

优,同时考虑到工业生产中它相对更加安全、便宜,故选择乙醇作为提取溶剂。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 66.

[2] Yang S H, Jeng C J, Chen C H, *et al.* Schisandrin enhances dendrite outgrowth and synaptogenesis in primary cultured hippocampal neurons [J]. *J Sci Food Agric*, 2011, 91 (4): 694-702.

[3] 周妍妍, 刘艳丽, 董春雪, 等. 五味子醇甲对 APP/PS1 双转基因痴呆模型小鼠脑组织突触素、 α -突触核蛋白表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(8): 1076-1079.

[4] 王 洋, 戚好文, 胡咏武, 等. 五味子醇甲对介导的肝纤维化抑制作用的初步研究[J]. 第四军医大学学报, 2008, 29(9): 816-818.

[5] 肖 飞, 翁 文, 罗焕敏. 五味子醇甲对 β -淀粉样蛋白损伤 PC12 细胞的预保护及治疗作用[J]. 中药材, 2010, 33 (3): 397-401.

[6] Hu D, Cao Y F, He R R, *et al.* Schizandrin, an antioxidant lignan from *Schisandra chinensis*, ameliorates A β 1-42-induced memory impairment in mice[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2012, 2012: 721721.

[7] 牟倩倩, 贺敬霞, 凌成利, 等. 五味子醇甲提取纯化方法的研究进展[J]. 中成药, 2017, 39(3): 583-587.

[8] 程振玉, 宋海燕, 杨英杰, 等. AB-8 大孔吸附树脂静态纯化北五味子木脂素工艺研究[J]. 北方园艺, 2015 (7): 141-145.

[9] 王 磊. 响应面法优化五味子中五味子醇甲超声提取[J]. 广州化工, 2012, 40(24): 69-71.

[10] 李洪洋, 文连奎. 大孔树脂分离纯化五味子醇甲的研究[J]. 食品与机械, 2011, 27(3): 56-58, 62.

大孔吸附树脂分离纯化油橄榄叶总黄酮

李 俊, 刘孟源, 方升平, 王维香*
(西华大学食品与生物工程学院, 四川 成都 610039)

摘要: **目的** 通过大孔吸附树脂分离纯化油橄榄叶总黄酮。**方法** 以总黄酮吸附量、解吸率为评价指标, 筛选大孔吸附树脂。以总黄酮质量浓度、上样液体积流量及 pH 值、洗脱液 (70% 乙醇) 体积流量为影响因素, 总黄酮吸附率为评价指标, 正交试验优化吸附条件。**结果** HPD-300 型大孔吸附树脂吸附-解吸效果最优, 吸附量 181.91 mg/g, 解吸率 87.28%。最佳工艺为径高比 1:10, 上样液质量浓度 3.25 mg/mL, 体积流量 2 BV/h, pH 值 5.0, 体积 16 BV, 洗脱液体积流量 1 BV/h, 总黄酮吸附率 83.5%, 得率 10.19%, 质量分数 87.38%, 回收率 80.74%。**结论** 该方法稳定可靠, 可用于大孔吸附树脂分离纯化油橄榄叶总黄酮。

关键词: 油橄榄; 叶; 总黄酮; 分离; 纯化; 大孔吸附树脂

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2019)02-0261-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.02.004

Isolation and purification of total flavonoids from *Olea europaea* leaves with macroporous adsorption resin

LI Jun, LIU Meng-yuan, FANG Sheng-ping, WANG Wei-xiang*
(College of Food and Bioengineering, Xihua University, Chengdu 610039, China)

KEY WORDS: *Olea europaea* L.; leaves; total flavonoids; isolation; purification; macroporous adsorption resin

收稿日期: 2018-04-09

基金项目: 四川省科技厅国际合作与交流项目 (2008HH0019); 四川省教育厅重大培育项目 (16CZ0015)

作者简介: 李 俊 (1996—), 男, 研究方向为生物工程

* 通信作者: 王维香 (1968—), 女, 博士生, 副教授, 从事生物活性物质分离提取及功能研究。E-mail: wang_weixiang@hotmail.com

油橄榄又名洋橄榄、齐敦果，是以“高产、优质、高效”为特征的世界名贵常绿木本油料和果用树种^[1]，国外学者已从中分离得到 100 多个化合物，其中油橄榄叶中含有的抗氧化活性成分较果实更突出，主要为多酚类^[2-4]。研究表明，油橄榄叶提取物有着降血脂、降血糖、降血压作用，并且可预防老年痴呆和癌症，治疗胆结石，抑制病毒和细菌^[5-7]，同时具有很强的抗氧化活性，可取代化学防腐剂用于食品保鲜^[8-11]，国外已将其广泛用于化妆品、食品和药品。油橄榄叶多酚类成分的分离提取技术包括有机溶剂萃取^[6]、超声辅助浸提^[12-13]、微波辅助浸提^[14]、超临界流体萃取^[15]、吸附法^[16]等，其中吸附法对酚类/多酚类物质的分离浓缩有明显优势^[17]。

油橄榄引入我国后受到政府大力扶持，已经初具规模，特别是四川、云南、甘肃等地已经出现较具规模的大型基地，但仅利用了其果实，而大量叶被废弃，造成资源浪费，目前回收利用该部位叶中的活性成分越来越受到重视^[18-21]。因此，本实验

比较 9 种大孔吸附树脂对油橄榄叶中总黄酮的吸附、解吸、动力学特性，从中筛选出选择性好、吸附率高、易解吸的树脂，同时优化其吸附与解吸条件，为提高其质量提供指导意义。

1 材料

油橄榄叶采自凉山州会理县丰达生态农业有限公司油橄榄种植基地，经西华大学食品与生物工程学院杨文宇副教授鉴定为木犀科木犀榄属常绿乔木油橄榄 *Olea europaea* L. 的叶，将其自然晾干粉碎后过 100 目筛，40 ℃ 下干燥至恒定质量。UV-2600 紫外可见分光光度计（上海尤尼柯仪器有限公司）；RE-52B 真空旋转蒸发仪（上海亚荣生化仪器厂）；TDL-40B 台式低速离心机（湖南星科科技仪器有限公司）；ST-02A 多功能粉碎机（永康市帅通工具有限公司）；层析柱（上海嘉鹏科技有限公司）；BS-100A 自动分部收集器、HL-2 恒流泵（上海沪西分析仪器厂）。大孔吸附树脂基本信息见表 1。芦丁对照品（上海试剂二厂）；其他试剂均为分析纯（成都市科龙化工试剂厂）。

表 1 大孔吸附树脂基本信息

Tab. 1 Basic information of macroporous adsorption resins

型号	生产厂家	极性	比表面积/(m ² ·g ⁻¹)	孔径/nm
LS-8	西安蓝深特种树脂有限公司	非极性	500~600	20
D140	成都晨光化工研究院	非极性	>850	9.5
BS-II	成都晨光化工研究院	弱极性	未知	未知
D296	天津南开大学化工厂	强极性	未知	未知
NKA-9	天津南开大学化工厂	弱极性	560~700	25~30
S-8	天津南开大学化工厂	强极性	100~120	28~30
AB-8	天津南开大学化工厂	弱极性	480~520	13~14
D101	宜宾天源离子交换树脂厂	弱极性	500~550	9~10
HPD-300	河北宝恩化工有限公司	非极性	800~870	5.0~5.5

2 方法

2.1 标准曲线绘制^[4] 以芦丁对照品质量浓度为横坐标（*X*），吸光度为纵坐标（*A*）进行回归，得到回归方程为 $A = 0.735\ 2X - 0.001\ 9$ ，在 0.09~1.075 mg/mL 范围内线性关系良好。

2.2 总黄酮质量浓度测定 称取干燥至恒定质量的油橄榄叶 144.8 g，1 L 70% 乙醇在 80 ℃ 下水浴提取 2 h，4 000 r/min 离心 10 min，收集上清液，同法提取残渣，合并 2 次上清液，40 ℃、50 r/min 下浓缩至 870 mL，加入 0.4% 壳聚糖醋酸溶液 100 mL，过滤，滤液用 70% 乙醇稀释至 2 180 mL，测定总黄酮质量浓度。

2.3 大孔吸附树脂筛选^[22-25]

2.3.1 预处理 非极性树脂用 95% 乙醇浸泡 24 h，充分溶胀，95% 乙醇冲洗至洗出液加适量蒸馏水无

白色浑浊，再用双蒸水洗至无醇味；阴离子交换树脂用 1 mol/L HCl 浸泡 2~3 h 后，蒸馏水洗至近中性，再用 1 mol/L NaOH 浸泡 2~3 h 后蒸馏水洗至近中性；D296 树脂依次用丙酮和乙醇浸泡 24 h，再用双蒸水洗至无醇味。

2.3.2 静态饱和和吸附量测定 称取预处理后的树脂各 1.000 g，加入 100 mL 样液，室温下振荡 24 h，于 1、2、4、6、8、24 h 取 1 mL 上清液测定总黄酮含量，计算树脂对总黄酮的饱和吸附量，公式为饱和吸附量 = $(C_0 - C_t) V_y / W_s$ ，其中 C_0 为吸附前样品溶液中总黄酮质量浓度， C_t 为吸附后样品溶液中总黄酮质量浓度， V_y 为样品溶液体积， W_s 为树脂质量。

2.3.3 静态解吸率测定 将吸附饱和的树脂置于 250 mL 锥形瓶中，加入 100 mL 70% 乙醇振荡 6 h

后静置 24 h，取 1 mL 上清液，测定解吸液中总黄酮含有量，计算树脂静态解吸率，公式为解吸率= $[(C_jV_j)/(QW_s)] \times 100\%$ ，其中， C_j 为解吸后上清液中总黄酮质量浓度， V_j 为解吸后上清液体积， W_s 为树脂质量， Q 为树脂静态饱和吸附量。

2.4 HPD-300 型大孔吸附树脂吸附总黄酮的条件

2.4.1 正交试验 在预试验基础上，选择总黄酮质量浓度 (A)、上样液体积流量 (B)、上样液 pH 值 (C)、洗脱液体积流量 (D) 作为影响因素，每个因素 3 个水平，通过 $L_9(3^4)$ 表进行设计。因素水平见表 2。

表 2 因素水平

Tab.2 Factors and levels

因素	1	2	3
A 总黄酮/(mg·mL ⁻¹)	3.25	4.90	2.45
B 上样液体积流量/(BV·h ⁻¹)	1.0	4.0	2.0
C 上样液 pH 值	4.0	6.0	5.0
D 洗脱液体积流量/(BV·h ⁻¹)	4.0	2.0	1.0

然后，取 25 mL 树脂装柱，层析柱径高比 1：10，油橄榄叶提取液上柱量 16 BV，70% 乙醇洗脱，收集洗脱液，每组 200 mL，测定总黄酮含有量，计算树脂动态吸附率，公式为吸附率= $[(C_0V_y-C_iV_i)/(C_0V_y)] \times 100\%$ ，其中 C_0 为上样液中总黄酮质量浓度， V_y 为上样液体积， C_i 为流出液中黄酮质量浓度， V_i 为流出液体积。

2.4.2 吸附泄漏曲线考察 条件为上柱液总黄酮质量浓度 3.25 mg/mL，pH 值 5.0，上柱体积流量 2 BV/h，层析柱径高比 1：10，收集流出液，1 BV/管，测定每管收集液中总黄酮质量浓度，绘制吸附泄漏曲线。

2.4.3 吸附洗脱曲线考察 条件为层析柱径高比 1：10，上柱液总黄酮质量浓度 3.25 mg/mL，pH 值 5.0，上柱液量 16 BV，上柱体积流量 2 BV/h，洗脱体积流量 1 BV/h。上柱液过柱后，先用 3 BV 蒸馏水洗掉树脂中未被吸附的样液，再用 70% 乙醇洗脱，收集洗脱液，1 BV/管，过滤后测定总黄酮质量浓度，绘制吸附洗脱曲线，计算总黄酮洗脱率和富集率，公式分别为洗脱率 =

$$\frac{\sum_{i=4}^{11} C_i V_0}{C_0 V_0 (1-L) - (C_1 + C_2 + C_3) V_0} \times 100\% \text{、富集率} = \frac{\sum_{i=4}^{11} C_i}{C_0} \times 100\%$$

，其中 C_i 为第 i 个管总黄酮质量浓度， C_0 为上柱液初始黄酮质量浓度， V_0 为

1 BV， C_1 、 C_2 、 C_3 分别为第 1、2、3 个 BV 总黄酮质量浓度， L 为泄漏率。

3 结果

3.1 总黄酮质量浓度测定 表 3 显示，总黄酮平均质量浓度为 1.945 mg/mL。从 144.8 g 干燥油橄榄叶中提取分离出的总黄酮质量为 4.24 g，油橄榄叶中总黄酮得率为 2.93%。

表 3 总黄酮质量浓度测定结果

Tab.3 Results of concentration determination of total flavonoids

试验号	稀释倍数/倍	吸光度	总黄酮/(mg·mL ⁻¹)
1	10	0.140	1.930
2	5	0.285	1.951
3	3.33	0.431	1.963
4	2	0.710	1.937

3.2 大孔吸附树脂筛选 表 4 显示，强极性树脂 D296、S-8 对总黄酮的吸附作用较好，但解吸率极低；弱极性树脂 AB-8、S-8 虽然有较大的比表面积，但吸附量和解吸率都较低；非极性树脂 LS-8 比表面积较小，吸附性能较差；非极性树脂 HPD-300、D140 比表面积较大，孔径较小，对总黄酮的吸附性很强，解吸率也较高，尤其是前者有更大的比表面积，吸附作用更强。另外，总黄酮在强极性树脂上具有很强的吸附能力，但解吸难，而在非极性或弱极性树脂上有更好的吸附效果，故本实验选择非极性树脂 HPD-300 进行后续研究。

表 4 大孔吸附树脂吸附量、解吸率

Tab.4 Adsorption quantities and desorption rates of macroporous adsorption resins

型号	吸附量/(mg·g ⁻¹)	解吸率/%
AB-8	104.16	67.04
D101	118.29	65.75
BS-II	133.47	59.10
LS-8	125.58	60.53
D296	192.36	23.75
NKA-9	127.54	46.32
D140	147.48	82.63
S-8	145.02	25.47
HPD-300	181.91	87.28

3.3 吸附总黄酮条件

3.3.1 动态吸附 表 5~6 显示，各因素影响程度依次为 A>C>B>D，最优工艺为 $A_1B_3C_3D_3$ ，即径高比 1：10，上样液质量浓度 3.25 mg/mL，体积流量 2 BV/h，pH 值 5.0，体积 16 BV，洗脱液体积流量 1 BV/h，总黄酮吸附率最高，为 83.5%。另外，低质量浓度下总黄酮不利于吸附，当上样液质量浓度为 3.25 mg/mL 时其吸附率最大，超过该质

量浓度后反而下降,可能产生泄漏,导致处理量下降。

表 5 试验设计及结果
Tab. 5 Design and results of tests

试验号	A	B	C	D	吸附率/%
1	1	1	1	1	51.2
2	1	2	2	2	69.3
3	1	3	3	3	83.5
4	2	1	2	3	57.6
5	2	2	3	1	63.9
6	2	3	1	2	50.7
7	3	1	3	2	50.5
8	3	2	1	3	34.9
9	3	3	2	1	43.8
K_{1j}	68	53.1	45.6	53.0	—
K_{2j}	57.4	56.0	56.9	56.6	—
K_{3j}	43.1	59.3	66.0	58.7	—
R	24.9	6.2	20.4	5.7	—

表 6 方差分析
Tab. 6 Analysis of variance

来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值
A	936.86	2	468.43	19.0
B	57.74	2	28.87	1.2
C	626.66	2	313.33	12.6
D	49.86	2	24.93	—
总和	1 090.61	8	—	—

注: $F_{0.01}=99,F_{0.05}=19,F_{0.1}=9$

3.3.2 吸附泄漏曲线 图 1 显示,上样液体积在 5 BV 后开始泄漏,到 16 BV 时泄漏液中总黄酮质量浓度为 3.20 mg/mL,接近上样液质量浓度(3.25 mg/mL),可认为树脂柱吸附量达到饱和。因此,确定最大上样液体积为 16 BV 左右。

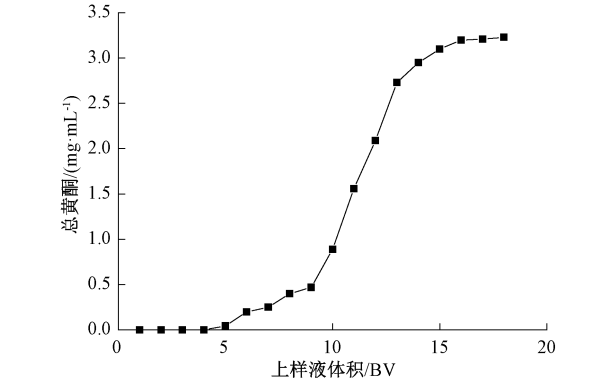


图 1 总黄酮吸附泄露曲线

Fig. 1 Adsorption leakage curve for total flavonoids

3.3.3 吸附洗脱曲线 图 2 显示,洗脱曲线峰型集中,无明显拖尾现象,总黄酮洗脱集中出现在 1~5 BV 区域,以此为富集段,测得总黄酮洗脱率为 94%,富集率为 346.7%,即是原来的 3.47 倍。

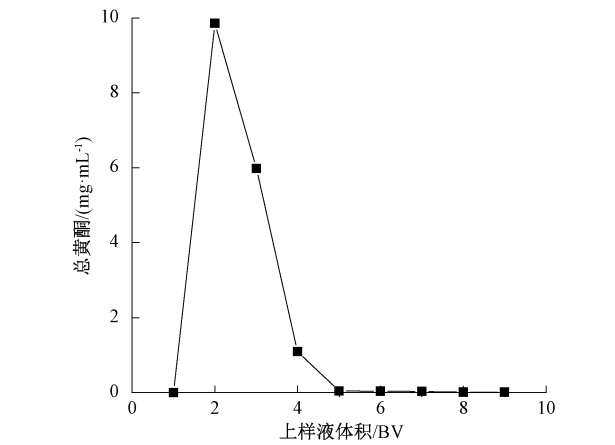


图 2 总黄酮吸附洗脱曲线

Fig. 2 Adsorption elution curve for total flavonoids

3.3.4 验证试验 采用“3.3.1”项下最优工艺进行 3 次验证试验,结果见表 7。由表可知,经过树脂纯化后可去除大量杂质,从而提高总黄酮量。

表 7 验证试验结果 ($n=3$)

Tab. 7 Results of verification tests ($n=3$)

指标	试验号			平均值
	1	2	3	
总黄酮得率/%	10.56	9.84	10.17	10.19
总黄酮质量分数/%	89.62	87.15	85.39	87.38
总黄酮回收率/%	78.32	82.86	81.03	80.74

4 结论

本实验通过测定 9 种大孔吸附树脂对油橄榄叶总黄酮的吸附特性,综合比较吸附量、解吸率、解吸物中总黄酮质量浓度。结果,非极性树脂 HPD-300 对总黄酮的分离纯化效果最佳,故确定其作为最佳吸附树脂。最佳纯化工艺为树脂柱径高比 1:10,总黄酮质量浓度 3.25 mg/mL,上样体积 16 BV,体积流量 2 BV/h,蒸馏水洗脱 3 BV 后再用 8 BV 70% 乙醇洗脱,收集洗脱液,回收乙醇,干燥,此时总黄酮吸附率为 83.5%,洗脱率为 94%,富集率为 346.7%,制得产品中其得率为 10.19%,质量分数为 87.38%,回收率为 80.74%。

参考文献:

[1] 王成章,高彩霞,陈文英,等.木樨榄属植物中裂环烯醚萜类的提取方法及开发前景[J].生物质化学工程,2006,40(2):45-49.

[2] El S N, Karakaya S. Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health[J]. *Nutr Rev*, 2009, 67(11): 632-638.

[3] Hayes J E, Allen P, Brunton N, et al. Phenolic composition and *in vitro* antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea* L.),

lutein, sesamol and ellagic acid[J]. *Food Chem*, 2011, 126(3): 948-955.

[4] 王成章, 高彩霞, 姜成英. 油橄榄的化学组成和加工利用[J]. 林业科技开发, 2006, 20(2): 1-4.

[5] Omar S H. Oleuropein in olive and its pharmacological effects[J]. *Sci Pharm*, 2010, 78(2): 133-154.

[6] Lee O H, Lee B Y. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract[J]. *Bioresour Technol*, 2010, 101(10): 3751-3754.

[7] Esmaili-Mahani S, Rezaeezadeh-Roukerd M, Esmailpour K, *et al.* Olive (*Olea europaea* L.) leaf extract elicits antinociceptive activity, potentiates morphine analgesia and suppresses morphine hyperalgesia in rats[J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 132(1): 200-205.

[8] Bouaziz M, Fki I, Jemai H, *et al.* Effect of storage on refined and husk olive oils composition: Stabilization by addition of natural antioxidants from *Chemlali olive* leaves[J]. *Food Chem*, 2008, 108(1): 253-262.

[9] Lalas S, Athanasiadis V, Gortzi O, *et al.* Enrichment of table olives with polyphenols extracted from olive leaves[J]. *Food Chem*, 2011, 127(4): 1521-1525.

[10] Hayes J E, Stepanyan V, Allen P, *et al.* Effect of lutein, sesamol, ellagic acid and olive leaf extract on the quality and shelf-life stability of packaged raw minced beef patties[J]. *Meat Sci*, 2010, 84(4): 613-620.

[11] Botsoglou E, Govaris A, Christaki E, *et al.* Effect of dietary olive leaves and/or α -tocopheryl acetate supplementation on microbial growth and lipid oxidation of turkey breast fillets during refrigerated storage[J]. *Food Chem*, 2010, 121(1): 17-22.

[12] Japón-Luján R, Luque-Rodríguez J M, Luque de Castro M D. Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves[J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1108(1): 76-82.

[13] Cárcela J A, García-Pérez J V, Muleta A, *et al.* Ultrasonically assisted antioxidant extraction from grape stalks and olive leaves[J]. *Phys Procedia*, 2010, 3(1): 147-152.

[14] Sánchez-Avila N, Priego-Capote F, Ruiz-Jiménez J, *et al.* Fast and selective determination of triterpenic compounds in olive leaves by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with multiple reaction monitoring after microwave-assisted extraction[J]. *Talanta*, 2009, 78(1): 40-48.

[15] Le Floch F, Tena M T, Ríos A, *et al.* Supercritical fluid extraction of phenol compounds from olive leaves[J]. *Talanta*, 1998, 46(5): 1123-1130.

[16] Altıok E, Bayçın D, Bayraktar O, *et al.* Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibroin[J]. *Sep Purif Technol*, 2008, 62(2): 342-348.

[17] Soto M L, Moure A, Domínguez H, *et al.* Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption: A review[J]. *J Food Eng*, 2011, 105(1): 1-27.

[18] 党建章, 金元宝, 毛友枚, 等. 大孔树脂分离纯化羟基酯醇工艺研究[J]. 中成药, 2012, 34(9): 1811-1813.

[19] 夏雅俊. 油橄榄叶抗糖尿病活性部位中主要有效成分的分离制备、分析方法及提取工艺研究[D]. 北京: 中国科学院大学, 2014.

[20] 闫树军, 王 远, 苏艳红, 等. 响应面法优化油橄榄叶中橄榄苦苷超声辅助提取工艺[J]. 食品科学, 2012, 33(18): 73-76.

[21] 吴遵秋, 姜友军, 苏光灿, 等. 油橄榄叶中橄榄苦苷的体外抗氧化和抑菌活性[J]. 食品科学, 2014, 35(21): 94-99.

[22] 丁利君. AB-8 树脂对半边旗提取液中黄酮的吸附作用[J]. 食品科学, 2007, 28(10): 241-244.

[23] 张纪兴, 李 坚, 程国华. 大孔树脂吸附法富集地锦草总黄酮的工艺研究[J]. 中药材, 2002, 25(2): 123-125.

[24] 曹群华, 瞿伟菁, 李家贵, 等. 大孔树脂吸附纯化沙棘籽渣总黄酮的研究[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(3): 225-228.

[25] 李 侃, 倪永年, 李 莉. 大孔吸附树脂分离纯化槲寄生中黄酮的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(2): 68-71.