

土庄绣线菊茶多酚抗氧化活性作用研究

杨洋, 李珍*, 杜之平, 丁华 (鄂尔多斯市药品医疗器械检验研究中心, 鄂尔多斯 017000)

摘要 目的: 以土庄绣线菊为原料提取茶多酚, 优化提取条件并研究其抗氧化活性。**方法:** 比较料液比、浸提时间和浸提溶剂对土庄绣线菊茶多酚提取率的影响, 确定提取最佳工艺参数。采用铁氰化钾还原法测定茶多酚的总还原能力, 以邻苯三酚自氧化法测定其对超氧阴离子自由基的清除作用、DPPH 自由基清除率和对 Fe^{2+} 络合能力来评价其抗氧化能力。**结果:** 土庄绣线菊料液比 1 : 20 (g/mL), 浸提温度 70 °C, 乙醇体积分数 70%, 浸提时间 20 min 时提取的茶多酚含量平均为 50.9 mg/g。茶多酚具有显著的还原能力和对 Fe^{2+} 的络合能力; 对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 DPPH 自由基清除作用相对较弱, 其半数抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 0.520 mg/mL 和 0.376 mg/mL。**结论:** 土庄绣线菊中茶多酚含量丰富, 且抗氧化活性较强, 可作为潜在天然抗氧化剂应用于食品和医药工业。

关键词: 土庄绣线菊; 茶多酚; 抗氧化; 自由基; 还原力

中图分类号: R926 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2020)03-0342-07

doi:10.16153/j.1002-7777.2020.03.015

On Antioxidant Activity of Tea Polyphenols from *Spiraea pubescens* Turcz.

Yang Yang, Li Zhen*, Du Zhiping, Ding Hua (Ordos Inspection & Research Center for Drug and Medical Devices, Ordos 017000, China)

Abstract Objective: To optimize extraction conditions, extract tea polyphenols from *Spiraea pubescens* Turcz., and to study its antioxidant activity. **Methods:** The effects of material-liquid ratio, extraction time and extraction solvent on the extraction rate of tea polyphenols from *Spiraea pubescens* Turcz. were evaluated. After that, the best parameters of extraction were determined. The total reducing capacity of tea polyphenols was determined by pyrogallol autoxidation. The total antioxidant activity of tea polyphenols from *Spiraea pubescens* Turcz. was determined by the scavenging rate of DPPH radical and the complexing capacity of Fe^{2+} . **Results:** The optimal conditions were material liquid ratio of 1 : 20 (g/mL), extraction temperature of 70 °C, ethanol volume fraction of 70% and extraction time of 20 min. The content of tea polyphenols extracted was 50.9 mg/g. Tea polyphenols had high reducing capacity and strong complexation ability on Fe^{2+} , but weak scavenging effect on $\text{O}_2^{\cdot-}$ and DPPH free radicals, and half of its suppression rate (IC_{50}) was 0.520 mg/mL and 0.376 mg/mL, respectively. **Conclusion:** Tea polyphenols were abundant in *Spiraea pubescens* Turcz. and exhibited strong antioxidant activity. It can be used as a potential natural antioxidant in food and pharmaceutical industry.

Keywords: *Spiraea pubescens* Turcz.; teapolyphenols; antioxidant activity; free radicals; reducing power

基金项目: 内蒙古自治区标准化项目《53 种蒙药材和 9 种炮制品的标准研究》(编号 2016-[MB02]-E04); 鄂尔多斯市应用技术研究与开发资金项目 (编号 2019-501)

作者简介: 杨洋, 博士, 主要从事药品质量检验及蒙草药标准起草; E-mail: yangyangsea@126.com

通信作者: 李珍, 高级工程师, 从事药品质量检验及蒙草药标准起草; Tel: (0477) 8580563; E-mail: 308965957@qq.com

土庄绣线菊(蒙文名哈登-切,拉丁文名 *Spiraea pubescens* Turcz.)为蔷薇科绣线菊属植物,在内蒙古分布广泛,除阿拉善盟外全区皆产^[1-2]。土庄绣线菊为药食两用植物,是蒙医经验用蒙药材,主治咽喉肿痛、跌打损伤,还是少数民族传统的代茶植物,蒙古族牧民习惯把土庄绣线菊的茎、叶、果等部位采摘代替砖茶饮用^[3-4]。在制定药材标准的过程中我们发现土庄绣线菊茶多酚(Teapolyphenol, TP)含量丰富,本文通过热浸法研究茶多酚的提取方法,测定茶多酚的总还原力、对超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)的抑制作用、对DPPH自由基的清除作用和对 Fe^{2+} 络合能力来研究其抗氧化能力。目前,对土庄绣线菊茶多酚抗氧化活性的研究还未见报道,因此,分析土庄绣线菊的化学成分,评定其利用价值,积极开展绣线菊属植物资源利用的研究,具有较高的理论研究价值与生产应用价值^[5-6]。

1 仪器与试剂

岛津UV-2450型分光光度仪。没食子酸(GC)(东京化成工业株式会社)、DPPH(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼, Sigma公司)。抗坏血酸(VC)、茛三酮、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、碳酸钠、铁氰化钾、三氯乙酸、三氯化铁、铁试剂、 Na_2EDTA 、硫酸亚铁、邻苯三酚、95%乙醇、福林酚试剂、甲醇均为国产分析纯试剂。自制超纯水。

土庄绣线菊:所有样品由内蒙古药品检验研究院主任蒙药师康双龙、内蒙古医科大学教授那圣桑,以及内蒙古民族大学附属医院主任蒙药师沙仁高娃等鉴定确认为正确品种。

2 方法与结果

2.1 茶多酚的提取

取土庄绣线菊粉末适量,按照料液比分别为1:5、1:10、1:20、1:40加入蒸馏水,在70℃下,浸提20 min,研究料液比对土庄绣线菊茶多酚提取的影响。

取土庄绣线菊粉末适量,按照料液比1:20加入蒸馏水,在70℃下,浸提时间分别为10、20、30、60、90、120 min,研究浸提时间对土庄绣线菊茶多酚提取的影响。

取土庄绣线菊粉末适量,按照料液比1:20,在70℃下,浸提时间为20 min,加入浸提溶剂乙醇,其体积分数分别为0%、50%、70%、100%,

研究浸提溶剂对土庄绣线菊茶多酚提取的影响。

2.2 茶多酚质量浓度测定

福林酚比色法(GB/T8313-2008)^[7]:利用福林酚试剂氧化茶多酚中的-OH基团并显蓝色,属于氧化还原反应。最大吸收波长是765 nm,用没食子酸做校正标准定量茶多酚。

标准曲线的制备:取没食子酸对照品55 mg,加水定容至50 mL。分别取0.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mL,加水至100 mL。取每个浓度工作液各1 mL至10 mL比色管中,分别加入5.0 mL的10%福林酚试剂,混匀,反应5 min,再加入4.0 mL 7.5%碳酸钠溶液,加水稀释至刻度,混匀。放置60 min。全波长扫描,在748 nm $\pm$ 5 nm波长处有最大吸收值,测定吸光度,绘制标准曲线。

样品中茶多酚质量浓度测定法:取1 mL土庄绣线菊浸提滤液,置10 mL比色管内,加入5.0 mL的福林酚试剂,混匀,反应5 min,再加入4.0 mL 7.5%碳酸钠溶液,加水稀释至刻度,混匀。放置60 min。测定吸光度。由标准曲线回归方程计算出茶多酚的含量。

2.3 茶多酚总还原力测定

铁氰化钾还原法:抗氧化剂可以使铁氰化钾溶液中的三价铁(Fe^{3+})还原成二价铁(Fe^{2+}),二价铁(Fe^{2+})进一步与三氯化铁($FeCl_3$)反应生成普鲁士蓝,反应前后溶液发生不同程度的变化,在700 nm波长处的吸光度值可以直接反映其还原能力大小^[8]。还原力的测定可检验化合物是否为良好的电子供应体,它所提供的电子可以使 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} ,从而使体系溶液颜色改变,即反映出体系中氧化还原状态的改变。在10 mL试管中分别加入不同浓度样品1 mL,磷酸盐缓冲溶液(0.2 mol/L pH=6.6)2.5 mL和1%铁氰化钾5 mL,置于50℃水浴中反应20 min,然后加入10%的三氯乙酸5 mL,摇匀。吸取上清液2.5 mL,加入2.5 mL蒸馏水和0.5 mL 0.1%的三氯化铁溶液。样品在700 nm处测定吸光值,反应物的吸光值增加表明还原力增强。在700 nm波长处测吸光度值,空白组用蒸馏水代替。使用抗坏血酸(VC)、没食子酸(GC)做对照试验。

2.4 超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)自由基清除率测定

采用邻苯三酚法自氧化法进行测定^[9]。邻苯三酚在碱性条件下能发生自氧化,释放出 $O_2^{\cdot-}$,生

成有色的中间产物,在320 nm处有最大吸收峰。当加入清除剂后,可清除 $O^{2-}\cdot$,阻止中间产物积累,使邻苯三酚自氧化速率降低,表现为体系的吸光度降低,因此,可通过添加试样前后吸光度的变化表示试液的清除效果。

将0.8 mg/mL的土庄绣线菊茶多酚提取溶液和相同浓度VC、GC溶液分别取0.3 mL加入到8.4 mL Tris-HCl 体系中,以蒸馏水为空白,在25℃水浴恒温20 min后,加入预热的邻苯三酚0.3 mL,充分混匀,准确反应3 min(加入邻苯三酚时开始计时)后,加入5%抗坏血酸(VC)0.15 mL终止反应。10 min后,于320 nm处测定各吸光度值A。平行测定3次,取平均值。同时用相同浓度的VC、GC做参照试验。

$$\text{清除率} = [A_{\text{空}} - (A_{\text{样}} - A_{\text{底}}) / A_{\text{空}}] \times 100\%$$

式中 $A_{\text{空}}$ 为试剂空白的吸光度值; $A_{\text{样}}$ 为样液的吸光度值; $A_{\text{底}}$ 为样液本底的吸光度值。

2.5 茶多酚对DPPH自由基的清除作用

稳定的DPPH自由基的乙醇溶液呈深紫红色,并在519 nm范围有最大吸收峰。当向DPPH自由基溶液中加入自由基清除剂(抗氧化剂)时,成单被配对,深紫色的DPPH自由基被还原成黄色DPPH-H分子,其褪色程度与所接受的电子数量成定量关系,因而,可以通过吸光度的变化进行定量分析。当DPPH自由基与抗氧化剂反应后,在519 nm波长处的吸收值降低,其降低的程度与接收的电子(抗氧化剂清除自由基活性)呈定量关系,可以用分光光度计测定^[10]。

DPPH自由基以95%乙醇溶液按1:24配成DPPH自由基母液。在试管中加入不同体积的浸提液及等体积的DPPH自由基母液2 mL。混匀后于暗处静置30 min,以无水乙醇为参比,于517 nm处测定吸光值,平行测定3次,取平均值。按下述公式

计算其清除率并计算 DPPH的半数抑制率,样品的 IC_{50} 越小,其抗氧化能力越强。

$$\text{清除率} = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\%$$

式中 A_0 为2 mL DPPH溶液+2 mL 蒸馏水; A_1 为2 mL DPPH溶液+2 mL 茶多酚; A_2 为2 mL DPPH溶液+2 mL 蒸馏水+2 mL 茶多酚。

2.6 茶多酚对 Fe^{2+} 络合能力测定

酚类化合物能够通过络合过渡金属如亚铁离子以阻断亚铁离子介导的自由基链式反应^[11]。 Fe^{2+} 能够催化Fenton反应导致羟基自由基的生成,多酚类物质能与 Fe^{2+} 络合,减少羟基自由基的生成,间接抑制脱氧核糖降解^[12]。

吸取 $FeSO_4$ (1 mmol/L) 150 μ L, 加入茶多酚样品溶液 1200 mL、铁试剂 (1 mmol/L) 60 μ L, 用甲醇定容至3 mL, 反应10 min 在540 nm 处测吸光值, 以不加样品溶液作为空白对照。同时, 用同一浓度的 VC、GC 溶液做参考试验。以 Na_2EDTA 为阳性对照, 结果表示为每克提取物相当于 Na_2EDTA 的毫克数。

3 结果与分析

3.1 茶多酚提取条件试验结果

3.1.1 料液比对茶多酚提取率的影响

取土庄绣线菊粉末, 分别按照料液比为1:5、1:10、1:20、1:40 (g/mL), 加入蒸馏水, 在浸提温度为70℃、浸提时间为20 min的条件下, 其结果如图1所示。由图1可知, 当料液比小于1:20 (g/mL) 时, 茶多酚的提取率随料液比的增加而升高, 但当料液比大于1:20 (g/mL) 时, 茶多酚的提取率随料液比的增加反而降低。这是因为料液比越大溶液中能够溶解的茶多酚量越大, 但茶多酚的含量一定, 料液比过大时提取率变化不大。故土庄绣线菊茶多酚提取时适宜的料液比为1:20 (g/mL), 提取率为5.53%。

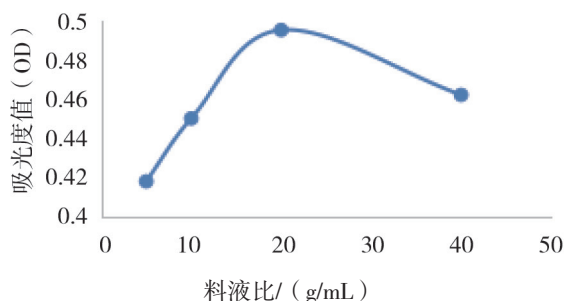


图1 料液比对茶多酚提取率的影响

3.1.2 浸提时间对茶多酚提取率的影响

取1.0 g 土庄绣线菊粉末, 按料液比1:20 加入蒸馏水, 浸提温度为 70 ℃, 浸提时间分别为10、20、30、60、90、120 min, 研究浸提时间对茶多酚提取的影响。结果如图2所示: 当浸提时间小于30 min时, 茶多酚的提取率随浸提时间的升高而提

高; 当浸提时间大于30 min 时, 茶多酚的提取率随浸提时间的延长增长缓慢。这可能是由于浸提时间越长土庄绣线菊中的茶多酚溶出的越多, 但茶多酚不稳定, 浸提时间过长时会使茶多酚被破坏。土庄绣线菊茶多酚适宜的浸提时间为 20 min 时, 提取率为 4.73%。

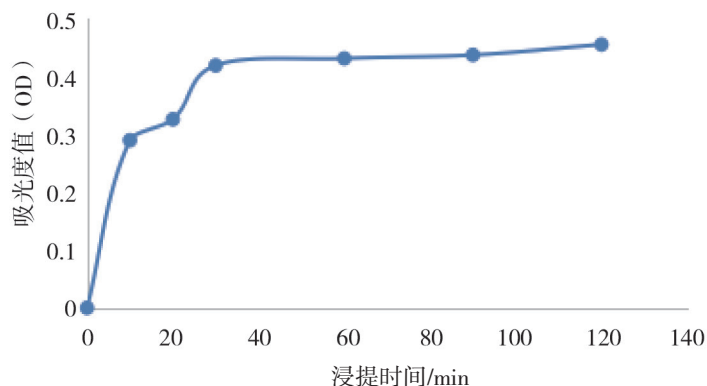


图2 浸提时间对茶多酚提取率的影响

3.1.3 浸提溶剂对土庄绣线菊茶多酚提取率的影响

取1.0 g 土庄绣线菊粉末, 按料液比1:20加入蒸馏水, 浸提温度为 70℃, 浸提溶剂乙醇质量分数分别为0%、50%、70%、100%, 其结果如图3所

示: 当浸提溶剂质量分数为100%时, 茶多酚的提取率是最低的; 当浸提溶剂质量分数为0%和50%时, 提取率有所升高; 当浸提溶剂质量分数为70%时, 提取率最高达到 50.60%。

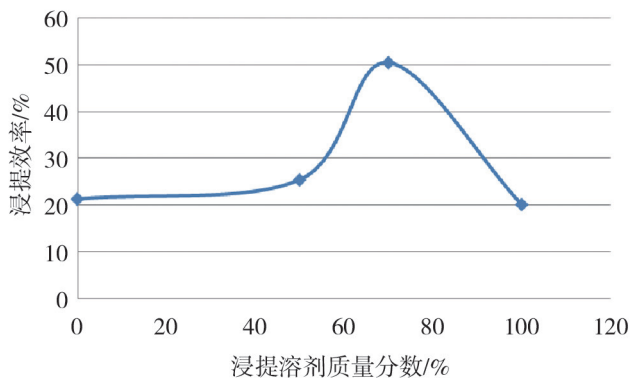


图3 浸提溶剂质量分数对茶多酚提取率的影响

3.2 茶多酚质量浓度测定结果

在土庄绣线菊颗粒度50目的前提下, 综合浸

提时间、浸提溶剂、料液比进行质量浓度测定, 试验结果见表1。

表 1 土庄绣线菊茶多酚质量浓度测定结果

样品号	1	2	3	4	5	6	7	平均值
吸光度值 (A)	0.428	0.400	0.401	0.414	0.506	0.486	0.474	0.444
质量浓度 / (mg/g)	47.2	46.8	46.7	45.8	57.9	56.3	55.3	50.9

3.3 茶多酚总还原能力的大小

土庄绣线菊茶多酚总还原力测定结果如图4所示,随着茶多酚质量浓度的升高,总还原力呈递增

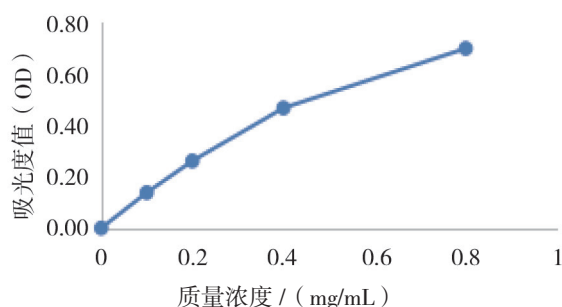


图 4 土庄绣线菊茶多酚的总还原能力

趋势。从图5中可以看出在 3 种抗氧化剂中,茶多酚的还原能力显著大于 VC,略低于 GC,图中 a、b 字母表示组间还原能力呈显著性差异 $P < 0.05$ 。

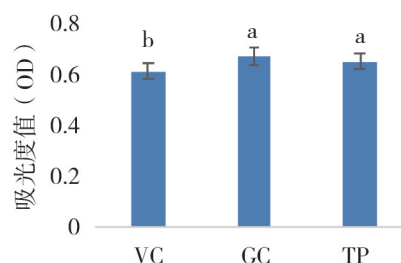
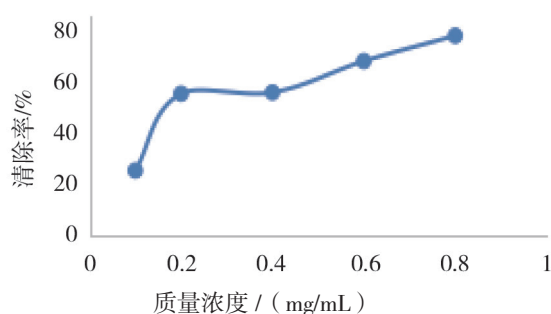


图 5 不同物质的总还原能力比较

3.4 茶多酚清除超氧阴离子 ($O_2^{\cdot-}$) 效果

茶多酚对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除效果如图6。由图可知,在试验浓度范围内,样品表现出较好的清除效果,且随浓度升高清除活性增强。样品浓度大于 0.4 mg/mL 时,清除率随浓度增大而增高的趋势显著;浓度小于 0.4 mg/mL 时,清除率趋于稳定;浓

图 6 土庄绣线菊茶多酚对 $O_2^{\cdot-}$ 自由基清除率

度为 0.8 mg/mL 时,清除率最高,达到 72.62%。根据清除曲线计算茶多酚对 $O_2^{\cdot-}$ 清除作用的 IC_{50} 为 0.520 mg/mL。从图7可知在相同浓度下,VC 的清除效果最强,TP 次之,GC 最小,图中 a、b、c 字母表示组间清除能力呈显著性差异 $P < 0.05$ 。

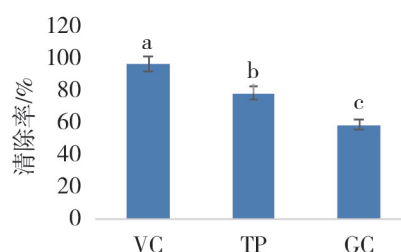


图 7 不同物质对 DPPH 自由基清除作用结果

3.5 茶多酚清除 DPPH 自由基效果

不同质量浓度茶多酚对 DPPH 自由基的清除率,结果如图8所示:茶多酚清除率随着浓度的增加而逐渐升高,但当到达一定质量浓度 (0.4 mg/mL) 时,清除率随浓度的增加而趋于平缓。根据清除

率拟合曲线计算茶多酚对 DPPH 自由基清除作用的 IC_{50} 为 0.376 mg/mL。从图9中可以看出,茶多酚对 DPPH 自由基的清除能力与 VC 相当,GC 效果最显著,图中 a、b 字母表示组间清除能力呈显著性差异 $P < 0.05$ 。

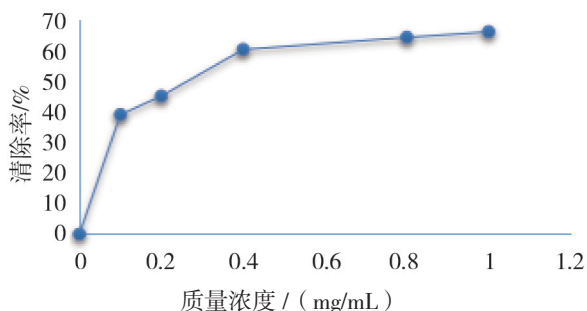


图 8 土庄绣线菊茶多酚对 DPPH 自由基清除率

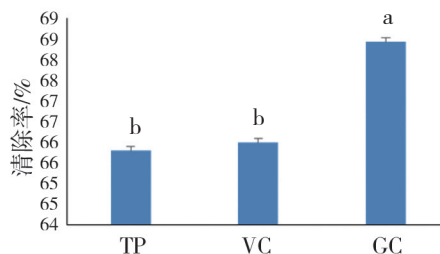


图 9 不同物质对 DPPH 自由基清除作用结果

3.6 茶多酚对 Fe^{2+} 络合能力测定

茶多酚分子内有多邻位酚羟基。可作为多基配体与一个中心离子如铅、锡、铁、钙等络合，形成环状的螯合物而产生沉淀。茶多酚对 Fe^{2+} 络合能力测定结果如图 10、11所示： FeSO_4 浓度在 0 ~ 1 mmol/mL 范围内与吸光度值成良好线性关系。线性回归方程： $y=0.0002x-0.0018$ ， $R^2=0.999$ 。取

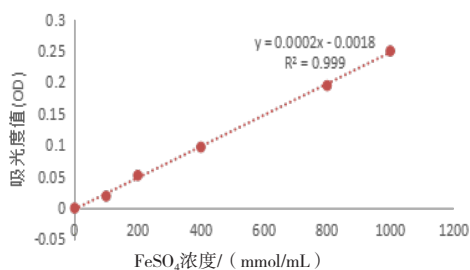


图10 Fe^{2+} 络合能力测定标准曲线

不同浓度的茶多酚提取液、没食子酸（GC）溶液和抗坏血酸（VC）溶液进行测定，测得3种抗氧化剂中，0.8 mg/mL 的茶多酚对 Fe^{2+} 的络合能力极显著地大于其他两种，GC次之，VC对 Fe^{2+} 的络合能力最弱。说明茶多酚有很强的络合 Fe^{2+} 能力，图中a、b、c字母表示组间络合能力呈显著性差异 $P<0.05$ 。

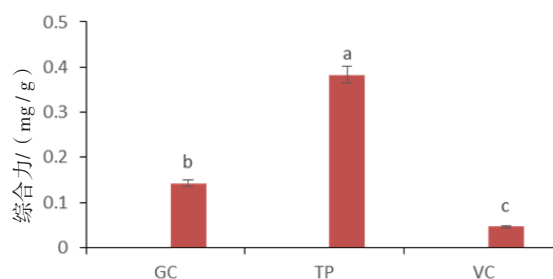


图11 Fe^{2+} 络合能力测定结果

4 讨论

茶多酚具有高效的抗衰老、抗辐射、消除人体过剩的自由基、去脂减肥、降低血糖、血脂和胆固醇、预防心血管疾病及抑制肿瘤细胞、保护脑神经等多种保健和药理功能^[13]。判断一种植物能否作为茶源植物，要对其是否含茶多酚等茶用化学成分及其含量进行分析评价^[4]，本研究着重探讨了如何从土庄绣线菊中提取出茶多酚并测定其抗氧化成分。一种药材的总还原能力是评价其潜在抗氧化活性的重要指标^[14]。抗氧化活性反映的不是样品针对某一种自由基的清除活性，而是样品总还原能力。常用DPPH自由基清除法^[15]来评价抗氧化活性的强弱，清除超氧阴离子能力的大小也可作为药物抗氧化能力的评价指标之一^[16]。

本试验采用公认的抗氧化剂抗坏血酸（VC）和没食子酸（GC）作为参照，研究测定土庄绣线

菊茶多酚的抗氧化活性，试验结果表明相同浓度条件下茶多酚的还原力和络合 Fe^{2+} 能力大于VC，清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 自由基的能力介于VC和GC之间，清除 DPPH 自由基的能力相对较弱，有很强的络合 Fe^{2+} 能力。

综上所述，土庄绣线菊具有较强的抗氧化作用，若能将土庄绣线菊作为茶源植物加以开发利用，不仅可为其资源利用开辟新的途径，还可填补内蒙古缺少茶树资源的空白；同时，也符合开发绿色食品的要求与少数民族的饮茶习惯，为保护和合理利用野生植物资源提供科学依据。

参考文献：

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志第三十六卷[M]. 北京：科学出版社，1974：39.
- [2] 内蒙古植物志编辑委员会. 内蒙古植物志 第3卷[M]. 第

- 二版. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 1989: 60.
- [3] 中国科学院林业土壤研究所. 东北木本植物图志[M]. 第一版. 北京: 科学出版社, 1955: 60.
- [4] 阿娟, 燕玲, 邢燕红, 等. 土庄绣线菊化学成分的分析及综合评价[J]. 干旱区资源与环境, 2011, (4): 155-160.
- [5] 邢燕红, 燕玲, 岳秀贤. 五种绣线菊属植物的化学成分分析及其资源评价[J]. 干旱区资源与环境, 2010, 24(6): 143-148.
- [6] 郭树琴, 吴胜举, 李岱, 等. 响应面法优化超声提取绿茶茶多酚工艺[J]. 生物加工过程, 2009, 7(1): 39-43.
- [7] GB/T 8313-2008 茶叶中茶多酚和儿茶素类含量的检测方法[S]. 2008.
- [8] Zuofa ZHANG, Jie JIN, Liangen SHI. Antioxidant Activity of the Derivatives of Polysaccharide Extracted from a Chinese Medical Herb (Ramulus mori) [J]. Food Sci Technol Res, 2008, 14(2): 160-168.
- [9] 李斐菲, 吴拥军, 屈凌波, 等. 中药巴戟天抗自由基活性研究[J]. 光谱实验室, 2005, (3): 553-555.
- [10] 方敏, 宫智勇, 王耀峰, 等. 玉米须乙醇提取物体外抗氧化活性研究[J]. 中国食品与营养, 2008, (4): 45-47.
- [11] 王华, 姚亚平, 王毕妮, 等. 高粱籽粒提取物抗氧化活性的研究[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(10): 123.
- [12] 刘学铭, 梁世中. 茶多酚的保健和药理作用及应用前景[J]. 食品与发酵工业, 1998, 24(5): 47.
- [13] 张星海, 沈生荣, 杨贤强. 茶多酚对心脑血管疾病防治作用的研究进展[J]. 福建茶叶, 2001, 4: 24.
- [14] 刘晓丽, 霍展样, 张金莲. 盐酸川芎嗪体外抗氧化作用的研究[J]. 中国航天医药杂志, 2003, 5(2): 37.
- [15] A M Aljadi, M Y Kamaruddin. Evaluation of the Phenolic Contents and Antioxidant Capacities of Two Malaysian Floral Honeys[J]. Food Chemistry, 2004, 85: 513-518.
- [16] Tseng Y H, Yang J H, Mau J L. Antioxidant Properties of Polysaccharides from Ganoderma Tsugae[J]. Food Chemistry, 2008, 10: 732.

(收稿日期 2019年5月21日 编辑 邹宇玲)