提下, 可以无水乙醇代替缓冲溶液稀释样品用于 DPPH 抗氧

化评价。

3.5.3 反应体系温度的选择 将火棘果提取液稀释 200 倍, 加入 DPPH 后, 分别在 15, 25, 35 °C 的避光环境中反应 30 min, 然后冰浴迅速冷却, 在 517 nm 处测其吸光度, 并计算 DPPH 自由基的清除率, 重复实验 5 次后计算平均值和变异系数。

由表 1 可以看出, 当反应体系温度控制在 15 °C 和 35 °C 时重复实验的变异系数明显大于 25 °C 时变异系数, 因此建议将 DPPH 抗氧化反应体系置于 25 °C 环境中进行。

表 1 15 °C, 25 °C 及 35 °C 时样品对 DPPH 的清除率 %

温度/°C	1	2	3	4	5	变异系数
15	32.33	31.96	31.97	33.33	33.70	2.48
25	37.78	37.81	37.33	38.76	37.92	1.37
35	51.23	50.80	49.70	50.91	48.72	2.01

3.5.4 避光和不避光对反应体系的影响 将火棘果提取液稀释 200 倍后, 分别在室温下避光和不避光环境中反应 30 min 后, 以无水乙醇为空白对照, 在 517 nm 处测其吸光度, 并计算 DPPH 自由基的清除率, 重复实验 5 次后计算平均值和变异系数。

由表 2 可以看出, 当反应体系不避光时, 重复实验的变异系数为 2.96, 明显大于避光环境时的 1.75, 因此建议将反应体系置于避光环境中进行反应。

表 2 避光、不避光时 DPPH 的清除率 %

光照	1	2	3	4	5	变异系数
避光	31.48	31.72	32.39	32.26	32.90	1.75
不避光	31.96	32.34	30.38	31.80	32.92	2.96

3.5.5 稀释样品用乙醇体积分数的选择 将火棘果提取液分别用 40%, 60%, 80%, 100% 的乙醇稀释 200 倍后, 在室温下避光环境中反应 30 min 后, 在 517 nm 处测其吸光度, 并计算 DPPH 自由基的清除率, 重复实验 5 次后计算平均值和变异系数。

由表 3 可以看出, 当用 40% 乙醇稀释时重复实验的变异系数明显大于用 60%, 80%, 100% 乙醇稀释的样品, 因此可以用 60%, 80%, 100% 乙醇稀释样品。为使实验操作更简便, 建议直接用无水乙醇稀释样品。

4 结论

本文研究了不同因素对 DPPH 乙醇溶液吸光度及火棘提取物溶液抗氧化检测的影响。结果表明, 用于抗氧化评价的 DPPH 乙醇溶液须临用新配, 若

表3 40%,60%,80%及100%的乙醇稀释

样品时 DPPH 的清除率 %

乙醇体积分数	1	2	3	4	5	变异系数
40	50.45	50.26	47.81	50.87	47.56	3.19
60	47.80	46.95	48.36	47.18	48.07	1.24
80	43.94	45.27	44.48	44.13	45.14	1.33
100	37.78	37.81	37.33	38.76	37.92	1.37

置于冰箱中(2℃)冷藏不得超过4h,且必须避光保存,适用评定体系pH须在3~8。以DPPH法评估火棘果提取物的抗氧化能力时,需通过待测样品稀释倍数的改变,控制DPPH清除率在17.70%~53.43%;待测样品最好用无水乙醇稀释,于25℃条件下,加入DPPH溶液避光反应30min后,在517nm处测吸光度,计算清除率。实验结果重复性好,变异系数小。

[参考文献]

- [1] 侯建军,魏文科,薛慧,等. 野生植物火棘的研究进展[J]. 湖北民族学院学报:自然科学版,2002,20(1):15.
- [2] 侯建军,魏文科,黄惠,等. 火棘对D-半乳糖小鼠抗氧化作用的影响[J]. 中国公共卫生,2003,19(8):944.
- [3] Yoshiki,Y,Kahara,T,Okubo,K, et al. Superoxide-and 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical-scavenging activities of soyasaponin β g related to gallic acid[J]. Biosci Biotechnol Biochem,2001,65(10):2162.
- [4] Molyneux, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity[J]. Songklanakarin J Sci Technol, 2004,(26)2:211.
- [5] 杨虎,张生堂,高国强. 玫瑰黄酮的提取及其清除DPPH自由基活性研究[J]. 食品科学,2012,33(24):152.
- [6] She G M, Xu C, Liu B, et al. Polyphenolic acids from mint (the aerial of *Mentha haplocalyx* Briq.) with

- DPPH radical scavenging activity [J]. J Food Sci, 2010,75(4):C359.
- [7] Liu Y W, Li H B, Wang X F, et al. Evaluation of the free radical scavenging activity of *cynomorium songaricum* Rupr. by a novel DPPH-HPLC method[J]. J Food Sci,2011,76(9):C1245.
- [8] 郭雪峰,岳永德,孟志芬,等. 用清除羟自由基法评价竹叶提取物抗氧化能力[J]. 光谱学与光谱分析,2010,30(2):508.
- [9] 王宇卿,朱丹妮,寇俊萍,等. HPLC-ABTS-DAD在线检测生脉散和益气复脉粉针的体外抗氧化能力[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(16):51.
- [10] 郭长江,杨继军,李云峰,等. FRAP法测定水果不同部分抗氧化活性[J]. 中国公共卫生,2003,19(7):841.
- [11] 方敏,王耀峰,宫智勇. 15种水果和33种蔬菜的抗氧化活性研究[J]. 食品科学,2008,29(10):97.
- [12] 王强,陈晓麟. 不同储藏条件对脂肪氧化初期氧化指标的影响[J]. 食品科技,2010,35(9):168.
- [13] 赵建,宋亮楠,刘薇,等. ORAC法测定保健食品抗氧化能力的体内外实验对比分析[J]. 食品科学,2011,32(15):103.
- [14] 曹亚兰,赵谋明,郑赛晶,等. 以ORAC法为评价指标优化制备大豆抗氧化肽[J]. 食品与发酵工业,2011,37(10):149.
- [15] 周德庆,潘占钧. 极谱氧电极法测定抗氧化剂清除超氧自由基作用的研究[J]. 海洋水产研究,2004,25(1):64.
- [16] Pyrzynska K., Pekal A. Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples [J]. Analytical Methods,2013,5(17):4288.
- [17] Ozcelik B, Lee J H, Min D B, Effects of light, oxygen, and pH on the absorbance of 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl[J]. J Food Sci, 2003,68(2):487.
- [18] R Scherer, H T Godoy. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method[J]. Food Chemistry, 2009,112(3):654.

[责任编辑 顾雪竹]