

不同预处理对毛竹木质素抗氧化性的影响

黄曹兴^{1,2,3}, 房伶俐³, 赖晨欢^{1,3}, 唐硕^{1,3}, 梁辰², 李鑫^{1,3}, 勇强^{1,3*}

(1. 南京林业大学林业资源高效加工利用协同创新中心, 南京 210037; 2. 广西清洁化制浆造纸与污染控制重点实验室, 南宁 530004; 3. 南京林业大学化学工程学院, 南京 210037)

摘要: 采用核磁共振技术(2D-HSQC NMR 和定量³¹P NMR)分析毛竹木质素经稀硫酸法和硫酸盐法预处理后官能团含量和结构单元类型比例变化, 并对预处理前后木质素抗氧化性能(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)和超氧阴离子自由基清除能力)进行评价。核磁共振分析结果表明, 毛竹木质素(MWLr)经稀硫酸法和硫酸盐法预处理(MWL_a和KL), 紫丁香基单元摩尔含量比例从50.6%提高至68.8%和72.2%, 相连接的麦黄酮结构发生降解, 脂肪族羟基、酚羟基和羧基质量分数均增加。抗氧化性结果表明, MWLr, MWL_a和KL对DPPH自由基最大清除能力为79.59%, 75.57%和77.69%, 对超氧阴离子自由基最大清除能力为81.15%, 47.27%和74.53%。稀酸和硫酸盐法预处理降低毛竹原本木质素抗氧化能力可能是由于木质素结构中麦黄酮被降解和紫丁香基结构质量分数比例增加导致。

关键词: 毛竹木质素; 预处理; 核磁共振技术; 官能团; 抗氧化性

中图分类号: TQ358 文献标志码: A 文章编号: 2096-1359(2018)03-0073-08

Effects of different pretreatments on antioxidant activities of Moso bamboo lignin

HUANG Caoxing^{1,2,3}, FANG Lingyan³, LAI Chenhuan^{1,3}, TANG Shuo^{1,3},
LIANG Chen², LI Xin^{1,3}, YONG Qiang^{1,3*}

(1. Jiangsu Co-Innovation Center for Efficient Processing and Utilization of Forest Products, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Clean Pulp & Papermaking and Pollution Control, Nanning 530004, China; 3. College of Chemical Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: In this study, lignins in Moso bamboo and acid-pretreated bamboo were isolated according to the method developed by Bjorkman, termed as MWLr and MWL_a, respectively. Lignin in black liquor of pretreated bamboo by kraft pulping was precipitated by acid and termed as KL. Then, the obtained lignins (MWLr, MWL_a, and KL) were characterized by 2D heteronuclear single quantum correlation nuclear magnetic resonance (2D-HSQC NMR) and quantitative ³¹P NMR to analyze the effects of different pretreatments on the functional groups and types of lignin units in the resulting lignin. Meanwhile, the performance of above obtained lignins on the scavenging of superoxide anion free radical and 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) radical were investigated. Results from the NMR analysis showed that the percentage of syringyl units in bamboo lignin increased from 50.6% to 68.8% and 72.2% after it was pretreated by acid and kraft pulping, respectively. In addition, the pretreatments resulted in degradation of tricin and increase in the amounts of aliphatic hydroxyl groups, phenolic hydroxyl groups, and carboxylic acid groups in obtained lignin samples. It showed that the capabilities of MWLr, MWL_a, and KL to scavenge DPPH radical were up to 79.59%, 75.57%, and 77.69%, respectively. For superoxide anion free radical, the highest scavenging rates were 81.15%, 47.27%, and 74.53% that achieved by MWLr, MWL_a, and KL, respectively. These results indicated that the antioxidant activity of the obtained lignin decreased after it was pretreated by acid or kraft pulping process. The probable reasons for this result might be due to the degradation of tricin in lignin and the increased percentage of syringyl units in the lignin.

Keywords: Moso bamboo lignin; pretreatment; nuclear magnetic resonance; functional groups; antioxidant

收稿日期: 2017-10-13

修回日期: 2017-12-12

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31570561); 国家自然科学基金青年项目(31600463); 广西清洁化制浆造纸与污染控制重点实验室开放基金(KF201725); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)。

作者简介: 黄曹兴, 男, 讲师, 研究方向为生物质资源生物降解与转化。通信作者: 勇强, 男, 教授。E-mail: swhx@njfu.com.cn

木质素是一种以愈创木基(G)、紫丁香基(S)和对羟基苯丙烷(H)3种基本结构单元形成的具有三维网络结构的天然酚类高分子材料,具有酚羟基、醇羟基、羰基、甲氧基、羧基、共轭双键等活性基团^[1]。在工业中已广泛应用于表面活性剂、染料分散剂、橡胶补强剂等方面;在农业中广泛用于农药缓蚀剂、植物生长调节剂、饲料添加剂等方面;在医药行业中用于制备香兰素、抗癌药物等^[2-5]。近年来,研究人员发现木质素具有一定的生物活性,能较好地清除自由基、抗氧化和抗癌变,可作为抗氧化剂应用于化妆品和食品行业。

竹材生物炼制过程中,预处理过程产生的碱木质素和纤维糖化过程产生的酶解木质素一般被视为“垃圾”直接焚烧,不仅造成资源浪费,而且导致环境污染。因此,如能将工业木质素作为抗氧化剂进行应用,可提高其附加值。Li等^[6]和龚卫华等^[7]均发现,竹材提取的木质素抗氧化性高于人工合成的抗氧化剂二丁基羟基甲苯(BHT),说明竹材木质素具有抗氧化剂应用的潜力。张莹等^[8]发现硫酸盐木质素具有一定的抗氧化性,游离酚羟基对其抗氧化性有较大贡献;Sun等^[9]对酸处理竹子的木质素进行研究发现,该木质素具有的抗氧化性能高于抗氧化剂BHT,而弱于抗氧化剂对叔丁基羟基茴香醚(BHA);Vinardell等^[10]的研究结果表明,工业木质素对偶氮二异丁脒盐酸盐(AAPH)自由基具有良好的清除能力,应用于眼睛和皮肤时未发现毒害作用。在酸碱预处理过程中,竹材木质素由于发生碎片化和缩聚等反应,结构单元类型比例,酚羟基、醇羟基和羧基等含量与原本木质素有所差异,可能会表现出不同的抗氧化性能^[11]。因此,笔者研究了毛竹木质素在稀酸法和硫酸盐法预处理前后木质素结构变化与抗氧化性能差异,包括1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基清除能力和超氧阴离子自由基清除能力,以期竹材工业木质素制备木质素基抗氧化性材料的开发提供依据。

1 材料与方 法

1.1 主要材料

毛竹竹屑,福建何其昌竹业有限公司提供。化学成分为葡聚糖41.04%、木聚糖21.99%、木质素29.99%、苯-醇抽出物5.01%。

硫酸、盐酸、硫化钠、氢氧化钠、二氧六环、无水乙醇等购于南京化学试剂有限公司,均为化学纯;邻苯三酚、吡啶、氯代氯仿、N-羟基-5-降冰片烯-2,

3-二酰亚胺溶液、三价乙酰丙酮化铬、2-氯-1,3,2-二噁磷杂戊环和DMSO-d₆购于Sigma-Aldrich公司,均为分析纯;DPPH、邻苯三酚和Tris-HCl缓冲液购于Macklin公司,均为分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 脱蜡毛竹制备

毛竹竹屑经过粉碎机磨碎后取0.18~0.83 mm的粉末,置于索氏抽提仪(BUCHI B-811,瑞士)中,采用苯/乙醇(体积比2:1)脱蜡6 h,样品于60℃下烘干24 h,备用。

1.2.2 毛竹预处理

稀酸预处理在油浴锅中进行。取25 g绝干毛竹竹屑装入1 L不锈钢管式蒸煮器中,按固液比1:10(g:mL)加入质量分数为0.5%的硫酸溶液。在80℃下预浸20 min后,以2℃/min的速率升温至150℃,保温1 h。预处理结束后,用蒸馏水将物料洗涤至中性,60℃下烘干,用粉碎机磨碎后取0.18~0.83 mm粉末,备用。

硫酸盐法预处理在油浴锅中进行。取25 g绝干毛竹竹屑装入1 L不锈钢管式蒸煮器中,按固液比1:5(g:mL)加入含NaOH和Na₂S蒸煮液,其中硫化度为20%、碱用量为10%(指NaOH+Na₂S质量分数,以Na₂O计)。在80℃下预浸20 min后,以2℃/min的速率升温至150℃,保温1 h。反应结束后用布袋过滤蒸煮物料得到毛竹黑液。

1.2.3 毛竹木质素和预处理木质素的分离和纯化

毛竹和稀酸预处理毛竹的木质素分离和纯化方法参考文献[12]中方法进行。分别称取脱蜡竹屑和稀酸预处理的竹屑4 g,使用行星球磨仪(Pulverisette 7,Fritsch,德国)球磨5 h^[13]。球磨条件:将4 g原料置于80 mL氧化锆罐中,配备25个直径1 cm的氧化锆球,球磨频率为600 r/min。取10 g球磨竹粉,按固液比1:10(g:mL)加入二氧六环/水(体积比96:4)溶剂于30℃搅拌提取。提取24 h后,离心分离出上清液,残渣加入新鲜的二氧六环/水(体积比96:4)溶剂搅拌24 h,提取3次。合并3次的提取液,使用旋转蒸发仪(BUCHI R-10,瑞士)旋蒸出溶剂即得到粗木质素。按照每克木质素20 mL比例加入体积分数为90%的乙酸溶解粗木质素,将溶解液逐滴加入100 mL蒸馏水中,沉淀出木质素。过滤分离出沉淀的木质素,按照每克木质素10 mL比例加入二氯乙烷/乙醇(体积比2:1)溶解木质素。离心除去不溶物后,木质素溶液逐滴加入到100 mL乙醚中,沉淀出木质素;用200 mL乙醚洗涤、过滤沉淀木质素3次,然后用200 mL石油醚

洗涤、过滤1次;沉淀物自然风干后即得到毛竹磨木木质素(MWLr)和稀酸预处理毛竹磨木木质素(MWL_a)。

硫酸盐法预处理毛竹木质素从预处理黑液中得到。黑液用布氏漏斗再次过滤,除去细小的纤维颗粒。用稀硫酸调节黑液pH至2~3,沉淀出木质素,用水洗涤木质素pH至5~6。所得到沉淀木质素在室温下风干,经过Björkman方法^[12]纯化,得到硫酸盐木质素(KL)。

1.2.4 木质素DPPH自由基清除能力测定

取2 mL不同质量浓度(0.05~1.00 g/L)的木质素溶液于试管中,加入2 mL DPPH溶液(溶于无水乙醇,浓度0.2 mmol/L),混匀后在室温下避光反应30 min。反应结束后,于517 nm处测定吸光度(A_s)。以2 mL不同质量浓度(0.05~1.00 g/L)的木质素溶液(溶于体积分数90%二氧六环)和2 mL无水乙醇反应为对照组,以2 mL无水乙醇和2 mL DPPH溶液(溶于无水乙醇,浓度0.2 mmol/L)反应为空白组,进行同样操作,吸光度分别为 A_c 和 A_b 。以相同质量浓度的维生素C(Vc)做阳性对照,每个样品重复试验两次。DPPH自由基清除率(S_1)根据公式(1)计算。

$$S_1 = (1 - (A_s - A_c) / A_b) \times 100\% \quad (1)$$

式中: S_1 为DPPH自由基清除率; A_s 为木质素与DPPH的溶液吸光度; A_c 为木质素与无水乙醇的溶液吸光度; A_b 为无水乙醇与DPPH的溶液吸光度。

1.2.5 木质素超氧阴离子自由基清除能力测定

采用邻苯三酚自氧化法测定木质素对超氧阴离子自由基清除能力。取1 mL不同质量浓度(0.05~1.00 g/L)的木质素溶液于试管中,加入4.5 mL 0.05 mol/L (pH 8.2)的Tris-HCl缓冲液,在25℃下水浴预热20 min。取0.5 mL 45 mmol/L邻苯三酚溶液(25℃)加入试管中,迅速混匀,在5 min之内每隔30 s于325 nm处测定吸光度(A_s)。以蒸馏水代替邻苯三酚为对照组进行同样试验,吸光值为 A_c 。以蒸馏水代替木质素溶液为空白组进行同样试验,吸光值为 A_b 。以相同质量浓度的Vc做阳性对照,每个样品重复试验两次。超氧阴离子自由基清除率根据公式(1)计算。

1.3 分析方法

1.3.1 化学组成分析

毛竹原料、稀酸预处理毛竹提取的木质素和硫酸盐木质素的葡聚糖、木聚糖、木质素质量分数分析均按照美国能源部可再生能源实验室(NREL)的方法进行^[14]。

1.3.2 中性糖分析

木质素经过NREL方法酸水解后,水解液中的葡萄糖和木糖定量分析在高效液相色谱仪(Agilent 1260型,美国)上进行。采用Bio-Rad HPX-87H柱(7.8 mm×300 mm),柱温55℃,流动相5 mmol/L的硫酸,流速0.6 mL/min,上样量10 μL,示差折光检测器,采用外标法测定。

1.3.3 木质素二维碳氢相关谱(2D-HSQC)和定量磷谱(³¹P)分析

木质素样品的2D-HSQC和定量³¹P核磁共振谱图均采用布鲁克(德国)600 M超导核磁共振仪在30℃下进行采集。

2D-HSQC谱样品分析:称取20 mg木质素样品溶解在DMSO-d₆中。采样条件为¹H和¹³C的谱宽分别为3 497和18 750 Hz,¹H和¹³C采样点数分别为1 024和256个,¹H弛豫时间为1.5 s,扫描次数分别为128和257次。

³¹P谱样品分析:准确称取40 mg绝干木质素至核磁管中,加入0.5 mL吡啶/氘代氯仿(体积比1.6:1.0)溶液溶解木质素。加入0.2 mL内标试剂N-羟基-5-降冰片烯-2,3-二酰亚胺溶液(e-NHI, 9.23 mg/mL)和0.05 mL弛豫试剂三价乙酰丙酮化铬溶液(5.6 mg/mL)。充分混合后加入0.1 mL磷化试剂2-氯-1,3,2-二噁磷杂戊环进行磷化处理,15 min后分析。

2 结果与分析

2.1 木质素成分分析

木质纤维原料在稀酸预处理过程中,10%~20%木质素发生碎片化而溶解在预处理液中,而大部分木质素仍残留在预处理物料;在硫酸盐法预处理过程中,70%以上木质素发生碎片化而溶解在黑液中^[15-16]。本研究利用Björkman提出的磨木木质素方法^[12]从毛竹原料和酸预处理毛竹中得到原本木质素(MWLr)和酸预处理木质素(MWL_a),利用酸沉法从黑液中得到毛竹碱预处理木质素(KL)。3种木质素经过纯化后,成分分析结果如表1所示。由表1可知,MWLr、MWL_a和KL中碳水化合物质量分数较低,分别为3.94%、3.03%和1.88%。经过纯化后,这些残留的碳水化合物可能以苯苷键、苯醚键、酯键等形式与木质素相连,形成木质素-碳水化合物复合物(LCCs)。MWLr、MWL_a和KL中木质素质量分数分别为94.37%、93.95%和97.21%,高纯度的木质素有利于后续的结构表征与分析。

本木质素含有麦黄酮成分^[13]。但在 MWLa 和 KL 谱图的芳香环区未检测出麦黄酮结构的信号峰,说明在稀硫酸和硫酸盐法预处理过程中,毛竹木质素中麦黄酮结构发生降解。Lan 等^[22] 和 del Rio

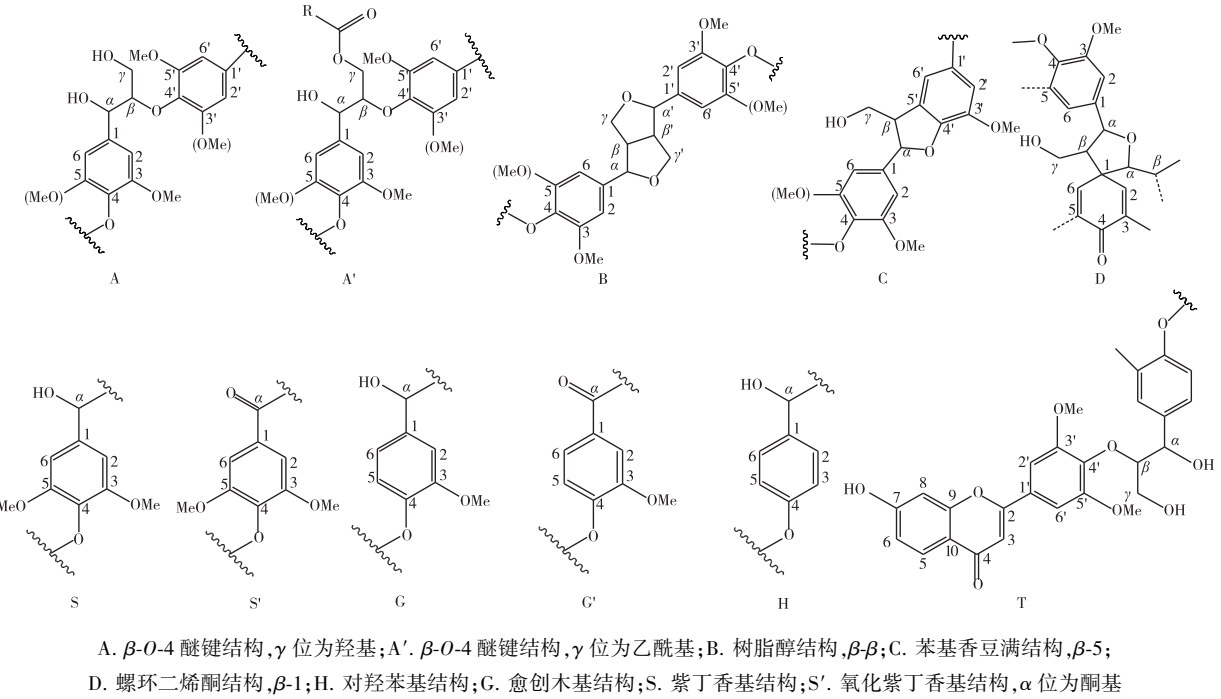


图 2 木质素样品基本连接键及木素结构单元

Fig. 2 The main structures and linkages in lignin

等^[23]的研究结果表明,在禾本科植物中,麦黄酮结构单体也参与木质素生物合成途径,主要以 β -O-4 芳基醚键与木质素相连。在稀硫酸法和硫酸盐法预处理过程中,毛竹木质素中与麦黄酮相连接的 β -O-4 芳基醚键可能发生断裂,麦黄酮从木质素上被脱出,从而使 MWLa 和 KL 成分中不含有麦黄酮成分。由于黄酮类物质在抗氧化反应中既能清除链引发阶段的自由基,还可以直接捕获自由基反应链中的自由基,阻断自由基链反应^[24]。因此,毛竹木质素经过预处理后麦黄酮成分的变化可能会影响其对自由基的清除,从而降低抗氧化性能。

2.3 定量磷谱分析

木质素自由基清除能力和抗氧化能力主要取决于其自身羟基和羧基等活性官能团含量^[25]。木质素经过不同预处理后,结构变化使其活性官能团含量差异较大,导致其抗氧化能力不同。因此,本研究利用定量核磁磷谱测定毛竹木质素经稀硫酸法和硫酸盐法预处理后脂肪族羟基、酚羟基和羧基的绝对摩尔含量 (mmol/g),定量核磁磷谱如图 3 所示。由图 3 可见, δ 152 为内标 (e-NHI) 信号峰, δ 150.8 ~ 145.0 为脂肪族羟基信号峰, δ 144.3 ~ 141.0 为缩合型酚羟基信号峰, δ 140.3 ~ 138.4 和 δ 138.4 ~ 137.2 为愈创木基木质素和对羟基苯基木质素的非缩合型酚羟基信号峰, δ 135.6 ~ 134.0 为羧基信号峰^[26]。

通过磷谱积分计算得到的官能团摩尔含量如表 2 所示。由表 2 可知, MWLa 脂肪族羟基质量摩

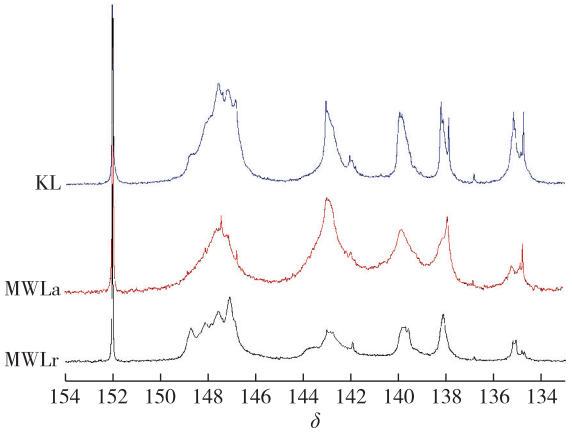


图 3 MWLr、MWLa 和 KL 定量核磁磷谱

Fig. 3 The quantitative ³¹P NMR spectra of MWLr, MWLa and KL

尔浓度 (1.27 mmol/g) 略高于 MWLr 脂肪族羟基质量摩尔浓度 (1.05 mmol/g)。这是由于木质素在酸性条件下, β -芳基醚键处于稳定状态, 仅少量发生断裂, 而 α -芳基醚键易断裂发生质子化, 因此, 使木质素的脂肪族羟基摩尔含量有所提高。KL 脂肪族羟基质量摩尔浓度 (3.21 mmol/g) 为 MWLa 摩尔含量的 3 倍左右, 表明竹材木质素经过硫酸盐法预处理后有大量的脂肪族羟基形成。这是因为在硫酸盐预处理过程中, 木质素结构的 α -O-4 和 β -O-4 芳基醚键在亲核试剂 HS⁻、S²⁻ 和 OH⁻ 作用下大量断裂, 从而导致溶出木质素的酚羟基摩尔含量升高^[27]。同时, α -O-4 和 β -O-4 芳基醚键断裂也会使

得木质素苯环结构的酚羟基摩尔含量增加。由表 2 可见,木质素经过稀硫酸法和硫酸盐法预处理后,总酚羟基摩尔含量从 1.82 mmol/g 分别提高至 2.81 和 3.48 mmol/g。MWLa 含有的缩合型酚羟基摩尔含量为 1.72 mmol/g,高于 KL 摩尔含量(1.65 mmol/g)。这可能是因为在酸性条件下木质素愈创木基单元苯环 5 号位碳原子与木质素分子侧链

的碳原子以 C—C 键结合发生缩合反应,从而导致木质素具有较高摩尔含量的缩合型酚羟基。毛竹木质素经过稀硫酸法和硫酸盐法预处理后,羧基摩尔含量从 0.26 mmol/g 分别提高至 0.92 和 1.41 mmol/g,可能由于木质素侧链上脂肪族羟基在预处理过程中发生一定的氧化反应所致^[21]。

表 2 MWLr、MWLa 和 KL 官能团摩尔含量
Table 2 Contents of functional groups in isolated lignins (MWLr, MWLa and KL) / (mmol · g⁻¹)

样品	羟基				羧基
	脂肪族	缩合型酚羟基	非缩合型酚羟基 ^a	总酚羟基 ^b	
MWLr	1.05	0.55	1.27	1.82	0.26
MWLa	1.27	1.72	1.09	2.81	0.92
KL	3.21	1.65	1.83	3.48	1.41

注:a 表示愈创木基木质素和对羟基苯基木质素的非缩合型酚羟基总和;b 表示缩合型酚羟基和非缩合型酚羟基总和。

2.4 自由基清除能力

自由基消除反应是抑制机体过氧化过程的主要机制之一,样品自由基清除能力反映其抗氧化性的高低,DPPH 是目前使用最广泛的自由基试剂之一^[28]。超氧阴离子自由基是所有活性氧中第 1 个

自由基,在体内经过一系列反应可产生氧化氢、羟自由基、过氧亚硝基阴离子等对身体有害的毒性物质^[29]。因此,笔者研究毛竹木质素经过稀酸法和硫酸盐法预处理之后对 DPPH 自由基和超氧阴离子自由基清除能力的差异,结果分别如图 4 和图 5 所示。

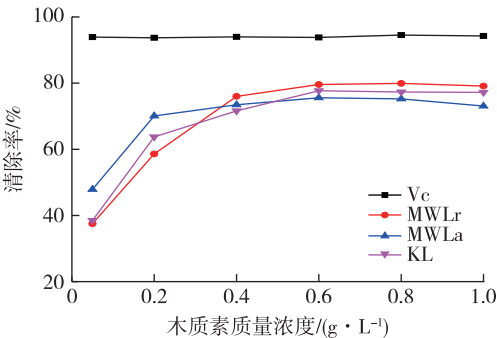


图 4 不同木质素浓度对 DPPH 自由基清除率的影响
Fig. 4 Effects of lignin concentrations on DPPH radical scavenging rate

从图 4 可以看出,Vc 作为对照组,其 DPPH 自由基清除能力明显高于毛竹原本木质素以及预处理木质素。当质量浓度为 0.05 g/L 时,Vc 对 DPPH 自由基清除能力达 90% 以上,而 3 种木质素的清除能力仅为 37.51%~47.88%。对于木质素而言,DPPH 自由基清除效果与样品浓度具有明显相关性。木质素质量浓度在 0.05~0.60 g/L 范围内时,随着样品浓度增加,对 DPPH 自由基清除能力也增强;当浓度高于 0.60 g/L 时,木质素对 DPPH 自由基清除能力趋于平稳。这与田维珍等^[28]研究杨木、玉米秸秆、芦苇和麦草的乙醇木质素抗氧化性结果一致,即当木质素样品浓度达到一定范围时,对 DPPH 自由基清除能力达到饱和。严明芳等^[30]在研究杨木碱木质素 DPPH 自由基去除能力

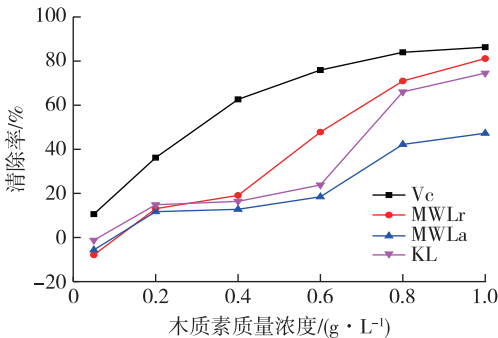


图 5 不同木质素浓度对超氧阴离子自由基清除率的影响
Fig. 5 Effects of lignin concentrations on superoxide anion free radical scavenging rate

时发现,当木质素质量浓度为 0.2 g/L 时清除能力达到稳定值,为 23.5%;田维珍等^[28]指出当木质素质量浓度为 0.4 g/L 时,杨木、玉米秸秆、芦苇和麦草的乙醇木质素对 DPPH 自由基清除率最高,分别为 70.0%,71.5%,68.6%和 60.7%;Sun 等^[9]研究毛竹竹材蒸汽爆破木质素对 DPPH 自由基去除能力时发现,木质素质量浓度为 0.4 g/L 时,不同处理条件得到的木质素对自由基清除能力在 41%~69%之间。IC₅₀(半抑制浓度)是指自由基清除率达到 50% 时所需样品的浓度,可用于评价样品抗氧化活性大小。从图 4 可以看出,MWLr、MWLa 和 KL 对 DPPH 自由基的 IC₅₀ 值分别为 0.13,0.11 和 0.07 g/L。MWLr 对 DPPH 自由基的最高清除率为 79.59%,高于 MWLa 和 KL(75.57%和 77.69%),说

明毛竹木质素经过稀酸预处理和硫酸盐法预处理后,抗氧化能力降低,原木木质素可能更具有做天然抗氧化剂的潜力。

从图5可见,Vc对超氧阴离子自由基具有较好的清除作用,随着Vc质量浓度的增加其对超氧阴离子自由基的清除率也增大,呈现一定的量效关系。当Vc质量浓度为0.8 g/L时,对超氧阴离子自由基的清除率可达80%以上。MWLr、MWLa和KL也表现出一定的超氧阴离子自由基清除能力,随着浓度增加而增大,但清除能力弱于Vc。当木质素质量浓度为0.05 g/L时,3种木质素的超氧阴离子自由基的清除率为负数,这与张盛明等^[31]分析 $\text{SO}_4^{2-}/\text{ZrO}_2$ 催化氢还原碱木质素的抗氧化能结果一致。这可能是由于超氧阴离子自由基清除试验基于邻苯三酚在碱性条件下会自氧化生成超氧阴离子自由基和中间产物,呈淡黄色,在325 nm处有吸收值。当加入抗氧化剂时可清除超氧阴离子,抑制淡黄色产物生成,从而降低其在325 nm处吸收值。木质素在325 nm处有一定的吸收值,同时在低浓度时对超氧阴离子清除能力较弱,反应速率可能高于邻苯三酚自氧化速率,因此清除率出现负值^[32]。在试验条件下,MWLr、MWLa和KL对超氧阴离子自由基的IC₅₀值分别为0.62,0.73和>1.0 g/L,说明MWLr的抗氧化活性最强。当质量浓度为1.0 g/L时,木质素表现出最大超氧阴离子自由基清除能力,MWLr、MWLa和KL的清除率分别为81.15%,47.27%和74.53%。毛竹木质素经过稀酸预处理和硫酸盐法预处理后,超氧阴离子自由基清除能力降低,清除强弱表现为MWLr>KL>MWLa。

抗氧化反应本质为发生电子转移的氧化还原反应,酚羟基和游离的羟基同时能够提供活泼的氢质子,进而影响抗氧化能力。因此,Dizhbite等^[25]指出,酚羟基和脂肪族羟基对木质素抗氧化性具有促进作用。在本研究中,KL的抗氧化性(DPPH自由基和超氧阴离子自由基清除能力)较MWLa的抗氧化性高,可能是因为KL具有更高的脂肪族羟基和酚羟基(表2)。MWLa和KL的总酚羟基摩尔含量高于MWLr的摩尔含量,MWLr的抗氧化性却最高,分析其原因可能为:1)苜蓿属麦黄酮是一类具有高活性的天然抗氧化剂^[32]。毛竹原本木质素具有麦黄酮成分,在稀酸和硫酸盐法预处理过程中,木质素中麦黄酮结构均发生降解(图1),导致其抗氧化能力可能比原本木质素低;2)木质素酚羟基的对位基团是丙烷基,邻位基团是甲氧基,这些基团均属于推电子基团,可增加苯环的电子密

度,从而有利于苯氧自由基的稳定。但在形成苯氧自由基之前甲氧基易与酚羟基形成分子内氢键,其抽氢反应要克服氢键键能,使其抗氧化活性降低,因此有1个甲氧基的愈疮木基结构(G)抗氧化活性强于有2个甲氧基的紫丁香基结构(S)^[33-34]。从图1的2D-HSQC谱图积分可知,毛竹木质素经过稀硫酸法和硫酸盐法预处理后,紫丁香基结构摩尔含量比例增加,从50.6%提高至68.8%和72.2%,导致其抗氧化能力可能比原本木质素抗氧化能力低。

3 结 论

1)毛竹木质素经过稀硫酸和硫酸盐法预处理后,所含有的苜蓿属麦黄酮结构发生降解,紫丁香基结构摩尔含量比例从50.6%提高至68.8%和72.2%,酚羟基摩尔含量从1.82 mmol/g分别提高至2.81和3.48 mmol/g,羧基摩尔含量从0.26 mmol/g分别提高至0.92和1.41 mmol/g。

2)MWLr、MWLa和KL对DPPH自由基最大清除能力为79.59%,75.57%和77.69%,对超氧阴离子自由基清除最大能力为81.15%,47.27%和74.53%。表明毛竹木质素经过预处理后抗氧化能力降低,原木木质素可能更具有做天然抗氧化剂的潜力。

3)毛竹木质素经过预处理后抗氧化能力降低,可能是含有的麦黄酮结构发生降解和紫丁香基结构含量比例增加所致。

参考文献(References):

- [1] 徐强,孙倩倩,赵新坤,等.工业碱木质素羟甲基化改性研究[J].林业工程学报,2017,2(3):90-96.
XU Q, SUN Q Q, ZHAO X K, et al. Study on hydroxymethylation of industrial lignin[J]. Journal of Forestry Engineering, 2017, 2(3): 90-96.
- [2] OUYANG X, KE L X, GUO Y X, et al. Sulfonation of alkali lignin and its potential use in dispersant for cement[J]. Journal of Dispersion Science and Technology, 2009, 30(1): 1-6.
- [3] PANG Y X, QIU X Q, YANG D J, et al. Influence of oxidation, hydroxymethylation and sulfomethylation on the physicochemical properties of calcium lignosulfonate[J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2008, 312(2/3): 154-159.
- [4] YANG D J, QIU X E, ZHOU M S, et al. Properties of sodium lignosulfonate as dispersant of coal water slurry[J]. Energy Conversion and Management, 2007, 48(9): 2433-2438.
- [5] GOSSELINK R A, SNIJDER M B, KRANENBARG A, et al. Characterisation and application of Novafiber lignin[J]. Industrial Crops and Products, 2004, 20(2): 191-203.
- [6] LI M F, SUN S N, XU F, et al. Microwave-assisted organic acid extraction of lignin from bamboo: structure and antioxidant

- activity investigation[J]. Food Chemistry, 2012, 134(3): 1392-1398.
- [7] 龚卫华, 冉占祥, 向卓亚, 等. 笋壳醋酸木质素的提取及抗氧化活性研究[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(11): 225-230.
- GONG W H, RAN Z X, XIANG Z Y, et al. Extraction and antioxidant activities of lignin from bamboo shoot shell[J]. Food and Fermentation Industries, 2016, 42(11): 225-230.
- [8] 张莹, 雷中方. 造纸黑液提取木质素的抗氧化性研究[J]. 复旦学报(自然科学版), 2010, 49(1): 60-65.
- ZHANG Y, LEI Z F. Study on antioxidant activity of lignin from pulping black liquor[J]. Journal of Fudan University (Natural Science), 2010, 49(1): 60-65.
- [9] SUN S L, WEN J L, MA M G, et al. Structural features and antioxidant activities of degraded lignins from steam exploded bamboo stem[J]. Industrial Crops and Products, 2014, 56(3): 128-136.
- [10] VINARDELL M P, UGARTONDO V, MITJANS M. Potential applications of antioxidant lignins from different sources[J]. Industrial Crops and Products, 2008, 27(2): 220-223.
- [11] 邓嘉雯, 杨海艳, 史正军, 等. 超声-弱碱协同作用下巨龙竹木质素的分离及表征[J]. 林业工程学报, 2017, 29(2): 64-69.
- DENG J W, YANG H Y, SHI Z J, et al. Isolation and structural characterization of lignin isolated from *Dendrocalamus sinicus* by ultrasonic-alkaline treatment[J]. Journal of Forestry Engineering, 2017, 29(2): 64-69.
- [12] BJÖRKMÄN A. Isolation of lignin from finely divided wood with neutral solvents[J]. Nature, 1954, 174(4440): 1057-1058.
- [13] HUANG C X, HE J, DU L T, et al. Structural characterization of the lignins from the bamboo green and bamboo yellow of bamboo culm (*Phyllostachys pubescens*) [J]. Journal of Wood Chemistry and Technology, 2016, 36(3): 157-172.
- [14] SLUITER A, RUIZ R, SCARLATA C, et al. Determination of extractives in biomass [R]. Laboratory Analytical Procedure (LAP), 2005-07-17.
- [15] NARRON R H, KIM H, CHANG H M, et al. Biomass pretreatments capable of enabling lignin valorization in a biorefinery process[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2016, 38: 39-46.
- [16] HUANG C X, HE J, LI X, et al. Facilitating the enzymatic saccharification of pulped bamboo residues by degrading the remained xylan and lignin-carbohydrates complexes [J]. Biore-source Technology, 2015, 192: 471-477.
- [17] WEN J L, SUN S L, XUE B L, et al. Quantitative structural characterization of the lignins from the stem and pith of bamboo (*Phyllostachys pubescens*) [J]. Holzforschung, 2013, 67(6): 613-627.
- [18] VILLAVARDE J J, LI J B, MONICA E K, et al. Native lignin structure of *Miscanthus x giganteus* and its changes during acetic and formic acid fractionation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(14): 6262-6270.
- [19] KIM H, RALPH J. Solution-state 2D NMR of ball-milled plant cell wall gels in DMSO-d₆/pyridine-d₅ [J]. Organic & Biomolecular Chemistry, 2010, 8(3): 576-591.
- [20] 黄曹兴, 何娟, 闵斗勇, 等. 稀硫酸预处理对毛竹竹黄木质素结构的影响[J]. 林业工程学报, 2016, 1(1): 55-60.
- HUANG C X, HE J, MIN D Y, et al. Effect of dilute acid pretreatment on the lignin structure of Moso bamboo inner skint[J]. Journal of Forestry Engineering, 2016, 1(1): 55-60.
- [21] WEN J L, SUN S L, YUAN T Q, et al. Structural elucidation of lignin polymers of *Eucalyptus* chips during organosolv pretreatment and extended delignification[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(46): 11067-11075.
- [22] LAN W, LU F C, REGNER M, et al. Tricin, a flavonoid monomer in monocot lignification [J]. Plant Physiology, 2015, 167(4): 1284-1295.
- [23] del RIO J C, RENCORET J, PRINSEN P, et al. Structural characterization of wheat straw lignin as revealed by analytical pyrolysis, 2D-NMR, and reductive cleavage methods [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(23): 5922-5935.
- [24] 陈季武, 朱振勤, 杭凯, 等. 八种天然黄酮类化合物的抗氧化构效关系[J]. 华东师范大学学报(自然科学版), 2002(1): 90-95.
- CHEN J W, ZHU Z Q, HANG K, et al. Relationship between structure and activity of eight natural flavonoids against oxidation [J]. Journal of East China Normal University (Natural Science), 2002(1): 90-95.
- [25] DIZHBITE T, TELYSHEVA G, JURKJANE V, et al. Characterization of the radical scavenging activity of lignins-natural antioxidants [J]. Biore-source Technology, 2004, 95: 309-317.
- [26] CUI C Z, SUN R K, ARGYROPOULOU D S. Fractional precipitation of softwood kraft lignin: isolation of narrow fractions common to a variety of lignins [J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2014, 2(4): 959-968.
- [27] 李佩慈, 张美云, 董浩, 等. 蒸煮助剂的制备及其在竹材制浆中的应用[J]. 造纸科学与技术, 2013(4): 49-52.
- LI P Y, ZHANG M Y, DONG H, et al. Preparation and application of cooking additive on bamboo pulping [J]. Paper Science and Technology, 2013(4): 49-52.
- [28] 田维珍, 周景辉. 4种乙醇木质素的抗氧化活性[J]. 大连工业大学学报, 2016, 35(6): 437-440.
- TIAN W Z, ZHOU J H. The antioxidant activities of four ethanol lignin [J]. Journal of Dalian Polytechnic University, 2016, 35(6): 437-440.
- [29] HALLIWELL B, ZENTELLA A, GOMEZ E O, et al. Antioxidants and human disease: a general introduction [J]. Nutrition Reviews, 1997, 55(1): S44.
- [30] 严明芳, 李家佩, 布志宇. 杨木木质素的提纯及其抗氧化性能研究[J]. 化学工程与装备, 2016(5): 3-5.
- [31] 张盛明, 刘亮, 马艳丽, 等. SO₄²⁻/ZrO₂ 催化氢还原碱木质素的抗氧化性能[J]. 功能材料, 2014, 45(13): 13071-13075.
- ZHANG S M, LIU L, MA Y L, et al. Antioxidant activity of hydrogen-reduced alkali lignin prepared using SO₄²⁻/ZrO₂ as catalyst [J]. Journal of Functional Materials, 2014, 45(13): 13071-13075.
- [32] 乐薇, 吴士筠. 热浸法提取箬竹叶总黄酮的动力学试验[J]. 林业科技开发, 2015, 29(4): 106-109.
- YUE W, WU S J. Kinetic research on extraction of total flavonoids from leaves of *Indocalamus tessellatus* by hot dipping [J]. China Forestry Science and Technology, 2015, 29(4): 106-109.
- [33] Van ACKER S A B E, KOYMANS L M H, BAST A. Molecular pharmacology of vitamin E: structural aspects of antioxidant activity [J]. Free Radical Biology and Medicine, 1993, 15(3): 311-328.
- [34] 郑秋闯, 范晶晶, 许凯, 等. 木质素结构在聚丙烯中抗氧化作用的影响[J]. 实验室研究与探索, 2013, 32(6): 8-11.
- ZHENG Q K, FAN J J, XU K, et al. Effect of lignin structure on antioxidation in polypropylene [J]. Research and Exploration in Laboratory, 2013, 32(6): 8-11.