

回归方程: $Y = 1.440 \times 10^4 X - 6.944$, $r = 0.9999$ 表明咖啡因浓度在 $0.053 \sim 1.057 \text{ mg/mL}$ 范围内呈良好的线形关系。

3.5 精密度试验: 分别精密吸取咖啡因对照品溶液 $5 \mu\text{L}$, 连续重复进样 9 次, 测定 RSD 为 0.12% , 表明精密度良好。

3.6 重现性试验: 取同一批号样品 (20000716), 按样品测定方法进行 5 次平行测定, RSD 为 1.01% , 表明重现性良好。

3.7 回收率试验: 取同一批号样品 (20000716), 采用加样回收试验, 精密称取样品 5 份, 各 0.2 g , 分别加入 4.038 mg 咖啡因, 按样品测定方法进行测定, 计算回收率, 结果平均回收率为 99.3% , RSD 为 0.3% ($n = 5$)。

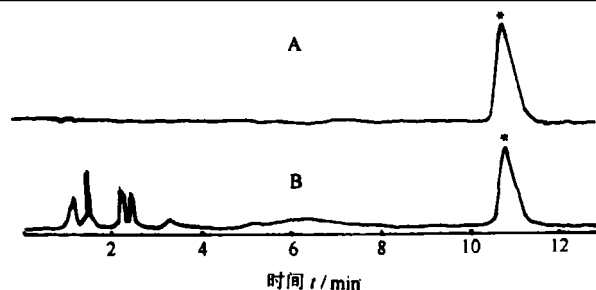
3.8 样品测定: 取本品 5 袋内容物, 混匀, 取约 0.2 g , 研细, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加 50% 甲醇溶液 20 mL , 称定重量, 浸泡 24 h , 超声处理 30 min , 放冷, 用 50% 甲醇溶液补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。按上述色谱条件测定, 结果见表 1 和图 2-B。

参考文献:

[1] 李志成, 左春旭, 杨尚军, 等. 荷叶化学成分的研究 [J]. 中草

表 1 3 批样品测定结果 ($n = 3$)

批 号	咖啡因含量 (mg/袋)	$RSD(\%)$
20000715	66.90	1.1
20000716	61.64	0.9
20000717	58.49	1.3



A 对照品 B 供试品 * 咖啡因

图 2 HPLC 图谱

药, 1996, 27(增刊): 50-52

- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海人民出版社, 1977.
- [3] 肖崇厚. 中药化学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1988.
- [4] 岑路, 何志强. 程序升温色谱法同时测定痰咳净中冰片和咖啡因 [J]. 中成药, 1989, 11(10): 8-10.
- [5] 王勇, 冯国康, 唐根源, 等. 高效液相色谱法测定利康胃胶囊中扑尔敏、扑热息痛、DL-盐酸甲基麻黄碱和咖啡因的含量 [J]. 色谱, 1996, 14(4): 288-290.
- [6] 何明三, 汪经环, 雷永军, 等. 高效液相色谱法测定痰咳净中咖啡因的含量 [J]. 中国医院药学杂志, 1994, 14(9): 391-393.

核桃清除活性氧自由基的研究

胡博路, 杭 珣*

(青岛大学 化学系, 山东 青岛 266071)

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2002)03-0227-02

随着自由基生物学与自由基医学的迅速发展, 现已证明许多疾病的发生、发展与自由基对组织的损伤有密切关系, 体内过多的自由基会引发脂质过氧化链式反应, 造成细胞膜损伤, 导致各种细胞功能的改变, 诱发衰老和多种疾病的发生^[1-3]。

核桃仁是非常受人们喜爱的营养食品, 具有补肾固精, 敛肺定喘, 镇咳, 补脑, 延缓衰老等作用; 核桃叶具有较好的杀灭钩端螺旋体的作用, 常用于解毒、消肿; 而核桃壳则多被弃置。本研究用化学发光法对核桃仁、核桃叶、核桃壳清除活性氧自由基进行了研究, 希望能对它们的营养、药用价值及进一步开

发利用提供科学依据。

1 材料

1.1 主要仪器: OX-7 型化学发光分析仪 (日本), UV-754 型分光光度计 (上海第三分析仪器厂)。

1.2 实验材料: 核桃取自山东临沂, 鲁米诺溶液为德国 Merck-Schuchardt 公司产品, 试剂均为分析纯, 试剂配制均使用高纯度的去离子水。

2 实验方法

2.1 核桃仁、核桃叶、核桃壳活性成分的提取: 分别称取 20 g 粉碎后的核桃仁、核桃叶、核桃壳, 加入 100 mL 石油醚于 25°C 振荡浸泡 6 h , 过滤, 滤渣再

* 收稿日期: 2001-07-03

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目 (Y98D02050)

重复浸泡 2 次,石油醚挥干后将滤渣称重,得产率分别为 32.0%、91.7% 及 97.2%。称取经石油醚处理后的核桃仁、核桃叶、核桃壳各 5 g,分别加入 50 mL 水,40℃ 恒温振荡提取 6 h,过滤。滤渣再加等量溶剂同法提取一次,合并滤液,然后一分为二。其中一份减压浓缩至浸膏,于 40℃ 真空干燥,计算浸提率;另一份减压浓缩并定容,备用。

2.2 产生 $O_2^{\cdot-}$ 的化学发光体系:参照文献^[4],用化学发光法测定样品对碱性连苯三酚体系(非酶体系)产生的 $O_2^{\cdot-}$ 的清除作用。在测定管中加入 5 mmol/L 鲁米诺溶液 800 μ L(用 pH=10.16, 0.1 mol/L Na_2CO_3 - $NaHCO_3$ 缓冲溶液配制),加入不同量的供试液,用去离子水做空白对照,混匀后,加入 6 mmol/L 连苯三酚溶液 100 μ L(用 10 mmol/L HCl 配制),迅速置于发光仪测定室中,启动反应,测定 5 s 内发光强度值,每个样品平行做 3 次,取平均值,按下式计算样品的清除率。

$$\text{清除率}(\%) = \frac{\text{空白对照值} - \text{样品值}}{\text{空白对照值}} \times 100\%$$

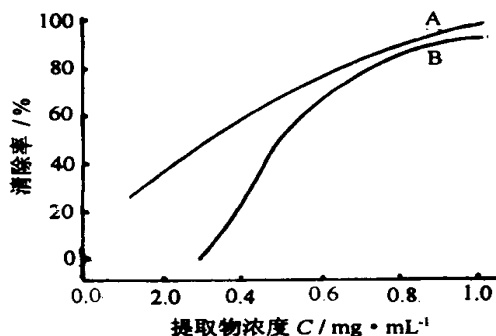
2.3 产生 $OH^{\cdot}$ 的化学发光体系:按文献^[5]采用抗坏血酸-CuSO₄-酵母-H₂O₂ 产生的发光体系。1.8 mmol/L 抗坏血酸 0.2 mL, 1.8 mmol/L CuSO₄ 溶液 0.4 mL, 75 mg/mL 酵母溶液 0.2 mL(以上溶液均用 50 mmol/L pH 6.2 的磷酸钠缓冲液配制), 0.6 mL 磷酸钠缓冲液,加入不同量的待测液,注入 60 mmol/L H₂O₂ 溶液 0.6 mL,快速混匀,启动发光反应,延迟 10 s 后,测出 15 s 的积分发光强度。

3 结果

3.1 对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除作用:实验表明,核桃壳对 $O_2^{\cdot-}$ 自由基无清除作用,由图 1 可见,核桃仁、核桃叶均能有效地清除 $O_2^{\cdot-}$ 自由基,当核桃仁、核桃叶浓度足够大时,对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除率均可达 90% 以上。其中,核桃叶的清除能力随溶液浓度的增大而急剧增强,相比之下,核桃仁的清除作用受浓度的影响较小,但在较低浓度时即表现出明显的清除作用。核桃仁清除 $O_2^{\cdot-}$ 的能力强于核桃叶,二者 IC₅₀(清除率达 50% 时提取物的浓度)分别为 0.37 和 0.45 mg/mL。

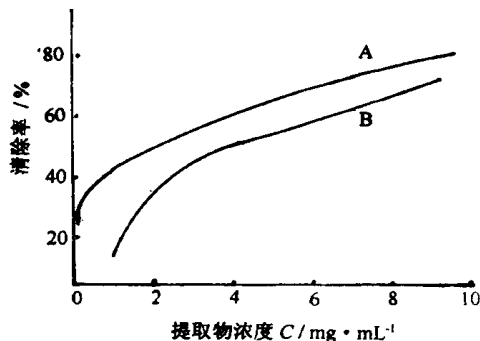
3.2 对 $OH^{\cdot}$ 的清除作用:核桃仁对 $OH^{\cdot}$ 自由基无清除作用,而核桃叶、核桃壳对 $OH^{\cdot}$ 有清除作用。由图 2 可见,核桃叶、核桃壳均能显著地清除 $OH^{\cdot}$ 自由基,并具有量效关系,核桃叶清除 $OH^{\cdot}$ 的能力强于核桃壳,其 IC₅₀ 分别为 1.96 和 3.70 mg/mL。

4 讨论



A-核桃仁 B-核桃叶

图 1 核桃仁、核桃叶对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除作用



A-核桃叶 B-核桃壳

图 2 核桃叶、核桃壳对 $OH^{\cdot}$ 的清除作用

$O_2^{\cdot-}$ 、 $OH^{\cdot}$ 是生物体内主要的活性氧自由基,由它所引发的体内脂质过氧化是人类疾病发生和衰老的重要原因。本实验表明,核桃叶能有效地清除 $O_2^{\cdot-}$ 及 $OH^{\cdot}$;核桃仁能清除 $O_2^{\cdot-}$ 但不能清除 $OH^{\cdot}$,其清除 $O_2^{\cdot-}$ 的能力强于核桃叶;核桃壳与核桃仁恰相反,可清除 $OH^{\cdot}$,但却不能清除 $O_2^{\cdot-}$,其清除 $OH^{\cdot}$ 的能力弱于核桃叶。核桃中含黄酮类及其苷、鞣质、没食子酸、Vit C 等,这些化合物往往是清除活性氧自由基的活性物质,至于这些成分中哪些与清除活性氧自由基相关尚需进一步深入研究。

本实验结果提示,多食用核桃仁有利于清除体内过多的氧自由基,从而起到强身益寿,养颜美容,延缓衰老的作用。鉴于核桃壳也具有清除自由基作用,这使我们可从中提取抗氧化物质,变废为宝,更充分、合理地利用资源。

参考文献:

- [1] 陈可冀.抗衰老中医学[M].北京:中医古籍出版社,1989.
- [2] 程伯基.氧化还原循环和超氧负离子的产生[J].生理科学,1989,9(4):14-17.
- [3] 莫简.医用自由基生物学导论[M].北京:人民卫生出版社,1989.
- [4] 龙盛京,覃爱娟,李毅.食用豆匀浆液抗活性氧研究[J].食品科学,1994,9:50-52.
- [5] 陈季武,胡天喜.测定 $OH^{\cdot}$ 产生与清除的化学发光体系[J].生物化学与生物物理进展,1992,19(2):136-140.