

大孔吸附树脂纯化核桃内种皮总多酚的工艺优选

张春梅¹, 陈朝银², 赵声兰^{1*}, 谢定岐¹, 樊启猛¹

(1. 云南中医学院中药学院, 昆明 650500; 2. 昆明理工大学生命科学与技术学院, 昆明 650500)

[摘要] **目的:** 优选大孔吸附树脂纯化核桃内种皮总多酚的工艺条件。**方法:** 以核桃内种皮为原料, 采用乙醇回流法提取总多酚, 通过静态吸附-洗脱试验筛选大孔吸附树脂型号, 通过单因素试验考察上样液质量浓度、上样量、吸附流速、洗脱液浓度和用量等对核桃内种皮总多酚大孔树脂纯化工艺的影响。**结果:** 选择 X-5 型大孔树脂, 其最佳纯化工艺条件为上柱液 pH 5.0, 质量浓度 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 吸附流速 $3 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, 上样量 9.5 BV, 加 70% 乙醇 2 BV 洗脱, 收集洗脱液; 总多酚纯度由粗提物的 64.52% 提高至 79.64%, 转移率 89.83%。**结论:** 优选的纯化工艺稳定可行, X-5 型大孔树脂适用于核桃内种皮总多酚的初步纯化。

[关键词] 核桃内种皮; 总多酚; 大孔吸附树脂; 没食子酸; 静态吸附-洗脱试验

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)17-0027-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014170027

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140715.1325.005.html>

[网络出版时间] 2014-07-15 13:25

Optimization of Purification Technology for Total Polyphenols from Juglandis Semen Kernel Pellicles by Macroporous Resin

ZHANG Chun-mei¹, CHEN Chao-yin², ZHAO Sheng-lan^{1*}, XIE Ding-qi¹, FAN Qi-meng¹

(1. Faculty of Chinese Traditional Medicine (TCM), Yunnan University of TCM, Kunming 650500, China;

2. Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and

Technology, Kunming 650500, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize purification technology of total polyphenols from Juglandis Semen kernel pellicles by macroporous resin. **Method:** With Juglandis Semen kernel pellicles as raw material, total polyphenols was extracted by ethanol refluxing method, static adsorption-elution test for total polyphenols were carried out to select proper macroporous resin, single factor tests were adopted to optimize purification process by taking the concentration of sample solution, adsorption flow rate, eluent dosage and so on as factors. **Result:** X-5 macroporous resin showed the best separation efficiency by comparing with other resins, its optimum purification technology was as follows; the concentration of sample solution $3.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ with pH of 5.0, adsorption rate of $3 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, sample volume of 9.5 BV, eluted with 2 BV of 70% ethanol, collected eluent; Purity of total polyphenol was enhanced from 64.52% to 79.64% with transfer rate of 89.83% in extract. **Conclusion:** This optimized process was stable and feasible, X-5 resin was suitable for initial purification of total polyphenols from Juglandis Semen kernel pellicles.

[Key words] Juglandis Semen kernel pellicles; total polyphenols; macroporous resin; gallic acid; static adsorption-elution test

[收稿日期] 20140509(014)

[基金项目] 国家科技部科技支撑计划项目(2011BAD46B03, 2011BAD46B02); 国家中医药管理局傣药学学科建设科研项目(30970101808)

[第一作者] 张春梅, 在读硕士, 从事中药资源开发与利用研究, Tel: 15877958868, E-mail: 441831738@qq.com

[通讯作者] * 赵声兰, 硕士, 教授, 从事药食资源开发与利用研究, Tel: 13330431529, E-mail: zhaoshenglan@163.com

核桃原产于近东地区,又称胡桃、羌桃,与扁桃、腰果、榛子并称为世界著名的“四大干果”^[1]。我国核桃资源非常丰富,核桃内种皮作为核桃产品生产过程中的主要副产物,约占整个核桃仁质量的 10%^[2],具有重要生理和药理作用,其中多酚类成分含量较高^[3],且不同品种中含量差异较大^[4]。核桃内种皮总多酚具有抗氧化、清除自由基、降血脂、护肝、抑菌、抗癌等生物活性^[5-6]。大孔吸附树脂被广泛用于中药有效成分的分离纯化^[7-8],但用于核桃内种皮总多酚纯化的文献鲜有报道^[9]。本实验通过比较 NKA-9, D101, HPD-100, X-5 和 AB-8 型共 5 种大孔吸附树脂^[10-12]对核桃内种皮总多酚的吸附-洗脱性能,利用单因素试验优选该类成分的纯化工艺,为核桃资源的充分利用与产品开发提供参考。

1 材料

UV759S 型紫外-可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),CP 214 型电子分析天平(美国奥豪斯仪器上海有限公司)。鲜核桃购自漾濞核桃有限公司,经云南林业科学研究院宁德鲁研究员鉴定为胡桃科植物核桃 *Juglans regia* L. 的成熟果实; NKA-9, D101, HPD-100, X-5, AB-8 型大孔吸附树脂(河北沧州宝恩吸附材料科技有限公司),没食子酸对照品(西安开来生物工程有限公司,批号 K121113),福林酚试剂(北京索莱宝科技有限公司),水为蒸馏水,其他试剂均为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 核桃内种皮总多酚的含量测定 采用 Folin-Ciocalteu 比色法^[4]。精密称取没食子酸对照品 0.01 g 至 100 mL 量瓶中,加水溶解并定容至刻度,摇匀,得 100 mg·L⁻¹ 储备液,临用现配。精密移取储备液 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中,加水定容,摇匀,得系列对照品溶液。精密吸取系列对照品溶液 1 mL 置于 10 mL 具塞试管内,加入 10% 福林酚试剂 5.0 mL,充分摇匀,5 min 后加入 7.5% 碳酸钠溶液 4.0 mL(前后间隔不超过 8 min),混匀,加水定容,室温下避光放置反应 1 h,于 765 nm 处测定吸光度(A),以质量浓度(C)为横坐标,A 为纵坐标,得没食子酸回归方程 $A = 0.0114C + 0.0189 (r = 0.9993)$,线性范围 0 ~ 80 mg·L⁻¹。以没食子酸为对照品,测得核桃内种皮中总多酚质量分数 19.63%。

2.2 树脂类型的选择

2.2.1 树脂的预处理 取在 95% 乙醇中浸泡并充分溶胀的大孔吸附树脂,湿法装柱。加 95% 乙醇洗

至流出液加水无浑浊,水洗至无醇味,加 5% 盐酸溶液洗脱,水洗至中性,加 5% 氢氧化钠溶液洗脱,水洗至中性,备用。

2.2.2 提取液的制备 在前期研究基础上,取自然干燥并经粉碎的核桃内种皮,加 60 倍量 60% 乙醇于 75 °C 回流提取 3 次,每次 1 h,滤过,合并滤液,减压浓缩,冷冻干燥制成核桃内种皮总多酚粗提物。称取一定量粗提物,加水溶解,制得核桃内种皮总多酚供试液。

2.2.3 静态吸附-洗脱试验 称取经滤纸吸干的 NKA-9, D101, HPD-100, X-5, AB-8 型 5 种预处理好的树脂各 5 g,分别置于 100 mL 锥形瓶中,加入 2.5 g·L⁻¹ 核桃内种皮总多酚样品溶液 20 mL,室温恒速震荡吸附 12 h,分别吸取吸附后的上清液 1 mL,按 2.1 项下方法测定总多酚含量;将静态吸附饱和后的树脂抽滤,洗净后置于 100 mL 锥形瓶中,加入 70% 乙醇 50 mL,室温恒速震荡解吸 6 h,吸取洗脱液 1 mL,按 2.1 项下方法测定总多酚含量,考察不同树脂对核桃内种皮总多酚的静态吸附-洗脱特性,见表 1。结果表明不同型号树脂对核桃内种皮总多酚的吸附率相差不大,但洗脱率存在一定差别,综合考虑,确定选择 X-5 型大孔树脂。

表 1 不同型号树脂对核桃内种皮总多酚的吸附率与洗脱率

树脂型号	总多酚质量浓度/g·L ⁻¹			吸附量 /mg·g ⁻¹	吸附率 /%	洗脱率 /%
	吸附前 药液	吸附饱和 后溶液	洗脱液			
X-5	1.825	0.184	0.525	6.56	89.94	80.52
D101	1.825	0.166	0.485	6.63	90.90	73.63
HPD-100	1.825	0.183	0.519	6.58	89.96	77.61
AB-8	1.825	0.230	0.511	6.32	87.38	80.74
NKA-9	1.825	0.234	0.478	6.30	87.18	75.68

2.3 静态吸附动力学特性的测定 准确称取 X-5 型树脂 5 g 置于 100 mL 锥形瓶中,加入 2.5 g·L⁻¹ 核桃内种皮总多酚 20 mL,室温震荡吸附 6 h,每隔 1 h 取上清液 1 mL 按 2.1 项下方法测定 A,绘制静态吸附动力学曲线,见图 1。结果表明 X-5 型树脂静态吸附 2 h 后达 81.18%,之后随着时间的推移吸附率逐渐趋于稳定。

2.4 上柱液 pH 对 X-5 型树脂吸附性能的影响 准确称取 X-5 型树脂 5 g,共 6 份,分别置于 6 个锥形瓶中,依次加入 pH 为 3,4,5,6,7,8 的 2.5 g·L⁻¹ 核桃内种皮总多酚供试液 20 mL,室温震荡,吸附饱和后取上清液 1 mL,按 2.1 项下方法测定总多

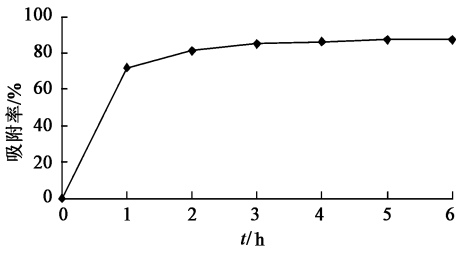


图1 X-5型树脂静态吸附核桃内种皮总多酚动力学曲线

酚含量,计算核桃内种皮总多酚的吸附率分别为 94.49%, 89.75%, 89.58%, 87.54%, 88.04%, 80.65%。试验过程中发现在上样液 pH 3 时,吸附过程会产生大量絮状沉淀,上柱极易阻塞树脂柱; pH 4 和 5 时,吸附率相近而且不产生絮状沉淀,故选择上样液 pH 5.0。

2.5 动态吸附试验

2.5.1 上样液质量浓度 取已处理好的 X-5 型树脂 20 mL 装入 1.2 cm × 40 cm 的层析柱中,共 4 份,分别加入 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 g · L⁻¹ 上样液 (pH 5.0) 以 3 BV · h⁻¹ 的流速上柱,收集流出液,按 2.1 项下方法测定总多酚含量,设定流出液中总多酚质量浓度 (C) 达上样液质量浓度 (C₀) 的 10% 为泄露点,停止上样,此时上样液体积分别为 6.5, 9.5, 10, 16.5 BV, 考察 C₀ 对 X-5 型树脂吸附核桃内种皮总多酚的影响,绘制动态吸附曲线,见图 2。结果表明 C₀ < 3.0 g · L⁻¹ 时,随 C₀ 的增加,树脂对总多酚的吸附量增加,流出液中总多酚含量很少;当 C₀ 增加至 4.0 g · L⁻¹ 时,流出液中总多酚含量迅速增加,上柱液为 6.5 BV 时达泄露点,树脂吸附量降低,故选择 3.0 g · L⁻¹。

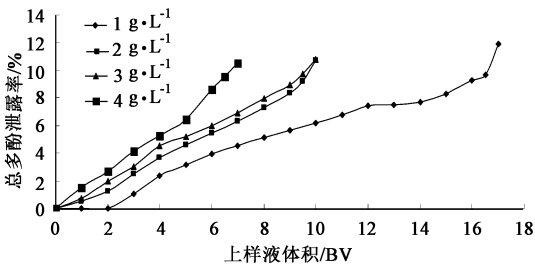


图2 上样液质量浓度对 X-5 型树脂吸附核桃内种皮总多酚的影响

2.5.2 吸附流速 取 3.0 g · L⁻¹ 上样液 (pH 5.0) 分别以 1, 2, 3, 4, 6 BV · h⁻¹ 的流速过柱,按 2.1 项下方法测定流出液中总多酚含量,达泄露点时停止上样,上样液体积分别为 200, 200, 200, 170, 120 mL, 见图 3。结果发现上柱流速太慢 (< 3 BV · h⁻¹), 影

响工作效率;流速太快则核桃内种皮总多酚与树脂接触时间太短,导致吸附率降低,故选择吸附流速 3 BV · h⁻¹。

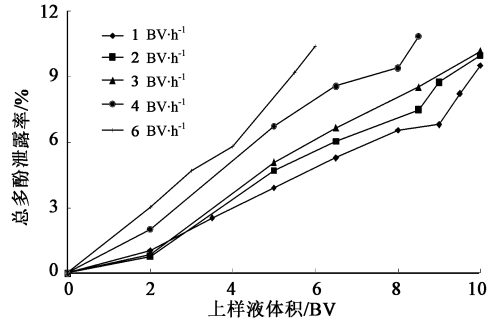


图3 吸附流速对 X-5 型树脂吸附核桃内种皮总多酚的影响

2.5.3 上样液体积 取 3 g · L⁻¹ 上样液 (pH 5.0) 以 3 BV · h⁻¹ 的流速过柱,收集流出液,每 0.5 BV 为 1 份,测定总多酚含量,达泄露点时停止上样。结果表明随上样液体积的增加,总多酚泄露量从 0 逐渐增加,当上样体积 < 6 BV 时,泄露率 < 4.0%, 之后随上样液体积的增加,泄露率增加较快,当上样量为 9.5 BV 时,泄露率 9.8, 上样量为 10 BV 时,泄露率达 10.59。综合树脂利用率考虑,选择上样液体积 9.5 BV。

2.5.4 洗脱液质量浓度 取 3 g · L⁻¹ 上样液 (pH 5.0) 9.5 BV 以 3 BV · h⁻¹ 的流速过柱,吸附饱和后,加水 3 BV 快速淋洗,分别加 40%, 60%, 70%, 80%, 90% 的乙醇溶液各 5 BV 以 3 BV · h⁻¹ 的流速洗脱,收集洗脱液,按 2.1 项下方法测定总多酚含量,见图 4。结果表明随乙醇体积分数由 40% 增加至 70%, 总多酚洗脱率增加,但纯度偏低;至 70% 时,总多酚洗脱率和纯度达最大值,之后乙醇体积分数再增加时,洗脱率略有下降。

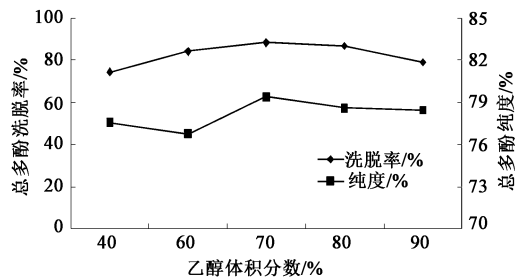


图4 乙醇体积分数对 X-5 型树脂吸附核桃内种皮总多酚的影响

2.5.5 洗脱液体积 按优选的吸附条件上样,加水 3 BV 快速淋洗,弃去洗脱液,加 70% 乙醇洗脱,收集洗脱液,按 2.1 项下方法测定洗脱液中总多酚含量,

计算洗脱率,结果见图 5,表明 70% 乙醇为 0.25 BV 时,洗脱率迅速增加,至 2 BV 时达最大值,之后随洗脱液体积的增加,洗脱率基本保持不变。

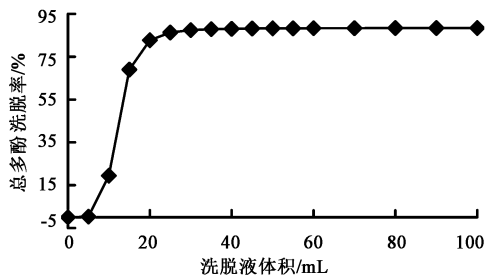


图 5 洗脱液体积对 X-5 型树脂吸附核桃内种皮总多酚的影响

2.5.6 恒定洗脱特性考察 取 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 上样液 9.5 BV 按优选的吸附条件过柱,吸附平衡后,加水 3 BV 快速洗去杂质,加 70% 乙醇洗脱,收集洗脱液,每 0.25 BV 为 1 份,测定洗脱液中总多酚含量,绘制动态洗脱曲线,见图 6。结果表明 70% 乙醇对核桃内种皮总多酚具有良好的洗脱性能,当洗脱液达 2 BV 时,总多酚基本洗脱完全,且洗脱峰集中,对称性好,无明显拖尾现象,计算洗脱率 88.08%,总多酚回收率 63.13%,提示洗脱效果良好。

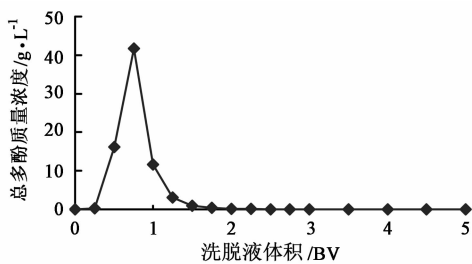


图 6 X-5 型树脂对核桃内种皮总多酚的洗脱曲线

2.6 验证试验 取纯度 64.52% 的核桃内种皮总多酚粗提取物 3 份,加水制备上样液,按优选的工艺条件进行验证试验,结果表明经 X-5 型树脂初步纯化后总多酚纯度由 64.52% 分别提高至 79.66%, 79.59%, 79.68%, 转移率分别为 89.87%, 89.72%, 89.90%, 表明优选的工艺稳定可行,适宜核桃内种皮总多酚的初步分离纯化。

3 讨论

目前,国内外利用大孔树脂纯化多酚的报道较多,但鲜少报道大孔吸附树脂对核桃内种皮多酚的

分离纯化,本文筛选的 X-5 型大孔吸附树脂纯化核桃内种皮总多酚时,按部分收集流出液检测泄漏量,通过考察吸附、洗脱动态特性过程,从而分析大孔树脂的动态特性曲线,得出 X-5 型大孔吸附树脂吸附率和洗脱率较高,纯化过程损失少,得率高,纯度提高了约 15%,转移率 > 89%,适用于核桃内种皮总多酚粗提物的初步分离纯化,为核桃内种皮的开发利用和活性成分筛选提供参考。

[参考文献]

- [1] 万政敏. 核桃青皮中多酚类物质及其抗氧化性的分析[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2004.
- [2] 万政敏,郝艳宾,杨春梅,等. 核桃仁种皮中的多酚类物质高压液相色谱分析[J]. 食品工业科技,2007,28(7):212.
- [3] 王勇,吴国良,徐彦岗,等. 核桃果实中酚类物质含量变化研究[J]. 中国农学通报,2004,20(6):234.
- [4] 张春梅,陈朝银,林玉萍,等. 几种云南核桃内种皮黄酮及多酚含量的测定[J]. 云南中医学院学报,2013,36(2):10.
- [5] Alasalvar C, Shahidi F. Natural antioxidants in tree nuts [J]. Eur J Lipid Sci Tech, 2009, 111(11):1056.
- [6] Shimoda H, Tanaka J, Kikuchi M, et al. Walnut polyphenols prevent liver damage induced by carbon tetrachloride and d-galactosamine: hepatoprotective hydrolyzable tannins in the kernel pellicles of walnut [J]. J Agr Food Chem, 2008, 56(12):4444.
- [7] 汪洪武,刘艳清. 大孔吸附树脂的应用研究进展[J]. 中药材,2005,28(4):353.
- [8] 黄少伟,池汝安,张越非,等. 大孔吸附树脂分离纯化土茯苓总黄酮[J]. 中国中药杂志,2008,33(10):1133.
- [9] 邵海燕,李兴飞,陈杭君,等. 山核桃多酚物质提取及抗氧化研究进展[J]. 食品科学,2011,32(5):336.
- [10] 黄阿根,董瑞健,谢凯舟. 茶树花多酚大孔树脂纯化工艺研究[J]. 农业工程学报,2007,23(9):239.
- [11] 艾志录,王育红,王海,等. 大孔树脂对苹果渣中多酚物质的吸附研究[J]. 农业工程学报,2007,23(8):245.
- [12] 宋倩,赵声兰,刘芳,等. 大孔吸附树脂分离纯化核桃壳总黄酮[J]. 食品与发酵工业,2012,38(12):180.

[责任编辑 刘德文]