

• 研究论文 •

抗氧化剂的毛细管电泳-间接化学发光联用在线评价方法研究

郑国灿^a 陈 华^{a,b} 陈志涛^a 甘婷婷^b 冯 波^a 夏之宁^{*,a,b}

(^a 重庆大学化学化工学院 重庆 400044)

(^b 重庆大学生物工程学院 重庆 400044)

摘要 根据碱性条件下羟自由基与 luminol 反应会产生化学发光而抗氧化剂能够清除羟自由基从而抑制发光的原理, 结合毛细管电泳技术, 建立了一种针对多组分共存体系中抗氧化组分的在线评价的新方法. 对这种毛细管电泳-间接化学发光检测技术, 优化化学发光的各种条件, 考察了抗氧化剂硫脲和麻黄碱的抗氧化活性, 采用曲线拟合求出它们对羟自由基的半数清除浓度(IC₅₀), 得出抗氧化活性大小为麻黄碱>硫脲, 这与荧光分光光度法的结果一致. 该方法初步应用于评价中药槐米提取物化学组分的抗氧化活性.

关键词 毛细管电泳; 化学发光; 抗氧化剂; 评价; 在线

Study on the On-line Evaluation Method for Antioxidants by Capillary Electrophoresis with Indirect Chemiluminescence Detection

ZHENG, Guo-Can^a CHEN, Hua^{a,b} CHEN, Zhi-Tao^a GAN, Ting-Ting^b
FENG, Bo^a XIA, Zhi-Ning^{*,a,b}

(^a College of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University, Chongqing 400044)

(^b College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044)

Abstract A novel method of on-line evaluation of antioxidants by capillary electrophoresis (CE) with indirect chemiluminescence (CL) detection was reported. It is based on the CL of luminol suppressed for lessened hydroxy radical which is scavenged by antioxidants in base condition. Optimal chemiluminescence conditions were obtained, and the antioxidant activities of thiourea and ephedrine were evaluated. The IC₅₀ values of thiourea and ephedrine were obtained by fitting curves, and the order of antioxidant activity is ephedrine>thiourea. The result was consistent with that of fluorospectrophotometry. The proposed method was preliminarily applied to evaluating the antioxidant activity of components of *Sophora japonica* L.

Keywords capillary electrophoresis; chemiluminescence; antioxidant; evaluation; on-line

1956 年 Harman 提出了自由基衰老假说, 极大促进了自由基生物学与自由基医学的发展. 研究表明, 自由基与多种疾病的产生与发展存在密切的关系^[1]. 而抗氧化剂能够有效地清除自由基, 从而阻断或预防疾病的产生. 随着自由基研究的不断深入, 针对抗氧化剂评价与抗氧化活性物质的筛选的研究也日益受到了人们的重视.

目前抗氧化剂的抗氧化活性评价方法有量子化学计算方法^[2]、抗脂质过氧化法^[3]以及清除活性氧及自由基法^[4], 采用的检测方法主要为分光光度法^[4]、荧光光度法^[5]、化学发光法^[6]、ESR 法^[7]、电化学方法^[8]等. 这些方法大多数只对单一物质的抗氧化活性进行独立的检测和评价, 而不能对多种组分的抗氧化活性同时进行检测; 更不能从复杂体系中筛选出具有抗氧化活性的成

* E-mail: zhnxia@yahoo.com.cn; Tel.: 023-65106615.

Received January 26, 2006; revised June 20, 2006; accepted August 21, 2006.

国家自然科学基金(Nos. 20375051, 20175038)和教育部高校青年教师奖[教人司(2002)123]资助项目.

分。例如,当抗氧化剂存在于生物体内(如血液)、食品以及中药等复杂体系中时,上述检测方法并不能排除复杂基体带来的干扰,同时也不能明确复杂体系中何种组分具有抗氧化活性,或者各种组分的抗氧化活性大小,因此这些方法都存在一定的局限性。结合色谱技术对复杂体系组分的抗氧化活性进行评价是一种新的发展。Vaya等^[9]对中药甘草的根的丙酮提取物进行分离纯化后,再采用液-液萃取技术和薄层色谱技术(thin layer chromatography, TLC)分离纯化,制备得到7个组分,分别评价了每个组分清除自由基和抑制脂质过氧化的抗氧化活性。TLC虽然仪器设备简单,但其分离能力较差,分辨率不高,需要进行繁琐的组分制备过程。Toyo'oka等^[10]结合流动注射技术把HPLC与化学发光检测(chemiluminescence, CL)进行联用,建立一种清除 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 的抗氧化剂在线筛选方法,考察了多种茶多酚的抗氧化活性,但没有对各种抗氧化剂的抗氧化活性进行定量评价。

与HPLC相比,毛细管电泳技术(capillary electrophoresis, CE)具有分析速度快、试剂用量少、仪器简单等优点,其强抗试剂污染能力更适于复杂体系的分离分析。目前,结合CE技术对同一复杂基体中的各种抗氧化剂进行在线筛选并定量评价的研究尚未见报道。本文以CE为各组分的分离手段,以抗氧化剂抑制发光的程度作为抗氧化活性的量度,建立了一种抗氧化剂的CE-CL在线评价方法,进一步使该方法不但能分离各种抗氧化活性成分,更可以达到定量评价其每一种物质的抗氧化活性的目的。以荧光法对各成分的抗氧化活性进行了单独的评价,给予CE-CL抗氧化活性筛选可行性的验证。另外,本方法初步应用于评价中药槐米提取物化学组分的抗氧化活性。

1 实验部分

1.1 仪器与装置

自组装毛细管电泳-化学发光检测仪[0~30 kV可调高压电源,0~-900 V光电倍增管(PMT)];数据采集和处理:HW-2000色谱工作站(上海千谱软件有限公司);荧光分光光度计(Shimadzu, RF5301PC),石英毛细管(永年锐沣色谱器件有限公司)。

自组装CE-CL接口装置^[11]如图1所示,分离毛细管内径75 μm ,有效长度40.0 cm,反应管内径530 μm ;分离毛细管的负极一端烧去4.0 cm长的聚酰亚胺涂层,经氢氟酸腐蚀后插入反应毛细管中;化学发光反应试剂通过位差加压的方法由试剂管引入T型接口,在试剂管前端加一段长10.0 cm、内径为200 μm 的限流毛细管以获

得稳定的流速。整个接口及检测窗口置于暗盒内避免外界光源的干扰。紫外检测用毛细管为75 $\mu\text{m} \times 50.0$ cm。

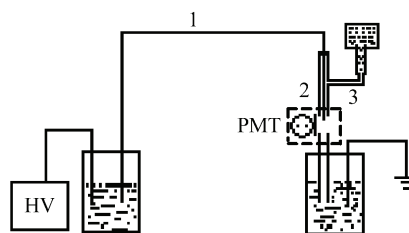


图1 CE-CL装置示意图

Figure 1 Schematic diagram of CE-CL

1—separation capillary, 2—reaction capillary, 3—reagent capillary

1.2 试剂及溶液配制

Luminol (Sigma公司)、四硼酸钠(成都化学试剂厂)、氢氧化钠(北京化工厂)、浓盐酸(重庆川东化学试剂厂)、硫酸铜(重庆北碚化学试剂厂)、氨水(重庆东方试剂厂)、苯甲酸(武汉有机合成厂)、盐酸麻黄碱(内蒙古赤峰制药厂)、硫脲(重庆东方试剂厂)、30% H_2O_2 (重庆川东化学试剂厂),以上试剂均为分析纯,实验用水为蒸馏水。

Luminol储备液($25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)以 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液配制,放4℃冰箱存储1周。以电泳缓冲溶液稀释luminol储备液至实验所需浓度。 Cu^{2+} 以 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸钠溶液配制(加氨水使之配合而溶解)。样品以电泳运行缓冲液配制。

中药槐米样品的制备:称取0.4 g槐米粉末,加入50 mL甲醇,浸泡12 h,超声提取60 min,过滤得提取液,实验时挥干甲醇,用电泳缓冲液配制成样品。

1.3 间接CE-CL方法的建立

Fenton体系是产生 $\cdot\text{OH}$ 的经典体系,其原理是 Fe^{2+} 催化 H_2O_2 产生 $\cdot\text{OH}$ 。文献研究表明与 Fe^{2+} 类似的过渡金属离子也具有这种催化作用^[12]。本文采用 Cu^{2+} 作为催化剂产生 $\cdot\text{OH}$ ^[13],luminol被 $\cdot\text{OH}$ 氧化而产生化学发光。 Cu^{2+} 与 H_2O_2 分别由限流毛细管和分离毛细管引入,在接口处混合产生 $\cdot\text{OH}$,产生的 $\cdot\text{OH}$ 氧化共存的luminol而使之发光。

实验前,用 $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的HCl冲洗毛细管10 min,再依次用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的NaOH溶液、蒸馏水、电泳缓冲液冲洗5 min,电进样方式进样。在整个电泳过程中,光电倍增管均检测到化学发光信号,成为电泳谱图基线,而发光信号因组分带通过减少,视为间接化学发光方法。

1.4 抗氧化活性CE-CL在线评价

抗氧化剂在清除 $\cdot\text{OH}$ 时,其抗氧化性表现在两个方面,即清除自由基的效应和阻止自由基链反应的效应^[14]。

当电泳区带不含抗氧化剂时,体系中的 luminol 被 $\cdot\text{OH}$ 氧化发光,当电泳区带存在抗氧化剂时,由于抗氧化剂的抗氧化效应,使体系中 $\cdot\text{OH}$ 的量减少,从而使 luminol 的发光强度降低,在谱图上出现该物质相应的抑制峰,根据化学发光被抑制的程度,间接化学发光信号的量可以得到物质抗氧化性能的大小.

以发光试剂的发光强度作为 $\cdot\text{OH}$ 的浓度量化尺度,以样品抑制发光的峰高作为清除 $\cdot\text{OH}$ 的量化尺度,则每一种抗氧化剂的抗氧化活性可以通过自由基清除率来量化,清除率计算公式为

$$\text{清除率}(Y) = \frac{\text{峰高}}{\text{基线强度}} \times 100\%$$

当清除率 $Y=50\%$ 时,则表明一半的自由基被清除,此时的抗氧化剂浓度称为 IC_{50} , IC_{50} 越小,抗氧化活性越大.

1.5 荧光分光光度法评价抗氧化性

为了与 CE-CL 方法进行对比,采用经典的荧光分光光度法(fluorospectrophotometry, FS)对两种物质的抗氧化性进行分别测定.以苯甲酸为荧光本底物质,苯甲酸在 $\cdot\text{OH}$ 的攻击下会生成强荧光物质羟基苯甲酸^[5],根据羟基苯甲酸的荧光强度可以确定 $\cdot\text{OH}$ 量效关系.当存在抗氧化剂时,生成羟基苯甲酸的量减少,荧光强度降低,从而可以评价抗氧化活性的大小.该方法的清除率计算公式为

$$\text{清除率}(Y) = \frac{F_0 - F_S}{F_0} \times 100\%$$

其中 F_0 表示不含样品时羟基苯甲酸的荧光强度, F_S 为含有样品时羟基苯甲酸的荧光强度.

2 结果与讨论

2.1 化学发光体系的优化

2.1.1 发光体系溶液混合模式

在金属离子-luminol- H_2O_2 化学发光体系中,较常用的发光试剂混合模式为以 Cu^{2+} 和 luminol 混合溶液作为电泳缓冲液, H_2O_2 作为反应试剂由限流毛细管引入.本研究观察到以 H_2O_2 和 luminol 混合溶液作为电泳缓冲液, Cu^{2+} 由限流毛细管引入的化学发光体系发光更稳定而且强度更大,实验结果显示,在相同浓度的 Cu^{2+} , luminol 和 H_2O_2 条件下,本文所选试剂混合模式发光强度为前者的 10 倍左右,因此本研究选择该模式进行实验.

2.1.2 H_2O_2 浓度对化学发光的影响

H_2O_2 的浓度与 $\cdot\text{OH}$ 的产量相关,而 H_2O_2 存在于电

泳缓冲液中,浓度不宜过大,否则 H_2O_2 被电解而产生气泡,引起电泳基线不稳,噪音变大^[15].从图 2 可知, H_2O_2 浓度低, $\cdot\text{OH}$ 产生量少,发光强度较小,随着 H_2O_2 的浓度增大,发光强度迅速增强,浓度增大到一定程度,发光强度趋于平缓,浓度再增大发光强度反而降低,其原因可能为过量的 H_2O_2 作为一种还原剂与 $\cdot\text{OH}$ 反应,导致 $\cdot\text{OH}$ 的量减少,从而使发光强度减弱^[8].本文中,抗氧化剂的活性因清除 $\cdot\text{OH}$ 使发光减弱而得到评价,因此一方面需要足够的 $\cdot\text{OH}$ 量,另外也需要较强的发光强度,故在实验中选择 H_2O_2 的浓度为 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$.

2.1.3 Luminol 浓度对化学发光的影响

Luminol 作为发光试剂,它的浓度影响着发光的强度.考察了 luminol 浓度分别为 $1.0, 2.5, 5.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 条件下的发光情况.在低浓度时,发光强度较弱, luminol 浓度较高时,发光强度增强,但电泳电流随之增大,造成基线不稳定,不利于电泳对复杂样品的分离,从而影响多组分抗氧化剂的在线分离、评价,因此选择 luminol 浓度为 $2.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$.

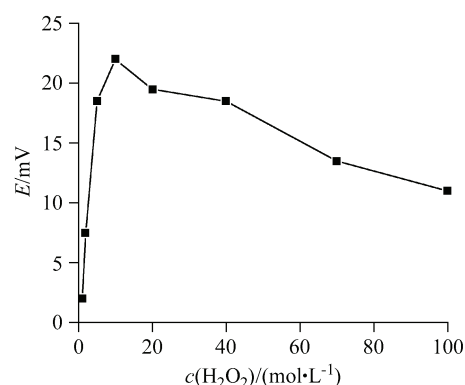


图 2 发光强度随 H_2O_2 浓度变化曲线

Figure 2 Relation between chemiluminescence intensity and H_2O_2 concentration

Condition: CE buffer, $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ borate containing $2.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ luminol and $x \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 (pH 8.0); CL reactant, $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_3PO_4 containing $0.05 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu^{2+} (pH=12); running voltage, 15 kV; PMT: -740 V

2.1.4 Cu^{2+} 浓度对化学发光的影响

Cu^{2+} 作为产生 $\cdot\text{OH}$ 的催化剂,与 $\cdot\text{OH}$ 的产量有关.在一定条件下, Cu^{2+} 浓度大, $\cdot\text{OH}$ 产量增多,在 H_2O_2 浓度为 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, luminol 浓度为 $2.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的条件下,考察了 Cu^{2+} 浓度在 $0.005, 0.02, 0.05, 0.10, 0.20, 0.30, 0.50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 条件下的发光情况,随着 Cu^{2+} 浓度的增大,发光强度随之增强,但 Cu^{2+} 浓度大于 $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 后,基线噪音明显增大,这可能是因为 Cu^{2+} 浓度增大后,反应速度加快,增加了体系的不稳定性.综合考虑发光强度和基线噪音两个因素,选择了 Cu^{2+} 浓度为 $0.05 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$.

2.1.5 发光试剂引流速度及分离电压的影响

发光试剂引入速度影响发光强度, 两液流混合后发光会持续一定的时间, 在一定的电渗流速度下, 发光试剂的引流速度增大, 使两液流的混合更加充分, 发光强度增强, 但是引流速度太大, 液流流过检测窗口速度过快可能使发光强度未达到峰值时, 液流已流出检测窗口, 引起检测到光信号减弱; 同时, 引流速度也影响着样品峰的峰形, 由于样品区带从分离毛细管运行到反应毛细管时, 由于毛细管内径的突然增大, 纵向扩散非常严重, 使区带展宽, 而引流速度往往远大于电渗流速度, 使样品区带通过检测窗口的时间大大减少, 进而可以改善峰形. 综合以上因素, 本文选择引流试剂液面距电泳负极的高度为 20 cm.

在一定的电泳缓冲液和发光试剂引流速度条件下, 电泳电压增大, 电渗流也会增大, 则电泳液流与发光试剂引流混合更充分, 发光强度也增强, 同时由于焦耳热引起的电泳基线不稳, 因此, 电泳电压的选择也要兼顾样品各组分的分离度、出峰时间以及电泳基线. 在选择电压条件时以各组分的分离情况以及电泳基线为准则, 在分离度、出峰时间以及电泳基线符合要求的前提下选择最大的电压使具有较大的发光强度, 具体电压条件参见图注.

2.2 麻黄碱和硫脲抗氧化活性评价

2.2.1 CE-CL 法

硫脲是 $\cdot\text{OH}$ 的有效清除剂, 是较强的抗氧化剂^[16], 麻黄碱是中药麻黄的主要成分, 具有抑制羟自由基的作用^[17]. 两种物质都可以清除体系中的 $\cdot\text{OH}$, 使 luminol 发光受到抑制, 从而表现出抗氧化性, 二者混合样品抑制发光毛细管的电泳谱图见图 3, 图中纵坐标为发光强度, 由于电泳介质在电泳过程中一直构成一个稳定的发光, 而当电泳区带中含有麻黄碱和硫脲分子时, 发光因受到

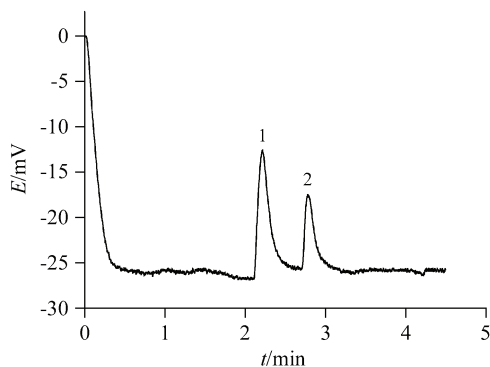


图3 麻黄碱、硫脲的化学发光检测电泳谱图

Figure 3 Electropherogram of thiourea and ephedrine by CE-CL. Peak identities: 1. ephedrine, 2. thiourea. Condition: running buffer, 20 mmol·L⁻¹ borate containing 2.5 mmol·L⁻¹ luminol and 10 mmol·L⁻¹ H₂O₂; electrokinetic injected: 15 kV for 2 s; other conditions are the same as in Figure 2

抑制而出现电压负值减少, 得到两个正峰, 从两个正峰的峰高可知, 在相同浓度下, 麻黄碱对自由基的清除效果要大于硫脲.

考察了不同浓度的硫脲和麻黄碱的抗氧化性, 求得两种抗氧化剂在各浓度下对自由基的清除率, 清除率与浓度的关系见图 4. 发现自由基清除率与抗氧化剂的浓度是非线性关系, 在低浓度下, 清除率随抗氧化剂浓度增大而增大, 浓度增大到了一定的程度, 清除率与浓度关系出现平台区, 表明抗氧化剂的抗氧化效果达到最大, 这时清除率随浓度的增大而缓慢增加.

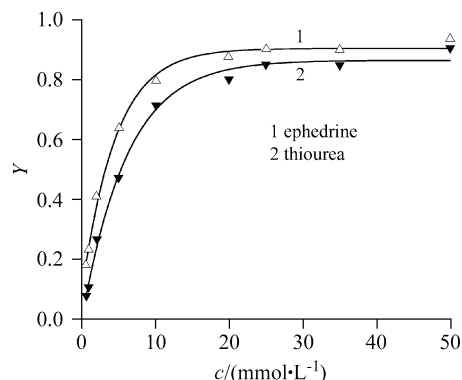


图4 $\cdot\text{OH}$ 清除率与麻黄碱和硫脲浓度关系的拟合曲线

Figure 4 Fitting curves of scavenging effect on $\cdot\text{OH}$ vs. concentrations of ephedrine and thiourea

以浓度 c 为横坐标, 清除率 Y 为纵坐标, 通过非线性拟合(Origin7.0 软件)得到麻黄碱、硫脲的清除率与浓度的曲线方程分别为

$$Y_1 = 0.906 - \frac{17.049}{1 + \exp \frac{c+13.328}{4.443}}, R^2 = 0.9954$$

$$Y_2 = 0.866 - \frac{12.036}{1 + \exp \frac{c+15.020}{5.859}}, R^2 = 0.9952$$

根据曲线拟合方程得到麻黄碱和硫脲的 IC_{50} 分别为 3.2 和 5.3 mmol·L⁻¹, IC_{50} 越小, 则抗氧化剂的活性越大, 故在该条件下二者的抗氧化性大小为麻黄碱>硫脲.

2.2.2 FS 法

苯甲酸为弱荧光物质, 其氧化产物羟基苯甲酸为强荧光物质, 二者最大激发波长均为 302 nm, 苯甲酸的最大发射波长为 416 nm(图 5a), 羟基苯甲酸的最大发射波长为 419 nm(图 5b).

在 Cu^{2+} 浓度为 0.05 mmol·L⁻¹, H_2O_2 浓度为 10 mmol·L⁻¹ 的条件下, 考察了含不同浓度苯甲酸溶液的荧光强度. 从图 6 可知, 当苯甲酸浓度较低时, 苯甲酸

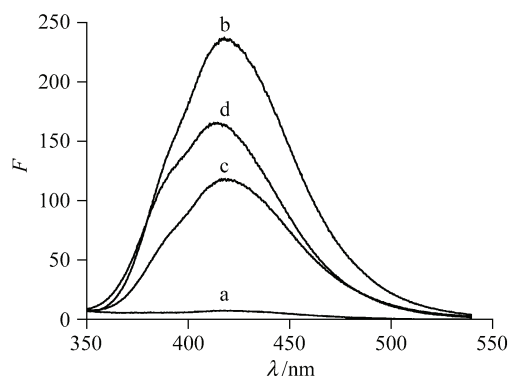


图5 苯甲酸及其产物的荧光发射谱图

Figure 5 Fluorescence emission spectra of benzoic acid and products

a—benzoic acid; b—benzoic acid- Cu^{2+} - H_2O_2 ; c—benzoic acid- Cu^{2+} - H_2O_2 -ephedrine; d—benzoic acid- Cu^{2+} - H_2O_2 -thiourea

被完全氧化生成羟基苯甲酸, 荧光强度随苯甲酸的浓度线性增加, 且斜率较大, 说明羟基苯甲酸的荧光强度较大. 当苯甲酸浓度进一步升高时, 荧光强度不再随苯甲酸浓度线性增大, 曲线趋于平缓, 原因有两个方面^[5]: 一是由于羟基苯甲酸浓度升高造成的非线性响应, 二是由于出现过量的苯甲酸, 其荧光叠加于羟基苯甲酸的荧光之上, 这两者共同形成非线性. 当苯甲酸浓度继续升高时羟基苯甲酸的荧光完全达到饱和, 出现较平缓的线性区, 这完全是苯甲酸的荧光响应关系. 由于苯甲酸的荧光强度很弱, 所以斜率很小, 而且其荧光叠加于饱和的产物荧光之上.

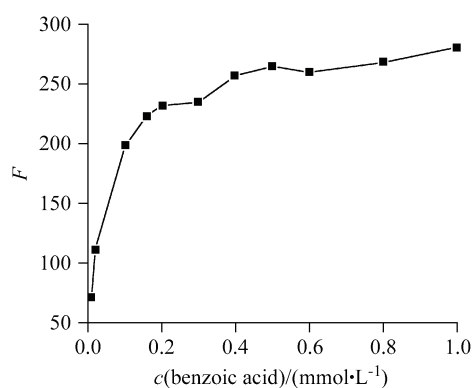


图6 苯甲酸浓度与荧光强度的关系

Figure 6 Relation between concentration of benzoic acid and fluorescent intensity

在该条件下, 当苯甲酸浓度大于 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 其产物已达饱和. 当溶液中存在抗氧化剂时, 生成的羟基苯甲酸减少, 即体系的荧光强度减弱(图 5c, d), 为了使剩余的 $\cdot\text{OH}$ 被苯甲酸完全反应, 而且使各溶液荧光本底值基本一致, 则应使各溶液中的苯甲酸过量. 选择苯甲酸的浓度为 $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 麻黄碱和硫脲对 $\cdot\text{OH}$ 的

清除率与浓度的关系见图 7, 拟合曲线方程为

$$Y_1 = 0.866 - \frac{17.550}{1 + \exp \frac{c+1.308}{0.471}}, R^2 = 0.9849$$

$$Y_2 = 0.896 - \frac{15.160}{1 + \exp \frac{c+17.142}{5.390}}, R^2 = 0.9922$$

由拟合方程求得 IC_{50} 分别为 $0.5, 2.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 故二者的抗氧化活性大小为麻黄碱 > 硫脲.

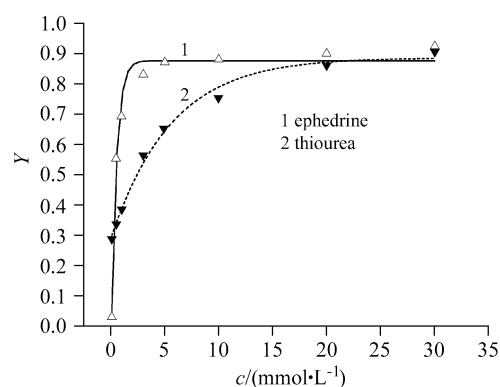


图7 荧光光度法测定自由基清除率与麻黄碱和硫脲浓度拟合曲线

Figure 7 Fitting curves of scavenging effect on $\cdot\text{OH}$ vs. concentrations of ephedrine and thiourea by fluorospectrophotometry

2.2.3 CE-CL 法与 FS 法结果比较

从实验结果可以看出, CE-CL 法与 FS 法相比, 求得的 IC_{50} 虽有一定的差异, 但是麻黄碱和硫脲的抗氧化活性大小顺序相同, 这可能是这两种方法本身原因造成的. CE-CL 方法在抗氧化研究时, Cu^{2+} 和 H_2O_2 在接口处混合反应产生 $\cdot\text{OH}$, 与 H_2O_2 共存的 luminol 和抗氧化剂同时竞争与 $\cdot\text{OH}$ 反应, 由于这一过程都是在一种动态环境下进行的, 可能各种反应不是很完全, 所以抗氧化剂清除 $\cdot\text{OH}$ 的效率并没有达到最大. 采用 FS 方法时, Cu^{2+} , H_2O_2 , 荧光试剂和抗氧化剂共存于一个静态的环境中, 它们之间可以进行充分的反应, 所以 FS 法中的抗氧化剂对 $\cdot\text{OH}$ 的清除效率大于 CE-CL 法, 即 IC_{50} 皆比 CE-CL 法要小, 而这种影响对每一种抗氧化剂都是相同的, 并不会影响抗氧化剂之间抗氧化活性的相对大小, 故两种方法得到抗氧化剂的抗氧化活性大小都为麻黄碱 > 硫脲. 因此, CE-CL 方法评价抗氧化活性是可靠的.

当抗氧化剂存在于复杂体系中, 特别是体系含有两种以上的抗氧化剂时, FS 方法既不能排除复杂基体带来的干扰, 也不能明确每一种抗氧化剂活性, 不适用于复杂体系中的抗氧化剂的抗氧化评价, 故本文采用 FS 方

法只能对硫脲、麻黄碱进行独立实验. CE-CL 方法能对复杂体系中的组分进行有效的分离, 而且可以在线对每一组分的抗氧化活性进行评价, 更适用于复杂体系中抗氧化剂的评价.

2.3 中药槐米提取物化学组分的抗氧化活性评价

天然抗氧化剂往往存在于植物的复杂基体中, 本文将该方法应用于分离并评价中药槐米提取物中一些组分抗氧化活性. 槐米主要成分为具有抗氧化活性的黄酮类物质, 其中含量最高的组分为芦丁. 实验中考察了磷酸盐、硼酸盐缓冲液对分离的影响, 发现硼酸盐缓冲液能够较好地分离槐米提取物的各组分, 原因是硼酸盐能够与黄酮类中的邻二酚羟基类物质形成络合物, 不同组分络合程度不同而增大各组分的淌度差异^[18], 故采用硼砂作为电泳缓冲介质. 此外, 还考察了硼砂的浓度、pH 值以及分离电压对分离的影响, 确定了较优的分离条件为 $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 9.0. 为了与化学发光条件相匹配, 电泳缓冲液中含有 $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 luminol 和 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$, 在优化条件下槐米提取物的紫外检测电泳谱图如图 8.

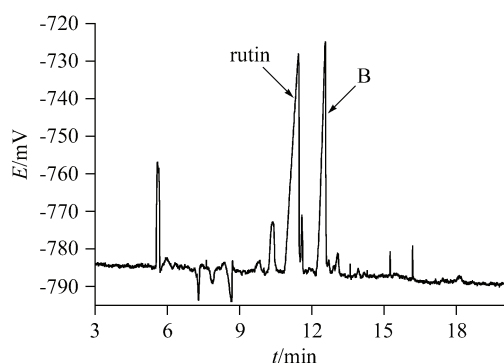


图 8 槐米提取物的紫外检测电泳谱图

Figure 8 Electropherogram of extract of *Sophora japonica* L. by CE-UV

CE buffer: $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ borax- $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ luminol- $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$, pH 9.0; UV detection, 254 nm, 18 kV, PMT: -510 V , electrokinetic injected: 15 kV for 10 s

在相同的缓冲液条件下, 各组分的电泳出峰顺序不会改变, 采用化学发光检测方式对槐米提取物的抗氧化组分进行了分离并评价, 化学发光检测谱图如图 9. 从图中可以看出, 槐米中含有较多具有抗氧化活性组分. 比较图 8, 9 可以看出, 其主要成分芦丁既有较强的紫外吸收, 也有很强的抗氧化活性, 但是芦丁之后具有强紫外吸收的组分 B(图 8), 在化学发光检测时峰高很小, 表明其抗氧化活性较弱. 此外, 一些含量较少的组分或者紫外吸收很弱的组分(如图 9 中组分 A), 由于有较强的抗氧化活性在化学发光检测时能够得到检测. 因此本文

建立的 CE-CL 在线评价抗氧化活性的方法能够用于筛选复杂体系中具有抗氧化活性的化合物.

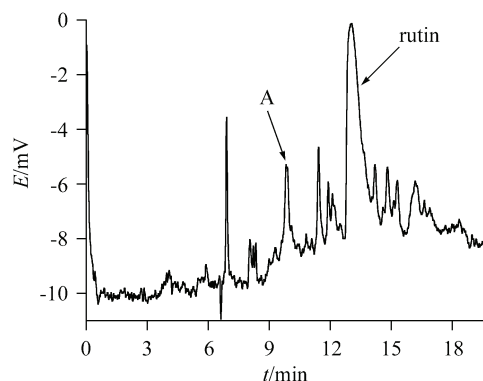


图 9 槐米提取物的化学发光检测电泳谱图

Figure 9 Electropherogram of extract of *Sophora japonica* L. by CE-CL

CE buffer is the same as Figure 8; CL reagent: $0.05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$, PMT: -820 V , electrokinetic injected: 17 kV for 5 s

3 结论

自由基及活性氧对人体具有很大的伤害, 它能够氧化生物体中的糖类、氨基酸、蛋白质、核酸和脂类等生物大分子, 使细胞坏死或者发生突变, 从而使人体衰老或发生疾病. 由于合成抗氧化剂往往具有不可预测的毒副作用, 甚至是致癌作用^[19], 对人体可能造成危害, 因此寻找天然的抗氧化剂具有重要而深远的意义.

本研究建立的在线评价抗氧化剂的技术操作简单, 方法可靠, 不仅能够排除复杂基体中其它物质的干扰, 而且能够对多组分抗氧化剂的抗氧化活性同时进行在线评价, 对筛选复杂基体中天然的抗氧化剂具有重要的应用价值.

References

- 1 Stadtman, E. R.; Berlett, B. S. *Drug Metab. Rev.* **1998**, *30*, 225.
- 2 Kong, D.-X.; Jiang, T.; Guan, H.-S. *Chin. J. Chem.* **2005**, *23*, 816.
- 3 Chang, L.-W.; Yen, W.-J.; Huang, S.-C.; Duh, P.-D. *Food Chem.* **2002**, *78*, 347.
- 4 Liu, F.; Ng, T.-B. *Life Sci.* **2000**, *66*, 725.
- 5 Chen, G.-H.; Tian, Y.-L.; Yang, G.-L.; Wang, X.-Y.; Zhao, H.-R. *Spectrosc. Spect. Anal.* **2002**, *22*, 634 (in Chinese). (陈冠华, 田益玲, 杨更亮, 王晓燕, 赵花荣, 光谱学与光谱分析, **2002**, *22*, 634.)
- 6 Ying, Z.-P.; Yu, W.-L.; Wang, D.-P.; Liang, X.-F.; Hu, T.-X. *Food Chem.* **2003**, *80*, 115.
- 7 Hegde, P.-S.; Chandra, T.-S. *Food Chem.* **2005**, *92*, 177.
- 8 Cao, Y.-H.; Chu, Q.-C.; Ye, J.-N. *Anal. Bioanal. Chem.*

- 2003**, 376, 691.
- 9 Vaya, J.; Belinky, P.-A.; Aviram, M. *Free Radic. Biol. Med.* **1997**, 23, 302.
- 10 Toyo'oka, T.; Kashiwazaki, T.; Kato, M. *Talanta* **2003**, 60, 467.
- 11 Gan, T.-T.; Chen, H.; Xia, Z.-N.; Jiang, X.-M.; Zhang, R.; Xin, L.-T. Yu, Y.-L. *J. Instrum. Anal.* **2006**, 25, 66 (in Chinese).
(甘婷婷, 陈华, 夏之宁, 蒋雪梅, 张蓉, 辛龙涛, 喻彦林, 分析测试学报, **2006**, 25, 66.)
- 12 Su, R.-G.; Lin, J.-M.; Qu, F.; Gao, Y.-H.; Chen, Z.-F. *Acta Chim. Sinica* **2003**, 61, 885 (in Chinese).
(苏荣国, 林金明, 屈峰, 高云华, 陈志峰, 化学学报, **2003**, 61, 885.)
- 13 Huai, Q.; Li, J.-Q.; Fang, X.-W. *J. Radiat. Res. Radiat. Process.* **1998**, 16, 193 (in Chinese).
(淮清, 李久强, 方兴旺, 辐射研究与辐射工艺学报, **1998**, 16, 193.)
- 14 Gaboriau, F.; Delcros, J. G.; Moulinoux, J. P. *J. Pharmacol. Toxicol.* **2002**, 47, 43.
- 15 Zhang, Y.; Huang, B.; Cheng, J.-K. *Anal. Chim. Acta* **1998**, 363, 163.
- 16 Xu, X.-R.; Wang, W.-H.; Li, H.-B. *Chin. J. Anal. Chem.* **1998**, 26, 1460 (in Chinese).
(徐向荣, 王文华, 李华斌, 分析化学, **1998**, 26, 1460.)
- 17 Wang, G.-Z.; Oura, H. *Chin. J. Integ. Trad. West. Med.* **1994**, 14, 485 (in Chinese).
(王国柱, 大浦彦吉, 中国中西医结合杂志, **1994**, 14, 485.)
- 18 Kuhn, H.-S.; Paulus, A.; Gassmann, E.; Widmer, H.-M. *Anal. Chem.* **1991**, 63, 1541.
- 19 Suja, K.-P.; Jayalekshmy, A.; Arumugan, C. *Food Chem.* **2005**, 91, 213.

(A0601269 YANG, X.; ZHENG, G. C.)