文章编号:1009-038X(2004)02-0062-05

圈养秦岭大熊猫 2 种主食竹叶维生素 C 含量分析

莫晓燕[1], 李 静[1], 冯 宁[2], 王 哲[1], 杨德夏[3], 高更更[3]
(1. 西安交通大学 生命科学与技术学院, 陕西 西安 710049;2. 陕西省林业厅保护处, 陕西 西安 710082;3. 陕西省野生动物保护与饲养中心, 陕西 周至 710400)

摘 要: 分别采用紫外分光光度法和肼比色法检测了人工圈养秦岭大熊猫的 2 种主食竹叶——淡竹和箬竹中还原型维生素 C 和总维生素 C 的含量. 结果显示,全株总维生素 C 含量在 2 种竹叶中无明显差别,但还原型与总维生素 C 的比例有所不同,箬竹、1 年生淡竹和 2 年生淡竹竹叶中还原型维生素 C 分别是总维生素 C 质量分数的 39.7%、32.5%和 28.1%. 不同部位淡竹竹叶中 2 种类型维生素 C 含量有相似的趋势,即上部竹叶维生素 C 水平明显高于下部(1.26~2.07 倍),而且随着竹龄增长维生素 C 的水平有不同程度降低.

关键词: 大熊猫;竹叶;维生素 C;紫外分光光度法;肼比色法
中图分类号: S 865.3 **文献标识码**: A

Analysis on the Vitamin C Contents in Two Major Species of Bamboo Leaves for Captive Qinling Giant Panda

MO Xiao-yan[1], LI Jing[1], FENG Ning[2], WANG Zhe[1],
YANG De-xia[3], GAO Geng-geng[3]

(1. School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China; 2. Nature Reserves and Wildlife Administration Office, Forestry Dept. of Shaanxi, Xi'an 710082, China; 3. Wild Animal Protection and Breeding Center of Shaanxi, Zhouzhi 710400, China)

Abstract: The ultraviolet spectrophotometry and hydrazine colorimetry were respectively used to determine redutive and overall vitamin C contents in two major species of bamboo leaves——*Phyllostachys glauca* and *Indocalamus longiauritris* which were fed to the captive Qinling giant panda. The results showed that the overall vitamin C contents had little difference in these 2 kinds bamboo leaves, but the proportion of reductive type to overall vitamin C changed with species and age of bamboos (*Indocalamus longiauritris* 39.7%, annual *Phyllostachys glauca* 32.5% and biennial *Phyllostachys glauca* 28.1%). In addition, both reductive and overall vitamin C in different of trunk positions of *Phyllostachys glauca* had a similar tendency——the contents in top leaves were obviously higher than those in bottom leaves(1.26~2.07 times), and almost at all of positions, vitamin C contents decreased with ages of *Phyllostachys glauca*.

Key words: giant panda; bamboo leaves; vitamin C; ultraviolet spectrophotometry; hydrazine colorimetry

收稿日期:2003-08-05; **修回日期**:2003-11-06.

作者简介: 莫晓燕(1954-),女,江苏江都人,高级工程师,工学硕士.

万方数据

大熊猫是我国珍稀特产动物之一,现存的野生种群仅分布在四川、甘肃、陕西三省的 6 片相互隔离的山系之中[1].大熊猫野外的食物组成中 99%是竹子,包括竹茎、竹枝、竹叶和竹笋,已有一些野生大熊猫主食竹种营养成分(蛋白质和氨基酸、细胞壁组分和无机元素等)的分析报道[2,3],但对圈养大熊猫主食竹子中维生素含量的研究甚少[4].在目前大熊猫栖息地日益恶化的情况下,对大熊猫的圈养繁殖进行系统化研究有着非常重要的意义[5].维生素 C 是重要的水溶性维生素之一,广泛分布于蔬菜和水果中,尤以绿色蔬菜和柑橘类含量丰富,是一种很好的天然抗氧化剂,由于具有可逆的氧化还原作用,参与了体内诸多的代谢过程,与动物的生长发育关系密切.因此本研究对陕西省周至圈养的秦岭大熊猫 2 种主食竹叶中的维生素 C 含量进行了测定,为合理安排大熊猫的饮食以及进一步采取有效措施保护大熊猫提供实验依据.

1　材料与方法

1.1　材料及处理

以陕西省野生动物保护与饲养中心喂养秦岭大熊猫的主要食用竹——淡竹(*Phyllostachys glauca*)和箬竹(*Indocalamus longiauritris*)作为研究对象.在饲养中心工作人员的指导下,于 2002 年 4 月赴当地采集了箬竹和淡竹竹叶,并将其分为不同生长阶段(1 年生竹,2 年生竹)和不同部位(上部,中上部,中下部,下部)多份样品,用塑料袋分装密封后带回实验室,低温冰箱保存.测定前用重蒸水将竹叶冲洗干净,放置于干净滤纸上,室温下自然晾干,待用.

1.2　仪器与试剂

1)主要仪器:DU-640 紫外可见分光光度计和 J2-MC 高速冷冻离心机:美国 Beckman 公司生产;GB 303 电子天平:瑞士 Mettler 公司生产;FJ-200 高速分散匀质机:上海标本模型厂生产.

2)维生素 C 标准溶液(50 μg/mL):用电子天平准确称取维生素 C(上海伯奥公司生产,分析纯)0.025 0 g,溶解至 5.0 mL 体积分数 0.1%HCl 溶液中,并以重蒸水定容 500.0 mL.

其余试剂均为分析纯,实验用水为重蒸水.

1.3　方法和原理

1.3.1　还原型维生素 C 的测定　根据还原型维生素 C 在紫外区有最大吸收峰,并且在较大范围内具有良好的线性关系,而氧化型维生素 C 无紫外吸收峰的原理,采用紫外分光光度法[6]测定还原型维生素 C 的含量.

用电子天平称取竹叶若干克置小烧杯中,以体积分数 0.01% HCl 溶液 20 mL 为提取剂,在高速分散匀质机作用下快速捣成匀浆;10 000 r/min 冷冻离心 10 min,取 0.2 mL 上清液,加入 0.1 mL 体积分数 0.1% HCl 溶液,4.7 mL 重蒸水,以蒸馏水作空白在 243.8 nm 下测定光密度值 OD_1;另取 0.2 mL 离心后上清液,加入 0.1 mL 体积分数 0.1% HCl,0.05 mL $CuSO_4$ 溶液,4.65 mL 重蒸水,置 70 ℃恒温水浴锅加热反应 13 min,冰浴冷却后测 OD_2.

1.3.2　总维生素 C 的测定　采用肼比色法[7]测定竹叶中总维生素 C 含量,其原理为 2,6-二氯酚靛酚钠盐(DCP)将还原型维生素 C 全部氧化成脱氢抗坏血酸,后者的羰基与 2,4-二硝基苯肼(DNP)反应生成红色的脎,再用硫酸脱水使之转变为桔红色无水化合物,在 520～525 nm 显色稳定,并且在一定范围内具有良好的线性关系.

用电子天平称取竹叶若干克置小烧杯中,加入 20 mL 质量分数 5%偏磷酸溶液提取,用高速分散匀质机粉碎成匀浆,10 000 r/min 冷冻离心 10 min;分别取样品提取上清液和维生素 C 标准溶液 0.2 mL 置试管中,依次加入质量分数 5%偏磷酸、DCP、硫脲-偏磷酸及 DNP,置 50 ℃恒温水浴锅加热反应 70 min,冰浴条件下滴加体积分数 85%硫酸,室温放置 30 min 后,读取 520 nm 的吸光值 A 和 A';同时做样品空白和标准空白,除 DNP 最后加入反应体系外,其余步骤同前,测定 A_0 和 A'_0.

2　结　果

2.1　还原型维生素 C 含量

2.1.1　标准曲线和计算公式　图 1 为紫外分光光度法测得的维生素 C 标准曲线.用未氧化与氧化的测试液光密度值之差(OD_1-OD_2)查标准曲线,根据以下公式即可计算出样品中还原型维生素 C 的含量.

还原型维生素 C(mg/kg)=($\rho_1\times V_2\times 20\times 1\,000$)/($V_1\times m\times 1\,000$)

式中:ρ_1 是标准曲线上查得维生素 C 的质量浓度(μg/mL);V_2 和 V_1 分别代表测试液反应总体积(5.0 mL)和测定用的体积(0.2 mL);m 为测定样品的质量(g).

万方数据

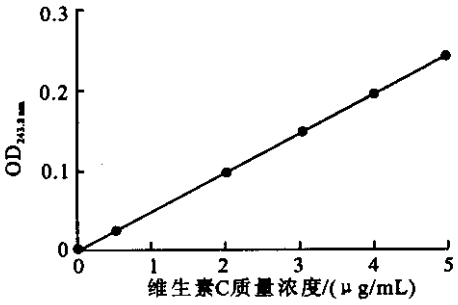


图 1 维生素 C 标准曲线(紫外分光光度法)

Fig. 1 Standard curve of vitamin C (ultraviolet spectrophotometry)

2.1.2 竹叶还原型维生素 C 含量 实验测得箬竹竹叶中还原型维生素 C 的质量分数为 474.4±101.6 mg/kg,淡竹不同部位、不同竹龄的叶子中还原型维生素 C 的质量分数结果见表 1.

2.2 总维生素 C 含量

2.2.1 标准曲线和计算公式 图 2 为肼比色法测得的维生素 C 标准曲线. 根据以下公式即可计算出样品中总维生素 C 的含量.

总维生素 C(mg/kg)$=20\times(0.2/A'-A'_0)\times(A-A_0)\times 1\,000/m$

式中:A_0 和 A'_0 分别是样品空白和标准空白的吸光度值;A 和 A' 分别是样品测试液和标准测试液的吸光度值;m 为测定样品的质量(g).

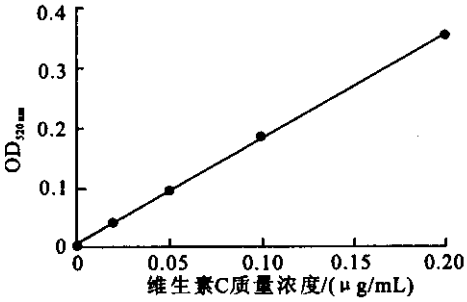


图 2 维生素 C 标准曲线(肼比色法)

Fig. 2 Standard curve of vitamin C (hydrazine colorimetry)

2.2.2 竹叶总维生素 C 含量 测定的箬竹竹叶中总维生素 C 的质量分数为 1 193.8±176.9 mg/kg,淡竹不同部位、不同竹龄的叶子中总维生素 C 的结果见表 2.

表 1 淡竹竹叶还原型维生素 C 质量分数

Tab. 1 Reductive vitamin C contents in bamboo leaves of *Phyllostachys glauca* mg/kg

竹龄/年	上 部	中上部	中下部	下 部	全 株
1	640.3±128.6	337.0±51.1	380.3±38.7	316.3±26.1	418.5±150.3
2	459.0±73.5	332.0±83.4	277.5±29.0	336.0±0.0	351.1±76.7

表 2 淡竹竹叶总维生素 C 质量分数

Tab. 2 Overall vitamin C contents in bamboo leaves of *Phyllostachys glauca* mg/kg

竹龄/年	上 部	中上部	中下部	下 部	全 株
1	1472.5±94.0	1329.0±82.7	1296.8±89.4	1051.0±138.6	1287.3±175.1
2	1393.0±200.8	1235.0±141.4	1256.0±7.1	1108.0±0.0	1248.0±116.7

2.3 2 种维生素 C 含量的比较

图 3 为 2 种竹叶中还原型与总维生素 C 含量的对比分析,图 4 则显示出 1 年生和 2 年生淡竹竹叶不同部位 2 种维生素 C 含量的差别.

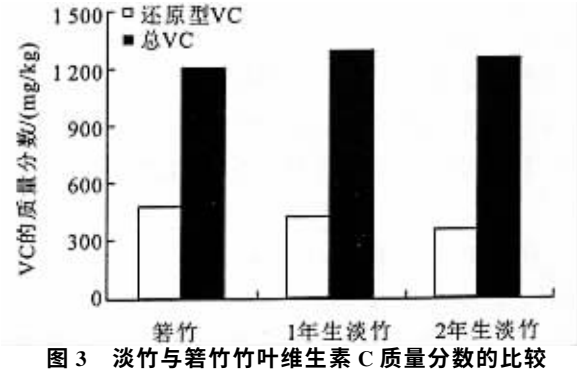


图 3 淡竹与箬竹竹叶维生素 C 质量分数的比较

Fig. 3 Comparison of vitamin C contents in bamboo leaves between *Phyllostachys glauca* and *Indocalamus longiauritris*

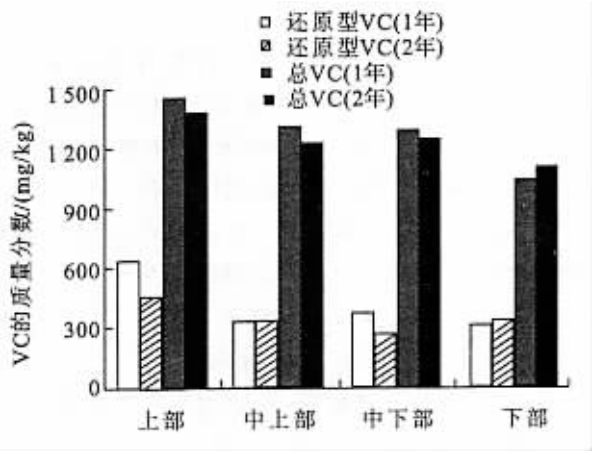


图 4 不同竹龄淡竹竹叶维生素 C 质量分数的比较

Fig. 4 Comparison of vitamin C contents in bamboo leaves between annual and biennial *Phyllostachys glauca*

万方数据

3 讨 论

3.1 测定方法和条件

维生素 C 的定量方法有多种,分别用于还原型维生素 C 和总维生素 C 的测定,前者的测定方法有碘量法、染料法、萃取法和紫外分光光度法;肼比色法为后者的常用方法;而荧光法、高效液相色谱法和电化学方法可用于 2 种维生素 C 的测定. 不同方法具有各自的优缺点,有的操作繁琐,要求特殊仪器,也有的灵敏度低,干扰多. 肼比色法自 1943 年建立以来已成为维生素 C 的常规定量方法,优点为操作比较简便、快速,不需特殊仪器,并且适用于多种样品;不足之处是该方法特异性稍差,有可能受其他氧化还原性物质的干扰,使结果偏高. 紫外分光光度法是近年发展迅速的测定果蔬中还原型维生素 C 的方法,具有操作简便、反应快速、结果准确、干扰因素少,以及仪器设备简单、实验成本低等优点,但对不同样品的实验条件还需进行摸索. 本研究分别采用肼比色法和紫外分光光度法进行竹叶中总维生素 C 和还原型维生素 C 的测定.

由于尚未见到有关紫外分光光度法测定竹叶维生素 C 含量的报道,本实验分别对提取剂、催化剂和最大吸收峰进行研究,确定了最佳测试条件,保证实验结果的准确性和可靠性.

好的提取剂可延长维生素 C 的稳定时间,并且有助于提高提取效率,常用的提取剂有 HCl、EDTA、柠檬酸、草酸等. 本实验采用 HCl 作为提取剂,对所用 HCl 在 200～300 nm 范围下扫描未见吸收峰;同时测定了 15 min 内维生素 C 在 HCl 溶液中的 OD 值(3 min 一次),$OD_{243.8\ nm}$ 值波动范围小于0.002,证实维生素 C 在 HCl 溶液中具有良好的稳定性.

Cu^{2+} 作为催化剂可加速反应体系中还原型维生素 C 的氧化. 首先通过测定不同用量(0.05,0.15,0.25,0.35,0.45 mL)Cu^{2+} 溶液(100 μg/mL)在 243.8 nm 下的光密度值,证明 Cu^{2+} 不会造成本底吸收而影响实验的准确性. 其次通过实验进一步确定催化剂的作用时间和用量,结果表明在反应体系中加入 5 μg Cu^{2+},70 ℃加热反应 13 min 为最佳条件.

以蒸馏水作空白,在 200～300 nm 的波长范围内对维生素 C 标准溶液进行连续扫描,确定最大吸收峰 243.8 nm 为本实验的测定波长.

3.2 圈养大熊猫的食用竹

淡竹属于禾亚科箬竹超族(*Bambusatae*)箬竹族(*Bambuseae*)刚竹属(*Phyllostachys*)[8],植株约 3～5 m 以上,属中型竹种,秆型通直,韧性强. 因箭竹一般生长在海拔较高的地方,难于采集;而淡竹对海拔的要求不高,在秦岭的不同地理位置均可见到,所以淡竹成为当地人工圈养大熊猫的主要食用竹之一.

箬竹是一类竹的总称,也属箬竹超族箬竹族[8]. 大熊猫所食的箬竹高度仅 1 m 左右,其竹株密集生长,没有明显的竹秆,竹枝细小质地柔软,叶长而宽,嫩叶有清香味. 据工作人员介绍,当初在饲养中心周围种植箬竹只是为了美化环境,大熊猫并不吃这种箬竹,但后来却开始食用并逐渐喜爱上这种竹子,特别是在冬天其他竹子供应量不足的时候,箬竹成为大熊猫的主要食物之一. 这表明,大熊猫的食性会随着环境的变化而改变.

3.3 竹叶的维生素 C 含量

组织中的维生素 C 以氧化型和还原型两种形式存在,大多是前者高于后者,二者可通过氧化还原互相转变,因而都具有生理活性. 在生物体内起主要作用的是还原型维生素 C,因此一般认为只测定还原型 C 即可代表总抗坏血酸的水平. 但也有报告称,蔬菜中总维生素 C 含量比还原型维生素 C 的量大得多,认为还原型维生素 C 并不能完全反映组织中维生素 C 的真实水平[9]. 因此,分别测定二者含量才能够对食物营养学价值作出全面的评价.

本研究测定了圈养的秦岭大熊猫 2 种主食竹叶中总维生素 C 和还原型维生素 C 的含量. 分析测定结果可知,淡竹竹叶的还原型维生素 C 含量低于箬竹竹叶,并且随着竹龄的增长而下降,而 2 种竹叶全株总维生素 C 的含量无明显差别. 淡竹上部竹叶中 2 种维生素 C 的含量明显高于下部,其中 1 年生和 2 年生上部还原型维生素 C 分别是下部的 2.07倍和 1.37 倍,上部总维生素 C 分别为下部的 1.40 倍和 1.26 倍.

比较测定结果(见图 3)可以看出,箬竹竹叶的还原型维生素 C 高于淡竹,而总维生素 C 含量却略低于淡竹;箬竹、1 年生淡竹和 2 年生淡竹竹叶中还原型维生素 C 分别是总维生素 C 的 39.7%、32.5%和 28.1%.

不同部位淡竹竹叶 2 种维生素 C 的对比分析显示(见图 4),淡竹竹叶中总维生素 C 含量与还原型维生素 C 趋势相似,即上部的维生素 C 高于下部,而且随着竹龄增长维生素 C 的水平有不同程度降低,其中 1 年生上部竹叶还原型维生素 C 与总维生素 C 含量的百分比最高(43.5%),最低的是 2 年

万方数据

生中下部竹叶(22.1%).这说明不同竹种和同一竹种不同竹龄的竹叶维生素 C 的含量和类型存在一定的差异,因此在给大熊猫投放饲料时对此应有所考虑.

维生素 C 又名抗坏血酸,其结构为 6 碳的酸性多羟基化合物,在体内既可成为供氢体,又可作为受氢体,与细胞内的氧化还原过程关系密切,在参与呼吸链和能量代谢,促进铁和叶酸还原而影响造血,通过羟化酶促进胶原蛋白合成,以及抗氧化、抗衰老,提高机体免疫力等方面均有着重要作用.竹子作为大熊猫的主要食物,其中各种营养素的水平与大熊猫的生长发育密切相关,而且与野生大熊猫相比,圈养大熊猫对竹子的种类和部位的选择性较低.因此深入系统地研究圈养大熊猫的食物成分和膳食结构,对于合理投放饲料及添加营养素有指导性意义.

本研究结果显示,淡竹上部竹叶的维生素 C 相对富集,并且竹子生长期长短对维生素 C 含量、还原型和总维生素 C 的比例有一定的影响;箬竹和淡竹竹叶中所测定的总维生素 C 含量无明显差别,箬竹竹叶还原型维生素 C 低于淡竹.通过本次研究,初步了解到箬竹和淡竹竹叶中维生素 C 的含量,为进一步深入研究大熊猫的营养结构,以及人工饲养大熊猫更好的科学配制膳食提供了实验依据.

参考文献:

[1] 龙玉,曹焯,潘文石. 秦岭野生大熊猫对竹笋细胞壁的利用[J]. 北京大学学报,2002,38(4):576－581.
[2] 胡锦矗,夏勒,潘文石,等. 卧龙的大熊猫[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1985. 51－77.
[3] 潘文石,吕植,朱小健, 等. 继续生存的机会[M]. 北京: 北京大学出版社, 2001. 368－405.
[4]刘选珍. 圈养大熊猫主食低山竹类营养特点的初步研究[J]. 兽类学报,2001,21(4):314－317.
[5]汤纯香,张和民. 圈养繁殖在大熊猫保护生物学中的作用[J]. 四川动物,2001,20(2):91－93.
[6] 李军. 紫外分光光度法测定果蔬中的维生素 C[J]. 河北职业技术师范学院学报,2000,14(1):41－44.
[7] 杨森,魏国勤,吕志宏,等. 食用维生素——基础知识、定量方法[M]. 北京:中国环境科学出版社,1989. 135－139.
[8]《中国森林》编辑委员会. 中国森林(第 4 卷): 竹林、灌木林、经济林[M]. 北京: 中国林业出版社, 2000. 50－100.
[9] 刘志诚,于守洋. 营养与食品卫生学(第二版)[M]. 北京: 人民卫生出版社,1990. 56－59.

(责任编辑:杨 勇)

(上接第 52 页)

[5] 陈培基,李刘东,李来好,等. 利用小杂鱼、低值鱼提取浓缩鱼蛋白[J]. 湛江海洋大学学报,1999,19(1):38－43.
[6] Jens Adler-Nissen. Enzymic Hydrolysis of Food Protein[M]. London:London and New York Elsevier Applied Science Publishers, 1986.
[7] Cushman D W,Cheung H S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin converting enzyme of rabbit lung [J]. **Biochem Pharmol**,1971,20:1637－1648.
[8] 倪莉. 食品蛋白质新资源—废蚕丝蛋白的研究与开发[D] . 无锡:无锡轻工大学,1999.
[9] 曹文红,章超桦. 食品蛋白降血压肽及其酶法制备[J]. 食品科技,2002,(5):11－13.
[10] Nili,Daijun,Taoguanjun,*et al*. Preparation of a new functional food additive—ACE inhibitory peptides from libroin[A]. 第 4 届国际食品科学技术交流会组委会. food of 21st century-food and resource, technology, environment(II) [C]. 北京:中国轻工出版社,2000. 25－26.
[11] Richard L Soffer. Angiotensin-converting enzyme and the regulation of vasoactive peptides[J]. **Annu Rev Biochem**, 1976,45:73－94.

(责任编辑:杨 萌)

万方数据