

茶树花黄酮的提取及对羟自由基的清除效果

陈小萍¹, 张卫明^{1,2}, 史劲松², 顾龚平²

(1. 南京农业大学食品学院, 江苏 南京 210095)
(2. 南京野生植物综合利用研究院, 江苏 南京 210042)

[摘要] 通过对茶树花物料粒度、不同提取剂和提取方式的比较, 研究茶树花黄酮的最佳提取工艺; 并比较不同提取方法获得的茶树花黄酮提取物对羟自由基 (·OH) 的清除效果. 结果表明: 乙醇热回流提取的最佳工艺条件为: 体积分数 95% 的乙醇, 料液比 1:15, 80℃ 下批次提取 90 min; 超声波振荡提取最佳工艺为: 体积分数 95% 的乙醇, 料液比 1:30, 提取温度 45℃, 批次提取 80 min. 超声波结合热提法获得的茶树花黄酮提取物对 ·OH 的清除效果最好.

[关键词] 茶树花, 黄酮, 提取, 清除, 羟自由基

[中图分类号] S571.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-4616 (2007) 02-0093-05

Research on Extracting Tea Flower Flavonoids and its
Effect on Scavenging Hydroxyl Radicals

Chen Xiaoping¹, Zhang Weiming^{1,2}, Shi Jinsong², Gu Gongping²

(1. College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)
(2. Nanjing Institute for Comprehensive Utilization of Wild Plant, Nanjing 210042, China)

Abstract: The optimal extraction process of Tea Flower flavonoids was studied by investigating different particle sizes, extraction reagents and methods. Comparisons were also made among the effects of flavonoids extracted by different methods on scavenging hydroxyl radicals. Results showed that: (1) the optimal conditions of heat extraction method were: solid-liquid ratio was 1:15, extraction temperature was 80℃, and volume fractions of ethanol was 95%, with 90 minutes each time; (2) optimal conditions of ultrasonic extraction method were: solid-liquid ratio was 1:30, 45℃, and volume fractions of ethanol was 95%, with 80 minutes each time. Results also showed that Tea Flower flavonoids extracted by ultrasonic combined with heat extraction had the highest scavenging activity on hydroxyl radicals.

Key words: Tea Flower flavonoids, extraction, scavenge, hydroxyl radicals

0 引言

茶树 (*Camellia sinensis*) 系山茶科 (Theaceae) 多年生草本植物, 我国对茶叶的利用已有近 2 000 年历史, 但有关茶树花 (Tea Flower) 的研究少见报道. 茶树花资源丰富, 利用率低, 茶树花中含有丰富的黄酮类物质^[1], 黄酮类物质具有抗炎、抗氧化、抗动脉硬化、降低胆固醇、解挛、抗辐射、抗肿瘤等生物活性^[2-4]. 笔者以茶树花总黄酮提取率为指标, 正交实验法对茶树花黄酮的提取工艺进行优化, 并对不同方法获得的茶树花黄酮清除羟自由基 (·OH) 的效果进行比较, 为合理利用茶树花资源提供理论依据.

收稿日期: 2006-11-21. 修回日期: 2006-12-08
基金项目: 国家十五科技攻关课题 (2001BA502B09) 资助项目.
作者简介: 陈小萍 (1981—), 女, 硕士研究生, 主要从事农产品加工与贮藏的学习与研究. E-mail: chenxp_81@163.com
通讯联系人: 张卫明 (1957—), 教授, 博士生导师, 主要从事野生资源开发与利用的教学与研究. E-mail: botanyzh@163.com

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

材料:茶树花,采自安徽宁国,黄花云尖种,由中林绿源(北京)茶树花研发中心提供.

主要仪器:KQ-250 型超声波清洗器,巩义市英峪予华仪器厂;SP-752 型紫外可见分光光度计,上海光谱仪器有限公司.

主要试剂:芦丁(Rutin),中国药品生物制品检定所提供,其他试剂均为分析纯.

1.2 茶树花黄酮含量的测定

以芦丁为对照品,按文献方法^[5]进行测定,得溶液浓度 $Y(\text{mg/mL})$ 与吸光度 A 的回归方程为:

$$Y = 0.0306A - 0.00002, R^2 = 0.9994$$

样品含量测定:茶树花 粉碎 浸泡 提取 抽滤 溶液定容 测定 计算含量.

1.3 茶树花黄酮的提取^[6,7]

1.3.1 材料粒度对黄酮提取率影响

材料自然晾干含水率 8.14%,分别粉碎至 12、20、40、60、80、100、120 目.取不同粒度的茶树花材料 5.0 g,以料液比 1:15 加入体积分数 80% 的乙醇,80℃ 下热回流提取 2 次,每次 2 h,抽滤并合并滤液,测定茶树花黄酮含量并计算提取率.

1.3.2 提取剂对黄酮提取率影响

称取 60 目茶树花材料 5.0 g,以 1:15 料液比,分别加入蒸馏水、碱水 ($\text{pH} = 10.0$)、甲醇、体积分数 80% 的乙醇、乙醚等提取剂,80℃ 回流提取 2 次,每次 2 h,测定茶树花黄酮含量并计算提取率.

1.3.3 不同提取方法比较

称取 60 目茶树花材料 5.0 g,分别采用连续热回流、超声波提取法的最佳工艺和超声波结合热提法提取,测定黄酮含量并计算提取率,比较提取效果.

1.3.3.1 连续热回流法

在上述实验的基础上,以 A 乙醇体积分数、B 提取温度、C 提取时间和 D 料液比为考察因素,每因素选取 3 个水平,设计 $L_9(3^4)$ 实验,考察指标为茶树花黄酮提取率.

1.3.3.2 超声波提取法

利用超声波提取设备,以 A 提取时间、B 乙醇体积分数、C 料液比和 D 提取温度为因素,进行 3 水平实验,按 $L_9(3^4)$ 表作正交实验,以茶树花黄酮提取率为考察指标.

1.4 茶树花黄酮清除 ·OH 的作用

·OH 由 Fenton 反应在弱碱性条件下产生.按照文献 [8] 依次加入 $\text{pH} 7.4$ 磷酸盐缓冲溶液, FeSO_4 , $\text{EDTA} - 2\text{Na}$, H_2O_2 , 水杨酸和一定体积的样品溶液,蒸馏水补充至 8.0 mL,摇匀.37℃ 恒温水浴 1 h,510 nm 处测定不加样管的吸光度 A_1 和加样管的吸光度 A_2 . A_2 用试样空白校正,试样空白吸光度为 A_0 .按下式计算羟自由基清除率:

$$\text{·OH 清除率} / \% = \frac{A_1 - (A_2 - A_0)}{A_1} \times 100$$

1.5 茶树花黄酮的定性试验

紫外光谱扫描采用甲醇为溶剂,220 ~ 440 nm 范围内扫描,绘制吸收曲线.其他定性实验按照文献进行^[9].

2 结果与分析

2.1 物料粒度对黄酮提取效果的影响

在 12 ~ 60 目范围内,随着物料粉碎粒度加大,提取率迅速上升,但高于 60 目以后,物料细度对提取率影响不大(图 1),因此宜选择 60 目粒度的物料进行黄酮提取.

2.2 提取剂对黄酮提取效果的影响

体积分数 80% 的乙醇对茶树花黄酮的提取效果最佳,其次为甲醇、碱水和蒸馏水,乙醚效果最差(图

2).提取效果受提取剂极性的强弱影响.

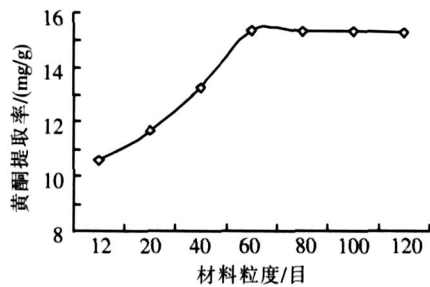


图 1 物料粒度对提取效果的影响

Fig.1 Effect of particle sizes on extraction yield

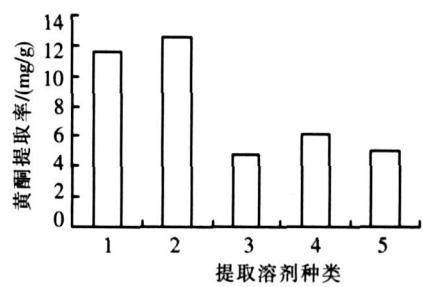


图 2 不同提取剂对提取效果的影响

Fig.2 Effect of different reagents on extraction yield

2.3 连续热回流提取工艺的优化

采用正交法对连续热回流的工艺参数进行优化,以乙醇体积分数、提取温度、提取时间和料液比为考察因素,实验结果如表 1.

表 1 回流提取法正交实验结果

Table 1 Results of orthogonal test of heat extraction method

序号	因素 Factor				提取率 / (mg/g)			
	A / %	B /	C /min	D / (g/mL)				T
1	60	40	60	1 10	5.75	5.68	5.67	17.1
2	60	60	90	1 15	7.61	7.81	7.43	22.85
3	60	80	120	1 20	7.96	8.01	7.89	23.86
4	80	40	120	1 15	8.03	8.14	7.96	24.13
5	80	60	90	1 20	7.63	7.88	7.67	23.18
6	80	80	60	1 10	8.34	8.59	8.34	25.27
7	95	40	90	1 20	9.03	9.12	9.09	27.24
8	95	60	60	1 10	8.78	8.93	8.64	26.35
9	95	80	120	1 15	9.08	9.15	9.12	27.35
K_{1j}	63.81	68.47	68.72	67.63				
K_{2j}	72.58	72.38	74.33	75.36				
K_{3j}	80.94	76.48	74.28	74.34				
R	17.13	8.01	5.61	7.73				

4种因素对黄酮提取率的影响程度为:

A 乙醇体积分数 >B 提取温度 >D 料液比 >C 提取时间.

A 因素中一水平到三水平呈上升趋势;B 因素数据曲线缓慢上升,但三者相差不明显;C 分析因素中,二水平较好,三者相差不大;D 因素数据曲线出现了拐点,二水平效果较好.综合表 1 结果,可以得出连续热回流提取的最佳提取方案为 $A_3B_3C_2D_2$,即采用体积分数 95%的乙醇,按照 1 15 的料液比在 80 下提取 90 min,可获得最佳提取率.

2.4 超声波提取工艺的优化

极差分析可看出超声波提取工艺中的因素影响由小到大为:A 提取时间 >B 乙醇体积分数 >D 提取温度 >C 料液比,超声波提取的最佳提取工艺为 $A_3B_3C_2D_2$,即在 45 下、1 30 的料液比、用 95%体积分数的乙醇提取 80 min,可获得高提取率.

此外,实验还对蒸馏水热回流提取、索氏提取等方式进行了研究和比较,几种提取方式对茶树花黄酮的提取情况见表 3.索氏抽提完全,但耗时长,不适合工业化生产;蒸馏水热回流提取是最经济的提取方法,但提取率显著较低;在超声波法基础上结合热提取法进行处理,可以大大提高茶树花黄酮的提取率,且超声波装置简单,无污染,容易进行工业化生产,是比较理想的提取方法.

表 2 超声波提取法正交实验结果

Table 2 Results of orthogonal test of ultrasonic extraction method								
序号	因素 Factor				提取率 / (mg/g)			
	A /min	B %	C / (g/mL)	D /	T			
1	20	60	1: 20	35	5. 96	6. 31	6. 54	18. 81
2	20	80	1: 30	45	7. 69	7. 66	7. 98	23. 33
3	20	95	1: 40	60	8. 20	8. 53	8. 37	25. 10
4	50	60	1: 40	45	8. 05	8. 07	8. 14	24. 26
5	50	80	1: 30	60	8. 50	8. 78	8. 61	25. 89
6	50	95	1: 20	35	9. 53	9. 49	9. 75	28. 77
7	80	60	1: 30	60	9. 09	9. 14	9. 26	27. 49
8	80	80	1: 20	35	9. 78	9. 83	9. 93	29. 54
9	80	95	1: 40	45	10. 92	10. 32	10. 49	31. 73
K ₁ j	67. 24	70. 56	77. 12	76. 43				
K ₂ j	78. 92	78. 76	79. 32	79. 59				
K ₃ j	88. 76	85. 6	78. 48	78. 9				
R	21. 52	15. 04	2. 20	3. 16				

表 3 不同方法提取效果比较

Table 3 Comparisons of flavonoids yields by different extraction methods					
方法	热回流提取 1 h (蒸馏水)	热回流提取 1 h (体积分数 95%的乙醇)	超声波提取 1 h (体积分数 95%的乙醇)	超声波结合热提 1 h (体积分数 95%的乙醇)	索氏提取 48 h (体积分数 95%的乙醇)
黄酮含量 / (mg/g)	7. 24	8. 49	9. 83	10. 52	10. 98

2.5 黄酮提取物清除 ·OH效果比较

黄酮是一类复杂的化合物,不同极性的提取剂、不同的提取方法对特定结构的组分溶出有一定选择性,因而对羟基自由基清除能力也有差别.实验表明,超声波结合热提法获得的茶树花黄酮提取物对·OH的清除效果最佳(表 4),而水热回流提取物的清除作用最差.同时实验表明,V_C清除·OH 50时的浓度(IC₅₀)为 187. 51 μg/mL,茶树花黄酮提取物 IC₅₀普遍低于 1. 61 μg/mL,其清除·OH效果远高于 V_C.

表 4 不同方法提取的茶树花黄酮对清除·OH效果比较

Table 4 Comparisons of hydroxyl radicals scavenging abilities of flavonoids extracted by different methods			
样品	体系中总黄酮含量 μ / (μg/mL)	羟自由基清除率 / %	IC ₅₀ / (μg/mL)
水热回流提取黄酮	0. 90	38. 72	1. 61
	1. 81	53. 29	
乙醇热回流提取黄酮	0. 74	22. 61	1. 22
	1. 49	65. 34	
超声波提黄酮	0. 92	48. 61	0. 89
	1. 74	76. 59	
超声波结合热提法提黄酮	0. 20	39. 06	0. 34
	0. 79	67. 81	
索氏抽提法提黄酮	0. 76	45. 34	0. 81
	0. 99	67. 71	

2.6 茶树花黄酮提取物的特性试验

2.6.1 光谱扫描^[10]

黄酮、黄酮醇类物质结构中,A环苯甲酰基系统的吸收谱带范围在 310~385 nm,B环桂皮酰基系统吸收的谱带范围在 250~280 nm,异黄酮、二氢黄酮和二氢黄酮醇类只有苯甲酰系统,一般在该波长范围没有强吸收.茶树花黄酮提取物在 264 nm、304 nm 及 349 nm 各有吸收峰(图 3),因此该提取物中,可能含有黄酮、黄酮醇,也可能包括异黄酮、二氢黄酮、二氢黄酮醇等物质.

2.6.2 茶树花中黄酮类化合物定性分析

结合以上定性试验结果,推测茶树花中黄酮类化合物可能以黄酮醇类为主,与茶籽黄酮提取物特性基本一致^[11].

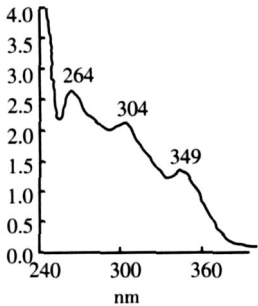


图 3 茶树花提取物紫外扫描

Fig.3 UV scanning spectrum of the extract from Tea Flower

表 5 定性试验
Table 5 Qualitative test

方法、原理	还原试验		与金属离子的络合反应				显色试剂	
试剂	钠汞齐	盐酸 - 镁粉	铝盐	镁盐	镓盐	铁盐	硼酸	氢氧化钠
现象	溶液为红色	由黄色变成橙红色	有黄绿色荧光		由黄色变成亮黄色	有墨绿色沉淀	亮黄色,有荧光	溶液呈棕黄色
结论	黄酮类化合物的特征反应	存在类黄酮,被还原成花色甙和双花色甙.	提取物中化合物属黄酮、黄酮醇或异黄酮类		含有 3 - OH 和 5 - OH 的黄酮类化合物	提取物中含有酚类化合物	有 5 - OH 黄酮或 2 - OH 查耳酮	有黄酮醇类

3 讨论

大量的科学研究已经证实,黄酮类化合物作为植物的次生代谢产物具有显著的生物活性,对人体具有较强的医疗保健作用^[12-14].从本实验可以看出,茶树花黄酮提取过程中,选择恰当的材料粒度和提取剂对提取效果有较大的影响,其适宜的粉碎粒度为 60 目,适宜的提取剂是乙醇.连续热回流提取法是最常用的传统提取方法,超声波辅助提取是发展较快的新兴提取方法,实验通过正交试验选出两种提取方法的最佳工艺条件,在超声波基础上结合热提法处理,提取效果基本接近索氏提取效果.

黄酮是一类复杂的化合物,不同极性的提取剂、不同的提取方法对特定结构的组分溶出有一定选择性,因此不同提取方法获得的茶树花黄酮提取物对·OH 的清除效果存在差异,其中以超声波结合热提法制备的提取物清除效果最佳,而蒸馏水热回流提取物的清除作用最差.同时实验表明,茶树花黄酮提取物对·OH 清除效果远高于 V_C.

茶树花黄酮提取物所进行的黄酮特征颜色反应、UV 光谱等定性反应均具有良好的一致性,说明样品中含有黄酮醇类化合物、黄酮类化合物因其良好的医疗保健作用而在食品、医药和化妆品等行业广泛应用.我国有近 20 个省、市、自治区产茶,而全国茶树花实际年可采资源量在 180 万 t 以上.采用本文所述的最佳提取法则可获得约 1.89 万 t 的黄酮粗品.这不仅具有较大的经济意义,而且也 为茶树花的综合利用提供了一条很好的途径.

致谢:感谢中林绿源(北京)茶树花研发中心主任徐纪英老师对本实验的关心和帮助!

[参考文献]

[1] 李英华,胡福良,朱威,等.我国花粉化学成分的研究进展[J].养蜂科技,2005(1): 7-16

[2] 白凤梅,蔡同一.类黄酮生物活性及其机理的研究进展[J].食品科学,1999,20(8): 11-13

[3] Peter C H, Holman, Hertog M G L, et al Analysis and health effects of flavonoids[J]. Food Chemistry, 1996, 9(57): 43-46

[4] Torel J, Cillard J, Cillard P. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxyradical [J]. Phytochemistry, 1986, 25(2): 383-385.

[5] 庄向平,虞杏英.银杏叶中黄酮含量的测定和提取方法[J].中草药,1992,23(3): 122-124.

[6] 丁利君,吴振辉,蔡创海,等.金银花中黄酮类物质最佳提取工艺的研究[J].茶叶科学,2002,23(2): 62-66

[7] 朱万靖,倪培德,江志炜,等.沙棘果渣中黄酮类化合物最佳提取工艺研究[J].中国油脂,2001,26(1): 35-37.

[8] 蔡仲军,陈仕江,尹定华,等.不同产地冬虫夏草清除羟自由基作用的研究[J].中草药,2004,35(1): 57-59.

[9] 中国科学院上海药物研究所植物化学研究室.黄酮体化合物鉴定手册[M].北京:科学出版社,1981: 363-392

[10] 肖崇厚.中药化学[M].上海:上海科学技术出版社,1994: 289-299.

[11] 江和源,柯昌强,陈小强.茶籽饼粕中黄酮苷的 HPLC 分析、制备与 MS 鉴定[J].茶叶科学,2005,25(4): 289-294

[12] 汪秋安,周冰,单扬.天然黄酮类化合物的抗氧化活性和提取技术研究进展[J].化工生产与技术,2004,11(5): 29-35.

[13] 张德权,台建祥,付勤.生物类黄酮的研究及应用情况[J].食品与发酵工业,1999,6: 52-57.

[14] 谭仁祥.植物成分分析[M].北京:科学出版社,2002: 495-498

[责任编辑:孙德泉]

