

单丛茶水提物清除 DPPH 和 ABTS 自由基的光谱学研究

郑善元¹, 陈填烽^{2, 3*}, 郑文杰², 黄荫成^{3*}

1 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东 广州 510632

2 暨南大学化学系, 广东 广州 510632

3 香港中文大学生物系农业生物技术重点实验室, 香港 新界 沙田

摘 要 研究了白叶和凤凰两种单丛茶水提物清除 DPPH 和 ABTS 自由基的能力及其光谱学特征。采用分光光度法测定单丛茶水提物清除 ABTS 自由基的测定波长为 734 nm, 体系稳定时间为 6 min; 清除 DPPH 自由基的测定波长为 515 nm, 体系稳定时间为 30 min。单丛茶水提物具有良好的抗氧化活性, 能有效、快速地抑制溶液中 DPPH 和 ABTS 自由基的形成及其特征吸收峰。在选定的反应体系中, 白叶单丛茶(I, II)、凤凰单丛茶(III, IV)和标准抗氧化剂 Trolox 对 ABTS 自由基的半数抑制浓度(IC_{50})分别为 26.9, 25.5, 28.0, 31.7 和 $85.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 说明单丛茶水提物的总抗氧化活性明显优于 Trolox。对于 DPPH 自由基, 4 种单丛茶的 IC_{50} 值分别为 49.8, 41.6, 47.3 和 $64.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。实验结果显示, 单丛茶水提物具有优良的抗氧化活性, 且对水溶性自由基的抑制率明显高于脂溶性自由基, 作为功能食品具有广阔的开发和应用前景。

关键词 单丛茶; 水提物; 抗氧化活性; ABTS; DPPH

中图分类号: TS201.2 文献标识码: A DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2010)09-2417-07

引 言

目前, 各种各样的茶在世界范围内被广泛饮用, 这不仅由于茶叶里的茶多酚具有较强的抗氧化活性, 而且饮茶被证实具有抑制肿瘤发生的作用^[1]。很多动物和细胞模型研究证实绿茶和红茶对各种癌症具有化学预防作用, 如肺癌、结肠癌、胰腺癌和乳腺癌等^[2]。茶叶里的茶多酚具有较强的抗氧化活性, 有助于预防氧化损伤相关的慢性疾病, 包括降低冠心病的发病率、提高骨矿物密度、预防癌症等^[3]。许多研究表明, 茶叶中的植物化学因子, 如儿茶素、酚酸、黄酮, 以及其他黄酮衍生物, 是茶清除自由基、实现其抗氧化及保健作用的物质基础。但是, 茶的成分及生物活性受加工技术、茶叶种类、气候和园艺技术等因素的影响^[4]。乌龙茶主产于我国福建、广东和台湾三省, 而单丛茶是广东乌龙茶的典型代表, 是介于不发酵茶与全发酵茶之间的一种半发酵茶。千百年来, 广东地区的人们把单丛茶视为日常保健不可或缺的佳品。然而, 关于单丛茶的抗氧化活性及其机理却鲜有报道。自由基是生物体新陈代谢过程中产生的一类具有氧化活性的

带负电的物质, 化学性质相当活跃, 易对机体产生迅速而强烈的损伤, 与机体的许多功能障碍和疾病的发生密切相关。因此, 研究自由基的检测方法并探讨物质对自由基的清除作用具有重要意义。DPPH 和 ABTS 法是基于分光光度法来测定样品的抗氧化活性, 具有操作简单、快速、高通量等优点^[5-8]。实验用 DPPH 和 ABTS 自由基清除法研究白叶和凤凰 2 种单丛茶水提物的抗氧化活性, 为单丛茶的保健机理提供一定的科学依据。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂

UV-3600 紫外可见分光光度计, 日本 SHIMADZU 公司; BP301S 电子天平, 德国 Sartorius 公司; DPPH (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), ABTS (2, 2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazol-6-sulfonic acid) 和 Trolox (6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid) 均购自 Sigma 公司。单丛茶样品由广东省潮安凤凰鹏龙茶叶发展有限公司鉴定、提供。

收稿日期: 2009-12-08, 修订日期: 2010-03-12

基金项目: 香港中文大学 IPMBAB 研究项目 (1901037), 国家自然科学基金项目 (20771044, 20901030), 广东省科技计划项目 (2008A03201020) 和广东省科学基金项目 (9451063201002077) 资助

作者简介: 郑善元, 1989 年生, 华南理工大学生物科学与工程学院本科生 e-mail: zsy_t6@yahoo.com.cn

* 通讯联系人 e-mail: yumshingwong@cuhk.edu.hk; tchentf@jnu.edu.cn

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2 单丛茶水提物的提取

准确称取各种单丛茶样品 5 g, 用 100 mL 开水浸泡 30 min 后, 过滤、离心($6\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$)得到茶汤, 冷冻干燥后得到粉末备用。

1.3 ABTS 自由基清除实验

参照文献[9]方法。用 pH 7.4 的 PBS 配制 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 ABTS 储备液, 与 MnO_2 反应后用 $0.2\text{ }\mu\text{m}$ 的 PVDF 膜过滤, 再用 PBS (pH 7.4) 稀释到 734 nm 处吸光度为 0.70 ± 0.02 , $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。在反应体系中, 于 10 mL 比色管中加入 50 μL 不同浓度的样品或参比溶液(DMSO), 再加入 3 mL 的 ABTS 反应溶液, 振荡摇匀, 于室温下避光静置 6 min, 测定溶液在 734 nm 处的吸光值, 并扫描 UV-Vis 光谱。

ABTS 自由基清除率($I\%$) = $(1 - A_s/A_0) \times 100\%$, 其中 A_s 为样品管的吸光值; A_0 为对照管的吸光值。

1.4 DPPH 自由基清除实验

参照文献[9]方法。准确称取 DPPH 粉末, 用甲醇溶解配备 $6\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 储备液, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存, 临用前用甲醇稀释至 $60\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在反应体系中, 于 10 mL 比色管中加入 50 μL 不同浓度的样品或参比溶液(DMSO), 再加入 3 mL 的 $60\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DPPH 甲醇溶液, 振荡摇匀, 于室温下避光静置 30 min, 然后测定溶液在 515 nm 处的吸光值, 并扫描 UV-Vis 光谱。

DPPH 自由基清除率($I\%$) = $(1 - A_s/A_0) \times 100\%$, 其中 A_s 为样品管的吸光值; A_0 为对照管的吸光值。

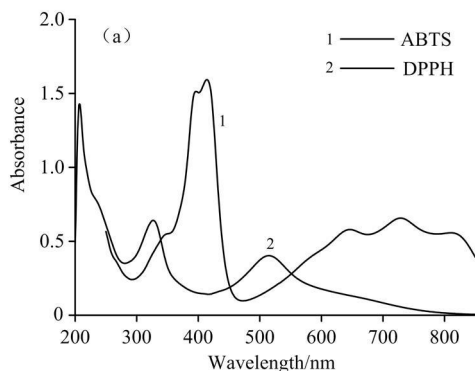


Fig 1 Absorbance spectra of (a) DPPH and ABTS, and (b) aqueous extracts of Baiye (I, II) and Fenghuang (III, IV) Dangcong teas

在 DPPH 自由基清除法中, DPPH 可在有机溶剂中形成一种稳定的自由基, 呈紫红色, 且具有典型的特征吸收峰。当反应体系中存在抗氧化剂时, 抗氧化剂提供氢原子和电子给 DPPH 自由基, 使其生成无色产物, 导致溶液的特征吸收峰下降, 吸光值变小。在此反应中, 体系颜色变得越浅表明所检测物质的抗氧化能力越强。本研究对 DPPH 自由基溶液和单丛茶水提物进行 UV-Vis 光谱扫描。结果如图 1(b) 所示, DPPH 溶液在 515 nm 处出现特征吸收峰, 而单丛茶水提物在 450 nm 以上范围没有吸收峰, 说明单丛茶水提物本身不会对反应测定造成干扰。加入样品后(图 3), DPPH 在 515 nm 处的吸收峰呈剂量效应的降低, 且线性关系良好, 因此本实验选择 515 nm 作为 DPPH 自由基清除实验的检测波

1.5 半数抑制率(IC_{50})的计算

以样品的浓度对自由基清除率作图并进行线性拟合, 并计算 IC_{50} 值, IC_{50} 值定义为清除率为 50% 时所需抗氧化剂的浓度。

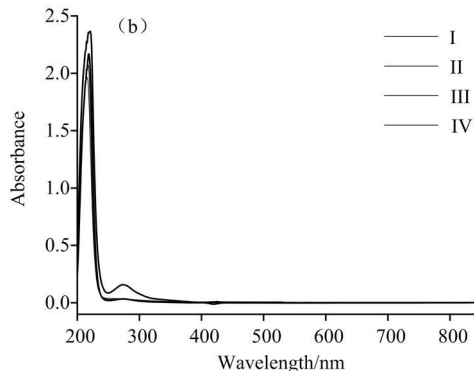
1.6 统计学分析

所有实验至少重复 3 次, 并采用 SPSS 13.0 软件系统进行统计学处理, 以 $P < 0.05$ 判断为有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 ABTS 和 DPPH 反应体系的吸收光谱及测定波长的确定

ABTS 自由基清除法^[9] 目前已被广泛应用于生物样品的总抗氧化能力的测定。在次反应体系中, ABTS 经氧化后生成相对稳定的蓝绿色的 ABTS 水溶性自由基。抗氧化剂与 ABTS 自由基反应后使其溶液褪色, 特征吸光值降低。溶液褪色越明显则表明所检测物质的总抗氧化能力越强。在本实验中, 对 ABTS 溶液进行 UV-Vis 光谱扫描, 结果如图 1(a) 所示, ABTS 溶液在 734 和 415 nm 处出现特征吸收峰。加入单丛茶水提物后(图 2), 415 nm 处的吸收峰受到样品本身吸收峰的干扰, 而 734 nm 处的吸收峰则呈剂量效应的降低, 且线性关系良好, 这些结果提示 734 nm 处吸收峰的变化可以用于反映样品清除自由基的情况, 故此本实验选用 734 nm 作为 ABTS 自由基清除实验的检测波长。



长。

2.2 ABTS 和 DPPH 体系的反应动力学研究

在 ABTS 和 DPPH 自由基清除实验中, 对于不同的待测抗氧化剂, 体系反应稳定时间的确定是一个关键的影响因素^[10]。为了解所采用的 ABTS 和 DPPH 体系的反应动力学特性, 研究了 ABTS 和 DPPH 自由基溶液在加入不同抗氧化剂(包括单丛茶水提物和 Trolox)后吸光值随时间变化的规律。如图 4 所示, 在 ABTS 自由基溶液中分别加入 4 种单丛茶水提物样品(终质量浓度为 1.50, 3.00, 6.25, 12.5, 25.0 和 $50.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和 Trolox(终质量浓度为 1.50, 3.00, 6.25, 12.5, 25.0 和 $50.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 后, 体系的特征吸收峰 A_{734} 在 60 s 内显著下降, 在 6 min 后, 体系基本趋于平衡, 达

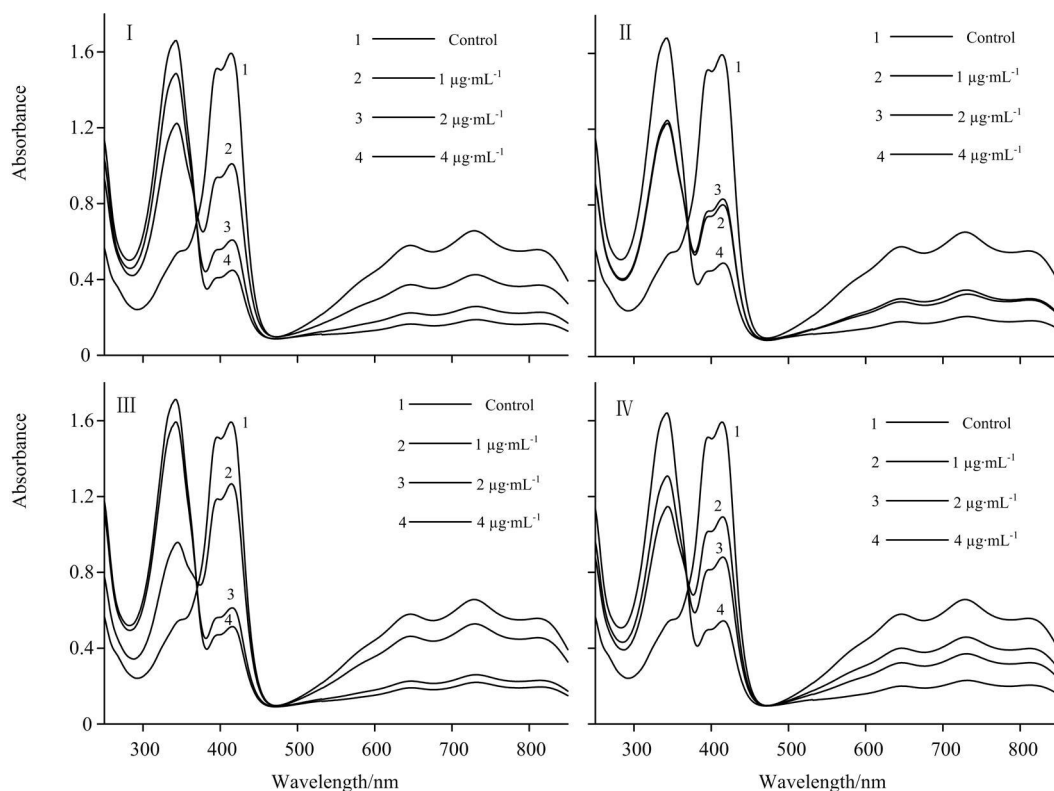


Fig 2 Changes in absorbance spectra of ABTS with addition of aqueous extracts of Baiye(I , II) and Fenghuang(III, IV) Dangcong teas

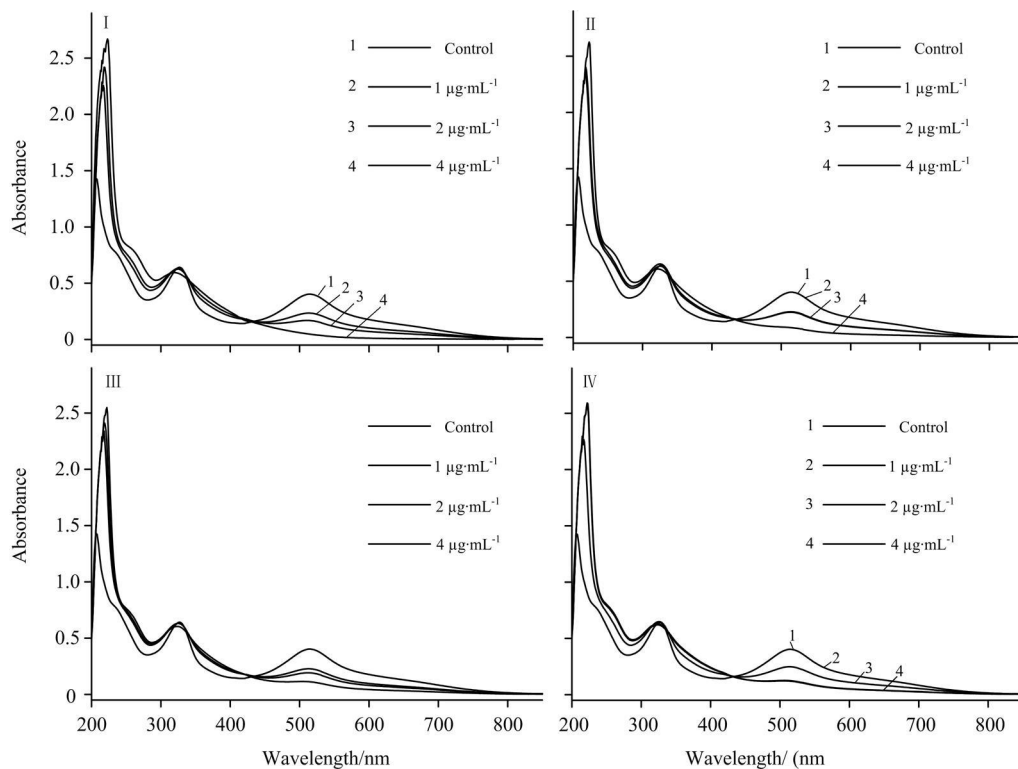


Fig 3 Changes in absorbance spectra of DPPH with addition of aqueous extracts of Baiye(I , II) and Fenghuang(III, IV) Dangcong teas

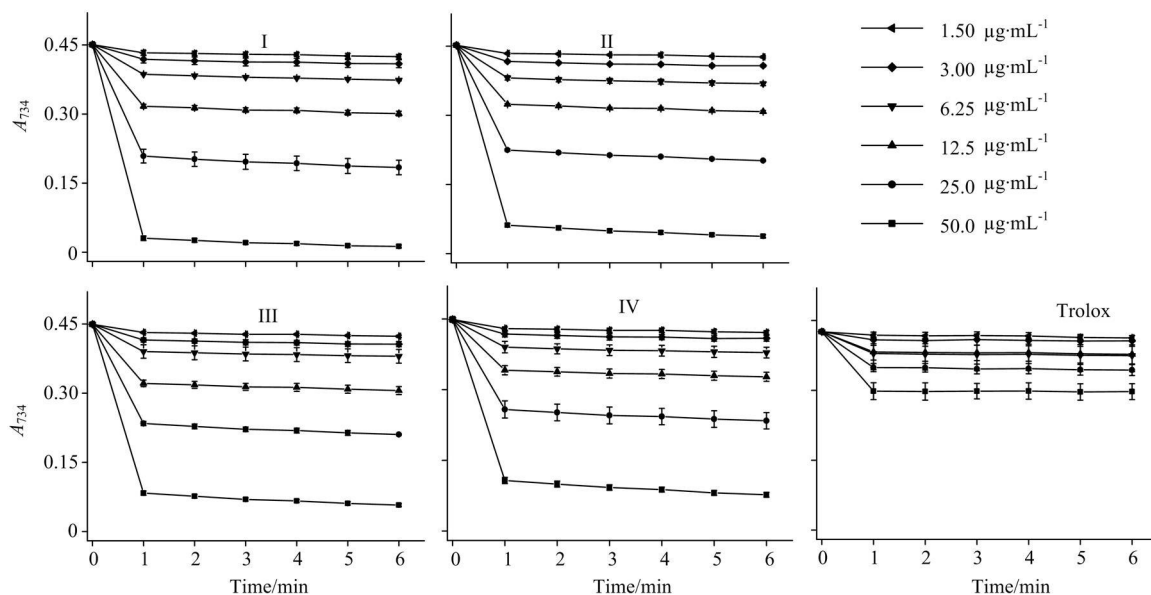


Fig 4 Changes in absorbance of ABTS (A_{734}) after addition of aqueous extracts of Baiye (I, II) and Fenghuang (III, IV) Dangcong teas and Trolox

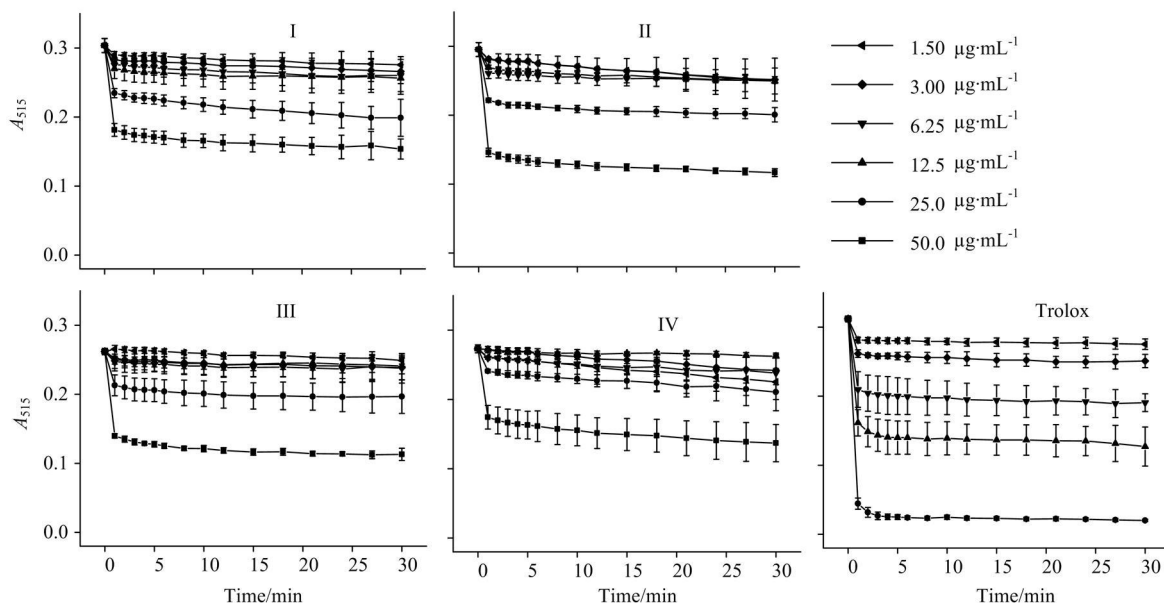


Fig 5 Changes in absorbance of DPPH (A_{515}) after addition of aqueous extracts of Baiye (I, II) and Fenghuang (III, IV) Dangcong teas and Trolox

到稳定状态, 说明对于不同的抗氧化剂, 6 min 这个时间点适用于进一步的剂量效应的研究。对于 DPPH 体系, 如图 5 所示, 在 $60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DPPH 甲醇溶液中分别加入 4 种单丛茶水提取物样品(终质量浓度为 $1.50, 3.00, 6.25, 12.5, 25.0$ 和 $50.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和 Trolox (终质量浓度为 $1.50, 3.00, 6.25, 12.5, 25.0$ 和 $50.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 后, 体系的特征吸收峰 A_{515} 在 5 min 内显著下降, 在 5 min 后, 体系基本趋于平衡, 至 30 min 时, A_{515} 达到稳定状态, 说明对于不同的抗氧化剂, 30 min 是一个合适的、稳定的反应时间点, 可用于进一

步的剂量效应研究。

2.3 抗氧化剂清除 ABTS 和 DPPH 自由基的剂量效应及其对比评价

根据以上选定的测定波长和反应时间, 测定一系列浓度(倍比稀释)的单丛茶样品和 Trolox 对 ABTS 和 DPPH 自由基的清除率, 计算相应的抗氧化剂的 IC_{50} 值, 并对其抗氧化活性进行对比评价。对于 ABTS(图 6) 和 DPPH(图 7) 反应体系, 在 $0 \sim 50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的质量浓度范围, 单丛茶水提取物和 Trolox 对自由基清除率有良好的线性关系, 据此可计算其

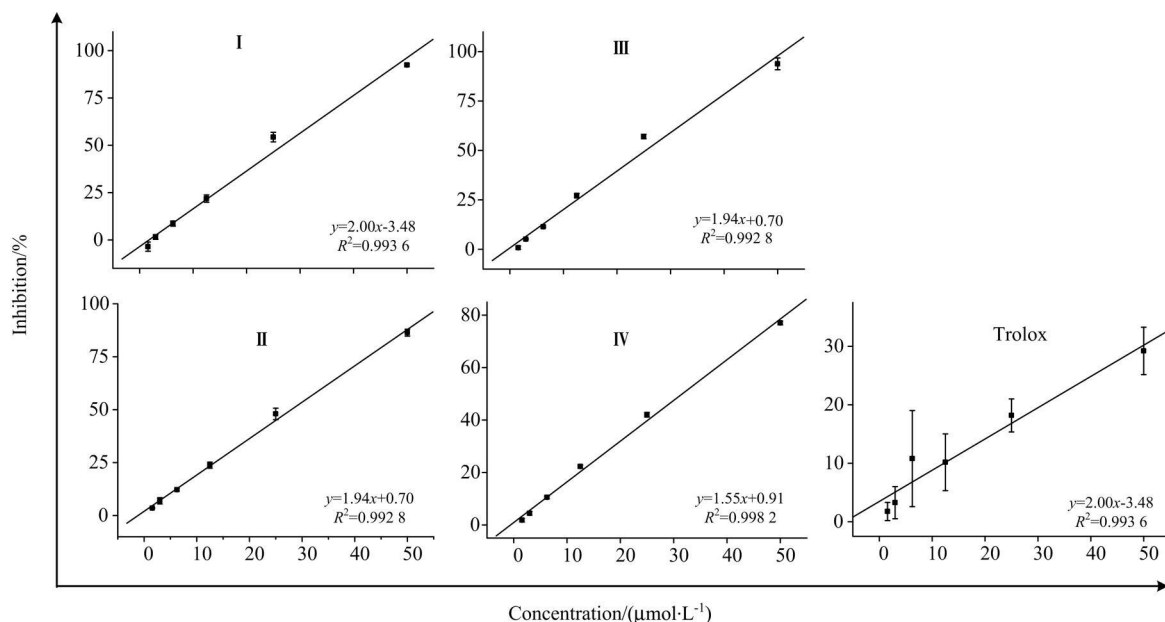


Fig 6 Dose dependent inhibitions of aqueous extracts of Baiye(I , II) and Fenghuang(III, IV) Dangcong teas and Trolox on ABTS free radicals and their linearity correlation

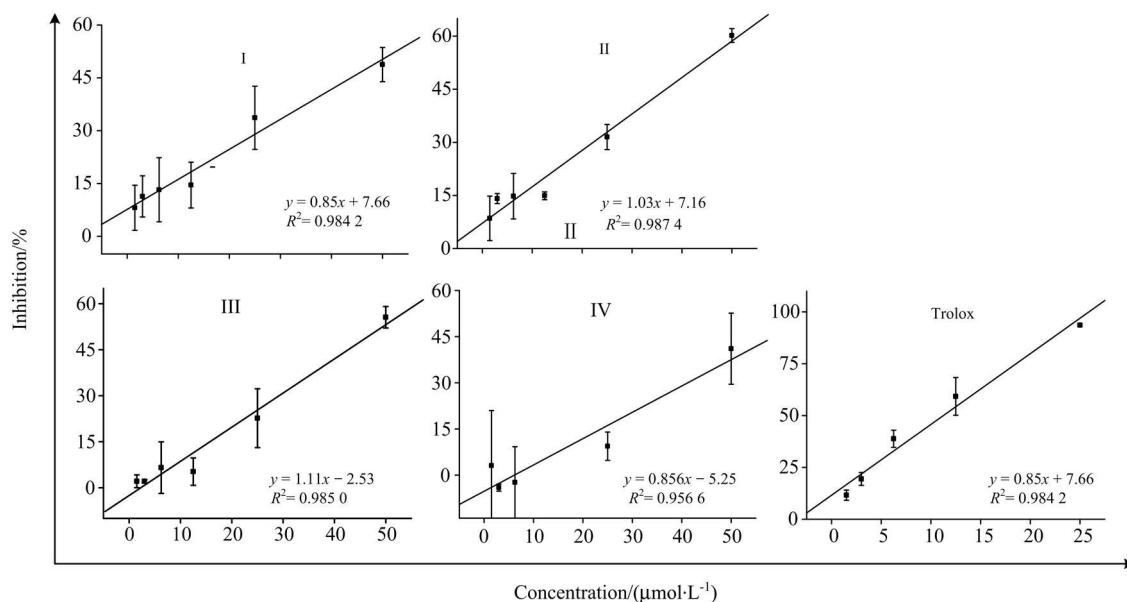


Fig 7 Dose dependent inhibitions of aqueous extracts of Baiye(I , II) and Fenghuang(III, IV) Dangcong teas and Trolox on DPPH free radicals and their linearity correlation

IC_{50} 值。

如图 8 所示, 在 ABTS 自由基清除实验中, 白叶单丛茶 (I , II)、凤凰单丛茶 (III, IV) 和标准抗氧化剂 Trolox (作为阳性对照) 的 IC_{50} 值分别为 (26.9 ± 0.6), (25.5 ± 3.0), (28.0 ± 1.6), (31.7 ± 0.7) 及 (85.2 ± 4.1) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 此结果说明单丛茶水提取物具有良好的总抗氧化活性。对于 DPPH 自由基, 4 种单丛茶样品和 Trolox 的 IC_{50} 值分别为 (49.8 ± 4.9), (41.6 ± 1.9), (47.3 ± 3.5), (64.5 ± 0.7) 和 (11.8 ± 0.6) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 此结果说明单丛茶水提取物对脂溶性自由基也具有较好的清除作用。

综合以上结果可以发现: 单丛茶水提取物均具有良好的抗氧化活性, 其中, 对 ABTS 自由基的抑制率明显高于标准抗氧化剂 Trolox, 对 DPPH 自由基的抑制率则低于 Trolox。表明单丛茶水提取物对水溶性自由基 (ABTS) 的抑制率明显高于脂溶性自由基 (DPPH)。

3 结 论

本实验研究了白叶和凤凰 2 种单丛茶水提取物清除 DPPH 和 ABTS 自由基的能力及其光谱学特征。结果表明, 采

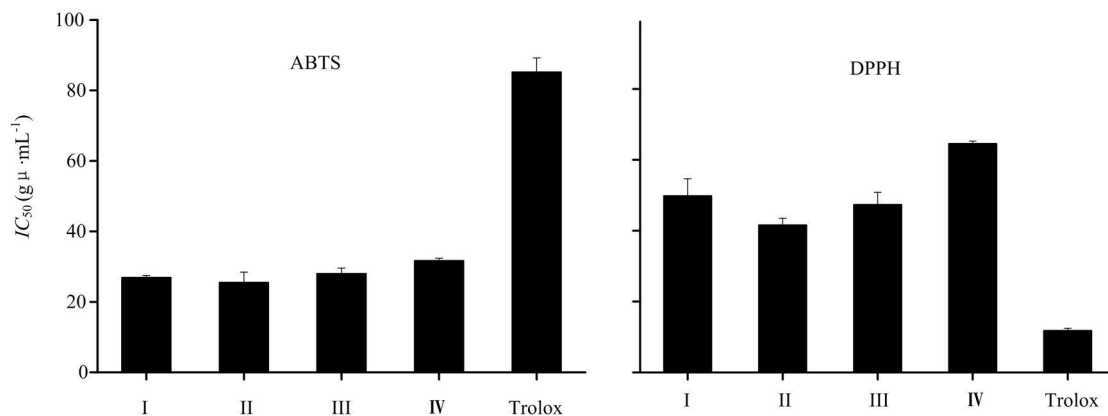


Fig 8 IC_{50} values of aqueous extracts of Baiye (I, II) and Fenghuang (III, IV) Dangcong teas and Trolox determined by ABTS and DPPH assays

用分光光度法测定单丛茶水提取物清除 ABTS 自由基的测定波长为 734 nm, 体系稳定时间为 6 min; 清除 DPPH 自由基的测定波长为 515 nm, 体系稳定时间为 30 min。单丛茶水提取物具有良好的抗氧化活性, 能有效、快速的抑制溶液中 DPPH 和 ABTS 自由基的形成及其特征吸收峰。在选定的反应体系中, 白叶单丛茶 (I, II)、凤凰单丛茶 (III, IV) 和标准抗氧化剂 Trolox 对 ABTS 自由基的半数抑制浓度 (IC_{50}) 分

别为 26.9, 25.5, 28.0, 31.7 和 84.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 说明单丛茶水提取物的总抗氧化活性明显优于 Trolox。对于 DPPH 自由基, 4 种单丛茶的 IC_{50} 值分别为 49.8, 41.6, 47.3 和 64.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。本实验的结果显示, 单丛茶水提取物具有优良的抗氧化活性, 且对水溶性自由基的抑制率明显高于脂溶性自由基, 作为功能食品具有广阔的开发和应用前景。

参 考 文 献

- [1] Weisburger J H. Food Chem. Toxicol., 1999, 37: 943.
- [2] Yang C S, Maliakal P, Meng X F. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 2002, 42: 25.
- [3] Gardner E J, Ruxton C H, Leeds A R. Eur. J. Clin. Nutr., 2007, 61: 3.
- [4] Lin Y L, Juan I M, Chen Y C, et al. J. Agric. Food Chem., 1996, 44(6): 1387.
- [5] Shyu Y S, Lin J T, Chang Y T, et al. Food Chem., 2009, 115: 515.
- [6] Sharma O P, Bhat T K. Food Chem., 2009, 113: 1202.
- [7] Marghitas L A, Oltica G S, Daniel S D, et al. Food Chem., 2009, 115: 878.
- [8] Chen T F, Wong Y S. J. Agric. Food Chem., 2008, 56: 4352.
- [9] Miller N J, Sampson J, Candeias L P, et al. FEBS Lett., 1996, 384: 240.
- [10] De Beer D, Joubert E, Gelderblom W C, et al. J. Agric. Food Chem., 2003, 51(4): 902.

Spectrometric Investigation of the Antioxidant Activities of Dangcong Tea Aqueous Extracts against DPPH and ABTS Free Radicals

ZHENG Shair yuan¹, CHEN Tiarr feng^{2, 3*}, ZHENG Wen jie², WONG Yunr shing^{3*}

1. School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510632, China

2. Department of Chemistry, Jinan University, Guangzhou 510632, China

3. State Key Laboratory of Agrobiotechnology, Department of Biology, the Chinese University of Hong Kong, Hong Kong, China

Abstract The antioxidant activities of Dangcong tea aqueous extracts against DPPH and ABTS free radicals were evaluated using spectrometric methods. The results show that Dangcong tea aqueous extracts could effectively and rapidly inhibited the formation of ABTS and DPPH free radicals in a dose- and time-dependent manner, indicating the potent antioxidant activities of Dangcong tea aqueous extracts under both hydrophilic and hydrophobic conditions. In the optimized systems, the IC_{50} values of Baiye (I, II) and Fenghuang (III, IV) Dangcong teas against ABTS free radical were 26.9, 25.5, 28.0 and 31.7 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

respectively, which were significantly lower than that of Trolox, the positive control ($85.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), indicating the higher antioxidant activities of Dangcong teas. For DPPH free radical, the IC_{50} values for the Dangcong teas (I - IV) were 49.8, 41.6, 47.3 and $64.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. Taken together, our results suggest the potential applications of Dangcong tea as functional food.

Keywords Dangcong tea; Aqueous extracts; Antioxidant activity; ABTS; DPPH

(Received Dec. 8, 2009; accepted Mar. 12, 2010)

* Corresponding author