

乙醇浸提苦荞茶和雀嘴茶中的总黄酮及羟自由基清除活性探究

李会端

(楚雄师范学院,化学与生命科学系,云南 楚雄 675000)

摘要:优化苦荞茶和雀嘴茶中总黄酮提取的较佳实验条件,并探究总黄酮提取液对羟自由基的清除活性.以提取液中总黄酮收率为考察指标,乙醇浸提苦荞茶和雀嘴茶中的总黄酮,考察乙醇浓度、料液比、浸提温度和时间单因素对浸提液中总黄酮收率的影响,设计正交实验确定较佳的提取条件.较佳实验条件为50%乙醇水溶液,料液比0.5:40(g·mL),浸提温度和时间分别为60℃和2.5h,苦荞茶和雀嘴茶提取液中总黄酮收率高达21.64%和19.41%;苦荞茶和雀嘴茶提取液对羟自由基清除效果优于相同浓度相同体积的BHT.乙醇浸提法是苦荞茶和雀嘴茶中总黄酮提取的有效方法,提取液中获得的总黄酮对羟自由基具有较强清除活性.

关键词:苦荞茶;雀嘴茶;乙醇浸提;总黄酮;提取率;清除活性

中图分类号:S131;S132;O658

文献标志码:A

黄酮是一类具有2-苯基色原酮结构的化合物,因含有酮式羰基,显碱性而与强酸反应成盐,其羟基衍生物多为黄色.黄酮广泛存在于植物中,具有降血压、降血脂、降血糖、消炎杀菌、抗肿瘤、抗氧化等多种药用价值^[1].黄酮类化合物的提取工艺、结构鉴定和性质研究备受关注,文献报道的黄酮提取方法主要有酸提法、碱提法、浸提法、回流提取法、微波超声波及大孔树脂吸附法等^[2-3].

绿色保健饮品备受现代健康生活理念的青睐,苦荞茶和雀嘴茶是云南特产绿色保健饮品.苦荞,属蓼科双子叶植物,苦荞茶是将苦荞麦的种子经过筛选、烘烤等工序加工成的次级冲饮品.雀嘴茶是杜鹃花科越橘属植物樟叶越橘的顶叶或嫩芽,生长于滇西北海拔1500~3000m^[4].两种茶叶均可软化人体血管,具有降血脂、降血糖、降血压、健脾开胃、通便润肠、抗氧化、根治通风等功效^[5].

山西大学杨振煌报道了荞麦种子总黄酮提取,西北农林科技大学王敏报道了使用酶解法提取苦荞茎叶粉中的总黄酮,吉林工程技术师范学院白宝兰报道了苦荞叶黄酮的提取,结果表明苦荞麦中含有丰富的黄酮类化合物,收率高达2.5%^[6-8].近年来,研究人员还通过正交试验法优化苦荞总黄酮的提取工艺,探究了苦荞茶的冲泡特性^[9-10].在此,笔者以云南特产绿色保健饮品苦荞茶和雀嘴茶为原料,以芦丁为参照,通过分光光度法测定提取液中总黄酮收率,设计单因素和正交试验优化提取条件,并初步探究了总黄酮提取液对活性氧自由基的清除作用,为云南绿色保健茶品营养价值的开发和综合利用提供参考.

1 实验方法及流程

1.1 原料

咏轻松牌苦荞茶(超市购买)→粉碎→备用;红色雀嘴茶(采集于楚雄州武定县)→晾干→粉碎→备用.

1.2 实验方法

试验方法及流程如图1所示.

收稿日期:2014-09-17;修回日期:2014-12-23.

基金项目:云南省应用基础研究项目(2012FD050);楚雄师范学院科学研究基金项目(11YJGG01).

作者简介(通信作者):李会端(1983-),女,河北宁晋人,楚雄师范学院副教授,博士研究生,研究方向为天然食品化学成分提取及应用研究,E-mail: lhd08@cxtc.edu.cn.

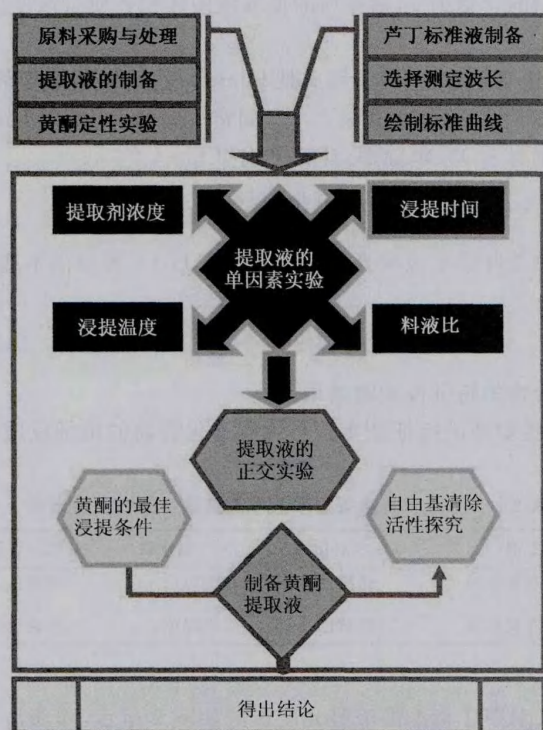


图1 黄酮提取及自由基清除活性探究实验流程图

提取液的制备及总黄酮的定性实验:称取 1.000 0 g 样品置于 50 mL 圆底烧瓶中,加入 40 mL 70% 乙醇,水浴回流提取 2 h. 得总黄酮提取液. 移取 1.00 mL 茶叶提取液于小试管,分别加入 4% 氢氧化钠溶液, 5% 三氯化铁水溶液和盐酸—锌粉,振荡,观察现象.

芦丁标准曲线绘制及线性方程的获得:配制 $1.000\ 0\ \text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 标准芦丁溶液,配置步骤及显色反应参考文献[12],试剂空白做参比,在 400~600 nm 之间扫描测定吸光度,确定最大吸收峰波长. 分别移取芦丁溶液 0.00、0.50、1.00、1.50、2.00、2.50、3.00 mL 于 50.00 mL 容量瓶中稀释定容,显色反应参考文献,在最大波长处扫描吸光度,绘制标准曲线,得回归方程.

单因素实验和正交实验:固定料液比 $0.5:40(\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$,浸提温度和时间分别为 $60\ ^\circ\text{C}$ 和 2.0 h,使用浓度 20%、30%、40%、50% 和 60% 的乙醇为提取剂浸提两种茶叶中的总黄酮. 将所得提取液抽滤,洗涤,合并滤液和洗涤液转入 50 mL 容量瓶,用乙醇定容. 取液显色反应和吸光度测量参考文献[11]. 参考上述步骤,考察其它单因素的改变, $0.5:10\sim 0.5:50(\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ 的料液比, $40\sim 80\ ^\circ\text{C}$ 的浸提温度和 0.5~2.5 h 范围内的浸提时间,对两种茶叶浸提液中总黄酮收率的影响. 基于单因素实验结果,以两种茶叶提取液中总黄酮收率为指标设计表 1 所示的 $L_9(3^4)$ 正交实验表.

表 1 $L_9(3^4)$ 正交实验因素与水平设计

水平	因素			
	A: c乙醇/%	B: 料液比	C: T _{浸提} /℃	D: t _{浸提} /h
1	30	0.5:30	50	1.5
2	40	0.5:40	60	2.0
3	50	0.5:50	70	2.5

茶叶总黄酮收率计算:总黄酮浓度与其吸光度值服从 Lambert-Beer 定律,将吸光度值代入线性回归方程计算提取液中总黄酮质量浓度,再计算茶叶总黄酮收率. 设茶叶总黄酮的含量为 x ,稀释以后提取液质量浓度为 C ;原提取液浓度为 C_0 .

$$C_0 = \frac{C \times V}{V_0}, x = \frac{C_0 \times 50}{2.000 \times 1000} \times 100\%.$$

注:设样品中黄酮类化合物的含量为 x , 稀释后的提取液的体积和质量浓度分别 V_0 和 C ; 移取原提取液的体积和质量浓度分别 V_0 和 C_0 .

茶叶总黄酮提取液对羟自由基清除活性:参照文献 Fenton 反应体系,加入茶叶提取液后,其中的黄酮类物质与水杨酸竞争 $\cdot\text{OH}$,降低有色络合物生成量^[11-12]. 固定反应时间,在 510 nm 处测量提取液吸光度,与空白液对照,计算样品中总黄酮对 $\cdot\text{OH}$ 消除率. 计算公式如下:

$$\cdot\text{OH 清除率}(\%) = \frac{A_0 - (A_x - A_{x_0})}{A_0} \times 100\%.$$

其中 A_0 为空白液吸光度; A_x 为茶叶提取液吸光度; A_{x_0} 为不加 H_2O_2 提取液本底吸光度.

2 结果与讨论

2.1 原料提取液中黄酮类化合物的特征性实验结果

表 2 显示苦荞茶和雀嘴茶提取液的特征性实验与黄酮类化合物的特征反应现象一致,证明苦荞茶和雀嘴茶中均含有黄酮类化合物.

表 2 苦荞茶和雀嘴茶提取液中总黄酮特征性实验结果

试 剂	4%氢氧化钠	5%三氯化铁	盐酸-锌粉
苦荞茶提取液	亮黄色	墨绿色	橙黄色
雀嘴茶提取液	亮黄色	墨绿色	橙黄色

2.2 芦丁标准曲线的绘制

测定波长的选择:扫描波长对芦丁标准溶液吸光度影响如图 2 所示,随着波长增加,吸光度先增大后减小,扫描波长为 510 nm 时,吸光度值最大,故选择 510 nm 为黄酮类物质的最大吸收波长.

芦丁标准曲线的绘制:在 510 nm 处测定吸光度,以浓度(c)为横坐标,吸光度(A)为纵坐标,绘制标准曲线,如图 3 所示,得线性回归方程 $A=11.857c+0.011$,相关系数 $R=0.999\ 06$.

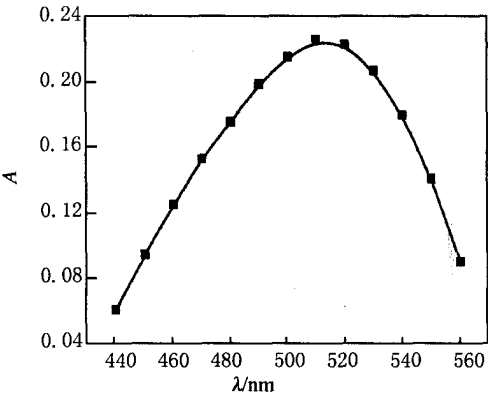


图 2 扫描波长对芦丁标准液吸光度的影响

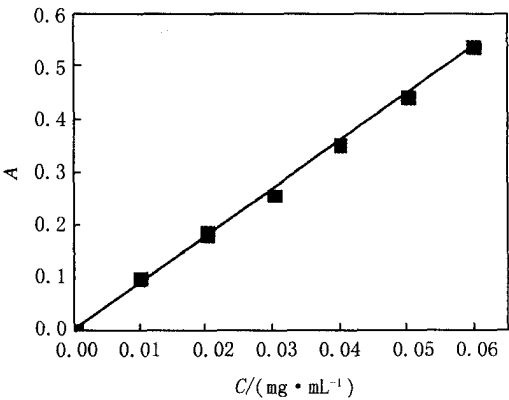


图 3 芦丁标准曲线

2.3 提取液的单因素实验结果

乙醇浓度和料液比对提取液中总黄酮收率的影响见图 4,总黄酮收率随乙醇浓度的增大先增加后降低,当乙醇浓度为 40% 时,总黄酮收率最大,分别为 21.55%(苦荞茶)和 19.93%(雀嘴茶). 因此,总黄酮浸提的较佳乙醇浓度为 40%.

图 4 显示较佳料液比为 0.5 : 40 ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),总黄酮最大收率分别为 20.24%(苦荞茶)和 19.79%(雀嘴茶). 浸提温度和时间对提取液总黄酮收率的影响见图 5,结果显示总黄酮的较佳浸提温度为 60℃,浸提液中总黄酮收率最大,分别为 20.50%(苦荞茶)和 20.18%(雀嘴茶). 浸提温度过高,超过 60℃,总黄酮开始分解,从而导致浸提液中总黄酮收率开始降低. 总黄酮的较佳浸提时间为 2.0 h,浸提液中总黄酮收率最大,分别为 21.10%(苦荞茶)和 20.07%(雀嘴茶).

根据单因素实验结果,从溶剂挥发、生产速率、生产成本和总黄酮收率几个方面考虑,选择 40% 的乙醇溶液为提取剂、料液比为 0.5 : 40(g · mL⁻¹)、浸提温度和时间分别为 60 ℃ 和 2.0 h,苦荞茶和雀嘴茶浸提液中总黄酮收率最高。

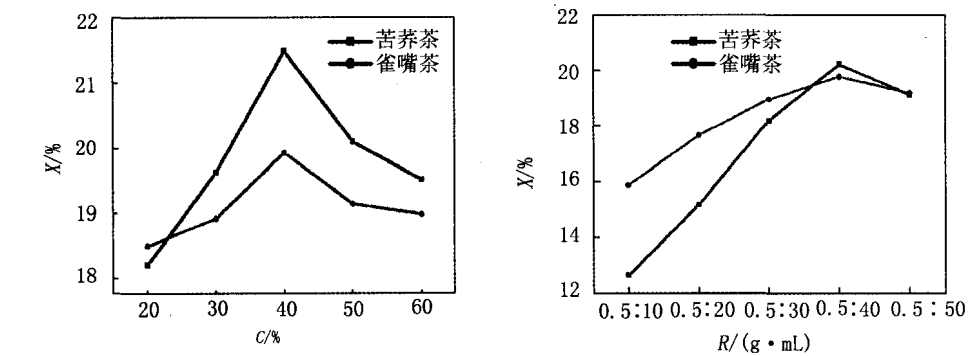


图 4 乙醇浓度 (左) 和料液比 (右) 对总黄酮收率的影响

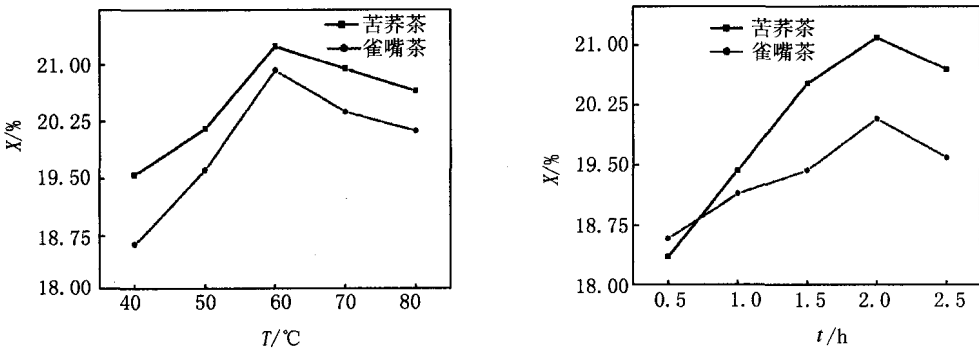


图 5 浸提温度 (左) 和时间 (右) 对总黄酮收率的影响

2.4 提取液的正交实验结果

按照表 1 所示的因素水平设计表操作,乙醇浸提选择雀嘴茶中的总黄酮,正交试验结果见表 3.

表 3 正交实验结果表

序号	单因素				总黄酮收率/%
	A: 乙醇/%	B: 料液比	C: 温度/℃	D: 时间/h	
1	30	0.5 : 30	50	1.5	17.23
2	30	0.5 : 40	60	2.0	17.60
3	30	0.5 : 50	70	2.5	17.32
4	40	0.5 : 30	60	2.5	17.68
5	40	0.5 : 40	70	1.5	17.23
6	40	0.5 : 50	50	2.0	19.51
7	50	0.5 : 30	70	2.0	17.80
8	50	0.5 : 40	60	2.5	19.51
9	50	0.5 : 50	50	1.5	19.20
K1	17.38	17.57	18.75	17.89	较优组合 A3B2C2D3
K2	18.14	18.11	18.16	18.30	主次关系
K3	18.84	18.67	17.45	18.17	A>C>B>D
R	1.46	1.1	1.3	0.41	—

乙醇浸提雀嘴茶总黄酮实验中,A、B、C、D 四个单因素的主次关系是 A>C>B>D, A(乙醇浓度)影响最大,D(浸提时间)影响最小;较佳的浸提条件组合为 A3B2C2D3. 在正交实验确定的最佳提取条件下,即乙醇浓度为提 50%,料液比为 0.5 : 40,浸提温度和时间分别为 60 ℃ 和 2.5 h,做 3 次平行实验,实验结果如表 4 所示,苦荞茶和雀嘴茶中总黄酮的平均收率分别 21.64% 和 19.41%.

表 4 最佳组合验证实验结果

苦荞茶			雀嘴茶		
吸光度	总黄酮收率/%	均值/%	吸光度	总黄酮收率/%	均值/%
0.767	21.90	21.64	0.683	19.51	19.41
0.753	21.51	0.683	19.51	—	—
0.753	21.51	0.672	19.20	—	—

2.5 提取液对 $\cdot\text{OH}$ 清除作用

参考文献[11—12]设计对照实验,比较相同浓度的苦荞茶提取液、雀嘴茶提取液和 BHT 对羟自由基的清除作用,实验结果见图 6. 结果显示,随着清除剂体积增加,对 $\cdot\text{OH}$ 清除率也增加. 固定加入清除剂的量,清除效果依次为苦荞茶>雀嘴茶>BHT. 可见,苦荞茶和雀嘴茶提取液对 $\cdot\text{OH}$ 清除效果优于食品工业常用抗氧化剂 BHT.

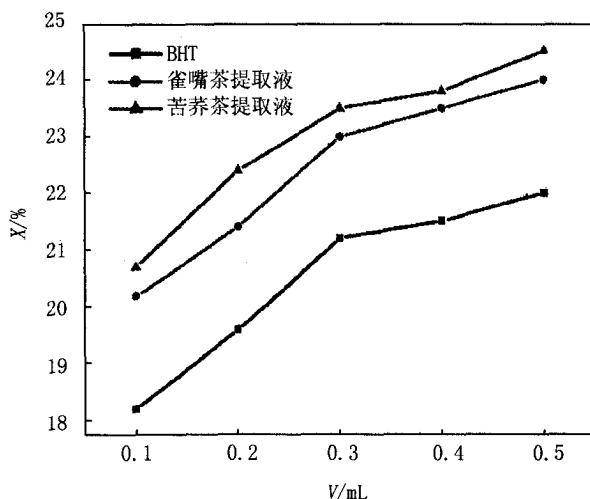


图6 苦荞茶和雀嘴茶中总黄酮提取液和BHT对羟自由基清除作用

3 结 论

乙醇浸提苦荞茶和雀嘴茶总黄酮的较佳条件为:50%乙醇水溶液,料液比 $0.5:40(\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$,浸提温度和时间分别为 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 2.5 h ,提取液中总黄酮收率高达21.64%和19.41%. 对 $\cdot\text{OH}$ 清除活性实验结果显示,苦荞茶和雀嘴茶提取液中总黄酮对 $\cdot\text{OH}$ 清除效果优于相同浓度相同体积的 BHT.

参 考 文 献

- [1] 黄爱玲. 黄酮类化合物药理作用的研究进展[J]. 安徽农学通报, 2007, 13(10): 71-72.
- [2] 唐德智. 黄酮类化合物的提取、分离、纯化研究进展[J]. 海峡药学, 2009, 21(12): 101-104.
- [3] 于智峰, 王 敏, 金 颖. 大孔吸附树脂对苦荞黄酮吸附分离特性研究, 食品研究与开发 2006, 27(11): 1-5.
- [4] 杨芳, 邵金良, 杨 斌, 等. 雀嘴茶营养成分的分析及评价[J]. 现代食品科技, 2011, 27(12): 1516-1519.
- [5] 姚小敏, 覃成箭, 羊金梅, 等. 茶叶中总黄酮的提取、鉴别及其含量测定[J]. 右江民族医学院学报, 2005(6): 779-781.
- [6] 闫斐艳, 杨振煌, 李玉英, 等. 苦荞种子总黄酮提取方法的比较研究[J]. 食品与药品, 2010, 12(3): 93-95.
- [7] 王敏, 高锦明, 王 军, 等. 苦荞茎叶粉中总黄酮酶法提取工艺研究[J]. 中草药, 2006, 37(11): 1645-1648.
- [8] 白宝兰, 曹柏营, 郑鸿雁, 等. 苦荞叶黄酮的提取及精制[J]. 食品科学, 2008, 29(09): 181-185.
- [9] 徐钰丁, 王治荣, 刘文成, 等. 凉山苦荞茶中总黄酮含量提取条件及方法改进探讨[J]. 中国化工贸易, 2012(1): 118-119.
- [10] 扶庆权. 正交试验法优化苦荞总黄酮的提取工艺[J]. 湖北农业科学, 2013, 52(9): 04-03.
- [11] 李会端. 酶解法提取紫藤总黄酮及自由基清除活性研究, 河南师范大学学报: 自然科学版, 2014, 42(03): 79-84.
- [12] 文美琼, 李 璐, 杨申明, 等. 彝药野坝子花总黄酮的提取及对活性氧自由基的清除作用[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(6): 1444-1447.

Photochemistry Degradation of Dinotefuran in Water

ZHENG Liqing, ZHAO Yuan, ZHANG Leilei, LIN Yidong

(Key Laboratory for Yellow River and Huaihe River Water Environmental and Pollution Control, Ministry of Education, Henan Key Laboratory of Environmental Pollution Control, School of Environment, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: Through the simulation experiment, the photolysis characteristic of dinotefuran and the factors influencing the photolysis of dinotefuran in water were studied. The results showed that the photodegradation rate of dinotefuran decreases with the increased of initial concentration or pH of aqueous solution. The photolysis half-life was of dinotefuran in buffer solution of pH5, pH7, pH8 and pH9 was 12.42 h, 12.06 h, 10.84 h and 8.45 h respectively. Ferric iron and nitrate ions had photosensitization on dinotefuran. Humic acid (HA) had photoquenching on dinotefuran, and its photoquenching efficiency was positively related to the dosage of humic acid.

Keywords: dinotefuran; photolysis; photosensitization; photoquenching

(上接第 92 页)

Study on Ethanol Extraction of Flavonoids from Buckwheat Tea and Sparrow Mouth Tea and Scavenging Effect on Hydroxyl Radicals

LI Huiduan

(Department of Chemistry and Life Science, Chuxiong Normal University, Chuxiong 675000, China)

Abstract: Ethanol extractions of total flavonoids from Buckwheat tea and Sparrow mouth tea were optimized and scavenging effects on hydroxyl radicals of the extracts were studied. In this paper, total flavonoids from Buckwheat tea and Sparrow mouth tea were extracted by using ethanol. The influences of four single factors on extraction ratio of total flavonoids were studied, including ethanol concentration, solid-liquid ratio, extract temperature and time. The preferred extraction conditions were ethanol concentration was 50%, solid-liquid ratio was 0.5 : 40 g · mL⁻¹, temperature was 60 °C and extraction time was 2.5 h determined by orthogonal experiment, extraction ratios of flavonoids reached up to 21.64% for Buckwheat tea and 19.41% for Sparrow mouth tea by using spectrophotometer. Antioxidant effects of flavonoids from Buckwheat tea, Sparrow mouth tea and BHT were measured to remove hydroxyl radicals by comparative experiments. It showed that Buckwheat tea and Sparrow mouth tea extracts displayed stronger scavenging effect. Ethanol extractions of total flavonoids from Buckwheat tea and Sparrow mouth tea have been proved to be an effective technique, total flavonoids extracts obtained exhibited stronger scavenging effect on hydroxyl radicals

Keywords: Buckwheat tea; Sparrow mouth tea; ethanol extraction; total flavonoids; extraction ratio; scavenging effect