

黄金茶醇提取物成分及抗氧化活性的研究

陈慧, 盛丹丹, 王文君

(江西农业大学南昌市农产品加工与质量控制重点实验室, 江西南昌 330045)

摘要: 研究了黄金茶醇提取物组成及体外抗氧化活性。采用乙醇提取、石油醚和乙酸乙酯萃取后得粗提物, 并通过液相-质谱联用技术对其结构进行了初步鉴定, 分析了醇提物体外抗氧化活性。结果表明, 黄金茶醇提取物由绿原酸、对香豆酰奎尼酸、咖啡酸、芦丁、金丝桃苷、山萘酚-3-O-芸香糖苷、阿魏酸、圣草酚-O-己糖苷和木犀草苷所组成。黄金茶醇提物具有较好的体外抗氧化能力: 在相同的浓度下, 相对于Vc来说, 对DPPH自由基具有更好的清除能力; 对羟自由基有较好的清除能力, 随浓度的增大, 其清除能力逐渐增大; 对超氧阴离子具有较强清除能力, 浓度为250 $\mu\text{g/mL}$ 时, 清除率可达89.80%; 在50~100 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下, 对ABTS⁺自由基的清除能力比Vc效果更好, 在100~250 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下, 两者的清除效果相当; 相同浓度下, 醇提物的还原能力比Vc稍弱。

关键词: 黄金茶; 醇提物; 结构鉴定; 抗氧化活性; 体外

文章编号: 1673-9078(2017)1-26-32

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.1.005

Study on the Constituents and Antioxidant Activity of Gold Tea Alcohol Extract

CHEN Hui, SHENG Dan-dan, WANG Wen-jun

(Key Lab for Agro-Products Processing and Quality Control, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: The *in vitro* anti-oxidant activity and the constituents of gold tea ethanol extract were investigated. The structure of the crude extract was examined using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) after ethanol extraction as well as petroleum ether and ethyl acetate extraction. The anti-oxidant activity was then analyzed *in vitro*. The results showed that gold tea ethanol extract was composed of chlorogenic acid, p-coumaroylquinic acid, caffeic acid, rutin, hyperin, kaempferol-3-O-rutinoside, ferulic acid, eriodictyol-O-hexoside, and luteoloside. The ethanol extract was found to exhibit a high antioxidant capacity *in vitro*. At the same concentration, the DPPH radical scavenging activity of the ethanol extract was higher than that of Vitamin C (Vc). The extract also had a high hydroxyl radical scavenging ability, which increased in a dose-dependent manner. In addition, the extract had the ability to scavenge superoxide anions, and this ability reached 89.80% at a concentration of 250 $\mu\text{g/mL}$. When the ABTS⁺ radical scavenging activity was measured, the ethanol extract was found to have higher activity than Vc, when the concentration was 50~100 $\mu\text{g/mL}$; when the concentration was 100~250 $\mu\text{g/mL}$, the scavenging activity of the two were comparable. At the same concentration, the reducing capacity of the extract was slightly lower than that of Vc.

Key words: gold tea; ethanol extract; structural identification; anti-oxidant activity; *in vitro*

黄金茶, 蜡梅科蜡梅属, 又称柳叶蜡梅或山腊梅, 是江西原产植物, 现广泛分布于浙南山区、安徽齐云山和江西三清山等地^[1]。黄金茶功效很多, 在民间多作茶饮, 同时兼有药用价值, 曾被誉为江西四大著名药材之一。研究表明, 黄金茶具有止咳化痰、抗炎解热、降压、免疫调节、促进消化、减肥和消毒抑菌等作用, 其主要化学成分包括挥发油、生物碱、黄酮类、

香豆素类和鲨肌醇等^[2]。目前国内外对黄金茶的抗氧化活性研究甚少, 潘心禾^[3]等研究了黄金茶的抗氧化活性, 其有效成分是东莨菪亭、山萘酚和槲皮素, 它们分别具有一定的清除 ABTS 自由基的能力。清除 ABTS 自由基、DPPH 自由基、羟自由基、超氧阴离子的能力及还原能力是评价某种物质抗氧化活性的常用指标^[4,5]。

目前常用的抗氧化剂多为 BHT(2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚)、TBHQ(特丁基对苯二酚)和 BHA(丁基羟基茴香醚)等人工合成酚类物质, 但由于毒性和致癌作用, BHA 和 BHT 已被立法机构限制使用^[6]。因此, 天然抗氧化剂越来越受到广大消费者的欢迎。天然抗氧化剂的主要来源有香辛料和中草药等, 由于资源不

收稿日期: 2016-01-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31560459); 江西省科技厅农业处重点项目(20141BBF60034); 江西省高等学校科技落地计划资助项目(KJLD13027)和研究生创新项目(YC2014-S188)

作者简介: 陈慧(1992-), 女, 在读硕士, 从事天然产物与功能食品研究

通讯作者: 王文君(1971-), 男, 博士, 教授, 食品化学与分子营养学

足,有效成分低,人们在天然抗氧化剂的探索与发现的道路上仍在努力着。本文通过液相-质谱联用技术对黄金茶的乙醇提取物进行了组分分析,并通过 DPPH 自由基、羟自由基、超氧阴离子及 ABTS 自由基这 5 个指标的测定结果与分析来探究黄金茶醇提物的抗氧化活性,进一步了解黄金茶中具体的化学成分以及其成分的抗氧化活性,为天然抗氧化剂的研究与开发提供新的来源与思路。

1 材料与方法

1.1 原料

黄金茶(*Chimonanthus nitens Oliv.*):购自江西省玉山县黄金茶厂,粉碎后过 60 目筛备用;聚酰胺树脂(80~100 目):国药集团化学试剂有限公司。

1.2 试剂

无水乙醇、石油醚、乙酸乙酯、氢氧化钠、盐酸、冰醋酸、三氯乙酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、硫酸亚铁、双氧水、水杨酸、三氯化铁、邻苯三酚、TRIS、过硫酸钾、铁氰化钾和抗坏血酸(分析纯):天津永大化学试剂有限公司;甲醇和乙腈(高效液相色谱纯):TEDIA Company, USA;绿原酸、咖啡酸、对香豆酰奎尼酸、芦丁、金丝桃苷和木犀草苷(标准品):成都曼思特生物科技有限公司;圣草酚-7-O-葡萄糖苷标准品:西力生物技术有限公司;DPPH(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼)、ABTS⁺(3-乙基苯并噻唑啉):上海华蓝化学科技有限公司。

1.3 试验仪器

KYC-11 型恒温摇床:上海苏坤实业有限公司;RE-52AA 旋转蒸发器:上海亚荣生化仪器厂;V-5600 可见分光光度计:上海元析仪器有限公司;GPX-9248A 干燥箱/培养箱(两用):上海跃进医疗器械厂;SSC300NA 型三足式离心机:张家港市永永离心机制造有限公司;HF-20B 超声循环提取机:北京宏祥隆生物技术研发有限公司;Scientz-10N 冷冻干燥机:宁波新芝生物科技股份有限公司;Agilent 1260 Infinity 液相色谱仪:安捷伦科技;6538 精确质量测定的 Q-TOF 液质联用仪:安捷伦科技;HH-60 数显恒温搅拌循环水箱:常州国华电器有限公司。

1.4 试验方法

1.4.1 黄金茶醇提物的制备与分离纯化

黄金茶样品经粉碎过 60 目筛,按照以下条件^[7]

进行提取:超声时间为 20 min,超声功率为 75 W,乙醇浓度为 70%,料液比为 1:20 (g/mL)。得到的醇提取液减压浓缩后先用石油醚萃取,除去提取液中的叶绿素和脂溶性物质,再用乙酸乙酯萃取,合并乙酸乙酯相,蒸干乙酸乙酯,冷冻干燥得粗提物。粗提物再经聚酰胺树脂分离纯化,洗脱剂为 70%的乙醇,流份经减压浓缩后冷冻干燥得纯化后的黄金茶醇提物。

1.4.2 HPLC 分析

将黄酮初纯物粉末用甲醇溶解,配置成一定浓度的样品溶液,经 0.45 μm 的有机滤膜过滤,备用。标准品均用甲醇溶解,经 0.45 μm 的有机滤膜过滤,备用。

色谱条件:C18 色谱柱(250 mm×4.6 mm×5 μm);流速:1 mL/min;柱温:40 °C;进样量:10 μL;流动相:乙腈(A)-0.1%乙酸(B),梯度洗脱(0~15 min:16%A;15~30 min:21%A;30~45 min:40%A);检测波长:291 nm。

1.4.3 质谱条件

采用负离子模式;毛细管电压为 3500 V;质量扫描范围: m/z 50~1200;雾化气压力:40 psi;干燥气流速:10 L/min;干燥气温度:350 °C;碰撞电压:120 V。

1.4.4 DPPH 自由基清除能力的测定

取 2.0 mL 不同浓度的黄金茶醇提物溶液于试管中,各加入 2.0 mL、0.1 mmol/L 的 DPPH 溶液,充分混合后避光反应 20 min,于 517 nm 处测吸光度 A_i ;以无水乙醇代替 DPPH,测吸光度 A_j ;空白组以蒸馏水代替黄金茶醇提物溶液,测吸光度 A_0 。以 Vc 做阳性对照,各组均重复测三次,取平均值计算清除率 I:

$$I=(A_0-A_i+A_j)/A_0$$

1.4.5 羟自由基清除能力的测定

取 2.0 mL 不同浓度的黄金茶醇提物溶液,依次加入 2.0 mL、6 mmol/L 硫酸亚铁、2.0 mL、6 mmol/L 双氧水,混匀后静置 10 min,再加入 2.0 mL、6 mmol/L 水杨酸,混匀后静置 30 min,于 510 nm 处测吸光度 A_i 。以蒸馏水代替水杨酸测吸光度 A_j ,空白对照以 2.0 mL 蒸馏水代替黄金茶醇提物溶液测吸光度 A_0 。以 Vc 做阳性对照,各组均重复测三次,取平均值,计算羟自由基的清除率 E:

$$E=(A_0-A_i+A_j)/A_0$$

1.4.6 超氧阴离子清除能力的测定

取 50 mmol/L、pH=8.2 的 Tris-HCl 缓冲液 4.5 mL 于试管中,加入 2.0 mL 蒸馏水,于 25 °C 水浴加热 20 min,再加入 2.0 mL 不同浓度的黄金茶醇提物溶液,再加入 25 mmol/L 的邻苯三酚 0.5 mL 混匀,在 25 °C 水浴中反

应6 min, 立即滴加1 mL、10 mmol/L的盐酸终止反应, 在320 nm下测定吸光值 A_i , 以0.5 mL蒸馏水代替邻苯三酚测吸光度 A_j , 以2.0 mL蒸馏水代替黄金茶醇提物溶液测吸光度 A_0 , 以Vc做阳性对照, 各组均重复测三次, 取平均值, 计算超氧阴离子自由基的清除率S:

$$S=(A_0-A_i+A_j)/A_0$$

1.4.7 ABTS⁺自由基清除能力的测定

精密称取40.00 mg ABTS, 加入1.0 mg/mL的过硫酸钾溶8.0 mL, 密封后避光静置反应16 h, 定量转移到250 mL的容量瓶中, 加入32 mL蒸馏水, 用无水乙醇定容至刻度, 放置10 h后使用。取0.5 mL不同浓度的黄金茶醇提物溶液, 用80%乙醇补至2 mL, 再加入2.0 mL ABTS⁺工作液, 摇匀, 避光反应6 min, 在734 nm下测吸光值 A_i , 以80%乙醇代替黄金茶醇提物溶液作为空白对照, 测吸光度 A_0 。以Vc做阳性对照, 各组均重复测三次, 取平均值, 计算提取液对ABTS自由基清除率W:

$$W=(A_0-A_i)/A_0$$

1.4.8 还原能力的测定

取2.0 mL不同浓度黄金茶醇提物溶液于试管中, 加入0.2 mol/L磷酸盐缓冲液2.5 mL (pH=6.6)和1%的铁氰化钾溶液2.5 mL, 混匀后于50 °C水浴中保温20 min后, 快速冷却, 再加入2.0 mL、10%三氯乙酸, 以3000 r/min的转速离心10 min, 取上清液1.0 mL, 加入0.1%的三氯化铁溶液0.5 mL, 再加3.5 mL蒸馏水, 充分混匀, 在700 nm处测定其吸光值 A_i , 以Vc作阳性对照, 各组均重复测三次, 取平均值。

1.5 统计与分析

试验数据采用DPS V7.05专业版进行统计分析。各项指标以平均数±标准差表示, $p<0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

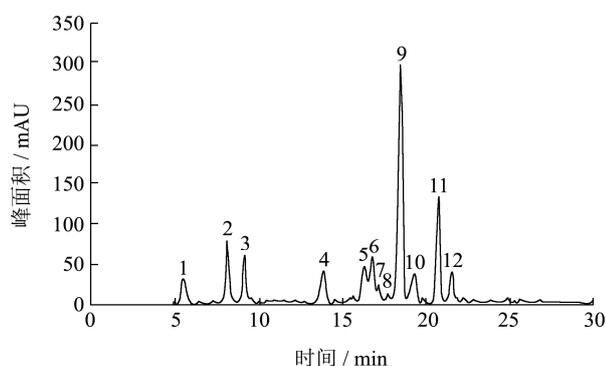


图1 黄金茶醇提物的HPLC色谱图

Fig.1 Liquid chromatogram of the alcohol extract from gold tea

2.1 HPLC 图谱分析

按1.4.2的色谱条件, 对黄金茶醇提物的待测溶液进行分析, 得到了样品溶液的HPLC色谱图(图1)。如图所示, 样品溶液的HPLC色谱图各峰得到了较好的分离^[8], 由图可看出HPLC色谱图中主要含有12个色谱峰, 推断黄金茶醇提物中可能含有12种物质。为了确定这12个色谱峰所代表的物质, 还需结合质谱进一步分析。

2.2 LC-MS 图谱分析

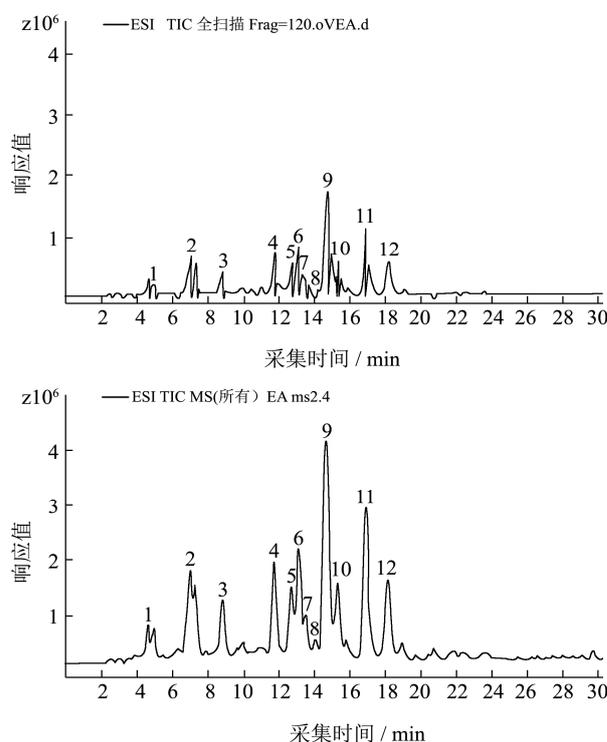


图2 总离子流图

Fig.2 Total ion chromatograms

按1.4.3的质谱条件, 得到负离子模式下的总离子流图见图2, 与HPLC色谱图基本一致。通过各色谱峰的保留时间, 分子量(一级质谱)以及特征结构碎片, 与文献中的研究结果进行比对, 对各个峰进行了鉴定, 初步鉴定结果见表1。由表1可见, 初步鉴定出黄金茶醇提物中的12种化合物: 绿原酸、对香豆酰奎尼酸、咖啡酸、阿魏酸、芦丁、金丝桃苷、山奈酚-3-O-芸香糖苷及其同分异构体、圣草酚-O-己糖苷和木犀草苷。黄金茶醇提物中主要种类为有机酸类(绿原酸、对香豆酰奎尼酸、咖啡酸和阿魏酸), 黄酮苷类(芦丁、金丝桃苷、山奈酚-3-O-芸香糖苷及其同分异构体、圣草酚-O-己糖苷和木犀草苷), 这些化合物都含有酚羟基, 为黄金茶的抗氧化作用奠定了基础。

表 1 各质谱峰的鉴定结果

Table 1 Identification of each mass spectrum peak

序号	保留时间/min	MS ¹ (<i>m/z</i>)	MS ² (<i>m/z</i>)	分子式	化合物
1	5.77	353.09	191.06	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	绿原酸
2	8.42	337.09	173.05	C ₁₆ H ₁₇ O ₈	对香豆酰奎尼酸
3	9.33	179.04	135.05	C ₉ H ₇ O ₄	咖啡酸
4	14.28	609.15	300.03	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆	芦丁
5	16.21	463.09	300.03,301.04	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	金丝桃苷
6	16.82	593.16	284.03	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅	山奈酚-3-O-芸香糖苷同分异构体
7	17.58	193.05	134.04	C ₁₀ H ₉ O ₄	阿魏酸
8	18.30	449.11	151.00	C ₁₄ H ₂₅ O ₁₆	圣草酚-O-己糖苷
9	19.12	593.16	285.04	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅	山奈酚-3-O-芸香糖苷
10	19.92	447.10	284.03,151.00	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	木犀草苷同分异构体
11	21.30	447.10	284.03	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	木犀草苷同分异构体
12	22.06	447.10	285.04,151.00	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	木犀草苷同分异构体

对各质谱峰的定性分析:

1 号峰的保留时间为 5.77 min, 其分子离子峰 [M-H]⁻为 *m/z* 353.09, 与绿原酸的分子量相吻合。在 1 号峰的二级质谱中, 出现了 *m/z* 191.06 的碎片离子, 是分子离子峰失去一个咖啡酰基后产生的奎尼酸碎片峰, 参照文献推断 1 号峰为绿原酸^[9,10]。通过与标准品对照, 证实为绿原酸。

2 号峰的保留时间为 8.42 min, 其分子离子峰 [M-H]⁻为 *m/z* 337.09, 二级质谱中有 *m/z* 173.05 的碎片离子, 参照文献^[10,11]推断 2 号峰为对香豆酰奎尼酸。通过与标准品对照, 证实为对香豆酰奎尼酸。

3 号峰的保留时间为 9.33 min, 其质谱信息与 I.M. Abu-Reidah^[10]等通过 RP-UHPLC 和 ESI-QTOF-MS 方法分析莨菪中代谢产物中所含有的咖啡酸的质谱信息是一致的, 其 [M-H]⁻为 *m/z* 179.04, 二级质谱中碎片离子峰 *m/z* 135.05, 由此可推断 3 号峰为咖啡酸。通过与标准品对照, 证实为咖啡酸。

4 号峰的保留时间为 14.28 min, 其分子离子峰 [M-H]⁻为 *m/z* 609.15, 二级质谱中有 *m/z* 300.03 的碎片离子峰, 参照文献^[12,13]可推断 4 号峰为芦丁。通过与标准品对照, 证实为芦丁。

5 号峰的保留时间为 16.21 min, 其分子离子峰 [M-H]⁻为 *m/z* 463.09, 其碎片离子峰为 *m/z* 300.03 和 301.04, Cindy F. Verdu^[12]等采用 UHPLC-UV 和 UHPLC-MS/MS 的方法来鉴定苹果汁中的多酚类化合物, 获得了金丝桃苷的质谱信息, 通过比较, 5 号峰所代表的物质极有可能是金丝桃苷。通过与标准品对照, 证实为金丝桃苷。

6 号和 9 号峰的保留时间分别为 16.82 min 和 19.12 min, 其分子离子峰 [M-H]⁻均为 *m/z* 593.16, 两

者可能是同分异构体。6 号峰有 *m/z* 284.03 的碎片离子峰, 9 号峰有 *m/z* 285.04 的碎片离子峰, 此峰为山奈酚母环。参照文献^[14]推断 9 号峰可能为山奈酚-3-O-芸香糖苷, 6 号峰是其同分异构体。

7 号峰的保留时间为 17.58 min, 其分子离子峰 [M-H]⁻为 *m/z* 193.05, 其碎片离子峰 *m/z* 134.04 的产生是由于失去了 [M-H-CH₂-CO₂]⁻, 参照文献^[15]推断 7 号峰为阿魏酸。

8 号峰的保留时间为 18.30 min, 其分子离子峰 [M-H]⁻为 *m/z* 449.11, 其碎片离子峰为 *m/z* 151.00, 参照文献^[16]推断 8 号峰为圣草酚-O-己糖苷。

10 号峰、11 号峰和 12 号峰的保留时间分别为 19.92 min、21.30 min 和 22.06 min。3 个峰的分子离子峰 [M-H]⁻均为 *m/z* 449.11, 10 号峰的碎片离子峰为 *m/z* 284.03 和 151.00, 11 号峰的碎片离子峰为 *m/z* 284.03, 12 号峰的碎片离子峰为 *m/z* 285.04 和 151.00, 所以三者可能是同分异构体, 参照文献^[10,16]推断 10 号峰、11 号峰和 12 号峰可能为木犀草苷同分异构体。

2.3 黄金茶醇提取物对 DPPH 自由基的清除能力

DPPH 自由基 (1,1-二苯基-1-苦味基肼自由基) 是一种稳定的含氮自由基, 结构中存在单电子, 在乙醇溶液中显深紫色, 在 517 nm 处有特征吸收。黄金茶醇提取物中的多数化合物都具有酚羟基, 可以提供氧原子, 与 DPPH 自由基结构中的孤对单电子配对, 从而减少单电子数目, 使吸收减弱, 颜色变浅或者消失。根据颜色变化程度就可以判定自由基的清除程度。黄金茶醇提取物对 DPPH 自由基清除作用的结果如图 3 所

示, 黄金茶醇提物和 Vc 对 DPPH 自由基都有很好的清除能力, 在 50~250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度下, 黄金茶醇提物对 DPPH 自由基的清除率最大值为 95%, 而 Vc 对 DPPH 自由基的清除率最大值为 90%; 在相同的浓度下, 黄金茶醇提物对 DPPH 自由基具有更好的清除能力, 差异显著 ($p < 0.05$), 并且具有明显的优势, 其原因可能是在相同的浓度下, 黄金茶醇提物能够提供更多的酚羟基与 DPPH 自由基结构中的孤对单电子配对; 两者对 DPPH 自由基的清除作用与其浓度并没有呈现线性递增的关系, 当浓度都在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 清除 DPPH 自由基的能力已相对稳定。

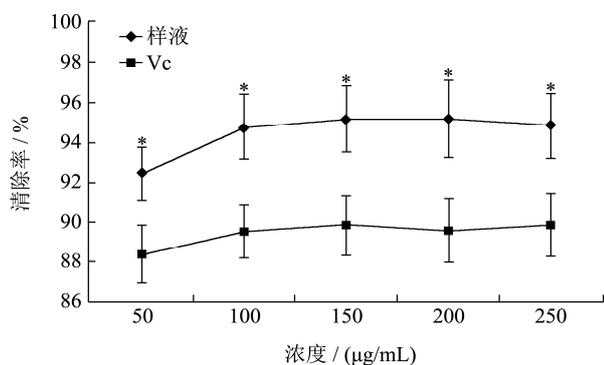


图3 黄金茶醇提物对 DPPH 自由基的清除作用

Fig.3 Scavenging effect of gold tea alcohol extract and Vc on DPPH radicals

注: $n=3$, $*p < 0.05$ 。

2.4 黄金茶醇提物对羟自由基的清除能力

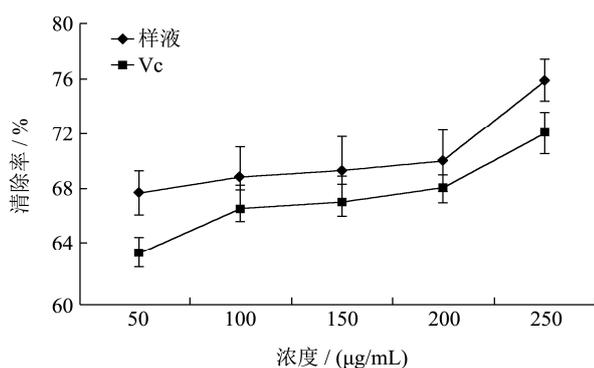


图4 黄金茶醇提物对羟自由基的清除作用

Fig.4 Scavenging effect of gold tea alcohol extract and Vc on hydroxyl radicals

注: $n=3$ 。

FeSO_4 与 H_2O_2 会发生反应生成羟自由基, 加入水杨酸后会与其产生有色物质, 在 510 nm 下有最大吸收。而加入黄金茶醇提物后会与水杨酸竞争羟自由基, 使颜色变浅或消失, 从而可以判定其清除羟自由基的能力。如图 4 所示, 黄金茶醇提物对羟自由基具有较强清除能力, 且随着浓度的增大, 其清除能力逐渐增

大; 与 Vc 相比, 相同浓度条件的醇提物对羟自由基的清除能力更强, 但不存在显著差异性。

2.5 黄金茶醇提物对超氧阴离子的清除能力

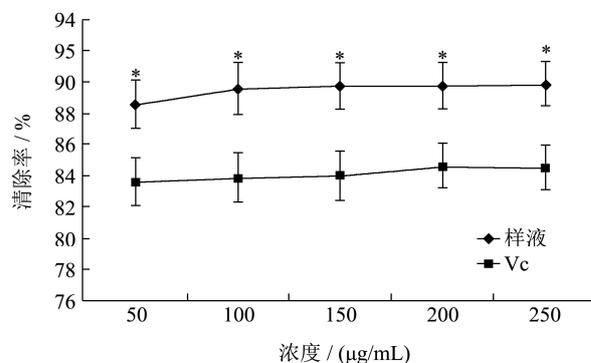


图5 黄金茶醇提物对超氧阴离子的清除作用

Fig.5 Scavenging effect of gold tea alcohol extract and Vc on superoxide anion radicals

注: $n=3$, $*p < 0.05$ 。

碱性条件下, 邻苯三酚可以发生自氧化反应, 并会生成超氧阴离子和有色的中间产物, 该有色的中间产物在 320 nm 下有特征吸收。加入自由基清除剂, 可以抑制超氧阴离子的产生, 以及中间产物的产生, 从而使颜色减弱, 吸光度减小。则可以通过吸光度的变化, 分析清除超氧阴离子的能力。黄金茶醇提物对超氧阴离子的清除能力如图 5 所示, 黄金茶醇提物对超氧阴离子具有较强清除能力, 在浓度为 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 清除率达到了最大值, 为 89.80%。与同浓度的 Vc 相比, 其对超氧阴离子的清除能力更强, 差异显著 ($p < 0.05$)。

2.6 黄金茶醇提物对 ABTS^+ 自由基的清除能力

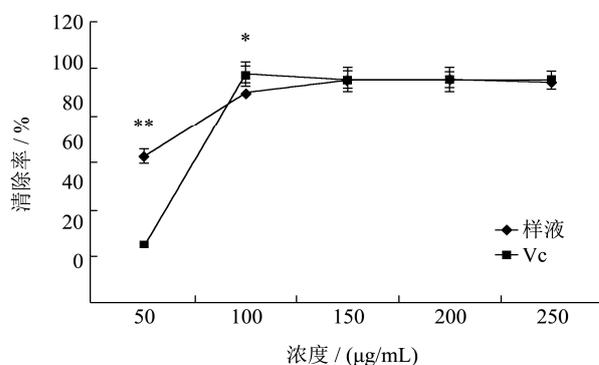


图6 黄金茶醇提物对 ABTS^+ 自由基的清除作用

Fig.6 Scavenging effect of gold tea alcohol extract and Vc on ABTS^+ radicals

注: $n=3$, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ 。

ABTS⁺在反应体系中被氧化后会生成稳定的ABTS⁺自由基,为蓝绿色,在734 nm下有特征吸收。加入自由基清除剂后(如黄酮类化合物和Vc等)会使颜色减弱,吸光度下降,下降程度即可反应其清除自由基的能力。黄金茶醇提取物对ABTS⁺自由基的清除能力如图6所示,由图可知,黄金茶醇提取物和Vc对ABTS⁺自由基都有较好的清除作用。在低浓度下,对ABTS⁺自由基的清除,黄金茶醇提取物比Vc效果更好,在50 μg/mL浓度下,差异极显著($p < 0.01$),在100 μg/mL浓度下,差异显著($p < 0.05$);高浓度下,两者的清除效果相当。两者浓度均在达到150 μg/mL后,清除ABTS⁺自由基的能力趋于平衡。

2.7 黄金茶醇提取物的还原能力

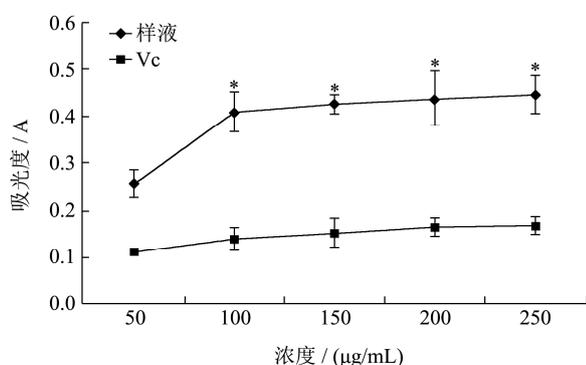


图7 黄金茶醇提取物的还原能力

Fig.7 Reducing power of gold tea alcohol extract and Vc

注: n=3, * $p < 0.05$ 。

铁氰化钾能被还原性物质还原生成亚铁氰化钾,而在酸性环境中,亚铁氰化钾能与Fe³⁺反应生成普鲁士蓝,普鲁士蓝在700 nm下有特征吸收,浓度越大,吸光值越大。黄金茶醇提取物和Vc都可以提供电子,将Fe³⁺还原成Fe²⁺,从而使普鲁士蓝浓度降低。还原力与抗氧化性存在很大的相关性,还原力越强,抗氧化性越强,而吸光值越大则还原力越强。黄金茶醇提取物的还原能力的测定结果如图7所示,黄金茶醇提取物和Vc都有较好的还原能力。在50~100 μg/mL的浓度之间,两者的还原能力变化幅度很明显,且随着浓度的增加还原能力也随之增强;在100~250 μg/mL的浓度之间,两者的还原能力没有随着浓度的增加呈现明显的增强趋势,但醇提取物的还原力明显高于Vc,差异显著($p < 0.05$);两者作为还原剂的最适宜浓度可控制在100 μg/mL。相同浓度下,黄金茶醇提取物的还原能力比Vc稍弱,其原因可能是Vc中的烯醇式羟基比黄金茶醇提取物中的化合物中的酚羟基更容易解离从而可以提供更多的电子。

3 结论

3.1 本试验采用乙醇浸提法得到黄金茶粗提取物,再通过聚酰胺树脂的进一步分离纯化得到较纯的黄金茶醇提取物,并通过液相-质谱联用技术对其组分进行了初步鉴定,最终鉴定出黄金茶醇提取物中含有以下化合物:绿原酸、对香豆酰奎尼酸、咖啡酸、阿魏酸、芦丁、金丝桃苷、山奈酚-3-O-芸香糖苷及其同分异构体、圣草酚-O-己糖苷和木犀草苷。

3.2 黄金茶醇提取物的抗氧化试验说明:黄金茶醇提取物和Vc对DPPH自由基都有很好的清除能力,但是在相同的浓度下,黄金茶醇提取物对DPPH自由基具有更好的清除能力,浓度超过100 μg/mL时,两者对于DPPH自由基的清除能力没有显著改变;黄金茶醇提取物对羟自由基具有较强清除能力,且随着浓度的增大,其清除能力逐渐增大;黄金茶醇提取物对超氧阴离子具有较强清除能力,浓度为250 μg/mL时,清除率可达89.80%;在50~100 μg/mL浓度下,黄金茶醇提取物对ABTS⁺自由基的清除能力比Vc效果更好,在100~250 μg/mL浓度下,两者的清除效果相当;相同浓度下,黄金茶醇提取物的还原能力比Vc稍弱。实验结果表明黄金茶醇提取物具有较好的抗氧化活性,它是一种潜在的天然抗氧化剂,对于开发天然抗氧化剂具有一定的参考价值。

参考文献

- [1] 聂韡,房海灵,黄丽莉,等.山蜡梅叶中3种黄酮类成分含量动态变化研究[J].江西农业大学学报,2013,35(2):357-360
NIE Wei, FANG Hai-ling, HUANG Li-li, et al. Determination of the contents of three flavonoids in leaves of *Chimonanthus nitens Oliv.* and their dynamic changes [J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2013, 35(2): 357-360
- [2] 马雪梅,吴朝峰,彭仁海.腊梅的研究进展[J].安徽农业科学,2010,38(34):19279-19280,19283
MA Xue-mei, WU Chao-feng, PENG Ren-hai. Advance in studies on *Chimonanthus praecox* [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2010, 38(34): 19279-19280, 19283
- [3] 潘心禾,史小娟,张新风,等.柳叶蜡梅化学成分及其抗氧化活性研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(1):99-101
PAN Xin-he, SHI Xiao-juan, ZHANG Xin-feng, et al. Constituents of *Chimonanthus salicifolius* and their antioxidant activity [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2012, 18(1): 99-101

- [4] 叶燕军,陈俊,翁武银.超滤膜分离鲍鱼内脏酶解物及其体外抗氧化活性的研究[J].现代食品科技,2015,31(5):130-136
YE Yan-jun, CHEN Jun, WENG Wu-yin. *In vitro* antioxidant activity of abalone viscera hydrolysates isolated by ultrafiltration [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(5): 130-136
- [5] 陈彩薇,吴晖,赖富饶,等.米糠中不同存在形态酚类物质的抗氧化活性研究[J].现代食品科技,2015,31(2):42-46
CHEN Cai-wei, WU Hui, LAI Fu-rao, et al. Study on the antioxidant activity of different forms of phenolic compounds in rice bran [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(2): 42-46
- [6] 李兴太,纪莹.线粒体氧化应激与天然抗氧化剂研究进展[J].食品科学,2015,36(7):268-277
LI Xing-tai, JI Ying. Recent advances in mitochondrial oxidative stress and natural antioxidants [J]. Food Science, 2015, 36(7): 268-277
- [7] 盛丹丹,李楠,王文君,等.黄金茶中总黄酮超声提取工艺[J].食品研究与开发,2014,35(12):1-4
SHENG Dan-dan, LI Nan, WANG Wen-jun, et al. The extraction technology of total flavonoids from *Golden Tea* by ultrasonic method [J]. Food Research and Development, 2014, 35(12): 1-4
- [8] 李善俊,杨琳.液相色谱与质谱联用分析蕪艾总黄酮提取物初步研究[J].中国民康医学,2013,25(6):22-24
LI Shan-jun, YANG Lin. LC-MS analysis of total flavonoids extract of Chinese mugwort [J]. Medical Journal of Chinese People's Health, 2013, 25(6): 22-24
- [9] Stintzing F C, Kammerer D, Schieber A, et al. Betacyanins and phenolic compounds from *Amaranthus spinosus* L. and *Boerhavia erecta* L [J]. Z Naturforsch C, 2004, 59(1-2): 1-8
- [10] Abu-Reidah I M, Contreras M M, Arráez-Román D, et al. Reversed-phase ultra-high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry as a powerful tool for metabolic profiling of vegetables: *Lactuca sativa* as an example of its application [J]. Journal of Chromatography A, 2013, 13(13): 212-227
- [11] Parejo I, Jauregui O, Sánchez-Rabeneda F, et al. Separation and characterization of phenolic compounds in *Fennel* (*Foeniculum vulgare*) using liquid chromatography- negative electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(12): 3679-3687
- [12] Verdu C, Gatto J, Freuze I, et al. Comparison of two methods, UHPLC-UV and UHPLC-MS/MS, for the quantification of polyphenols in cider apple juices [J]. Molecules, 2013, 18(9): 10213-10227
- [13] 钟慧臻,徐玉娟,李春美,等.高效液相色谱-电喷雾离子阱质谱法测定荔枝果肉中酚类物质[J].广东农业科学,2010,4: 11-14
ZHONG Hui-zhen, XU Yu-juan, LI Chun-mei, et al. Analysis of phenolic compounds in pulp of litchi by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2010, 4: 11-14
- [14] 冯进.蓝莓叶多酚分离纯化、结构及抗氧化活性的研究[D].南京:南京农业大学,2013
FENG Jin. Isolation, purification, structure and antioxidant capacity *in vitro* of polyphenols from *rabbiteye blueberry* [D]. Nanjing: Nanjing Agriculturae Universitatis, 2013
- [15] Rodríguez-Pérez C, Quirantes-Piné R, Fernández-Gutiérrez A, et al. Comparative characterization of phenolic and other polar compounds in Spanish melon cultivars by using high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization quadrupole-time of flight mass spectrometry [J]. Food Research International, 2013, 54(2): 1519-1527
- [16] Pereira O R, Peres A M, Silva A M S, et al. Simultaneous characterization and quantification of phenolic compounds in thymus x citriodorus using a validated HPLC-UV and ESI-MS combined method [J]. Food Research International, 2013, 54(2): 1773-1780