

吴 婕, 吴学慧, 徐 高. 大孔树脂纯化甜茶叶总黄酮及其纯化前后的抗氧化性[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(16): 190–193.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.16.043

# 大孔树脂纯化甜茶叶总黄酮及其纯化前后的抗氧化性

吴 婕<sup>1,2</sup>, 吴学慧<sup>2</sup>, 徐 高<sup>2</sup>

(1. 遵义师范学院/赤水河流域环境保护与山地农业发展协同创新中心, 贵州遵义 563006;

2. 贵州师范学院化学与材料学院, 贵州贵阳 5500181)

**摘要:**通过对比聚酰胺、DM-130、LSA-40、DHP-600 与 FL-1 等 5 种大孔树脂的静态“吸附-解吸”性能, 筛选出最适合甜茶叶总黄酮分离纯化的大孔树脂, 并对其动态纯化工艺条件进行探讨。结果表明, 最适大孔树脂的动态“吸附-解吸”参数如下: 上样液质量浓度为 2.0 mg/mL, 上样液体积为 60 mL, 上样液 pH 值为 5.0, 上样流速为 2 BV/h, 洗脱剂乙醇体积分数为 70%, 洗脱剂用量为 70 mL, 洗脱流速为 2 BV/h。在此优化条件下, 得到甜茶叶总黄酮的纯度为 39.6%。并且在抗氧化研究中, 纯化后的甜茶叶总黄酮对 2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐 (ABTS) 自由基的抗氧化能力半抑制浓度 (IC<sub>50</sub> 值) 由 108.7 μg/mL 降低到 77.6 μg/mL。由结果可知, 甜茶叶总黄酮经过 FL-1 大孔树脂的纯化, 能够提高抗氧化能力, 因此, 它具有很好的医药保健品生产前景。

**关键词:**甜茶叶; 总黄酮; FL-1 大孔树脂; 抗氧化性

**中图分类号:** R284 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)16-0190-04

甜茶叶, 别称伞花八仙叶, 其味微甜, 属于蔷薇科悬钩子属多年生多刺灌木, 主要分布在广西、广东、湖南、贵州、江西等地<sup>[1]</sup>。甜茶叶既可入茶, 亦可入药, 被称为“神茶”。甜茶叶富含多种营养物质和微量元素, 如生物类黄酮、氨基酸、锶、维生素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub>、超氧化物歧化酶等。其中, 黄酮类化合物可以降低血脂和胆固醇, 也有抗炎和抗氧化作用<sup>[2-4]</sup>。因此分离纯化甜茶叶总黄酮, 对于提高甜茶叶总黄酮的工业生产价值有重要意义。

在分离纯化植物活性成分的方法中, 大孔树脂因具有成本低、无污染、操作简单、选择性好、可再生等优点而备受人们关注<sup>[5-7]</sup>, 但是用大孔树脂分离纯化甜茶叶总黄酮的研究却鲜有报道。本研究以甜茶叶总黄酮的吸附量、吸附率与解吸率为考察指标, 比较 5 种大孔树脂对总黄酮的“吸附-解吸”性能, 筛选出最适宜分离纯化甜茶叶总黄酮的大孔树脂, 并且通过大孔树脂的动态“吸附-解吸”试验, 得到最适合大孔树脂分离纯化甜茶叶总黄酮的优化工艺参数。通过抗氧化性试验, 表明优化条件下大孔树脂纯化甜茶叶总黄酮的抗氧化能力得到了较大提高。研究结果可为工业化生产甜茶叶总黄酮提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

甜茶叶, 贵州健康茶科技有限公司; 聚酰胺 (60~100 目), 沧州宝恩吸附材料有限公司; DHP-600、FL-1 型树脂,

天津欧瑞生物科技有限公司; DM-130、LSA-40 型树脂, 郑州勤实科技有限公司; 芸香苷标准品 (分析纯), 合肥博美生物有限公司; 乙醇、氢氧化钠、盐酸等均为国产分析纯。

UV2300 分光计, 上海天美科学仪器有限公司; K104A 型离心机, 湖南凯达公司; XT120A 型电子天平, 瑞士普利赛斯公司; FZ102 微型植物粉碎机, 上海书培实验设备有限公司; RE-52AA 旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂; SHA-B 恒温振荡仪, 金坛市富华仪器有限公司。

### 1.2 黄酮含量的测定

采用 NaNO<sub>2</sub>-Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 显色法测定黄酮含量。精确配制浓度为 0.202 mg/mL 的芸香苷标准品溶液, 分别在 25 mL 容量瓶中加入 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL 标准品溶液, 加蒸馏水至总体积为 6.0 mL; 加入 1.0 mL 5% NaNO<sub>2</sub> 溶液, 摇匀静置 10 min 后, 加入 1.0 mL 10% Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 溶液, 摇匀静置 10 min 后, 加入 10.0 mL 4% NaOH 溶液, 用蒸馏水定容至刻度处, 摇匀静置 20 min。在波长 510 nm 处测定吸光度。以质量浓度为横坐标、吸光度为纵坐标, 绘制总黄酮质量浓度的标准曲线方程:  $y = 6.7499x - 0.0304$  ( $r^2 = 0.9997$ )。

### 1.3 大孔树脂吸附量、吸附率、解吸率及甜茶叶总黄酮纯度的计算

大孔树脂的吸附量、吸附率、解吸率及甜茶叶总黄酮纯度的计算公式如下:

$$H = (C_1 - C_{II}) \times V_1 / M_I; \quad (1)$$

$$P = (C_1 - C_{II}) / C_1 \times 100\%; \quad (2)$$

$$Q = C_{III} \times V_{II} / [(C_1 - C_{II}) \times V_1] \times 100\%; \quad (3)$$

$$L = (C_{III} \times V_{II}) / M_{II} \times 100\%。 \quad (4)$$

式中:  $H$  为吸附量, mg/g;  $P$  为吸附率, %;  $Q$  为解吸率, %;  $L$  为纯度, %;  $C_1$ 、 $C_{II}$ 、 $C_{III}$  分别为初始、吸附平衡、解吸平衡的甜茶叶总黄酮的质量浓度, mg/mL;  $V_1$ 、 $V_{II}$  分别为上样液甜茶叶总黄酮体积、解吸液乙醇体积, mL;  $M_I$  为大孔树脂的干质量, g;  $M_{II}$  为大孔树脂纯化后旋干物质的质量, g。

收稿日期: 2018-09-12

基金项目: 赤水河流域环境保护与山地农业发展协同创新中心开放基金 (编号: 遵师协同创新[2018]06)。

作者简介: 吴 婕 (1982—), 女, 贵州铜仁人, 硕士, 副教授, 主要从事天然产物研究。Tel: (0856) 5238982; E-mail: wujiejiaoan@126.com。

#### 1.4 粗制甜茶叶总黄酮的方法

采用超声辅助浸提甜茶叶总黄酮技术,提取条件如下:超声功率为 120 W,提取时间为 30 min,乙醇体积分数为 75%,液料比为 15 mL:1 g,提取温度为 60 ℃,提取次数为 2 次,离心(1 800 r/min、15~20 min),取上清液,浓缩,旋干,得到粗制的甜茶叶总黄酮,备用。

#### 1.5 大孔树脂的活化

用无水乙醇将大孔树脂浸泡 24 h,再用蒸馏水洗去醇溶性杂质至无醇味,然后用 4% HCl 溶液浸泡 4 h,再用蒸馏水冲洗酸溶性杂质至中性,然后用 4% NaOH 溶液浸泡 4 h,最后用蒸馏水冲洗碱溶性杂质至中性,备用。

#### 1.6 大孔树脂对甜茶叶总黄酮静态“吸附-解吸”性能的研究

在室温下,称取 2.0 g 大孔树脂于具塞三角瓶中,加入粗制的甜茶叶总黄酮溶液(浓度为 0.93 mg/mL;体积为 80 mL),振荡 24 h,测定吸附平衡后的甜茶叶总黄酮质量浓度。将吸附平衡后的大孔树脂先用蒸馏水冲洗至无色,再加入 80 mL 无水乙醇解吸液,振荡 24 h,测定大孔树脂解吸后的甜茶叶总黄酮质量浓度。根据“1.3”节中的公式计算大孔树脂的吸附量、吸附率和解吸率,筛选出最合适纯化甜茶叶总黄酮的大孔树脂。

#### 1.7 FL-1 大孔树脂对甜茶叶总黄酮的动态“吸附-解吸”性能研究

大孔树脂在吸附过程中,除了本身的物理化学性质以外,上样液质量浓度、上样液 pH 值及上样流速都是影响大孔树脂纯化效果的重要因素。在室温下,用湿法将 20 mL 活化的 FL-1 大孔树脂装入层析柱(半径×高=10 mm×400 mm)中,考察甜茶叶总黄酮的上样液质量浓度(1.0、2.0、3.0、4.0 mg/mL)、上样液 pH 值(4.0、5.0、6.0、7.0、8.0)、上样流速(1.2、3 BV/h)与不同上样体积对 FL-1 大孔树脂吸附率的影响;此外,考察洗脱液乙醇的体积分数(50%、60%、70%、80%)及洗脱液体积对 FL-1 大孔树脂解吸率的影响。

**1.7.1 上样液质量浓度对 FL-1 大孔树脂吸附率的影响** 为了使加入的甜茶叶总黄酮的量相等,分别设 pH 值为 5.0,上样液体积为 80、40、26.7、20 mL,质量浓度为 1.0、2.0、3.0、4.0 mg/mL,以 2 BV/h 的流速加入 FL-1 大孔树脂柱中。收集流出液并测定总黄酮的质量浓度,得出 FL-1 大孔树脂对不同质量浓度总黄酮的吸附率。

**1.7.2 上样液 pH 值对 FL-1 大孔树脂吸附率的影响** 取 100 mL 上样液,甜茶叶总黄酮质量浓度为 2 mg/mL,pH 值分别设为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0,以 2 BV/h 的流速加入 FL-1 大孔树脂柱中,收集流出液并测定总黄酮的质量浓度,考察甜茶叶总黄酮溶液 pH 值对大孔树脂吸附率的影响。

**1.7.3 上样液流速对 FL-1 树脂吸附率的影响** 取 80 mL 甜茶叶总黄酮上样液,质量浓度为 2.0 mg/mL,pH 值为 5.0,分别以 1、2、3 BV/h 的流速加入 FL-1 大孔树脂柱中,按 5 mL/管收集流出液并测定总黄酮的质量浓度,直至流出液的质量浓度是原上样液质量浓度的 1/10,绘制不同流速对应的 FL-1 大孔树脂柱动态吸附穿透曲线,找出泄漏点,得到最适宜的上样流速和上样体积。

#### 1.7.4 洗脱剂体积分数对 FL-1 大孔树脂解吸性能的影响

向吸附饱和的 FL-1 大孔树脂柱中,以 3 BV/h 的洗脱流速,加入 60 mL 体积分数分别为 50%、60%、70%、80%、90% 的乙醇溶液进行洗脱,收集洗脱液,测定总黄酮的质量浓度,得到不同体积分数洗脱剂的解吸率。

**1.7.5 洗脱流速和洗脱剂体积对 FL-1 大孔树脂解吸性能的影响** 向吸附甜茶叶总黄酮的饱和 FL-1 大孔树脂柱中,加入体积分数为 70% 的乙醇溶液,分别以 1、2、3 BV/h 的流速进行洗脱。按 10 mL/管收集洗脱液,测定洗脱液的总黄酮质量浓度,计算 FL-1 大孔树脂柱在不同洗脱速度下的动态解吸率,确定最佳洗脱流速和洗脱液用量。

#### 1.8 FL-1 大孔树脂纯化工艺的验证

得到粗制的甜茶叶总黄酮溶液(pH 值为 5.0,浓度为 2.0 mg/mL,体积为 60 mL)后,设上样流速为 2 BV/h,加入 20 mL FL-1 大孔树脂层析柱(半径×高=10 mm×400 mm)中,进行动态吸附,收集流出液,计算吸附率。当 FL-1 大孔树脂柱吸附平衡后,按照 2 BV/h 的洗脱速度,加入 70 mL 体积分数为 70% 的乙醇溶液进行洗脱,收集流出液,计算解吸率。进行 3 次平行试验,取均值,验证 FL-1 大孔树脂纯化甜茶叶总黄酮的可行性及稳定性。

#### 1.9 粗制和纯化的甜茶叶总黄酮对 2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)自由基的抗氧化性

将粗制和纯化的甜茶叶总黄酮配制成不同质量浓度的待测液,同时以维生素 C 作为参比。参考林恋竹等的方法<sup>[7]</sup>,测定它们对 ABTS 自由基的清除率。

## 2 结果与分析

### 2.1 大孔树脂的静态“吸附-解吸”试验

大孔树脂的空间结构、极性和粒径决定其对活性成分的“吸附-解吸”性能。由表 1 可以看出,在相同条件下,5 种大孔树脂对甜茶叶总黄酮都有一定的“吸附-解吸”能力,其静态吸附能力排序为 FL-1>聚酰胺(60~100 目)>HPD-600>LSA-40>DM-130;其静态解吸能力排序为 HPD-600>FL-1>LSA-40>DM-130>聚酰胺(60~100 目)。综合考虑吸附率和解吸率,FL-1 大孔树脂是纯化甜茶叶总黄酮较为理想的树脂。

表 1 5 种大孔树脂对总黄酮的吸附和解吸效果

大孔树脂型号	吸附量 (mg/g)	吸附率 (%)	解吸率 (%)
HPD-600	16.5	37.2	90.5
LSA-40	10.4	23.4	67.4
聚酰胺(60~100 目)	25.2	56.9	42.5
FL-1	30.5	78.9	71.4
DM-130	2.9	6.6	62.1

### 2.2 FL-1 大孔树脂的动态“吸附-解吸”性能研究

**2.2.1 上样液质量浓度对 FL-1 大孔树脂吸附率的影响** 由图 1 可知,当上样液浓度为 1.0 mg/mL 时,FL-1 大孔树脂的吸附率达到最大值 93%。当上样液的质量浓度为 1.0~2.0 mg/mL 时,FL-1 大孔树脂的吸附率随着上样液质量浓度的增加而缓慢降低,若继续增加上样液质量浓度,其吸附率迅速降低。这是由于在等温条件下,当上样液质量浓度较低时,黄酮类化合物与树脂接触得越充分,大孔树脂的吸附率越

高,但是吸附量较小;当上样液质量浓度过大时,受到大孔树脂吸附容量和孔容的影响,导致大孔树脂吸附量、吸附率均减小。考虑到上样液质量浓度过低会导致吸附量太小,纯化效率不高,而上样液质量浓度过高会导致大孔树脂吸附不充分,浪费原料。因此,甜茶叶总黄酮的上样液质量浓度选择 2.0 mg/mL 为共宜。

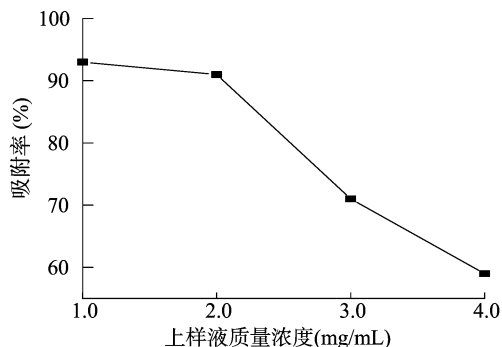


图1 上样液质量浓度对吸附率的影响

**2.2.2 上样液 pH 值对 FL-1 大孔树脂吸附率的影响** 如图 2 所示, FL-1 大孔树脂对甜茶叶总黄酮的吸附率随着上样溶液 pH 值的增加呈现先升高后降低的趋势。当 pH 值为 5.0 时, 甜茶叶总黄酮的吸附率达到最大值 89%, 这是因为当上样溶液 pH 值为 5.0 时, 溶液中的黄酮类化合物主要以分子形式存在, 有利于 FL-1 大孔树脂的吸附。若上样溶液 pH 值较小, 黄酮分子易形成“羧盐”; 若上样溶液 pH 值较大, 黄酮类化合物以离子状态存在, 都不利于 FL-1 大孔树脂对甜茶叶总黄酮发生物理吸附作用。因此, 甜茶叶总黄酮上样液的 pH 值为 5.0 时较适宜。

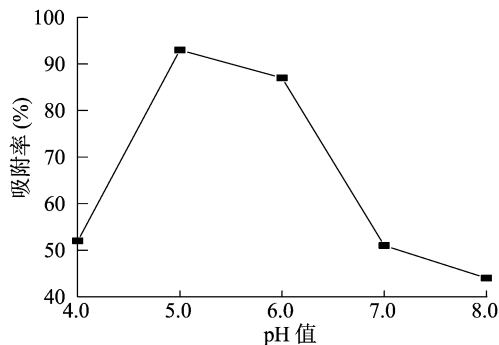


图2 上样液 pH 值对吸附率的影响

**2.2.3 上样液流速和上样体积的确定** 由图 3 可知, 甜茶叶总黄酮的上样流速越快, 渗漏点也出现得越早。当上样流速为 1 BV/h 时, 上样体积约为 80 mL 时出现泄露点; 当上样流速为 2 BV/h 时, 上样体积约为 60 mL 时出现泄露点; 当上样流速为 3 BV/h 时, 上样体积约为 30 mL 时就出现了泄露点。因为大孔树脂的吸附过程主要是活性成分在大孔树脂的膜扩散和粒扩散的过程<sup>[8]</sup>, 上样流速越快, 甜茶叶黄酮类化合物与大孔树脂接触的时间越短, 它们还没有来得及被吸附到树脂表面或孔内就流出树脂柱。所以, 在上样液质量浓度相同的情况下, 当上样流速为 3 BV/h 时, FL-1 大孔树脂柱对甜茶叶总黄酮的吸附量小, 吸附率较低; 当上样流速为 1 BV/h 时, FL-1 大孔树脂柱对甜茶叶总黄酮的吸附量和吸附率相对较高。然而, 在实际工业生产中, 上样流速过慢会导致生产效率低, 因此选择上样流速为 2 BV/h 较好, 并且在此条件下的最佳上样体积为 60 mL。

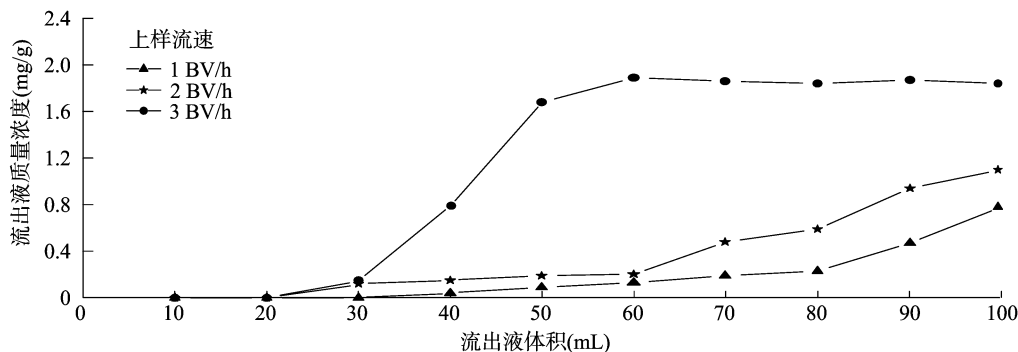


图3 不同上样流速的 FL-1 大孔树脂吸附曲线

**2.2.4 不同体积分数的洗脱剂对 FL-1 大孔树脂洗脱效果的影响** 由图 4 可知, 随着洗脱液乙醇体积分数的增加, 甜茶叶总黄酮的洗脱率先提高后略有降低。当乙醇体积分数为 50% ~ 70% 时, 乙醇体积分数越大, 它对甜茶叶黄酮类化合物的解吸率也越高; 当乙醇体积分数为 70% 时, 甜茶叶总黄酮的解吸率为 83%; 当乙醇体积分数为 80% 时, 甜茶叶总黄酮的解吸率为 85%。但是与体积分数为 70% 的乙醇得到的洗脱率相比, 体积分数为 80% 的乙醇得到的解吸率提高得较慢。这是因为乙醇体积分数越大, 洗脱剂的极性越弱, 较小极性的黄酮类化合物更加容易被洗脱<sup>[9]</sup>; 但是当乙醇体积分数过大时, 醇溶性杂质会增多, 它们会与甜茶叶黄酮类化合物形成竞争, 使甜茶叶黄酮类化合物与乙醇-水分子结合的可能性下降, 导致甜茶叶总黄酮解吸率降低。综合考虑, 乙醇溶液

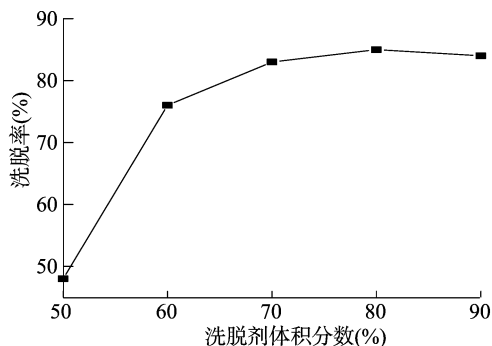


图4 不同体积分数的乙醇对解吸率的影响

的体积分数以 70% 为宜。

**2.2.5 洗脱剂流速及洗脱体积的确定** 由图 5 可知, 随着洗

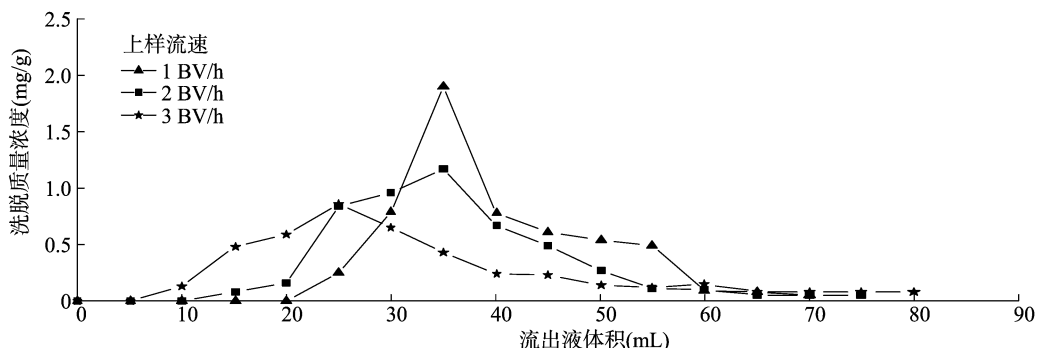


图5 洗脱速率对洗脱率的影响

脱液流速的增加,洗脱出的甜茶叶总黄酮的质量浓度形成的峰形越宽,并且拖尾现象越明显,洗脱体积也越大;但是洗脱流速太小会导致洗脱时间过长,工业生产效率低。综合考虑,最佳洗脱流速为 2 BV/h,最佳洗脱体积用量为 70 mL。

### 2.3 FL-1 大孔树脂纯化工艺的验证

由表 2 可知,FL-1 大孔树脂对甜茶叶总黄酮的吸附、解吸和纯化的性能较好,其吸附量、解吸率、解吸后的纯度分别为 41.7 mg/g、81.5%、39.6%。因此可见,在工业生产中 FL-1 大孔树脂纯化甜茶叶总黄酮具有操作上的可行性。

表 2 FL-1 大孔树脂纯化总黄酮的结果

试验编号	吸附量 (mg/g)	解吸率 (%)	纯度 (%)
1	41.4	81.5	39.8
2	41.7	81.1	39.5
3	42.1	81.9	39.6
平均值	41.7	81.5	39.6

### 2.4 纯化前后的甜茶叶总黄酮对 ABTS 自由基清除能力的比较

ABTS·是由强氧化剂与 ABTS 盐反应制备的,其氧化还原电势较低,可以通过电子传递(ET)反应机制或者通过氢原子转移(HAT)机制使自由基失去活性,从而导致体系绿色减退<sup>[9]</sup>。由图 6 可以看出,纯化前后的甜茶叶总黄酮对 ABTS 自由基均具有一定的清除能力,并且清除率与总黄酮的质量浓度有较强的正相关性( $r^2=0.97$ );当甜茶叶总黄酮质量浓度相同时,纯化后的总黄酮清除能力更接近维生素 C,纯化后的总黄酮对 ABTS 自由基清除的半抑制浓度( $IC_{50}$  值)由 108.7  $\mu\text{g/mL}$  降至 77.6  $\mu\text{g/mL}$ 。由此可见,FL-1 纯化的甜茶叶总黄酮具有较强的抗氧化能力。

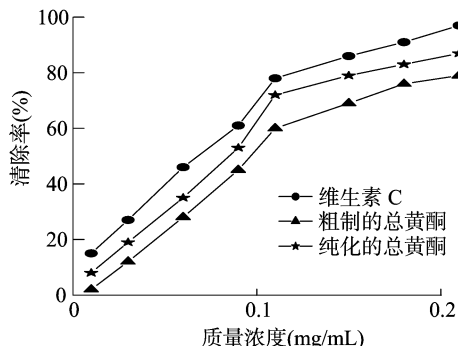


图6 粗制与纯化的甜茶叶总黄酮对 ABTS 自由基清除率的比较

## 3 结论

通过静态“吸附-解吸”试验,筛选出最适用于甜茶叶总黄酮分离纯化的 FL-1 大孔树脂。在动态“吸附-解吸”试验中,得到 FL-1 大孔树脂优化甜茶叶总黄酮的纯化工艺参数:上样液质量浓度为 2.0 mg/mL,上样液体积为 60 mL,上样液 pH 值为 5,上样流速为 2 BV/h;洗脱剂乙醇体积分数为 70%,洗脱剂用量为 70 mL,洗脱流速为 2 BV/h。在此条件下,得到甜茶叶总黄酮的纯度为 39.6%。在抗氧化性研究中,当甜茶叶总黄酮质量浓度相同时,纯化后的总黄酮对 ABTS 自由基清除的  $IC_{50}$  由 108.7  $\mu\text{g/mL}$  降至 77.6  $\mu\text{g/mL}$ ,用 FL-1 纯化的甜茶叶总黄酮具有较强的抗氧化能力。综合分析可知,FL-1 大孔树脂分离纯化甜茶叶总黄酮的纯化效率高,纯化后的总黄酮更具有商业价值。

### 参考文献:

- [1] 闫志刚,蒙淑洁,韦荣昌,等. 广西甜茶研究与应用现状[J]. 中草药,2017,48(12):2572-2578,2588.
- [2] 葛益银,张涛,张凌云,等. 广西甜茶生理活性成分及其提取纯化研究进展[J]. 食品工业科技,2014,35(4):388-391,396.
- [3] 颜小捷,卢凤来,李典鹏. 甜茶化学成分及药理作用研究进展[J]. 广西植物,2013,33(1):136-142.
- [4] Koh G Y, McCutcheon K, Zhang F, et al. Improvement of obesity phenotype by Chinese sweet leaf tea (*Rubus suavissimus*) components in high fat diet induced obese rats[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2011,59(1):98-104.
- [5] Zhang Y, Li S F, Wu X W, et al. Macroporous resin adsorption for purification of flavonoids in *Houttuynia cordata* Thunb[J]. Chinese Journal of Chemical Engineering,2007,15(6):872-876.
- [6] 黄玲艳,黄宏轶,汪元元,等. 16 种常见可食花卉水提液的总多酚与总黄酮含量及其抗氧化活性[J]. 食品工业科技,2017,38(4):353-356,360.
- [7] 林恋竹,赵谋明. 反应时间对 DPPH·法、ABTS·+法评价抗氧化性结果的影响[J]. 食品科学,2010,31(5):63-67.
- [8] 李侠,臧学丽,徐祎博,等. AB-8 大孔树脂纯化绿豆皮黄酮工艺优化及纯化前后抗氧化能力比较[J]. 2018,39(10):293-290.
- [9] 骆爱委,叶静,黄雅燕,等. AB-8 大孔吸附树脂精制芦柑皮总黄酮及黄酮类化合物的分离[J]. 食品科学,2014,35(6):30-35.