

茶叶籽油中酚类化合物的提取工艺优化 及其抗氧化相互作用动力学研究

梁丽, 朱雯绮, 刘晓芳, 李思童, 刘国艳

(扬州大学食品科学与工程学院, 江苏扬州 225009)

摘要:为揭示二元酚类复合物的抗氧化相互作用机制,采用碱解法结合有机溶剂对茶叶籽油中酚类化合物进行提取。通过单因素实验及正交实验优化酚类化合物提取工艺条件,采用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)分析酚类化合物组成,并对7种酚类化合物及其21组二元复合物的DPPH·清除动力学进行研究。结果表明:茶叶籽油中酚类化合物最佳提取工艺条件为乙酸乙酯为萃取剂、NaOH浓度2.0 mol/L、碱解温度45℃、碱解时间5 h、料液比1:15,在最佳条件下总酚含量可达 $(91.37 \pm 1.83) \mu\text{g/g}$;共鉴定出22种酚类化合物,总含量达 $152.181 \mu\text{g/g}$,以酚酸类化合物($82.021 \mu\text{g/g}$)为主;6,7-二羟基香豆素与龙胆酸的复合物具有强协同作用,二元酚类复合物对DPPH·的清除速率受单体相互作用及起主要抗氧化作用酚类化合物的清除速率的影响,同时酚类化合物的相互作用在抗氧化过程中会发生改变。因此,茶叶籽油的耐储藏性与酚类化合物间的抗氧化协同作用密切相关。

关键词:茶叶籽油;酚类化合物;碱解法提取;抗氧化相互作用;动力学

中图分类号:TS225.1;TQ641 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2022)09-0076-08

Extraction optimization and antioxidant interaction kinetics of phenolic compounds from tea seed oil

LIANG Li, ZHU Wenqi, LIU Xiaofang, LI Sitong, LIU Guoyan

(College of Food Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China)

Abstract: In order to reveal the antioxidant interaction mechanism of binary phenolic compounds, the phenolic compounds were extracted from tea seed oil by alkaline hydrolysis combined with organic solvent extraction. Through single-factor and orthogonal experiments, the extraction process was optimized, the phenolic compounds composition was analyzed by UPLC-MS/MS, and the scavenge kinetics of DPPH· of 7 phenolic compounds and 21 binary phenolic compounds were studied. The results showed that the optimal extraction conditions of phenolic compounds were obtained as follows: with ethyl acetate as extraction solvent, NaOH concentration 2.0 mol/L, alkaline hydrolysis temperature 45℃, alkaline hydrolysis time 5 h, material-liquid ratio 1:15. Under these conditions, the total phenols content could reach $(91.37 \pm 1.83) \mu\text{g/g}$. A total of 22 phenolic compounds were identified, with total content of $152.181 \mu\text{g/g}$, mainly phenolic acids ($82.021 \mu\text{g/g}$). The compounds of 6,7-dihydroxycoumarin and gentisic acid had a strong synergistic effect. The scavenge rate of binary phenolic compound on DPPH radical was affected by the monomer interaction and the scavenge rate of the phenolic compound which played a major antioxidant role in the compounds. The interaction of phenolic compounds could alter in the

process of antioxidation. The storage resistance of tea seed oil is closely related to the antioxidant synergistic effect of phenolic compounds.

Key words: tea seed oil; phenolic compound; extraction by alkaline hydrolysis; antioxidant interaction; kinetics

收稿日期:2021-08-04;修回日期:2022-04-11

基金项目:国家自然科学基金面上项目(31671785)

作者简介:梁丽(1989),女,讲师,硕士生导师,博士,研究方向为脂质加工及营养(E-mail)liangli0508@hotmail.com。

通信作者:刘国艳,副教授,硕士生导师,博士(E-mail)liugy@yzu.edu.cn。

由山茶科植物茶(*Camellia Sinensis* O. Ktze.)的果实经压榨得到的茶叶籽油,含有丰富的茶多酚、植物甾醇、维生素E、角鲨烯等营养成分^[1]。研究表明,茶叶籽油较长的货架期主要归因于其酚类化合物^[2]。朱晋萱等^[3]测定了我国13个省份的茶叶籽油中总酚含量(20~45 mg/kg),并且发现不同产地茶叶籽制取的原油中活性物质含量有明显差异。目前对酚类化合物的提取方法主要为有机溶剂浸提法,但部分酚类化合物可能通过—OH或C—C与其他生物大分子结合,因而需要通过水解将共价键断裂,以达到充分释放酚类物质的目的。碱水解可在室温下进行,同时能作用于糖苷键和酯键^[4]。Verma等^[5]对比了酸、碱水解下小麦麸皮中酚类化合物含量,发现碱水解释放出的酚类化合物的含量几乎是酸水解的两倍,该水解方法常见于植物中酚类化合物的提取,但在油脂体系中应用较少。

茶叶籽油中各种酚类化合物的抗氧化能力受羟基数量、位置及取代基种类和位置等因素的影响^[6]。另外,茶叶籽油含有的酚类化合物种类较多,其耐储藏性可能是多种酚类化合物共同作用的结果。同时,抗氧化相互作用并非单一物质抗氧化性的简单相加,其贡献效果涉及到相加、协同、拮抗作用^[7]。目前,对茶叶籽油的研究集中于提取、基本成分分析、理化指标测定等方面^[1-4,8],虽然有部分研究探讨了酚类化合物的抗氧化作用机制^[9-11],但是针对茶叶籽油中酚类化合物的全面系统分析及相互作用的研究较少。

本文采用碱解法对茶叶籽油中酚类化合物进行提取,通过优化提取工艺充分富集茶叶籽油中的酚类化合物,采用UPLC-MS/MS分析酚类化合物组成,从中选择具有代表性的酚类化合物,研究二元酚类复合物的抗氧化相互作用的动力学特征,揭示二元酚类复合物的抗氧化相互作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

茶叶籽(福鼎大白),购于湖北;二氯苯丙氨酸, GL Biochem(上海)公司;乙酸乙酯、甲醇、丙酮、正己烷、氢氧化钠、盐酸、碳酸钠、福林酚,国药集团化学试剂有限公司;没食子酸、槲皮素、鼠李素、矢车菊素-3-O-半乳糖苷、6,7-二羟基香豆素标准品和1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH),上海阿拉丁试剂有限公司;槲皮素-3-O-阿拉伯糖苷,上海麦克林生化科技有限公司;咖啡酰酒石酸、龙胆

酸,上海源叶生物科技有限公司。

QYZ-230型自动液压榨油机,山东省泰安市良君益友机械有限公司;Multiskan FC酶标仪,美国赛默飞世尔科技公司;UV1000紫外分光光度计,上海天美科学仪器有限公司;超高效液相色谱-质谱联用仪,美国Waters公司。

1.2 实验方法

1.2.1 茶叶籽油中酚类化合物的提取

将茶叶籽剥壳,得到茶叶籽仁。将茶叶籽仁用自动液压榨油机压榨获得茶叶籽油。称取50 g茶叶籽油,按一定料液比加入一定浓度的NaOH溶液,在一定温度下水浴碱解一段时间。待水解液冷却后用6 mol/L HCl溶液调节pH至2,以1 000 r/min离心5 min,收集下层碱液。按料液比1:1加入萃取剂,常温提取3次,每次旋涡振荡提取2 min,合并萃取液。将萃取液于40℃下减压浓缩至干燥,用甲醇(色谱纯)溶解并定容至10 mL,于-20℃冰箱中密封避光保存。

1.2.2 总酚含量的测定

采用福林-酚法测定茶叶籽油的总酚含量,参照卢鹤^[12]的方法并略作改动。配制质量浓度分别为5、10、20、30、40、50、60 μg/mL的没食子酸标准溶液。取不同浓度没食子酸标准溶液各0.5 mL,分别加入0.5 mL蒸馏水、1 mL福林-酚溶液,混匀后加入3 mL质量分数7.5%的碳酸钠溶液,充分混匀,室温下避光反应60 min,于765 nm处测定吸光度。以没食子酸质量浓度(x)为横坐标,吸光度(y)为纵坐标,绘制标准曲线,得到没食子酸的标准曲线方程为 $y = 0.0223x - 0.0098$, $R^2 = 0.999$ 。取0.5 mL 1.2.1中的茶叶籽油酚类化合物甲醇溶液代替没食子酸标准溶液,按上述步骤操作测定吸光度,再通过标准曲线方程计算样品中总酚含量。

1.2.3 酚类化合物的组成分析

取100 μL 1.2.1中的茶叶籽油酚类化合物甲醇溶液于内插管中,加入5 μL 100 μg/mL的二氯苯丙氨酸溶液(内标),然后取1 μL样品采用UPLC-MS/MS分析酚类化合物组成。

UPLC条件:Acquity UPLC HSS T3色谱柱(2.1 mm×100 mm×1.8 μm);柱温40℃;自动进样器温度4℃;流动相A为0.05%甲酸,流动相B为乙腈;梯度洗脱程序为0~1.0 min 5% B,1.0~12.0 min 5%~95% B,12.0~13.5 min 95% B,13.5~13.6 min 95%~5% B,13.6~16.0 min 5% B;流速0.3 mL/min。

MS条件:加热器温度300℃;鞘气压力310 kPa;辅

助气压力 103 kPa;尾气压力 6.9 kPa;电喷雾电压 3.0 kV(正模式)、3.2 kV(负模式);毛细管温度 350 °C; S-Lens RF Level 30%(正模式)、60%(负模式);扫描模式为一级全扫描(m/z 70 ~ 1 050)与数据依赖性二级质谱扫描(dd-MS², TopN = 10)。

根据质谱结果对各酚类化合物进行定性,采用内标法进行定量。

1.2.4 DPPH·清除能力动力学分析

酚类化合物 DPPH·清除能力的测定参考马骥^[13]的方法。

在前期测定酚类化合物 DPPH·清除能力的基础上,计算每种酚类化合物清除 50% 的 DPPH·所需的浓度(IC₅₀)。经前期实验选择二元酚类化合物协同作用最显著的浓度(0.4 倍的 IC₅₀),测定该浓度下各酚类化合物及二元复合物(两种酚类化合物的浓度为各自 0.4 倍的 IC₅₀,体积比为 1:1)在 300 s 内对 DPPH·的清除能力,以此来计算各酚类化合物及二元复合物清除 DPPH·的速率。根据前期实验结果,将二元复合物分为协同组合、拮抗组合和相加组合^[14]。

在 96 孔板中加入 100 μL 酚类化合物标准品溶液(浓度为 0.4 倍的 IC₅₀,溶剂为无水乙醇)与 100 μL 300 μmol/L DPPH 溶液,在波长 517 nm 下,分别记录 10、30、50、70、90、120、150、180、210、240、270、300 s 时的吸光度。按文献^[15]计算 DPPH·清除率,利用公式(1)^[16]对所得数据用非线性回归指数函数曲线拟合、求导,并利用公式(2)计算在 5 s 时酚类化合物对 DPPH·的清除速率。

$$y = a(1 - e^{-bx}) \quad (1)$$

式中: y 表示 DPPH·清除率; a 、 b 表示曲线拟合系数; x 为时间, s。

$$R_s = abe^{-bx} \quad (2)$$

式中: R_s 表示 x 时刻 DPPH·的清除速率。

1.2.5 数据分析

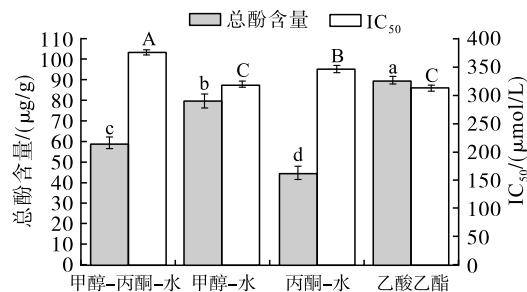
实验均平行测定 3 次,结果以“平均值 ± 标准偏差”表示。采用 SPSS 23.0 进行单因素方差分析(ANOVA),采用 Duncan 检验($p < 0.05$)进行统计学意义评价。

2 结果与讨论

2.1 萃取剂对茶叶籽油总酚含量及其抗氧化性的影响

在料液比 1:5、NaOH 浓度 2 mol/L、碱解温度 45 °C、碱解时间 3 h 条件下,分别采用甲醇-丙酮-水(体积比 8:8:4)、甲醇-水(体积比 8:2)、丙酮-

水(体积比 8:2)及乙酸乙酯为萃取剂,对茶叶籽油中酚类化合物进行提取,并测定其清除 DPPH·的 IC₅₀,研究不同极性的萃取剂对茶叶籽油总酚含量及其抗氧化性的影响,结果如图 1 所示。



注:相同指标下不同字母表示在 $p < 0.05$ 水平上差异显著

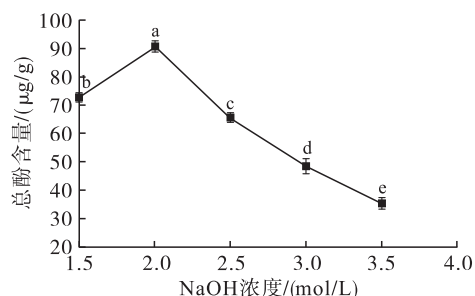
图 1 不同萃取剂对茶叶籽油中总酚含量及其抗氧化性的影响

从图 1 可以看出,乙酸乙酯的提取效果最优,茶叶籽油中总酚含量为 $(89.20 \pm 1.41) \mu\text{g/g}$,比其他 3 种萃取剂提取的总酚含量高 13.83% ~ 103.14%,其清除 DPPH·的 IC₅₀ 为 $(317.23 \pm 3.92) \mu\text{mol/L}$,与甲醇-水提取物的 IC₅₀ 无显著差异,且低于甲醇-丙酮-水、丙酮-水提取物的 IC₅₀,这可能是乙酸乙酯提取过程中某些抗氧化性能较好的酚类化合物降解,同时某些抗氧化能力较强的酚类化合物可能极性较强,更易被高极性萃取剂提取出来所致。综合考虑总酚含量和提取物的抗氧化能力,以及后续有机溶剂浓缩造成的总酚损失,选择乙酸乙酯为萃取剂。

2.2 碱解法提取茶叶籽油中酚类化合物的工艺优化

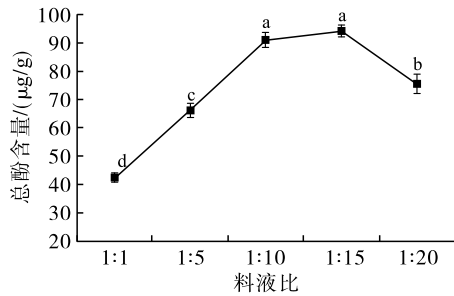
2.2.1 茶叶籽油中酚类化合物提取的单因素实验

与酸解法相比,碱解法更适合酚类化合物的提取,可显著提高总酚含量^[17]。NaOH 浓度、料液比、碱解温度和碱解时间对茶叶籽油中总酚含量的影响分别见图 2 ~ 图 5。



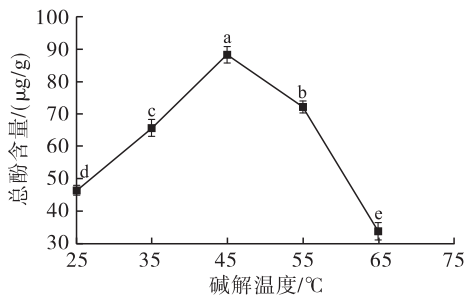
注:料液比为 1:5,碱解温度为 45 °C,碱解时间为 3 h。不同小写字母表示在 $p < 0.05$ 水平下差异显著。下同

图 2 NaOH 浓度对茶叶籽油中总酚含量的影响



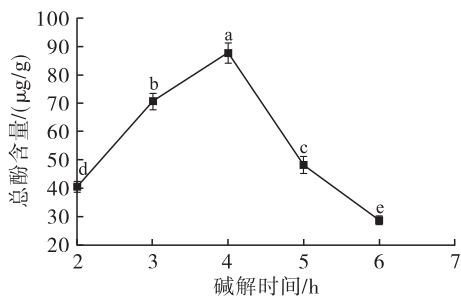
注:NaOH浓度为2.0 mol/L,碱解温度为45℃,碱解时间为3 h

图3 料液比对茶叶籽油中总酚含量的影响



注:NaOH浓度为2.0 mol/L,料液比为1:5,碱解时间为3 h

图4 碱解温度对茶叶籽油中总酚含量的影响



注:NaOH浓度为2.0 mol/L,料液比为1:5,碱解温度为45℃

图5 碱解时间对茶叶籽油中总酚含量的影响

从图2可以看出,随NaOH浓度增大,总酚含量先增加后降低,在NaOH浓度为2.0 mol/L时,总酚含量达到最高,为 $(90.63 \pm 0.48) \mu\text{g/g}$ 。White等^[15]研究表明,有效地释放结合酚所需NaOH浓度为1~4 mol/L,并且酚类化合物的苯环上含有羟基,处于强碱环境中易发生电离,会造成结合酚的损失^[18]。从图3可以看出,随料液比增大,总酚含量先增加后降低。在料液比为1:10时总酚含量为 $(90.63 \pm 2.48) \mu\text{g/g}$,与料液比为1:15时无显著差异。在一定范围内,增加碱液的用量可以促使酚类化合物充分溶出;但随着碱液用量增大,溶液浓缩耗时较长,酚类物质更易被氧化,导致总酚含量降低,另外,糖、蛋白质等物质的大量溶出,使得体系黏度增大,阻碍了酚酸的水解分

离^[19]。从图4可以看出,随碱解温度升高,总酚含量先增大后降低。碱解温度为45℃时,总酚含量最高,为 $(88.35 \pm 2.59) \mu\text{g/g}$ 。碱解温度过高,茶叶籽油中的酚类物质易发生氧化分解被破坏。从图5可以看出,随碱解时间延长,总酚含量先增加后降低。碱解时间为4 h时,总酚含量最高,为 $(87.64 \pm 3.59) \mu\text{g/g}$ 。碱解时间较短,酚类化合物与其他大分子之间连接的化学键不能完全断裂,导致提取不完全;而碱解时间过长,部分酚类化合物被氧化,杂质大量溶出,不利于提取^[20-21]。综合考虑,选择NaOH浓度2.0 mol/L、料液比1:10、碱解温度45℃、碱解时间4 h为提取茶叶籽油中酚类化合物的最优工艺条件。

2.2.2 茶叶籽油中酚类化合物提取的正交实验

在单因素实验的基础上,以NaOH浓度(A)、碱解温度(B)、料液比(C)、碱解时间(D)为因素,总酚含量为指标,对碱解提取茶叶籽油中酚类化合物的工艺条件进行优化。正交实验因素水平见表1,正交实验设计及分析见表2,方差分析见表3。

表1 正交实验因素水平

水平	NaOH浓度/(mol/L)	碱解温度/°C	料液比	碱解时间/h
1	1.5	35	1:5	3
2	2.0	45	1:10	4
3	2.5	55	1:15	5

表2 正交实验设计及分析

实验号	A	B	C	D	总酚含量/($\mu\text{g/g}$)
1	1	1	1	1	35.72
2	1	2	2	2	46.24
3	1	3	3	3	23.09
4	2	1	2	3	75.62
5	2	2	3	1	90.43
6	2	3	1	2	60.84
7	3	1	3	2	48.61
8	3	2	1	3	62.19
9	3	3	2	1	22.42
k_1	35.02	53.32	52.92	49.52	
k_2	75.63	66.29	48.09	51.90	
k_3	44.41	35.45	54.04	53.63	
R	40.61	30.84	5.95	4.11	

表3 方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F比	F临界值	显著性
A	2 712.51	2	5.34	5.14	显著
B	1 438.33	2	2.83	5.14	
C	59.93	2	0.12	5.14	
D	25.54	2	0.05	5.14	
误差	1 523.82	6			

由表2、表3可知,各因素对总酚含量影响的主要顺序为NaOH浓度 > 碱解温度 > 料液比 > 碱解时间,NaOH浓度对总酚含量的影响显著。茶叶籽油中酚类化合物提取的最佳工艺条件组合为A₂B₂C₃D₃,即NaOH浓度2.0 mol/L、碱解温度45℃、料液比1:15、碱解时间5 h。进行3次重复验证实验,总酚含量为(91.37 ± 1.83) μg/g。

2.3 茶叶籽油中酚类化合物的组成

采用UPLC-MS/MS对提取的酚类化合物组成进行分析,结果见表4。

表4 茶叶籽油中酚类化合物的组成及含量

酚类物质名称	检测模式	含量/ (μg/g)	占比/%
槲皮素-3β-D-葡萄糖苷	ESI ⁻	0.004	0.003
木犀草素	ESI ⁻	0.007	0.005
黄豆黄素	ESI ⁻	0.013	0.009
橙皮素	ESI ⁺	0.044	0.029
槲皮素	ESI ⁻	0.044	0.029
表没食子儿茶素-3-O-没食子酸酯	ESI ⁻	0.063	0.041
芹菜素	ESI ⁺	0.066	0.043
儿茶酚	ESI ⁻	0.248	0.163
4-羟基苯甲酸-4-O-葡萄糖苷	ESI ⁻	0.539	0.354
4-羟基苯甲酸	ESI ⁻	2.095	1.377
阿魏酰酒石酸	ESI ⁺	2.141	1.407
矢车菊素-3-O-半乳糖苷	ESI ⁺	2.209	1.452
龙胆酸	ESI ⁻	4.435	2.914
苯甲酸	ESI ⁻	5.420	3.562
槲皮素-3-O-阿拉伯糖苷	ESI ⁺	7.640	5.020
没食子酸-3-O-没食子酸酯	ESI ⁺	10.791	7.091
对香豆酰基酒石酸	ESI ⁺	13.031	8.563
没食子酸-4-O-葡萄糖苷	ESI ⁺	14.491	9.522
咖啡酰酒石酸	ESI ⁻	16.771	11.020
6,7-二羟基香豆素	ESI ⁺	22.155	14.558
原儿茶酸-4-O-葡萄糖苷	ESI ⁻	22.846	15.012
鼠李素	ESI ⁺	27.128	17.826
总计		152.181	100

由表4可知,从茶叶籽油中共鉴定出22种酚类化合物,总含量为152.181 μg/g。按照化合物结构的不同,大致分为以下7类:①酚酸类。如斛皮素-3β-D-葡萄糖苷、儿茶酚、4-羟基苯甲酸-4-O-葡萄糖苷、4-羟基苯甲酸、阿魏酰酒石酸、龙胆酸、苯甲酸、对香豆酰基酒石酸、没食子酸-4-O-葡萄糖苷、咖啡酰酒石酸、原儿茶酸-4-O-葡萄糖苷。②天然黄酮类。如木犀草素、芹菜素。③二氢黄酮类。如黄豆黄素、橙皮素。④黄酮醇类。如槲皮素、槲皮素-3-O-阿拉伯糖苷、鼠李素。

⑤黄烷醇类。如表没食子儿茶素-3-O-没食子酸酯、没食子酸-3-O-没食子酸酯。⑥花青素类。如矢车菊素-3-O-半乳糖苷。⑦香豆素类。如6,7-二羟基香豆素。检测到的酚酸类物质种类最多,总含量高达82.021 μg/g。酚酸类化合物主要以糖、各种酯类及有机酸的形式广泛存在于植物中^[22],部分酚类化合物通过-OH或C-C与一个或多个糖苷紧密结合,需经过水解等方法才能释放出来^[5],合适的碱解条件有利于促进结合型酚类化合物的溶出及保持酚酸类物质的稳定性。类黄酮及其衍生物是植物中主要的酚类化合物,其含量占植物中总酚的一半以上^[23],本文鉴定出的类黄酮及其衍生物包括5类(天然黄酮、二氢黄酮、黄酮醇、黄烷醇和花青素),总含量为48.005 μg/g,其中以黄酮醇类为主(34.812 μg/g)。

已有研究证明,芹菜素、龙胆酸、4-羟基苯甲酸、苯甲酸、槲皮素、木犀草素、表没食子儿茶素-3-O-没食子酸酯是茶叶籽油中的酚类物质^[23-24],另外15种酚类化合物首次被发现存在于茶叶籽油中。其中:鼠李素含量最高,达27.128 μg/g,占比为17.826%;其次为原儿茶酸-4-O-葡萄糖苷,含量为22.846 μg/g,占比为15.012%。茶叶籽油中酚类化合物具有多种医药和保健作用^[25],这些新鉴定的酚类化合物可为开发利用茶叶籽油中酚类资源提供重要依据。

2.4 酚类化合物清除DPPH·动力学分析

以酚类化合物在茶叶籽油中的含量及已有研究的理论抗氧化值为参考^[26],选择7种有代表性的酚类化合物作为研究对象,分别为槲皮素(A)、矢车菊素-3-O-半乳糖苷(B)、龙胆酸(C)、槲皮素-3-O-阿拉伯糖苷(D)、咖啡酰酒石酸(E)、6,7-二羟基香豆素(F)、鼠李素(G),从清除DPPH·动力学角度,分别考察这7种酚类化合物和21组二元酚类复合物在300 s内清除DPPH·的能力。通过比较DPPH·的清除速率,揭示酚类化合物抗氧化相互作用的机制^[27]。各酚类化合物及协同组合、拮抗组合的DPPH·清除反应的动力学曲线拟合结果如图6、图7所示。

从图6、图7可以看出,在反应的初始阶段,DPPH·清除率随时间延长几乎呈线性增强,随后逐渐减缓,最后达到平衡。在初始快速清除阶段,不同组分样品之间存在明显差异,这些差异与最初形成的苯酚衍生基团的次级慢反应(二聚反应或歧化反应)作用有关^[28]。协同组合在300 s内的DPPH·清除率整体均高于其单体,拮抗组合均低于其单体。

协同组合在 120 s 后 DPPH · 清除率趋于稳定,而拮抗组合在 100 s 后 DPPH · 清除率趋于稳定。在清除率达到平衡时,酚类化合物对 DPPH · 清除能力的强弱顺序为 6,7-二羟基香豆素 + 龙胆酸 > 矢车菊素-3-O-半乳糖苷 > 鼠李素 > 槲皮素-3-O-阿拉伯糖苷 + 鼠李素 > 槲皮素 + 6,7-二羟基香豆素 > 咖啡酰酒石酸 + 6,7-二羟基香豆素 > 槲皮素 + 鼠李素 > 鼠李素 + 咖啡酰酒石酸 > 槲皮素 + 槲皮素-3-O-阿拉伯糖苷 > 槲皮素 + 龙胆酸 > 6,7-二羟基香豆素 > 槲皮素-3-O-阿拉伯糖苷 + 矢车菊素-3-O-半乳糖苷 > 矢车菊素-3-O-半乳糖苷 + 6,7-二羟基香豆素 > 矢车菊素-3-O-半乳糖苷 + 咖啡酰酒石酸 > 鼠李素 + 6,7-二羟基香豆素 > 槲皮素 + 咖啡酰酒石酸 > 槲皮素 > 槲皮素 + 矢车菊素-3-O-半乳糖苷 > 槲皮素-3-O-阿拉伯糖苷 + 龙胆酸 > 槲皮素-3-O-阿拉伯糖苷 > 咖啡酰酒石酸 + 龙胆酸 > 龙胆酸 > 槲皮素-3-O-阿拉伯糖苷 + 咖啡酰酒石酸 > 鼠李素 + 矢车菊素-3-O-半乳糖苷 > 咖啡酰酒石酸。

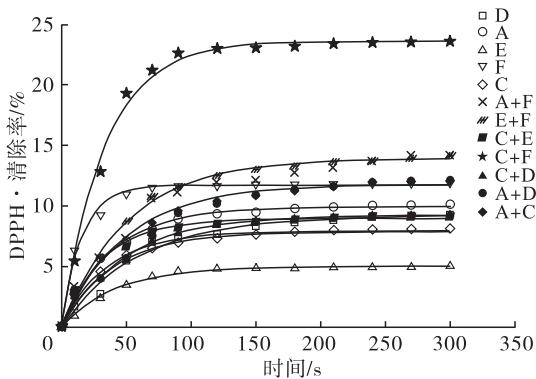


图6 酚类化合物和二元酚类协同组合的 DPPH · 清除动力学的拟合曲线

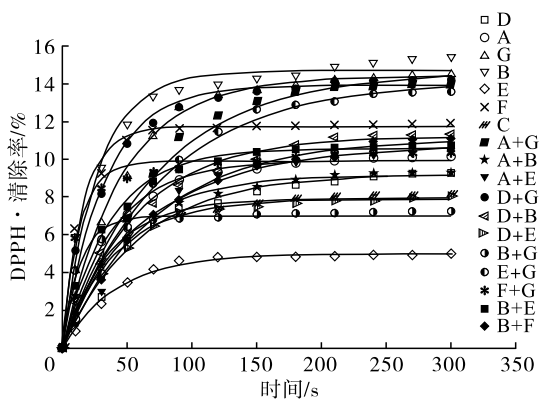


图7 酚类化合物和二元酚类拮抗组合的 DPPH · 清除动力学拟合曲线

在 21 组二元酚类复合物中有 7 组呈协同作用, DPPH · 清除率较其单体提高了 12.28% ~ 65.56%; 11 组呈拮抗作用, DPPH · 清除率较其单体降低了

1.86% ~ 40.03%; 其余 3 组表现为相加作用。协同作用组合由槲皮素、龙胆酸、槲皮素-3-O-阿拉伯糖苷、咖啡酰酒石酸、6,7-二羟基香豆素单体组成,其中 6,7-二羟基香豆素与龙胆酸复合后,在 0.4 倍的 IC_{50} 质量浓度下 300 s 时 DPPH · 清除率达 23.63%,较各自单体分别显著提高了 98.57% 和 190.29%,表明二者之间存在强协同作用,可能是由于二者苯环上分别含有 2 个酚羟基,促进了抗氧化剂的相互再生,从而提高了复合物的抗氧化性^[29]。此外,研究发现,黄酮类化合物上的 4-羰基结构可以与酚羟基形成氢键连接,阻碍酚类化合物的供氢能力,从而降低 DPPH · 清除能力^[30]。龙胆酸和 6,7-二羟基香豆素的对位和邻位羟基可以降低这种结构的影响,因此它们与槲皮素或槲皮素-3-O-阿拉伯糖苷相互作用具有协同效应。这些酚类化合物间的抗氧化协同作用与茶叶籽油的耐储藏性密切相关。

为了量化单一酚类化合物和二元酚类复合物抗氧化动力学行为,对拟合曲线进行一阶求导,结果如表 5 所示。

表5 DPPH · 清除动力学拟合方程参数

酚类物质编号	<i>a</i>	<i>b</i>	R_s/s^{-1}	R^2
E	4.988	0.024	0.106	0.995
D	9.223	0.017	0.142	0.986
B + F	11.101	0.014	0.144	0.997
D + F	10.029	0.016	0.145	0.993
A + E	10.632	0.015	0.147	0.992
A + D	12.410	0.014	0.161	0.993
D + C	9.243	0.020	0.167	0.992
D + E	7.853	0.025	0.172	0.990
A + B	9.164	0.021	0.174	0.988
D + B	11.202	0.018	0.181	0.991
A + G	14.544	0.014	0.189	0.994
C	7.909	0.028	0.192	0.987
G + E	13.059	0.018	0.210	0.996
B + C	10.582	0.023	0.213	0.989
A + C	11.779	0.020	0.214	0.989
A	9.927	0.026	0.225	0.997
A + F	13.774	0.018	0.225	0.984
G + C	15.870	0.015	0.226	0.996
G	14.361	0.018	0.231	0.992
E + C	8.948	0.031	0.239	0.993
E + F	13.939	0.020	0.247	0.997
B + E	10.551	0.028	0.254	0.992
G + B	7.009	0.075	0.362	0.985
D + G	13.900	0.031	0.370	0.987
B	14.701	0.036	0.445	0.984
F + G	10.013	0.076	0.519	0.986
F	11.707	0.065	0.547	0.990
F + C	23.657	0.030	0.607	0.995

由表 5 可知,单一酚类化合物和二元酚类复合物的动力学拟合方程的决定系数(R^2)为 0.984 ~ 0.997,说明拟合效果较好。在 5 s 时,7 种酚类化合物对 DPPH· 的清除速率从快到慢依次为 6,7-二羟基香豆素 > 矢车菊素-3-O-半乳糖苷 > 鼠李素 > 槲皮素 > 龙胆酸 > 槲皮素-3-O-阿拉伯糖苷 > 咖啡酰酒石酸。与 300 s 清除率达平衡时对 DPPH· 清除能力的强弱顺序基本一致,除了 6,7-二羟基香豆素和槲皮素-3-O-阿拉伯糖苷的顺序略有变化。

在 5 s 时,6,7-二羟基香豆素和龙胆酸对 DPPH· 的清除速率分别为 0.547 s^{-1} 和 0.192 s^{-1} ,而 6,7-二羟基香豆素 + 龙胆酸在 5 s 时的清除速率达到 0.607 s^{-1} ,这是因为香豆素类化合物具有更低的氧化还原电势^[31],并且 A 环上增加了多个取代基团,因此二者的协同作用提高了复合物的 DPPH· 清除速率,并且这种强协同作用持续至清除反应达到平衡。类似的情况在协同组合咖啡酰酒石酸 + 龙胆酸中也被观察到。然而,在拮抗组合槲皮素-3-O-阿拉伯糖苷 + 鼠李素、槲皮素-3-O-阿拉伯糖苷 + 咖啡酰酒石酸中也观察到在 5 s 时,复合物的 DPPH· 清除速率快于各单一酚类化合物的,说明槲皮素-3-O-阿拉伯糖苷与鼠李素、槲皮素-3-O-阿拉伯糖苷与咖啡酰酒石酸在 DPPH· 清除初期呈现出协同作用,加快了清除速率,在清除反应后期可能是因为两种酚类化合物之间的相互竞争导致拮抗作用的出现。这说明二元酚类复合物在清除 DPPH· 反应的过程中,其相互作用会发生改变。

矢车菊素-3-O-半乳糖苷和 6,7-二羟基香豆素在 5 s 时对 DPPH· 的清除速率分别为 0.445 s^{-1} 和 0.547 s^{-1} ,而二者复合物在 5 s 时对 DPPH· 的清除速率只有 0.144 s^{-1} ,说明二者之间存在强拮抗作用,互相抑制了对方的供氢能力,从而降低了复合物的抗氧化能力。在拮抗组合槲皮素 + 矢车菊素-3-O-半乳糖苷、槲皮素 + 鼠李素中也观察到类似的结果。除上述提到的 4 个组合(复合物对 DPPH· 的清除速率大于任一酚类化合物的)和 3 个组合(复合物对 DPPH· 的清除速率小于任一酚类化合物的)外,其余 14 个组合的二元复合物对 DPPH· 的清除速率介于两种酚类化合物之间。二元酚类复合物对 DPPH· 的清除速率受酚类化合物单体的相互作用及复合物中起主要抗氧化作用单体对 DPPH· 清除速率的影响。例如槲皮素-3-O-阿拉伯糖苷、槲皮素、槲皮素 + 槲皮素-3-O-阿拉伯糖苷在 5 s 时对 DPPH· 的清除速率分别为 0.142、

0.225、0.161 s^{-1} ,说明槲皮素在相互作用中起主导作用,提高了复合物中槲皮素-3-O-阿拉伯糖苷的清除速率。此外,6,7-二羟基香豆素 + 鼠李素在 300 s 时对 DPPH· 的清除率为 10.37%,较 6,7-二羟基香豆素和鼠李素的清除率分别下降了 14.75%、39.73%,呈拮抗作用。但在 5 s 时,6,7-二羟基香豆素 + 鼠李素对 DPPH· 的清除速率为 0.519 s^{-1} ,仅次于清除速率最快的 6,7-二羟基香豆素,推测在二者相互作用时 6,7-二羟基香豆素在初始阶段起主导作用,随着反应的进行,6,7-二羟基香豆素的供氢能力下降,同时鼠李素的存在可能抑制了其抗氧化能力,故在 70 s 时 6,7-二羟基香豆素 + 鼠李素的 DPPH· 清除率趋于稳定。

3 结 论

以茶叶籽为原料压榨制取茶叶籽油,采用碱解法从茶叶籽油中提取酚类化合物,研究了茶叶籽油中酚类化合物的组成及抗氧化相互作用动力学。提取茶叶籽油酚类化合物的最佳工艺条件为:以乙酸乙酯为萃取剂,NaOH 浓度 2.0 mol/L,碱解温度 45 °C,碱解时间 5 h,料液比 1:15。在最佳条件下,总酚含量为 $(91.37 \pm 1.83)\text{ }\mu\text{g/g}$ 。通过 UPLC-MS/MS 分析,共鉴定出 22 种酚类化合物,总含量为 $152.181\text{ }\mu\text{g/g}$,主要为酚酸类化合物,总含量为 $82.021\text{ }\mu\text{g/g}$,鼠李素含量最高,为 $27.128\text{ }\mu\text{g/g}$ 。具有代表性的 7 种酚类化合物及其 21 组二元酚类复合物的 DPPH· 清除反应动力学研究表明,二元复合物中有 7 组起协同作用,11 组起拮抗作用,3 组起相加作用,其中 6,7-二羟基香豆素与龙胆酸的复合物具有强协同作用。茶叶籽油中酚类化合物单体具有抗氧化活性,二元复合物对 DPPH· 的清除速率受单体相互作用及复合体系中起主要抗氧化作用单体的清除速率的影响,同时酚类化合物的相互作用在抗氧化过程中会发生改变。本文从动力学角度初步揭示了茶叶籽油中二元酚类复合物相互作用的机制,为明确茶叶籽油活性成分作用机制以及茶叶籽油耐储藏特性提供了初步的理论支持,未来酚类化合物的研究方向仍需集中于多组分复合及相互作用机制的深入探讨。

参考文献:

- [1] 张继光, 吴万富, 吕世懂. 基于脂肪酸组成的茶叶籽油和油茶籽油模式识别分析[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(17): 247-252.
- [2] WANG X Q, LIANG X Q, ZHAO J, et al. Cultivar characterization of tea seed oils by their active components and antioxidant capacity[J]. J Am Oil Chem Soc, 2014,

- 91(4): 629–639.
- [3] 朱晋萱, 朱跃进, 刘国艳, 等. 13个省茶叶籽油脂脂肪伴随物分析[J]. 中国油脂, 2013, 38(1): 84–88.
- [4] 王俐娟. 茶叶籽油不同形态酚类化合物分析及其抗氧化机制研究[D]. 福建 厦门: 华侨大学, 2018.
- [5] VERMA B, HUCL P, CHIBBAR R N. Phenolic acid composition and antioxidant capacity of acid and alkali hydrolysed wheat bran fractions[J]. Food Chem, 2009, 116(4): 947–954.
- [6] CAI Y Z, SUN M, XING J, et al. Structure – radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants[J]. Life Sci, 2006, 78(25): 2872–2888.
- [7] MAŁGORZATA O T. Synergistic, antagonistic and additive antioxidant effects in the binary mixtures[J]. Phytochem Rev, 2020, 19(1): 63–103.
- [8] SARMAH K, DAS P. Biochemical characteristics, fatty acid profiles and antioxidant activities of tea seed oil[J]. Curr Sci, 2018, 114(12): 2549–2554.
- [9] 马莹莹, 姚金彤, 张超, 等. 茶叶籽油酚类化合物抗氧化作用机制研究新进展[J]. 化学工程师, 2018, 32(9): 47–51.
- [10] 梁杏秋, 王晓琴, 黄兵兵. 茶叶籽油组成分析及其抗氧化机理研究进展[J]. 中国粮油学报, 2013, 28(11): 123–128.
- [11] WANG X Q, DEL MAR CONTRERAS M, XU D, et al. Different distribution of free and bound phenolic compounds affects the oxidative stability of tea seed oil: a novel perspective on lipid antioxidation[J/OL]. LWT – Food Sci Technol, 2020, 129: 109389[2021–07–01]. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109389>.
- [12] 卢鹤. 茶叶籽油酚类化合物鉴定分析及存在形态研究[D]. 福建 厦门: 华侨大学, 2016.
- [13] 马骥. 茶叶籽油极性伴随物成分分析及抗氧化能力研究[D]. 江苏 扬州: 扬州大学, 2019.
- [14] LIU G Y, ZHU W Q, LI S T, et al. Antioxidant capacity and interaction of endogenous phenolic compounds from tea seed oil[J/OL]. Food Chem, 2022, 376: 131940 [2021–07–01]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131940>.
- [15] WHITE B L, HOWARD L R, PRIOR R L. Release of bound procyanidins from cranberry pomace by alkaline hydrolysis[J]. J Agric Food Chem, 2010, 58(13): 7572–7579.
- [16] 张莉莎. α -生育酚、植物甾醇和 γ -谷维素清除DPPH自由基相互作用研究[D]. 江苏 无锡: 江南大学, 2019.
- [17] KIM K H, RONG T, YANG R, et al. Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions[J]. Food Chem, 2006, 95(3): 466–473.
- [18] 易谷洋. 碳纳米管固相提取 – 高效液相色谱法测定水中酚类化合物[D]. 上海: 东华大学, 2012.
- [19] 胡铮璐, 刘玉环, 阮榕生, 等. 阿魏酸、对香豆酸碱法制备及应用研究进展[J]. 食品科学, 2009, 21: 438–442.
- [20] 丁岩, 唐世云, 侯汉学, 等. 小麦麸皮中酚酸提取方法的研究[J]. 中国食物与营养, 2012, 18(6): 52–58.
- [21] NACZK M, SHAHIDI F. Extraction and analysis of phenolics in food[J]. J Chromatogr A, 2004, 1054(1/2): 95–111.
- [22] 林鹏飞, 贾小舟, 祁燕, 等. 酚酸类化合物研究进展[J]. 广东化工, 2017, 44(1): 50–52.
- [23] WANG X Q, ZENG Q M, DEL MAR CONTRERAS M, et al. Profiling and quantification of phenolic compounds in *Camellia* seed oils: natural tea polyphenols in vegetable oil[J]. Food Res Int, 2017, 102: 184–194.
- [24] WANG X Q, JIA W C, LAI G Y, et al. Extraction for profiling free and bound phenolic compounds in tea seed oil by deep eutectic solvents[J]. J Food Sci, 2020, 85(5): 1450–1461.
- [25] 刘振香, 陈璠, 罗小会. 茶油在医药方面的活性成分研究进展[J]. 金华职业技术学院学报, 2014, 14(3): 77–81.
- [26] AMIĆ D, LUČIĆ B. Reliability of bond dissociation enthalpy calculated by the PM6 method and experimental TEAC values in antiradical QSAR of flavonoids [J]. Bioorgan Med Chem, 2010, 18(1): 28–35.
- [27] SKROZA D, MEKINIĆ I G, SVILOVIĆ S, et al. Investigation of the potential synergistic effect of resveratrol with other phenolic compounds: a case of binary phenolic mixtures [J]. J Food Compos Anal, 2015, 38: 13–18.
- [28] SAVATOVIC S M, ČETKOVIĆ G S, ČANADANOVIĆ – BRUNET J M, et al. Kinetic behaviour of DPPH radical scavenging activity of tomato waste extracts[J]. J Serb Chem Soc, 2012, 77(10): 1381–1389.
- [29] FREEMAN B L, EGGETT D L, PARKER T L. Synergistic and antagonistic interactions of phenolic compounds found in navel oranges[J]. J Food Sci, 2010, 75(6): C570–C576.
- [30] HIDALGO M, SÁNCHEZ – MORENO C, PASCUAL – TERESA S D. Flavonoid – flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity[J]. Food Chem, 2009, 121(3): 691–696.
- [31] MAZZONE G, MALAJ N, GALANO A, et al. Antioxidant properties of several coumarin – chalcone hybrids from theoretical insights[J]. RSC Adv, 2015, 5(1): 565–575.