

Antioxidant Activity of Theabrownine from Fuzhuan Brick Tea

Guowen He, Dan Wu, Xiaobin Lei, Yilan You, Jin Zhang

Hunan Provincial Key Lab of Dark Tea and Jin-Hua, School of Materials and Chemical Engineering,
Hunan City University, Yiyang Hunan
Email: zhongyihgw@163.com

Received: Aug. 4th, 2019; accepted: Aug. 22nd, 2019; published: Aug. 29th, 2019

Abstract

In this study, theabrown was extracted and purified from Fuzhuan brick tea. The antioxidant activities of theabrown on hydroxyl free radical and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) were studied. The antioxidant activity test result showed that the theabrown on hydroxyl free radical with a scavenging capacity of 50.2%, and the elimination of theabrown with different purity against hydroxyl radicals is different. While scavenging capacity of theabrown on DPPH free radical was up to 90%, and the antioxidant activity of theabrown at low concentration was higher than that of Vc.

Keywords

Theabrownine, Antioxidant Activity, Fuzhuan Tea, Vc

茯砖茶中茶褐素的抗氧化性研究

贺国文, 吴丹, 雷晓斌, 游一兰, 张劲

湖南城市学院, 材料与化学工程学院, 黑茶金花湖南省重点实验室, 湖南 益阳
Email: zhongyihgw@163.com

收稿日期: 2019年8月4日; 录用日期: 2019年8月22日; 发布日期: 2019年8月29日

摘要

本研究对茯砖茶中的茶褐素提取纯化, 考察茶褐素对羟基自由基和1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)的抗氧化性能。试验结果表明, 茶褐素对羟基自由基清除率为50.2%, 并且不同纯度的茶褐素消除效果稍有差别。而对DPPH清除率高达90%, 在低浓度下茶褐素的抗氧化性大于维生素C (Vc)。

关键词

茶褐素, 抗氧化活性, 茯砖茶, 维生素C

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

茶褐素是茶多酚、茶黄素和茶红素继续氧化和聚合的最终产物, 是一类分子差异极大的复杂高聚合物[1] [2], 已有的研究表明茶褐素具有消食去腻、减肥防龋、降血脂、降低胆固醇等多种保健功能和显著的抗疲劳、降血脂的药理疗效[3] [4]。目前对于茶褐素的研究多集中在绿茶[5]、普洱茶和红茶方面[6]-[11], 而茯砖茶茶褐素抗氧化研究鲜见文献报道。何英姿[12]发现六堡茶茶褐素对羟基自由基的清除率高达74%, 同条件低浓度情况下比Vc的高, 对亚硝基的清除作用与Vc基本相当, 最高可达73%, 对超氧阴离子自由基的清除率最高为60%。周向军[13]研究发现乌龙茶茶褐素对羟自由基、超氧阴离子自由基和DPPH具有一定的清除效果, 虽清除效果均低于Vc, 但在同类天然提取物中, 茶褐素提取物仍具有明显优势, 具有较大的开发价值。茯砖茶中的茶褐素(TB)含量很高, 约占茶干量17.3% [14]。本研究对茯砖茶中的茶褐素进行提取纯化, 对其抗氧化活性进行研究, 以期对茯砖茶茶褐素的开发利用提供理论参考。

2. 实验部分

2.1. 实验材料

茯砖茶(2018年产, 湖南城院生物科技); 正丁醇(天津富宇精细化工)、三氯甲烷(天津富宇精细化工)、乙酸乙酯(天津恒兴化学试剂)、无水乙醇(天津富宇精细化工)、双氧水(30%, 广州华杭化工材料)、硫酸亚铁(天津大茂化学试剂)、水杨酸(济南英东化工)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH, 北京中生瑞泰科技), 均为分析纯; 维生素C (Vc, $\geq 99.7\%$, 天津致远化学试剂)。

2.2. 溶液的配制

1) DPPH-乙醇溶液的配制: 称取DPPH质量为2.0 mg, 用25 mL无水乙醇溶解配成 $0.08 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的DPPH-乙醇溶液, 放冰箱冷藏。

2) 水杨酸-乙醇溶液的配制: 称取水杨酸34.53 mg, 溶于50 mL容量瓶中, 制成 $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的水杨酸-乙醇溶液。

3) 硫酸亚铁溶液的配制: 称取水杨酸38 mg, 溶于50 mL容量瓶中, 制成 $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硫酸亚铁溶液。

4) 双氧水配制: 取27.77 mg 30%的双氧水稀释成 $4.9 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 现配现用。

4) Vc溶液配制: 取1 mg溶于25 mL容量瓶中制成浓度为 $0.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 然后稀释成实验所需的浓度。

5) 样品溶液的配制: 取茶褐素样品0.1 g分别溶于25 mL容量瓶中得 $4.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 然后将其稀释成实验所需浓度。

2.3. 茯砖茶中茶褐素提取纯化

按照文献[2], 将茯砖茶粉碎干燥到恒重后索氏提取, 提取液用等体积的正丁醇萃取三次, 得到水相, 除去皂甙。水相再用等体积的三氯甲烷萃取三次, 除去咖啡碱。将水相用等体积的乙酸乙酯萃取三次,

得到水相，除去茶黄素和茶红素，加过量的无水乙醇使茶褐素沉淀，过滤干燥得到茶褐素，其提取纯化流程见图 1。本研究中，茶褐素提取率为 16.1%。

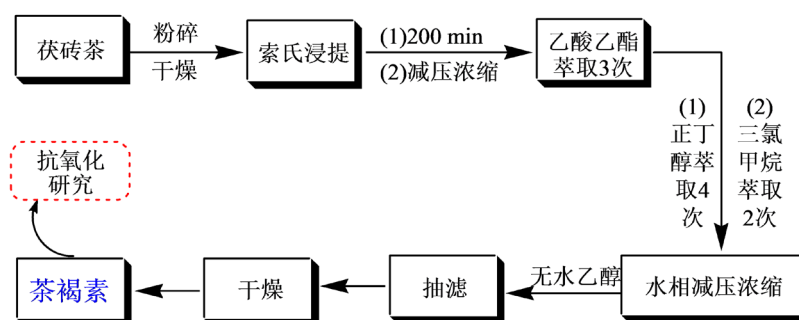


Figure 1. Flow chart of extraction and purification of theabrownine from fuzhuan tea
图 1. 茯砖茶中茶褐素的提取纯化流程图

2.4. 茶褐素对羟基自由基的清除实验

茶褐素对羟基自由基的清除作用依据文献[15] [16]稍作修改。把三种样品配制浓度为 4.0、2.0、1.0、0.50、0.25 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的样液，分别把不同样液在 96 孔板中滴入 50 μL ，5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 水杨酸-乙醇 50 μL ，5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ FeSO_4 50 μL ，最后加入 4.9 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 50 μL 启动反应，在恒温箱中 37 $^\circ\text{C}$ 反应 30 min。以蒸馏水和无水酒精体积比 3:1 混合液为空白对照，在 510 nm 下测量各待测液的吸光度。考虑到样品本身的吸光值，以 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 水杨酸-乙醇 50 μL ，5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ FeSO_4 50 μL ，不同浓度的样液 50 μL ，用双蒸水代替 H_2O_2 ，为茶褐素的背景吸收。考虑到其他液体的吸光值，以 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 水杨酸-乙醇 50 μL ，5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ FeSO_4 50 μL ，不同浓度的样液用蒸馏水代替 50 μL ，最后加入 4.9 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 50 μL 启动反应，为阴性对照吸收。计算清除率并进一步计算其 IC_{50} 值。清除率(S)按照公式(*)进行计算。

$$S = \left(1 - \frac{A_0 - A_x}{A}\right) \times 100\% \quad (*)$$

A_0 为样品液的吸光度； A_x 为样品液背景的吸光度； A 为不加茶褐素溶液的阴性对照吸光度。

2.5. 茶褐素对 DPPH 自由基的清除实验

依据文献[12] [13] [17]的方法，把样品配制浓度为 0.8、0.4、0.2、0.1、0.05、0.025、0.0125 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的样液 100 μL ，分别加 0.08 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 DPPH-乙醇溶液 100 μL ，作为样品测试组 A。蒸馏水与无水乙醇体积比 1:1 混合共 200 μL 作为参比液，100 μL 蒸馏水加 100 μL DPPH-乙醇溶液作为样品阴性组 A；各浓度样品液 100 μL 加 100 μL 蒸馏水作为样品背景组 A_x ，将不同浓度样液按上述配比移入 96 孔板中，然后在恒温箱中 37 $^\circ\text{C}$ 反应 30 min。计算清除率并进一步计算其 IC_{50} 值。清除率的计算依据公式(*)。

3. 结果与讨论

3.1. 茶褐素对羟基自由基清除作用

羟基自由基是新陈代谢过程中产生的作用最强、毒性最大的一种活性氧自由基，它能氧化损伤和破坏生物体内的核酸、蛋白质、脂类等大分子物质，导致疾病。因此，研究茯砖茶中茶褐素提取液对羟基自由基的清除能力具有重要意义。本研究采用水杨酸- Fe^{2+} 氧化法，其机理是利用茶褐素中的酚羟基与金属离子螯合，阻止 OH 生成。

茶褐素对羟基自由基的清除效果并以 Vc 作对比分别见图 2 和图 3。从图可知，茶褐素对羟基自由基的清除率随其质量浓度的增大而逐渐增高，且在 2.0~5.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 内其清除效果随其浓度的增加几乎成线性增长，但浓度达到 4.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 其对羟基自由基的清除率才超过 50%，说明茶褐素对羟基自由基的清除作用不强。茶褐素是由茶多酚类物质进一步氧化而来，把酚羟基结构氧化成醛或羧基，导致茶褐素中含有的酚羟基结构少，从而与金属离子的螯合能力减弱，可能这是茶褐素对 OH 的抗氧化性不强的原因。经 IC_{50} 软件计算知，Vc 的 IC_{50} 为 0.0118 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ，可知茶褐素对羟基自由基清除率不高，虽然仍然低于 Vc，但茶褐素在天然提取物中仍然具有优势。

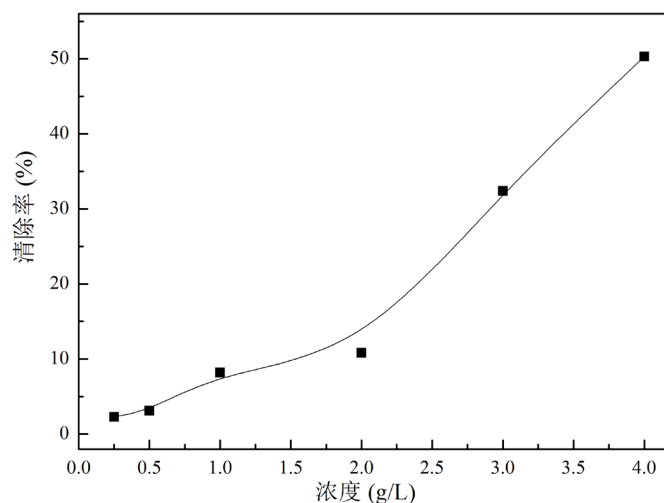


Figure 2. Scavenging rate of hydroxyl free radical by theabrownine with different concentration
图 2. 茶褐素对羟基自由基清除作用影响

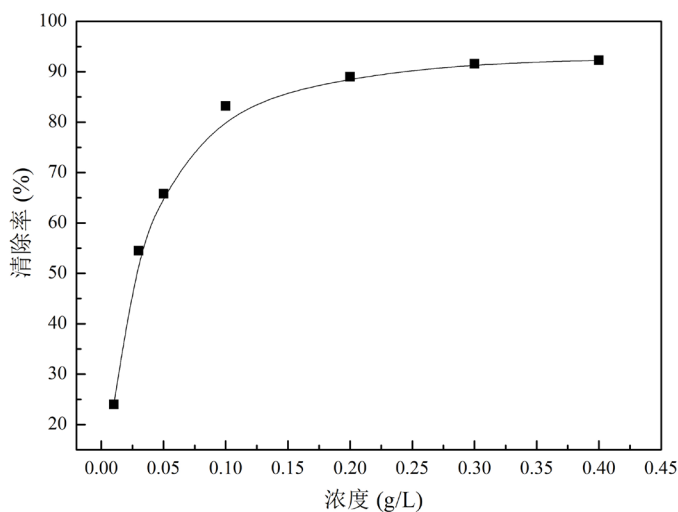


Figure 3. Scavenging rate of hydroxyl free radical by Vc with different concentration
图 3. 不同浓度 Vc 对羟基自由基清除作用影响

3.2. 茶褐素对 DPPH 自由基清除作用

以 Vc 作对照测定茶褐素对 DPPH 自由基的清除率，见图 4 和图 5。可知，在一定范围内茶褐素对 DPPH 自由基的清除率随其质量浓度的增大而逐渐增高，且在 0.01~0.1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 内其清除效果随其浓度的增加呈急剧

的线性增长,最高清除率可达到90%。经 IC_{50} 软件计算知,Vc和不同纯度茶褐素的 IC_{50} 分别为 $0.07\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $0.022\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,可知茶褐素具有很高的DPPH自由基清除率,茶褐素在天然提取物中具有很大的优势。

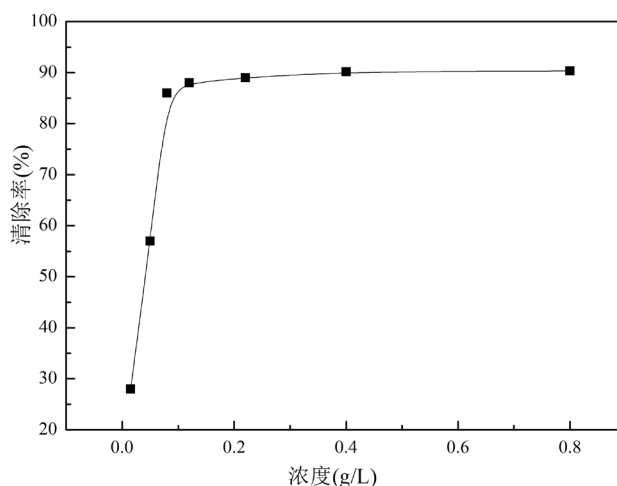


Figure 4. Scavenging rate of DPPH free radicals by theabrownine with different concentration

图 4. 不同浓度茶褐素对 DPPH 自由基清除

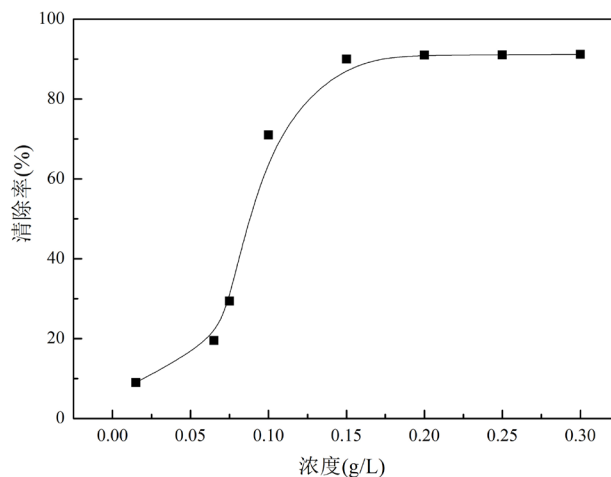


Figure 5. Scavenging rate of DPPH free radicals by Vc with different concentration

图 5. 不同浓度 Vc 对 DPPH 自由基清除作用影响

4. 结论

在对茯砖茶中茶褐素进行了提取纯化的基础上,对茶褐素的抗氧化性进行了对比性研究。茶褐素浓度为 4.0 g/L 时对羟基自由基的清除率达 50.2% ,具有一定的抗氧化性,但在低浓度下较Vc对羟基自由基的清除效果差。在低浓度下对DPPH自由基的清除率达到 90% ,但在低浓度下较Vc对DPPH自由基的清除效果强。茶褐素具有良好的抗氧化活性,在抗氧化应用方面有良好的前景,可为茯砖茶的深度开发提供数据支持。

基金项目

黑茶金花湖南省重点实验室(2016TP1022)、湖南省自然科学基金(2017JJ2018)。

参考文献

- [1] 樊蓉. 普洱茶多酚氧化产物的提取分离及活性评价[D]: [硕士学位论文]. 武汉: 华中农业大学, 2007.
- [2] Gong, J.S., Tang, C. and Peng, C.-X. (2012) Characterization of the Chemical Differences between Solvent Extracts from Pu-erh Tea and Dian Hong Black Tea by CP-Py-GC/MS. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **95**, 189-197. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2012.02.006>
- [3] 吴恩凯, 王秋萍, 龚加顺, 等. 发酵方法对普洱茶茶褐素样品组成的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(4): 215-221.
- [4] 李祥龙, 李晓梅, 杨煦, 等. 黑茶茶褐素与茶多糖对脂肪酶的抑制作用[J]. 食品与机械, 2018, 34(3): 27-31, 58.
- [5] 韩延超, 陈杭君, 郜海燕. 贮藏温度对茶汤抗氧化特性的影响及相关性分析[J]. 中国食品学报, 2019, 19(6): 179-184.
- [6] 秦谊, 龚加顺, 李宝才, 等. 普洱茶茶褐素提取工艺及理化性质的初步研究[J]. 林产化学与工业, 2009, 29(5): 95-98.
- [7] 董文明, 谭超, 龚加顺. 普洱茶茶褐素中 2 种水溶性成分研究[J]. 食品科学, 2013, 34(23): 32-35.
- [8] 倪德江, 樊蓉, 陈玉琼, 等. 普洱茶主要氧化产物提取条件的优化及其抗氧化活性研究[J]. 中国茶叶试验研究, 2010(2): 22-23.
- [9] He, Y.Z., Lu, Z.Q., Chen, Y.F., et al. (2013) Study on Extraction Technology of Theabrownine from Liubao Tea and Its Antioxidant Activity. *Agricultural Biotechnology*, **2**, 12-15. <https://doi.org/10.19759/j.cnki.2164-4993.2013.04.004>
- [10] 马慧, 茹鑫, 王津, 等. 4 种茶叶水提物及茶多酚的体外抗氧化性能研究[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(8): 65-70.
- [11] 丁世环, 张嘉杨, 鲁群岷. 普洱茶茶渣中茶多糖的超声波辅助提取及其抗氧化性[J]. 2018, 39(18): 187-192, 200.
- [12] 何英姿, 陈艳芳, 刘艳妮, 等. 六堡茶茶褐素的提取工艺及其抗氧化活性研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(35): 17301-17303.
- [13] 周向军, 高义霞, 袁毅君, 等. 乌龙茶茶褐素提取工艺的优化及抗氧化性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(2): 37-39.
- [14] 贺国文, 雷晓斌, 彭晓赟, 等. 茯砖茶中茶褐素的提取纯化研究[J]. 生物技术世界, 2014(9): 68-69.
- [15] 徐怀德, 闰宁环, 陈伟, 等. 黑莓原花青素超声波辅助提取优化及抗氧化性研究[J]. 农业工程学报, 2008, 24(2): 264-272.
- [16] 赵文红, 邓泽元, 范亚苇, 等. 儿茶素体外抗氧化作用的研究[J]. 食品科技, 2009, 34(12): 278.
- [17] 陈志科, 黎深. 荔枝核活性成分分析及其提取物抗氧化性能研究[J]. 食品科学, 2009, 30(23): 110.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网首页: <http://cnki.net/>, 点击页面中“外文资源总库 CNKI SCHOLAR”, 跳转至: <http://scholar.cnki.net/new>, 搜索框内直接输入文章标题, 即可查询;
或点击“高级检索”, 下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2331-8287, 即可查询。
2. 通过知网首页 <http://cnki.net/> 顶部“旧版入口”进入知网旧版: <http://www.cnki.net/old/>, 左侧选择“国际文献总库”进入, 搜索框直接输入文章标题, 即可查询。

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: hjmce@hanspub.org