

臧红 T-Fenton 体系荧光光谱法 测定黄山贡菊/金菊的抗氧化活性

徐金明^① 陈 欢

(黄山学院化学系 安徽省黄山市屯溪区西海路 39 号 245041)

摘 要 臧红 T 能产生特征荧光, 其激发波长和发射波长分别为 264nm 和 577nm。酸性介质中, Fenton 体系($\text{H}_2\text{O}_2\text{-Fe}^{2+}$)产生的羟自由基能氧化臧红 T 使其荧光猝灭, 而许多花茶的提取物可部分清除溶液中的羟自由基使其荧光猝灭程度降低, 据此建立了一种测定黄山贡菊和金菊的抗氧化活性的新方法。本实验采用单因素实验法, 对羟自由基体系各种条件进行了优化, 并根据各体系的荧光强度计算出自由基清除率分别是 64.8%、50.9%。

关键词 臧红 T; 荧光分析法; 黄山贡菊; 抗氧化活性

中图分类号: O657.32

文献标识码: B

文章编号: 1004-8138(2011)05-2455-05

1 引言

生命活动的有氧代谢可以不断产生各种氧自由基(Reactive Oxygen species, ROs)或称活性氧, 主要包括超氧阴离子自由基 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、羟基自由基 $\cdot\text{OH}$ 、酯自由基 $\text{RCOO}\cdot$ 和单线态氧 $^1\text{O}_2$ 等, 由于均有未配对电子, 所以反应活性大, 寿命短, 易于迅速与其他分子剧烈反应, 所以破坏性极大, 尤以 $\cdot\text{OH}$ 为甚^[1]。羟基自由基是造成组织脂质过氧化、核酸断裂、蛋白质和多糖分解的活性氧, 与机体的衰老、肿瘤、辐射损伤和细胞吞噬有关。

检测羟基自由基的主要方法有: 电子自旋共振法^[2]、高效液相色谱法^[3-5]、化学发光法^[6,7]、分光光度法^[8-10]、荧光光谱法^[11,12]等。电子自旋共振法和高效液相色谱法操作复杂, 仪器昂贵, 化学发光法虽然操作简便, 测定快速, 但其仪器不普及。比色法只需要使用特殊的试剂, 在特定的紫外波长下检测吸光度的变化即可, 均易为实验室采用。荧光分析法的灵敏度高、选择性好、样品用量少和操作简便, 它的灵敏度通常比分光光度法高 2—3 个数量级, 在卫生检验、环境及食品分析、药物分析、生化和临床检验等方面有着广泛的应用。

2 实验部分

2.1 仪器与药品

F-4500 荧光分光光度计(日本 Hitachi 公司); ESJ210-4A 分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司); DF-101D 恒温加热磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限公司); Aquaplast AWL-D502 超纯水仪(重庆艾科浦公司)。

30% 的双氧水(AR)、硫酸亚铁(AR)、冰乙酸(AR)、无水乙醇(AR)、氢氧化钠(AR)、槲皮素(BR)购于国药集团化学试剂有限公司; 臧红 T(BR, 天津市光复精细化工研究所); 抗坏血酸(BR, 天津市博迪化工有限公司)。实验用水为超纯水(电阻率为 $18.25\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$)。

黄山贡菊、黄山金菊(黄山市隆晟茶叶有限公司)。

① 联系人, 电话: (0559) 2546612; E-mail: xjm000@sina.com

作者简介: 徐金明(1970—), 男, 安徽省望江县人, 讲师, 硕士, 主要从事分析化学教学与研究工作。

收稿日期: 2010-12-17; 接受日期: 2011-01-18

臧红 T 溶液: $4.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$; FeSO_4 溶液: $8.8 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ (加入少量稀盐酸后定容); H_2O_2 溶液: 0.01%; 抗坏血酸溶液: $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$; 槲皮素溶液: $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$; pH 3.5 的 HAc-NaAc 缓冲溶液。

2.2 实验方法

2.2.1 羟自由基的测定

取 2 只 25mL 的容量瓶, 分别加入臧红 T 溶液 1mL, pH 3.5 HAc-NaAc 缓冲溶液 2mL, 向一只容量瓶中加入 FeSO_4 溶液 1.4mL, 0.01% H_2O_2 溶液 1mL, 另一只中不加, 分别以水定容, 摇匀, 放置 30min。用荧光分光光度计, 分别测定加与不加 Fenton 试剂体系的荧光强度 F 、 F_0 , 计算其差 ΔF ($\Delta F = F_0 - F$), 由此间接求得 Fenton 体系所产生羟自由基的量。

实验是在常温下进行, 采用 $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 264\text{nm}/577\text{nm}$ 为测定波长, 激发与发射狭缝宽度都为 5nm, 荧光分光光度计的扫描速度为 2400nm/min。

2.2.2 羟自由基清除率的测定

在羟自由基体系中加入一定量的羟自由基清除剂抗坏血酸或槲皮素, 按 2.2.1 节方法测定荧光强度 F_s , 未加清除剂体系的荧光强度为 F , 则清除率(S)的计算公式为:

$$S = (F_s - F) / (F_0 - F) \times 100\%^{[13]}。$$

2.2.3 黄山贡菊与金菊提取物的抗氧化作用

取黄山贡菊和金菊各 2.0g, 置于 250mL 带塞的锥形瓶中, 向锥形瓶中加 60mL 无水乙醇, 并将锥形瓶放入超声波清洗器中超声萃取 1h, 提取液过滤, 再将提取液在水浴加热蒸馏回收乙醇至干, 残渣加少量的 $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液溶解, 加水定容到 100mL, 再稀释 10 倍。取溶液 1.0mL 按 2.2.1 节方法进行测定。

3 结果与讨论

3.1 荧光光谱

对各反应体系以 264nm 为激发波长, 在 540—600nm 范围内扫描发射光谱图, 如图 1。由图 1 可知, 臧红 T 的最大发射波长为 577nm。臧红 T 被羟自由基氧化后荧光峰强度显著下降(曲线 3), 加入抗氧化剂与羟自由基反应, 可使荧光峰下降程度减弱(曲线 2)。可见, 曲线 1 与曲线 3 的差值 ΔF 可用于测定羟自由基的产生量; 曲线 2 与曲线 3 的差值 ΔF 可用于测定清除率。

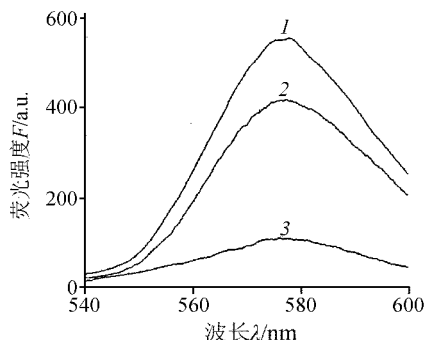


图 1 发射光谱

1—臧红 T+ 缓冲溶液;

2—臧红 T+ 缓冲溶液+ FeSO_4 + H_2O_2 + 抗氧化剂;

3—臧红 T+ 缓冲溶液+ FeSO_4 + H_2O_2 。

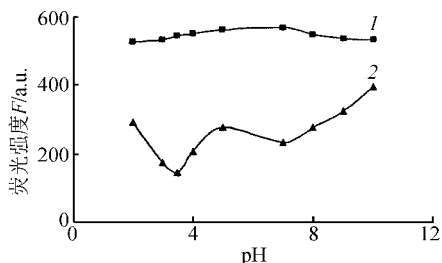


图 2 不同 pH 的缓冲溶液对荧光强度的影响

1—臧红 T; 2—臧红 T+ Fenton 体系。

3.2 实验条件优化

3.2.1 酸度及缓冲溶液用量的选择

不同 pH 对臧红 T 及臧红 T-Fenton 体系的荧光强度的影响见图 2。

由图 2 可知, 臧红 T 本身的荧光强度受酸度影响不大, 但臧红 T-Fenton 体系的荧光强度受 pH 的影响较大, 因羟自由基的产生与 pH 密切相关。在 pH= 3.5 时, ΔF 的值较大, 故选 pH= 3.5 的缓冲溶液。缓冲溶液的用量在 1—2mL 范围内, ΔF 随缓冲溶液用量增加而增加, 用量大于 2mL 时, ΔF 减少, 故选用缓冲溶液的用量为 2mL。

3.2.2 硫酸亚铁的最适用量的选择

按 2.2.1 节实验方法配制羟自由基体系溶液, 测定臧红 T-Fenton 体系-缓冲溶液体系(1mL 臧红 T+ 2mL 缓冲溶液+ 1mL H_2O_2 并向其中加入不同体积的 $FeSO_4$ 溶液)的荧光强度 F , 其荧光强度见图 3。由图 3 可知, 荧光强度 F 随 $FeSO_4$ 的量的加大而减小, 当 $FeSO_4$ 的量超过 1.4mL 时, F 值基本不变, 故 $FeSO_4$ 的最适用量为 1.4mL。

3.2.3 H_2O_2 溶液的最适用量的选择

按 2.2.1 节实验方法配制羟自由基体系溶液, 测定臧红 T-Fenton 体系-缓冲溶液体系(1mL 臧红 T+ 2mL 缓冲溶液+ 1.4mL $FeSO_4$ 并向其中加入不同体积的 H_2O_2 溶液)的荧光强度 F , 其荧光强度见图 4。

图 4 可知, F 随 H_2O_2 的量的加大而减少, 当 H_2O_2 的量超过 1mL 时, F 的值变化不大, 故 H_2O_2 的最适用量为 1mL。

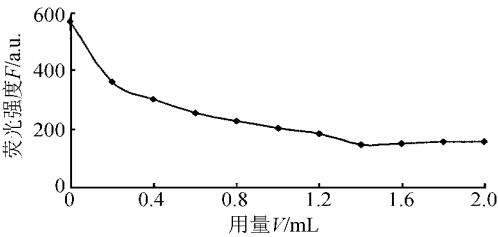


图 3 $FeSO_4$ 的量对荧光强度的影响

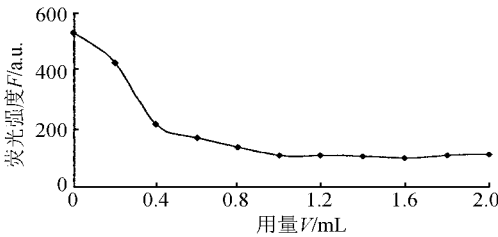


图 4 H_2O_2 用量对荧光强度的影响

3.2.4 反应时间对荧光强度的影响

按 2.2.1 节实验方法配制羟自由基体系溶液(1mL 臧红 T+ 2mL 缓冲溶液+ 1.4mL $FeSO_4$ 溶液+ 1mL H_2O_2), 每隔 5min 测一次荧光强度。反应时间在 5—20min 范围内, 荧光强度 F 迅速下降, 在 20—30min 范围内, 荧光强度 F 缓慢下降, 30min 以后, 荧光强度 F 基本没变化。故选择反应时间为 30min。

3.3 方法的重现性实验

按 2.2.1 节实验方法配置 10 份羟自由基体系的溶液(1mL 臧红 T+ 2mL 缓冲溶液+ 1.4mL $FeSO_4$ 溶液+ 1mL H_2O_2), 静置 30min, 测定其荧光强度进行重现性实验, 其相对标准偏差为 2.23%, 表明该方法具有良好的重现性。

3.4 抗氧化剂清除羟自由基的作用

槲皮素、抗坏血酸是有效的羟自由基清除剂, 在臧红 T-Fenton 体系中, 分别加入不同体积的的抗坏血酸(1×10^{-3} mol/L)和槲皮素(1×10^{-3} mol/L), 其荧光强度见图 5。计算羟自由基清除剂的清

除率,以验证方法的有效性。抗坏血酸、槲皮素的自由基清除率分别可到达 87.7%、53.5%。

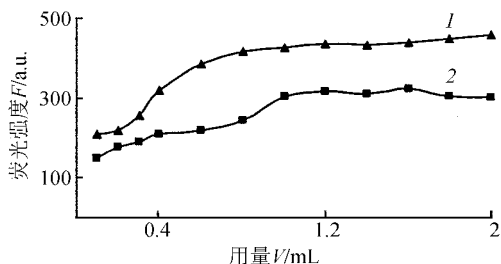


图 5 各体系的荧光强度光谱
1——加抗坏血酸;2——加槲皮素。

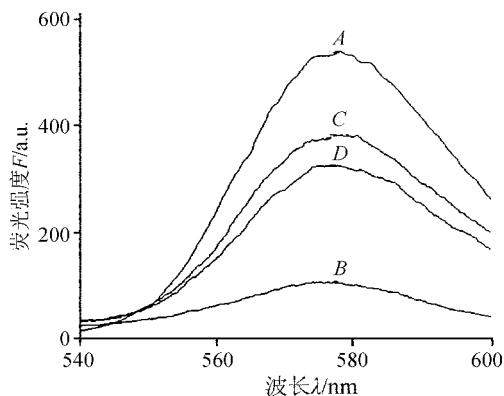


图 6 自由基清除剂的量对荧光强度的影响

A——1mL 臧红 T+ 2mL 缓冲溶液;
B——A+ 1.4mL FeSO_4 溶液+ 1mL H_2O_2 ;
C——B+ 黄山贡菊提取物;
D——B+ 黄山金菊提取物。

3.5 黄山贡菊/金菊提取物的抗氧化作用

按 2.2.1 节实验方法,测定空白体系 A(1mL 臧红 T+ 2mL 缓冲溶液)、臧红 T-Fenton 体系 B(1mL 臧红 T+ 2mL 缓冲溶液+ 1.4mL FeSO_4 溶液+ 1mL H_2O_2)和加入不同体积黄山贡菊和金菊提取物 C、D 后体系的荧光强度 F (如图 6)。黄山贡菊、金菊提取物自由基最大清除率分别为 64.8%、50.9%。可见花茶的确具有较强的羟自由基清除能力,即具有较强的抗氧化能力。

4 结论

本实验以黄山贡菊和金菊为代表材料,采用荧光分光光谱法,以臧红 T-Fenton 体系研究花茶提取物对羟自由基($\cdot\text{OH}$)的清除能力,进一步了解它们的抗氧化能力。经实验测定黄山贡菊和金菊提取物对羟自由基的清除率较大,具有较强的抗氧化作用。

参考文献

- [1] 温宝珠.超氧化物歧化酶研究现状与医学[J].青海医药杂志,1995,25(1):64—67.
- [2] Pasanphan W, Chirachanchai S. Conjugation of Gallic Acid on Chitosan: An Approach for Green and Water-Based Antioxidant[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2008, 72(1): 169—177.
- [3] 郭华,侯冬岩,回瑞华等. HPLC 法测定中草药对羟基自由基的清除率[J]. 中国药杂志, 2007, 42(16): 12—14.
- [4] 杜芹芹,张旭,宋凤瑞等. 人参与附子、黄连配伍的 HPLC-ESI-MS 研究及抗氧化活性测定[J]. 高等学校化学学报, 2010, 31(7): 1332—1336.
- [5] 刘冬梅,盛继文,李万忠等. 两个品种猴腿蹄盖蕨总黄酮含量的测定及抗氧化活性研究[J]. 光谱实验室, 2010, 27(3): 803—808.
- [6] 李世俊,胡永金. 香椿叶提取物抗氧化活性研究[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(22): 6807—6808, 6810.
- [7] 赵娟娟. 番茄红素的抗氧化活性研究[J]. 食品科技, 2010, 35(7): 62—65.
- [8] Gu H F, Li C M, Xu Y J *et al.* Structural Features and Antioxidant Activity of Tannin from Persimmon Pulp[J]. *Food Research International*, 2008, 41(2): 208—217.
- [9] 郭艳华. 常用天然香辛料抗氧化活性的比较研究[J]. 中国酿造, 2010, 220(7): 154—156.
- [10] 陈志红,徐美奕,龚先玲. 紫荆花黄酮类化合物体外抗氧化活性研究[J]. 化学世界, 2010, 51(7): 401—403.
- [11] 郭春燕,薛丽,赵二芳,罗丹明 B-Fenton 体系荧光法测定中草药抗氧化活性[J]. 分析科学学报, 2010, 26(1): 122—124.
- [12] 张爱梅,刘妮娜,臧运波等. 罗丹明 B-Mn²⁺-H₂O₂ 体系同步荧光分光光度法测定中药的抗氧化活性[J]. 理化检验(化学分

册), 2007, 43(4): 280—282.

[13] 蒋林玲, 李宝林, 王丽. $C_{y5}-Fe^{2+}-H_2O_2$ 光度法测定天然抗氧化剂的抗氧化活性[J]. 分析科学学报, 2008, 24(2): 212.

Determination of Antioxidant Activity of Huangshan Chrysanthemum/ Golden Aster by Fluorometry with Safranine T-Fenton System

XU Jin-Ming CHEN Huan
(Department of Chemistry, Huangshan University, Huangshan, Anhui 245041, P. R. China)

Abstract Characteristic fluorescence produced by safranine T was observed with its excitation and emission wavelength at 264nm and 577nm, respectively. Fluorescence intensity of safranine T was quenched by the hydroxyl free radical produced by Fenton system in acidic medium. However, this quenching effect can be alleviated by some extractants of flower tea, because the hydroxyl free radical can be partially cleaned. Based on this principle, a fluorometry method was developed for the determination of the antioxidant activities of Huangshan chrysanthemum and golden aster. Various conditions of hydroxyl radicals system were optimized by single-factor test, and the clearance rate of free radicals for Huangshan chrysanthemum and golden aster were 64.8% and 50.9%, respectively.

Key words Safranine T; Fluorescence Analysis; Huangshan Chrysanthemum; Antioxidant Activity

2012 年《光谱实验室》
征订启事

《光谱实验室》, 双月刊, 16 开, 每册 612 页, 发表论文约 140 篇, 单月 25 日出版。单价: 70 元/册; 年价: 420 元/卷。单篇论文平均售价(单价与发表论文篇数之比)的排序, 在 17 种科技期刊中为 7(右表), 居中。

欲订阅的读者请到当地国家邮电局(所)办理订阅手续, 邮发代号为 82-863。错过时间者, 可通过电子邮件(发到 gpsys@periodicals.net.cn)与本编辑部联系直接订阅。

《光谱实验室》编辑部

17 种科技期刊单篇论文的平均售价							
刊 名	刊期	开本	每期 页码	单 价 (元)	论 文 篇数	单篇论文 平均售价 (元)	单 篇 论 文 平均售价的 排 序 ^①
福建分析测试	双月	大 16	64	5	18	0.28	1
理化检验(化学分册)	月	大 16	144	15	48	0.31	2
分析科学学报	双月	大 16	140	10	30	0.31	2
岩矿测试	双月	大 16	160	10	25	0.33	3
分析化学	月	大 16	160	15	40	0.38	4
分析测试学报	月	大 16	124	12	28	0.42	5
光谱实验室	双月	16	612	70	140	0.50	6
分析试验室	月	大 16	124	18	30	0.60	7
高等学校化学学报	月	大 16	220	30	40	0.75	8
冶金分析	月	大 16	80	15	19	0.79	9
质谱学报	双月	大 16	64	15	17	0.88	10
光学学报	月	大 16	216	40	40	1.00	11
化学通报	月	大 16	96	20	18	1.11	12
化学学报	半月	大 16	120	20	18	1.11	13
量子电子学报	双月	大 16	128	30	25	1.20	14
钢铁研究学报	月	大 16	64	20	15	1.33	15
中国激光	月	大 16	320	125	58	2.16	16

① 排序越前者, 售价越低。