

苦丁茶总黄酮纯化工艺及其黄嘌呤氧化酶抑制活性研究

谭颂严, 杨志伟*

(广西大学轻工与食品工程学院, 广西南宁 530004)

摘要: 以 D101 大孔树脂对苦丁茶粗提物中的总黄酮进行分离纯化, 确定最佳纯化工艺条件, 测定纯化前后的样品总黄酮的纯度, 并检测纯化前后样品对黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XOD)的体外抑制活性。通过单因素试验得到最佳优化工艺条件为上样液 pH 值为 3、洗脱液乙醇浓度 70%、上样液浓度 3.0 mg/mL、上样液流速 2.0 mL/min、洗脱液流速 2.0 mL/min、上样量 55 mL、洗脱液体积 40 mL。纯化后样品纯度由 75.53% 提高至 94.40%, 对 XOD 的 IC_{50} 分别为 $(228.22 \pm 1.07) \mu\text{g/mL}$ 和 $(135.74 \pm 1.02) \mu\text{g/mL}$ 。

关键词: 苦丁茶总黄酮; 大孔树脂; 纯化工艺; 黄嘌呤氧化酶; 抑制活性

Study on Purification Technology of Total Flavonoids from Kudingcha and Their Inhibitory Activity on Xanthine Oxidase

TAN Song-yan, YANG Zhi-wei*

(College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, Guangxi, China)

Abstract: In this study, the total flavonoids in Kudingcha crude extract were separated and purified using D101 macroporous resin. The optimum purification conditions were elucidated, the purity of the total flavonoids before and after purification was determined, and the *in vitro* inhibitory activity of the samples on xanthine oxidase (XOD) was detected. The optimum process conditions were determined using Harman's single factor test, and the results were as follows: sample pH value 3; eluent 70% ethanol solution; concentration of sample solution 3.0 mg/mL; flow rate of sample solution 2.0 mL/min; flow rate of eluent 2.0 mL/min; sample volume 55 mL; and eluent volume 40 mL. Following purification, the purity of the sample was increased from 75.53% to 94.40%. The IC_{50} values for XOD inhibition were $(228.22 \pm 1.07) \mu\text{g/mL}$ before purification and $(135.74 \pm 1.02) \mu\text{g/mL}$ after purification, respectively.

Key words: flavonoids of kudingcha; macroporous resin; purification process; xanthine oxidase; inhibitory activity

引文格式:

谭颂严, 杨志伟. 苦丁茶总黄酮纯化工艺及其黄嘌呤氧化酶抑制活性研究[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(9): 124-131.

TAN Songyan, YANG Zhiwei. Study on Purification Technology of Total Flavonoids from Kudingcha and Their Inhibitory Activity on Xanthine Oxidase[J]. Food Research and Development, 2022, 43(9): 124-131.

苦丁茶(*Ilex Kudingcha* C.J.Tseng)是冬青科冬青属苦丁茶种常绿乔木, 主要分布于我国华南、西南地区。苦丁茶是一种传统药用植物, 具有清热解暑、活血

化痰、清肝明目等功效^[1]。现代科学研究的结果表明, 苦丁茶中含有多酚类、黄酮类、三萜类、挥发油、多糖类等多种化合物^[2]。其中黄酮类化合物苦丁茶中含量较

基金项目: 广西农业科技创新联盟“农产品精深加工产业科技先锋队”

作者简介: 谭颂严(1995—), 女(毛南), 在读硕士研究生, 研究方向: 食品科学。

* 通信作者: 杨志伟(1973—), 男(侗), 副教授, 博士, 研究方向: 食品工程。

高,是苦丁茶的主要生物活性成分之一,在大多数苦丁茶中发现存在槲皮素、芦丁、杨梅酮等多种黄酮类化合物^[3]。据报道,黄酮类化合物在抗肿瘤^[4]、抑菌^[5]、抗氧化^[6]、降尿酸^[7]等方面具有生物活性。黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase,XOD)是人体嘌呤代谢过程中的关键酶,主要功能为将次黄嘌呤催化氧化为黄嘌呤,再进一步氧化生成尿酸^[8]。人体主要通过两大途径获取尿酸:一是通过食物摄入尿酸;二是由XOD催化次黄嘌呤、黄嘌呤等底物生成尿酸。人体体液中尿酸含量过高可能导致高尿酸血症和痛风,在临床治疗方面,抑制XOD活性是治疗高尿酸血症和痛风的良好靶点,其原理为利用黄嘌呤氧化酶抑制剂可逆或不可逆地抑制XOD的活性,减少尿酸的生成进而达到治疗高尿酸血症和痛风的目的^[9]。目前临床常见的黄嘌呤氧化酶抑制剂类降尿酸药物包括别嘌醇、非布司他、托匹司他等,但具有不同程度、类型的毒副作用^[10],因此有必要寻找更高效、低毒副作用的黄嘌呤氧化酶抑制剂。

近年来,大量研究表明,多种黄酮类化合物具有抑制XOD活性、降低人体血尿酸含量的作用。郝悦等^[11]以黄嘌呤氧化酶抑制活性为指标,研究30种黄酮的降尿酸活性,其中木犀草素、槲皮素、芹菜素、山柰酚可明显抑制黄嘌呤氧化酶的活性,IC₅₀分别为42.02、120.22、135.98、184.36 μmol/L;李佳川等^[12]利用分子对接技术,将藤茶总黄酮中的主要活性成分与XOD进行分子对接,结果表明藤茶总黄酮主要活性成分中的二氢杨梅素、杨梅素、槲皮素和藤茶素对接得分较高,动物实验显示藤茶总黄酮能显著降低高尿酸血症模型小鼠血清中的XOD的活性和尿酸、肌酐、尿素氮的含量;Zhang等^[13]利用分子对接证实槲皮素与XOD的结合位点在XOD的黄素腺嘌呤二核苷酸(flavin adenine dinucleotide,FAD)结构域的异丙噁环上,使XOD的构象发生变化,进而影响酶的催化功能。

本试验对大孔树脂吸附苦丁茶总黄酮的纯化工艺进行研究,并采用紫外分光光度法检测纯化前后样品的XOD体外抑制活性,探究苦丁茶总黄酮抑制XOD的活性能力,为进一步开发苦丁茶中的黄酮类化合物,解析苦丁茶总黄酮抑制XOD活性的机理提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

苦丁茶:市售;芦丁标准品(纯度≥98%)、黄嘌呤(纯度≥98%)、黄嘌呤氧化酶(10.9 U/mL):北京索莱宝科技有限公司;别嘌醇、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、无水乙醇、浓盐酸、氢氧化钠、亚硝酸钠、硝酸铝、二甲基亚

砷(均为分析纯):上海源叶生物科技有限公司;D101型大孔树脂:江苏常州市长丰化工有限公司;96孔酶标板:无锡耐思生命科技股份有限公司。

1.2 主要仪器与设备

KQ-600DA型超声波清洗器:昆山市超声仪器有限公司;722N可见分光光度计:上海仪器分析仪器有限公司;AL204分析天平:梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;PHSJ-4F型pH计:上海雷磁仪器有限公司;Max Plus 384酶标仪:美国Molecular Devices公司;RE-2000旋转蒸发器:上海亚荣生化仪器厂;SCIENTZ-10N型冷冻干燥机:宁波新芝生物科技股份有限公司;DHG-9240A恒温鼓风干燥箱:上海精宏实验设备有限公司;SHA-B恒温水浴振荡器:常州金坛良友仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 苦丁茶中黄酮的提取

苦丁茶粉碎后过80目筛,低温烘干;精密称取一定量烘干后的苦丁茶粉进行超声波辅助提取,条件为超声功率600 W、料液比1:50(g/mL)、乙醇浓度50%、时间40 min、温度60℃。提取结束后,过滤,取滤液在50℃旋转蒸发挥发乙醇,于冷冻干燥机中冻干得到苦丁茶粗提物。

1.3.2 芦丁标准曲线的绘制

芦丁标准曲线的绘制参考万聆^[14]的方法,并稍加修改。芦丁标准品试验前于105℃烘箱中干燥至恒重,精确称取芦丁标准品10 mg,用70%乙醇定容于10 mL容量瓶中,得到1.0 mg/mL的芦丁标准溶液。分别取0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL芦丁标准溶液于6支10 mL具刻度试管中,加入3 mL 70%乙醇,加入1 mL 5%的NaNO₂溶液,摇匀,避光静置6 min后加入1 mL 10%的Al(NO₃)₃溶液,摇匀,避光静置6 min后加入4 mL 4% NaOH溶液,用70%乙醇定容至10 mL,摇匀,即得到浓度分别为0、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10 mg/mL的芦丁标准品稀释液,避光静置15 min后在510 nm处测定吸光度。以芦丁标准溶液的浓度为横坐标,以各浓度芦丁标准溶液的吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,得到标准曲线方程 $y=10.6919x+0.0012$ (R²=0.9995)。

1.3.3 样品中黄酮纯度的测定

称取10 mg冻干制备的样品,用70%乙醇定容于10 mL容量瓶中,得到样品溶液,取1 mL样品溶液于10 mL容量瓶中,按1.3.2中的方法处理后于510 nm处检测吸光度,根据回归方程计算样品溶液中的总黄酮浓度,再计算得到样品中总黄酮的纯度。计算公式如下^[15]。

$$\text{纯度}/\% = \frac{C \times V \times N}{m} \times 100$$

式中: C 为溶液中总黄酮浓度,mg/mL; V 为所取样品溶液的体积,mL; N 为稀释倍数; m 为样品质量,mg。

1.3.4 大孔树脂的预处理

D101大孔树脂经3倍体积的95%乙醇浸泡溶胀24 h,再用95%乙醇冲洗抽滤,至滤液中加入蒸馏水不产生浑浊为止,用蒸馏水冲洗至无醇味备用,预处理后的大孔树脂储存在95%乙醇溶液中,使用前用蒸馏水冲洗至无醇味即可^[6]。

1.3.5 大孔树脂静态吸附曲线和静态解吸曲线的绘制

称取2 g预处理后的大孔树脂于具塞锥形瓶中,加入50 mL一定浓度的苦丁茶粗提物溶液,置于转速120 r/min的恒温水浴振荡器中,每隔一段时间取1 mL苦丁茶粗提物溶液,测定其总黄酮浓度,直到锥形瓶中溶液的黄酮浓度趋于稳定。根据测得的数据,以时间为横坐标,以吸附率为纵坐标,绘制静态吸附曲线。

将上述吸附饱和的大孔树脂水洗、晾干,置于具塞锥形瓶中,加入50 mL 70%乙醇,置于转速120 r/min的恒温水浴振荡器中,每隔一段时间取1 mL乙醇溶液测定其总黄酮浓度,至剩余溶液中的总黄酮浓度趋于稳定。根据测得的数据,以时间为横坐标,以解吸率为纵坐标,绘制静态解吸曲线。公式如下^[7]。

$$\text{吸附率}/\% = \frac{C_0V_0 - C_1V_1}{C_0V_0} \times 100$$

$$\text{解吸率}/\% = \frac{C_2V_2}{C_0V_0 - C_1V_1} \times 100$$

式中: C_0 为吸附前上样液初始总黄酮浓度,mg/mL; C_1 为吸附后上样液总黄酮浓度,mg/mL; C_2 为解吸后样液总黄酮浓度,mg/mL; V_0 为吸附前上样液体积,mL; V_1 为吸附后上样液体积,mL; V_2 为解吸液体积,mL。

1.3.6 大孔树脂纯化工艺参数的确定

1.3.6.1 上样液 pH 值对大孔树脂吸附率的影响

称取2 g预处理后的大孔树脂若干份于具塞锥形瓶中,分别加入pH值为1、2、3、4、5的一定浓度的上样液50 mL,在恒温水浴振荡器中以转速120 r/min振荡24 h,到达吸附饱和,计算吸附率。每个pH值梯度重复3次平行试验。

1.3.6.2 洗脱液浓度对解吸率的影响

称取吸附饱和的2 g大孔树脂若干份于具塞锥形瓶中,分别加入浓度为50%、60%、70%、80%、90%乙醇洗脱液,在恒温水浴振荡器中以转速120 r/min振荡24 h进行解吸,计算解吸率。每个乙醇浓度梯度重复3次平行试验。

1.3.6.3 上样浓度对大孔树脂吸附率的影响

取预处理后大孔树脂湿法装入具阀色谱柱(2 cm×

30 cm)中,分别用质量浓度为2.5、3.0、3.5、4.0、4.5 mg/mL的上样液经过层析柱,流速为2.0 mL/min,pH值为3,计算吸附率。

1.3.6.4 上样流速对大孔树脂吸附率的影响

取预处理后大孔树脂湿法装入具阀色谱柱(2 cm×30 cm)中,分别以流速1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL/min使上样液经过层析柱,上样液质量浓度为3.0 mg/mL,pH值为3,计算吸附率。

1.3.6.5 洗脱液流速对解吸率的影响

取吸附饱和的大孔树脂湿法装柱,70%乙醇溶液分别以流速1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL/min经过层析柱,至流出的洗脱液无色为止,收集洗脱液,计算解吸率。

1.3.6.6 大孔树脂动态吸附曲线的绘制

称取预处理后的D101树脂5 g,湿法装柱,将苦丁茶粗提物配制为质量浓度3.0 mg/mL上样液,以流速2.0 mL/min流过层析柱,每5 mL收集1管流出液,测定其总黄酮浓度,共收集16管。以管数为横坐标,总黄酮浓度为纵坐标绘制大孔树脂动态吸附曲线。当流出液中总黄酮浓度为上样液初始浓度的10%时,达到大孔树脂的泄漏点^[8],此时的上样体积为最佳上样体积。

1.3.6.7 大孔树脂动态洗脱曲线的绘制

上样结束后,先用80 mL蒸馏水水洗杂质,再用70%乙醇,以流速2.0 mL/min进行洗脱,每5 mL收集1管洗脱液,测定其总黄酮浓度,共收集16管。以管数为横坐标,总黄酮浓度为纵坐标,绘制动态洗脱曲线,确定最佳洗脱液体积。

1.3.7 苦丁茶黄酮纯度的测定

在最佳工艺条件下,对苦丁茶粗提物进行纯化,收集乙醇溶液洗脱后的洗脱液于旋转蒸发仪中旋蒸至无醇味,再经过冷冻干燥得到粉末状物质。根据1.3.3公式计算纯化前后样品的纯度。

1.3.8 XOD 体外活性抑制试验

1.3.8.1 溶液和供试品配制

供试品和溶液配制的方法参照Nguyen等^[9]的方法,并稍作修改。磷酸缓冲溶液(phosphate buffer solution,PBS):称取71.6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,蒸馏水定容至1 000 mL,得到A液;称取31.2 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,蒸馏水定容至1 000 mL,得到B液。量取A液81 mL,B液19 mL,混合摇匀,即得到0.2 mol/L、pH 7.4的PBS。黄嘌呤(xanthine,XA)底物溶液:精密称取黄嘌呤6.1 mg,用1 mL 1 mol/L氢氧化钠溶液助溶,以PBS定容至100 mL,得到0.4 mmol/L黄嘌呤溶液。XOD溶液:取XOD(10.9 U/mL)用PBS稀释为0.05 U/mL工作液。XA和XOD溶液均应现配现用。

苦丁茶粗提物和纯化后的总黄酮溶液:称取适量苦丁茶粗提物和纯化后的总黄酮样品,用二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide,DMSO)溶解配制成100 mg/mL的储备液,试验时用PBS将储备液稀释为不同浓度的供试品溶液,苦丁茶粗提物溶液在反应体系中的终浓度分别为125、150、175、200、225、250、275 $\mu\text{g/mL}$,纯化后的总黄酮溶液的终浓度分别为75、100、125、150、175、200、225 $\mu\text{g/mL}$,反应体系中DMSO含量<5%(体积比)。

别嘌呤溶液:精密称取别嘌呤10 mg,用PBS于100 mL容量瓶中定容,得到0.1 mg/mL别嘌呤溶液,使用时用PBS稀释为所需浓度,现配现用。

1.3.8.2 黄嘌呤氧化酶体外活性抑制试验

黄嘌呤氧化酶体外活性检测方法参考燕晓婷等^[20]、Zhang等^[21]的方法,并加以修改。方法为试验在96孔酶标板中进行,向酶标板中加入50 μL 供试品和别嘌呤溶液,分别为试验组和对照组;加入50 μL PBS,为空白组。分别向各组加入50 μL XOD溶液,在酶标仪中于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温孵育3 min,分别向各组加入100 μL XA溶液,启动反应,体系总体积为200 μL 。在波长290 nm处测定吸光度A,每10 s读取一次,记录3 min内吸光度的变化,每个浓度平行测定3次,计算XOD抑制率,公式如下。

$$\text{XOD 抑制率}/\% = \frac{[(dA/dt)_{\text{空白}} - (dA/dt)_{\text{样品}}]}{(dA/dt)_{\text{空白}}} \times 100$$

式中: dA 为反应起始和反应终止时的吸光度的差值; dt 为反应时间。

1.4 数据处理

所有试验数据均平行3次,数据表示为平均值 $\pm$ 标准差,试验数据采用Excel软件进行统计分析,使用GraphPad Prism 7.0软件进行分析并计算不同样品对XOD的 IC_{50} 。

2 结果与分析

2.1 大孔树脂静态吸附曲线和静态解吸曲线

2.1.1 大孔树脂静态吸附曲线

大孔树脂静态吸附曲线见图1。

由图1可知,在0.5 h~9.0 h内,大孔树脂对黄酮的吸附率随着吸附时间的延长而增长。吸附3 h时,吸附率达到(75.08 $\pm$ 0.37)% ,为饱和吸附率的91.31%,说明D101大孔树脂对苦丁茶总黄酮的吸附为快速平衡型,对苦丁茶总黄酮具有良好的吸附效果。吸附5 h后,静态吸附曲线随时间延长趋于平缓,此时大孔树脂基本吸附饱和,达到吸附平衡的状态。考虑时间成本问题,最佳静态吸附时间为3 h。

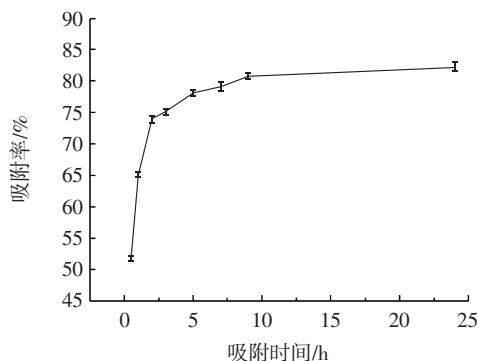


图1 大孔树脂静态吸附曲线

Fig.1 Static adsorption curve of macroporous resin

2.1.2 大孔树脂静态解吸曲线

大孔树脂静态解吸曲线见图2。

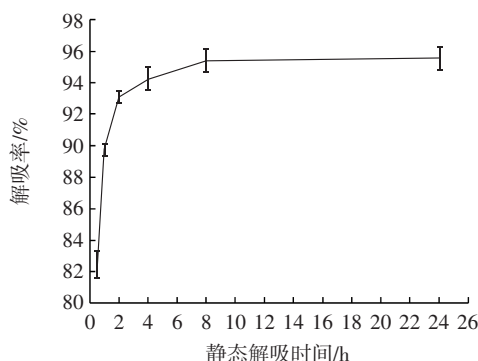


图2 大孔树脂静态解吸曲线

Fig.2 Static desorption curve of macroporous resin

由图2可知,大孔树脂在2 h内迅速解吸。解吸2 h时,解吸率为(89.78 $\pm$ 0.38)% ,达到最大解吸率的93.91%。解吸2 h后,随着解吸时间延长,大孔树脂静态解吸曲线趋于平缓。说明以70%乙醇为洗脱液时,D101大孔树脂对苦丁茶黄酮具有快速解吸作用,为节约时间成本,取2 h为最佳静态解吸时间。

2.2 大孔树脂纯化工艺参数

2.2.1 上样液 pH 值对吸附率的影响

上样液 pH 值对吸附率的影响见图3。

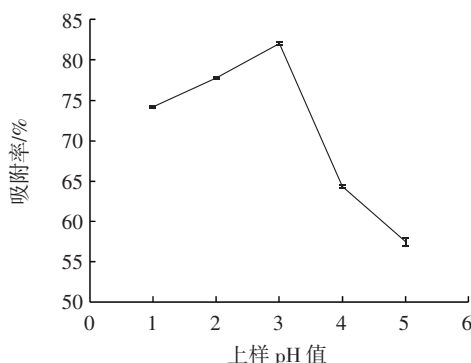


图3 上样 pH 值对吸附率的影响

Fig.3 Effect of loading pH on adsorption rate

由图3可知,当上样液pH值为3时吸附率达到最高,这是因为当pH值过低时,大量氢离子与溶液中的黄酮类化合物争夺大孔树脂上的吸附活性位点,导致吸附率降低;当pH值过高,黄酮类化合物游离出阴离子,与树脂的氢键作用减弱^[22],均会降低大孔树脂对黄酮类化合物的吸附率。因此选择在上样液pH值为3的条件下进行吸附。

2.2.2 洗脱液浓度对解吸率的影响

洗脱液浓度对解吸率的影响见图4。

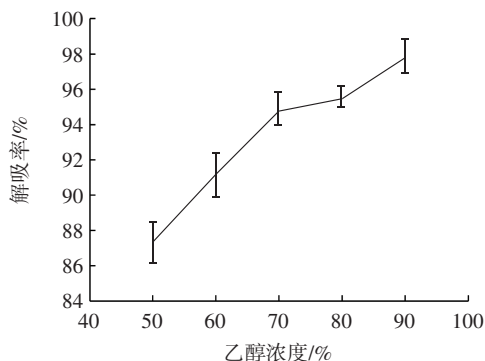


图4 洗脱液浓度对解吸率的影响

Fig.4 Effect of eluent solubility on resolution

由图4可知,当乙醇浓度在50%~90%时,解吸率随乙醇浓度的升高而升高;乙醇浓度为70%、80%、90%时,乙醇浓度的升高对解吸率的影响并不明显,这可能是因为一定浓度乙醇的极性条件下,苦丁茶总黄酮与大孔树脂结合的作用位点易被破坏^[23]。从节约成本、减少有机试剂使用的角度考虑,选择洗脱液乙醇浓度为70%进行解吸。

2.2.3 上样浓度对大孔树脂吸附率的影响

上样浓度对大孔树脂吸附率的影响见图5。

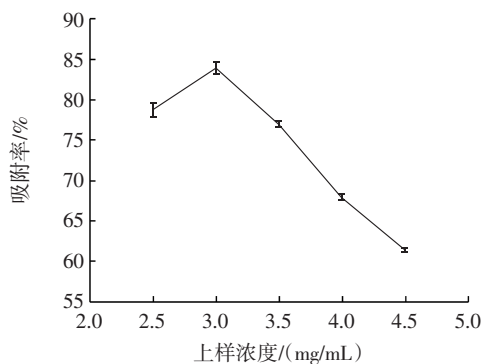


图5 上样浓度对吸附率的影响

Fig.5 Effect of loading concentration on adsorption rate

由图5可知,随着上样浓度的提高,大孔树脂吸附率呈先上升后下降的趋势。浓度为3.0 mg/mL时吸附率最高。继续提高浓度,吸附率逐渐下降。原因可能是

上样浓度提高的同时,溶液中分子的密集程度增大,更容易与大孔树脂接触并被吸附;浓度过高时,上样液中的总黄酮经过大孔树脂时不能充分被吸附,上样液所含杂质的浓度也随之提高,影响了上样液黄酮与大孔树脂充分接触,导致吸附率逐渐下降^[24]。因此确定最佳上样浓度为3.0 mg/mL。

2.2.4 上样流速对大孔树脂吸附率的影响

上样流速对大孔树脂吸附率的影响见图6。

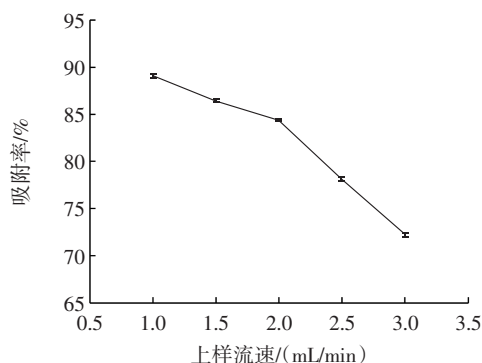


图6 上样流速对吸附率的影响

Fig.6 Effect of loading flow rate on adsorption rate

由图6可知,随着上样流速的增加,大孔树脂的吸附率逐渐下降。可能是因为在一定大孔树脂吸附速率有限的情况下,上样液流速越快,与大孔树脂接触的时间就越短,吸附率就越低;反之,上样液流速越慢,上样液流过大孔树脂所需时间越长,就能更充分地与大孔树脂接触,吸附率就越高。但上样液流速过低会导致耗时间过长,降低了生产效率,考虑到时间成本,选择2.0 mL/min为最佳上样流速。

2.2.5 洗脱液流速对解吸率的影响

洗脱液流速对解吸率的影响见图7。

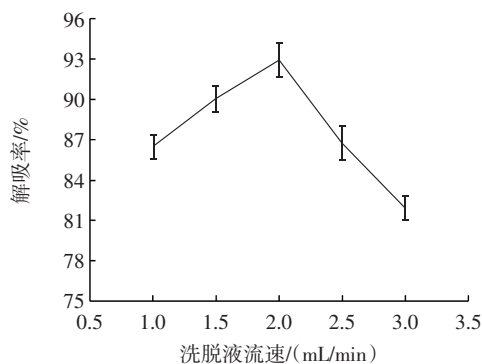


图7 洗脱液流速对解吸率的影响

Fig.7 Effect of eluent solubility on resolution

由图7可知,解吸率随洗脱液流速的增加呈先上升后下降的趋势。这可能是因为当流速太慢,吸附在大孔树脂内部的黄酮类物质无法被充分洗脱下来;当

流速太高,则导致吸附的黄酮未能充分地溶解在乙醇中被洗脱下来,因此影响了解吸率,综合考虑时间和解吸率的因素,选择 2.0 mL/min 为最佳洗脱液流速进行解吸。

2.2.6 动态吸附曲线

动态吸附曲线见图 8。

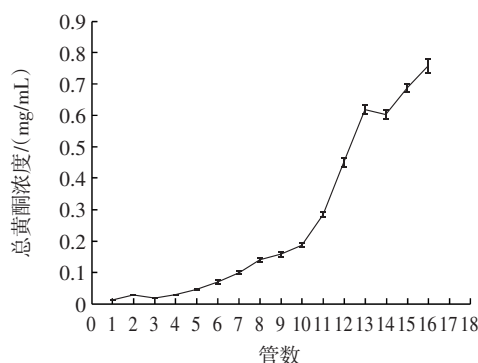


图 8 大孔树脂动态吸附曲线

Fig.8 Dynamic adsorption curve of macroporous resin

由图 8 可知,随着上样量的增加,流出液中的黄酮浓度也随之提高,上样体积由 0~50 mL 时,流出液中的黄酮浓度缓慢增加;上样体积超过 50 mL 时,流出液中的黄酮浓度开始迅速提高;上样体积为 55 mL 时,流出液黄酮浓度为 (0.28 ± 0.01) mg/mL,接近上样液浓度(3 mg/mL)的 10%,认为 55 mL 是动态吸附的泄漏点,当上样体积高于 55 mL 时吸附的黄酮大量泄漏,损失较大,因此选择上样体积为 55 mL。

2.2.7 动态解吸曲线

动态解吸曲线见图 9。

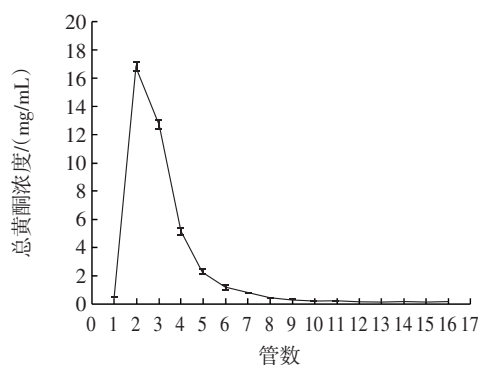


图 9 大孔树脂动态解吸曲线

Fig.9 Dynamic desorption curve macroporous resin

由图 9 可知,70%乙醇洗脱液以流速 2.0 mL/min 通过吸附饱和的大孔树脂,可以迅速将大孔树脂中吸附的黄酮洗脱下来,在 70%乙醇洗脱液通过 10 mL 时达到高峰,通过 40 mL 后大孔树脂中吸附的黄酮基本被洗脱下来,洗脱曲线出峰快,洗脱峰集中,无明显的

拖尾现象,因此认为 40 mL 为最佳的洗脱液体积。

2.3 苦丁茶总黄酮纯度的测定

苦丁茶总黄酮粗提物中,总黄酮纯度为 $(75.53 \pm 0.86)\%$,相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 1.135%;苦丁茶粗提物经上述最佳纯化工艺纯化后,冻干所得的样品中,总黄酮纯度为 $(94.40 \pm 1.46)\%$,RSD 为 1.548%。经纯化后,样品总黄酮的纯度明显提高。

2.4 苦丁茶粗提物和纯化后总黄酮样品的 XOD 体外抑制活性

2.4.1 样品对 XOD 的体外抑制活性

测定不同浓度苦丁茶粗提物和纯化后总黄酮样品对 XOD 的抑制率,绘制浓度-抑制率曲线,见图 10。

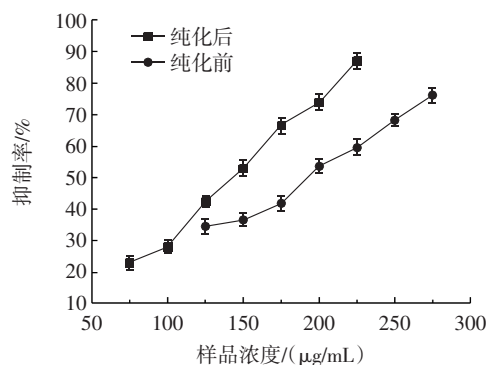


图 10 苦丁茶粗提物和纯化后总黄酮对 XOD 的浓度-抑制率曲线

Fig.10 The concentration-inhibitory rate curve of crude extract of Kudingcha and purified total flavonoids sample

由图 10 可知,苦丁茶粗提物和纯化后的总黄酮样品对 XOD 具有体外抑制活性,抑制率随样品浓度升高而升高。李美娟^[25]对苦丁茶化学成分和 XOD 抑制活性进行研究,结果显示苦丁茶乙醇提取物经乙酸乙酯萃取后,萃取部分中含有多种黄酮类化合物,其 XOD 抑制活性随样品浓度升高而升高,本试验结果与该研究结果相似。

2.4.2 粗提物和纯化后的总黄酮样品的 IC_{50}

采用 GraphPad Prism 7.0 软件,计算粗提物和纯化后的总黄酮样品以及别嘌呤(阳性对照)的 IC_{50} 。结果见表 1。

表 1 粗提物和纯化后的总黄酮样品及别嘌呤的 IC_{50}

Table 1 IC_{50} value of crude extract, purified total flavonoids sample and allopurinol for the XOD inhibition

样品名称	$IC_{50}/(\mu g/mL)$
苦丁茶粗提物	228.22 ± 1.07
纯化后的总黄酮样品	135.74 ± 1.02
别嘌呤	1.34 ± 0.07

由表1可知,苦丁茶粗提物对XOD的 IC_{50} 为 $(228.22 \pm 1.07) \mu\text{g/mL}$,纯化后的总黄酮样品为 $(135.74 \pm 1.02) \mu\text{g/mL}$ 。纯化后的总黄酮样品黄酮纯度提高,具有更强的XOD体外抑制活性。郝悦等^[11]筛选30种黄酮类化合物(纯度>98%),从中得到XOD抑制活性最强的木犀草素、槲皮素、芹菜素、山柰酚, IC_{50} 分别为12.03、36.94、36.75、52.77 $\mu\text{g/mL}$,说明不同黄酮类化合物的XOD抑制活性存在差异。本试验纯化后总黄酮样品可能为多种黄酮类化合物的混合物,混合物中黄酮类化合物的种类和含量决定了混合物XOD抑制活性的强弱。因此,对纯化后总黄酮样品进一步纯化分离后,可能得到具有更强XOD抑制活性的黄酮类化合物。

3 结论

本研究使用超声波辅助乙醇提取法提取苦丁茶中的黄酮类化合物,采用D101大孔树脂对粗提物总黄酮进行分离纯化,探究最佳的纯化工艺条件,得到的最佳纯化工艺条件:上样液pH值为3,洗脱液乙醇浓度70%,上样液浓度3.0 mg/mL,上样液流速2.0 mL/min,洗脱液流速2.0 mL/min,上样量55 mL,洗脱液体积40 mL。在最佳纯化工艺条件下,苦丁茶乙醇提取物中的总黄酮纯度由 $(75.53 \pm 0.86)\%$ 提高至 $(94.40 \pm 1.46)\%$,可见D101大孔树脂能有效地分离纯化苦丁茶总黄酮。

根据试验结果可知,苦丁茶粗提物和纯化后总黄酮样品对XOD具有体外抑制活性,其抑制活性随着样品中总黄酮纯度的升高而升高。其抑制活性的强弱关系为别嘌呤>纯化后总黄酮样品>苦丁茶粗提物。后续可进一步分离鉴定具有XOD抑制活性的苦丁茶黄酮组分,探明苦丁茶黄酮抑制XOD活性的机理。

参考文献:

- [1] 张灿坤. 苦丁茶的原植物及商品调查[J]. 中药材, 1994, 17(3): 14-15, 54.
ZHANG Cankun. Original plants and market drugs investigation of 'Kudingcha'[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 1994, 17(3): 14-15, 54.
- [2] 韦晓洁, 银慧慧, 孟菲, 等. 苦丁茶有效成分及药理活性的研究进展[J]. 中国医药导报, 2017, 14(24): 62-65.
WEI Xiaojie, YIN Huihui, MENG Fei, et al. Research progress on the effective constituents and pharmacological activities of *Ilex Kudingcha* C.J. Tseng[J]. China Medical Herald, 2017, 14(24): 62-65.
- [3] 邹成梅, 厉莉, 史硕硕, 等. 苦丁茶提取物的分离纯化、鉴定及不同萃取部位活性分析[J/OL]. 食品科学: 1-10[2021-12-01]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.ts.20211015.2112.064.html>.
- [4] ZOU Chengmei, LI Li, SHI Shuoshuo, et al. Isolation, purification, identification and activity analysis of different extract parts of *Ilex latifolia* Thunb[J/OL]. Food Science, 1-10[2021-12-01]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.ts.20211015.2112.064.html>.
- [5] RIENKS J, BARBARESCO J, NÖTHLINGS U. Association of isoflavone biomarkers with risk of chronic disease and mortality: A systematic review and meta-analysis of observational studies[J]. Nutrition Reviews, 2017, 75(8): 616-641.
- [6] 孙永杰, 方小磊, 张兴华, 等. 超声波-乙醇法提取藜麦黄酮类物质及其对金黄色葡萄球菌的抑制作用[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(20): 42-47.
SUN Yongjie, FANG Xiaolei, ZHANG Xinghua, et al. Ultrasonic-ethanol extraction of quinoa flavonoids and its inhibitory effect on *Staphylococcus aureus*[J]. Food Research and Development, 2021, 42(20): 42-47.
- [7] CAKIR A, MAVI A, YILDIRIM A, et al. Isolation and characterization of antioxidant phenolic compounds from the aerial parts of *Hypericum hyssopifolium* L. by activity-guided fractionation[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2003, 87(1): 73-83.
- [8] LIN L, LIU X, ZHAO M. Screening of xanthine oxidase inhibitor from selected edible plants and hypouricemic effect of *Rhizoma Alpiniae Officinarum* extract on hyperuricemic rats[J]. Journal of Functional Foods, 2018, 50: 26-36.
- [9] WANG C H, ZHANG C, XING X H. Xanthine dehydrogenase: An old enzyme with new knowledge and prospects[J]. Bioengineered, 2016, 7(6): 395-405.
- [10] WHITE W B. Gout, xanthine oxidase inhibition, and cardiovascular outcomes[J]. Circulation, 2018, 138(11): 1127-1129.
- [11] 周启蒙, 赵晓悦, 梁宇, 等. 治疗高尿酸血症相关药物研究新进展[J]. 中国新药杂志, 2021, 30(10): 929-936.
ZHOU Qimeng, ZHAO Xiaoyue, LIANG Yu, et al. New progress in research on drugs for treatment of hyperuricemia[J]. Chinese Journal of New Drugs, 2021, 30(10): 929-936.
- [12] 郝悦, 焦安妮, 于敏, 等. 30种黄酮抑制黄嘌呤氧化酶活性的筛选[J]. 中成药, 2019, 41(1): 55-59.
HAO Yue, JIAO Anni, YU Min, et al. Activity screening of thirty flavonoids on the inhibition of xanthine oxidase[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2019, 41(1): 55-59.
- [13] 李佳川, 李思颖. 基于分子对接技术的藤茶总黄酮对高尿酸血症肾功能损伤保护机制研究[J]. 中草药, 2021, 52(3): 727-735.
LI Jiachuan, LI Siying. Protective effect and mechanism of total flavonoids from *Ampelopsis grossedentata* on renal function injury of hyperuricemia based on molecular docking technology[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2021, 52(3): 727-735.
- [14] ZHANG C, WANG R, ZHANG G W, et al. Mechanistic insights into the inhibition of quercetin on xanthine oxidase[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 112: 405-412.
- [15] 万聆. 超声辅助桑叶黄酮提取纯化及抑制黄嘌呤氧化酶活性研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2019.

- WANG Li ng. Ultrasound -assisted extraction and purification of flavonoids from mulberry leaves and inhibition of xanthine oxidase[D]. Nanchang: Nanchang University, 2019.
- [15] 李珊, 刘哲, 赵永珍, 等. 青藏高原狭果茶藨子黄酮纯化工艺及抗氧化活性研究[J]. 食品科技, 2021, 46(1): 212-219.
- LI Shan, LIU Zhe, ZHAO Yongzhen, et al. Purification process and antioxidant activity of flavonoids from *Ribes stenocarpum* maxim in Qinghai-Tibet plateau[J]. Food Science and Technology, 2021, 46(1): 212-219.
- [16] 王雪, 夏顺利, 刘景楠, 等. 白花蛇舌草总黄酮大孔树脂纯化工艺及其体内抑瘤作用的研究[J]. 中医药信息, 2021, 38(3): 16-21.
- WANG Xue, XIA Shunli, LIU Jingnan, et al. Study on purification process of total flavonoids from *Oldenlandia diffusa* by macroporous resin and its tumor inhibition *in vivo*[J]. Information on Traditional Chinese Medicine, 2021, 38(3): 16-21.
- [17] 毕洁, 于丽娜, 王明清, 等. 花生壳黄酮的提取纯化工艺[J]. 中国油料作物学报, 2021, 43(5): 933-941.
- BI Jie, YU Lina, WANG Mingqing, et al. Extraction and purification of flavonoids from peanut shell[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2021, 43(5): 933-941.
- [18] 牛鹤丽. 响应面法优化大蓟根总黄酮纯化工艺及其纯化前、后的抑菌活性比较[J]. 食品工业科技, 2021, 42(19): 211-217.
- NIU Heli. Optimization of purification process of total flavonoids from roots of *Cirsium japonicum* DC. with macroporous resin by response surface analysis and comparison of its anti-bacterial activity before and after purification[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(19): 211-217.
- [19] NGUYEN M T, AWALE S, TEZUKA Y, et al. Xanthine oxidase inhibitors from the flowers of *Chrysanthemum sinense*[J]. Planta Medica, 2006, 72(1): 46-51.
- [20] 燕晓婷, 陈华国, 周欣, 等. 黑骨藤总黄酮的提取纯化及体外抗黄嘌呤氧化酶的活性筛选[J]. 国际药学研究杂志, 2019, 46(7): 527-531.
- YAN Xiaoting, CHEN Huaguo, ZHOU Xin, et al. Purification of *Periploca forrestii* total flavonoids and assay for the *in vitro* inhibitory activity on xanthine oxidase[J]. Journal of International Pharmaceutical Research, 2019, 46(7): 527-531.
- [21] ZHANG C, ZHANG G, LIAO Y, et al. Myricetin inhibits the generation of superoxide anion by reduced form of xanthine oxidase[J]. Food Chemistry, 2017, 221: 1569-1577.
- [22] 张沛, 吴楠, 宋志军, 等. 响应面法优化大孔树脂纯化黄芩毛蕊异黄酮工艺[J]. 食品工业科技, 2021, 42(10): 209-214.
- ZHANG Pei, WU Nan, SONG Zhijun, et al. Purification of calycosin from *Astragalus membranaceus* with macroporous resins by response surface analysis[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(10): 209-214.
- [23] 上官宇晨, 黄丽媛, 黄熊, 等. 大孔树脂纯化仙草黄酮及成分测定[J]. 中国调味品, 2021, 46(6): 149-153, 159.
- SHANGGUAN Yuchen, HUANG Liyuan, HUANG Xiong, et al. Purification of flavonoids from *Mesona blumei* by macroporous resin and determination of components[J]. China Condiment, 2021, 46(6): 149-153, 159.
- [24] 朱仕豪, 凌智辉, 张湘龙, 等. 花榈木叶黄酮类化合物提取纯化工艺优化[J]. 湖南农业科学, 2020(12): 52-56.
- ZHU Shihao, LING Zhihui, ZHANG Xianglong, et al. Optimize the extracting and purification technology of flavonoids from *Ormosia henryi* prain leaf[J]. Hunan Agricultural Sciences, 2020(12): 52-56.
- [25] 李美娟. 苦丁茶冬青化学成分及生物活性研究[D]. 长春: 吉林大学, 2018.
- LI Meijuan. Chemical constituents and bioactivities of *Ilex Kudingcha*[D]. Changchun: Jilin University, 2018.

加工编辑: 刘艳美

收稿日期: 2021-12-08