

何志贵, 徐祥林, 崔莹莹, 等. 三叶青原花青素纯化工艺及抗氧化、 α -葡萄糖苷酶抑制活性研究 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(6): 178–185. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021060194

HE Zhigui, XU Xianglin, CUI Yingying, et al. Study on Purification Process and Antioxidative Activity and α -Glucosidase Inhibitory Activity of Proanthocyanidins from *Tetrastigma hemsleyanum*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(6): 178–185. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021060194

· 工艺技术 ·

三叶青原花青素纯化工艺及抗氧化、 α -葡萄糖苷酶抑制活性研究

何志贵, 徐祥林, 崔莹莹, 伍 兰, 周晓雨, 黄宗昉, 杜密英*
(桂林旅游学院休闲与健康学院, 广西桂林 541006)

摘 要: 为了探索三叶青中原花青素的纯化工艺及其生物活性作用, 制备经济高效的原花青素, 比较 5 种大孔吸附树脂对三叶青原花青素静态吸附及解吸附能力, 并对树脂的动态吸附及解吸附条件进行优化。同时, 探讨乙醇洗脱对原花青素纯度及生物活性影响。结果表明, AB-8 型树脂可用于三叶青中原花青素纯化, 纯化三叶青原花青素的最适条件为: 上样质量浓度 6.00 mg/mL, 上样流速 2 BV/h, 上样体积 11 BV, 洗脱流速 1.5 BV/h, 洗脱剂用量 2 BV, 70% 乙醇吸附效果最好, 纯化后的三叶青原花青素纯度达到 97.31% $\pm$ 0.96%, 比粗提物提高了 2.2 倍, 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) 自由基清除活性、ABTS⁺ 自由基清除活性及 α -葡萄糖苷酶抑制活性得到了显著增强 ($P<0.05$), 并且与原花青素含量之间存在极显著相关性 ($P<0.01$)。因此, AB-8 树脂纯化法简单、高效, 且三叶青原花青素具有较强的体外抗氧化活性以及 α -葡萄糖苷酶抑制活性, 为综合开发利用三叶青原花青素提供科学参考。

关键词: 三叶青原花青素, AB-8 型树脂, 抗氧化活性, α -葡萄糖苷酶抑制活性

中图分类号: TS201.2

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2022)06-0178-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021060194



本文网刊:

Study on Purification Process and Antioxidative Activity and α -Glucosidase Inhibitory Activity of Proanthocyanidins from *Tetrastigma hemsleyanum*

HE Zhigui, XU Xianglin, CUI Yingying, WU Lan, ZHOU Xiaoyu, HUANG Zongfang, DU Miying*

(School of Leisure and Health, Guilin Tourism University, Guilin 541006, China)

Abstract: In this paper, the purification process and biological activity of proanthocyanidins isolated from *Tetrastigma hemsleyanum* were explored to prepare economical and efficient proanthocyanidins. The static adsorption and desorption capacity of proanthocyanidins on five kinds of resins were compared. The dynamic adsorption and desorption conditions of resins were optimized. The effects of ethanol elution on the purity and biological activity of proanthocyanidins were evaluated. The results showed that AB-8 resin was chosen as the better sorbent for the purification of proanthocyanidins from *Tetrastigma hemsleyanum*. The optimal conditions for purifying proanthocyanidins were as follows: Sample concentration 6.00 mg/mL, loading rate 2 BV/h, loading amount 11 BV, eluent flow rate 1.5 BV/h, and eluent volume 2 BV. 70% ethanol had the best effect for the purification of proanthocyanidins, and the purification of proanthocyanidins were 97.31% $\pm$ 0.96%, 2.2 times the purification of crude extract. The DPPH scavenging activity, ABTS⁺ scavenging activity and α -glucosidase inhibitory activity were also increased dramatically and there was a significant positive correlation between these activities and content of proanthocyanidins ($P<0.01$). Therefore, the AB-8 resin purification method was

收稿日期: 2021-06-23

基金项目: 广西壮族自治区财政科技计划项目 (2018AB49021); 广西高校中青年教师基础能力提升项目 (2020KY22007); 桂林市科学研究与技术开发计划项目 (20170103-4)。

作者简介: 何志贵 (1980-), 男, 博士, 研究方向: 天然产物提取, E-mail: 906260300@qq.com。

* 通信作者: 杜密英 (1978-), 女, 硕士, 副教授, 研究方向: 烹饪营养与植物化学物, E-mail: 602451544@qq.com。

simple and efficient, and the *Tetrastigma hemsleyanum* proanthocyanidin had strong *in vitro* antioxidant activity and α -glucosidase inhibitory activity. It would provide a scientific reference for the comprehensive development and utilization of proanthocyanidins in *Tetrastigma hemsleyanum*.

Key words: *T. hemsleyanum* Diels et Gilg proanthocyanidins; AB-8 resins; antioxidant activity; α -glucosidase suppression

三叶青(*Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg)又名三叶崖爬藤、蛇附子、金线吊葫芦等,为葡萄科崖爬藤属植物^[1],在广西广泛种植。原花青素(Proanthocyanidins, PC)是一类由多羟基黄烷-3-醇结构单元缩合而成的多酚类化合物^[2-3],具有抗氧化^[4]、保护心血管系统^[5]、预防动脉粥样硬化^[6]、预防老年痴呆^[7]等药理活性功能。

原花青素的提取纯化工艺一直是影响其质量优劣的关键工艺。目前,常见的原花青素提取方法有:水提法^[8]、有机溶剂提取法^[9]、微波提取法^[10]、高压提取法^[11]、萃取法^[12]等,这几种提取方法各有优劣,为了提高提取效率,通常会联合使用几种提取方法,但提取后的原花青素为粗提物,内部含有大量的多糖、蛋白质等杂质^[13-15]。如若不采取适当的方法进行分离纯化,原花青素则易分解、粘稠、吸潮,影响其生物活性^[16-17]。常用于原花青素纯化的工艺包括膜分离法、纸层析法、高效液相色谱法、离子交换法等,这几种方法虽然纯化效率高,可纯化成本也较高,不适宜实际加工生产。大孔吸附树脂具有吸附纯化工艺简单、纯化效率高、生产成本低廉等优点,广泛应用于黄酮类、多酚类和色素等植物化学物质的纯化。赵文娟等^[18]通过 101 型树脂对黑枸杞原花青素进行分离纯化,纯化后的原花青素含量是原来的 2.17 倍。褚仕超等^[19]通过 AB-8 型树脂对蚕豆中原花青素进行纯化,纯化后的原花青素含量高达 94.33%。滕飞等^[20]通过 DM130 型树脂纯化黑果腺肋花楸原花青素,所得原花青素的纯度为 78.4%。但大孔树脂纯化三叶青原花青素还未见报道。

为探索三叶青中原花青素的纯化工艺及其活性,采用大孔吸附树脂法纯化三叶青原花青素,以不同类型树脂吸附量和解吸附率为指标,筛选最佳树脂类型,并对三叶青粗提物和纯化后的纯度、体外抗氧化活性以及葡萄糖苷酶抑制活性进行综合测定,以期三叶青原花青素的深入研究提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

三叶青 采自广西天峨县菠结乡常里村,经西北农林科技大学生命科学院、中药指纹图谱与天然产物国家地方联合工程研究中心董娟娥教授鉴定为葡萄科崖爬藤属植物三叶青(*T. hemsleyanum*)的干燥块根。样品用去离子水洗净,45℃烘干,将样品粉碎后过 60 目筛;D-101、X-5、AB-8、HPD-100、HPD-300 型大孔吸附树脂 安徽三星树脂科技有限公司; α -葡萄糖苷酶、DPPH、ABTS、对硝基苯- α -D-

吡喃葡萄糖苷 PNPG、L-抗坏血酸、阿卡波糖 美国 Sigma-Aldrich 公司;葡萄籽原花青素 标准品,纯度 $\geq 98.5\%$,南京狄尔格医药科技有限公司;其余试剂 均为国产分析纯;水 去离子水。

FW-100D 高速万能粉碎机 天津鑫博得仪器有限公司;UV-1700 紫外-可见分光光度计 日本株式会社岛津制作所;1510 全波长多功能酶标仪 赛默飞世尔科技有限公司;SB25-12DTDN 型超声波清洗机 宁波新芝;N-1300D-W 旋转蒸发仪 东京理化器械株式会社;BSA224 电子天平 赛多利斯科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 原花青素粗提物制备及含量测定 采用体积分数为 50% 乙醇溶液结合超声波辅助法提取原花青素:超声功率 100 W,超声温度为 40℃,超声时间为 5 min,料液比为 1:20,浸提温度为 40℃,浸提时间为 20 min,提取后 5000 r/min 离心 5 min,取上清液,旋蒸浓缩,冻干。并根据下列方法计算原花青素含量。

用香草醛—盐酸法测定原花青素的含量,参照本课题组建立的方法^[21],配制工作液(1 g/100 mL 香草醛-甲醛溶液与 1 mol/L 盐酸-甲醇溶液,体积比 1:1),称取原花青素标准品,以甲醇为溶剂,在容量瓶中制备 0.0、3.0、6.0、9.0、12.0、15.0 $\mu\text{g/mL}$ 的标准溶液,在不同浓度的标准液中分别加入 10 mL 工作液,充分摇匀,置于室温下 30 min 显色,用甲醇作空白对照,在 500 nm 波长处测定溶液吸光值,对三叶青原花青素含量进行初步定量分析。绘制吸光值(Y)与原花青素标准品质量浓度(X)的标准曲线,得标准曲线方程为: $Y=1.6771X-0.0002(R^2=0.9925)$

1.2.2 大孔吸附树脂型号的筛选

1.2.2.1 大孔吸附树脂处理 参照文献^[22]对 D101、X-5、HPD-100、HPD-300、AB-8 型大孔吸附树脂进行处理。所有树脂首先在无乙醇中处理 24 h,然后用去离子水洗涤以完全去除乙醇,在 5% (m/m) 的氢氧化钠中浸泡 6 h,用去离子水洗涤直到滤液 pH=7,在 5% (v/v) 的盐酸中浸泡 6 h,然后依次用去离子水洗涤直到滤液 pH=7。最后,所有的树脂在 60℃干燥。以不同类型树脂的饱和吸附量、解吸附量、解吸附率为主要指标,筛选出最优的树脂类型。

1.2.2.2 吸附量测定 参照文献^[23]精密称取上述经处理的大孔吸附树脂各 2 g,置于 250 mL 的具塞三角瓶中,分别加入质量浓度为 6 mg/mL 的三叶青粗提物溶液定容至 100 mL 密封后置于摇床中,25℃转速 60 r/min 摇 24 h,测定吸附后溶液原花青素质

量浓度 R_0 , 按照式(1)计算大孔树脂对原花青素的饱和吸附量。

$$\text{树脂饱和吸附量}(\text{mg/g}) = \frac{6 - R_0 \times 100}{2} \quad \text{式(1)}$$

1.2.2.3 解吸附量测定 称取吸附饱和后的预处理树脂各 1 g, 置于 250 mL 锥形瓶中, 加入体积分数为 70% 的乙醇溶液 100 mL 充分摇匀, 过滤并测定解吸附后的原花青素质量浓度 R_1 , 按照式(2)计算大孔树脂对原花青素的解吸附量。

$$\text{树脂解吸附量}(\text{mg/g}) = \frac{R_1 \times 100}{1} \quad \text{式(2)}$$

$$\text{树脂解吸附率}(\%) = \frac{\text{树脂解吸附量}}{\text{树脂饱和吸附量}} \times 100 \quad \text{式(3)}$$

1.2.3 动态吸附实验 湿法装柱(15 cm×1.3 cm), 平衡, 然后将含有原花青素为 6 mg/mL 的三叶青粗提物以 1、2、3、4、5 BV/h 的流速分别进行上样吸附, 流出液以 1 BV 为单位, 持续收集 24 份, 用酶标仪测定每份流出液中三叶青原花青素质量浓度。当含有三叶青原花青素的流出液质量浓度是上样质量浓度的 10% 时视为泄露点。此时停止加样, 以此确定上样质量浓度和流速。

1.2.4 洗脱流速及洗脱剂用量考察 依据 1.2.3 中确定的上样流速和上样质量浓度, 制备 5 份吸附饱和的树脂柱, 去离子水充分平衡, 70% 浓度乙醇作洗脱溶剂, 设 5 个梯度流速分别进行洗脱, 持续收集 25 份流出液(0.1 BV/份), 分别检测每一份流出液中三叶青原花青素的质量浓度, 通过绘制的洗脱曲线图来确定洗脱剂用量和洗脱流速。

1.2.5 洗脱剂浓度考察 参照 1.2.4 确定的洗脱剂用量和洗脱流速, 按照 1 BV/h 的流速依次用 50%、60%、70%、80%、90% 的乙醇溶液对饱和树脂进行充分洗脱, 并收集洗脱液, 检测 5 种不同体积分数的乙醇洗脱剂对三叶青原花青素洗脱能力的影响。

1.2.6 三叶青原花青素粗提物纯化 经预处理的 AB-8 型树脂分 3 份进行湿法装柱, 并以去离子水平衡。首先, 将三叶青提取物溶液(原花青素质量浓度为 6.00 mg/mL), 以流速 2 BV/h 上样 10 BV, 完全饱和和吸附后, 除去杂质。然后以 1 BV/h 流速分别用 50%、70%、90% 的体积分数乙醇进行解吸附, 并收集洗脱液, 旋蒸浓缩冻干, 得到不同纯度的三叶青原花青素纯化物。

1.2.7 DPPH 自由基清除活性测定 将 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)配成 100 $\mu\text{mol/L}$ 的工作液 100 mL。3 种三叶青纯化物、粗提物分别配成 0、20、40、60、80、100、120 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液。以 L-抗坏血酸作阳性对照, 参照文献 [24] 进行测定并计算 DPPH 自由基清除率, 样品及 L-抗坏血酸清除 DPPH 自由基的能力以对 DPPH 自由基的半数抑制浓度(Half maximal inhibitory concentration, IC_{50})表示。

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \frac{A_0 - A_i}{A_0} \times 100 \quad \text{式(4)}$$

式中: A_0 为空白样品, A_i 为各样品。

1.2.8 ABTS⁺自由基的清除活性测定 以 ABTS (7 mmol/L) 母液与 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (2.6 mmol/L) 的溶液按 1:1 的体积比混合, 避光条件下静置过夜, 使用前用无水乙醇稀释成工作液, 要求其在 734 nm 波长下的吸光度为 0.70 ± 0.2 。将 3 种三叶青纯化物、粗提物分别配成 0、20、40、60、80、100、120 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液。以 L-抗坏血酸作阳性对照, 参照文献 [24] 测定并计算 ABTS⁺自由基清除率, 样品及 L-抗坏血酸清除 ABTS⁺自由基的能力以对 ABTS⁺自由基的半数抑制浓度(IC_{50})表示。

$$\text{ABTS}^+ \text{ 自由基清除率}(\%) = \frac{A_0 - A_i}{A_0} \times 100 \quad \text{式(5)}$$

式中: A_0 为空白样品, A_i 为各样品。

1.2.9 α -葡萄糖苷酶抑制活性测定 三叶青粗提物及 3 种不同梯度纯化物用 10% 二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)进行注溶, 配成 0、2、4、6、8、10、12 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液。以阿卡波糖作为阳性对照, 参照文献 [23] 测定并计算 α -葡萄糖苷酶的抑制率, 抑制活性以对 α -葡萄糖苷酶的半数抑制浓度(IC_{50})表示。

$$\alpha\text{-葡萄糖苷酶的抑制率}(\%) = \frac{\Delta A_0 - \Delta A_i}{\Delta A_0} \times 100 \quad \text{式(6)}$$

式中: ΔA_0 为空白样品的增量, ΔA_i 为样品的增量, A_0 为空白样品。

1.3 数据处理

所有试验均以三份重复进行, 结果以三份平行测量的均数±标准差表示。使用 SPSS 22.0 软件得到半数抑制率 IC_{50} 值并进行单因素方差分析, Excel 2010 进行统计分析与整理。相关性分析采用 Pearson 相关, $P < 0.05$ 表示具有显著性。

2 结果与分析

2.1 大孔吸附树脂的筛选

考察 AB-8、HPD-100、X-5、HPD-300 以及 D101 共 5 种树脂对三叶青原花青素的吸附及解吸附能力。如表 1 所示, 五种树脂均表现出较强的吸附能力, 从统计学上分析吸附量来看, AB-8 和 HPD-100 最好, 分别可达到 132.61 和 137.68 mg/g; 从解吸附率试验结果来看, 树脂 AB-8 与树脂 D101 的解吸附率显著优于其他类型树脂($P < 0.05$), 分析认为原花青素分子中的苯环易与树脂形成疏水作用, 而比面积较小的树脂 AB-8 与 D101 较易洗脱^[25]。因此, 基于吸附和解吸附的能力, 综合考虑选用 AB-8 型大孔吸附树脂纯化三叶青原花青素^[26-27]。

2.2 上样量及上样流速对 AB-8 型吸附树脂纯化三叶青原花青素的影响

上样流速对树脂吸附效果的影响如图 1 所示。

表 1 大孔吸附树脂对三叶青原花青素的吸附及解吸附能力

Table 1 Adsorption and desorption capacity of macroporous resins for proanthocyanidins from <i>T. hemsleyanum</i>						
树脂型号	极性	孔径(nm)	比表面积(m ² /g)	饱和吸附量(mg·g ⁻¹)	解吸附量(mg·g ⁻¹)	解吸附率(%)
X-5	弱极性	29~30	500~600	119.85±1.88 ^b	86.46±2.73 ^c	72.15±2.50 ^c
D101	非极性	9~10	500~550	113.03±0.64 ^c	90.40±1.17 ^{bc}	80.20±1.28 ^b
AB-8	弱极性	12~16	480~520	132.61±3.50 ^a	124.83±4.08 ^a	94.12±1.12 ^a
HPD-100	非极性	8.5~9	650~700	137.68±3.62 ^a	93.2±2.63 ^b	67.72±2.41 ^d
HPD-300	弱极性	5~5.5	800~870	122.39±3.44 ^b	73.05±2.03 ^d	59.68±0.21 ^e

注: 同列小写字母不同表示差异性显著($P<0.05$)。

原花青素上样质量浓度为 6.0 mg/mL 时, 在 1~5 BV/h 流速范围内, 上样流速越快, AB-8 型号树脂吸附能力越受影响, 泄漏点越早出现。通过图 1 可知, 在 3 BV/h 后流出花青素质量浓度逐渐升高, 吸附效果较差, 分析认为在流速加快的情况下, 三叶青原花青素不能完全被 AB-8 型树脂吸附, 易造成溶液浪费; 相反, 流动速率过慢, 生产效率就会受到严重影响。综合时间成本及纯化效率考虑, 三叶青原花青素纯化最佳上样质量浓度为 6.0 mg/mL, 最佳上样流速 2 BV/h、最佳上样体积 11 BV。与鸡血藤、密蒙花最佳流速是 2 BV/h, 上样体积分别为 10、20 BV^[23,28] 相近。

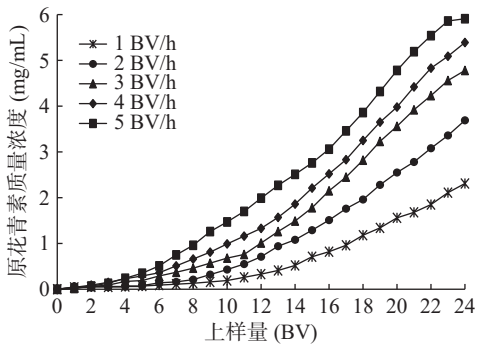


图 1 上样流速对树脂动态吸附原花青素的影响
Fig.1 Effect of loading velocity on dynamic adsorption of proanthocyanidins by resin

2.3 洗脱流速及洗脱剂用量对 AB-8 型吸附树脂纯化三叶青原花青素的影响

以三叶青原花青素吸附量和解吸附率为考察指标。如图 2 所示, 在 0.5~1.5 BV/h 三个梯度低流速洗脱时, 峰面积大, 解吸附率高; 相反在 2.0 和 2.5 BV/h 高流速洗脱时, 峰形降低, 解吸附率较差, 出现拖尾现象。这种情况下有可能洗脱流速到达一定的数值时, 洗脱溶剂与 AB-8 型树脂触及的时间过短, 解吸附不充分, 从而导致解吸附效率降低。当洗脱剂用量在 2.0 BV 之后时, 流出液中原花青素含量非常低, 因此, 选择洗脱剂用量以 2.0 BV、洗脱流速以 1.5 BV/h 为最佳。

2.4 乙醇体积分数对 AB-8 树脂纯化三叶青原花青素的影响

据文献报道, 原花青素中的多羟基结构与吸附树脂充分结合后形成氢键作用, 易被含水的有机溶剂洗脱, 因此, 植物中原花青素提取纯化通常用乙醇进

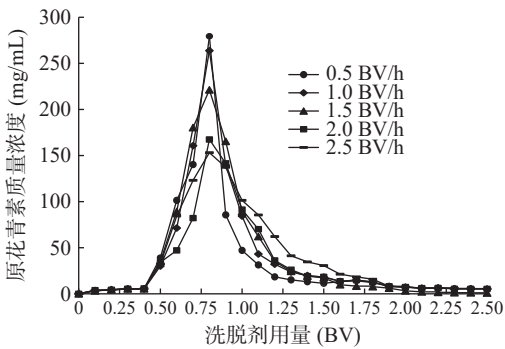


图 2 洗脱流速及洗脱剂用量对 AB-8 树脂纯化原花青素的影响
Fig.2 Effects of elution velocity and volume on procyanidins purification by AB-8 resin

行洗脱^[29]。选用乙醇对 AB-8 树脂中吸附的三叶青原花青素进行洗脱。如表 2 所示, 在 5 个不同梯度范围内, 随着乙醇浓度的增加, AB-8 型树脂对三叶青原花青素的解吸附量和解吸附率呈现先增后减的趋势。当乙醇体积分数增大到 70% 时解吸附量和解吸附率达到最高, 这可能与三叶青原花青素的极性有关^[23]。研究表明, 70% 的乙醇对三叶青原花青素表现出较好的提取效果, 因此, 优选 70% 乙醇作为最佳洗脱溶剂。

表 2 乙醇浓度对 AB-8 型树脂解吸附能力的影响
Table 2 Effects of ethanol concentration on AB-8 resin desorption capability

乙醇体积分数(%)	解吸附率(%)	解吸附量(mg·mL ⁻¹)
50	71.23	82.65
60	83.45	91.43
70	96.86	115.67
80	85.21	92.62
90	82.17	89.12

2.5 乙醇洗脱体积分数对原花青素纯度及生物活性影响

在选用不同体积分数的乙醇洗脱剂时, 优选对三叶青原花青素解吸附能力强、对杂质解吸附能力弱的洗脱剂, 从而提升三叶青原花青素纯度。用 50%、70%、90% 等不同体积分数的乙醇对吸附在 AB-8 树脂上的原花青素进行洗脱。利用 1.2.1 节所述方法对各样品原花青素纯度进行分析, 结果如表 3, 三叶青粗提物中的原花青素纯度为 44.77%±0.88%, 与李彦等^[23] 研究相近, 且 V70 样品中的原花青素纯

表 3 不同样品原花青素纯度及生物活性

Table 3 Purities and biological activities of proanthocyanidin from different samples

	L-抗坏血酸	阿卡波糖	CE(粗提物)	V50	V70	V90
原花青素纯度(%)	—	—	44.77±0.88 ^d	82.43±0.67 ^c	97.31±0.96 ^a	87.04±1.03 ^b
对DPPH自由基清除率的IC ₅₀ (μg/mL)	97.95±0.69 ^a	—	91.26±1.43 ^b	81.06±0.23 ^d	71.59±0.99 ^e	85.28±1.06 ^c
对ABTS ⁺ 自由基清除率的IC ₅₀ (μg/mL)	41.74±0.43 ^{bc}	—	94.72±0.21 ^a	48.10±1.3 ^b	37.97±0.25 ^c	50.04±1.25 ^b
对α-葡萄糖苷酶抑制率的IC ₅₀ (μg/mL)	—	572.01±9.85 ^a	13.76±0.16 ^b	4.64±0.13 ^c	3.84±0.09 ^c	5.56±0.23 ^c

注: V50、V70、V90分别为50%、70%、90%乙醇洗脱的三叶青原花青素纯化物。同行数据后小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

度达到 97.31%±0.96%, 约为粗提取物的 2.2 倍, 在所有样品中最高($P<0.05$)。50% 和 90% 体积分数乙醇溶解杂质的能力强于 70% 的乙醇, 造成 V50 和 V90 纯化物中含有一定量的杂质, 纯度分别为 82.43%±0.67% 和 87.04%±1.03%, 表明 70% 体积分数酒精较适宜洗脱, 并提高了对 DPPH 自由基、ABTS⁺自由基及 α-葡萄糖苷酶的清除能力。其中 V70 对 DPPH 自由基、ABTS⁺自由基清除率的 IC₅₀ 分别为 71.59 与 37.97 μg/mL, 显著低于其他试验组及阳性对照组($P<0.05$)。

2.5.1 DPPH 自由基清除活性 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)是一种稳定的自由基, 分子结构简单, 已大量用于天然产物体外抗氧化活性评价^[30]。本文主要研究三叶青原花青素不同质量浓度下对 DPPH 自由基的清除活性, 以此评价 AB-8 型树脂的纯化工工艺效果。图 3 可知, 在 0~100 μg/mL 的质量浓度区间内, 随样品浓度增加, DPPH 抗氧化活性增强, 呈浓度依赖性($P<0.05$)。当浓度大于 100 μg/mL 时, DPPH 自由基清除能力逐渐趋于平缓($P>0.05$)。相同浓度条件下, 对 DPPH 自由基的清除活性依次为: V70>V50>V90>L-抗坏血酸>CE, V50 与 V90 相近, V70 抗氧化活性约为 L-抗坏血酸的 1.37 倍, 约为 CE 的 1.27 倍, 由 2.5 节可知 V70 样品中的原花青素纯度约为粗提取物的 2.2 倍, 表明经 AB-8 大孔吸附树脂纯化再经 70% 乙醇洗脱后的三叶青原花青素, 抗氧化活性得到进一步提升, 也再次印证了 70% 体积分数乙醇较适宜洗脱。据文献报道, 经 AB-8 树脂纯化的黑果枸杞、白刺果中的原花青素抗氧化活性明显强于 L-抗坏血酸^[31-32], 经 X-5 大孔树

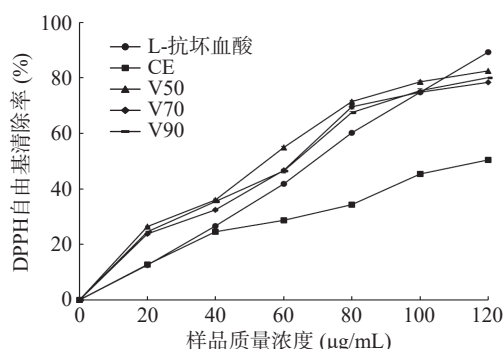
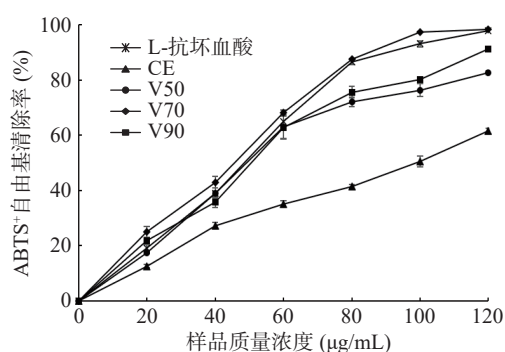


图 3 不同质量浓度样品对 DPPH 自由基的清除率

Fig.3 DPPH radicals scavenging rate of samples with different concentrations

脂纯化得到的鸡血藤、蒙密花原花青素抗氧化活性明显强于 L-抗坏血酸^[23,28]。综上, 采用 AB-8 型树脂纯化的三叶青原花青素(OPC)抗氧化活性与上述文献报道基本一致, 较纯化前抗氧化活性显著增强。

2.5.2 ABTS⁺自由基清除活性 ABTS⁺自由基脱色试验是一种用于评价生物样品抗氧化活性的常用方法, 具有操作便捷且良好的重复性等优点。由图 4 可知, L-抗坏血酸、原花青素粗提物、V50、V70、V90 对 ABTS⁺自由基都有明显的清除作用, 经纯化与洗脱后, 原花青素的抗氧化能力得到明显的提高。随着样品质量浓度的增加, ABTS⁺自由基的清除率也逐渐的增加($P<0.05$), 当样品质量浓度高于 100 μg/mL, ABTS⁺自由基清除率逐渐接近于 100%($P<0.05$)。这与 DPPH 自由基清除率的变化趋势一致, 说明原花青素浓度越大, 抗氧化能力越强。同一浓度条件下, V70 对 ABTS⁺自由基的清除活性最高($P<0.05$), 比 L-抗坏血酸的效果略好, 比原花青素粗提物、V50 与 V90 作用效果具有显著的差异($P<0.05$); 而 V50 与 V90 作用效果较为接近。但在相同浓度条件下, 原花青素对 ABTS⁺自由基清除率整体上比其对 DPPH 自由基的清除率高, 两者清除率相差明显, 说明三叶青原花青素能够更好地清除 ABTS⁺自由基。

图 4 不同质量浓度样品对 ABTS⁺自由基的清除率Fig.4 ABTS⁺ radicals scavenging rate of samples with different concentrations

2.5.3 α-葡萄糖苷酶(α-Glucosidase)抑制活性 临床上常见的 α-葡萄糖苷酶抑制剂阿卡波糖对 α-葡萄糖苷酶具有很强的抑制作用, 降低多糖分解为葡萄糖的速率, 延缓碳水化合物的消化和吸收, 减低餐后血糖水平, 减少糖尿病并发症的发生, 是少数可干预糖耐量受损的口服降糖药之一^[33]。法国海岸松(*Pinus pinaster*)树皮中碧萝芷低聚原花青素、鸡血藤中的

表 4 三叶青原花青素纯度与抗氧化指标的相关性

Table 4 Correlation between the purity of the *T. hemsleyanum* Gilg proanthocyanidins and antioxidative activities

抗氧化指标	原花青素纯度	DPPH 自由基的清除活性	ABTS ⁺ 自由基的清除活性	α -葡萄糖苷酶抑制活性
DPPH 自由基的清除活性	0.881**	1		
ABTS ⁺ 自由基的清除活性	0.865**	0.945**	1	
α -葡萄糖苷酶抑制活性	0.718**	0.958**	0.926**	1

注: ** 表示在 0.01 水平上呈极显著相关, * 表示在 0.05 水平上呈显著相关。

原花青素可有效抑制 α -葡萄糖苷酶^[23,34]。因此,研究不同质量浓度下,不同纯度三叶青原花青素对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性。由图 5 可知,随着三叶青原花青素质量浓度不断增加,对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性不断增强($P<0.05$)。V70 在 12 $\mu\text{g/mL}$ 时抑制率最高,达到了 89.05%;从图 6 中可以看出阿卡波糖(阳性对照)对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性也是随质量浓度增加而增强,在 2800 $\mu\text{g/mL}$ 时达到最大抑制率为 83.76%,因此,三叶青原花青素及三叶青粗提物对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性均高于阿卡波糖。

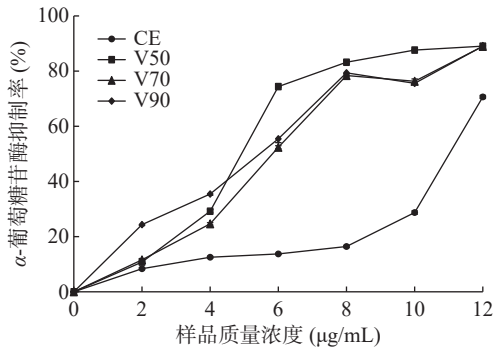


图 5 不同质量浓度样品对 α -葡萄糖苷酶的抑制率

Fig.5 α -glucosidase inhibitory rate of samples with different concentrations

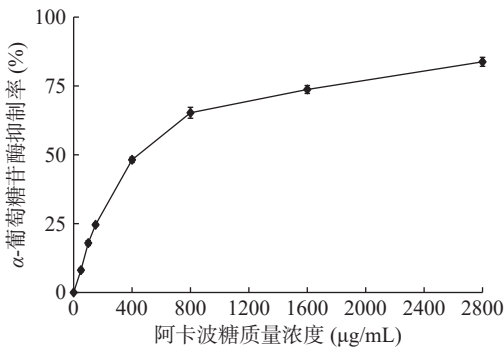


图 6 不同质量浓度阿卡波糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制率

Fig.6 α -Glucosidase inhibitory rate of acarbose with different concentrations

不同质量浓度样品对 α -葡萄糖苷酶半抑制浓度(IC_{50})评价对 α -葡萄糖苷酶抑制活性结果如表 3 所示:阿卡波糖的 IC_{50} (阳性对照)为: 572.01 $\mu\text{g/mL}$ 、V50 的 IC_{50} 为: 4.64 $\mu\text{g/mL}$ 、V70 的 IC_{50} 为: 3.84 $\mu\text{g/mL}$ 、V90 的 IC_{50} 为: 5.56 $\mu\text{g/mL}$, 抑制活性的顺序依次为: V70>V50>V90>CE, 其中, 三叶青粗提物(CE)的抑制活性为对照组的 41.57 倍;而纯化后的样品 V70 与对照相比, 抑制活性提高了 148.96 倍。通过

上述结果,可以明确说明三叶青粗提物自身对 α -葡萄糖苷酶的 IC_{50} 抑制活性较强,而通过 AB-8 树脂纯化后,抑制活性提升为粗提物 3 倍以上。

2.6 抗氧化活性与 α -葡萄糖苷酶抑制活性之间的相关性

不同纯度的三叶青原花青素与 DPPH 自由基的清除活性、ABTS⁺自由基的清除活性及 α -葡萄糖苷酶抑制活性之间的相关性分析表明(表 4):三叶青原花青素的纯度与 DPPH 自由基清除活性、ABTS⁺自由基的清除活性及 α -葡萄糖苷酶抑制活性均具有极显著正相关性($P<0.01$),各活性指标间也具有极显著正相关性($P<0.01$),表明三叶青原花青素对其抗氧化活性有明显作用,与上述结果一致。

3 结论

选用了 D-101、X-5、AB-8、HPD-100、HPD-300 共 5 种不同极性的大孔吸附树脂纯化三叶青原花青素。纯化工艺的最优条件为:选用 AB-8 型树脂用于三叶青原花青素纯化,上样质量浓度为 6.00 mg/mL ,上样流速 2 BV/h 、上样体积 11 BV ,洗脱流速 1.5 BV/h ,洗脱剂用量 2 BV ,70% 乙醇体积分数进行洗脱。在此条件下,三叶青中原花青素含量由 44.77% 上升到 97.31%。

对三叶青原花青素纯化前后的 DPPH 和 ABTS⁺ 自由基清除活性以及 α -葡萄糖苷酶抑制能力进行了考察。结果表明:三叶青粗提物经 70% 乙醇纯化后的原花青素(V70)纯度最高,约为粗提取物的 2.2 倍。V70 对 DPPH 自由基、ABTS 自由基清除率的 IC_{50} 分别为 71.59 $\mu\text{g/mL}$ 与 37.97 $\mu\text{g/mL}$,显著低于其他试验组及阳性对照组($P<0.05$),V70 对 α -葡萄糖苷酶的 IC_{50} 为 3.84 $\mu\text{g/mL}$,与对照相比,抑制活性提高了 148.96 倍。通过相关性分析发现,原花青素纯度与自由基清除率及 α -葡萄糖苷酶抑制活性呈显著正相关,更加印证了三叶青中的原花青素具有抗氧化活性以及 α -葡萄糖苷酶抑制活性。但原花青素是否为三叶青抗氧化及抑制 α -葡萄糖苷酶的主要活性成分需进一步研究。本研究可为三叶青原花青素开发药品、功能性食品、食品添加剂等相关领域提供理论研究基础,促进三叶青资源的可持续开发利用。

参考文献

[1] 范世明,徐惠龙,谢心月,等. 三叶青指纹图谱研究及 8 种酚类成分含量测定[J]. 中国中药杂志,2016,41(21): 3975-3981.
[FAN S M, XU H L, XIE X Y, et al. Study on UHPLC fingerprint

- and determination of eight phenolic components of *Tetragium hemsleyanum* leaves[J]. Chinese Journal of Chinese Materia Medica, 2016, 41(21): 3975–3981.]
- [2] 王满生, 杨晶, 王延周. 莲房原花青素提取纯化及其抗氧化活性研究进展[J]. 食品科技, 2020, 45(8): 174–179. [WANG M S, YANG J, WANG Y Z. Research progress on extraction, purification and antioxidant activities of lotus seedpod procyanidins[J]. Food Science and Technology, 2020, 45(8): 174–179.]
- [3] DOWNING L E, FERGUSON B S, RODRIGUEZ K, et al. A grape seed procyanidin extract inhibits HDAC activity leading to increased Ppara phosphorylation and target-gene expression[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2017, 61(2): 1600347.
- [4] 郝小燕, 牟春堂, 乔栋, 等. 葡萄籽原花青素对羔羊瘤胃发酵、血清炎症及抗氧化指标的影响[J]. 中国农业科学, 2021, 54(10): 2239–2248. [HAO X Y, MU C T, QIAO D, et al. Effects of high-concentrate diet supplemented with grape seed proanthocyanidins on rumen fermentation, inflammatory and antioxidant indicators of rumen and serum in lambs[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2021, 54(10): 2239–2248.]
- [5] VALLS R M, LLAURADÓ E, FERNÁNDEZ-CASTILLEJO S, et al. Effects of low molecular weight procyanidin rich extract from french maritime pine bark on cardiovascular disease risk factors in stage-I hypertensive subjects: Randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled intervention trial[J]. Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology, 2016, 23(12): 1451–1461.
- [6] RONG S, HU X, ZHAO S, et al. Procyanidins extracted from the litchi pericarp ameliorate atherosclerosis in ApoE knockout mice: their effects on nitric oxide bioavailability and oxidative stress[J]. Food & Function, 2017, 8(11): 4210–4216.
- [7] 谢海, 战同霞, 钟明强. 原花青素对老年痴呆患者脑功能的影响[J]. 中国误诊学杂志, 2008, 8(24): 5866–5867. [XIE H, ZHAN T X, ZHONG M Q. The effect of proanthocyanidins on brain function of patients with senile dementia[J]. Chinese Journal of Misdiagnosis, 2008, 8(24): 5866–5867.]
- [8] HELLSTROM J K, TORRONEN A R, MATTILA P H. Proanthocyanidins in common food products of plant origin[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2009, 57(17): 7899–7906.
- [9] 张朝, 唐志书, 刘红波. 沙棘原花青素的提取、纯化及药理学研究进展[J]. 中南药学, 2017, 15(7): 943–946. [ZHANG Z, TANG Z S, LIU H B. Extraction, purification and pharmacology progress of proanthocyanidins from *Hippophae rhamnoides* Linn[J]. Central South Pharmacy, 2017, 15(7): 943–946.]
- [10] ZHANG B B, YANG H F, CHEN M S, et al. Microwave and enzyme-assisted extraction of grape seed procyanidins and study of their antibacterial activity[J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(8): 146–154.
- [11] ZHOU H C, TAN N F, LIN Y M, et al. Relationships between degree of polymerization and antioxidant activities: A Study on proanthocyanidins from the leaves of a medicinal mangrove plant *Ceriops tagal*[J]. PLoS One, 2014, 9(10): e107606.
- [12] BODOIRA R, ROSSI Y, MONTENEGRO M, et al. Extraction of antioxidant polyphenolic compounds from peanut skin using water-ethanol at high pressure and temperature conditions[J]. Journal of Supercritical Fluids, 2017: 57–65.
- [13] Cyboran-Mikołajczyk S, Csonka Ákos, Molnar J, et al. In vitro studies of anti-hemolytic and cytotoxic activity of procyanidin-rich extract from the leaves of *Actinidia arguta*[J]. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 2017, 68(2): 171–177.
- [14] LIU D D, CAO G, HAN L K, et al. Flavonoids from *Radix Tetragimae* inhibit TLR4/MD-2 mediated JNK and NF-kappaB pathway with anti-inflammatory properties[J]. Cytokine, 2016, 84: 29–36.
- [15] SUN Y, LI H Y, HU J, et al. Qualitative and quantitative analysis of phenolics in *Tetragium hemsleyanum* and their antioxidant and antiproliferative activities[J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 2013, 61(44): 10507–10515.
- [16] 许文, 傅志勤, 林婧, 等. HPLC-Q-TOF-MS 和 UPLC-QqQ-MS 的三叶青主要成分定性及定量研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(22): 4365. [XU W, BO Z Q, LIN J, et al. Qualitative and quantitative analysis of major constituents in *Tetragium hemsleyanum* by HPLC-Q-TOF-MS and UPLC-QqQ-MS[J]. Chinese Journal of Chinese Materia Medica, 2014, 39(22): 4365.]
- [17] 李鑫, 刘景玲, 李彦, 等. 三叶青原花青素结构分析[J]. 食品科学, 2018, 39(16): 247–255. [LI X, LIU J L, LI Y, et al. Structural analysis of proanthocyanidins from *Tetragium hemsleyanum* Diels et Gilg[J]. Food Science, 2018, 39(16): 247–255.]
- [18] 赵文娟, 宋扬, 杨洪江. 大孔吸附树脂纯化黑果枸杞中的原花青素[J]. 食品工业科技, 2017, 38(22): 189–194. [ZHAO W J, SONG Y, YANG H J. Purification of the proanthocyanidins from *Lycium ruthenicum* Murr. by macroporous resin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(22): 189–194.]
- [19] 褚仕超, 张宏, 邓莉, 等. 蚕豆皮原花青素纯化工艺优化[J]. 食品科技, 2013, 38(9): 174–178, 184. [CHU S C, ZHANG H, DENG L, et al. Optimization purification of proanthocyanidins from Faba bean episperm[J]. Food Science and Technology, 2013, 38(9): 174–178, 184.]
- [20] 滕飞, 李丽, 皮子凤. 黑果腺肋花楸原花青素分离纯化工艺研究[J]. 长春师范大学学报, 2019, 38(4): 67–72. [TENG F, LI L, PI Z F. Study on extraction process and purification conditions of proanthocyanidins from *Aronia melanocarpa* Elliot[J]. Journal of Changchun Normal University, 2019, 38(4): 67–72.]
- [21] 何志贵, 聂相珍, 惠小涵, 等. 超声波辅助法提取三叶青原花青素工艺的研究[J]. 西北林学院学报, 2019, 34(3): 207–211. [HE Z G, NIE X Z, HUI X H, et al. Ultrasonic-assisted extraction of proanthocyanidins from *Tetragium hemsleyanum*[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2019, 34(3): 207–211.]
- [22] DONG Y, ZHAO M, SUN-WATERHOUSE D, et al. Absorption and desorption behaviour of the flavonoids from *Glycyrrhiza glabra* L. leaf on macroporous adsorption resins[J]. Food Chemistry, 2015, 168: 538–545.
- [23] 李彦, 李鑫, 刘景玲, 等. 鸡血藤原花青素的纯化及活性评价[J]. 食品科学, 2016, 37(17): 45–51. [LI Y, LI X, LIU J L, et al. Purification and bioactivity evaluation of proanthocyanidins from *Spatholobi Caulis*[J]. Food Science, 2016, 37(17): 45–51.]
- [24] LÓPEZ-ANGULO G, MONTES-AVILA J, SÁNCHEZ-

- XIMELLO L, et al. Anthocyanins of *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth. fruit associated with high antioxidant and α -glucosidase inhibitory activities[J]. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2018(73): 308–313.
- [25] 赵平, 张月萍, 任鹏. AB-8 大孔树脂对葡萄籽原花青素的吸附过程[J]. *化工学报*, 2013, 64(3): 980–985. [ZHAO P, ZHANG Y P, REN P. Adsorption process of proanthocyanidins in AB-8 macroporous resin[J]. *CIESC Journal*, 2013, 64(3): 980–985.]
- [26] 马小琴, 王晓敏, 周凡. 大孔吸附树脂法分离纯化葡萄籽中原花青素[J]. *食品研究与开发*, 2017, 38(16): 54–57. [MA X Q, WANG X M, ZHOU F. Separation and purification of procyanidins in grape seed with macroporous adsorption resin[J]. *Food Research and Development*, 2017, 38(16): 54–57.]
- [27] 蒋德旗, 李慧斌, 蓝雪叶, 等. AB-8 树脂吸附分离苹果原花青素的研究[J]. *饲料工业*, 2014, 35(3): 18–20. [JIANG D Q, LI H B, LAN X Y, et al. Study on the adsorption and separation of procyanidins from apple with macroporous resin AB-8[J]. *Feed Industry*, 2014, 35(3): 18–20.]
- [28] 刘景玲, 李匡元, 陈惜燕, 等. 密蒙花黄酮的纯化及抗氧化活性研究[J]. *食品研究与开发*, 2018, 39(7): 52–59. [LIU J L, LI K Y, CHEN X Y, et al. Purification and antioxidant ability evaluation of flavonoids from *Buddleia flos*[J]. *Food Research and Development*, 2018, 39(7): 52–59.]
- [29] 杨志娟, 曾真, 吴晓萍. 火龙果皮原花青素提取纯化及定性分析[J]. *食品科学*, 2015(2): 75–79. [YANG Z J, ZENG Z, WU X P. Extraction, purification and qualitative analysis of proanthocyanidins from pitaya peel[J]. *Food Science*, 2015(2): 75–79.]
- [30] 熊双丽, 卢飞, 史敏娟, 等. DPPH 自由基清除活性评价方法在抗氧化剂筛选中的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(8): 380–383. [XIONG S L, LU F, SHI M J, et al. Advancement of evaluation methods about DPPH radical scavenging activity in screening antioxidant[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 33(8): 380–383.]
- [31] 李三省, 许丹丹, 张富粟, 等. AB-8 大孔树脂纯化黑果枸杞原花青素及其稳定性研究[J]. *中国食品添加剂*, 2018(3): 106–114. [LI S X, X D D, ZHANG F L, et al. Purification of proanthocyanidins from *Lycium ruthenicum* Murr. by AB-8 macroporous resin and its stability[J]. *China Food Additives*, 2018(3): 106–114.]
- [32] 浦娜娜. 白刺果原花青素的提取、纯化及抗氧化活性研究[D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2019. [PU N N. Study of Extraction, purification and antioxidant activity of proanthocyanidins from *Nitraria*[D]. Jinan: Qilu University of Technology, 2019.]
- [33] DONG H Q, LI M, ZHU F, et al. Inhibitory potential of trilobatin from *Lithocarpus polystachyus* Rehd against α -glucosidase and α -amylase linked to type 2 diabetes[J]. *Food Chemistry*, 2012, 130(2): 261–266.
- [34] SCHFER A, HGGER P. Oligomeric procyanidins of French maritime pine bark extract (Pycnogenol) effectively inhibit α -glucosidase[J]. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2007, 77(1): 41–46.