

石雪萍, 李小华, 杨爱萍. 南京雨花茶中总黄酮提取以及 DPPH 自由基清除活性研究[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(6): 238–240.

南京雨花茶中总黄酮提取以及 DPPH 自由基清除活性研究

石雪萍, 李小华, 杨爱萍

(江苏经贸职业技术学院工程技术学院/江苏省食品安全工程技术研究开发中心, 江苏南京 210007)

摘要:通过正交试验优化了南京雨花茶的提取工艺, 结果表明用乙醇浸提法提取南京雨花茶总黄酮的最佳工艺条件为浸提温度 80 ℃、料液比 1 g : 30 mL、乙醇浓度 70%、浸提时间 2.5 h。通过 DPPH 自由基清除试验研究了雨花茶总黄酮的抗氧化活性, 结果表明雨花茶黄酮具有一定的抗氧化活性, 且随着浓度升高, 抗氧化性能增强。

关键词:雨花茶; 总黄酮; 提取工艺; DPPH · 自由基; 抗氧化活性

中图分类号: TS202.3; R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2013)06–0238–03

雨花茶是南京特产, 是全国十大名茶之一, 因产于南京中华门外的雨花台而得名。雨花茶茶叶外形圆绿, 如松针, 带白毫, 紧直, 冲泡后茶色碧绿、清澈, 香气清幽^[1]。

黄酮类化合物是一类重要的广泛存在于自然界的天然有机化合物, 约有 20% 的中草药含有黄酮类化合物, 可见其资源之丰富。黄酮类化合物对人类健康有重要作用, 近几年的研究证实它具有特殊的生物效能。现代大量科学研究证实, 茶叶中含有与人体健康密切相关的生化成分, 主要为黄酮类。茶叶中黄酮(亚硝酸钠–硝酸铝体系)含量主要在 7% ~ 10%^[2]。目前国内外对南京雨花茶的研究多集中在茶叶的加工、栽培种植方面, 而对雨花茶中有效成分的提取等的研究鲜见报道。

DPPH · 是一种非常稳定的人工合成自由基, 其甲醇溶液

显紫色, 最大吸收波长范围在 515 ~ 528 nm^[3]。当抗氧化剂与 DPPH · 反应时, 抗氧化剂提供 1 个电子与 1 个 DPPH · 自由基配对结合, 使 DPPH · 的特征紫色消失, 可根据吸光度的变化测抗氧化剂的活性^[4]。DPPH 法能测定为数众多的天然抗氧化剂而不受葡萄糖等干扰。因此, 通过吸光度的变化可以衡量试样清除自由基的能力^[5]。本试验通过优化雨花茶的提取工艺, 得出了最佳的提取条件, 并对雨花茶总黄酮进行 DPPH 自由基清除试验, 为雨花茶的进一步开发利用提供了一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

材料:雨花茶, 购于南京市苏果超市, 经鉴定为南京地产雨花茶品种, 粉碎备用。

试剂:芸香苷对照品(中国药品生物制品检定所), DPPH (1, 1–二苯–2–苦肟基, Sigma 公司), 试剂均为分析纯。

仪器:751 分光光度计(上海精科实业有限公司); HH–4

社, 1986.

[3] 楼凤昌, 马琴玉, 杜方麓. 灵香草化学成分的研究[J]. 中国药科大学学报, 1989, 20(1): 37–39.

[4] 黄新安, 杨仁洲. 珍珠菜属植物三萜类化合物研究进展[J]. 热带亚热带植物学报, 2007, 15(2): 175–182.

[5] 徐小丽, 曹雁平. 超声技术在食品工业中的研究进展[J]. 食品科技, 2006(7): 1–4.

[6] 杨瑞云, 李 远, 梁凤琴, 等. 正交试验法优化灵香草中总皂苷提取工艺[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(11): 16–19.

[7] 蒋彦婕, 吴纪中, 张巧凤, 等. 紫小麦麸皮花色苷提取工艺及其结构[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(5): 1146–1151.

[8] Dietrich K, Marco Z, Volker H, et al. Applications and potential of ultrasonics in food processing[J]. Trends in Food Science and Technology, 2004, 15(5): 261–266.

[9] 纵 伟, 李翠琴, 赵光远, 等. 桔梗皂苷超声提取工艺优化研究[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(6): 244–247.

[10] 李 健, 张令文, 刘 宁. 超声波提取苦瓜总皂苷的研究[J]. 化学世界, 2007, 16(2): 104–106.

收稿日期: 2012–12–11

作者简介: 石雪萍(1974—), 女, 河南南阳人, 博士, 副研究员, 主要从事营养与食品功能成分研究。E-mail: stbdw@126.com。

时间仅需 40 min, 因此从节能和经济角度来看, 超声波辅助提取方法优于乙醇浸提法。

3 结论

通过对提取温度、提取时间、超声波功率、料液比的单因素试验和正交试验, 确定超声波辅助提取香灵草总皂苷的最佳工艺为: 提取温度 50 ℃, 提取时间 40 min, 超声波功率 400 W, 料液比为 1 g : 30 mL。各因素对香灵草总皂苷提取效果影响的顺序依次为: 提取温度 > 超声功率 > 提取时间 > 料液比, 其中提取温度对提取率的影响显著。与乙醇浸提法相比, 超声波辅助提取法香灵草总皂提取率高, 提取时间短。

参考文献:

[1] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴: 第三册[M]. 北京: 科学出版社, 1974.

[2] 江苏新医学院. 中药大辞典: 下册[M]. 上海: 上海科学技术出版

数显恒温水浴锅(江苏省金坛市江南仪器厂);高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司);电子天平(上海精密科学仪器有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 总黄酮含量的测定

采用铝盐显色法^[6](亚硝酸钠-硝酸铝体系)测定。精确称取九水合硝酸铝 44.0 g 于烧杯中,用少量水溶解后转移至 250 mL 容量瓶中,用蒸馏水定容,配成 10% 的溶液。分别配制 5% 的亚硝酸钠和 10% 的氢氧化钠溶液于试剂瓶中,待用。

分别准确吸取 0.2 mg/mL 的芸香苷溶液 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL 于 20 mL 的干净试管中,各管均加 5% 亚硝酸钠溶液 1.0 mL,混匀,放置 6 min;加 10% 硝酸铝溶液 1.0 mL,摇匀,放置 6 min;加 10% 氢氧化钠试液 10 mL,用乙醇补齐至 20 mL 摇匀,静置 15 min 后测定吸光度。以吸光度为纵坐标,芸香苷质量为横坐标,绘制校正曲线。

1.2.2 提取液中总黄酮测定

精确称取干燥粉碎的雨花茶粉末 2.0 g,置于 150 mL 锥形瓶中,加入一定浓度的乙醇,在设定条件下提取,抽滤取滤液,按照“1.2.1”步骤测定滤液的吸光度。根据标准曲线求出黄酮总量。黄酮得率的计算公式如下:

总黄酮得率 = 提取液中黄酮总量/雨花茶原料重 × 100%。

1.2.3 单因素试验

分别以乙醇浓度、提取温度、提取时间、料液比为变量,固定其他因素,考察不同因素和总黄酮得率的关系。

1.2.4 正交试验

以料液比、乙醇浓度、提取时间、提取温度为变量,总黄酮得率为指标,考察这 4 个因素对总黄酮得率的影响。在单因素试验的基础上,以提取温度、提取时间、乙醇浓度、料液比 4 个因素进行正交试验,优化提取工艺。正交试验的因素水平见表 1。

表 1 总黄酮提取正交试验的因素与水平

水平	因素			
	A:提取温度(℃)	B:提取时间(h)	C:乙醇浓度(%)	D:料液比(g:mL)
1	60	1.5	60	1:20
2	70	2.0	70	1:25
3	80	2.5	80	1:30

1.2.5 DPPH 自由基清除能力

参考 Amarowicz 等的方法^[7]进行试验。精确称取 49.3 mg DPPH,用甲醇定容至 250 mL,得 5×10^{-4} mol/L DPPH 溶液。将雨花茶黄酮提取物及维生素 C 溶解于甲醇中,制得浓度为 0.01、0.025、0.05、0.10、0.15、0.20 mg/mL 的样品溶液。添加 5×10^{-4} mol/L 的 DPPH 溶液 2.0 mL,各样品溶液 2 mL,25 ℃ 下静置 30 min,于 517 nm 处测定吸光度。根据下式计算样品对 DPPH· 的清除率。

样品对 DPPH· 的清除率 = $(1 - D_1/D_0) \times 100\%$

式中: D_0 为未加样的 DPPH(2.0 mL DPPH + 2.0 mL 甲醇)溶液的吸光度; D_1 为样品与 DPPH· 反应后的吸光度。

2 结果与分析

2.1 标准曲线建立

按照“1.2.1”的方法制作标准曲线。回归方程为 $y =$

$0.546 2x - 0.016 4$,相关系数 $r^2 = 0.999 0$ 。其中 y 为吸光度, x 为样品中总黄酮相当于芸香苷的量(mg)。

2.2 单因素试验结果

2.2.1 提取温度对总黄酮得率的影响

称取茶叶粉 2.0 g,固定料液比为 1 g : 20 mL,以 60% 乙醇作为提取剂,在不同温度下提取 1 h。从图 1 可以看出,提取温度由 40 ℃ 升至 70 ℃ 时,总黄酮得率有较大增长,但由 70 ℃ 升至 80 ℃ 时,增长速度变化趋于平缓,说明 70 ~ 80 ℃ 已经可以提取出大部分雨花茶总黄酮。

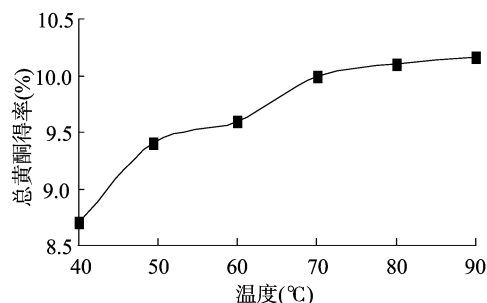


图1 提取温度对总黄酮提取的影响

2.2.2 提取时间对雨花茶总黄酮得率的影响

称取茶叶粉 2.0 g,固定料液比为 1 g : 20 mL,以 60% 乙醇作为提取剂,在 60 ℃ 下提取 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h。由图 2 可知,提取时间在 0.5 ~ 3.0 h 时,总黄酮得率呈上升趋势;但提取时间超过 2.0 h,黄酮得率增加不明显。考虑到提取时间过长,杂质成分的溶解也会随之增加,使吸光度发生干扰,并会给后续纯化造成困难,因此提取时间暂定为 2.0 h。

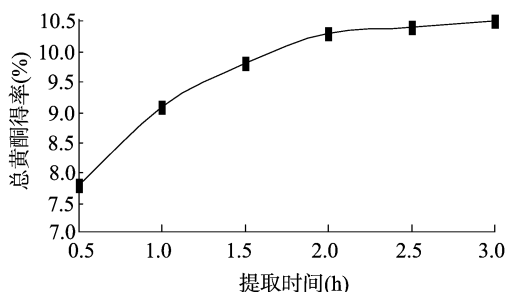


图2 提取时间对总黄酮提取的影响

2.2.3 乙醇浓度对雨花茶总黄酮得率的影响

称取茶叶粉 2.0 g,固定料液比 1 g : 20 mL,在 60 ℃ 下用不同浓度的乙醇提取 1.0 h。由图 3 可以看出,乙醇浓度从 40% 增至 70%,总黄酮得率随之不断增加;之后随着乙醇浓度继续增加,总黄酮得率开始降低,故暂定乙醇浓度为 70%。

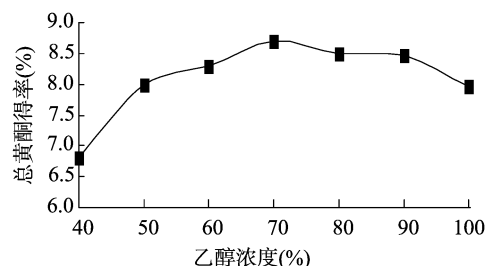


图3 乙醇浓度对总黄酮提取的影响

2.2.4 料液比对雨花茶总黄酮得率的影响

称取茶叶粉

2.0 g,以 70% 乙醇作为提取剂,在 70 ℃ 下以不同料液比提取 1.0 h。由图 4 可以看出,当料液比大于 1 g : 20 mL 时,雨花茶总黄酮得率增大不明显,故暂定料液比为 1 g : 20 mL。

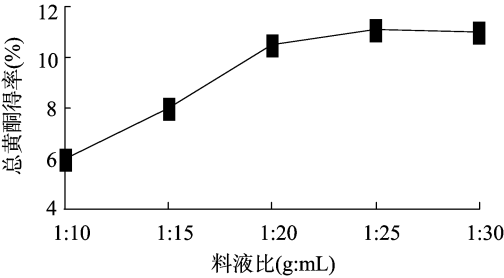


图4 料液比总黄酮提取的影响

2.3 正交试验结果

根据单因素试验结果,确定以乙醇浓度、提取温度、提取时间、料液比等 4 个因素进行正交试验,以测定雨花茶提取物中的总黄酮含量,结果见表 2。

表 2 南京雨花茶总黄酮提取正交试验结果

试验号	因素				总黄酮得率 (%)
	A:提取温度	B:提取时间	C:乙醇浓度	D:料液比	
1	1	1	1	1	9.7
2	1	2	2	2	10.3
3	1	3	3	3	11.0
4	2	1	2	3	10.9
5	2	2	3	1	9.6
6	2	3	1	2	10.7
7	3	1	3	2	10.8
8	3	2	1	3	11.1
9	3	3	2	1	10.4
k ₁	10.3	10.5	10.50	9.9	
k ₂	10.4	10.3	10.53	10.6	
k ₃	10.8	10.7	10.47	11.0	
R	0.5	0.4	0.06	1.1	

由表 2 分析结果可以看出,4 种因素对总黄酮提取的影响程度依次 D > A > B > C,其中料液比的影响最为显著,乙醇体积分数影响最小。总黄酮最佳提取工艺为 A₃B₃C₂D₃,即乙醇浓度为 70%、料液比为 1 g : 30 mL、提取时间为 2.5 h、提取温度为 80 ℃。

以提取温度 80 ℃、提取时间 2.5 h、乙醇浓度 70%、料液比 1 g : 30 mL 为固定条件进行验证试验,提取 3 次,雨花茶总黄酮得率分别为 11.2%、11.4%、11.3%,平均为 11.3%,高于上述任何一组试验。

2.4 雨花茶总黄酮对 DPPH · 的清除效果

按照“1.2.5”描述的方法测定雨花茶总黄酮对 DPPH · 自由基的清除率,并和维生素 C 作比较,结果见图 5。

从图 5 可以看出,维生素 C 和雨花茶总黄酮对 DPPH · 都有良好的清除效果。在低浓度范围内,清除率呈线性增长;浓度达到 0.2 mg/mL 后清除率基本不变,维生素 C 和雨花茶总黄酮对 DPPH · 清除率均随浓度升高而增加,雨花茶总黄

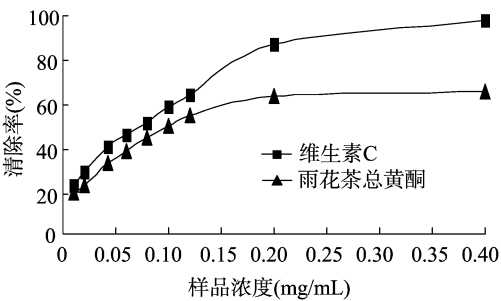


图5 雨花茶总黄酮的DPPH · 清除能力

酮自由基清除率低于维生素 C。说明雨花茶总黄酮具有较好的自由基清除效果,但比维生素 C 弱,IC₅₀ 达到 0.05 mg/mL。

3 结论

通过对南京雨花茶总黄酮提取工艺的单因素试验和正交试验分析,确定了雨花茶总黄酮提取的最佳工艺为乙醇浓度 70%、料液比为 1 g : 30 mL、提取时间为 2.5 h、提取温度 80 ℃,此时平均总黄酮得率为 11.3%,比苦丁茶^[8]、油茶叶^[9]的总黄酮提取得率都要高。

DPPH · 自由基清除试验结果显示,雨花茶总黄酮提取物对 DPPH 自由基具有较强的清除效果,且随浓度升高,清除率增加。雨花茶总黄酮对 DPPH · 自由基有清除作用,说明雨花茶总黄酮有一定的抗氧化作用,该结果为雨花茶提取物在食品和药品领域的利用开发提供了依据。

参考文献:

[1] 王建荣,吴胜天. 中国名茶品鉴[M]. 济南:山东科学技术出版社,2005.

[2] 何书美,刘敬兰. 茶叶中总黄酮含量测定方法研究[J]. 分析化学 2007,35(9):1365-1368.

[3] Sultana B, Anwar F, Przybylski R. Antioxidant activity of phenolic components present in barks of *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia nilotica* and *Eugenia jambolana* Lam. trees[J]. Food Chem, 2007,104(3):1106-1114.

[4] He C H, Ji X W, Pan Y M, et al. Antioxidant activity of alcoholic extract of *Agrimonia pilosa* Ledeb[J]. Med Chem Res,2010,19(5):448-461.

[5] 方玉梅,谭 萍,王毅红,等. 苦荞麦苗黄酮类化合物清除二苯代苦味酰肼自由基的作用[J]. 贵州农业科学,2009,37(7):21-23.

[6] 石雪萍,张卫明,钱近春,等. 均匀设计法优选葱白总黄酮提取工艺[J]. 食品工业科技,2009,30(2):187-188.

[7] Amarowicz R, Żegarska Z, Rafalowski R, et al. Antioxidant activity and free radical - scavenging capacity of ethanolic extracts of thyme, oregano, and marjoram[J]. Eur J Lipid Sci Technol,2009,111(11):1111-1117.

[8] 张毅贞,李鉴明,李 宁. 苦丁茶叶中总黄酮的含量测定[J]. 广西中医药学报,1999,16(2):71-72.

[9] 李姣娟,龚建良,周尽花,等. 油茶叶总黄酮的提取及其抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发,2008,29(12):93-95.