

藤茶总多酚的提取及其抗氧化活性研究

陈根洪

(湖北民族学院生物科学与技术学院, 湖北 恩施 445000)

摘要: 采用溶剂提取法对藤茶总多酚物质的提取工艺条件及其抗氧化能力进行研究。结果表明, 藤茶总多酚的最佳提取条件为体积分数 50% 丙酮溶液、料液比 1:25(g/mL)、75℃提取 1.5h, 此时总多酚得率 21.82%。藤茶总多酚有较强的还原能力, 对超氧阴离子自由基、羟自由基和 DPPH 自由基均有良好的清除效果, 并呈明显的量效关系。

关键词: 藤茶; 总多酚; 提取; 抗氧化

Extraction and Antioxidant Activity of Total Polyphenols from *Ampelopsis grossedendata*

CHEN Gen-hong

(Institute of Bioscience and Technology, Hubei University for Nationalities, Enshi 445000, China)

Abstract: The extraction and antioxidant activity of total polyphenols from *Ampelopsis grossedendata* were studied in this paper. The optimal extraction conditions were achieved to be extraction at 75 °C for 1.5 h with a 25-fold volume of 50% acetone aqueous solution as the extraction solvent. Under the optimal extraction conditions, the yield of total polyphenols was 21.82%. Total polyphenols from *Ampelopsis grossedendata* showed high reducing power and excellent scavenging effect on hydroxyl, superoxide anion and DPPH free radicals in a dose-dependent manner.

Key words: *Ampelopsis grossedendata*; total polyphenols; extraction; antioxidant activity

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)06-0127-04

藤茶为显齿蛇葡萄[*Ampelopsis grossedentata* (Hand. Mazz) W.T.Wang]的嫩茎叶制成的代用茶, 又名甜树茶、甜茶藤、茅岩莓茶等^[1]。显齿蛇葡萄是葡萄科蛇葡萄属木质藤本药食两用植物, 广泛分布于湖南、湖北、福建、广东和广西等省区, 该植物总黄酮高, 尤以二氢杨梅素含量丰富, 我国不同地区的藤茶总黄酮含量在 36%~45% 之间^[2-5]。目前关于藤茶功能成分的研究主要集中在藤茶黄酮和多糖方面, 有关藤茶多酚的研究报道不多。

植物多酚具有较强的抗氧化性和清除自由基的能力。现代药理研究发现, 植物多酚具有良好的抑菌、抗癌、抗氧化等生物活性^[6-7]。本实验对藤茶总多酚的提取及其抗氧化性质进行初步探讨, 旨在为藤茶资源的综合开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

藤茶 湖北省来凤县凤鸣藤茶公司。

DPPH 自由基 日本东京化成工业株式会社; 没食子酸 天津科密欧化学试剂公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 样品处理及藤茶总多酚提取

经粉碎、过 20 目筛的藤茶粉末, 再经石油醚脱脂脱色、干燥, 密封保存备用。

藤茶总多酚提取工艺: 藤茶粉末→回流提取→离心→粗提液→浓缩→放置澄清→离心→藤茶总多酚溶液。

藤茶总多酚提取在对溶剂、温度、时间和料液比的单因素试验基础上, 选取时间、温度和料液比进行 3 因素 3 水平 $L_9(3^4)$ 的正交试验。

1.2.2 藤茶总多酚含量的测定

酒石酸亚铁比色法^[8]。以没食子酸为标准品, 标准曲线方程为 $y=0.5823x+0.0046$ 。

吸取一定体积的藤茶总多酚溶液于 25mL 容量瓶中, 加入 4mL 蒸馏水, 再加入酒石酸亚铁溶液 5mL, 用 pH7.5

收稿日期: 2010-06-28

基金项目: 湖北省自然科学基金项目(2006ABA036); 湖北省科技厅创新团队项目(2009CDA155)

作者简介: 陈根洪(1968—), 男, 副教授, 硕士, 研究方向为天然产物与食品贮藏保鲜。E-mail: chengh6872@163.com

的磷酸缓冲溶液定容, 摇匀, 在波长 540nm 处测定吸光度。计算藤茶总多酚得率:

$$W/\% = \frac{0.0046 \times A \times V_2}{0.5823 \times V_1 \times m \times 1000} \times 100$$

式中: W 为藤茶总多酚得率/%; A 为样品的吸光度 A_{540nm} ; V_1 为测定时吸取样品的体积/mL; V_2 为样品总多酚溶液定容后的体积/mL; m 为藤茶粉末质量/g。

1.2.3 藤茶多酚的抗氧化活性研究^[9-11]

按 1.2.1 节提取工艺路线制备藤茶总多酚溶液(浓缩后的上清液), 测定其总多酚含量, 作为抗氧化活性测定的藤茶多酚样品, 放入冰箱中避光保存备用。

1.2.3.1 样品还原能力的测定

取 2.5mL 样品液、2.5mL 0.2mol/L PBS(pH6.6)和 2.5mL 1% $K_3[Fe(CN)_6]$ 于试管中混匀, 在 50℃ 水浴中反应 20min, 速冷后加入 2.5mL 10% TCA, 混匀后 3000r/min 离心 10min, 取 5mL 上清液, 加入 1mL 0.1% $FeCl_3$ 混匀, 再加 4mL 蒸馏水摇匀后, 以蒸馏水调零测定吸光度(A_{700nm})。以 VC 为阳性对照, 藤茶总多酚样品稀释液质量浓度: 0、10、20、30、40、50 $\mu g/mL$ 。

1.2.3.2 样品对羟自由基清除率的测定

利用 H_2O_2 对 Fe^{2+} 混合产生 $\cdot OH$, 在体系内加入水杨酸捕捉 $\cdot OH$ 并产生有色物质, 该物质在波长 510nm 处有最大吸收。用 2mL 不同质量浓度的总多酚稀释液加入反应体系, 再加入 H_2O_2 溶液启动反应, 37℃ 反应 0.5h。以蒸馏水为参比, 在波长 510nm 处测定各质量浓度样品的吸光度(考虑到多酚本身吸光度, 以 2mL 9mmol/L $FeSO_4$ 、2mL 水杨酸-乙醇溶液及 2mL 不同质量浓度的多酚溶液作为本底吸收)。藤茶总多酚稀释液质量浓度: 0.05、0.10、0.20、0.50、1.00、1.50、2.00mg/mL。

$$\cdot OH \text{ 清除率}/\% = \frac{A_0 - (A_x - A_{x0})}{A_0} \times 100$$

式中: A_0 为空白对照液的吸光度(用 2mL 蒸馏水代替多酚溶液); A_x 为加入各样品的吸光度; A_{x0} 为不加 H_2O_2 本底的吸光度(用 2mL 蒸馏水代替 H_2O_2)。

1.2.3.3 样品对超氧阴离子自由基清除效果的测定

取 4.5mL 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH8.2)和 4.2mL 蒸馏水, 混匀后在 25℃ 水浴中保温 20min, 取出, 立即加入 0.3mL 3mmol/L 邻苯三酚(25℃ 预热), 迅速摇匀后在 325nm 波长处每隔 30s 测定吸光度, 计算线性范围内每分钟吸光度的增加。测定样品清除能力时, 所取试剂同前, 只是在加入邻苯三酚前, 分别加入 2mL 样液代替蒸馏水。样品总多酚稀释液质量浓度: 30、40、50、60、70、80、90 $\mu g/mL$ 。

$$\text{抑制率}/\% = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100$$

式中: A_0 为邻苯三酚的自氧化速率; A 为加入总多酚样液后邻苯三酚的自氧化速率。单位均为每分钟吸光度的增加值。

1.2.3.4 样品对 DPPH 自由基清除率的测定

样品总多酚稀释液质量浓度: 0.2、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0、2.4 $\mu g/mL$ 。分别加入 4mL 总多酚样液和 4mL DPPH-乙醇溶液, 摇匀, 室温黑暗处放置 30min。用溶剂调零, 测定各管在波长 517nm 处的吸光度。

$$SA/\% = \frac{A_0 - (A_i - A_j)}{A_0} \times 100$$

式中: SA 为样品对 DPPH 自由基的清除率/%; A_0 为 4mL DPPH-乙醇溶液与 4mL 50% 乙醇混合液的吸光度; A_i 为 4mL DPPH-乙醇溶液与 4mL 样液反应后的吸光度; A_j 为 4mL 样液与 50% 乙醇混合液的吸光度。

以上所有试验处理, 均重复 3 次, 取平均值。

2 结果与分析

2.1 藤茶总多酚提取工艺参数的确定

2.1.1 溶剂对藤茶总多酚提取效果的影响

在 70℃ 条件下, 料液比 1:20(g/mL)、时间 1h, 分别以体积分数 50% 丙酮溶液、不同体积分数的乙醇溶液和蒸馏水进行提取, 结果如图 1 所示。50% 丙酮溶液对藤茶总多酚的提取效果最好。多酚是一种极性化合物, 溶剂的极性越大, 提取效果越好。后续提取均以 50% 丙酮溶液为溶剂。

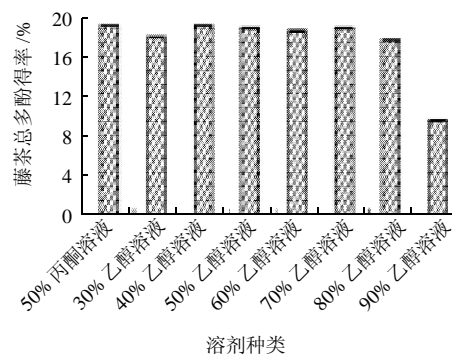


图 1 溶剂对藤茶总多酚提取效果的影响

Fig.1 Effect of extraction solvent composition on extraction efficiency of total polyphenols from *Ampelopsis grossedendata*

2.1.2 温度对藤茶总多酚提取效果的影响

料液比 1:20、时间 1h, 用 50% 丙酮溶液在不同温度下进行藤茶总多酚提取, 结果如图 2 所示。随着温度

的升高, 藤茶总多酚提取率增加, 当温度超过 75℃ 后, 提取率急速下降。可能的原因是: 因提取温度超过丙酮-水双液系的沸点, 溶液剧烈沸腾产生的气泡使原料粉末黏附于容器壁上, 未能充分被溶剂浸提; 另外也可能是由于温度过高造成多酚分子的结构破坏。选择 75℃ 进行后续提取试验。

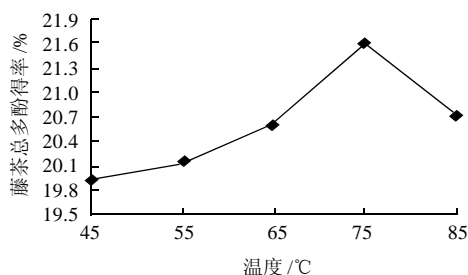


图2 温度对藤茶总多酚提取效果的影响

Fig.2 Effect of extraction temperature on extraction efficiency of total polyphenols from *Ampelopsis grossedendata*

2.1.3 提取时间对藤茶总多酚提取效果的影响

料液比 1:20、提取温度 75℃, 用 50% 丙酮溶液分别提取不同时间, 结果如图 3 所示。藤茶总多酚提取率随着提取时间的延长呈上升趋势, 但 1、1.5、2h 三者间的提取率相差不大, 从省时考虑选择 1h 为后续提取试验。与 1h 相比, 1.5h 的提取率略有下降, 原因尚需进一步探讨。

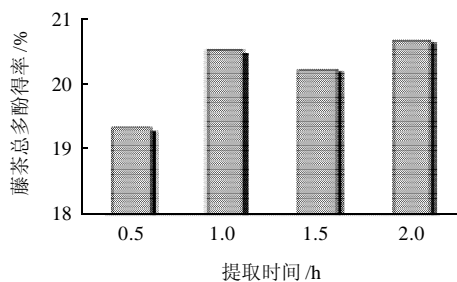


图3 提取时间对藤茶总多酚提取效果的影响

Fig.3 Effect of extraction time on extraction efficiency of total polyphenols from *Ampelopsis grossedendata*

2.1.4 料液比对藤茶总多酚提取效果的影响

在 75℃ 条件下, 提取时间 1h、50% 丙酮溶液作溶剂, 分别采用不同的料液比进行提取, 结果如图 4 所示。藤茶总多酚提取率随溶剂用量的增加而增加, 直到 1:25 料液比时达到最大, 以后呈下降趋势。这与常规提取中所表现的提取率随溶剂量增加而保持上升的现象不完全相符, 可能与溶剂量过大而致使回流加热时升温不均匀有关。选择 1:25 料液比进行后续试验。

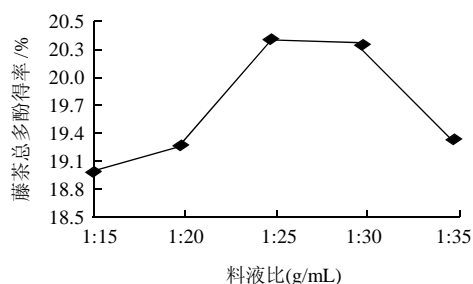


图4 料液比对藤茶总多酚提取效果的影响

Fig.4 Effect of material/liquid ratio on extraction efficiency of total polyphenols from *Ampelopsis grossedendata*

2.1.5 藤茶总多酚最佳提取工艺参数的优选

在单因素试验基础上, 以 50% 丙酮溶液为提取溶剂, 进行料液比、时间和温度 3 因素 3 水平 $L_9(3^4)$ 正交试验, 结果见表 1。

表1 提取藤茶总多酚的正交试验设计与结果

Table 1 Scheme and experimental results of orthogonal array design

| 试验号 | A 料液比 | B 提取时间/h | C 提取温度/℃ | 藤茶总多酚得率/% |
|-------|---------|----------|----------|-----------|
| 1 | 1(1:20) | 1(0.5) | 1(55) | 20.72 |
| 2 | 1 | 2(1) | 2(65) | 20.73 |
| 3 | 1 | 3(1.5) | 3(75) | 21.58 |
| 4 | 2(1:25) | 1 | 2 | 20.49 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 21.45 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 21.70 |
| 7 | 3(1:30) | 1 | 3 | 20.83 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 20.60 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 21.80 |
| K_1 | 63.03 | 62.04 | 63.02 | |
| K_2 | 63.64 | 62.78 | 63.02 | |
| K_3 | 63.23 | 65.08 | 63.86 | |
| k_1 | 21.01 | 20.68 | 21.01 | |
| k_2 | 21.21 | 20.93 | 21.01 | |
| k_3 | 21.08 | 21.69 | 21.29 | |
| R | 0.20 | 1.01 | 0.28 | |

极差分析显示, 影响藤茶总多酚提取效果的 3 因素主次关系为提取时间>提取温度>料液比, 最佳工艺组合为 $A_2B_3C_3$, 即料液比 1:25、时间 1.5h、温度 75℃。

在最佳工艺条件下进行 3 次平行实验, 藤茶总多酚得率平均为 21.82%, 与正交试验结果相符。

2.2 藤茶总多酚抗氧化活性的研究

2.2.1 藤茶总多酚的还原能力

VC 是良好的抗氧化剂。由图 5 可知, 在实验质量浓度范围内, 随 VC 质量浓度的增加, 还原能力逐渐增大, 而藤茶总多酚溶液在与 VC 相同质量浓度范围内, 其还原能力高于 VC, 说明藤茶多酚提取物具有较强的还原能力。

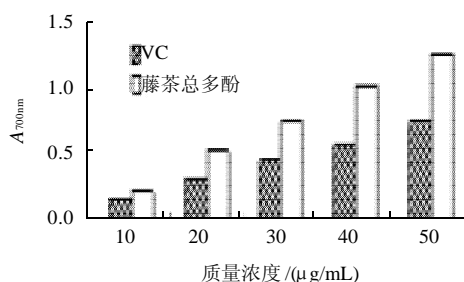


图5 VC和藤茶总多酚还原能力的比较

Fig.5 Comparison of reducing power between total polyphenols from *Ampelopsis grossedendata* and vitamin C

2.2.2 藤茶总多酚对羟自由基的清除作用

羟自由基是已知的最强氧化剂,对生物细胞和组织的破坏作用最大。藤茶总多酚对 $\text{H}_2\text{O}_2\text{-Fe}^{2+}$ 体系产生的羟自由基的清除效果如图6所示。藤茶总多酚对 $\text{H}_2\text{O}_2\text{-Fe}^{2+}$ 体系产生的羟自由基清除作用明显,并且随着反应体系中藤茶总多酚质量浓度的增大,清除能力增强。表明藤茶总多酚对羟自由基的清除能力与其质量浓度具有明显的量效关系。

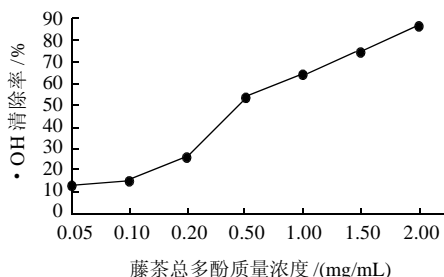
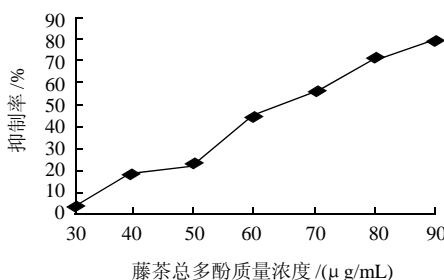


图6 藤茶总多酚对·OH的清除作用

Fig.6 Scavenging capability of total polyphenols from *Ampelopsis grossedendata* on hydroxyl free radicals

2.2.3 藤茶总多酚对超氧阴离子自由基的清除作用

图7 藤茶总多酚对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除作用Fig.7 Scavenging capability of total polyphenols from *Ampelopsis grossedendata* on superoxide anion free radicals

邻苯三酚在碱性条件下迅速自氧化产生 $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ 加速邻苯三酚自氧化速率,同时生成有色中间产物,在 325nm 有强烈的光吸收。由于自氧化速率依赖于 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的浓度, $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除则抑制自氧化反应,从而评价样品清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的能力,如图7所示。藤茶总多酚对邻苯三酚自氧化体系产生的超氧阴离子自由基的清除作用明显,

并且随着反应体系中藤茶多酚质量浓度的增大,清除能力增强,量效关系明显。

2.2.4 藤茶总多酚对 DPPH 自由基的清除效果

DPPH 自由基是一种人工合成的稳定自由基,其乙醇溶液呈紫色,在波长 517nm 处有较强吸收,当 DPPH 自由基溶液中加入能清除自由基的样品时,在波长 517nm 处吸光度变小,其减小程度与自由基清除效果相关,如图8所示。藤茶总多酚对 DPPH 自由基清除效果明显,并随藤茶总多酚浓度增大,清除能力增强,呈明显的量效关系。

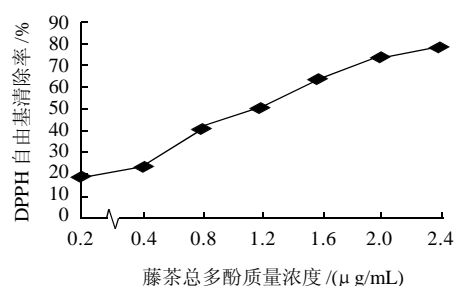


图8 藤茶总多酚对 DPPH 自由基的清除效果

Fig.8 Scavenging capability of total polyphenols from *Ampelopsis grossedendata* on DPPH free radicals

3 讨论与结论

溶剂法提取藤茶总多酚的最佳工艺条件为以 50% 丙酮溶液作提取溶剂、料液比 1:25、时间 1.5h、温度 75℃,此时藤茶总多酚提取率可达 21.82%。藤茶总多酚具有较强的还原能力,对羟自由基、超氧阴离子自由基和 DPPH 自由基均有较好的清除效果,并表现出明显的量效关系。

据文献报道,藤茶富含二氢杨梅素等黄酮类物质,具有重要的生物活性^[2,4-5,12],还富含黄酮类物质以外的多酚类物质^[8]。本实验初步探讨了藤茶总多酚的提取工艺与生物活性,关于藤茶总多酚的分离纯化以及具有生物活性的有效成分的鉴定尚需要进一步研究。

参考文献:

- [1] 郑道君,刘国民.中国藤茶资源的研发概况[J].农业科技通报,2006(6):136-141.
- [2] 张友胜,杨伟丽.显齿蛇葡萄部分营养及功能成分研究[J].食品科学,2001,22(9):75-77.
- [3] 覃洁萍,许学健.广西瑶族藤茶化学成份的研究[J].天然产物研究与开发,1997,9(4):41-43.
- [4] 何桂霞,裴刚,周天达,等.显齿蛇葡萄中总黄酮和二氢杨梅素的含量测定[J].中国中药杂志,2000,25(7):423-425.
- [5] 熊皓平,杨伟丽,何国庆,等.分光光度法测定显齿蛇葡萄总黄酮含量[J].食品科学,2004,25(2):144-145.
- [6] 张铁英.红豆中多酚类物质的提取及其含量测定的研究[J].中国食品添加剂,2004(5):99-100.
- [7] 张力平,孙长霞,李俊清,等.植物多酚的研究现状及发展前景[J].林业科学,2005,41(6):157-162.
- [8] 熊皓平,杨伟丽,张友胜,等.显齿蛇葡萄多酚含量测定方法的比较研究[J].湖南农业大学学报,2001,27(5):381-383.
- [9] 钟耀广,林楠.香菇多糖的抗氧化性能与抑菌作用研究[J].食品科技,2007(1):141-144.
- [10] 关炳峰,谭军,周志娣,等.金银花提取物的抗氧化作用与其绿原酸含量的相关性研究[J].食品工业科技,2007,28(10):127-129.
- [11] 金杰,李志西,张峰,等.桑椹提取物对二苯代苦味酰基自由基(DPPH·)的清除作用[J].西北农林科技大学学报,2006,34(3):135-137.
- [12] 杨志坚,袁弟顺,陈凌华,等.藤茶中二氢杨梅素的研究概况[J].中国茶叶加工,2010(1):20-22.