

综合利用

大孔树脂纯化美藤果壳酚类物质的研究

杨婉¹, 葛学惠², 赵晨伟¹, 唐年初¹

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 上海梁丰食品销售有限公司, 上海 200333)

摘要:以美藤果壳为原料,用70%乙醇提取得到美藤果壳酚类粗提物,研究大孔树脂纯化美藤果壳酚类物质的工艺条件,对AB-8、HPD300、NKA-9、D101、S-8、DM130 6种型号大孔树脂进行了筛选。结果表明:NKA-9型大孔树脂为纯化美藤果壳酚类物质最佳树脂;NKA-9型大孔树脂纯化美藤果壳酚类物质的最佳工艺条件为上样液质量浓度10 mg/mL、上样速度2.0 mL/min、以70%的乙醇溶液洗脱、洗脱速度1.0 mL/min、洗脱剂体积2.5 BV。在最佳工艺条件下纯化后的美藤果壳酚类物质的总酚含量为73.8%,对比于粗提物中的总酚含量33.2%,提高了1.2倍。

关键词:美藤果壳;酚类物质;大孔树脂;纯化

中图分类号:TS229;TQ28

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2018)02-0120-05

Purification of phenolic compounds from Sacha Inchi shells by macroporous resin

YANG Wan¹, GE Xuehui², ZHAO Chenwei¹, TANG Nianchu¹

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China;

2. Shanghai Liangfeng Food Sales Co., Ltd., Shanghai 200333, China)

Abstract: With Sacha Inchi (SI) shells as raw material, the crude phenolic compounds extract was extracted by 70% ethanol. The purification process conditions of phenolic compounds from SI shells by macroporous resins were studied, and six kinds of macroporous resins of AB-8, HPD300, NKA-9, D101, S-8 and DM130 were screened. The results showed that NKA-9 type resin was the most suitable resin for the purification of SI shell phenolic compounds. The optimal purification process conditions were obtained as follows: mass concentration of sample 10 mg/mL, flow rate of sample 2.0 mL/min, with 70% ethanol as eluent, elution rate 1.0 mL/min, and eluent volume 2.5 BV. Under the optimal conditions, the total phenol content in phenolic compounds from SI shells was 73.8%, which was 1.2 times higher than that in crude extract (33.2%).

Key words: Sacha Inchi shell; phenolic compounds; macroporous resin; purification

美藤果,又称印加果、南美星油藤,属大戟科多年生木质藤本植物,生长在秘鲁亚马逊的低地,由土著居民种植^[1]。我国美藤果由中科院西双版纳热带植物园于2006年从秘鲁引种成功^[2],目前在普洱、西双版纳等地均有大面积的种植^[3]。美藤果纯

仁率为64%,仁含油率高达52%,且油中含有49%亚麻酸和36%亚油酸,粕中蛋白质含量可达37%。2013年,美藤果被我国卫生部批准为新资源食品^[4]。

天然酚类化合物在癌症等疾病的预防和治疗中起着重要的作用^[5]。天然酚类化合物包括酚酸、黄酮、类黄酮、单宁、苯乙烯类、姜黄素类、香豆素类、木脂素类、醌类等^[6]。研究表明,一些植物原料加工后的副产物是重要的天然酚类化合物的重要来源^[7-13]。目前,关于美藤果壳中酚类物质的研究很少,因此本文以美藤果壳为原料,用70%乙醇提取

收稿日期:2017-06-14;修回日期:2017-10-22

作者简介:杨婉(1992),女,在读硕士,研究方向为美藤果壳中酚类物质的纯化、结构鉴定及清除自由基功能评价(E-mail)jnyangwan@126.com。

通信作者:唐年初,副教授,硕士生导师(E-mail)tangnc@126.com。

其中的酚类物质并使用大孔吸附树脂将提取的酚类物质进行纯化。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

美藤果,购于云南普洱联众生物资源开发有限公司,手工剥壳后将壳置于50℃的真空干燥箱中干燥后粉碎,过40目筛,用石油醚(30~60℃)脱脂后备用。

石油醚(30~60℃)、无水乙醇、无水碳酸钠为分析纯;没食子酸对照品为优级纯;福林酚试剂为生化试剂;AB-8、HPD300、NKA-9、D101、S-8、DM130型树脂,购于陕西西安乐博生化科研有限公司。

1.1.2 仪器与设备

88-1型数显恒温大功率磁力搅拌器;RE-52A旋转蒸发仪;ME204E电子天平,梅特勒-托利多仪器有限公司;ZKXF型真空干燥箱;DKZ系列电热恒温振荡水槽;HL-2B数显恒流泵; Φ 2.5 cm×30 cm玻璃层析柱;BSZ-100自动部分收集器;HD-3紫外检测仪;UV2802型紫外可见分光光度计。

1.2 实验方法

1.2.1 总酚含量的测定

采用福林酚法测定总酚含量^[14]。没食子酸质量浓度在7~70 μg/mL范围内与765 nm处的吸光度呈现良好的线性关系^[15]。精确称取100 mg没食子酸,用去离子水溶解后定容于100 mL容量瓶,得到质量浓度为1 mg/mL的没食子酸标准储备液。用移液管精确量取0、1、2、3、4、5、6 mL标准储备液于100 mL容量瓶中,用去离子水定容,则没食子酸标准工作液的质量浓度分别为0、10、20、30、40、50、60 μg/mL。分别移取各质量浓度的没食子酸标准工作液1 mL于10 mL容量瓶中,分别加5.0 mL去离子水,再分别加0.6 mL福林酚试剂,反应8 min后加2.4 mL饱和碳酸钠溶液,反应5 min后用去离子水定容,定容后将容量瓶置于暗处避光反应2 h后,测定溶液在765 nm处的吸光度。以没食子酸的质量浓度为横坐标,765 nm处的吸光度为纵坐标绘制没食子酸标准曲线,得到回归方程为 $y = 0.114 1x + 0.007 7$, $R^2 = 0.999 2$ 。

1.2.2 美藤果壳酚类粗提物的制备

称取一定量的脱脂美藤果壳粉末,以20:1的液料比加入70%乙醇溶液,60℃下回流提取1 h,抽滤后将滤渣再以相同的方式提取1次,合并两次的滤

液后蒸干溶剂,经真空干燥得美藤果壳酚类粗提物。称取一定量的粗提物,用去离子水溶解定容,测定总酚含量,计算出粗提物中总酚含量为33.2%。

1.2.3 树脂的预处理

称取一定量的树脂,用无水乙醇浸泡树脂后用无水乙醇清洗至洗出液滴加去离子水不产生白色浑浊为止。用去离子水洗去无水乙醇后,用5% HCl溶液浸泡树脂4~6 h后过滤,用去离子水洗至中性。再用5% NaOH溶液浸泡树脂4~6 h后过滤,用去离子水洗至中性后,70℃真空干燥备用。

1.2.4 大孔树脂对美藤果壳酚类物质的静态吸附及解吸实验

1.2.4.1 静态吸附实验

分别称取预处理好的6种树脂各1 g,用少量的无水乙醇溶胀后用去离子水洗去无水乙醇,再用滤纸吸干树脂表层的水,将树脂转移到150 mL具塞三角瓶中,分别加入一定质量浓度的美藤果壳酚类溶液40 mL,30℃水浴摇床吸附24 h,充分吸附后过滤,将滤液定容,测定滤液中总酚的质量浓度,按下式计算各树脂的吸附量和吸附率。

$$Q_e = (C_0 \times V_0 - C_e \times V_e) / W$$

$$E = (C_0 \times V_0 - C_e \times V_e) / (C_0 \times V_0) \times 100\%$$

式中: Q_e 为达到吸附平衡时树脂的吸附量,mg/g; E 为吸附率,%; C_0 为酚溶液的初始质量浓度,mg/mL; V_0 为酚溶液的初始体积,mL; C_e 为滤液定容后总酚的质量浓度,mg/mL; V_e 为滤液定容的体积,mL; W 为树脂的质量,g。

1.2.4.2 静态解吸实验

将上述吸附饱和的树脂再次转移到150 mL具塞三角瓶中,准确加入50 mL 95%乙醇,30℃水浴摇床解吸24 h,过滤后将滤液定容,测定滤液中总酚的质量浓度,按下式计算各树脂的解吸量和解吸率。

$$Q_d = C_d \times V_d / W$$

$$D = C_d \times V_d / (C_0 \times V_0 - C_e \times V_e) \times 100\%$$

式中: Q_d 为解吸量,mg/g; D 为解吸率,%; C_d 为解吸后酚溶液质量浓度,mg/mL; V_d 为解吸后酚溶液体积,mL。

1.2.5 大孔树脂对美藤果壳酚类物质的动态吸附和洗脱实验

1.2.5.1 大孔树脂的动态吸附实验

通过静态吸附和解吸实验,从6种大孔树脂中筛选出1种最理想的树脂进行动态吸附实验。将预处理好的树脂用95%的乙醇溶胀后进行湿法装柱,装入 Φ 2.5 cm×30 cm的玻璃层析柱中,柱床体积(BV)为100 mL。用去离子水平衡柱子并排去层析

柱中的气泡。使用去离子水复溶美藤果壳酚类物质的粗提物,得到不同质量浓度的待上样液。将待上样液进行上样,用恒流泵控制上样速度和流出液速度,使用紫外分光光度计检测流出液的吸光度,并使用部分收集器进行收集,10 mL 为 1 管。当流出液的吸光度达到进样液吸光度的 1/10 时停止上样(此点认为酚类化合物已透过)。动态吸附量按下式进行计算。

$$Q = (C_1 - C_2) \times V/V_r$$

式中: Q 为吸附量,mg/100 mL; C_1 为上样液总酚质量浓度,mg/mL; C_2 为流出液的总酚质量浓度,mg/mL; V 为流出液体积,mL; V_r 为柱床体积,100 mL。

1.2.5.2 动态洗脱实验

先使用去离子水对吸附饱和的树脂洗去可溶性糖以及蛋白质,洗至流出液还原糖反应呈阴性^[16]。然后对大孔树脂进行动态洗脱实验。动态解吸率按下式进行计算。

$$P = C_p \times V_p / (Q \times V_r) \times 100\%$$

式中: P 为动态解吸率,%; C_p 为洗脱流出液的总酚质量浓度,mg/mL; V_p 为洗脱流出液体积,mL。

2 结果与讨论

2.1 静态吸附、解吸实验结果

以大孔树脂的吸附量、吸附率、解吸量和解吸率为评价指标,将 AB-8、HPD300、NKA-9、D101、S-8、DM130 6 种树脂进行了比较,结果见表 1。从表 1 可以看出,S-8 树脂有最高的吸附率,但解吸率仅为 0.7%。HPD300 和 NKA-9 的吸附能力相近,但 NKA-9 的解吸率明显高于 HPD-300,因此选择 NKA-9 为美藤果酚类物质的最佳纯化树脂。

表 1 6 种不同型号树脂吸附和解吸性能的比较

树脂型号	吸附量/(mg/g)	吸附率/%	解吸量/(mg/g)	解吸率/%
AB-8	8.6	60.4	5.5	64.0
HPD300	9.7	72.1	7.6	78.4
NKA-9	10.4	71.8	9.0	86.5
D101	7.8	50.0	4.2	53.8
S-8	14.7	90.6	0.1	0.7
DM130	8.5	65.7	6.0	70.6

2.2 动态吸附、解吸实验结果

2.2.1 上样液质量浓度对吸附效果的影响

当上样液质量浓度过低时,纯化效率低,上样液质量浓度过高时,树脂吸附不完全。控制上样速度为 2.0 mL/min,分别采用 2、5、10、20、30、40 mg/mL 上样液质量浓度进行实验,结果见图 1。从图 1 可

以看出,在质量浓度为 2 ~ 10 mg/mL 范围内,树脂的吸附量随上样液质量浓度的增大而增大,当上样液质量浓度大于 10 mg/mL 时,吸附量增加趋于平缓,且当上样液质量浓度大于 10 mg/mL 时,上样液开始出现沉淀,上样后在柱床的上层出现絮状沉淀,不利于大孔树脂的吸附。综上,选 10 mg/mL 为本实验中的上样液质量浓度。

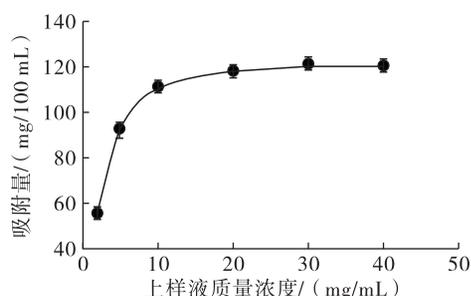


图 1 上样液质量浓度对吸附量的影响

2.2.2 上样速度对吸附效果的影响

控制上样液质量浓度为 10 mg/mL,分别采用 0.8、1.2、1.6、2.0、2.4、2.8 mL/min 的上样速度进行实验,结果见图 2。从图 2 可以看出,在上样速度 0.8 ~ 2.0 mL/min 范围内,大孔树脂的吸附量变化很小,当上样速度大于 2.0 mL/min 时,吸附量随上样速度的增大呈直线下降。而当上样速度较小时,吸附效率低,因此选 2.0 mL/min 为最佳上样速度。

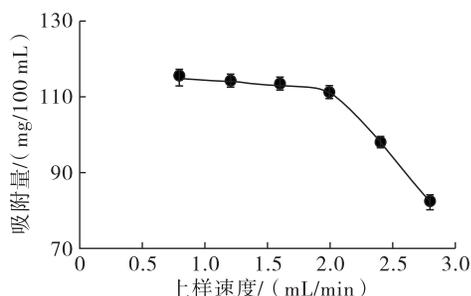


图 2 上样速度对吸附量的影响

2.2.3 NKA-9 型大孔树脂动态吸附曲线

根据上述确定的两个最佳上样条件,取上样液质量浓度为 10 mg/mL 的美藤果壳酚类溶液,以 2.0 mL/min 的上样速度进行上样,使用自动部分收集器收集流出液,10 mL 为 1 管,并测定总酚含量,以上样体积为横坐标($BV = 100$ mL),流出液的总酚质量浓度为纵坐标,绘制动态吸附曲线,结果见图 3。从图 3 可以看出,当上样体积为 3 BV(300 mL)时,酚类物质开始泄露,当上样体积到 25 BV(2 500 mL)时,大孔树脂趋于饱和。泄漏点与饱和点之间有一定的差距,大孔树脂达到完全饱和和吸附,需连续上样 25 BV,因此在实际生产中,可选用循环上样的模式。

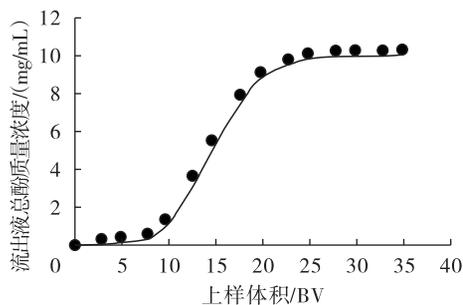


图3 NKA-9型大孔树脂动态吸附曲线

2.2.4 洗脱剂的体积分数对解吸率的影响

NKA-9为中等极性的大孔树脂,需选择极性较强的溶剂作为洗脱剂。以达到洗脱目的,且使用中较为安全环保且经济为原则,选用乙醇作为洗脱剂。分别使用体积分数为15%、30%、50%、70%、90%、100%的乙醇对吸附有美藤果酚类物质的大孔树脂柱在洗脱速度1.0 mL/min、洗脱液体积2.5 BV条件下进行洗脱,收集洗脱液定容并测定总酚的质量浓度,计算解吸率,结果见图4。从图4可以看出,酚类物质与大孔树脂存在强烈的氢键作用,低体积分数的乙醇很难将酚类物质洗脱下来,随着乙醇体积分数的增加,解吸率也随之增加。当乙醇体积分数为70%时,解吸率为89.1%,乙醇体积分数为90%时,解吸率为90.1%,差别较小,因此选用体积分数70%乙醇为最佳的洗脱剂。

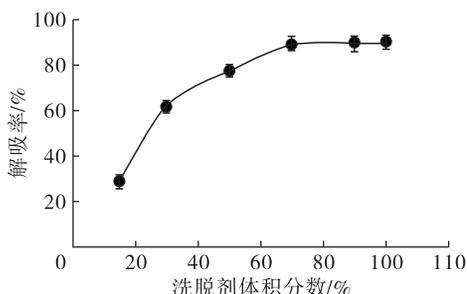


图4 洗脱剂体积分数对解吸率的影响

2.2.5 洗脱速度对解吸率的影响

用体积分数为70%的乙醇,分别使用0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL/min的洗脱速度,在洗脱液体积2.5 BV条件下对吸附有美藤果酚类物质的大孔树脂柱进行洗脱,收集洗脱液定容并测定总酚的质量浓度,计算解吸率,结果见图5。

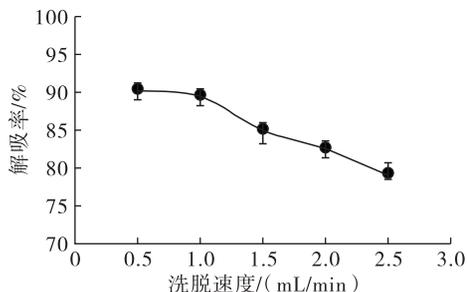


图5 洗脱速度对解吸率的影响

从图5可以看出,当洗脱速度大于1.0 mL/min时,解吸率随洗脱速度的增大而减小。当洗脱速度过小时,洗脱周期较长,因此1.0 mL/min的洗脱速度较为合适。

2.2.6 NKA-9型大孔树脂动态解吸曲线

采用循环上样使得大孔树脂柱达到吸附饱和,用去离子水冲洗柱子,洗至流出液还原糖反应呈阴性,再用70%的乙醇,洗脱速度为1.0 mL/min,对柱子进行洗脱,以10 mL为1管收集洗脱液,测定总酚的质量浓度,绘制动态解吸曲线,结果见图6。从图6可以看出,用2.5 BV(250 mL)左右的洗脱液可将大孔树脂吸附的酚类物质全部洗下来。收集0.25~2.5 BV(25~250 mL)之间的洗脱液,经干燥得到纯化的美藤果壳酚类物质。

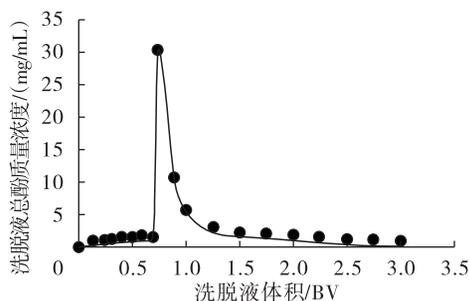


图6 NKA-9动态解吸曲线

通过动态吸附和解吸实验得到NKA-9型大孔树脂纯化美藤果壳酚类物质的最佳工艺条件为:上样液质量浓度10 mg/mL,上样速度2.0 mL/min;以70%的乙醇溶液洗脱,洗脱速度1.0 mL/min,洗脱液体积2.5 BV。在最佳工艺条件下纯化的美藤果壳酚类物质的总酚含量为73.8%,对比于粗提物中的总酚含量33.2%,提高了1.2倍。

3 结论

本文使用乙醇提取得到美藤果壳酚类物质的粗提物,并用大孔树脂将其纯化,探讨大孔树脂纯化的工艺条件。以静态吸附和解吸性能为标准,比较了AB-8、HPD300、NKA-9、D101、S-8、DM130 6种型号的大孔树脂,得出NKA-9对于纯化美藤果壳酚类物质有最好的效果。同时对NKA-9进行了动态吸附和解吸实验,得到NKA-9型大孔树脂纯化美藤果壳酚类物质的最佳工艺条件为:上样液质量浓度10 mg/mL,上样速度2.0 mL/min,以70%的乙醇溶液洗脱,洗脱速度1.0 mL/min,洗脱液体积2.5 BV。在最佳工艺条件下纯化后的美藤果壳酚类物质的总酚含量为73.8%,对比于粗提物中的总酚含量33.2%,提高了1.2倍,说明NKA-9型号树脂能够有效地纯化美藤果壳酚类物质。

(下转第128页)

糖得率的因素依次为:液料比 > 超声时间 > 超声功率。在最佳条件下,即提取温度 40 °C、液料比 14:1、超声功率 140 W、超声时间 76 min 时,发芽糙米米糠多糖得率为 2.85%。发芽糙米米糠多糖具有较强的抗氧化能力,不仅比普通米糠水提多糖的抗氧化活性高,而且对·OH 的清除能力高于 V_C。提示发芽糙米米糠多糖有更好的功能活性。

参考文献:

- [1] 张守文. 糙米的营养保健功能[J]. 粮食与饲料工业, 2003(12): 38-41.
- [2] 高丽红, 吴盛文, 何旭孔, 等. 糙米及其制品营养成分含量的比较[J]. 粮食与饲料工业, 2016(5): 4-5.
- [3] ZHOU Z, RAOBRDS K, HELLIWELL S, et al. Composition and functional properties of rice [J]. Int J Food Sci Technol, 2002, 37(8): 849-868.
- [4] LAMBERTS L, DEBIC E, VANDEPUTTE G E, et al. Effect of milling on colour and nutritional properties of rice [J]. Food Chem, 2007, 100(4): 1496-1503.
- [5] 王文平, 郭祀远, 李琳, 等. 苯酚-硫酸法测定野木瓜中多糖含量的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(4): 276-279.
- [6] 董群, 郑丽伊. 改良的苯酚-硫酸法测定多糖和寡糖含

(上接第 123 页)

参考文献:

- [1] GUILLÉN M D, RUIZ A, CABO N, et al. Characterization of sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil by FTIR spectroscopy and ¹H NMR. Comparison with linseed oil [J]. J Am Oil Chem Soc, 2003, 80(8): 755-762.
- [2] 刘瑞营. 提升生活品质造福人类健康——西双版纳印奇生物资源开发有限公司创新发展美藤果产业[J]. 中国科技产业, 2015(10): 78.
- [3] 张思佳, 黄璐, 熊周权, 等. 美藤果油研究进展[J]. 粮食与油脂, 2013, 26(6): 4-6.
- [4] 张嘉怡, 杜冰, 谢蓝华, 等. 绿色新资源食品——美藤果油[J]. 中国油脂, 2013, 38(7): 1-4.
- [5] 陈亮, 李医明, 陈凯先, 等. 植物多酚类成分提取分离研究进展[J]. 中草药, 2013(11): 1501-1507.
- [6] HUANG W Y, CAI Y Z, ZHANG Y. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention [J]. Nutr Cancer, 2009, 62(1): 1-20.
- [7] 杨国峰, 周建新, 汪海峰, 等. 花生壳提取物的制备及其抗氧化与抗菌活性的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2007(2): 97-101.
- [8] 王彩云. 石榴叶多酚的提取富集工艺及其药理作用研究[D]. 北京:北京林业大学, 2013.
- [9] 王超华. 柿叶中酚类物质的提取、纯化及初步鉴定研究

量的研究[J]. 中国药学杂志, 1996, 31(9): 550-553.

- [7] 郭磊, 王嘉新, 皮佳玉, 等. 腾冲红花油茶多糖体外抗氧化活性研究[J]. 中国油脂, 2014, 39(3): 37-39.
- [8] 朱艳华, 谭军. 玉米多肽抗氧化作用的研究[J]. 中国粮油学报, 2008, 23(1): 36-43.
- [9] 叶文姣, 冯武, 黄文, 等. 蛹虫草胞外多糖的体外抗氧化活性分析[J]. 华中农业大学学报, 2014, 33(5): 105-110.
- [10] 涂宗财, 寇玉, 王辉, 等. 荷叶多糖的超声波辅助提取和抗氧化活性[J]. 食品科学, 2013, 34(16): 108-112.
- [11] 魏明, 王晨, 杨超英, 等. 酶法协同超声波提取米糠多糖及其抗氧化活性研究[J]. 中国油脂, 2015, 40(1): 78-82.
- [12] 殷军, 葛青, 毛建卫, 等. 竹叶多糖的组分及抗氧化活性分析[J]. 食品工业科技, 2013, 34(2): 100-103.
- [13] 董万领, 闫晓明, 程江华, 等. 响应面法优化水提菜籽多糖工艺[J]. 中国油脂, 2014, 39(4): 87-89.
- [14] ZHA X Q, WANG J H, YANG X F, et al. Antioxidant properties of polysaccharide fractions with different molecular mass extracted with hot-water from rice bran [J]. Carbohydr Polym, 2009, 78(3): 570-575.

[D]. 长沙:湖南农业大学, 2010.

- [10] 鲁晓翔, 赵晨光, 连喜军. 板栗壳多酚提取条件及其抗氧化性研究[J]. 食品研究与开发, 2008(3): 32-36.
- [11] GARRIDO I, MONAGAS M, GÓMEZ-COROVÉS C, et al. Extracción de antioxidantes a partir de subproductos del procesado de la almendra [J]. Grasas Y Aceites, 2007, 58(2): 130-135.
- [12] WEISZ G M, KAMMERER D R, CARLE R. Identification and quantification of phenolic compounds from sunflower (*Helianthus annuus* L.) kernels and shells by HPLC-DAD/ESI-MSn [J]. Food Chem, 2009, 115(2): 758-765.
- [13] SHAHIDI F, ALASALVAR C, LIYANA-PATHIRANA C M. Antioxidant phytochemicals in hazelnut kernel (*Corylus avellana* L.) and hazelnut byproducts [J]. J Agric Food Chem, 2007, 55(4): 1212-1220.
- [14] 卜彦花, 周娜娜, 王春悦, 等. 福林酚试剂法和紫外分光光度法测定冬枣多酚含量的比较研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(1): 212-217.
- [15] 何志勇. 橄榄酚类化合物的分离纯化和结构研究[D]. 江苏无锡:江南大学, 2007.
- [16] 童鑫, 张瑞芬, 邓媛元, 等. 米糠酚类物质的大孔树脂分离纯化工艺[J]. 中国农业科学, 2016, 49(19): 3818-3830.