

## 甜茶素和甜茶总多酚的制备

鲍晨阳<sup>1</sup>, 韦万丽<sup>1</sup>, 陈显刚<sup>2</sup>, 廖莉玲<sup>1\*</sup>

1(贵州师范大学 化学与材料科学学院, 贵州 贵阳, 550001)

2(贵州省健康茶叶科技有限公司, 贵州 黔南, 558100)

**摘 要** 设计了从甜茶叶同时制备甜茶素和甜茶总多酚的工艺, 简化了甜茶素生产流程, 提高了产率。首先将甜茶提取液用大孔树脂富集, 收集柱流液, 然后通过低浓度的乙醇溶液对饱和的甜茶素富集柱进行洗脱, 合并洗脱液和柱流液, 用大孔树脂对合并液进行纯化, 得到的总多酚产品纯度可以达到约 60%, 产率约为 10%, 再用高浓度的乙醇溶液对甜茶素富集柱进行洗脱, 旋干, 得到甜茶素粗品, 纯度约为 45%, 产率为 7.1%。若再用聚酰胺树脂对甜茶素粗品进行精制, 则纯度可达到约 71%, 产率为 3.4%。

**关键词** 甜茶素; 甜茶多酚; 制备工艺

广西甜茶 (*Rubus Suavissimus* S. Lee), 属蔷薇科悬钩子属植物, 是有刺、多年生的一种灌木, 可入茶入药, 有清热、润肺、止咳等作用<sup>[1-2]</sup>。

甜茶素 (rubusoside) 是甜茶的主要活性成分之一, 其甜度约为蔗糖甜度的 300 倍<sup>[3]</sup>, 是一种甜度高, 低热值, 健康安全的天然甜味剂, 已广泛应用于食品、保健等行业, 因此, 对甜茶素的分离、纯化已有较多研究报道<sup>[4-5]</sup>, 且已有规模化的工业生产。甜茶总多酚也是甜茶叶主要活性成分之一, 具有抗氧化、防辐射、抗过敏、防癌症等生物活性<sup>[6-7]</sup>。

为了提高甜茶叶的综合利用, 减少资源浪费, 本文在现有提取甜茶素的工艺基础上, 探索出一条同时制备甜茶素和甜茶总多酚的工艺, 在简化甜茶素生产的工艺流程, 提高甜茶素产率的同时得到了总多酚产品。

## 1 材料与方 法

## 1.1 材料与试剂

甜茶叶, 贵州省健康茶科技有限公司; 甜茶素标准品, 南通飞宇生物科技有限公司; 色谱甲醇, 德国默克; 树脂型号与生产厂家: 聚酰胺 (100 目), 国药集团化学试剂有限公司; HPD826、D101 (沧州宝思吸附材料有限公司); 707、732 (江苏色可赛思树脂有限公

司); SA-3 (郑州勤实科技有限公司), 其余实验试剂均为分析纯。

## 1.2 仪器与设备

UV2450 型紫外分光光度仪, 日本岛津公司; LC-15C 型高效液相色谱仪, 日本岛津公司; RE-52AA 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; FD-1A-50 冷冻干燥机, 上海豫明仪器有限公司; A200S 型电子天平, 德国赛多利斯集团; DHL-3 电脑恒流泵, 上海驰唐电子有限公司; FZ102 型微型植物粉碎机, 天津市泰斯特仪器有限公司。

## 1.3 实验方法

## 1.3.1 甜茶提取液的制备

用植物粉碎机将甜茶叶粉碎, 称取 40 g 甜茶叶粉末, 置于 1 000 mL 烧瓶中, 每次加入 400 mL 蒸馏水, 回流提取 2 次, 每次提取时间 1 h, 过滤, 合并 2 次滤液, 并定容至 1 000 mL, 备用。

## 1.3.2 树脂预处理和树脂的装填

707 阴离子交换树脂按厂家的说明处理: 蒸馏水浸泡 12 h  $\xrightarrow{\text{倾去蒸馏水}}$  2 BV, 5% NaOH 浸泡 2 h  $\xrightarrow{\text{蒸馏水洗至中性}}$  2 BV, 5% HCl 浸泡 2 h  $\xrightarrow{\text{蒸馏水洗至中性}}$  2 BV, 5% NaOH 浸泡 2 h  $\rightarrow$  蒸馏水洗至中性备用。732 阳离子交换树脂和 707 阴离子交换树脂处理方法基本相同, 但是要把酸碱的顺序调换一下。

其他树脂参考文献 [8] 中方法处理。树脂采用湿法装柱, 装柱 30 mL (柱子直径为 1.5 cm)。

## 1.3.3 甜茶素和总多酚样品浓度、纯度和产率的计算

甜茶素采用高效液相色谱法 (HPLC) 按文献 [9] 检测, 柱温为 30 ℃。先测定样品溶液的甜茶素浓度

第一作者: 硕士研究生 (廖莉玲教授为通讯作者, E-mail: ll6383@163.com)。

基金项目: 贵州省科学技术厅中药现代化攻关项目 (黔科合 ZY 字 [2012] 3012 号); 贵阳市科技局现代药业计划项目 (筑科合同 [20122204] 号)

收稿日期: 2015-09-05, 改回日期: 2015-10-27

( $\rho_{\text{样}}$ , 单位为  $\text{mg/mL}$ ), 并旋干称重、计算样品的纯度和产率。

$$\rho_{\text{样}} / (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}) = \frac{\rho_{\text{标}} \times S_{\text{样}}}{S_{\text{标}}} \quad (1)$$

$$\text{纯度} / \% = \frac{\rho_{\text{样}} \times V_{\text{样}}}{m_{\text{样}}} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{产率} / \% = \frac{m_{\text{样}}}{m_{\text{对应茶叶干重}}} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{得率} = \text{纯度} \times \text{产率} \quad (4)$$

式(1)~式(4)中, $\rho_{\text{标}}$ 为标准品溶液的浓度, $\text{mg/mL}$ ;  $S_{\text{样}}$ 、 $S_{\text{标}}$ 分别为待测样品溶液和标准品溶液的HPLC峰面积; $V_{\text{样}}$ ,所取样品溶液的体积, $\text{mL}$ ;  $m_{\text{样}}$ ,此样品溶液旋干后的质量, $\text{mg}$ ;  $m_{\text{对应茶叶干重}}$ 是换算的、为制得相应体积样品溶液所需的甜茶叶干重, $\text{mg}$ 。

溶液中的多酚浓度,采用光度法按文献[10]检测。用旋转蒸发仪减压浓缩,再用冷冻干燥机冻干,按式(2)、式(3)计算多酚样品的纯度和产率。

#### 1.3.4 甜茶素,甜茶多酚的提取工艺

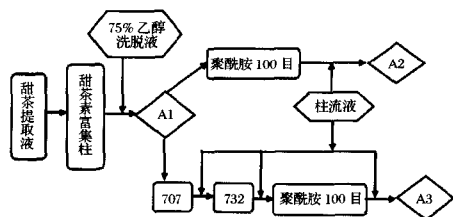


图1 制备甜茶素原工艺

Fig.1 The original technology of preparing rubusoside

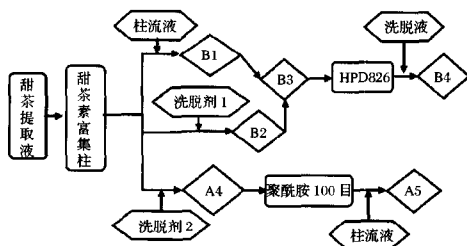


图2 联产制备甜茶素,甜茶总多酚工艺

Fig.2 Preparation technology of rubusoside and total polyphenols

图2中A1~A5为甜茶素溶液,B1~B4为甜茶总多酚溶液。乙醇洗脱剂1、2分别洗脱甜茶素富集柱得到B2、A4。

#### 1.3.5 乙醇洗脱剂1浓度的选择

用甜茶提取液,以2 BV/h分别向甜茶素富集树脂D101、SA-3中上样至饱和(柱流液流出的甜茶素浓度达到提取液浓度的10%即为饱和),少量水洗后,再用不同浓度的乙醇溶液洗脱,每25 mL收集1

管,用1.3.3中的方法分管测定其中的甜茶素浓度和甜茶多酚浓度。

#### 1.3.6 乙醇洗脱剂2用量的选择

参照文献[11]。经实验,体积分数75%乙醇对不同甜茶素富集柱吸附的甜茶素均有良好的洗脱能力,故选用75%乙醇作为洗脱剂2。经合适低浓度乙醇溶液洗脱后,再用75%乙醇分别对D101、SA-3进行洗脱,用1.3.3中的方法,测定甜茶素浓度,对洗脱剂的用量进行优化。

#### 1.3.7 甜茶素、甜茶总多酚的纯化

按照图2所示,对B3、A4样品溶液进一步精制纯化。图2中的A4用聚酰胺100目进行纯化<sup>[12]</sup>,图中的B3样品溶液用HPD826树脂进行纯化<sup>[13]</sup>,样品溶液都以2 BV/h上样2 BV,聚酰胺树脂收集柱流液A5。HPD826树脂用少量水洗后,收集40%乙醇洗脱液3 BV,得到B4,减压浓缩,冻干,得到相应的产品。

## 2 结果与讨论

### 2.1 洗脱剂1浓度的选择

如图1所示,现有生产甜茶素的工艺中,A1是较高浓度乙醇溶液(体积分数75%)一步洗脱得到,由于乙醇浓度较高,在甜茶素洗脱下来的同时,也将多酚,黄酮等也洗脱下来。因此,A1纯度不高。但如果需要较高纯度的甜茶素产品,还要经过图中产物A2或A3的纯化路径,经过一步或者多步除杂过程才能得到。故设计在原工艺的基础上,对甜茶素富集柱采用梯度洗脱的方式,先用低浓度乙醇即洗脱剂1将部分黄酮,多酚洗脱下来,得到B2,再用高浓度的乙醇,即洗脱剂2将甜茶素洗脱,得到A4。这样,A4中的多酚、黄酮等的含量大幅度减少,甜茶素的纯度就得到了提高,再次纯化甜茶素的步骤即可减少。同时B2还可以用于甜茶多酚的提取,增加甜茶多酚的回收率。

根据图2,用1.3.5中的方法,选择20%、35%、50%三个梯度的乙醇溶液作为洗脱剂,分别平行洗脱饱和的D101、SA-3大孔树脂柱,分管收集,并用1.3.3中的方法测定洗脱液中的甜茶素和甜茶总多酚的含量。结果如图3,图4所示。

从图3中可以看到,如果用体积分数20%乙醇溶液洗脱D101柱,不能洗脱下甜茶素,但洗脱的甜茶总多酚的量也很少,不具备实际价值。若用50%乙醇溶液洗脱,甜茶素和甜茶总多酚都会被洗脱,不能区别开来,也不能采用。35%乙醇溶液洗脱液中,

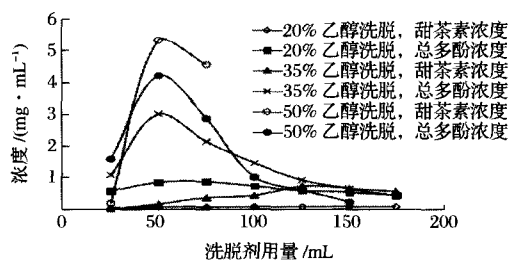


图3 D101树脂低浓度乙醇洗脱曲线

Fig. 3 Low concentration ethanol elution curves of D101

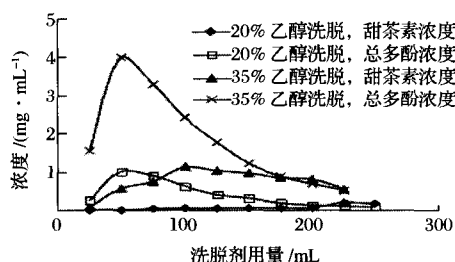


图4 SA-3树脂低浓度乙醇洗脱曲线

Fig. 4 Low concentration ethanol elution curves of SA-3

虽然甜茶素会被洗脱下来少部分,这个浓度的乙醇溶液的洗脱能力对甜茶素和甜茶总多酚有较大区别。若选择洗脱剂用量为3~3.5 BV,则既可以洗脱较大部分的多酚,损失的甜茶素的量亦较少,故选择35%的乙醇较为适宜。

图4中,用35%的乙醇溶液进行洗脱,虽然总多酚和甜茶素分离得较好,但是主要产品甜茶素损失较多,不宜使用。故选择乙醇浓度为20%,洗脱7 BV。用50%的乙醇溶液就会把甜茶素大量洗脱下来,不能起到分离甜茶素与总多酚的效果,故图中未列出。

## 2.2 洗脱剂2用量的选择

使用75%乙醇,再洗脱经上一步最佳条件洗脱后的甜茶素富集柱,按照1.3.3中的方法,测定甜茶素的浓度。结果如图5所示。

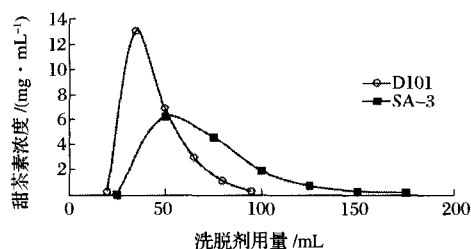


图5 75%乙醇对甜茶素的洗脱曲线

Fig. 5 75% ethanol elution curves of rutin

如图5所示,D101应再洗脱3 BV,洗脱剂的用

量较少,洗脱效果较好。SA-3应再洗脱6 BV。

## 2.3 新工艺条件下产品分析

在向甜茶素富集柱上样至饱和的过程中发现,SA-3上样约17倍饱和,D101上样约14倍饱和,故选用SA-3树脂为甜茶素富集树脂,进行下一步的产品对比。按图2所示的工艺,分别制得甜茶素样品溶液A4、A5和多酚样品溶液B1~B4,经减压浓缩,冻干,得到相应的固体样品A4'、A5'、B1'~B4'。按照图1所示工艺,在和A4'、A5'同样的柱条件下制得甜茶素固体样品A1'、A2'、A3'。其中,制备A3产品路径中的离子交换树脂707、732的柱条件参照文献[14]。全部样品用1.3.3中的方法分别计算产品的产率、纯度和得率,结果见表1、表2。

表1 甜茶素产品的工艺数据

Table 1 The data of rutin product

指标	A1'	A2'	A3'	A4'	A5'
产率/%	9.7	4.8	2.4	7.1	3.4
纯度/%	33.9	54.6	72.5	45.7	71.2
得率/%	3.28	2.62	1.74	3.24	2.42

表2 新工艺条件下,甜茶总多酚的工艺数据

Table 2 The data of total polyphenols product (under the condition of new technology)

指标	B1'	B2'	B3'	B4'
产率/%	17.4	7.2	23.1	10.2
纯度/%	27.8	49.8	37.1	60.7
得率/%	4.84	3.59	8.57	6.19

由表1可见,A1'是老工艺条件下,75%乙醇一步洗脱下来的甜茶素溶液产品,纯度只有约34%、A4'是新工艺下条件下,经过分步洗脱,除杂后75%乙醇洗脱液得到的产品,两者得率相近,但A4'的纯度远高于A1',新工艺条件下,只需过一个树脂柱即可获得甜茶素粗品(甜茶素粗品要求纯度大于40%),而老工艺获得甜茶素粗品需要过甜茶素富集柱和聚酰胺柱2根柱子才能得到。这是因为,新工艺通过分步洗脱的方式,洗去了部分杂质,使主要产物甜茶素的纯度得以相对提高。同样,A2'和A5'分别为老工艺、新工艺经过甜茶素富集柱和聚酰胺柱得到的产品。虽然A5'的得率低于A2',但A5'的纯度远高于A2',新工艺条件下,只需经过2根柱子即可得到甜茶素精品(甜茶素精品要求纯度大于70%),而老工艺要得到甜茶素精品则需经制A3的途径,过4根柱子才能得到。新工艺简化了生产甜茶素的生产流程,同时减少了生产过程甜茶素的损失,提高了甜

茶素的产率。

由表2可见,新工艺中的B1、B2、B3、B4是甜茶总多酚的溶液,经检测发现,在B1~B2中都有甜茶多酚的存在,B1虽然纯度不高,但是总量大,B2纯度虽然不低,但还有提纯的空间。故把B1、B2合并为B3,再用大孔树脂柱进行纯化,精制后纯度可以达到60%,产率达到10%。新工艺提纯甜茶多酚操作步骤简单,易于工业化生产。

### 3 结论

通过改变甜茶产品的工艺流程,同时获取了甜茶素和甜茶总多酚,实现了甜茶中2种重要产品的联产制备。

对于甜茶素,本文通过梯度洗脱的方式,洗去部分甜茶多酚,黄酮类化合物,实现了甜茶素和其他物质的粗分,提高了甜茶素的纯度,只经简单步骤只过一根树脂,纯度达到了45.7%,且因为简化了提纯步骤,少过了树脂,甜茶素粗品的产率相比老工艺得到明显提高。如果进一步提纯甜茶素,也可以少过树脂,从而提高甜茶素产率。

对于甜茶总多酚,本文通过合并柱流液和洗脱液1,再上柱精制甜茶多酚,既实现了甜茶素的提纯,又实现了甜茶多酚的高效回收利用。

本文通过简单的梯度洗脱,提高了甜茶素的纯度、产率,减化了精制甜茶素的工艺流程,减少了生产时间,并回收、高效利用了甜茶总多酚。工艺全过程只用水和乙醇溶液,无毒,环保,且乙醇可通过乙醇蒸

馏塔回收利用,增加了工艺的经济性。

### 参 考 文 献

- [1] 邓绍林. 广西甜茶叶片的营养成分及开发利用价值研究[J]. 中国林副特产, 2000(3): 18-19.
- [2] 周如金, 黄敏, 张玲, 等. 大孔树脂提取甜茶苷的研究[J]. 林产化学与工业, 2008, 28(5): 35-39.
- [3] 陈全斌, 张巧云, 义祥辉. 高纯度甜茶甙的制备[J]. 林业科技, 2006, 31(4): 55-56.
- [4] 吕鑫华, 况鹏群, 袁其朋, 等. 制备色谱法在纯化甜茶苷工艺中的应用[J]. 北京化工大学学报: 自然科学版, 2012, 39(5): 92-97.
- [5] 龙永诚, 韦忠孙, 马剑霜, 等. 甜茶原粉生产及产品指标制定[J]. 企业科技与发展, 2014(5): 15-16.
- [6] 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.
- [7] 滕建文, 黄丽, 易湘茜, 等. 广西甜茶多酚的抗过敏性评价[J]. 食品与机械, 2008, 24(5): 48-51.
- [8] 张强华, 熊清平, 石莹莹. 大孔树脂对甜菊糖苷溶液的脱色研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(5): 249-252.
- [9] 卢昕, 张新申, 刘承伟. 反相高效液相色谱法测定广西甜茶中的甜茶素[J]. 色谱, 2003, 21(3): 260-262.
- [10] 崔紫娇, 张彩云, 刘彬彬, 等. Folin-Ciocalteu 比色法测定甜茶总多酚含量[J]. 贵州农业科学, 2014, 42(3): 158-160.
- [11] 陈全斌, 沈钟苏, 张巧云, 等. 甜茶中黄酮甙元的分离提纯及其表征[J]. 林业科技, 2005, 30(1): 46-48.
- [12] 葛益银, 张凌云. 广西甜茶苷柱纯化研究[J]. 中国野生植物资源, 2012, 31(5): 33-36, 40.
- [13] 吕春茂, 宋雨涵, 孟宪军, 等. 大孔树脂纯化寒富苹果渣多酚工艺优化[J]. 食品工业科技, 2012, 33(6): 301-303, 308.
- [14] 吴应熊, 戴静. 用大孔吸附树脂分离甜茶甙[J]. 食品科学, 1990(5): 12-13.

## Preparation technology of rubusoside and total polyphenols from sweet tea

BAO Chen-yang<sup>1</sup>, WEI Wan-li<sup>1</sup>, CHEN Xian-gang<sup>2</sup>, LIAO Li-ling<sup>1\*</sup>

1( School of Chemistry and Materials Science, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China)

2( Guizhou Province Health Tea Science and Technology Limited Company, Qiannan 558100, China)

**ABSTRACT** Technology of preparing rubusoside and total polyphenols from sweet tea in the same time was designed. The technology simplified the process of preparing rubusoside and improved the yield. First of all sweet tea extract was enriched by the macroporous resin and the column flow fluid was collected. Then the saturated rubusoside enrichment column was eluted by low concentration of ethanol solution, the eluent and column flow fluid were combined and purified by macroporous resin HPD826. Column conduction was flow rate of 2 BV/h, sample volume of 2 BV and 40% ethanol solution of 3 BV as eluent. Eluent was collected and concentrated by rotary evaporator and freeze-dried. The purity and yield of the total polyphenols production were 60% and 10%, respectively. Then the enrichment column was eluted again by a high concentration of ethanol solution, eluent was dried by the rotary evaporator, and crude product of rubusoside was obtained. The purity and yield of production were 45% and 7.1%, respectively. Polyamide resin was used for refining crude product; column condition was same as HPD826. Column flow was collected and concentrated by rotary evaporator and freeze-dried. The purity of production could reach about 71%, the yield was about 3.4%. The solvent and macroporous resin could be recycled in the whole new process flow; the technological process was simple, green, and suitable for industrial production.

**Key words** rubusoside; polyphenol of sweet tea; preparation technology