

# 枫香树叶黑色素粗产品 清除 DPPH 自由基活性研究

谢宇奇,莫春风,奚文权

(百色学院 化学与环境工程学院,广西 百色 533000)

**摘要:**为开发利用枫香树叶资源,探讨枫香树叶黑色素清除 DPPH 自由基活性的能力,浸渍提取黑色素,经 AB-8 大孔树脂初步纯化后得到枫香树叶黑色素粗产品。通过 DPPH 清除率曲线和计算  $IC_{50}$ ,评价枫香树叶黑色素、抗坏血酸、焦性没食子酸、叔丁基对苯二酚(TBHQ)、2,6-二叔丁基对甲酚等物质的抗氧化能力。结果表明:通过该方法制取的枫香树叶黑色素粗产品的  $IC_{50}$  值为 3.41,单位质量抗氧化剂清除 DPPH 自由基能力次序为焦性没食子酸 > TBHQ > 抗坏血酸 > 枫香树叶黑色素粗产品 > BHT。枫香树叶黑色素具有一定的清除 DPPH 自由基活性,作为天然色素,其在食品、药品、化妆品等领域的应用前景广阔。

**关键词:**枫香树叶;黑色素;清除 DPPH 能力

**中图分类号:**R 284.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1007-7561(2016)05-0083-04

## Study on the scavenging DPPH free radical activity of melanin in crude product of Chinese sweet gum leaves

XIE Yu - qi, MO Chun - feng, XI Wen - quan

(College of Chemical and Environmental Engineering, Baise University, Baise Guangxi 533000)

**Abstract:**The ability of melanin in Chinese sweet gum leaves for scavenging DPPH free radical activity was discussed in order to utilize the resource of Chinese sweet gum leaves. The melanin was extracted by immersion extraction; the crude product of melanin in the leaves was purified with AB-8 macroporous resin. The antioxidant ability of the melanin in the leaves, ascorbic acid (Vc), pyrogalllic acid, tert-butyl hydroquinone (TBHQ) and 2,6 Di tert-butyl and other substances was evaluated. The results showed that  $IC_{50}$  value of the melanin crude product prepared by the method was 3.41, the order of scavenging DPPH free radical ability of unit mass of antioxidant was pyrogalllic acid > TBHQ > ascorbic acid > Chinese sweet gum leaves melanin crude product > BHT. Chinese sweet gum leaves melanin has a certain ability of scavenging DPPH free radical activity, which, as a natural pigment, has broad application prospect in the field of food, medicine, cosmetics and so on.

**Key words:**Chinese sweet gum leaves; melanin; DPPH scavenging ability

人体正常的新陈代谢过程中会产生羟基自由基等具有氧化活性的物质,自由基攻击生命大分子造成的损伤可能是引起机体衰老的原因,也与癌症等疾病的诱发机制有关<sup>[1]</sup>。BHA、TBHQ、BHT 等人工合成抗氧化剂已经被广泛运用于医药和食品工业,但存在安全隐患,欧美和日本等发达经济体已禁用某些种类的人工合成抗氧化剂。寻找、筛选具有阻

断或抑制自由基形成的天然抗氧化剂的研究越来越受到人们的关注。黑色素是广泛存在于动植物和微生物界的保护性色素,具有抗病毒、抗辐射和提高免疫力等多种功效<sup>[2-4]</sup>,不仅可以作为食用色素,而且具有一定的清除自由基的能力。

枫香树(Liquidambar formosana Hance)又名枫树,全棵都可入药,具有祛风湿、行气、解毒等功效<sup>[5]</sup>,常用于治疗疮疖肿痛及外伤出血等症<sup>[6-8]</sup>。我国广西、广东、海南等南方各省的野生枫树资源丰富,极具开发价值<sup>[9]</sup>。广西壮族有在农历“三月三”

收稿日期:2015-09-19

基金项目:广西高校科学技术研究项目(LX2014441)

作者简介:谢宇奇,1979年出生,男,高级实验师。

用枫香树叶、紫兰草、姜黄等天然植物的叶茎染制呈现“红、黄、紫、黑、白”等颜色的“五色糯米饭”的传统,这些天然色素的安全性久经历史检验。其中,黑色糯米饭一般由富含黑色素的枫香树叶染制:先用从枫香树叶中熬煮出的黑色汁液浸泡糯米,然后高温蒸熟,具有色泽黑亮,气味清香怡人的染色效果。虽然枫香树叶黑色素已经接受广西、海南等省少数民族群众长期食用检验,具备高安全性、食药两用、食品染色效果突出的优点,但开发利用的程度很低,仅局限于观赏和染制糯米饭,偶尔作为民间中草药。探究枫香树叶黑色素的生化特性,对促进其在药品、功能性食品和化妆品等领域的应用,具有现实意义。

目前,国内已对黑木耳<sup>[10]</sup>、山杏种皮黑色素<sup>[11]</sup>、木耳黑色素<sup>[12]</sup>、黑灵芝<sup>[13]</sup>等部分天然植物源黑色素的抗氧化活性进行了研究,但目前对枫香树叶黑色素的研究成果较少,主要集中在提取工艺方面<sup>[14-15]</sup>,抗氧化活性的研究成果鲜见报道。本实验采用体外化学评价法,通过 DPPH 检测法测定枫香树叶黑色素清除自由基的能力,探究枫香树叶黑色素的抗氧化活性,为枫香树叶黑色素在食品、药品、化妆品等行业的开发利用,提供参考数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂和仪器

#### 1.1.1 实验材料

枫香树叶采自广西百色市右江区永乐乡,洗净沥干水分,在干燥箱中 45℃ 干燥后,用粉碎机粉碎,过 40 目筛,置于棕色瓶中,密封避光保存,备用。

#### 1.1.2 实验试剂

DPPH:生化试剂,  $C_{18}H_{12}N_5O_6$ , 日本进口原装 TCI。准确称取 DPPH 试剂 0.252 6g,用 95% 乙醇配制成质量浓度为 252.6 mg/L 的 DPPH 贮备液,置于冰箱中冷藏备用。

AB-8 大孔树脂:沧州宝恩吸附材料科技有限公司;叔丁基对苯二酚、2,6-二叔丁基对甲酚、焦性没食子酸(AR):国药集团化学试剂有限公司;抗坏血酸(AR):天津市光复精细化工研究所;95% 乙醇、无水乙醇均为国产分析纯。实验用水均为一次蒸馏水。

#### 1.1.3 主要仪器

UV-2700 型紫外可见分光光度计:日本岛津公司;721 型可见分光光度计:上海菁华科技仪器有

限公司;BSA224S 电子天平:赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;LD-100 手提式实验室粉碎机:长沙市长宏制药机械设备厂;PHS-3C 数字式酸度计:金坛市金分仪器有限公司;HH-S2 型数显恒温水浴锅:金坛市医疗仪器厂。

### 1.2 枫香树叶黑色素的制备

称取 100.0 g 枫香树叶粉末,加入 1 000 mL (pH < 3) 的水,恒温 60℃ 水浴浸渍提取 2 h 后抽虑。滤液置于烘箱中恒温 60℃ 干燥,经 AB-8 大孔树脂对黑色素粗品进行初步纯化后干燥,得到固态枫香树叶黑色素粗产品。

### 1.3 DPPH 紫外吸收光谱与测定波长的确定

分别在四个 10 mL 棕色容量瓶中依次加入 100  $\mu$ L 浓度均为  $2 \times 10^{-4}$  mol/L 的抗坏血酸、叔丁基对苯二酚、焦性没食子酸、2,6-二叔丁基对甲酚,然后用 DPPH 溶液定容至刻度。以 95% 乙醇作参比,在 200~800 nm 波长范围内进行扫描。

### 1.4 反应时间的确定

准备两个 10 mL 棕色容量瓶,第一个加入 100  $\mu$ L 稀释了 25 倍的枫香树叶黑色素溶液,用浓度为 45.47 mg/L 的 DPPH 溶液定容至刻度;第二个加入 100  $\mu$ L 稀释了 25 倍的枫香树叶黑色素溶液,用稀释了 1.25 倍的 DPPH 溶液定容至刻度。分别根据一定的时间间隔连续测定其吸光度。

### 1.5 DPPH 溶液吸光度与浓度关系的测定

以 95% 乙醇为稀释剂,制备不同浓度 DPPH 溶液,测吸光值 A。以吸光值 A 对 DPPH 浓度 C 作图。

### 1.6 清除 DPPH 自由基能力的测定<sup>[16]</sup>

向 10 mL 棕色容量瓶依次加入 5.0 mL 浓度为 45.47 mg/L 的 DPPH 溶液和 1.0 mL 95% 乙醇,总体积为 6.0 mL,混匀后,用 1 cm 比色皿在 517 nm 波长处测吸光值 A,记为  $A_0$ ;加入 5.0 mL 95% 乙醇和 1.0 mL 黑色素样液,测定值记为  $A_r$ ;加入 5.0 mL 浓度为 45.47 mg/L 的 DPPH 溶液和 1.0 mL 黑色素样液,测定值记为  $A_s$ 。按式(1)计算自由基清除率(Y):

$$Y = 1 - (A_s - A_r) / A_0 \times 100\% \quad (1)$$

将枫香树叶黑色素粗产品配制成系列浓度的溶液,测各溶液的 DPPH 自由基清除率。绘制 DPPH 自由基清除率对枫香树叶黑色素粗产品的溶液浓度曲线。计算清除率为 50% 时,所需枫香树叶黑色素粗产品的溶液浓度( $IC_{50}$ ),计算出枫香树叶黑色素粗产品溶液的溶质质量。按式(2)计算  $IC_{50}$  值:

$IC_{50} = 50\% \times \text{加入的 DPPH 质量} / \text{加入的试样溶液中溶质质量}$  (2)

### 1.7 枫香树叶黑色素与几种抗氧化剂清除 DPPH 自由基能力的比较

配制抗坏血酸、叔丁基对苯二酚、焦性没食子酸、2,6-二叔丁基对甲酚标准溶液,稀释成系列浓度的溶液,分别按照 1.6 方法测定,计算抗氧化剂对 DPPH 的清除率。以清除率对各抗氧化剂浓度作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 DPPH 紫外吸收光谱与测定波长的确定

由图 1 可知,DPPH 溶液在波长为 327 nm 和 517 nm 处的吸光度均有峰值,加入抗坏血酸、叔丁基对苯二酚、焦性没食子酸、2,6-二叔丁基对甲酚后这两个峰值都有所降低,但在 517 nm 处的峰值降低较明显,因此用 517 nm 处的峰值变化来表示 DPPH 含量的变化可以提高测定的灵敏度。

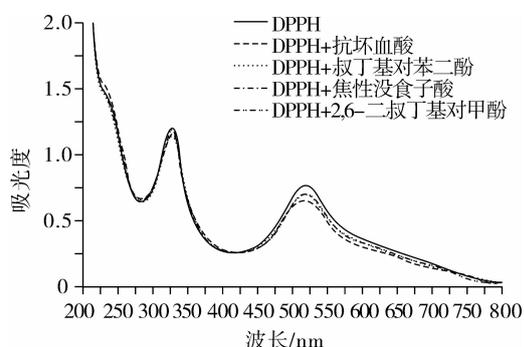


图 1 DPPH 紫外吸收光谱图

### 2.2 反应时间的确定

如图 2 所示,添加枫香树叶黑色素粗产品后,DPPH 溶液的吸光度随时间变化而变化,吸光度在 13 min 内下降最快,在 13 ~ 23 min 内,反应体系的吸光度变化缓慢。30 min 后基本保持不变。因此选择 DPPH 与枫香树叶黑色素粗产品溶液反应的时间为 30 min。

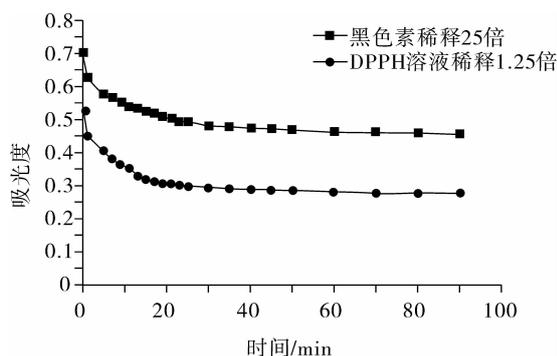


图 2 DPPH 吸光度变化曲线

### 2.3 DPPH 溶液吸光度与浓度关系的测定

如图 3 所示,在 0 ~ 84.2 mg/L 浓度范围内,DPPH 溶液吸光度随着浓度的提高而增大,且具有良好的线性关系,线性方程为  $A = 0.02C + 0.025$ ,  $R^2 = 0.9986$ 。

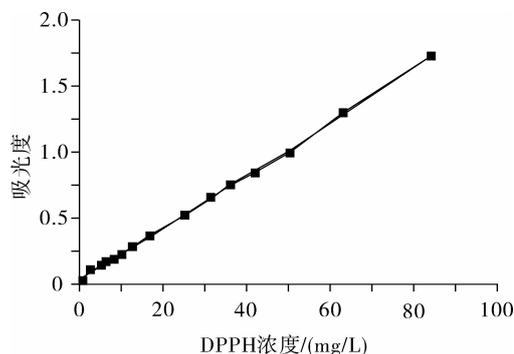


图 3 DPPH 吸光度与浓度的关系

### 2.4 枫香树叶黑色素清除 DPPH 自由基能力测定

在一定的浓度范围内,枫香树叶黑色素对 DPPH 自由基的清除率随黑色素浓度的提高而升高,当清除率达到最大值时,继续增大黑色素浓度,清除率无明显变化。DPPH 自由基是一种以氮为中心,较为稳定的自由基,由图 4 可知,枫香树叶黑色素对 DPPH 自由基具有清除能力。这说明枫香树叶黑色素粗产品具备降低羟基自由基、烷基自由基或过氧化自由基有效浓度的能力。

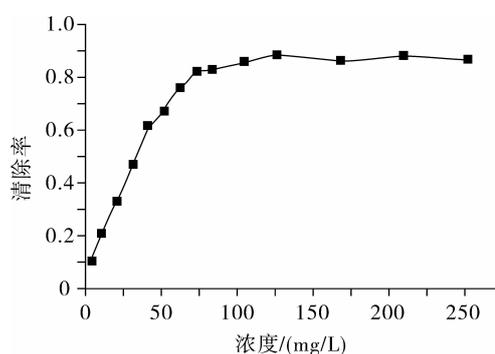


图 4 清除 DPPH 自由基能力的测定

### 2.5 枫香树叶黑色素与几种抗氧化剂清除 DPPH 自由基能力的比较

由图 5 可知,各抗氧化剂对 DPPH 自由基的清除率与其浓度均呈先升高后趋于平缓的关系。抗氧化剂在较低浓度范围时,随着浓度的提高清除率迅速上升且两者具有良好的线性关系。清除率在抗氧化剂浓度达到一定浓度后,均可达到极大值。

各抗氧化剂浓度  $C$  与清除率  $Y$  之间的线性方程。枫香树叶黑色素: $Y = 0.0134C + 0.0535$ ,  $R^2 =$

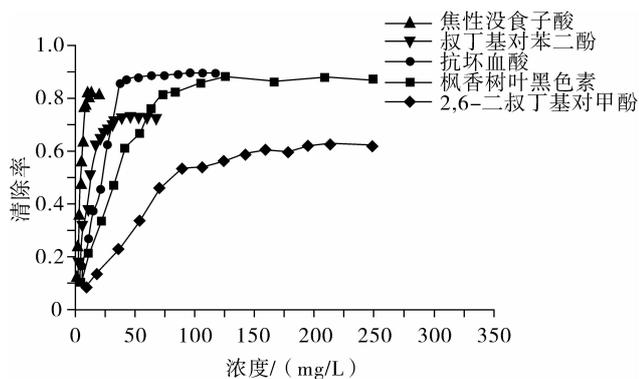


图5 几种抗氧化剂的DPPH清除率曲线

0.998 3, 线性范围: 枫香树叶黑色素浓度 4.19 ~ 41.90 mg/L。抗坏血酸:  $Y = 0.0216C + 0.032$ ,  $R^2 = 0.9936$ , 线性范围: 抗坏血酸浓度 5.34 ~ 37.38 mg/L。焦性没食子酸:  $Y = 0.1043C + 0.0276$ ,  $R^2 = 0.9936$ , 线性范围: 焦性没食子酸浓度 1.12 ~ 7.08 mg/L。TBHQ:  $Y = 0.0337C + 0.068$ ,  $R^2 = 0.9907$ , 线性范围: TBHQ 浓度 3.33 ~ 16.63 mg/L。BHT:  $Y = 0.0058C + 0.0303$ ,  $R^2 = 0.9957$ , 线性范围: BHT 浓度 8.89 ~ 88.98 mg/L。按 1.6 公式(2)计算可得枫香树叶黑色素、抗坏血酸、焦性没食子酸、TBHQ、BHT 的  $IC_{50}$  分别为 3.41、5.25、25.09、8.87、1.40。由  $IC_{50}$  值可知, 单位质量抗氧化剂清除 DPPH 自由基能力次序为: 焦性没食子酸 > TBHQ > 抗坏血酸 > 枫香树叶黑色素粗产品 > BHT。由于枫香树黑色素粗产品可能还含有多糖、黄酮类、微量元素等其他物质, 而黄酮类等物质也具有清除 DPPH 自由基的能力<sup>[17]</sup>, 均可对  $IC_{50}$  值产生影响, 具体组分的贡献度有待进一步研究。

### 3 结论

枫香树叶黑色素粗产品具备一定的清除 DPPH 自由基的能力。DPPH 分光光度检测法测定枫香树叶黑色素的适宜条件为: 波长 517 nm, 反应时间 30 min。枫香树叶黑色素粗产品、抗坏血酸、焦性没食子酸、TBHQ、BHT 的  $IC_{50}$  分别为 3.41、5.25、25.09、8.87、1.40。单位质量抗氧化剂清除 DPPH 自由基能力次序为: 焦性没食子酸 > TBHQ > 抗坏血酸 > 枫

香树叶黑色素粗产品 > BHT。

### 参考文献:

[1] MOSKOVITZ J, YIM M B, CHOCK P B. Free radicals and disease [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2002, 397:354 - 359.

[2] BROWN D A. Skin pigmentation enhancers[J]. J Photochem Photobiol B, 2001. 63(1 - 3):148 - 161.

[3] HILL H Z. The function of melanin or six blind people examine an elephant[J]. Bioessays, 1992, 14(1):49 - 56.

[4] EL - OBEID A, AL - HARBI S, AL - JOMAH N, et al. Herbal melanin modulates tumor necrosis factor alpha (TNF - alpha), interleukin 6 (IL - 6) and vascular endothelial growth factor (VEGF) production[J]. Phytomedicine, 2006, 13(5):324 - 333.

[5] 谢跃生, 郑小军, 郑丽蓉. 枫香树叶中某些水溶性微量元素的分析[J]. 广西师院学报(自然科学版), 2000, 17(3):5 - 7.

[6] 中国医学科学院陕西分院中医研究所. 陕西中药志: 第一卷 [M]. 西安: 陕西人民出版社, 1962.

[7] 贾敏如, 李星炜. 中国民族药志要 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2005.

[8] 国家药典委员会. 中国药典: 一部 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.

[9] 翁琳琳, 蒋家淡, 张鼎华, 等. 乡土树种枫香的研究现状与发展前景[J]. 福建林业科技, 2007, 34(2):184 - 189.

[10] 张莲姬. 黑木耳黑色素抗氧化作用的研究[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(5):111 - 114.

[11] 姚增玉, 李科友, 赵忠, 等. 山杏种皮黑色素的抗氧化活性 [J]. 林业科学, 2013, 43(10):59 - 63.

[12] 吴晨霞, 陈萍, 金晖, 等. 木耳黑色素的提取及其抗氧化研究 [J]. 食用菌, 2013(4):73 - 75.

[13] 陈奕, 谢明勇, 弓晓峰. 黑灵芝提取物清除 DPPH 自由基的作用 [J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18:917 - 921.

[14] 陈祖洪. 从枫香树叶中提取黑色素的探索 [J]. 林产化工通讯, 1998(1):20 - 21.

[15] 辜燕飞, 黄澜, 何猛雄, 等. 海南枫香传统食用黑色素的初步研究[J]. 食品工业科技, 2007, 28(8):86 - 87.

[16] 陈丛瑾, 黄克瀛, 孙崇鲁. 白英果提取物清除 DPPH 自由基活性研究 [J]. 食品研究与开发, 2006, 27(10):45 - 48.

[17] 李娇娟, 周尽花, 戴瑜, 等. 川桂叶总黄酮清除 DPPH 自由基作用的研究 [J]. 中南林业科技大学学报, 2010, 30(10):125 - 128. 完