

昆仑雪菊茶总黄酮提取及抗氧化活性研究

Extraction and antioxidant activities of flavonoids from

Coreopsis tinctoria Nutt tea

王家妮¹ 明建^{1,2} 田勇¹ 王荣杰¹ 李福香¹

WANG Jia-ni¹ MING Jian^{1,2} TIAN Yong¹ WANG Rong-jie¹ LI Fu-xiang¹

(1. 西南大学食品科学学院, 重庆 400715; 2. 西南大学国家食品科学与工程实验教学中心, 重庆 400715)

(1. College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. National Food Science and Engineering Experimental Teaching Center, Southwest University, Chongqing 400715, China)

摘要:以昆仑雪菊为原料,在单因素试验基础上,结合 Box-Behnken 响应面法,研究昆仑雪菊茶总黄酮的浸提工艺优化及抗氧化活性。结果表明:昆仑雪菊茶总黄酮的最佳浸提工艺条件为浸提时间 13 min、浸提温度 98 ℃、料液比 1:78 (g/mL),总黄酮得率为 (20.39±0.07)%。最优条件下浸提物的 DPPH·清除能力、铁还原力的 IC₅₀ 分别为 (82.40±1.98), (137.98±1.56) μg/mL,氧自由基吸收能力 (ORAC 值) 为 1 427.89 μmol TE/g·DW,证明昆仑雪菊茶总黄酮具有很好的抗氧化活性。

关键词:昆仑雪菊茶;黄酮;抗氧化活性

Abstract: The optimization of the flavonoids extraction technique of *Coreopsis tinctoria* Nutt tea and the vitro antioxidant activity of flavonoids was studied by taking the *Coreopsis tinctoria* Nutt tea as the raw material, and basing the single factor experiment and Box-Behnken methodology. Results: The optimal extraction conditions of flavonoids from *Coreopsis tinctoria* Nutt tea were: extraction time 13 min, extraction temperature 98 ℃, the ratio of solid to liquid 1:78 (g/mL). Under the conditions, the flavonoids extraction rate was (20.39±0.07)%. The half inhibiting concentrations (IC₅₀) to FRAP and DPPH free radical scavenging were (137.98±1.56) μg/mL and (82.40±1.98) μg/mL, respectively. The ORAC value was 1 427.89 μmol TE/g·DW, which indicated that the flavonoids from *Coreopsis tinctoria* Nutt tea exhibited significant antioxidant activities *in vitro*.

Keywords: *Coreopsis tinctoria* Nutt tea; flavonoids; antioxidant activities

基金项目:中央高校基本科研业务费专项(编号:XDJK2017B050);重庆市社会民生科技创新专项(编号:cstc2015shmszx80019)

作者简介:王家妮,女,西南大学在读本科生。

通信作者:明建(1972—),男,西南大学教授,博士。

E-mail: mingjian1972@163.com

收稿日期:2018-03-09

昆仑雪菊学名两色金鸡菊 (*Coreopsis tinctoria* Nutt.)^[1],系菊科(Compositae)金鸡菊属(*Coreopsis*)一年生草本植物,因其生长在新疆昆仑山脉海拔 3 000 m 以上的高寒积雪地区而得名“雪菊”^[2]。研究表明,昆仑雪菊含有黄酮、有机酸、皂苷、鞣质、不饱和脂肪酸、三萜类、多肽类等多种活性成分^[3-4],其中黄酮类化合物含量最为丰富^[5]。昆仑雪菊黄酮具有抗氧化^[6-7]、降血脂^[8]、降血糖^[9]、抗炎^[10]、降血压^[11]和抗衰老^[12]等多种生物活性。

目前,国内外对昆仑雪菊黄酮类化合物的提取主要采用有机溶剂法^[13-14],鲜有用水直接浸提的研究报道。但在日常生活中,雪菊的主要摄入方式为传统茶饮,因此更应当关注其亲水活性成分。李宝文等^[15]研究了昆仑雪菊中水溶性黄酮的提取工艺,其提取方法不同于传统茶饮冲泡,而模拟传统茶饮冲泡方式,更具有实际价值。因此,本研究模拟传统茶饮冲泡方法,对昆仑雪菊茶总黄酮进行水浸提,通过响应面法优化浸提工艺,并对昆仑雪菊茶总黄酮的体外抗氧化活性进行研究,以期为昆仑雪菊茶饮的开发及研究提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

昆仑雪菊:采自新疆昆仑山海拔 3 000 m 以上的高寒地区,购于新疆和田地区;

芦丁、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、荧光素钠盐(FL)、6-羟基-2,5,7,8-四甲基色烷-2-羧酸(Trolox):分析纯,美国 Sigma 公司;

2,2'-偶氮二异丁基脒盐酸盐(ABAP):分析纯,日本 Wako Chemicals 公司;

亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、铁氰化钾、三氯乙酸、三氯化铁等:分析纯,成都市科龙化工试剂厂。

1.2 仪器与设备

分光光度计:JH722 型,上海精科科学仪器厂;

数显恒温水浴锅:HH-2型,常州澳华仪器有限公司;
分析天平:FA1004A型,上海精天电子仪器有限公司;
pH计:PB-10型,德国赛多利斯公司;
微型台式离心机:1-15PK型,德国赛多利斯公司;
多功能酶标仪:Synergy H1型,美国基因公司。

1.3 试验方法

1.3.1 单因素试验

(1) 浸提时间:精确称取 3.0 g 昆仑雪菊样品放入三角瓶中,按料液比 1:80 (g/mL) 与水混合,在 90 °C 下分别浸提 2, 5, 8, 11, 14, 17 min, 测定浸提时间对总黄酮得率的影响。

(2) 浸提温度:精确称取 3.0 g 昆仑雪菊样品放入三角瓶中,按料液比 1:80 (g/mL) 与水混合,分别在 75, 80, 85, 90, 95, 100 °C 下浸提 14 min, 测定浸提温度对总黄酮得率的影响。

(3) 料液比:精确称取 3.0 g 昆仑雪菊样品放入三角瓶中,分别按料液比 1:50, 1:60, 1:70, 1:80, 1:90, 1:100 (g/mL), 在 90 °C 条件下浸提 14 min, 测定料液比对总黄酮得率的影响。

1.3.2 雪菊茶总黄酮含量测定

(1) 标准曲线的制备:参照文献[16]。得到标准曲线的回归方程: $Y = 0.0127x - 0.0114 (R^2 = 0.9997)$ 。

(2) 样品黄酮含量的测定:取 1 mL 茶汤样品(可作适当稀释),置于 25 mL 容量瓶中,后续操作与标准曲线制备相同。

1.3.3 雪菊茶总黄酮得率计算

$$c = \frac{m_1}{m_2} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

c ——提取率, %;

m_1 ——提取的总黄酮质量, g;

m_2 ——干燥原料的质量, g。

1.3.4 响应面设计优化浸提工艺 结合单因素试验结果,对雪菊茶总黄酮浸提工艺进行响应面设计及其回归方程方差分析。以总黄酮得率为响应值,浸提时间、浸提温度、料液比作为考察因素,选取 5 个中心点进行 17 个试验,并对试验结果进行响应面分析。

1.3.5 昆仑雪菊茶抗氧化活性测定

(1) 清除 DPPH·能力:根据 Cheung 等^[17]的方法。按式(2)计算 DPPH·清除能力。

$$K = \left(1 - \frac{A_i}{A_j}\right) \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

K ——DPPH·清除率, %;

A_i ——样品液吸光度;

A_j ——纯水吸光度。

(2) 铁还原能力测定(FRAP):根据 Luanda 等^[18]的方法。

(3) 氧自由基吸收能力测定(ORAC):根据 Wolfe 等^[19]

的方法。按式(3)、(4)分别计算 AUC 值和 ORAC 值。

$$AUC = (0.5 \times f_1/f_1 + f_2/f_1 + f_3/f_1 + \dots + f_n/f_1 + \dots + f_{30}/f_1 + 0.5 \times f_{30}/f_1) \times CT, \quad (3)$$

$$ORAC = \frac{AUC_{\text{样品}} - AUC_{\text{空白}}}{AUC_{\text{Trolox}} - AUC_{\text{空白}}} \times \frac{\text{Trolox 摩尔浓度}}{\text{Sample 摩尔浓度}}, \quad (4)$$

式中:

f_1 ——第 1 次荧光读数;

f_n ——第 n 次荧光读数;

CT ——间隔测定时间 4.5 min;

$AUC_{\text{样品}}$ ——样品荧光衰减下的面积;

$AUC_{\text{空白}}$ ——空白液荧光衰减下的面积。

用 Trolox 当量($\mu\text{mol TE/g}$)来表示 ORAC 值。

1.4 试验数据分析

采用 Excel 2010 计算平均值和标准偏差,Origin 8.0 软件进行单因素试验分析,响应面设计试验设计与方差分析使用 Design-Expert 8.0.6 软件进行。所有试验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 浸提时间对昆仑雪菊茶总黄酮得率的影响 由图 1 可知,在 2~11 min 时雪菊茶总黄酮得率随浸提时间的增加而增加,超过 11 min 以后基本保持不变。分析其原因可能是昆仑雪菊中黄酮随着浸提时间的延长不断溶出,当时间达到 11 min 时,雪菊中黄酮基本溶出,此后随着浸提时间的延长,总黄酮得率不再变化。因此选择最佳浸提时间为 11 min。

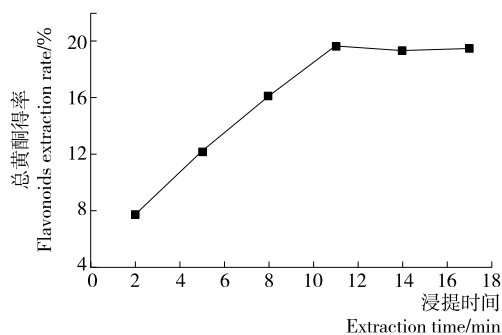


图 1 浸提时间对昆仑雪菊茶总黄酮提取的影响

Figure 1 Effect of extraction time on the yield of flavonoids of *Coreopsis tinctoria* tea

2.1.2 浸提温度对昆仑雪菊茶总黄酮得率的影响 由图 2 可知,在一定温度范围内,昆仑雪菊茶总黄酮得率与浸提温度呈正相关,当浸提温度达到 95 °C 时,总黄酮得率达到最大值 18.22%,当温度高于 95 °C 雪菊茶总黄酮得率有所下降。因此选择最佳浸提温度为 95 °C。

2.1.3 料液比对昆仑雪菊茶总黄酮得率的影响 由图 3 可知,随着加水量的增加,昆仑雪菊茶总黄酮得率先增加后减少的趋势,在料液比为 1:80 (g/mL) 时总黄酮得率达到最大值,与宋佳敏等^[20-21]研究结果一致。这可能是当加水量较少时,在稀释作用下黄酮随着提取液的增加溶出更加充分,但加水量太大会导致体系的比热容增大,可能会加剧

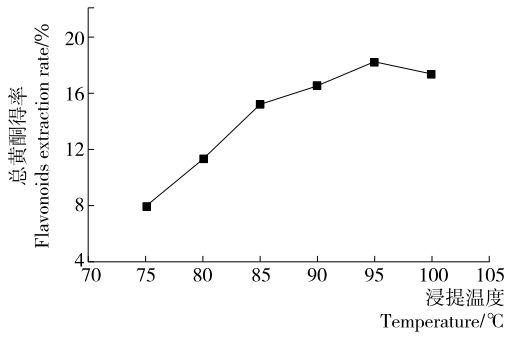


图 2 浸提温度对昆仑雪菊茶总黄酮提取的影响

Figure 2 Effect of extraction temperature on the yield of flavonoids of *Coreopsis tinctoria* tea

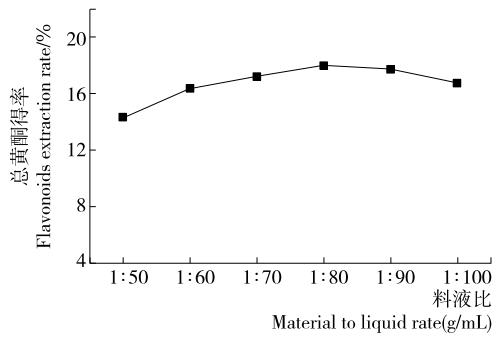


图 3 料液比对昆仑雪菊茶总黄酮提取的影响

Figure 3 Effect of material-to-liquid ratio on the flavonoids of *Coreopsis tinctoria* tea

对黄酮结构的破坏^[21]。因此选择最佳料液比为 1 : 80 (g/mL)。

2.2 提取工艺的优化

2.2.1 响应面优化结果 根据单因素试验结果,选取对昆仑雪菊茶总黄酮得率有影响的浸提时间、浸提温度、料液比因素,设计三因素三水平响应面试验。表 1 为因素水平编码表,表 2 为试验方案设计及结果。

表 1 设计试验因素水平及编码

Table 1 Factor level and coding of Box-Behnken design

水平	A 浸提时间/min	B 浸提温度/°C	C 料液比(g/mL)
-1	8	90	1 : 70
0	11	95	1 : 80
1	14	100	1 : 90

使用 Design Expert 8.0.6 软件,对表 2 中数据进行处理,得到如表 3 所示的该模型回归方程方差分析表,对数据进行非线性回归的二项式拟合,得到以下预测模型:

$$R = 19.86 + 0.76A + 0.71B + 0.21C + 0.12AB - 0.21AC - 0.14BC - 0.61A^2 - 0.79B^2 - 0.17C^2 \quad (5)$$

对此模型进行回归分析,分析结果如表 3 所示,模型相关系数 $R^2=0.9964$,决定系数 $R^2_{Adj}=0.9918$,说明该模型没有偏离实际情况,误差较小。模型极显著($P<0.01$),失拟项 $P=0.547$ (不显著),表明该模型可靠,具有可行性。模型变异

表 2 响应面试验设计方案及结果

Table 2 Design-expert design scheme and experimental results

试验号	A	B	C	总黄酮得率/%
1	-1	-1	0	17.18
2	1	-1	0	18.39
3	-1	1	0	18.3
4	1	1	0	19.99
5	-1	0	-1	17.89
6	1	0	-1	19.89
7	-1	0	1	18.69
8	1	0	1	19.87
9	0	-1	-1	17.81
10	0	1	-1	19.57
11	0	-1	1	18.53
12	0	1	1	19.74
13	0	0	0	19.79
14	0	0	0	19.77
15	0	0	0	19.89
16	0	0	0	19.88
17	0	0	0	19.99

系数为 0.44%,说明模型重复性好,可以用于预测昆仑雪菊茶总黄酮浸提工艺。

从表 3 可以看出,3 个因素的一次项及二次项对总黄酮得率的影响极显著($P<0.01$),3 个因素之间交互作用均显著($P<0.05$)。由 F 值可知,各因素对昆仑雪菊茶总黄酮得率影响的大小次序依次为:浸提时间>浸提温度>料液比。

表 3 优化后模型方差分析表[†]

Table 3 Significance test for coefficient of the regression model developed

项目	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	13.98	9	1.55	216.37	<0.000 1	**
A	4.62	1	4.62	643.76	<0.000 1	**
B	4.05	1	4.05	563.82	<0.000 1	**
C	0.35	1	0.35	48.57	0.000 2	**
AB	0.058	1	0.058	8.02	0.025 3	**
AC	0.17	1	0.17	23.42	0.001 9	**
BC	0.076	1	0.076	10.54	0.014 1	*
A ²	1.58	1	1.58	220.61	<0.000 1	**
B ²	2.60	1	2.60	362.17	<0.000 1	**
C ²	0.12	1	0.12	16.12	0.005 1	**
残差	0.050	7	7.18E-03			
失拟项	0.019	3	6.38E-03	0.82	0.547 0	不显著
净误差	0.031	4	7.78E-03			
总误差	14.03	16				

† ** 表示极显著($P<0.01$), * 表示显著($0.01<P<0.05$)。

2.2.2 响应面分析 图 4 可以直观地反映出浸提时间、浸提温度和料液比三因素之间的交互作用对总黄酮得率的影响。各因素对总黄酮得率的影响程度可以通过响应曲面陡峭程度反映,响应曲面陡峭表明对总黄酮得率影响显著,响应曲面平缓,表明该因素对总黄酮得率影响不显著^[22]。比较模型的响应曲面陡峭程度:浸提时间>浸提温度>料液比,表明各因素对总黄酮提取率的影响大小顺序为:浸提时间>浸提温度>料液比,其结论同表 3 方差分析结论一致。等高线的形状可反映出各因素间交互作用的强弱,趋于椭圆形表明两因素的交互作用显著,而圆形表明不显著^[23],图 4(a)~(c)中各因素相互作用得到的等高线均为椭圆形,表明浸提时间与浸提温度、浸提时间与料液比、浸提温度与料液比交互作用显著,与模型的方差分析结果一致。

2.2.3 最优浸提工艺条件的验证 根据 Design-Expert 8.0.6 软件,结合实际操作条件,响应面优化的模型得出最优条件为:浸提时间 13 min、浸提温度 98 ℃、料液比 1 : 78

(g/mL),提取率为 20.30%。根据优化后的最佳工艺参数提取,验证实验重复 3 次,取平均值,黄酮得率为 (20.39 ± 0.07)%,与预测模型得出的理论值相比较,偏差<0.33%,说明该模型具有可靠性,可以用于预测昆仑雪菊茶浸提总黄酮得率。

2.3 雪菊茶的体外抗氧化活性评价

如图 5 所示,昆仑雪菊茶 DPPH·清除能力的半数有效浓度值(IC_{50})为 (82.40 ± 1.98) μg/mL,弱于抗坏血酸的 [(18.70 ± 0.89) μg/mL];铁还原力 IC_{50} 值为 (137.98 ± 1.56) μg/mL,弱于抗坏血酸的 [(60.41 ± 0.62) μg/mL],表明昆仑雪菊茶具有一定的铁还原能力及抗氧化活性。同时,研究发现昆仑雪菊茶的 ORAC 值为 1 427.89 μmol TE/g · DW,显著高于徐维盛等^[24]测定的闽红茶(1 379.10 μmol TE/g · DW)、乌龙茶(1 270.70 μmol TE/g · DW)以及古丈毛尖茶(1 247.10 μmol TE/g · DW),表明昆仑雪菊茶具有良好的氧自由基清除能力。

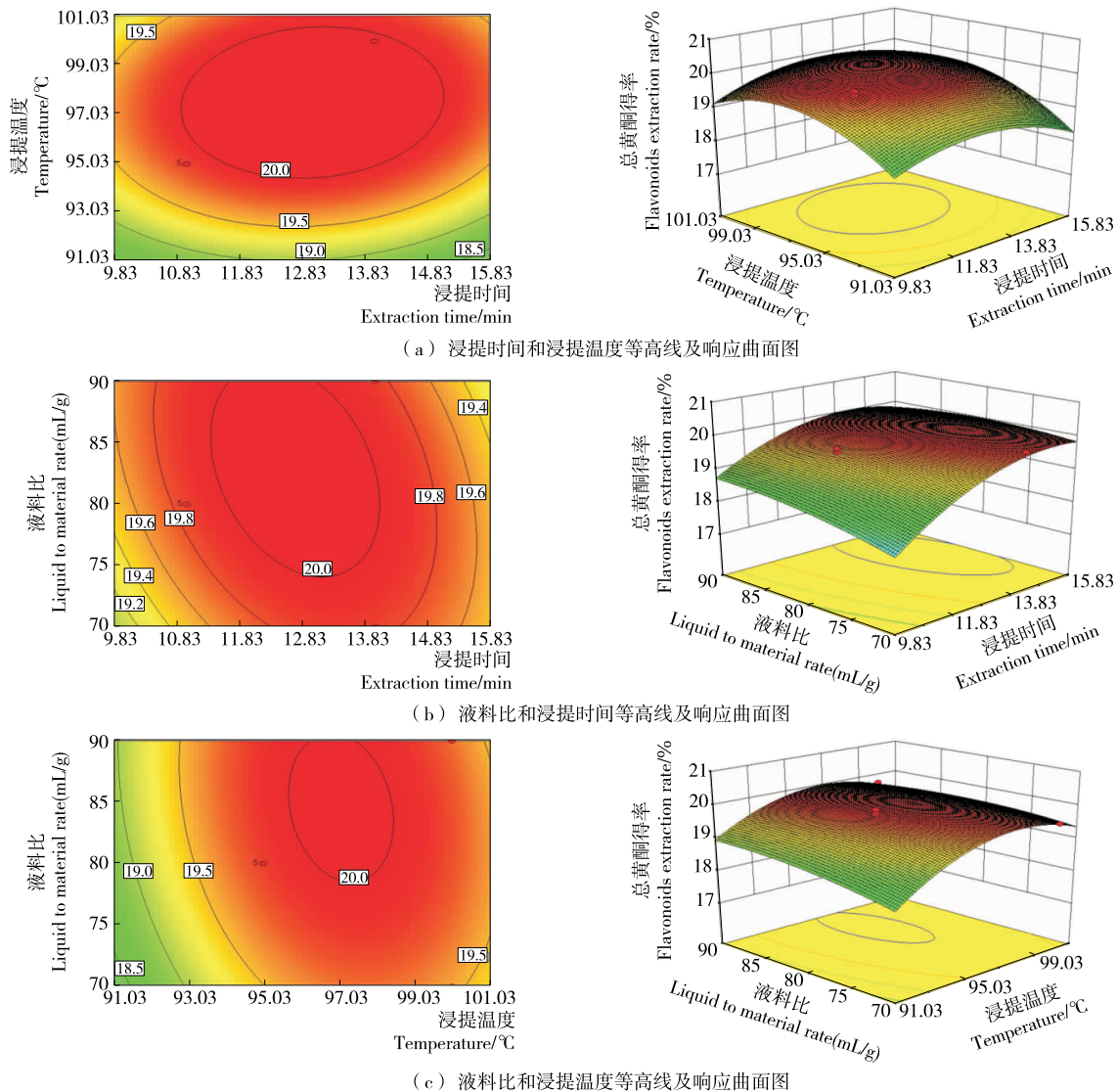


图 4 等高线及响应曲面图

Figure 4 Contour plots and response surface

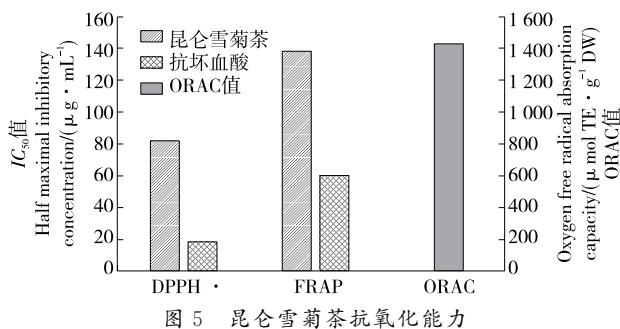


Figure 5 Antioxidant Capacity of *Coreopsis tinctoria* tea

3 结论

本研究通过模拟日常冲泡花茶的方法,以昆仑雪菊茶总黄酮浸出得率为评价指标,采用单因素试验和 Box-Behnken 响应面法优化昆仑雪菊茶浸提总黄酮的最佳工艺条件,并评价其体外抗氧化活力。工艺优化结果表明,最佳浸提条件为:浸提时间 13 min、浸提温度 98 ℃、料液比 1 : 78 (g/mL),该条件下昆仑雪菊茶中总黄酮得率高达 20.30%,以数学模型得到的浸提条件进行验证实验,相对误差较小 (RSD<0.33%),表明回归模型优化得到的浸提工艺条件是有效的,具有实用价值。

另外,昆仑雪菊茶黄酮的抗氧化活性研究表明,在一定浓度范围内,昆仑雪菊茶抗氧化能力随总黄酮浓度的增加而增加,且线性关系良好。昆仑雪菊茶的清除 DPPH · IC₅₀ 值为 (82.40 ± 1.98) μg/mL,还原铁离子的 IC₅₀ 值为 (137.98 ± 1.56) μg/mL,ORAC 值为 1 427.89 μmol TE/g · DW,表明昆仑雪菊茶表现出较好的抗氧化活性,可作为一种天然抗氧化剂来源,具有良好的发展前景。

本研究以水为溶剂,采用传统茶饮冲泡方式,更具有实际意义。本文仅研究了昆仑雪菊茶中总黄酮的浸提工艺条件及体外抗氧化活性,而昆仑雪菊茶饮中总黄酮的开发利用及抗氧化有效单体成分有待进一步研究。

参考文献

- [1] 黄涵. 雪菊质量评价研究[D]. 广州: 广东药科大学, 2016: 2-4.
- [2] GUO Li-min, ZHANG Wen-sheng, LI Shi-ming, et al. Chemical and nutraceutical properties of *Coreopsis tinctoria* [J]. Journal of Functional Foods, 2015, 13(4): 11-20.
- [3] 邱佳俊. 雪菊总黄酮的制备及其抗氧化活性研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2015: 41-43.
- [4] JEFFREY B H, CHRISTINE A W. Advances in flavonoid research since 1992 [J]. Phytochemistry, 2000, 55(6): 481-504.
- [5] 黄伟, 刘润潮, 夏靓, 等. 雪菊化学成分及药理作用的研究现状 [J]. 中国高新技术企业, 2017(5): 102-103.
- [6] 宋焯威, 金红娜, 徐洁, 等. 昆仑雪菊中黄酮类化合物的提取分离及抗氧化活性评价 [J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(4): 220-223.
- [7] 徐斌, 王丹, 葛红娟, 等. 昆仑雪菊黄酮提取物体外抗氧化活性试验 [J]. 中国兽医杂志, 2015, 51(12): 103-106.
- [8] 方焯, 李雅丽, 陈新梅. 雪菊黄酮对脂肪变肝细胞的降脂效

- 果 [J]. 温州医科大学学报, 2016, 46(10): 720-723.
- [9] 高飞. 雪菊总黄酮降血脂作用及其机制研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2016: 2-3.
- [10] UKIYA M, AKIHISA T, TOKUDA H, et al. Constituents of Compositae plants: III. Anti-tumor promoting effects and cytotoxic activity against human cancer cell lines of triterpene diols and triols from edible chrysanthemum flowers [J]. Cancer Letters, 2002, 177: 7-12.
- [11] 崔康康. 新疆昆仑雪菊水提液对大鼠血脂与血压的影响研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2013: 44-47.
- [12] 沙爱龙, 吴瑛, 盛海燕, 等. 昆仑雪菊黄酮对衰老模型小鼠脑及脏器指数的影响 [J]. 动物医学进展, 2013, 34(7): 66-68.
- [13] 杨英士, 陈伟, 杨海燕, 等. 昆仑雪菊中 2 个黄酮类化合物的分离鉴定及其抗氧化活性评价 [J]. 南京农业大学学报, 2014, 37(4): 149-154.
- [14] 李顺源, 彭裕红, 章斌, 等. 雪菊总黄酮提取工艺研究进展 [J]. 中医药导报, 2017, 23(5): 54-56.
- [15] 李宝文, 贾明. 昆仑雪菊中水溶性总黄酮的提取工艺研究 [J]. 中国民族民间医药, 2014, 23(20): 20-21, 27.
- [16] 杜鹃, 吴忠红. 新疆昆仑雪菊总黄酮含量测定方法研究 [J]. 食品研究与开发, 2015, 36(1): 93-96.
- [17] CHEUNG L M, CHEUNG P C K, OOI V E C. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts [J]. Food Chemistry, 2003, 81(2): 249-255.
- [18] LUANDA M A S D C, FERNANDA V L, ROZANGELA C P, et al. Free radical scavenging of grape pomace extracts from Cabernet sauvignon (*Vitis vinifera*) [J]. Bioresource Technology, 2008, 99(17): 8 413-8 420.
- [19] WOLFE K, KANG Xin-mei, HE Xiang-ju, et al. Cellular antioxidant activity of common fruits [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(18): 8 418-8 426.
- [20] 宋佳敏, 王鸿飞, 孙朦, 等. 响应面法优化金蝉花多糖提取工艺及抗氧化活性分析 [J]. 食品科学, 2018, 39(4): 275-281.
- [21] 朱宇, 姚英政, 董玲, 等. 响应面法优化玉米须袋泡茶冲泡工艺 [J]. 食品科学, 2014, 35(2): 328-332.
- [22] 喻俊, 王涛, 贾春红, 等. 响应面优化牛蒡子多糖的提取及其抗氧化活性研究 [J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(6): 207-212.
- [23] 曹春艳. 响应面法优化银杏叶黄酮提取工艺 [J]. 中国食品学报, 2014, 14(4): 78-86.
- [24] 徐维盛, 张桂雨, 刘静, 等. ORAC 法评价 16 种茶叶的抗氧化能力 [J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(1): 241-246.