

基于 DPPH 自由基清除能力的姜黄提取物抗氧化活性评价

王笑晴

天津医科大学第二医院, 天津 300021

摘要: 目的 建立高通量检测 DPPH 自由基清除能力的实验方法, 对姜黄提取物抗氧化活性进行初步评价。方法 通过测定抗坏血酸(维生素 C)的 DPPH 自由基清除率曲线, 以 IC_{50} 值作为评价试样清除 DPPH 自由基能力的指标, 并将此应用于测定姜黄醇提物和水提物清除 DPPH 自由基的能力。结果 测定波长 515 nm, 抗坏血酸 DPPH 自由基清除能力在 62.5~750.0 $\mu\text{g/mL}$ 线性良好, 方法可靠。姜黄醇提物的 DPPH 自由基清除能力 (IC_{50} 7.78 mg/mL) 明显强于水提物 (IC_{50} 14.84 mg/mL)。结论 建立的 DPPH 自由基清除测定方法可靠、简便、灵敏, 其高通量的快速检测方法可为抗氧化药物筛选提供参考。

关键词: 姜黄; DPPH 自由基; 抗氧化活性; 高通量; 抗坏血酸; 维生素 C

中图分类号: R977.9 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2011)05-0360-04

Evaluation on anti-oxidant activity of *Curcuma longa* extracts based on DPPH free radical scavenging capability

WANG Xiao-qing

Second Affiliated Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300021, China

Abstract: Objective To establish a high-throughput method of DPPH free radical scavenging for evaluating the anti-oxidant activity of the extracts from *Curcuma longa*. **Methods** Taking IC_{50} as the evaluating criterion of DPPH free radical scavenging capability by determining the scavenging rate curves of ascorbic acid, the DPPH free radical scavenging capability of two extracts from *C. longa* was determined. **Results** At the wavelength of 515 nm, DPPH free radical scavenging rate of ascorbic acid and concentration could fit a good linearity (0.062 5—0.75 mg/mL), and the results revealed that the method is convenient and reliable. Under this condition, the DPPH free radical scavenging capability of alcohol extracts (IC_{50} 7.78 mg/mL) was significantly stronger than that of water extracts (IC_{50} 14.84 mg/mL) from *C. longa*. **Conclusion** The convenient and reliable method could be used to evaluate the anti-oxidant activity of other Chinese materia medica, as well as provide an approach and reference for high-throughput activity screening.

Key words: *Curcuma longa* L.; DPPH free radical; anti-oxidant activity; high-throughput; ascorbic acid; vitamin C

姜黄 *Curcuma longa* L. 是姜黄属植物, 具有悠久的历史, 在东南亚及南亚有广泛的应用, 主要作调味品、染料、色素、医药、化妆品等。其味苦, 性温, 归脾、肝经, 具有破血行气、通经止痛的功效^[1]。有实验表明姜黄提取物有抗血脂、抗氧化、促纤溶、抑制环氧酶和脂氧酶、抗肿瘤等作用^[2-6]。现代研究表明, 自由基作为新发现的致病因子已引起广泛关注, 它与炎症、肿瘤、心血管疾病等的发生有关。因此, 在植物中寻找高效低毒的天然抗氧化剂工作深受重视。

清除自由基的检测评价方法有许多种^[7-8], 体内试验比较灵敏, 但繁琐、周期较长、费用高, 不适

于大量样品的测定。文献报道抗氧化活性检测方法有硫氰酸盐法、硫代巴比妥酸(TBA)法、抗氧化能力指数法(ORAC)等体外实验法^[9-12], 寻找一种从整体反映药物抗氧化活性的方法, 建立一种生物活性评价方法是其质量控制的重要手段和发展新趋势, 而 1, 1-二苯基-2-苦基苯肼(DPPH)法从整体出发考察药材抗氧化能力, 具有快速、简便、灵敏的优点^[13-14], 其原理是通过分子中 1 个稳定的 DPPH 自由基与抗氧化剂提供的 1 个电子配对结合, 使 DPPH 的特征紫色消失^[15-16], 因此可用于抗氧化剂清除自由基能力的评价。

本实验以抗氧化作用明确的抗坏血酸(V_C)建

收稿日期: 2011-07-13

作者简介: 王笑晴(1986—), 药师。Tel: (022) 88329043 E-mail: WXQ_YD2@126.com

立高通量的清除 DPPH 自由基的实验方法,对姜黄的乙醇提取物和水提取物清除 DPPH 自由基的能力进行比较,旨在为利用姜黄开发天然的、高效低毒的抗氧化功效药物提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

姜黄药材购于四川双流县,经天津医科大学第二医院药剂科刘森海教授鉴定为姜科植物姜黄 *Curcuma longa* L. 的干燥根茎。

姜黄素对照品,购自北京亚希尔科技有限公司。经超高效液相色谱 (UPLC) 法检测,质量分数 $\geq 98\%$ 。

DPPH ($C_{18}H_{12}N_5O_6$, 批号 S90790-379, 美国 Sigma-Aldrich 公司), 无水乙醇 (AR, 北京化学试剂厂), 娃哈哈纯净水; 其他试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 姜黄醇提物的制备 取姜黄药材,适当粉碎,取黄豆粒大小均匀颗粒 10.0 g,加入 10 倍量 80%乙醇后超声提取 (功率 250 W, 频率 50 kHz) 2 次,每次 30 min。经双层滤纸滤过,合并滤液。回收乙醇,浓缩液转移至 10 mL 棕色量瓶中,用无水乙醇稀释,定容,即得含原生药 1 g/mL 药液), 4 °C 储存备用。

1.2.2 姜黄水提物的制备 精密称取姜黄药材 (黄豆粒大小均匀颗粒) 约 25 g,置 1 000 mL 圆底烧瓶中,加入 10 倍量水,加热煮沸,保持沸腾 30 min,连续提取 3 次,合并滤液,纱布滤过,浓缩,定量转移至 25 mL 棕色量瓶中,用水稀释,定容,得含原生药 1 g/mL 药液), 4 °C 储存备用。

1.2.3 DPPH 对照液的配制 精密称定 DPPH 对照品 10.0 mg,置于 100 mL 棕色量瓶中,无水乙醇充分溶解,定容,摇匀。即得为 100 μ g/mL DPPH 对照贮备溶液,置 -20 °C 冰箱中保存备用。临用前用无水乙醇稀释 10 倍即得所需浓度对照液。

1.2.4 V_C 溶液的制备 精密称定 V_C 24.6 mg,置 25 mL 量瓶中,用去离子水充分溶解,定容至刻度,摇匀,即得为 0.984 mg/mL 的 V_C 贮备液,4 °C 冷藏,临用前稀释至所用浓度。

1.2.5 实验原理 DPPH 在有机溶剂中是一种稳定的自由基,其乙醇溶液呈深紫色,在可见光区最大吸收峰为 515 nm^[17-20],当 DPPH 溶液中加入自由基清除剂时,孤对电子被配对,吸收消失或减弱。因此可用来检测自由基的清除情况,从而评价某物质

的抗氧化能力。其作用原理如图 1。

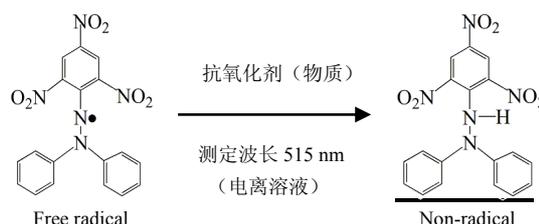


图 1 DPPH 自由基清除作用原理

Fig. 1 Principle of DPPH free radical scavenging

1.2.6 DPPH 自由基清除试验的测定方法 将每种供试品溶液分别取 20 μ L 加样在 96 孔板中,再在每个孔中平行加入 180 μ L DPPH 溶液。同时设立对照组 (等量乙醇代替供试液),空白组 (20 μ L 乙醇加入 180 μ L DPPH 溶液)。轻轻振荡,使充分混匀,将 96 孔板放置在避光环境下反应 30 min。药物与自由基反应完全,在波长 515 nm 处测定,记录最终吸光度 (A) 值。

$$\text{自由基清除率 } D = (A_{\text{对照组}} - A_{\text{样品组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白}})$$

式中 $A_{\text{样品组}}$ 为加入测试样品后反应液的吸光度; $A_{\text{对照组}}$ 为对照组未加药的吸光度; $A_{\text{空白}}$ 为空白组的吸光度。为了减小实验误差,每样品设 6 复孔,6 复孔取平均值。

2 结果与讨论

2.1 方法学考察

2.1.1 DPPH 标准曲线的绘制 分别吸取 1、2、4、6、8、10 mL DPPH 对照贮备溶液,定量转移至 10 mL 棕色量瓶中,乙醇定容,摇匀。精密移取 200 μ L 加入 96 孔板中,515 nm 测其 A 值。以质量浓度为横坐标, A 值为纵坐标,绘制标准曲线,每个质量浓度重复 3 次,取平均值。得回归方程 $A = 10.88C + 0.075$ ($r = 0.9996$)。

2.1.2 仪器精密度、方法重现性、样品稳定性 按上述实验条件,精密移取 200 μ L DPPH 溶液置于 96 孔板中,测定 A 值,重复测定 6 次,测定值 RSD 为 0.38% ($n = 6$),表明该仪器精密度良好。用同一样品进行 6 次测定,测定值 RSD 为 0.33% ($n = 6$),表明该方法重现性良好。为了考察 DPPH 溶液和供试液,即 DPPH 溶液和样品溶液稳定性对测定结果的影响,取同一批次配制的 DPPH 溶液保存在 -20 °C 冰箱中,分别于配置后 0、1、2、3、5、7 d 与同期保存在 4 °C 冰箱的姜黄醇提物溶液反应,测定 A 值,计算 RSD 分别为 0.63% 和 1.02% ($n = 6$),结果表明 DPPH 试剂和姜黄两种提取液在 7 d 内基

本稳定。

2.2 抗坏血酸的 DPPH 自由基清除能力的测定

配制的 V_C 贮备溶液, 逐级稀释使用, 按“1.2.6”项下方法测定, 每个浓度设置 6 个复孔, 6 复孔取平均值计算 V_C 对 DPPH 的清除率 (Y)。以 Y 对质量浓度 (C) 线性拟合得到方程 $Y=0.468+0.395C$ ($62.5\sim 750.0\ \mu\text{g/mL}$, $r=0.999\ 6$)。可见一定范围内可以用清除率表示抗氧化剂的自由基清除能力。 V_C 清除 DPPH 自由基的 IC_{50} 为 $0.081\ \text{mg/mL}$ 。

2.3 姜黄两种提取物的 DPPH 清除能力评价

选择 IC_{50} 值为姜黄提取物清除 DPPH 能力的测定指标。按“1.2.6”项下方法测定姜黄水提取物和醇提取物对 DPPH 自由基的清除能力, 结果见图 2。

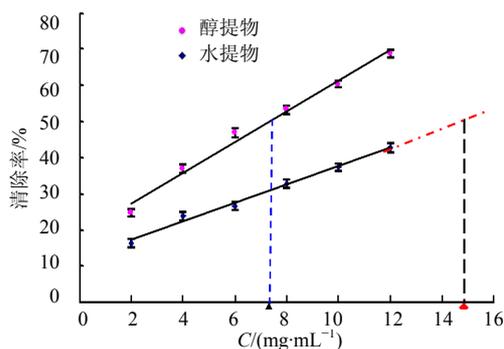


图 2 姜黄提取物对 DPPH 自由基作用

Fig. 2 DPPH free radical scavenging of extract from *C. longa*

从图 2 中可以看出姜黄两种提取物对 DPPH 具有不同的清除效果。当加入一定质量浓度的姜黄醇提取物或水提取物后, DPPH 自由基信号明显减弱, 吸光度值随药物质量浓度的增加而减小, 清除率随着质量浓度的增加而提高, 说明姜黄两种提取物对 DPPH 自由基均有显著的清除作用, 且呈明显的量-效关系。以清除率对药物质量浓度拟合回归方程, 水提取物 $Y=0.025\ 5X+0.121\ 5$ ($r=0.995\ 7$), 醇提取物 $Y=0.186\ 6-0.040\ 3X$ ($r=0.998\ 6$); 姜黄水提取物的清除能力相对较弱, IC_{50} 为 $14.840\ \text{mg/mL}$, 姜黄醇提取物清除能力相对较强, IC_{50} 为 $7.780\ \text{mg/mL}$ 。

IC_{50} 越低, 抗氧化剂的清除自由基的能力越强。由图 2 可以看出, 将 DPPH 自由基的清除率和质量浓度进行拟合, 呈良好线性关系, 说明各抗氧化剂具有较强的 DPPH 自由基清除能力, 且呈明显的量-效关系。因此选择 IC_{50} 值作为抗氧化剂自由基清除能力的测定指标。采用该法测定的抗坏血酸、姜黄醇提取物、水提取物 IC_{50} 值分别为 0.081 、 7.780 、 14.840

mg/mL 。可见自由基清除能力抗坏血酸 \gg 姜黄醇提取物 $>$ 姜黄水提取物。

3 讨论

本研究通过对 DPPH 溶液的吸光度与质量浓度的线性、稳定性、实验方法学的考察, 以及在 DPPH 溶液中加入抗坏血酸后的吸光度变化特性等, 认为 DPPH 分光光度法适用于抗氧化自由基的测定, 该方法具有简便灵敏、高通量快速、重现性好等特点。应用该方法评价姜黄的两种提取物的抗氧化活性, 结果表明姜黄提取物随着剂量的增加, DPPH 自由基清除率相应增加, 并成剂量相关性, 以 IC_{50} 值作为评价试样清除 DPPH 自由基能力的指标, 姜黄醇提取物的清除 DPPH 自由基能力 ($IC_{50}\ 7.78\ \text{mg/mL}$) 明显强于水提取物 ($IC_{50}\ 14.84\ \text{mg/mL}$)。提示姜黄中起抗氧化作用的物质以醇溶物质为主, 为姜黄的进一步开发利用提供理论依据。

现代研究表明, 自由基是引起多种疾病和老化的重要因素, 自由基引起的连锁反应经体内代谢后会引起脂质、DNA、细胞膜等体内大分子损伤, 是多种疾病, 如癌症、心血管疾病、发炎肾炎等的诱因^[21-22], 人体内虽不断产生自由基, 但又不断被自身的一套有效机制所清除, 而一旦体内自由基产生过多或清除能力下降时, 就会导致各种炎症、脏器损伤、肿瘤等一系列病变, 因此, 抗氧化剂的研究越来越受到高度的重视。但由于使用的合成抗氧化剂多有不良反应, 筛选能防御自由基损害的天然来源的抗氧化剂是目前研究的热点。目前, 关于姜黄的抗氧化作用研究较热门, 而多以姜黄素单体居多^[23-25]。本实验结果表明, 姜黄乙醇提取物对活性氧自由基有很好的清除作用, 而且姜黄乙醇提取物的效果明显优于水提取物, 可能与姜黄素类化合物主要是醇溶性物质有关。

DPPH 分光光度法是近些年发展起来的一种筛选抗氧化剂的简便方法, 该方法有简便、灵敏、直接等特点。本实验将酶标仪灵活地应用 DPPH 自由基测定方法, 其更具有快速、简便、灵敏的优势。省时省力、对比性好且重复性好, 其高通量的快速检测方法为药物筛选提供方法参考。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] Huang M T, Lysz T, Ferraro T, et al. Inhibitory effects of curcumin on *in vitro* lipoxygenase and cyclooxygenase activities in mouse epidermis [J]. *Cancer Res*, 1991,

- 51(3): 813-819.
- [3] 沃兴德, 唐利华, 李万里, 等. 姜黄醇提取物对食饵性高脂血症家兔抗氧化和促纤溶作用的研究 [J]. 浙江中医学院学报, 1999, 23(1): 25-26.
- [4] 蒋德昭, 谢祁阳, 王绮如. 姜黄素剂量依赖性抑制 CFU-GM 和 WEHI-3B 细胞增殖 [J]. 湖南医科大学学报, 2000, 25(3): 216-218.
- [5] 狄建彬, 顾振纶, 赵笑东, 等. 姜黄素的抗氧化和抗炎作用研究进展 [J]. 中草药, 2010, 41(5): 附 18-附 21.
- [6] 罗廷顺, 李洪文, 刘正文, 等. 姜黄素的提取分离与药理作用研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2011, 26(2): 102-107.
- [7] 宋怀恩, 闻 韧. 抗氧化剂筛选方法的研究进展 [J]. 中国药物化学杂志, 2003, 13(2): 119-124.
- [8] 郑晶泉. 抗氧化剂抗氧化实验研究进展 [J]. 国外医学: 卫生学分册, 2000, 27(1): 37-40.
- [9] 翁新楚, 吴 侯. 抗氧化剂的抗氧化活性的测定方法及其评价 [J]. 中国油脂, 2000, 25(6): 119-122.
- [10] Bors W, van Beek T A, Linssen J P, *et al.* Screening of plant extracts for antioxidant activity: A comparative study on three testing methods [J]. *Phytochem Anal*, 2002, 13(1): 8-17.
- [11] Saint-Cricq De Gaulejac N, Provost C, Vivas N. Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods [J]. *J Agric Food Chem*, 1999, 47(2): 425-431.
- [12] 夏向东, 吕飞杰, 台建祥. 抗氧化剂的功效及抗氧化活性的体外分析评价 [J]. 食品研究与开发, 2001, 22(1): 38-42.
- [13] 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.
- [14] 许申鸿, 杭 瑚. 一种筛选自由基清除剂的简便方法 [J]. 中草药, 2000, 31(2): 96-97.
- [15] Hideyuki L, Kahara T, Okubo K, *et al.* Superoxide and 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activities of soyasaponin related to gallic acid [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2001, 65(10): 2162-2165.
- [16] Parejo I, Codina C, Petrakis C, *et al.* Evaluation of scavenging activity assessed by Co(II)/EDTA-induced luminal chemiluminescence and DPPH* (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical assay [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2000, 44(3): 507-512.
- [17] Bondet V, Brand-Williams W, Berset C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH* free radical method [J]. *Lebensmittel-Wissenschaft Technologie*, 1997, 30(6): 609-615.
- [18] Brand-Williams W, Cuvelier M E, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity [J]. *LWT/Food Sci Technol*, 1995, 28(1): 25-30.
- [19] Go'mez-Alonso S, Fregapane G, Salvador M D, *et al.* Changes in phenolic composition and antioxidant activity of virgin olive oil during frying [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(3): 667-672.
- [20] Lebeau J, Furman C, Bernier J L, *et al.* Antioxidant properties of di-tert-butylhydroxylated flavonoids [J]. *Free Radic Biol Med*, 2000, 29(9): 900-912.
- [21] 石 碧, 狄 莹. 植物多酚 [M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [22] 孙存普. 自由基生物学导论 [M]. 合肥: 中国科技大学出版社, 1999.
- [23] Sacchetti G, Maietti S, Muzzoli M, *et al.* Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods [J]. *Food Chem*, 2005, 91(4): 621-632.
- [24] Koo B S, Lee W C, Chung K H, *et al.* A water extract of *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) rescues PC12 cell death caused by pyrogallol or hypoxia/reoxygenation and attenuates hydrogen peroxide induced injury in PC12 cells [J]. *Life Sci*, 2004, 75(19): 2363-2375.
- [25] Mohanty I, Singh Arya D, Dinda A, *et al.* Protective effects of *Curcuma longa* on ischemia-reperfusion induced myocardial injuries and their mechanisms [J]. *Life Sci*, 2004, 75(14): 1701-1711.