

中南林业科技大学

硕士学位论文

槟榔多酚提取、纯化及组分分析

姓名：曾义鑫

申请学位级别：硕士

专业：食品加工及贮藏工程

指导教师：周文化

20120601

# 摘 要

槟榔是棕榈科槟榔属植物槟榔的种子，主要种植于海南、福建、云南，广西地区也有少量种植，槟榔中含有约 15%的酚类物质，主要分布于根、叶、花、及果实中，新鲜的槟榔果中酚类物质含量较高。槟榔多酚作为槟榔的主要活性物质具有抗氧化、抑菌、抗衰老等作用。目前槟榔产业的发展方向为槟榔的精深加工及槟榔保健食品的开发，而研究槟榔多酚，对提高槟榔产品功能特性，开发新型槟榔保健食品具有重要意义，本论文首先采用溶剂提取法对槟榔多酚进行了提取并对提取工艺进行了优化，其次，采用大孔树脂对提取的槟榔多酚进行了纯化，优化了纯化工艺，最后，采用超高效液相色谱与质谱联用技术对纯化后的槟榔多酚进行了结构鉴定，为槟榔功能特性的研究及槟榔高附加值产品的开发提供理论基础。

(1) 槟榔多酚的提取及工艺优化：采用溶剂提取法对槟榔多酚进行提取，通过比较不同提取剂对槟榔多酚的提取效果的影响得到，甲醇的提取效果最好，提取率为 15.82mg/g，确定甲醇为最佳提取剂，通过单因素试验，考察了提取温度、提取时间、料液比、甲醇浓度对对槟榔多酚提取效果的影响，并在此基础上，采用响应曲面的方法，对槟榔多酚的最佳提取条件进行优化，结果表明，槟榔多酚提取的最佳工艺条件为：提取温度 62℃，提取时间 53min、料液比 1:16、甲醇浓度 86.2%，槟榔多酚提取率为 17.82 mg/g。

(2) 槟榔多酚的纯化：采用大孔树脂吸附法对槟榔多酚进行了纯化，通过静态吸附与解析试验研究得到 S-8 型树脂的吸附量和解析量均最大，分别为 14.01 mg/g 和 28.44 mg/g，适宜用于槟榔多酚的纯化，通过动态吸附试验考察了上柱液 pH，上柱液体积和上柱液浓度对 S-8 型大孔树脂对槟榔多酚吸附性能的影响，并采用响应曲面的方法对最佳吸附工艺条件进行优化，结果得到最佳吸附条件为：上柱液浓 2.23mg/mL，上柱液体积 6.6BV，上柱液 pH2.2，此条件下吸附率为 93.062%，同时通过动态解析试验研究了解析液体积，解析液 pH 和解析液浓度对大孔树脂解析率的影响，并在此基础上，采用响应曲面法对最佳解析工艺条件进行了优化，结果得到最佳解析条件为解析液浓度 77.4%，解析液体积 6.5BV，解析液 pH3.8，最佳解析率为 92.52%。

(3) 槟榔多酚结构鉴定：采用超高效液相色谱与质谱连用技术对纯化后的槟榔多酚进行了结构鉴定，结果表明槟榔多酚中含有芦丁，绿原酸，没食子酸和表儿茶素，质荷比 (m/z) 分别为 609.2，353.5、169.1 和 291.5。

关键词：槟榔；多酚；纯化；结构鉴定

## ABSTRACT

Areca nut is the seed of *Areca Catechu L* which belongs to palmae. It was widely planted in Hainan, Fujian and Yunnan province; some was planted in Guangxi province. There are about 15% polyphenols in *Areca Catechu L* and mainly distributed in root, leaves, flower and seed. The fresh areca nut contains higher polyphenols. The polyphenols in areca nut has the effect of antioxidant, bacteriostasis and antiaging as the functional substance of areca nut. Deeping processing and protective foods of areca nut were the important aspect of areca industrial so that it was important to study on the polyphenols of areca in order to develop health food of areca nut and improve the functional ability of areca. First of all the polyphenols of areca nut was extracted by solvent and the extraction conditions were optimized in this paper; second the crude polyphenols extracted by solvent was purified by macroporous resin Adsorption and the conditions were optimized; third the constituent of polyphenols which was purified by macroporous resin was identified by HPLC-MS. All the research above were aimed to provide the theoretical basis of developing high value-added product of areca nut and promoted the functions of areca nut.

(1) The extraction of polyphenols from areca nut and the optimized of the conditions: the polyphenols of areca nut was obtained by solvent extraction; the methanol was confirmed to be the best solvent with the extraction rate of 15.82mg/g. The effect of extraction temperature、extraction time、concentration of methanol and ratio of solid and liquid on the extraction rate was studied through the Single Factor Experiment. The conditions of extraction process were optimized by the Response Surface Method on the basis of above results. The result showed that the optimum conditions of extraction were temperature 62℃, time 53min, ratio of solid and liquid 1:16 concentration of methanol 86.2% with the extraction rate of 17.82 mg/g.

(2) The purification of crude polyphenols of areca nut: Macroporous Resin Adsorption was adopted to purify the polyphenols of areca nut and the S-8 macroporous resin was confirmed to have the best effect through the static adsorption and elution. The adsorption amount and elution amount were 14.01 mg/g and 28.44 mg/g respectively. The effect of pH 、volume of polyphenols and concentration of polyphenols on the adsorption effect of S-8 resin was studied by the dynamic

adsorption test and the adsorption conditions was optimized by the Response Surface Method. The result showed that the best adsorption conditions were: concentration of polyphenols 2.23mg/mL, volume of polyphenols 6.6BV and pH2.2 with the adsorption rate of 93.062%. Similarly the effect of volume of elution, pH of elution and concentration of elution on the elution effect was studied and the elution conditions were optimized by the Response Surface Method. The result showed that the best elution conditions were: elution volume 6.5BV, elution concentration 77.4%, elution pH3.8 and the elution rate was 92.52%.

(3) The constituent determination of polyphenols of areca nut: the HPLC-MS was adopted to identify the component of areca nut polyphenols and the result showed that it contains rutin, chlorogenic acid, gallic acid and catechin. The (m/z) were 609.2, 353.5, 169.1 and 291.5 respectively.

**Keywords: Arecanut; Polyphenols; Purified; Structural identification**

# 1. 绪论

## 1.1 植物多酚概述

植物多酚是植物体内的复杂酚类次生代谢产物，具有多元酚结构，主要存在于植物体的皮、根、叶、壳和果肉中，在自然界中的储量非常丰富，仅次于木质素、纤维素和半纤维素<sup>[1,2]</sup>。植物多酚以苯酚为基本骨架，以苯环的多羟基取代为特征，从低分子量的简单酚类到分子量大至数千道尔顿的单宁类，按结构可分为酚酸类（Phenolic acids）、类黄酮类（Flavonoids）及 1,2-二苯乙烯（Stilbenes）和木酚素类（Lignans），目前已经分离鉴定了 8000 多种多酚类物质<sup>[3,4]</sup>。

植物多酚可通过疏水键和多点氢键与生物大分子如蛋白质、多糖、生物碱发生复合反应<sup>[5,6]</sup>；多酚类物质的重要特征是具有多个临位羟基集团，这些临位羟基集团可以作为一种多基配体，与金属离子发生络合反应，形成沉淀，某些条件下植物多酚可以与高价金属离子如  $\text{Cr}^{6+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$  发生络合反应而把其从高价态还原至低价态，很多考察植物多酚抗氧化性的方法就是根据这个原理<sup>[7,8]</sup>。由于植物多酚的邻位酚羟基极易被氧化，且对活性氧、 $\text{DPPH}\cdot$ 、羟基自由基等有较强的清除能力，使植物多酚具有很强的抗氧化能力和清除自由基的能力，抗氧化性是植物多酚在各领域广泛应用的基础<sup>[9,10]</sup>。蔡为荣，周慧超，研究了荷叶多酚清除自由基的能力，结果发现荷叶多酚对  $\text{DPPH}\cdot$  的最大清除率可达 90% 且与提取物质量呈正相关关系<sup>[11]</sup>。有研究报道，青梅果多酚含量与总抗氧化能力之间存在极显著的线性相关性，相关系数达到 0.9465，表明青梅多酚类物质可能是其抗氧化作用的主要物质基础<sup>[12]</sup>。

由于具有独特的功能活性，近年来，国内外的学者对多酚进行了广泛和深入的研究，随着研究工作的不断的深入，植物多酚的各种性质被人们所发觉，多酚的应用也越来广泛，尤其是多酚的抗氧化性，抑菌性，抗衰老等性质，使得多酚在食品添加剂，保健食品、化妆品及医学等方面的应用越来越突出<sup>[13,14]</sup>。

## 1.2 植物多酚的溶剂提取技术

植物多酚种类繁多，均以混合形式存在，它们在植物体内通常与蛋白质、糖类及一些生物碱结合存在。有机溶剂萃取是最常用的植物多酚提取技术，随着研究技术的深入，科研工作者对有机溶剂萃取技术进行了很大改进，如采用超声波、微波等手段辅助处理样品，提取效率大大提高，但其基本原理仍然是相似相容的性质<sup>[15,16]</sup>。植物中的化学成分的极性差异，导致植物中不同的化学成分在不同极性的溶剂中溶解性差异较大，根据这一特点，选用与目标成分即多酚类物质极性

相似的溶剂对植物组织进行提取,溶解度大的多酚类物质将会溶出,溶解度小的物质如多糖,蛋白质等基本不会被溶出,或溶出的量很少<sup>[17,18]</sup>。当采用溶解对植物原料进行提取时,体系中溶剂的浓度远远大于植物原料细胞中溶剂的浓度,因此溶剂通过扩散进入到植物组织原料的细胞中,同时,植物组织细胞中的多酚类物质溶解于提取溶剂中,由于存在浓度梯度,溶解于溶剂中的多酚类物质不断向反应体系扩散,直至达到动态平衡后滤出溶液。有机溶剂萃取技术主要用于分离提取可溶性酚类化合物,由于酚类物质具有酚羟基、羟基、羧基等基团与蛋白质、多糖、生物碱等大分子依靠氢键和疏水键结合而存在于植物组织中,有机溶剂具有断裂氢键的作用,因此,可用甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯等有机溶剂进行萃取。一般来说,以酸酯为主体的酚类物质,采用丙酮-水体系进行萃取较好,而以缩合单宁为主体的酚类物质可采用弱酸性醇-水体系萃取,可以将以共价键与植物组织中大分子物质相交联的单宁类物质溶出。一般来说乙醚可萃取出小分子量的多酚,乙酸乙酯或丙酮-水体系能够萃取出中等分子量的单宁物质,热碱溶液浸提物则以大分子酚类物质为主。

### 1.2.1 影响植物多酚有机溶剂提取效果的主要因素

#### (一) 物料粉碎度

物料粉碎度直接影响物料与溶液的接触面积,物料粉碎度越大,比表面积越大,因此与溶剂接触的面积就越大,提取速率就越快。但物料不宜粉碎过细,物料粉碎过细,会增大反应体系中溶剂的流通,降低传质动力,因而导致提取效率降低,而且,过细的原料可能导致杂质成分的溶出,会增加过滤的难度<sup>[19]</sup>。

#### (二) 料液比

料液比是影响植物多酚溶剂提取的重要因素,料液比越大,植物细胞内多酚溶液与溶剂中多酚之间的浓度差越大,因此,提取的传质推动力就越大,提取速率就越快<sup>[20]</sup>。

#### (三) 物料与溶剂两相间的相对运动

加强物料与溶剂两相间的相对运动,可以减少两相边界上液膜的厚度,降低边界层阻力,并使液膜不断更新,从而提高浓度差,增大提取推动力,提高传质速率。最常用的方式为在提取的体系中附上搅拌装置,增大提取效率<sup>[21,22]</sup>。

#### (四) 提取温度

提取温度对提取率有一定影响,对大多数物质而言,温度升高,物质的溶解度增大,溶液粘度下降,扩散系数就增大,因此有效成分的扩散速率增大,从而提高提取速率。然而,提取温度不可过高,植物多酚属热敏性物质,温度过高可能会对植物多酚具有破坏作用。

#### (五) 溶剂

提取溶剂对提取速率的影响主要表现在, 溶剂的溶解度、亲和力、粘度、分子大小等因素。物料不同, 植物多酚的组成与性质也有很大差别, 因此, 要根据相似相容原理, 及物料种类选择溶剂, 同时还应考虑溶剂容易回收、适当的密度、表面张力、安全性及化学稳定性等问题。

### 1.3 植物多酚的分离纯化

植物多酚的分离纯化常用大孔树脂层析分离。大孔树脂是 20 世纪 60~70 年代发展起来的一类有机高分子聚合物吸附剂, 它具有物理化学稳定性高, 吸附选择性独特, 不受无机物存在的影响、再生简单、解吸条件温和, 具有快速、高效、方便、使用周期长、宜于构成闭路循环、节省费用等优点, 常用于天然产物的分离和纯化<sup>[23]</sup>。侯晓丹, 袁其朋, 田海源<sup>[24]</sup>以安徽怀远石榴加工废弃物石榴籽为研究对象, 建立了大孔吸附树脂纯化石榴籽中总多酚的方法, 选择 AB-8 大孔吸附树脂为实验树脂, 吸附过程为单分子层吸附, 吸附等温线符合 Langmuir 方程, 拟合方程为  $y=0.01211+0.02086x$ ,  $R^2=0.9977$ , 理论最大吸附量为 82.56 mg/g 湿树脂。石榴籽乙酸乙酯提取物水溶液以 0.75 mL/min 流速上柱, 以 0.5 mL/min 流速洗脱, 所收集产品总多酚含量由 53.13% 提高到 78.80%。朱静, 陆晶晶, 袁其朋<sup>[25]</sup>采用大孔树脂吸附法对石榴皮中的酚类物质进行了分离纯化, 从选用的 11 种大孔树脂中筛选出 SP-700 型号的大孔树脂对石榴皮中的多酚类物质分离纯化效果较好, 并对该型号大孔树脂对石榴皮多酚的纯化进行了动态吸附与解析实验, 结果表明, SP-700 树脂对石榴皮多酚的吸附等温线符合 Freundlich 方程, 最佳的吸附条件为: 上柱液浓度 5 mg/mL, 流速为 4~4.5 BV/h, 温度 25℃, 解析条件为: 解析液体积 3.5 BV, 解析液浓度 70% 的乙醇溶液, 此时, 纯化样的收率为 26.5 g/100 g (干石榴皮), 多酚质量分数从 48% 提高到 81.9%。此外, 通过梯度洗脱得到纯度为 88% 的鞣花酸, 为石榴皮多酚的分离提供了一条新途径。

### 1.4 槟榔多酚研究状况

槟榔 (*Areca catechu* L.) 为棕榈科常绿乔木植物, 原产中非和东南亚一带, 我国引种已有 1500 多年历史, 主要引种地有海南、台湾、云南、广西、福建、广东等省区, 其中海南生产的槟榔最为出色, 产量高, 质量好, 饮誉四海<sup>[26,27]</sup>。

槟榔果含有多人体所需的营养元素以及多种生理活性成分, 槟榔作为一种常用中药, 位居我国四大南药 (槟榔、益智、砂仁、巴戟) 之首<sup>[28]</sup>。经植物化学成分现代化学研究证实, 槟榔种子含生物碱约 0.3%-0.6%, 主要为槟榔碱 (Arecoline), 含量 0.1~0.5%; 其余有槟榔次碱 (Arecaine)、去甲基槟榔碱 (Guvacine)、异去甲基槟榔次碱 (Isoguvacine)、槟榔副碱 (ArecoLine) 及高槟

榔碱(Homoarecoline)等,均与鞣酸结合形式存在<sup>[29,30]</sup>。槟榔果中含有大约 15% 的酚类物质(包括缩合鞣质、水解类鞣质及非丹宁类黄烷醇等)<sup>[31,32]</sup>。目前已从槟榔中检测出了缩合单宁、水解单宁、非单宁黄烷和简单多酚物质<sup>[33]</sup>,这些化合物具有抗氧化、清除自由基、抗透明质酸等活性<sup>[34]</sup>

### 1.4.1 槟榔多酚的构成

#### 1.4.1.1 槟榔的化学成分

槟榔的化学成份非常复杂,已有的研究表明,槟榔提取物的组分至少有几十种。槟榔原果的主要成分为 18.7%的多糖,10.8%的粗纤维,3.0%的灰分 14.0%的脂肪,9.9%的水分,0.5%的生物碱及 15%的酚类,槟榔还含有多种氨基酸其中脯氨酸含量占总氨基酸含量的 15%以上,苯丙氨酸、酪氨酸、和精氨酸的含量超过 10%,槟榔成熟时则非蛋白氮含量减少。同时槟榔内胚乳(Endosperm 有(-)-儿茶精、(-)-表儿茶精、原矢车菊甙元 B-1、B-2、B-7、A-1 及三个三聚体(I、II、V)、二个四聚体(III、IV)、二个五聚体(VI、VII)以及半乳糖、淀粉、甘露糖、 $\alpha$ -儿茶素、蔗糖、无色花青素(Leuco-cyanidin)、无色矢车菊素(Leuco-ganidin)、槟榔红色素(Areca red)、皂苷及树脂等;此外,槟榔还含有 11 种为人体必需的微量元素。槟榔是 54 种棕榈科植物中唯一一种含有生物碱的植物,槟榔果中总生物碱含量约为 0.3%-0.6%,主要为槟榔碱(Arecoline),槟榔次碱(Arecaidine)、去甲基槟榔碱(Guvacoline)、去甲基槟榔次碱(Guvacine),异去甲基槟榔次碱(Isoguvacine)、高槟榔碱(Homoarecoline)、槟榔副碱(Arecolidine)等,均与鞣酸结合存在。槟榔化学成分复杂,其成分与槟榔品种、土壤条件和食用槟榔加工方法等因素相关。杜道林等对 5 种常见海南槟榔品种果核和果皮中营养成分的含量进行了测定,结果见表 1.1 由表 1.1 可以看出,5 种海南常见槟榔品种果核和果皮中蛋白质、可溶性糖的质量分数均没有显著差异性( $P>0.01$ );所有槟榔品种中果核粗脂肪的含量均明显高于各自果皮中粗脂肪的含量,达到极其显著差异水平( $P<0.01$ )。不同土壤条件下槟榔的化学成分差异见表 1.2,由表 1.2 可以看出,不同土壤条件下槟榔果实的化学成分含量有所差异,沙丘槟榔中可溶性糖,粗脂肪、蛋白质的含量较高,而沟谷槟榔中可溶性糖、粗脂肪、蛋白质的含量仅次于沙丘槟榔,但其维生素 B 和维生素 C 含量较高。



表 1.1 槟榔不同品种果核和果皮中营养成分的含量测定(x±s)

Table 1.1 Nutrients content of nutlet and peel in different areca nut

| 品种编号 | w(可溶性糖)    |            | w(粗脂肪)     |            | w(蛋白质)    |           |
|------|------------|------------|------------|------------|-----------|-----------|
|      | 果皮         | 果核         | 果皮         | 果核         | 果皮        | 果核        |
| 1    | 15.86±2.76 | 14.93±4.63 | 2.54±0.73* | 20.01±1.34 | 7.10±1.44 | 8.31±1.10 |
| 2    | 14.71±5.02 | 12.71±5.01 | 1.53±0.25* | 18.35±1.51 | 7.00±1.67 | 6.68±1.14 |
| 3    | 7.79±2.6   | 12.98±3.40 | 7.07±0.18* | 16.36±1.49 | 7.39±0.43 | 7.26±0.87 |
| 4    | 14.42±6.07 | 17.29±5.21 | 6.77±0.65* | 13.75±0.21 | 6.35±1.06 | 7.00±0.90 |
| 5    | 11.16±3.88 | 15.17±4.74 | 6.90±0.41* | 12.31±0.97 | 5.57±0.96 | 6.73±1.53 |

注: \* 为同一品种果皮和果核相比较差异极其显著(  $P < 0.01$  )

表 1.2 不同土壤类型槟榔果实中化学成分含量

Table 1.2 Chemical constitution of areca nut indifferent area

| 土壤条件 | 可溶性糖<br>(mg/g) | 粗脂肪<br>(mg/g) | 蛋白质<br>(mg/g) | 维生素 B<br>(mg/100g) | 维生素 C<br>(mg/100g) |
|------|----------------|---------------|---------------|--------------------|--------------------|
| 砂丘槟榔 | 135.6          | 132.3         | 362.1         | 0.53               | 0.19               |
| 滨海槟榔 | 120.2          | 114.5         | 325.4         | 0.48               | 0.17               |
| 沟谷槟榔 | 128.7          | 120.3         | 340.8         | 0.57               | 0.23               |
| 早生槟榔 | 104.3          | 98.7          | 298.1         | 0.50               | 0.18               |

槟榔的化学成分在加工过程中会发生较大变化，如表 1.3。由表 1.3 可以看出，加工前后槟榔主要成分发生了明显的变化。槟榔经加工后，还原糖、蛋白质、维生素 C、酚类物质、槟榔碱含量下降，其中维生素 C 含量下降程度最大，这与维生素 C 的性质有直接关系，维生素 C 作为抗氧化剂的一种，属热敏性物质，且容易被氧化，因此，在加热或在溶液中易氧化分解；其次是还原糖，这可能是由于两方面的原因造成的，一方面，还原糖易溶于水，加工过程中因溶解而损失，尤其是在清洗、浸泡工艺，另一方面，还原糖在高温下会发生分子重排，形成黑色素而损失掉。酚类物质在加工后含量也有所下降，酚类物质的性质与维生素 C 相似，经热处理，和光照及吸收空气中的氧而被氧化掉；槟榔碱含量的降低，主要是由高温和水泡工艺导致的。加工后，灰分和粗纤维的含量上升，这主要是因为加工过程中，灰分和粗纤维相对稳定，而其他成分减少，导致其相对含量上升。粗脂肪含量槟榔制品甲少于海南产槟榔鲜果，而槟榔制品乙的含量比海南产槟榔鲜果多，这可能是由于加工工艺的不同引起的；由于槟榔生产工艺差异较大，因此，水分变化没有一定规律。加工后的不同产品的营养成分含量也有

所不同，槟榔制品甲的营养成分低于槟榔制品乙，这可能是因为，槟榔制品甲的生产工艺中有加热，温度高等工序或水泡时间较长。由于槟榔碱、还原糖、维生素 C 和酚类均为槟榔中的主要生理活性组分，其具有不同的保健功效和作用机理，它们的变化可能会造成加工前后槟榔生理功效的差异。

表 1.3 加工前后槟榔主要成分含量

Table1.3 content of main component Before and after processing

| 样品 | 槟榔碱<br>g/100g | 总酚<br>g/100g | 维生素 C<br>mg/g | 蛋白质<br>g/100g | 还原糖<br>g/100g | 粗纤维<br>g/100g | 粗脂肪<br>g/100g | 灰分<br>g/100g | 水分<br>g/100g |
|----|---------------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|--------------|
| A  | 0.32          | 14.85        | 14.21         | 8.42          | 14.23         | 16.57         | 15.34         | 5.18         | 22.26        |
| C  | 0.17          | 5.42         | 2.38          | 7.05          | 3.86          | 24.21         | 15.21         | 6.67         | 25.65        |
| E  | 0.27          | 7.65         | 1.45          | 7.78          | 17.19         | 22.45         | 16.23         | 5.94         | 21.56        |

注：A，C，E 分别代表海南产槟榔果、槟榔制品甲、槟榔制品乙

1.4.1.2 槟榔的多酚组成

槟榔多酚的组成多种多样，1964 年 A. G. Mathew 和 V. S. Govindarajan 用纸层析和特定的洗脱剂对槟榔中的多酚物质进行了测定。结果表明其中含有(+)-儿茶素、无色矢车菊素及其单体和多聚体，多聚化合物中含有高含量的花青素，表明他们容易裂解，对不同化合物的定量分析表明黄烷-3，4-二醇含量最多，不同生长阶段下，槟榔中的酚类化合物主要为黄酮类物质，并且，随着成熟度的增加，酚类化合物的浓度逐渐降低。随着高聚物、新生单体和中聚合物的溶解性降低，槟榔中多酚的成分模式也发生变化

1997 年，我国台湾学者 Chin-Kun Wang<sup>[35]</sup>等就对台湾槟榔成熟过程中，槟榔碱和槟榔多酚含量的变化进行了研究，研究表明台湾槟榔果中的酚类物质是儿茶素二聚体、无色矢车菊素二聚体和无色矢车菊素，全部新鲜槟榔果中酚类化合物的成分包括缩合单宁（92 mg/g，干重）、水解单宁（69 mg/g，干重）、非单宁类黄烷（84 mg/g，干重）、酚类化合物单体（56 mg/g，干重）。

2009 年，张兴，梅文莉等<sup>[36]</sup>对槟榔果实的酚类化学成分与抗菌活性进行初步研究，结果从槟榔果实中分离鉴定了 5 个酚类成分，分别鉴定为：金圣草黄素，异鼠李素，木犀草素，巴西红厚壳素和（±）-4，5-二羟基-3，5，7-三甲氧基黄烷酮。以上化合物均为首次从该属植物中分离得到。2010 年，王明月，罗金辉等<sup>[37]</sup>采用甲醇超声提取槟榔嫩果中的儿茶素，先用石油醚除去杂质，再用乙酸乙酯萃取，提取物经真空浓缩，高效液相色谱-质谱联用法测定。结果表明：槟榔

嫩果中儿茶素类组分为(+)- 儿茶素和表没食子儿茶素没食子酸酯。总离子流图如图 1.1，其中化合物 1 为儿茶素没食子酸酯，化合物 2 为表没食子儿茶素没食子酸酯，化合物 1 和化合物 2 的质谱图如图 1.2 和图 1.3

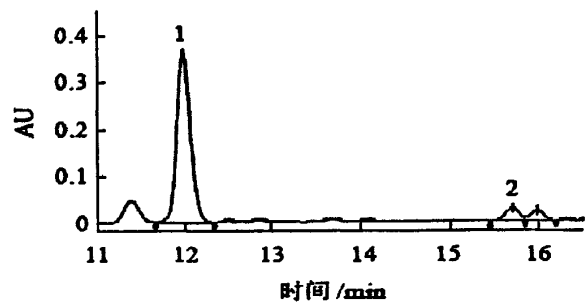


图 1.1 槟榔嫩果儿茶素总离子流图

Fig 1.1 Total ion chromatograms of catechin extracted from tender areca nut

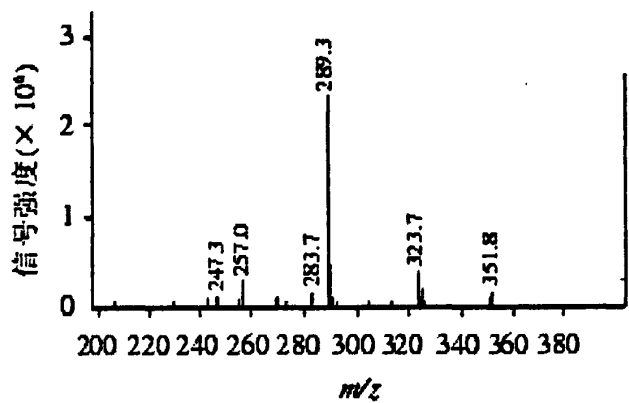


图 1.2 化合物 1 的质谱图

Fig 1.2 Mass spectrum of compound 1

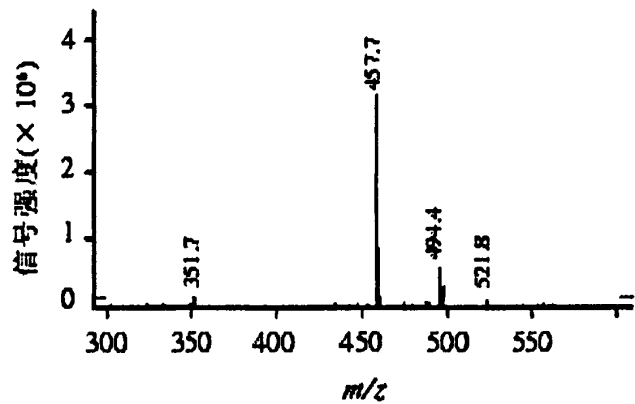


图 1.3 化合物 2 的质谱图

Fig1.3 Mass spectrum of compound 2

以上两种物质均属于多元酚类的一种，具有清除自由基、延缓老化、预防蛀

牙、改变肠道微生物的分布、抗菌作用、除臭、降低血中胆固醇及低密度脂蛋白（LDL），并增加高密度脂蛋白（HDL）的量、抗辐射以及紫外线等功能。特别是表没食子儿茶素没食子酸酯的抗肿瘤作用不亚于紫杉醇，而且毒性远低于紫杉醇。在常温条件下，表没食子儿茶素没食子酸酯具有很强的抗氧化功能，因此在日化产品上可做特殊功能的保质剂、护肤剂。

1.4.2 槟榔多酚的含量

槟榔多酚的含量随着不同季节，不同生长阶段及不同部位的差异而有所不同，1976 年，Shivashankar 等人<sup>[38]</sup>研究表明槟榔多酚含量在绿果时期为 17.2%~29.8%，而到了成熟时期就下降为 11.1%~17.8%，这一结果与前人报道的相似。不同部位槟榔水提物和甲醇提取物中单宁和总多酚的含量见表 1.5。2008 年，张春江，吕飞杰等<sup>[39]</sup>对槟榔果及其制品中总酚和单宁的含量进行了测定，发现，不同槟榔青果间酚类物质含量差异明显，榔玉的酚类物质含量远高于槟榔青果和槟榔外壳。经加工后的槟榔制品中，酚类物质含量明显减少。

表 1.5 不同部位槟榔水提物和甲醇提取物中单宁和总多酚的含量

Table 1.5 Content of tannin and total polyphenols in different parts of areca extracted with water and methanol

| 提取类型    | 单宁    |       | 总多酚含量 |       |
|---------|-------|-------|-------|-------|
|         | 水提物   | 甲醇提取物 | 水提物   | 甲醇提取物 |
| 树冠      | 0.9   | 0.16  | 1.59  | 1.43  |
| 1 个月的种子 | 53.18 | 52.00 | 37.74 | 36.37 |
| 2 个月的种子 | 48.20 | 51.99 | 38.91 | 39.15 |
| 3 个月的种子 | 43.14 | 47.84 | 36.16 | 38.51 |
| 4 个月的种子 | 42.14 | 47.72 | 42.06 | 45.12 |
| 6 个月的种子 | 63.42 | 54.18 | 42.53 | 45.32 |
| 8 个月的种子 | 31.56 | 62.70 | 38.59 | 50.76 |
| 4 个月的果壳 | <0.01 | 0.35  | 1.17  | 1.08  |
| 8 个月的果壳 | 0.26  | <0.01 | 1.60  | 1.42  |
| 根       | 11.52 | 19.41 | 6.25  | 21.56 |
| 不定根     | 3.33  | 8.93  | 4.15  | 11.43 |

### 1.4.3 槟榔多酚的活性

#### 1.4.3.1 槟榔多酚的抗菌活性

槟榔果多酚粗提物对鼠伤寒沙门杆菌 TA98、TA100 2-氨基-3 甲基咪唑并喹啉具有显著的抗氧化活性和抗诱变作用, 不会诱导染色体畸变, 能增加卵细胞姐妹染色单体互换 (SCE) 的几率, 而且槟榔果的儿茶素和单宁提取物能抑制胶原酶的活性; 张兴, 梅文丽, 等<sup>[36]</sup>, 从槟榔提取物中分离出了, 巴西红厚壳素, 异鼠李素, (±)-4,5-二羟基-3,5,7-三甲氧基黄酮, 金圣草黄素, 木犀草素, 5 种酚类化合物, 并采用滤纸片琼脂扩散法测定了 5 种酚类化合物的抗菌活性, 结果表明, 巴西红厚壳素对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌和金黄色葡萄球菌均有明显抑制作用, 抑菌圈直径达 9 mm, 而对白色念珠菌则无抑菌活性。其他四种化合物对金黄色葡萄球菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌和白色念珠菌均没有抑制活性。从槟榔籽中分离出来的多酚物质 NF-86I 和 NF-86II 分别对变形链球菌 MT8148 (c) 和 MT6715 (g) 的生长具有抑制作用, 这些抑制剂特异性地结合到细菌的细胞表面上从而抑制牙斑的形成<sup>[40]</sup>。张春江, 吕飞杰<sup>[41]</sup>报道, 槟榔中所含的鞣质, 对堇色毛癣菌、许兰氏黄癣菌、奥杜盎氏小芽孢癣菌、抗流感病毒 PR3 等均有不同程度的抑制作用, 槟榔水浸剂可以降低内氏放线菌和血链球菌的产酸能力, 槟榔的乙醇提取物能有效地控制牙龈卟啉菌和福赛类杆菌的生长, 此外, 当槟榔提取液浓度低于或等于 8.0 mg/mL 时, 对粘性放线菌的生长有抑制作用; 作用于变形链球菌表面的粘结素和获得性膜中的受体成分, 阻碍变形链球菌的粘附, 而产生有效的抗龋作。

#### 1.4.3.2 槟榔多酚的抗氧化活性

抗氧化活性是槟榔多酚最重要的性质, 也是其多种应用的基础, 2006 年 Penpun Wetwitayaklung 等<sup>[42]</sup>对不同生长阶段槟榔抗氧化活性的研究中指出, 槟榔果含有 50-60% 的糖类, 15% 的脂类 (月桂酸酯、肉豆蔻酸酯、油酸酯)、15% 的缩合单宁 (鞣质、儿茶素)、多酚 (NPF-861A、NPF-861B、NPF-86A、NPF-86B) 和 0.2~0.5% 的槟榔碱 (槟榔碱、槟榔次碱、去甲基槟榔次碱、去甲基槟榔碱), 不同生长阶段下槟榔果的水提取物和甲醇提取物中单宁和总酚的含量高于植株的其他部分的提取物, 不同生长阶段下槟榔果的甲醇提取物的抗氧化活性比植株的其他部位 (叶子、树冠、果壳 (4 或 8 个月)、根和不定根) 的提取物高, 槟榔果甲醇提取物的抗氧化活性次序从高到低依次是 4 个月的槟榔果、8 个月的槟榔果、6 个月的槟榔果、3 个月的槟榔果、2 个月的槟榔果和 1 个月的槟榔果, 82.05% 的抗氧化活性来源于槟榔中的酚类化合物, 槟榔碱没有抗氧化活性该研究还表明槟榔种子的水提物和甲醇提取物含有较高的单宁和总多酚, 甲醇提取物比水提物的抗氧化性

强,这可能是由于槟榔种子中酚类化合物成分复杂,多样,而甲醇是较为适当的提取溶剂。虽然6~8个月的槟榔种子甲醇提取物中,单宁和总多酚的含量高于4个月的槟榔种子,但是他们的抗氧化活性略低于4个月的槟榔种子。这表明槟榔种子中的单宁和总多酚并不是唯一的抗氧化因子,从数据可以看出82.05%的抗氧化活性来源于酚类物质,而槟榔碱没有抗氧化活性,因此槟榔种子中还有其他的抗氧化成分,如挥发油等,这些成分占到抗氧化活性的17.95%。根部单宁的含量比树冠、4、8个月的果壳和不定根的高,而且根部的甲醇提取物具有中抗氧化活性,其他部分具有低抗氧化活性。

此外,槟榔果中的酚类物质似乎与OSF有密切的关系<sup>[43]</sup>,另一方面,据研究槟榔果中的酚类提取物能降低人体N-亚硝基-L脯氨酸的形成。槟榔果酚类物质的抗畸变性质,也与他的抗氧化活性有关,研究表明,槟榔果中的酚类物质,在保护人体健康方面起着重要作用<sup>[44]</sup>。

#### 1.4.3.3 槟榔多酚的抗衰老作用

槟榔多酚具有抗透明质酸酶和抗弹性蛋白酶的作用,因此可用作抗老化物质,Lee<sup>[45]</sup>等人研究了150种药用植物对弹性蛋白酶的抑制作用,结果表明,槟榔多酚能够明显的抑制皮肤组织老化和发炎,此外,Lee<sup>[46]</sup>等人还从槟榔中分离出了CC-516和CC-517(槟榔乙醇提取物)成分,CC-516能够抑制弹性蛋白酶的活性从而保护弹性蛋白纤维而且能够促进胶原蛋白的合成,CC-517能够抑制参与血管周围基质降解的酶和弹性蛋白酶的活性,保护细胞外基质的主要蛋白,促进其重构,间接改善毛细血管壁的韧性。

#### 1.4.4 槟榔多酚的提取

槟榔多酚提取的常用方法为有机溶剂萃取法,不同产地,不同槟榔品种及不同部位槟榔多酚的提取所采用的溶剂会有所差异,张春江,吕飞杰<sup>[39]</sup>等采用丙酮-水体系对加工前后槟榔中的总多酚,缩合单宁及原花青素进行了提取,结果表明,成熟槟榔仁中总酚和缩合单宁含量最高,分别达到14.5%和22.1%。韩林,张海德,等<sup>[47]</sup>,采用乙醇水体系对槟榔籽中的多酚进行了提取,并对提取工艺进行了优化,结果得到在提取温度58℃、提取时间4h、液料比47mL/g,总酚含量为146.63mg/g;郑仕宏,任费燕,等<sup>[48]</sup>,采用甲醇对槟榔鲜果中的总酚进行提取,结果得到在最优条件下槟榔鲜果总酚的提取率为6.72mg/g。王明月,罗金辉,等<sup>[37]</sup>,以甲醇为溶剂,采用超声波辅助的方法对槟榔嫩果中的儿茶素进行了提取,经石油醚除去杂质后采用乙酸乙酯进行萃取,得到了纯度较高的儿茶素,表儿茶素没食子酸酯。

## 1.4.5 槟榔多酚的应用

### 1.4.5.1 开发保健食品

许多试验研究资料均显示, 槟榔多酚具有较强的抗氧化作用, 以及明显的抑菌, 抗癌, 抗老化和抑制胆固醇上升等功效, 摄取一定量的槟榔多酚能够有效地预防和抑制疾病的发生。因此, 可将其添加到食品中制作保健食品, 这方面研究国内刚刚起步。周文化, 李忠海, 等<sup>[49]</sup>以新鲜槟榔为主料, 以金银花、甘草为辅料, 经提取、过滤, 制得槟榔固体饮料提取物, 再以蔗糖作为甜味剂, 以可溶性淀粉为增稠剂, 经熬制、干燥、粉碎得槟榔固体饮料。这既为槟榔的综合利用与深度开发打基础弥补当今市场上含有槟榔成分食品的空白, 满足消费者对槟榔与健康的双重需求, 也为含有槟榔成分的(功能性)食品的开发提供一定的理论与现实依据

### 1.4.5.2 开发食品抗氧化剂

植物多酚是一类抗氧化和清除自由基的活性物质, 对油脂和含油脂食品具有良好的抗氧化作用, 其抗氧化效果甚至高于 BHA 等人工合成的抗氧化剂。我国槟榔种质资源丰富, 利用槟榔提取分类物质, 将其制作成天然抗氧化剂, 具有广阔的应用前景

## 1.5 本课题的研究意义和研究内容

### 1.5.1 本课题的研究意义

槟榔主产于我国海南岛、台湾、云南河口及西双版纳热带雨林间, 广西、广东及福建也有少量的分布。据史书记载海南岛种植槟榔已有 1500 年的历史了, 远在唐宋时代已闻名岛外。槟榔既是药用植物, 又可嚼食, 被誉为“植物口香糖”, 据记载人类嚼食槟榔历史已超过 2000 年, 苏东坡就写过“红潮登颊醉槟榔”的佳句。嚼食槟榔的习惯源于东南亚、印度、大陆南方及台湾。近年来, 嚼食槟榔的地域正在逐步扩大, 消费量也在不断增加。据统计, 2007 年仅湖南省槟榔的产值就达四十多亿元。最近十年, 槟榔加工已从家庭作坊式生产走向工业化生产, 成为湖南省食品行业一枝独秀的产业。

目前, 槟榔深加工问题已成为制约我国槟榔产业规模化升级的瓶颈, 而近年来, 随着国内外学者对多酚的深入研究, 使得多酚在食品、及日用化工品方面的应用越来越突出, 因此, 研究槟榔多酚可为槟榔的深加工提供新的思路。

近来, 关于槟榔毒理作用的大量研究, 及文献报导, 使得人们渐渐忽略了槟榔的有益作用, 槟榔产业的发展受到很大的打击, 因此, 减害增益以成为槟榔产业今后发展的主方向, 因此可将槟榔多酚提取出来, 添加到食品中, 或将其制成新型的健康食品。这就为槟榔高附加值产品的开发奠定了工作基础。

### 1.5.2 本课题研究的主要内容

- 1.采用有机溶剂萃取法对槟榔多酚进行提取，并对提取工艺进行优化。
- 2.对提取物采用大孔树脂进行分离纯化
- 3.对纯化后的多酚进行结构鉴定



2. 槟榔多酚的提取

槟榔多酚的提取多种多样，有沉淀分离法、超声波辅助提取、微波辅助提取，超临界流体萃取、层析分离法，色谱分离法等。其中沉淀分离法操作过程繁琐，而超声波、微波、层析分离及色谱分离法虽然提取效率高，污染相对较小，但因其设备要求高，成本大，不适合企业生产之用，超临界流体萃取无溶剂残留，安全系数高，但其对多酚的提取效率较低，而且设备成本高昂也不适用于企业生产，有机溶剂萃取法作为一种传统的多酚提取方法，不需要复杂的设备，操作过程简单，应用较为普遍，适合企业实际生产。因此，本章从企业实际生产及节约成本角度出发，采用有机溶剂萃取法对槟榔多酚进行提取。

本章首先通过不同溶剂对比实验，筛选出槟榔多酚的最佳提取溶剂，然后采用单因子试验方法，对新鲜槟榔多酚的有机溶剂提取进行研究，考察提取时间，提取温度，料液比，提取剂浓度，对槟榔多酚提取率的影响，最后采用响应曲面法对槟榔多酚的提取工艺进行优化，以期获得槟榔多酚有机溶剂萃取的最佳工艺条件。

2.1 材料与amp;方法

2.1.1 实验原料

新鲜槟榔，原产地海南。

2.1.2 主要试剂

|        |         |         |
|--------|---------|---------|
| 酒石酸钾钠  | 分析纯（AR） | 广州化学试剂厂 |
| 硫酸亚铁   | 分析纯（AR） | 广州化学试剂厂 |
| 磷酸氢二钠  | 分析纯（AR） | 天津化学试剂厂 |
| 磷酸二氢钾  | 分析纯（AR） | 天津化学试剂厂 |
| 焦性没食子酸 | 分析纯（AR） | 上海化学试剂厂 |
| 甲醇     | 分析纯（AR） | 上海化学试剂厂 |
| 乙醇     | 分析纯（AR） | 上海化学试剂厂 |
| 丙酮     | 分析纯（AR） | 上海化学试剂厂 |

2.1.3 仪器与amp;设备

|           |         |             |
|-----------|---------|-------------|
| 仪器或设备名称   | 规格型号    | 生产厂家        |
| 微型高速试样粉碎机 | FW80    | 河北省黄骅市新兴电器厂 |
| 电子分析天平    | FA-2004 | 上海科学仪器厂     |
| 数显恒温水浴锅   | HH-S21A | 金坛市医疗仪器厂    |
| 旋转蒸发器     | SBXZ-1  | 上海玻璃厂       |

## 2.1.4 实验方法

### 2.1.4.1 主要试剂的配制<sup>[50]</sup>

(1) 酒石酸亚铁溶液的配制：称取硫酸亚铁 1 g，酒石酸钾钠 5g 加蒸馏水溶解定容到 1 L。

(2) pH7.5 磷酸缓冲溶液的配制：将 0.0667 mol/L 的磷酸氢二钠溶液与 0.0667 mol/L 的磷酸二氢钾溶液按 84: 16 的比例混合，调 pH 至 7.5。

(3) 没食子酸标准溶液的配制：精确称取焦性没食子酸 50 mg 置于 100 mL 容量瓶中，用蒸馏水定容，浓度为 0.5 mg/mL。

### 2.1.4.2 标准曲线的绘制

准确吸取焦性没食子酸溶液 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 置于一系列 50 mL 的容量瓶中，加水至体积为 5 mL，再加入 5 mL 酒石酸亚铁溶液，然后用 pH7.5 磷酸缓冲溶液定容至 50 mL，混匀，静置 15 min 在 540 nm 处测吸光度，同时做空白

### 2.1.4.3 槟榔提取液中多酚含量的测定

准确吸取 1 mL 槟榔提取液于 50 mL 容量瓶中，加入 4 mL 蒸馏水，5 mL 酒石酸亚铁，用 pH=7.5 的磷酸缓冲溶液定容到 50 mL 同时做空白，在 540 nm 处测其吸光度，根据标准曲线计算槟榔多酚的浓度。

### 2.1.4.4 实验设计

采用单因素实验法对影响槟榔多酚提取率的因素进行研究，采用响应曲面法对槟榔多酚提取工艺条件进行优化。

## 2.2 结果与分析

### 2.2.1 槟榔多酚标准曲线的绘制

采用 2.1.4.2 中的方法，以焦性没食子酸的浓度为横坐标，吸光度为纵坐标，绘制标准曲线如图 2.1 所示，由 2.1 可以看出，焦性没食子酸标准曲线的相关系数  $R^2 = 0.9939$ ，说明吸光度范围在 0.1~0.9 内，焦性没食子酸浓度与吸光度的线性关系良好，可以用于计算槟榔多酚的浓度。

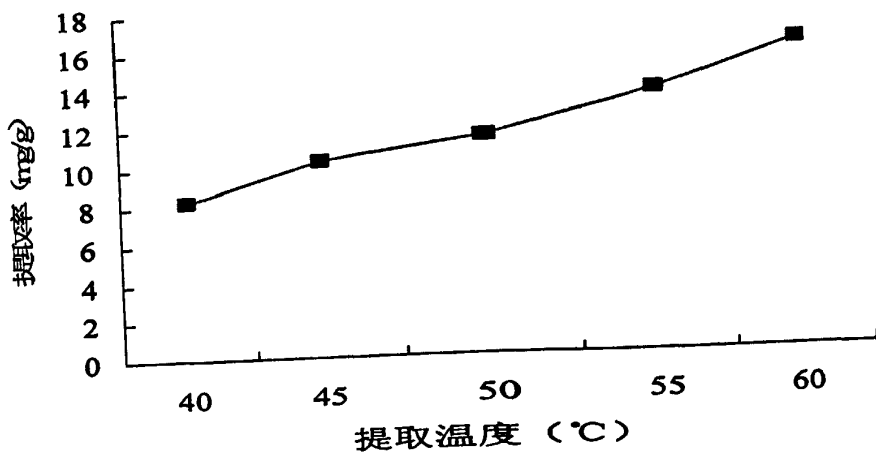


图 2.1 焦性没食子酸标准曲线

Fig. 2.1 Standard curve of pyrogalllic acid

## 2.2.2 提取溶剂的选择

溶剂对提取速率的影响是溶剂的溶解度、亲和力、粘度、分子大小等各因素的综合影响。根据相似相容原理选择溶剂，同时还应考虑溶剂容易回收、适当的密度、表面张力、安全性及化学稳定性等问题。

在提取条件相同的情况下，分别用甲醇、乙醇、丙酮和蒸馏水对槟榔多酚进行提取，结果见表 2.1，由表 2.1 可以看出几种溶剂中甲醇的提取率最高，乙醇次之，丙酮的提取效果不好，蒸馏水的提取效果最差，这可能与槟榔多酚复杂的化学结构有关，其在甲醇中的溶解度最高，而且甲醇容易回收，因此选择甲醇为最佳提取剂。

表 2.1 不同提取剂对槟榔多酚提取效果的比较

Table 2.1 Effect of various solvent on the extraction of areca nut polyphenols

| 溶剂种类 | 槟榔多酚含量 (mg/g) |
|------|---------------|
| 甲醇   | 15.82         |
| 乙醇   | 13.23         |
| 丙酮   | 10.34         |
| 蒸馏水  | 8.78          |

## 2.2.3 提取温度对槟榔多酚提取率的影响

对大多数物质而言，提取温度对提取速率有一定的影响。升高温度可以加大物质的溶解度，溶液粘度下降，扩散系数就增大，可提高有效成分的扩散速率，从而提高提取速率。但是提取温度过高，对一些热敏性物料有破坏作用。

在提取时间为 60 min 料液比 1：15，甲醇浓度为 100%，的条件下选择温度为 40 ℃、45 ℃、50 ℃、55 ℃、60 ℃对槟榔多酚进行提取。以提取温度为横坐标，提取率为纵坐标作图，结果如图 2.2 所示

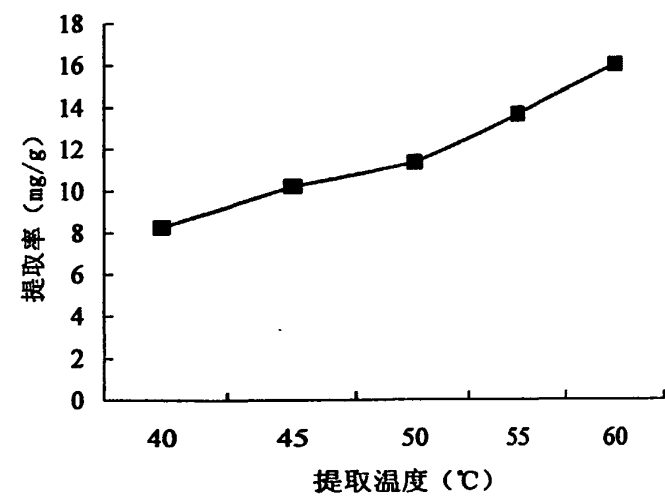


图 2.2 提取温度对槟榔多酚提取率的影响

Fig. 2.2 Effect of temperature on the extraction of areca nut polyphenols

由图 2.2 可以看出，在 40~60 ℃之间，随着温度的升高多酚提取率逐渐增大，在 60℃时达到最大值，由于甲醇的沸点为 68℃，而且高温条件下多酚容易发生氧化，因此选择最佳提取温度为 60℃。

2.2.4提取时间对槟榔多酚提取率的影响

提取时间是影响多酚提取率的重要因素，在温度为 60℃料液比 1：15，甲醇浓度为 100%，的条件下选择提取时间分别为 20 min，40 min，60 min，80 min 对槟榔多酚进行提取，以提取时间为横坐标，提取率为纵坐标作图，结果如图 2.3 所示

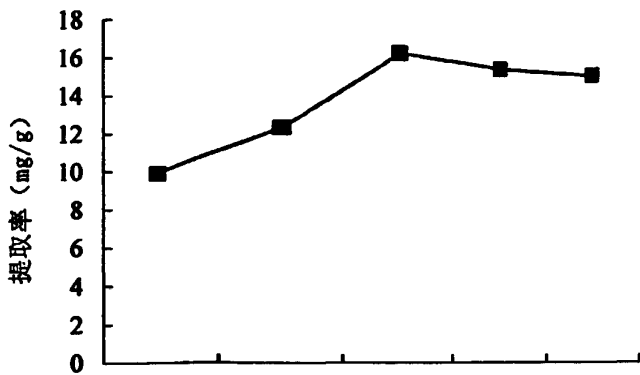


图 2.3 提取时间对槟榔多酚提取率的影响

Fig. 2.3 Effect of time on the extraction of areca nut polyphenols

由图 2.3 可以看出，多酚的提取率随着时间的增加呈先增加后下降趋势。主要原因可能是开始时随着时间的延长，多酚物质的溶解越来越充分。在 60 min 达到峰值后，细胞内的有效成分基本析出，再增加时间，析出的多酚由于受光、热等的影响，极易被氧化，因此应选择 60 min 为最佳提取时间。

### 2.2.5 料液比对多酚提取率的影响

料液比能够影响多酚在溶剂中的浓度差，而有效成分浓度差是推动提取进行的重要因素，一般浓度差越大，提取的传质推动力就越大，提取速率就越快。在温度为 60℃，提取时间为 60 min，甲醇浓度为 100%，的条件下选择料液比分别为 1: 6、1: 9、1: 12、1: 15、1:18 对槟榔多酚进行提取，以料液比为横坐标，提取率为纵坐标作图，结果如图 2.4 所示。

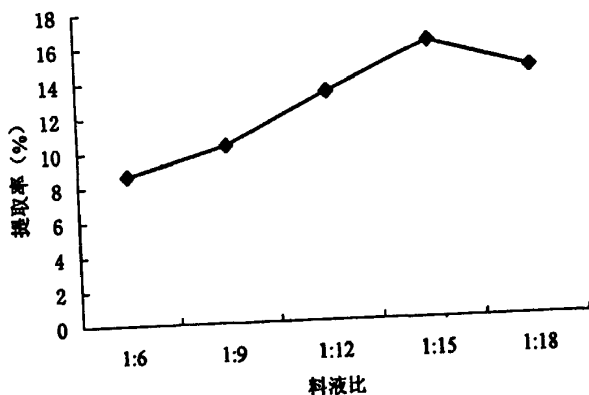


图 2.4 料液比对多酚提取率的影响

Fig. 2.4 Effect of solid-liquid ratio on the extraction of areca nut polyphenols

由图 2.4 可以看出，当料液比在 1: 6~1: 15 之间时，多酚的提取率随着料液比的增大而增加，并在 1: 15 时达到最大值 15.98mg/g，当料液比超过 1: 15 时多酚提取率反而下降，因此，选择 1: 15 为最佳料液比。

### 2.2.6 甲醇浓度对多酚提取率的影响

在温度为 60℃，提取时间为 60 min，料液比 1: 15 的条件下选择甲醇浓度分别为 60%、70%、80%、90%、100%，对槟榔多酚进行提取，以甲醇浓度为横坐标，提取率为纵坐标作图，结果如图 2.5 所示。

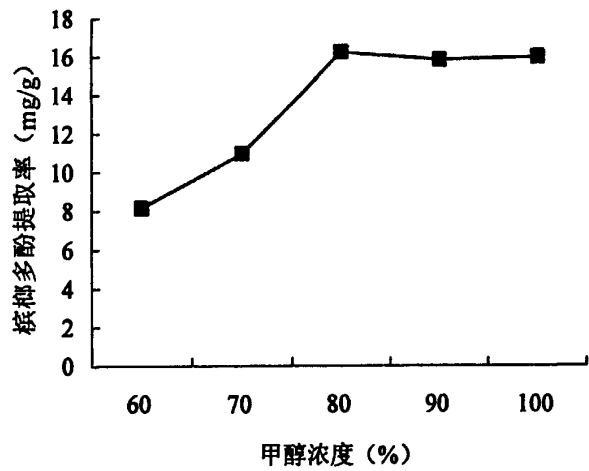


图 2.5 甲醇浓度对槟榔多酚提取率的影响

Fig. 2.5 Effect of methanol concentration on the extraction of areca nut polyphenols

由图 2.5 可以看出，槟榔多酚提取率，在甲醇浓度为 60%~80%之间迅速上升，在 80%~100%缓慢下降，原因可能是高浓度的甲醇溶液中水分很少，通透性差，细胞内的多酚物质向外扩散难度大，所以提取率低，另外一个原因也可能是高浓度的甲醇易挥发，间接降低了料液比使多酚提取量降低，所以选择 80%的甲醇较好。

2.2.7响应面法优化槟榔多酚提取工艺

2.2.7.1 实验设计及结果

在单因素实验的基础上采用响应曲面的方法对槟榔多酚的提取工艺进行优化，以提取温度、提取时间、料液比、甲醇浓度为自变量（因素），以槟榔多酚提取率为响应值（指标），采用 Box-Behnken 四因素三水平的响应曲面（RSM）设计方法，分别进行二次多项回归方程拟合及其优化分析试验设计因素编码及水平见表 2.2，实验设计及其结果见表 2.3。

表 2.2 实验设计因素编码及水平

| Table 2.2 Code and levers of experiment design |          |            |              |            |
|------------------------------------------------|----------|------------|--------------|------------|
| 水平                                             | A 温度 (℃) | B 时间 (min) | C 料液比 (g/mL) | D 甲醇浓度 (%) |
| -1                                             | 55       | 50         | 1 : 12       | 70         |
| 0                                              | 60       | 60         | 1 : 15       | 80         |
| 1                                              | 65       | 70         | 1 : 18       | 90         |

表 2.3 响应曲面实验设计及其结果

Table 2.3 Experiment design and result

| 试验号 | A 温度 (°C) | B 时间 (min) | C 料液比 (g/mL) | D 甲醇浓度(%) | 提取率(mg/g) |
|-----|-----------|------------|--------------|-----------|-----------|
| 1.  | -1        | -1         | 0            | 0         | 13.75     |
| 2.  | 1         | -1         | 0            | 0         | 17.37     |
| 3.  | -1        | 1          | 0            | 0         | 15.56     |
| 4.  | 1         | 1          | 0            | 0         | 16.15     |
| 5.  | 0         | 0          | -1           | -1        | 13.10     |
| 6.  | 0         | 0          | 1            | -1        | 15.65     |
| 7.  | 0         | 0          | -1           | 1         | 13.98     |
| 8.  | 0         | 0          | 1            | 1         | 15.82     |
| 9.  | -1        | 0          | 0            | -1        | 14.10     |
| 10. | 1         | 0          | 0            | -1        | 15.86     |
| 11. | -1        | 0          | 0            | 1         | 16.13     |
| 12. | 1         | 0          | 0            | 1         | 16.41     |
| 13. | 0         | -1         | -1           | 0         | 13.74     |
| 14. | 0         | 1          | -1           | 0         | 14.95     |
| 15. | 0         | -1         | 1            | 0         | 16.63     |
| 16. | 0         | 1          | 1            | 0         | 15.91     |
| 17. | -1        | 0          | -1           | 0         | 13.18     |
| 18. | 1         | 0          | -1           | 0         | 13.77     |
| 19. | -1        | 0          | 1            | 0         | 14.86     |
| 20. | 1         | 0          | 1            | 0         | 17.11     |
| 21. | 0         | -1         | 0            | -1        | 14.93     |
| 22. | 0         | 1          | 0            | -1        | 15.17     |
| 23. | 0         | -1         | 0            | 1         | 15.49     |
| 24. | 0         | 1          | 0            | 1         | 16.92     |
| 25. | 0         | 0          | 0            | 0         | 17.62     |
| 26. | 0         | 0          | 0            | 0         | 17.63     |
| 27. | 0         | 0          | 0            | 0         | 17.59     |
| 28. | 0         | 0          | 0            | 0         | 17.60     |
| 29. | 0         | 0          | 0            | 0         | 17.61     |

表 2.3 中 1~24 号为析因点，是自变量取值在个因素构成的三维顶点，25~29 为零点，是区域的中心点，零点实验重复五次，用以估计实验误差<sup>[61]</sup>；利用 dx7 软件对表 2.3 中的实验数据进行多元回归拟合，由此可求出影响因素的一次效应、二次效应及其交互效应的关联方程<sup>[62]</sup>，对槟榔多酚提取率的影响因素进行更深入的研究和条件优化，并做出响应面图。以提取温度、提取时间、料液比、甲醇浓度为编码自变量，以槟榔多酚提取率为指标，进行多元回归拟合分析，得到槟榔多酚提取率与各因素变量的二次方程模型为：

$$Y=17.61+0.76A+0.23B+1.11C+0.50D-0.76AB+0.41AC-0.37AD-0.48BC+0.30BD-0.18CD-1.00A^2-0.76B^2-1.74C^2-1.13D^2$$

2.2.7.2 实验模型方差分析

对实验模型进行系数估计及方差分析结果见表 2.4，由表 2.4 中的回归方程系数估计及方差分析可知，方程模型的显著性  $P<0.001$ ，属极显著范畴，表明方程只有 0.01% 的几率产生误差，回归方程相关系数  $R^2=96.97\%$ ，说明模型方程中的因变量与全体自变量之间的线性关系显著，方程对实验结果拟合度良好，实验误差小，可以用于对槟榔多酚提取率进行预测。方差分析中  $P<0.05$  表明该项对结果影响显著， $P<0.01$  表明该项对结果影响非常显著， $P>0.05$  表明该项对结果影响不显著，由表 2.4 可知，该模型中，A、B、C、D、AB、AC、BC、 $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$ 、 $D^2$  对结果均有显著影响，其中提取时间（因素 A）、料液比（因素 C）、甲醇浓度（因素 D）对结果有极显著影响，其次是提取时间（因素 B）；方程的一次项，平方项均达显著水平，说明各个具体实验因素对响应值的影响不是简单的线性关系，而是二次抛物线的关系。

表 2.4 回归方程系数估计及方差分析

| Table 2.4 Estimate value of the regression coefficient and variance analysis |        |     |         |        |         |     |
|------------------------------------------------------------------------------|--------|-----|---------|--------|---------|-----|
| 变异来源                                                                         | 平方和    | 自由度 | 均方      | F 值    | P 值     | 显著性 |
| 模型                                                                           | 56.76  | 14  | 4.05    | 32.02  | <0.0001 | **  |
| A                                                                            | 6.89   | 1   | 6.89    | 54.38  | <0.0001 | **  |
| B                                                                            | 0.63   | 1   | 0.63    | 4.98   | 0.0426  | *   |
| C                                                                            | 14.65  | 1   | 14.65   | 115.71 | <0.0001 | **  |
| D                                                                            | 2.94   | 1   | 2.94    | 23.22  | 0.0003  | **  |
| AB                                                                           | 2.30   | 1   | 2.30    | 18.13  | 0.0008  | **  |
| AC                                                                           | 0.69   | 1   | 0.69    | 5.44   | 0.0351  | *   |
| AD                                                                           | 0.55   | 1   | 0.55    | 4.32   | 0.0564  |     |
| BC                                                                           | 0.93   | 1   | 0.93    | 7.35   | 0.0169  | *   |
| BD                                                                           | 0.35   | 1   | 0.35    | 2.80   | 0.1167  |     |
| CD                                                                           | 0.13   | 1   | 0.13    | 1.00   | 0.3354  |     |
| $A^2$                                                                        | 7.10   | 1   | 7.10    | 56.07  | <0.0001 | **  |
| $B^2$                                                                        | 3.71   | 1   | 3.71    | 29.30  | <0.0001 | **  |
| $C^2$                                                                        | 19.64  | 1   | 19.64   | 155.09 | <0.0001 | **  |
| $D^2$                                                                        | 8.32   | 1   | 8.32    | 65.70  | <0.0001 | **  |
| 残差                                                                           | 1.77   | 14  | 0.13    |        |         |     |
| 纯误差                                                                          | 0.0001 | 4   | 0.00025 |        |         |     |
| 总变异                                                                          | 58.54  | 28  |         |        |         |     |

2.2.7.3 槟榔多酚提取率响应曲面分析与优化

响应曲面方法的图形，是特定的响应面 Y 与对应的因素 A、B、C、D 构成的三维空间，及其在二维平面上的等高线图，每个响应面对其中两个因素进行分析，另外两个因素固定在零水平，从中可以直观地反映出个因素对响应值的影响，从实验所得响应面曲线图上可以找到他们在提取过程中的相互作用，等高线图的形状反应交互作用的大小，椭圆形表示交互作用显著，圆形表示交互作用不显著<sup>[53]</sup>，槟榔多酚提取率的响应曲面优化见图 2.6。



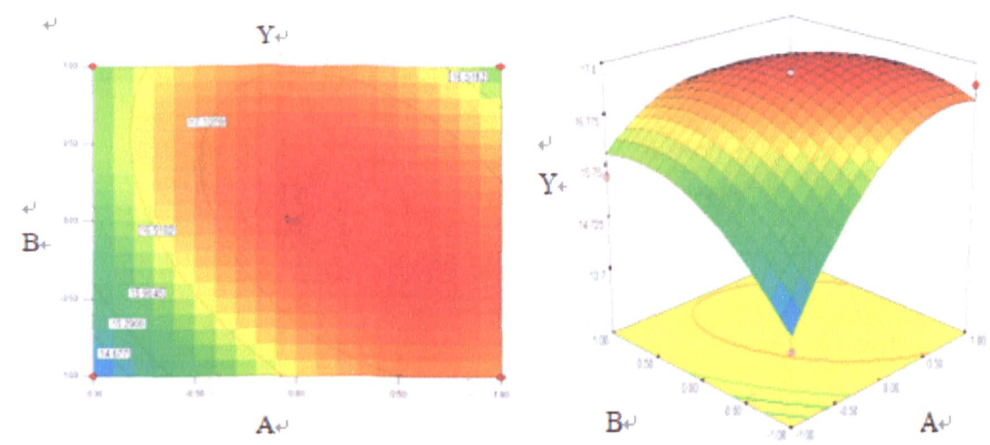


图 a 提取温度与提取时间交互作用

Fig. a Interaction between temperature and time

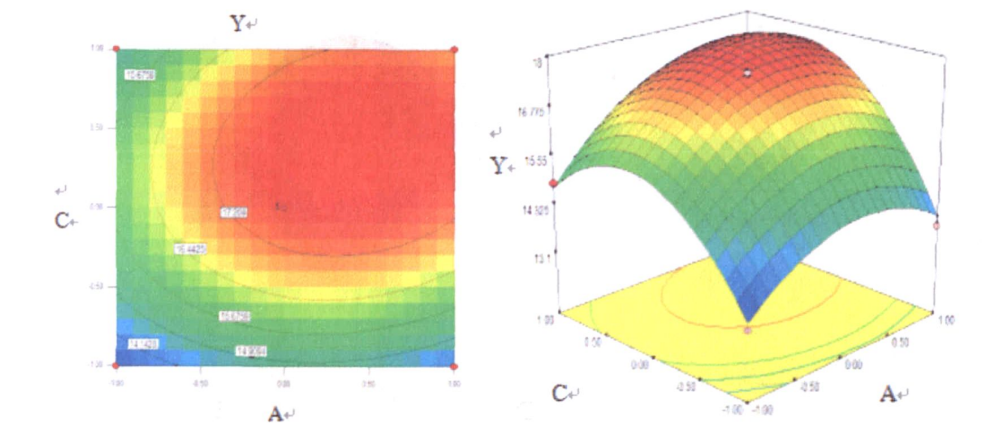


图 b 提取温度与料液比交互作用

Fig.b Interaction between temperature and solid-liquid ratio

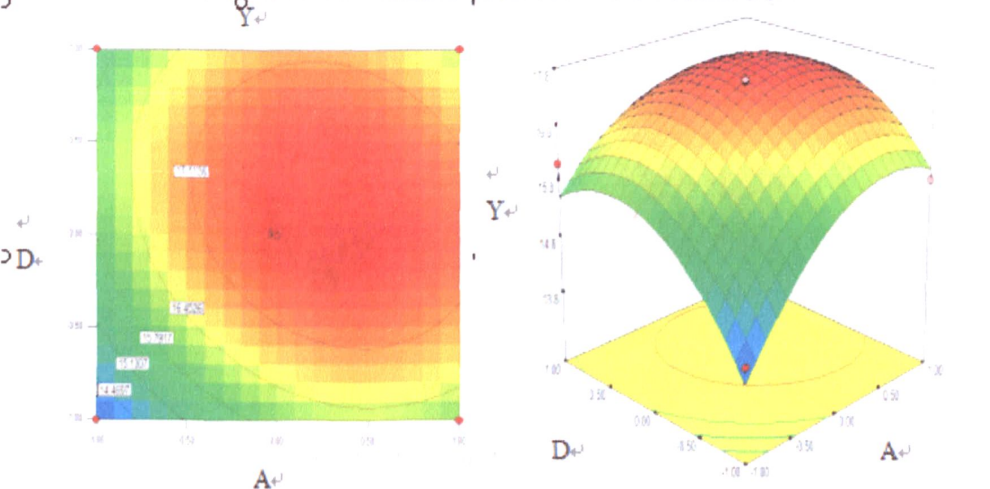


图 c 提取温度与甲醇浓度交互作用

Fig. c Interaction between temperature and methanol concentration

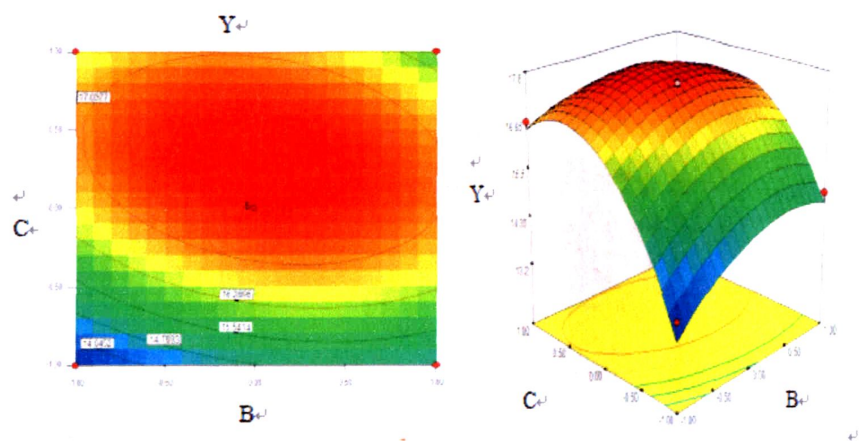


图 d 提取时间与料液比交互作用

Fig.d Interaction between time and solid-liquid ratio

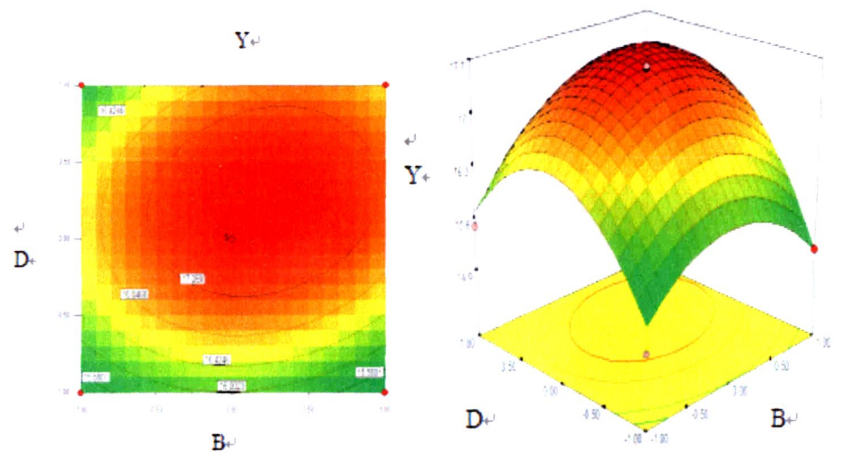


图 e 提取时间与甲醇浓度交互作用

Fig.e Interaction between time and methanol concentration

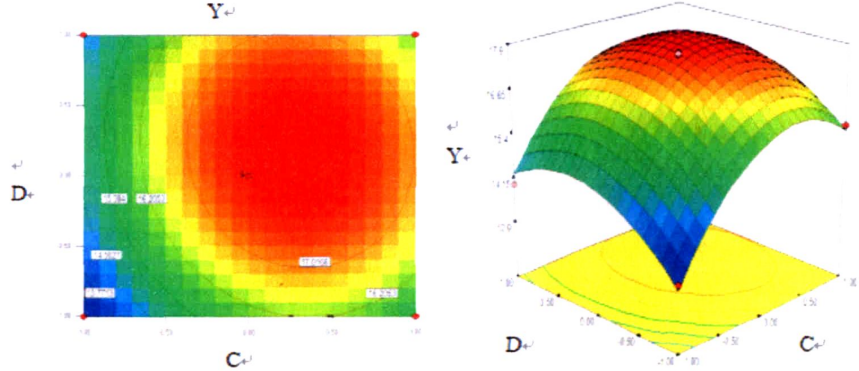


图 f 甲醇浓度与料液比交互作用

Fig. f Interaction between methanol concentration and solid-liquid ratio

图 2.6 各因素见得交互作用

Fig. 2.6 Interaction of various factors

图 2.6 中 a、b、c、d、e、f 给出了当其中两个因素固定在零水平, 另外两个因素间的交互作用图, 由图 2.6 可以看出, 提取温度与提取时间 (A 与 B)、提取温度与料液比 (A 与 C)、提取温度与甲醇浓度 (A 与 D)、提取时间与料液比 (B 与 C)、提取时间与甲醇浓度 (B 与 D) 间的交互作用显著, 表现为等高线图呈椭圆形, 而料液比与甲醇浓度间 (C 与 D) 的交互作用不显著, 表现为等高线图呈圆形。

根据所得到的模型, 通过软件对回归方程进行求导, 并令一阶偏导数为零, 得到一元一次方程组, 解方程组得到在稳定状态下各因素的最佳水平, 与槟榔多酚提取率的预测值。软件给出的影响槟榔多酚提取的各因素最佳水平为: A (提取温度) = 0.34、B (提取时间) = 0.31、C (料液比) = 0.27、D (甲醇浓度) = 0.62, 对应的各因素实际水平为: 提取温度 61.7 °C、提取时间 53.1 min、料液比 1:15.51、甲醇浓度为 86.2%。在此条件下模型预测槟榔多酚提取率为 17.96 mg/g。

#### 2.2.7.4 验证试验

为检验结果可靠性, 根据上述试验结果, 进行验证试验, 考虑到实际操作方便, 将上述条件修改为提取温度 62 °C, 提取时间 53 min、料液比 1:16、甲醇浓度 86.2%, 再次条件下进行三次平行试验, 结果得到槟榔多酚提取率为 17.82 mg/g, 与理论预测值较为接近, 相对误差为 0.78%。说明优化结果可靠。

## 2.3 讨论与小结

### 2.3.1 讨论

有机溶剂萃取法是植物多酚提取最常用的方法, 因为其提取过程不需要复杂的设备, 提取工艺简单, 成本较低。而影响植物多酚有机溶剂萃取法的主要因素为提取温度, 提取时间, 料液比, 提取剂种类及浓度。提取温度直接影响多酚分子在溶液中的相对运动, 一般来说, 温度越高多酚分子的相对运动越剧烈, 其向溶液中扩散的速率越高, 因而提取率越高, 但温度不宜过高, 因为植物多酚大多为热敏性物质, 许多多酚成分在高温下会发生分解氧化等, 因而会使多酚的含量较低, 不同植物其多酚的耐热性及其最佳提取温度有所不同, 因此, 必须通过实验来确定最佳的提取温度, 提取时间也是影响植物多酚有机溶剂萃取法的重要因素, 植物多酚因温度不同及其与溶液中的浓度差的不同其达到渗透平衡的时间也会有所差异, 在提取初始阶段随着时间的延长, 植物多酚的提取率会逐渐增加, 但当达到一定时间后, 反应体系达到渗透平衡后植物多酚的提取率不再增加, 甚至由于时间过长, 导致植物多酚氧化而造成植物多酚提取率下降; 料液比主要影响植物多酚提取过程中溶质多酚和溶液提取剂之间的浓度差, 一般料液比越大,

体系溶质与溶液的浓度差越大,传质动力越大,植物多酚提取效率增大,但考虑到成本问题料液比不宜过大,而且也有报道称料液比过大植物多酚的提取效率反而可能会下降,具体原因尚不明确,因此,要根据实际情况,将料液比控制在适宜的范围内;植物多酚是由多种具有共同基团或特性的化合物组成的混合物,其成分复杂多样,不同成分在不同溶剂中的溶解差异较大,有机溶剂萃取法提取植物多酚主要是依靠相似相容原理,将植物多酚提取出来,由于不同植物,多酚的组成各不相同,其不同溶剂中的溶解性差异较大,因此,提取剂的种类及浓度,对植物多酚的提取有很大影响,实际应用中应根据不同植物中多酚的组成及特性来选择不同的提取溶剂及其浓度,以达到最优的提取效果。以上因素对有机溶剂萃取法提取植物多酚的提取效率的影响并不是独立的,而往往是相互作用共同影响提取效率,因此,要综合考虑各种因素对结果的影响,

响应曲面法(RSM)能够考察各种因素的交互作用,并用立体图型直观的表现出来,是工艺优化的常用方法<sup>[54]</sup>。近年来随着统计学在各个领域的飞速发展,响应面的应用得到了大大的扩展,其在食品领域应用最为广泛,许多学者采用响应面的方法来进行工艺的优化,并得到了很好的结果。

### 2.3.2小结

本章首先对槟榔多酚的最佳提取溶剂进行了筛选,然后采用单因子试验方法,考察了提取温度、提取时间、料液比、甲醇浓度对槟榔多酚提取率的影响,在此基础上采用 Box-Behnken 四因素三水平的响应曲面法对槟榔多酚的提取工艺进行了优化,结果表明:槟榔多酚的最佳提取溶剂为甲醇,提取过程的各因素对槟榔多酚的提取率均有一定影响,槟榔多酚的提取率在一定范围内随着温度的升高而增加,随着提取时间、料液比和甲醇浓度的增加而增大,采用响应曲面的方法对槟榔多酚的提取工艺进行优化,结果得到各因素对槟榔多酚提取率均有显著影响,因素间交互作用显著,通过模型优化得到槟榔多酚最佳提取工艺条件为提取温度 62℃,提取时间 53min、料液比 1:16、甲醇浓度 86.2%,在此条件下槟榔多酚的提取率为 17.82 mg/g。韩林<sup>[55]</sup>,采用响应曲面法对槟榔籽中的多酚加热回流提取工艺进行了优化,结果得到的最佳提取工艺为温度 58℃,提取时间 4h,料液比 1: 47,在最佳工艺条件下槟榔籽多酚的提取率为 146.63mg/g,同时,采用响应曲面法,对槟榔多酚的超声波辅助提取工艺进行了优化,得到的最佳工艺为温度 58℃,时间 42min,料液比 1: 53,在此条件下,槟榔籽多酚提取率为 160.95mg/g,与加热回流法相比,提取时间短,提取率高,但两种方法的提取率远远高于本研究,其原因可能是原料不同,因此多酚含量有所差异。

### 3 槟榔多酚的纯化

槟榔中含有大约 15% 的酚类物质, (包括缩合鞣质、水解类鞣质及非丹宁类黄烷醇等) 此外, 槟榔中还含有生物碱, 多种矿物质、氨基酸、挥发油、木质素、甘露糖、半乳糖、 $\gamma$ -儿茶素、 $\beta$ -谷甾醇、无色花青素、槟榔红色素、儿茶精花白素及皂甙、胆碱等, 采用溶剂法提取的槟榔多酚为多酚含量较低的粗品, 其中含有多糖、槟榔碱等杂质, 因此需对槟榔多酚进行纯化, 使其更好的发挥生理效用。多酚纯化的方法有很多种, 目前使用最多的是大孔树脂吸附法<sup>[56,57]</sup>。

大孔树脂是一类以吸附为特点, 对有机物具有浓缩、分离作用的高分子聚合物<sup>[58,59]</sup>, 它具有物理化学稳定性高, 吸附选择性独特, 不受无机物存在的影响、再生简单、解吸条件温和等特点, 广泛用于生物物质的分离和纯化<sup>[60,61]</sup>, 本研究采用大孔树脂吸附法, 纯化槟榔多酚, 研究了最佳吸附和解析条件。

#### 3.1. 材料与方

##### 3.1.1 材料

海南产鲜槟榔, S-8、D-3520、ADS-8、DM-0301、AB-8 型大孔树脂购于长沙裕丰化玻公司; 所用药品均为分析纯

##### 3.1.2 方法

###### 3.1.2.1 槟榔多酚含量的测定

槟榔多酚含量的测定按照 2.1.4.3 进行

###### 3.1.2.2 大孔树脂的预处理

将 S-8、D-3520、ADS-8、DM-0301、AB-8 型大孔树脂用无水乙醇浸泡 24h, 用蒸馏水洗净, 然后用 5% 的 HCl 浸泡 8h, 用蒸馏水洗至中性, 再用 5% 的 NaOH 浸泡 8h 后, 再用蒸馏水洗净待用<sup>[62,63]</sup>。

###### 3.1.2.3 大孔树脂的静态吸附与解析特性研究

准确称取预处理后的 5 种树脂各 5.0 g, 先用滤纸吸干水分, 分别置于 250 mL 的具塞磨口三角瓶中, 加入 50 mL 槟榔多酚粗提液, 置于 25 °C 水浴摇床震荡 10 h, 每隔 2 h 测定溶液吸光度<sup>[64]</sup>, 绘制吸附特性柱形图。

$$\text{吸附量}(\text{mg/g}) = \frac{(C_0 - C_1)V_0}{m} \quad (3.1)$$

$$\text{吸附率}(\%) = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100 \quad (3.2)$$

式中:  $C_0$ —— 吸附前的多酚溶液浓度, mg/mL;

$C_1$ —— 吸附后多酚溶液浓度, mg/mL;

$V_0$ ——多酚粗体也体积 mL

树脂静态吸附后, 过滤, 加入无水乙醇 50mL, 置于 25℃水浴摇床振荡 10h, 每隔 2h 取样, 测定样品的吸光度, 绘制解析时间曲线, 解析率按下式计算

$$\text{解析率}(\%) = \frac{C_2 V_2}{(C_0 - C_1) V_1} \times 100 \quad (3.3)$$

$$\text{解析量}(\text{mg/g}) = \frac{C_2 V_2}{m} \quad (3.4)$$

式中:  $C_2$ ——解析后 槟榔多酚溶液浓度, mg/mL;

$C_0$ —— 吸附前的多酚溶液浓度, mg/mL;

$C_1$ —— 吸附后多酚溶液浓度, mg/mL;

$V_1$ —— 吸附多酚溶液体积, mL ;

$V_2$ —— 解析后多酚溶液体积, mL。

#### 3.1.2.4 大孔树脂的筛选

根据 3.1.2.2 中得到的 5 种大孔树脂的静态吸附与解析特性图, 在各自的最佳吸附与解析时间对槟榔多酚进行吸附与解析, 选出吸附率与解析率最好的树脂待用。

#### 3.1.2.5 大孔树脂的动态吸附与解析

筛选出的树脂采用湿法装柱, 装入  $\varnothing 3.0\text{cm} \times 40.0\text{cm}$  的玻璃柱中, 装柱高度约 25cm, 准确量取一定树脂床体积的槟榔多酚粗提液, 调节 pH 后上柱, 收集流出液, 测定穿透液中多酚浓度, 吸附完成后, 用无水乙醇解吸树脂上吸附的槟榔多酚, 收集洗脱液, 测定穿透液中多酚浓度<sup>[65]</sup>。

#### 3.1.2.6 大孔树脂纯化槟榔多酚条件的响应曲面优化

采用 Design expert 响应曲面发建立三因素三水平的 Box-behnken 模型, 以上柱液浓度、上柱液体积、上柱液 pH 为吸附自变量, 以吸附率为吸附操作响应值, 以解析液体积, 解析液浓度、解析液 pH 为解析操作自变量, 以解析率为解析操作响应值, 根据前期单因素实验结果, 吸附和解析自变量因素编码及水平见表 3.1 和表 3.2。

表 3.1 大孔树脂动态吸附条件优化因素水平

Table 3.1 Factors and levers in box-behnken experimental design for optimizing the dynamic adsorption of areca nut polyphenols

| 因素              | -1   | 0    | 1    |
|-----------------|------|------|------|
| A 上柱液浓度 (mg/mL) | 1.92 | 2.05 | 2.62 |
| B 上柱液体积 (mL)    | 5BV  | 6BV  | 7BV  |
| C 上柱液 pH        | 1.5  | 2.0  | 2.5  |

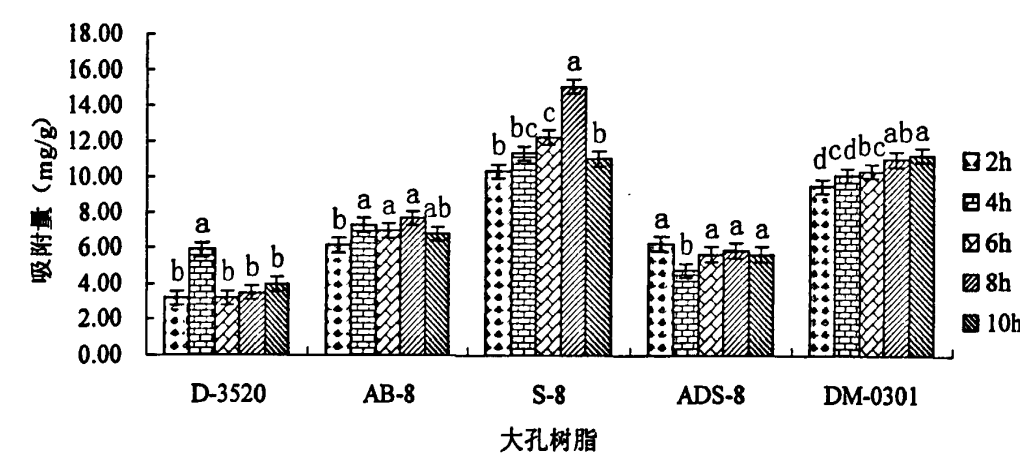
表 3.2 大孔树脂动态解析条件优化因素与水平

Table 3.2 Factors and levers in box-behnken experimental design for optimizing the dynamic desorption of areca nut polyphenols

| 因素           | -1  | 0   | 1   |
|--------------|-----|-----|-----|
| A 解析液浓度 (%)  | 70  | 75  | 80  |
| B 解析液体积 (mL) | 5BV | 6BV | 7BV |
| C 解析液 pH     | 3.5 | 4.0 | 4.5 |

3.2 结果与分析

3.2.1 大孔树脂静态吸附特性研究



(注：图中相同字母表示差异不显著  $P>0.05$ ；不同字母表示差异显著  $P<0.05$ )

图 3.1 大孔树脂静态吸附特性柱形图

Fig.3.1 The adsorption time bars of macroporous resin

五种大孔树脂对槟榔多酚的吸附量随时间的变化柱形图见图 3.1，由图 3.1 可知，D-3520 型大孔树脂在 4 h 时达到最大吸附量 5.90 mg/g，超过 4 h 吸附量显著下降 ( $P<0.05$ ) 并且吸附量随着时间的延长变化不明显，因此该种树脂的最佳吸附时间为 4 h；AB-8 型树脂在 8 h 时达到最大吸附量 7.71 mg/g，但与 4 h、6 h

及 10 h 相比差异均不显著 ( $P>0.05$ ) 因此, 从实际操作角度考虑, 可将该树脂的最佳吸附时间确定为 4 h; S-8 型大孔树脂在 8 h 时达到最大吸附量 15.11 mg/g, 与其他时间相比差异显著 ( $P<0.05$ ) 因此确定该种型号的树脂最佳吸附时间为 8 h; ADS-8 型大孔树脂在 2 h 时达最大吸附量 6.27 mg/g, 明显高于 4 h ( $P<0.05$ ), 与 6 h、8 h 及 10 h 相比差异不显著, 因此确定该树脂的最佳吸附时间为 2 h; DM-0301 型树脂随着时间的延长吸附量逐渐增加, 在 10 h 时达最大吸附量 11.27 mg/g, 与 8 h 相比差异不显著 ( $P>0.05$ ) 但与其他时间相比差异显著 ( $P<0.05$ ) 因此, 该树脂的最佳吸附时间为 8 h。

3.2.2 大孔树脂静态解析特性研究

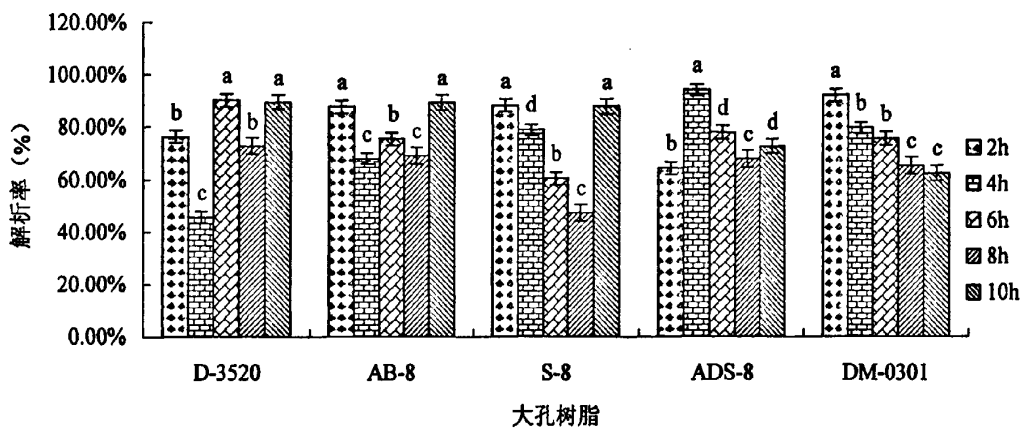


图 3.2 大孔树脂静态解析柱形图

Fig. 3.2 The elution bars of macroporous resin

五种大孔树脂吸附多酚后对其进行解析, 解析率随时间的变化情况见图 3.2, 由图 3.2 可知, D-3520 型树脂在 6 h 时达到最大解析率 90.28%, 明显高于 2 h、4 h 和 8 h, ( $P<0.05$ ), 与 10 h 相比差异不显著 ( $P>0.05$ ) 因此该种型号的树脂最佳解析时间为 6 h; AB-8 型大孔树脂在 10 h 时达最大解析率 89.46%, 与 2 h 的 87.70%相比, 差异不显著 ( $P>0.05$ ), 与其它时间相比差异显著 ( $P<0.05$ ) 因此, 确定该树脂的最佳解析时间为 2 h; S-8 型大孔树脂在 10 h 时达最大解析率 88.77%, 与 2 h 的 87.18%相比差异不显著, 但明显高于 4 h、6 h 及 8 h ( $P<0.05$ ), 因此该树脂的最佳解析时间选择 2 h; ADS-8 型大孔树脂在 4 h 时达最大解析率 94.14%, 明显高于其它时间的解析率 ( $P<0.05$ ); DM-0301 型大孔树脂的解析率随时间的延长而有所下降, 并在 2 h 时达最大解析率 92.18%, 与其它时间相比差异显著, 因此, 该型号树脂的最佳解析时间为 2 h。



### 3.2.3 大孔树脂的筛选

根据 3.2.1 和 3.2.2 中得到的各种大孔树脂的最佳吸附与解析时间，在各自的最佳吸附与解析时间下，对槟榔多酚进行纯化，结果见图 3.3

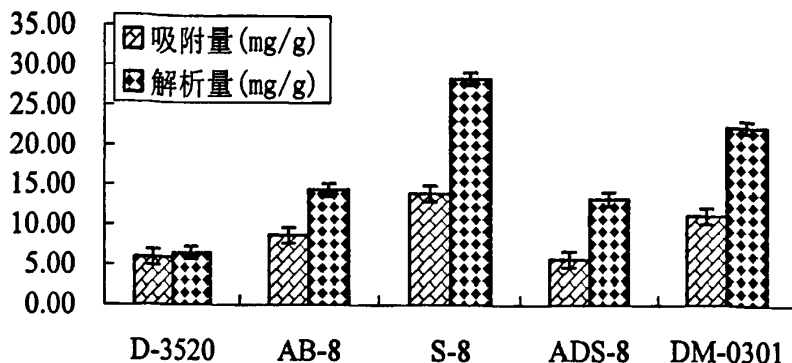


图 3.3 五种大孔树脂的吸附量和解析量

Fig.3.3 Adsorption and elution amount of five macroporous resin

从图 3.3 中可以看出，五种大孔树脂中，S-8 型树脂的吸附量和解析量均最大，分别为 14.01 mg/g 和 28.44 mg/g，树脂筛选的目的为筛选出同时具有高吸附量和解析量的树脂，因此本实验选择 S-8 型树脂为最佳树脂，对槟榔多酚进行纯化。

### 3.2.4 大孔树脂动态吸附实验

#### 3.2.4.1 上柱液 pH 对大孔树脂吸附率的影响

将处理好的 S-8 大孔树脂，采用湿法装柱，用水洗平衡后上柱，上柱液浓度为 1.92 mg/mL，上柱液体积 100 mL，设定上柱液 pH 分别为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0，分别测定流出液的多酚含量，考察不同上柱液 pH 对吸附率的影响，结果见图 3.4

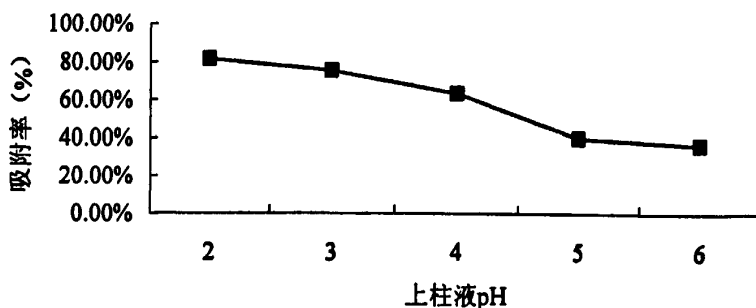


图 3.4 上柱液 pH 对吸附率的影响

Fig3.4 The effect of pH of polyphenols on the adsorption rate

由图 3.4 可知，随着 pH 的增加，S-8 型大孔树脂对槟榔多酚的吸附率逐渐下降，在 pH 为 2.0 时达最大吸附率 81.64%，这可能是由于槟榔多酚中含有一定的酚酸类物质，如绿原酸，果酸、没食子酸、鞣酸等，使粗提液呈现弱酸性，酸性物质在酸液中吸附，在碱液中解析，碱性物质在碱液中吸附，在酸液中解析<sup>[66]</sup>，因此选择 pH=2.0 为最佳吸附 pH。

3.2.4.2 上柱液浓度对大孔树脂吸附率的影响

在 pH=2.0 条件下，上柱液体积 100 mL，设定上柱液浓度分别为：1.42、1.74、2.05、2.90、3.82 mg/mL，采用 S-8 型大孔树脂对槟榔多酚粗提液进行吸附，考察不同上柱液浓度对大孔树脂吸附槟榔多酚的影响，结果见图 3.5。由图 3.5 可知，在槟榔多酚粗提液浓度小于 2.05 mg/mL 时，吸附率随着浓度的增加而增大，在 2.05 mg/mL 时达最大值 66.73%，当继续提高槟榔多酚粗提液浓度时，槟榔多酚吸附率反而有所下降，这可能是由于，浓度低时增加槟榔多酚的浓度，有利于增加与树脂接触的多酚分子的数量，吸附率增大，当达到 2.05 mg/mL 时，树脂达到吸附饱和状态，过量的多酚分子无法被吸附，直接穿透大孔树脂，导致穿透液多酚含量增加，吸附率降低。

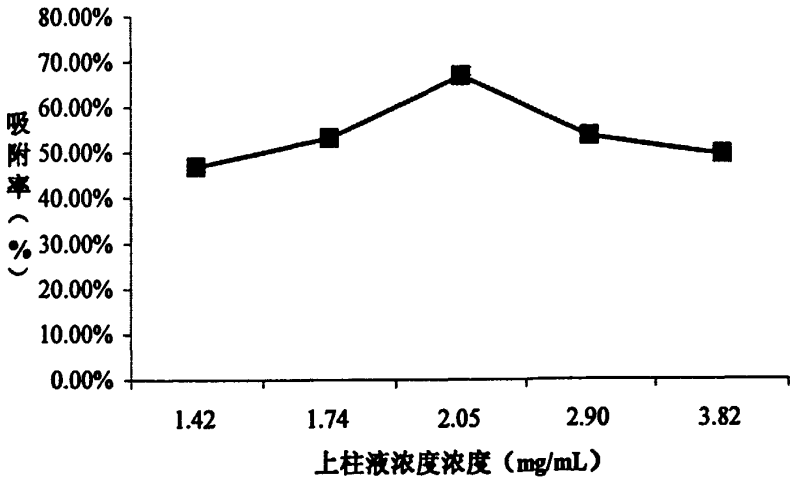


图 3.5 上柱液浓度对大孔树脂吸附槟榔多酚的影响

Fig3.5 The effect of concentration of polyphenols on the adsorption rate

3.2.4.3 上柱液体积对大孔树脂吸附率的影响

在 pH=2.0，上柱液浓度为 2.05 mg/mL 的条件下，选择上样液体积为 50、100、150、200、250mL 相当于 2、4、6、8、10 倍树脂床体积（2BV、4BV、6BV、8BV、10BV）进行上柱，考察不同上样体积对多酚吸附率的影响，结果见图 3.6。

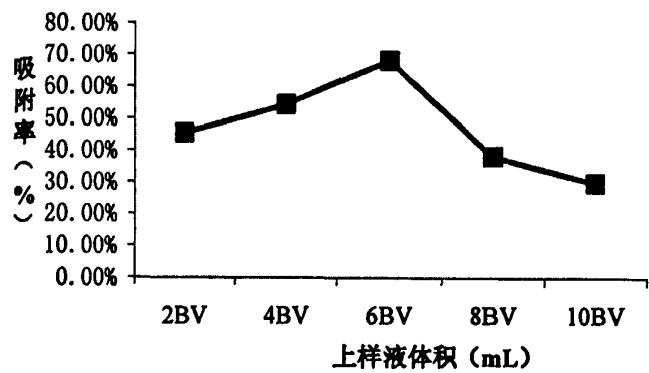


图 3.6 上柱液体积对大孔树脂吸附率的影响

Fig3.6 The effect of volum of polyphenols on the adsorption rate

由图 3.6 可知，当上样液体积小于 6 BV 时，S-8 大孔树脂对槟榔多酚的吸附率随着上样液体积的增加而增大，但当上样液体积超过 6 BV 时，大孔树脂对槟榔多酚的吸附率反而明显下降，而且，漏出液多酚的质量浓度超过了上样液浓度的 10%，这说明，在槟榔多酚质量浓度为 2.05 mg/mL 时，当上样液体积为 6 BV 时，大孔树脂对槟榔多酚的吸附达到了饱和状态，因此选择 6 BV 为最佳吸附体积。

3.2.5 大孔树脂动态解析实验

3.2.5.1 解析液 pH 对解析率的影响

采用 95%的乙醇溶液对吸附的槟榔多酚进行洗脱，固定洗脱体积为 4 BV，用 1 mol/L 的 HCl 溶液分别调节 pH 值为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、考察不同洗脱液 pH 对大孔树脂解析率的影响，实验结果见图 3.7。

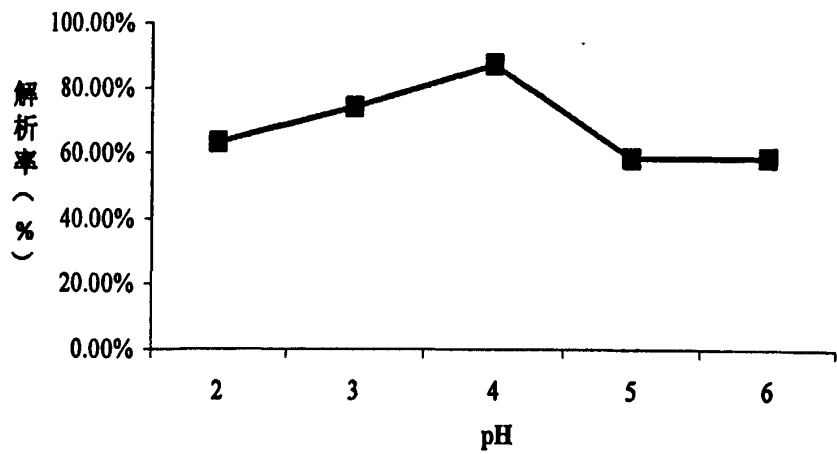


图 3.7 解析液 pH 对解析率的影响

Fig. 3.7 The effect of elution liquid pH on the elution rate

由图 3.7 可以看出，在较低的 pH 范围内，随着 pH 的增加，解析率逐渐增

加，当 pH 值为 4.0 时，解析率达最大值 87.50%，继续升高 pH 值，解析率反而有所下降，并且维持在较低水平，这可能是由于酸性物质在偏碱性条件下有较好的解析率，但 pH 过高，多酚类物质会发生氧化，导致解析率降低，因此选择 pH=4.0 为最佳解析 pH。

3.2.5.2 解析液浓度对解析率的影响

在 pH 为 4.0，洗脱体积为 4 BV 的条件下，设定乙醇浓度分别为 55%、65%、75%、85%、95%，分别测定流出液中多酚含量，考察不同乙醇浓度对解析率的影响，实验结果见图 3.8，由图 3.8 可以看出，随着乙醇浓度的增加，从 55%到 75%，大孔树脂的解析率不断增加，在 75%时达最大解析率 87.30%，继续增加乙醇浓度，解析率反而有所下降，这可能是由于在一定范围内，乙醇浓度增加，槟榔多酚的溶解性也不断增加，因而解析率提高，但由于槟榔中的多酚既含醇溶性成分，同时又含有水溶性成分，过高的浓度导致水溶性多酚溶解性降低，同时，高浓度的醇溶液会导致醇溶性杂质的流出，因此解析率会有所下降。因而，选择 75%的乙醇为最佳洗脱浓度<sup>[67]</sup>。

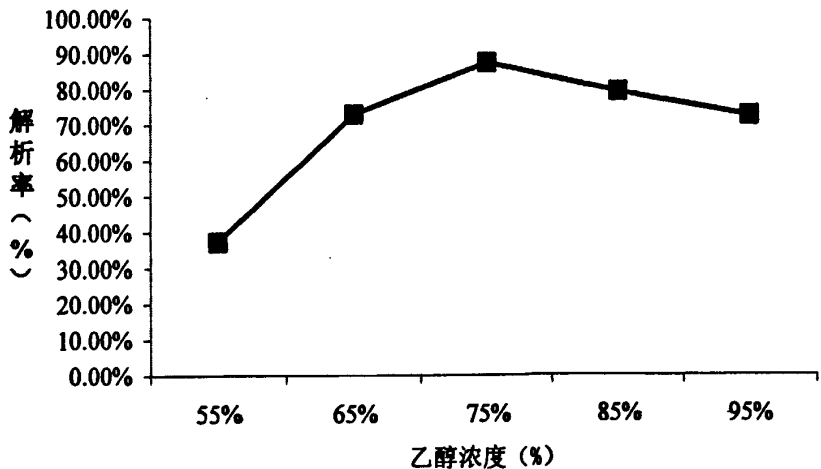


图 3.8 乙醇浓度对大孔树脂解析率的影响

Fig. 3.8 The effect of elution liquid concentration on the elution rate

3.2.5.3 解析液体积对解析率的影响

采用 75%的乙醇，在 pH 为 4.0 的条件下，分别选择洗脱体积为 2 BV、4 BV、6 BV、8 BV、10 BV 进行洗脱，分别测定洗脱液中多酚的含量，考察不同洗脱体积对解析率的影响，实验结果见图 3.9，由图 3.9 可以看出，70%的乙醇溶液对大孔树脂的解析率随着洗脱体积的增加而不断增加，当洗脱体积为 2BV 时，解析率只有 47.74%，当洗脱体积增加到 6 BV 时，解析率达到 75.71%，之后随着洗脱体积的增加，解析率增加不明显，趋于稳定，这可能是由于洗脱体积增大，

槟榔多酚与溶剂接触充分，因而解析率增加，当达到 6 BV 时，槟榔多酚趋于完全解析，因而解析率趋于恒定，因而最佳解析体积为 6 BV。

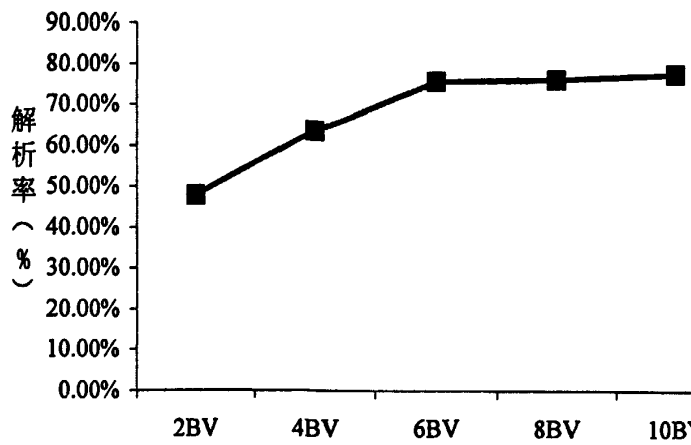


图 3.9 洗脱液体积对解析率的影响

Fig3.9 The effect of elution liquid volume on the elution rate

3.2.6 响应面法优化槟榔多酚纯化工艺

3.2.6.1 动态吸附试验条件的优化及模型的建立

根据 Design expert 中三因素三水平的 Box-behnken 进行了 15 组吸附试验，其中 1~12 为析因点，13~15 为零点及中心试验点，试验设计及结果见表 3.3，对表 3.3 中的实验数据进行回归分析，得到吸附率与上柱液浓度、上柱液体积、上柱 pH 之间的二次多元回归方程：

$$Y=93.10+1.95A+3.24B+0.34C-0.80AB+2.25AC-1.72BC-3.81A^2-3.54B^2-4.84C^2 \quad (3.5)$$

对该模型进行回归系数估计及方差分析，结果见表 3.4，由表 3.4 中的回归方程系数估计及方差分析可知，方程模型的显著性  $P=0.0016<0.01$ ，属极显著范畴，失拟项  $P=0.1378>0.05$  不显著，不显著的失拟项是可取的，回归方程的系数估计分析表明回归方程的相关系数  $R^2$  为 0.9761，调整后的  $R^2$  为 0.9330，说明方程中各自变量与因变量之间的线性关系显著，方程对实验结果拟合度良好，实验误差小，综合表明，该方程适合用于大孔树脂纯化槟榔多酚动态解析条件的优化。表 3.4 表明，模型中一次项 A、B 对结果影响极显著 ( $P<0.01$ )，一次项 C 多结果影响不显著 ( $P>0.05$ ) 交互作用项 AC、BC、对结果影响显著 ( $P<0.05$ )，AB 对结果影响不显著 ( $P>0.05$ )，二次项  $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$ 、对结果影响极显著 ( $P<0.01$ )。响应曲面是响应值与个自变量之间构成的三维空间曲线，其等高线可以直观反映出各对响应值的影响及因素间交互作用的强弱，本实验中各因素间的等高线图及相应曲面图见图 3.10

表 3.3 大孔树脂动态吸附条件优化试验设计及结果

Table 3.3 Arrangement and experimental results of the Box-Behnken experimental design for optimizing the dynamic adsorption of areca nut polyphenols

| 试验号 | A 上柱液浓度 (mg/mL) | 上柱液体积 (mL) | 上柱液 pH | 吸附率 (%) |
|-----|-----------------|------------|--------|---------|
| 1   | -1              | -1         | 0      | 78.7    |
| 2   | 1               | -1         | 0      | 85.1    |
| 3   | -1              | 1          | 0      | 88.0    |
| 4   | 1               | 1          | 0      | 91.2    |
| 5   | -1              | 0          | -1     | 85.4    |
| 6   | 1               | 0          | -1     | 83.9    |
| 7   | -1              | 0          | 1      | 80.5    |
| 8   | 1               | 0          | 1      | 88.0    |
| 9   | 0               | -1         | -1     | 79.5    |
| 10  | 0               | 1          | -1     | 88.2    |
| 11  | 0               | -1         | 1      | 84.7    |
| 12  | 0               | 1          | 1      | 86.5    |
| 13  | 0               | 0          | 0      | 93.7    |
| 14  | 0               | 0          | 0      | 92.5    |
| 15  | 0               | 0          | 0      | 93.1    |

表 3.4 吸附试验回归方程系数估计及方差分析

Table 3.4 Estimate value of the regression coefficient and variance analysis for adsorption

| 变异来源           | 平方和    | 自由度 | 均方    | F 值   | P 值    | 显著性 |
|----------------|--------|-----|-------|-------|--------|-----|
| 模型             | 312.09 | 9   | 34.68 | 22.66 | 0.0016 | **  |
| A              | 30.42  | 1   | 30.42 | 19.88 | 0.0067 | **  |
| B              | 83.85  | 1   | 83.85 | 54.79 | 0.0007 | **  |
| C              | 0.91   | 1   | 0.91  | 0.60  | 0.4752 |     |
| AB             | 2.56   | 1   | 2.56  | 1.67  | 0.2524 |     |
| AC             | 20.25  | 1   | 20.25 | 13.23 | 0.0149 | *   |
| BC             | 11.903 | 1   | 11.90 | 7.78  | 0.0385 | *   |
| A <sup>2</sup> | 53.67  | 1   | 53.67 | 35.07 | 0.0020 | **  |
| B <sup>2</sup> | 46.21  | 1   | 46.21 | 30.19 | 0.0027 | **  |
| C <sup>2</sup> | 86.41  | 1   | 86.41 | 56.46 | 0.0007 | **  |
| 残差             | 7.65   | 5   | 1.53  |       |        |     |
| 失拟项            | 6.93   | 3   | 2.31  | 6.42  | 0.1378 |     |
| 纯误差            | 0.72   | 2   | 0.36  |       |        |     |
| 总变异            | 319.74 | 14  |       |       |        |     |

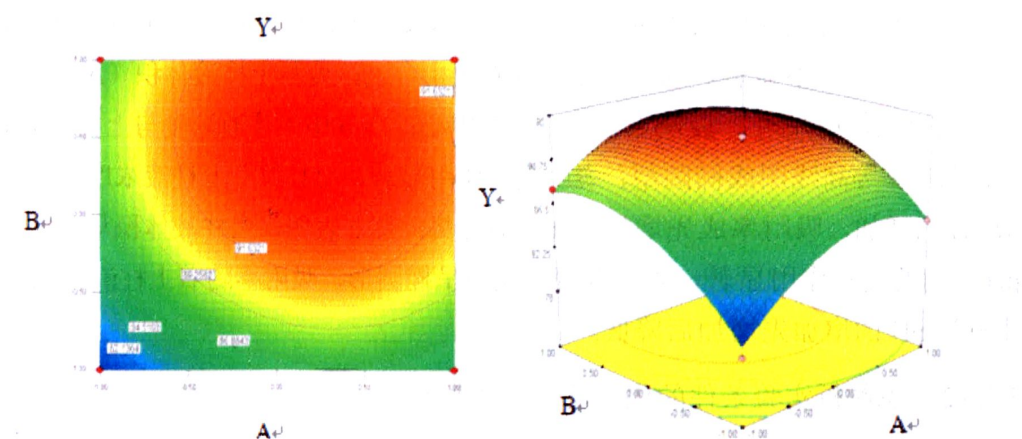


图 3.10 a 上柱液浓度与上柱液体积之间的交互作用  
Fig.3.10 a Interaction between column liquid concentration and column liquid volumn

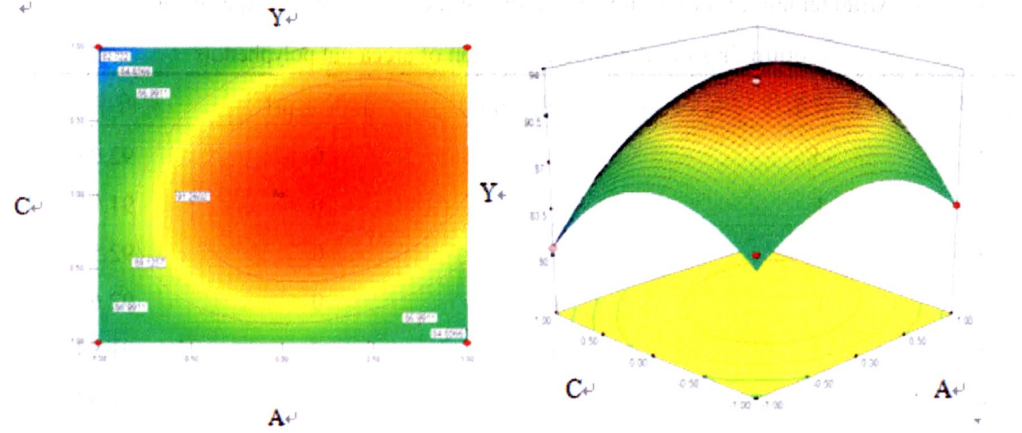


图 3.10 b 上柱液浓度与上柱液 pH 之间的交互作用  
Fig. 3.10 b Interaction between column liquid concentration and column liquid pH

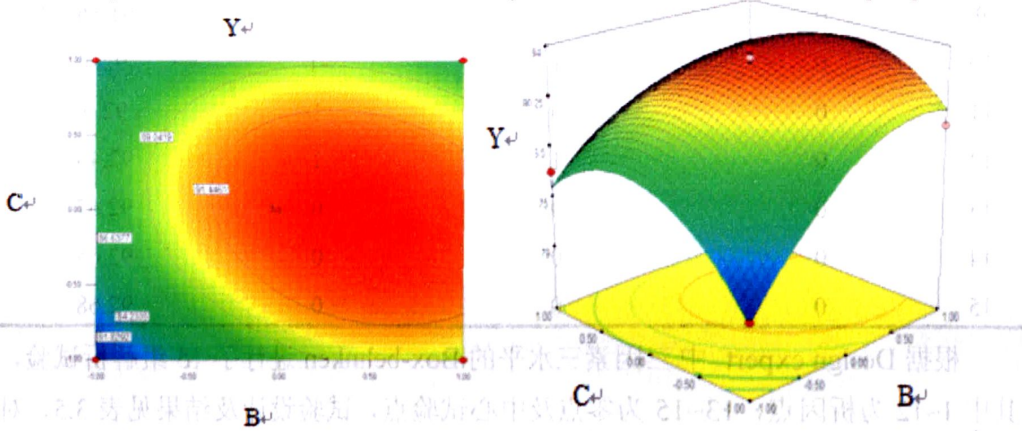


图 3.10 c 上柱液体积与上柱液 pH 之间的交互作用  
Fig. 3.10 c Interaction between column liquid volumn and column liquid pH

图 3.10 动态吸附实验各因素间的交互作用  
Fig.310 Interaction of various factors in dynamic adsorption of areca nut polyphenols  
图 3.10 中给出了动态吸附优化试验中，其中一个因素固定，另外两因素间

的交互作用的等高线图及响应曲面图，等高线图呈椭圆形表示交互作用显著，圆形表示交互作用不显著。从图 a 中可以看出上柱液浓度与上柱液体积（A 与 B）之间的交互作用显著，极值点出现在椭圆中心；图 b 中上柱液浓度与上柱液 pH（A 与 C）等高线图成椭圆型，表明交互作用显著，而且随着上柱液浓度和上柱液 pH 的增加，吸附率成先增加后降低的趋势；图 c 表明，上柱液体积与上柱液 pH 之间的交互作用显著，表现为等高线图呈椭圆形，吸附率随着上柱液体积与上柱液 pH 的增加先增加后降低。

3.2.6.2 动态解析实验条件的优化及模型的建立

表 3.5 动态解析优化实验设计及结果

Table 3.5Arrangement and experimental results of the Box-Behnken experimental design for optimizing the dynamic desorption of areca nut polyphenols

| 试验号 | A 解析液浓度（%） | 解析液体积（mL） | 解析液 pH | 解析率（%） |
|-----|------------|-----------|--------|--------|
| 1   | -1         | -1        | 0      | 92.03  |
| 2   | 1          | -1        | 0      | 91.97  |
| 3   | -1         | 1         | 0      | 92.53  |
| 4   | 1          | 1         | 0      | 92.63  |
| 5   | -1         | 0         | -1     | 91.88  |
| 6   | 1          | 0         | -1     | 92.02  |
| 7   | -1         | 0         | 1      | 92.03  |
| 8   | 1          | 0         | 1      | 92.18  |
| 9   | 0          | -1        | -1     | 91.86  |
| 10  | 0          | 1         | -1     | 92.4   |
| 11  | 0          | -1        | 1      | 92.0   |
| 12  | 0          | 1         | 1      | 92.45  |
| 13  | 0          | 0         | 0      | 92.67  |
| 14  | 0          | 0         | 0      | 92.65  |
| 15  | 0          | 0         | 0      | 92.68  |

根据 Design expert 中三因素三水平的 Box-behnken 进行了 15 组解析试验，其中 1~12 为析因点，13~15 为零点及中心试验点，试验设计及结果见表 3.5，对表 3.5 中的实验数据进行回归分析，得到解析率与解析液浓度、解析液体积、解析液 pH 之间的二次多元回归方程：

$Y=92.67+0.041A+0.27B+0.063C+0.04AB+0.025AC-0.023BC-0.26A^2-0.11B^2-0.38C^2$  (3.6)

对该模型进行回归系数检验及方差分析，结果见表 3.6。由表 3.6 中的回归方程系数估计及方差分析可知，方程模型的显著性  $P=0.0002<0.01$ ，属极显著范



畴，失拟项  $P=0.0507>0.05$  不显著，不显著的失拟项是可取的，回归方程的系数估计分析表明回归方程的相关系数  $R^2$  为 0.9901，调整后的  $R^2$  为 0.9724，说明方程中各自变量与因变量之间的线性关系显著，方程对实验结果拟合度良好，实验误差小，综合表明，该方程适合用于大孔树脂纯化槟榔多酚动态解析条件的优化。从表 3.6 中还可以看出，一次项 B（解析液体积）对结果影响极显著（ $P<0.01$ ）一次项 C（解析液 pH）对结果影响显著（ $P<0.05$ ），一次项 A（解析液浓度）对结果影响不显著（ $P>0.05$ ），交互作用项 AC、BC 对结果影响显著（ $P<0.05$ ），AB 对结果影响不显著（ $P>0.05$ ），二次项  $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$  对结果影响极显著（ $P<0.01$ ）各因素间的交互作用等高线图及响应曲面图见图 3.11。

表 3.6 解析试验回归方程系数估计及方差分析

| Table 3.4 Estimate value of the regression coefficient and variance analysis for desorption |        |     |        |         |         |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|--------|-----|--------|---------|---------|-----|
| 变异来源                                                                                        | 平方和    | 自由度 | 均方     | F 值     | P 值     | 显著性 |
| 模型                                                                                          | 1.37   | 9   | 0.15   | 55.75   | 0.0002  | **  |
| A                                                                                           | 0.014  | 1   | 0.014  | 4.97    | 0.0762  |     |
| B                                                                                           | 0.58   | 1   | 0.58   | 211.01  | <0.0001 | **  |
| C                                                                                           | 0.031  | 1   | 0.031  | 11.41   | 0.0197  | *   |
| AB                                                                                          | 0.0064 | 1   | 0.0064 | 2.34    | 0.1869  |     |
| AC                                                                                          | 0.0025 | 1   | 0.0025 | 0.00913 | 0.9276  | *   |
| BC                                                                                          | 0.0020 | 1   | 0.0020 | 0.74    | 0.4291  | *   |
| $A^2$                                                                                       | 0.26   | 1   | 0.26   | 93.50   | 0.0002  | **  |
| $B^2$                                                                                       | 0.047  | 1   | 0.047  | 17.32   | 0.0088  | **  |
| $C^2$                                                                                       | 0.52   | 1   | 0.52   | 190.46  | <0.0001 | **  |
| 残差                                                                                          | 0.014  | 5   | 0.0027 |         |         |     |
| 失拟项                                                                                         | 0.013  | 3   | 0.0041 | 18.89   | 0.0507  |     |
| 纯误差                                                                                         | 0.0047 | 2   | 0.0023 |         |         |     |
| 总变异                                                                                         | 1.39   | 14  |        |         |         |     |

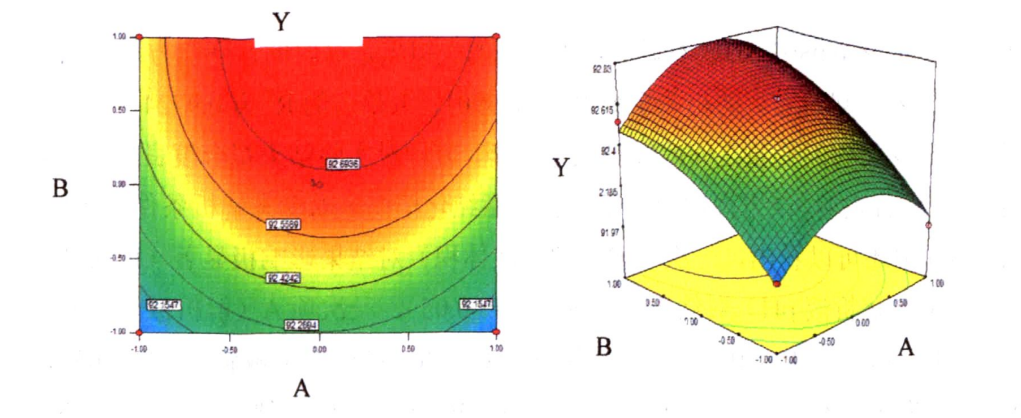


图 3.11a 解析液浓度与解析液体积之间的交互作用

Fig. 3.11a Interaction between elution concentration and elution volume

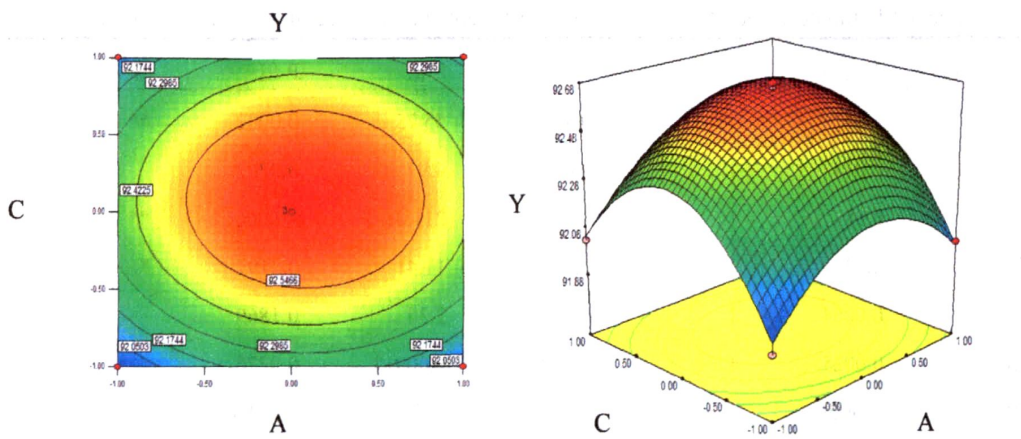


图 3.11b 解析液浓度与解析液 pH 之间的交互作用

Fig. 3.11b Interaction between elution concentration and elution Ph

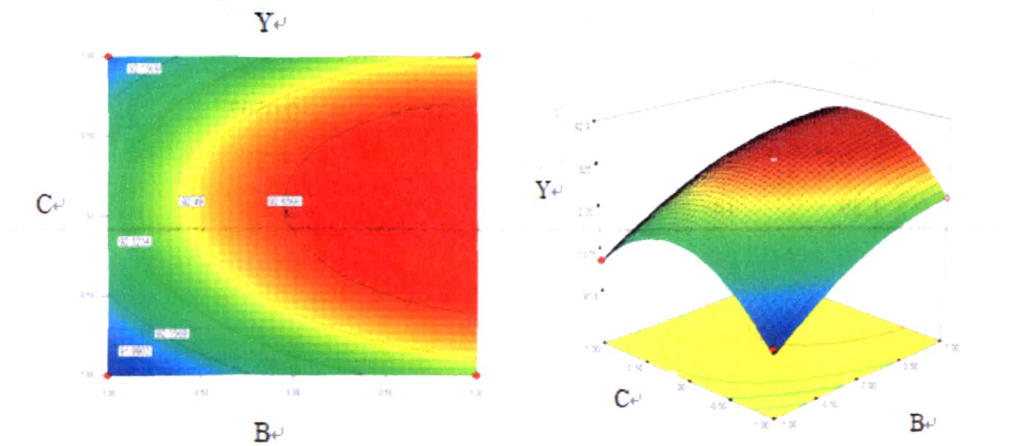


图 3.11c 解析液体积与解析液 pH 之间的交互作用

Fig. 3.11c Interaction between elution volume and elution pH

图 3.11 动态解析实验各因素间的交互作用

Fig. 3.11 Interaction of various factors in dynamic desorption of areca nut polyphenols

图 3.11 中 a、b、c 为动态解析优化试验中, 其中一个因素固定, 另外两因素间的交互作用的等高线图及响应曲面图, 从图 3.11a 可以看出, 解析液浓度与解析液体积 (A 与 B) 之间的交互作用显著, 解析率随着解析液浓度和解析液体积的增加而增大, 从图 3.11b 可以看出, 解析液浓度与解析液 pH (A 与 C) 之间交互作用显著, 解析率随着解析液浓度和解析液 pH 的增加成现增加后下降趋势, 极值点出现在椭圆中心, 从图 3.11c 中可以看出, 解析液体积与解析液 pH (B 与 C) 之间的交互作用显著, 解析率随着解析液体积与解析液 pH 的增加而增大。

### 3.2.6.3 动态吸附与动态解析优化实验结果

根据动态吸附实验与动态解析实验得到的优化模型 3.1 和 3.2, 利用 Design expert7.1 软件对回归方程进行求导, 并令一阶偏导数为零, 得到一元一次方程组, 解方程组得到在稳定状态下吸附试验与解析实验各因素的最佳水平以及吸附率与解析率的理论最优值。动态吸附试验中, 通过软件得到最佳吸附条件为 A 为 0.13 水平, B 为 0.64 水平, C 为 0.04 水平, 换算为实际值为上柱液浓度 2.23 mg/mL, 上柱液体积 6.6 BV, 上柱液 pH2.2, 理论吸附率预测值为 93.81%; 最佳解析条件为 A 为 0.49 水平, B 为 0.50 水平, C 为 -0.02 水平, 即解析液浓度 77.4%, 解析液体积 6.5BV, 解析液 pH3.8, 解析率理论预测值 92.74%, 根据所得到的最优吸附与解析条件进行验证实验, 平行三次, 得到实际吸附率为 93.062%, 解析率为 92.52%, 与理论值接近, 说明动态吸附与解析模型优化结果可靠。

## 3.3 讨论与小结

### 3.3.1 讨论

植物多酚常用的纯化方法有金属离子沉淀法, 膜分离纯化及大孔树脂柱层析分离纯化, 沉淀法分离纯化多酚是利用在一定 pH 条件下多酚与  $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$  等金属离子产生络合沉淀, 离心分离出来后用酸转溶, 得纯化多酚<sup>[68,69]</sup>。此种方法的关键技术是选择合适的沉淀剂。常用沉淀剂有 4 类, 即无机盐类、生物碱、蛋白质类和高分子聚合物 (聚乙烯吡咯烷酮、环糊精等)。其中无机盐类最为常用, 由于其它 3 类沉淀剂成本较高, 目前尚处在试验阶段使用。中国农科院茶叶研究所最早于 20 世纪 80 年代开始用水或乙醇等提取绿茶多酚, 可得纯度为 72% 的粗品, 如先用沸水提取, 用  $\text{AlCl}_3$  沉淀, 再用乙酸乙酯萃取, 可得接近白色的结晶, 有效成分达 99.5%, 提取率约 10.5%<sup>[70]</sup>。

膜分离法是一种以膜两侧的压力差为动力, 对酚类提取物进行分离、纯化的技术。超滤是膜分离法中用途最广泛的方法之一。该方法在常温条件下操作, 不破坏植物多酚, 操作工艺简单, 不污染环境, 但产品纯度偏低, 膜的价格偏高。刘志昌, 夏炎, 张莹, 等<sup>[71]</sup>, 利用膜分离技术分离纯化了白藜芦, 结果表明, 经

微滤膜处理后白藜芦醇的纯度达 30.5%，再经超滤膜处理，纯度达 55.8%。王永刚，李卫，<sup>[72]</sup>研究膜分离技术在花生壳中多酚提取液纯化上的应用，研究表明：使用微滤膜除杂，纳滤膜浓缩后，提取液中多酚的纯度从 9% 提高到 18.67%，体积减少 95.6%，且检验证明经膜处理后提取物仍具有较高的抗氧化能力和一定的抗菌效果。

大孔树脂柱层析法是应用最广泛的植物多酚纯化方法，大孔树脂是 20 世纪 60~70 年代发展起来的一类有机高分子聚合物吸附剂，它具有物理化学稳定性高，吸附选择性独特，不受无机物存在的影响、再生简单、解吸条件温和，具有快速、高效、方便、使用周期长、宜于构成闭路循环、节省费用等优点，常用于天然产物的分离和纯化<sup>[73]</sup>。侯晓丹，袁其朋，田海源<sup>[74]</sup>以安徽怀远石榴加工废弃物石榴籽为研究对象，建立了大孔吸附树脂纯化石榴籽中总多酚的方法，选择 AB-8 大孔吸附树脂为实验树脂，吸附过程为单分子层吸附，吸附等温线符合 Langmuir 方程，拟合方程为  $y=0.01211+0.02086x$ ， $R^2=0.9977$ ，理论最大吸附量为 82.56 mg/g 湿树脂。石榴籽乙酸乙酯提取物水溶液以 0.75 mL/min 流速上柱，以 0.5 mL/min 流速洗脱，所收集产品总多酚含量由 53.13% 提高到 78.80%。

### 3.3.2 小结

本文采用大孔树脂吸附法对槟榔多酚进行纯化，通过静态吸附实验，得到 D-3520、AB-8、S-8、ADS-8、DM-0301 五种大孔树脂的最佳吸附时间分别为 4 h、4 h、8 h、2 h、10 h；通过静态解析实验得到 D-3520、AB-8、S-8、ADS-8、DM-0301 五种大孔树脂的最佳解析时间分别为 6 h、2 h、2 h、4 h、2 h。试验得到 S-8 大孔树脂对槟榔多酚的吸附率和解析率最大。通过动态吸附实验得到，pH 为 2.0，上柱液浓度为 2.05 mg/mL、上柱液体积为 6 BV 时，吸附效果最好；通过动态解析实验得到，解析液 pH 为 4.0、乙醇浓度为 75%、解析液体积为 6 BV 时解析效果最好。

在单因素实验基础上采用响应曲面法对动态吸附与解析实验条件进行优化，结果得到最佳吸附条件为上柱液浓度 2.23 mg/mL，上柱液体积 6.6 BV，上柱液 pH=2.2，理论吸附率预测值为 93.81%；最佳解析条件为解析液浓度 77.4%，解析液体积 6.5 BV，解析液 pH=3.8，解析率理论预测值 92.74%，验证实验表明，吸附率与解析率的实际值与理论预测值相近，模型预测结果准确可靠。

4.槟榔多酚的高效液相色谱与质谱联用分析

高效液相色谱是一种准确度高，分离范围广的快速分离方法，它对化合物的结构破坏性小，适合有机分子和生物分子的分离<sup>[75,76]</sup>。质谱具有其他分析方法无可比拟的灵敏度，对于未知化合物的结构分析定性十分准确，对相应的标准样品要求也比较低<sup>[77,78]</sup>。质谱可以和气相联用如 GC/MS，也可以和高效液相色谱联用如 HPLC/MS。由于色谱和质谱灵敏度相当，再加上分离效果很好的色谱可以作为质谱的进样系统，质谱作为色谱的鉴定仪，速度快，分离好，应用广。色谱-质谱联用成为最好的用于分析微量有机混合物的仪器<sup>[79,80]</sup>。

本章采用超高效液相色谱与质谱联用分析（LC-MS）技术对大孔树脂纯化后的槟榔多酚进行分析，对槟榔多酚的组份进行结构鉴定

4.1 材料与方法

4.1.1 材料

新鲜槟榔， 原产地海南

4.1.2 主要试剂

|         |              |
|---------|--------------|
| 乙腈（色谱纯） | 上海化学试剂厂      |
| 甲醇（色谱纯） | 上海化学试剂厂      |
| 没食子酸标准品 | 上海原叶生物技术有限公司 |
| 绿原酸标准品  | 上海原叶生物技术有限公司 |
| 芦丁标准品   | 上海原叶生物技术有限公司 |
| 表儿茶素标准品 | 上海原叶生物技术有限公司 |

4.1.3 仪器设备

WATERS UPLC-TQD 液相色谱质谱联用仪

4.1.4 方法

4.1.4.1 槟榔多酚提取

槟榔多酚提取按照第二章中得到最佳提取工艺条件进行提取

4.1.4.2 槟榔多酚的纯化

采用第三章中的方法多槟榔多酚进行纯化

4.1.4.3 标准品工作液的配置

准确称取标准品 10mg 至于 10mL 容量瓶中，用甲醇溶解，配置成 1mg/mL 的溶液，置于冰箱中备用

4.1.5 仪器条件

WATERS UPLC-TQD 液相色谱质谱联用仪，离子源温度 110℃，脱溶剂气温度 350℃，脱溶剂气流量 800L/hr。表儿茶素是采用正离子模式，其他均采用负离子模式分析

4.1.6 梯度洗脱程序

梯度洗脱程序见表 4.1

表 4.1 梯度洗脱程序  
Table 4.1 Gradient elution program

| 流动相梯度    |             |          |         |
|----------|-------------|----------|---------|
| 时间 (min) | 流速 (mL/min) | A 乙腈 (%) | B 水 (%) |
| 0        | 0.3         | 10       | 90      |
| 2.5      | 0.3         | 50       | 50      |
| 6.5      | 0.3         | 90       | 10      |
| 9.0      | 0.3         | 10       | 90      |

4.2 结果与分析

4.2.1 多酚标准品 LC-MS 分析

本实验采用 LC-MS 对 4 种多酚标准品进行检测，其中芦丁、绿原酸、没食子酸，采用[M+H]<sup>+</sup>模式检测，表儿茶素采用[M-H]<sup>-</sup>模式检测，四种标准的特征离子对见表 4.2，相对分子量信息见表 4.3 四种标准品的总离子流图见图 4.1

表 4.2 标准品特征离子对  
Table 4.2 Features ion to the standard products

|      | 特征离子对        |                | Dwell (sec) | Cone (volts) | Coll Energy(ev) |
|------|--------------|----------------|-------------|--------------|-----------------|
|      | Parent (m/z) | Daughter (m/z) |             |              |                 |
| 表儿茶素 | 291.5        | 188.8          | 0.1         | 46           | 22              |
|      | 291.5        | 209.3          | 0.1         | 46           | 10              |
| 没食子酸 | 169.1        | 79.1           | 0.1         | 30           | 23              |
|      | 169.1        | 125.1          | 0.1         | 30           | 14              |
| 绿原酸  | 353.5        | 127.2          | 0.1         | 27           | 36              |
|      | 353.3        | 191.2          | 0.1         | 27           | 21              |
| 芦丁   | 609.2        | 271.3          | 0.1         | 51           | 81              |
|      | 609.2        | 300.3          | 0.1         | 51           | 44              |

表 4.3 四种标准品相对分子量

| Table 4.3 Relative molecular mass of standard products |                  |       |
|--------------------------------------------------------|------------------|-------|
| 相对分子量                                                  |                  |       |
| 表儿茶素                                                   | Catechin         | 290.3 |
| 芦丁                                                     | Rutin            | 610.5 |
| 绿原酸                                                    | Chlorogenic acid | 354.3 |
| 没食子酸                                                   | Galic acid       | 170.1 |

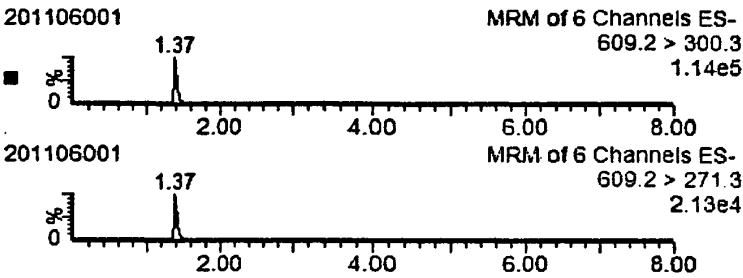


图 4.1a 芦丁标准品总离子流图

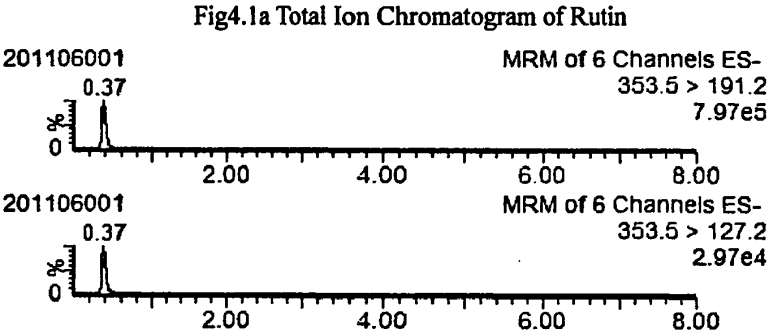


图 4.1b 绿原酸标准品总离子流图

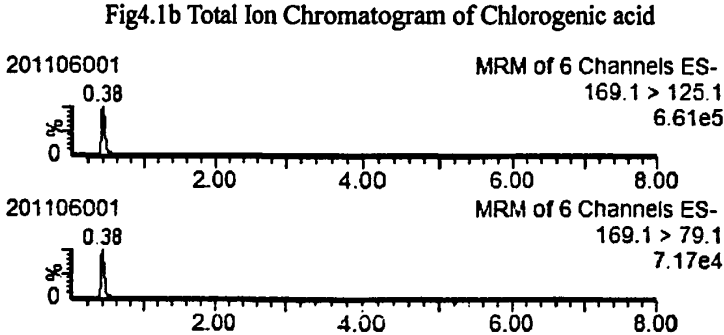


图 4.1c 没食子酸标准品总离子流图

Fig4.1c Total Ion Chromatogram of Galic acid

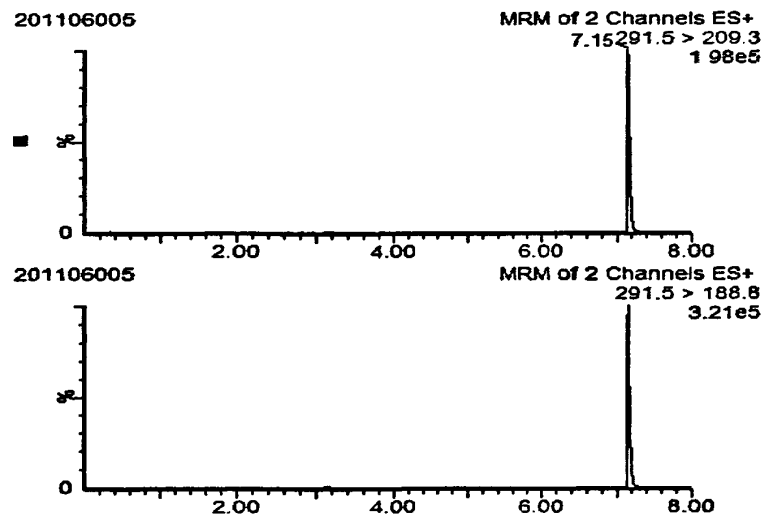


图 4.1d 表儿茶素标准品总离子流图

Fig4.1d Total Ion Chromatogram of Catechin

图 4.1 多酚标准品总离子流图

Fig 4.1 Total Ion Chromatogram of standard polyphenols

4.2.2 槟榔多酚样品 LC-MS 分析

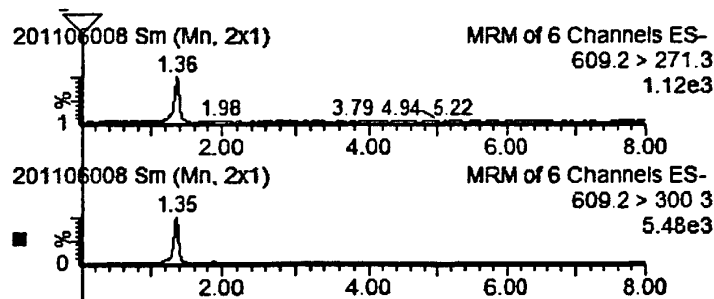


图 4.2a 槟榔中芦丁成分总离子流图

Fig4.2a Total Ion Chromatogram of Rutin in areca nut

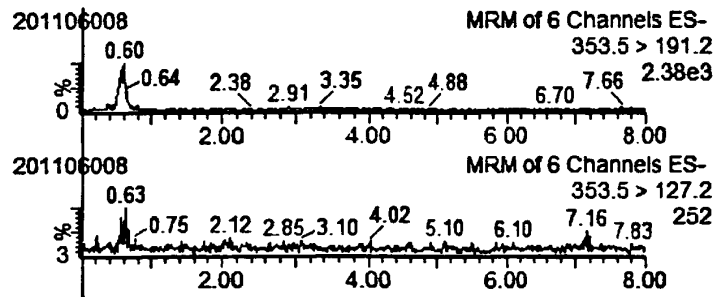


图 4.2b 槟榔中绿原酸成分总离子流图

Fig4.2b Total Ion Chromatogram of Chlorogenic acid in areca nut



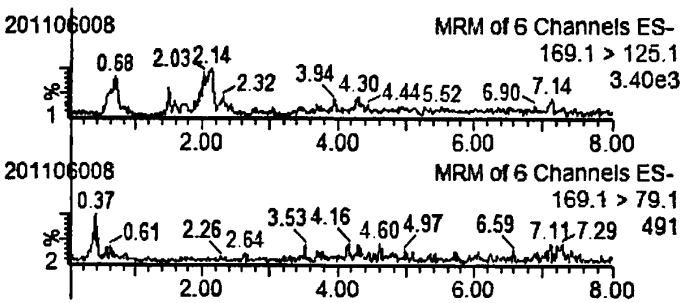


图 4.2c 槟榔中没食子酸成分总离子流图

Fig4.2c Total Ion Chromatogram of Galic acid in areca nut

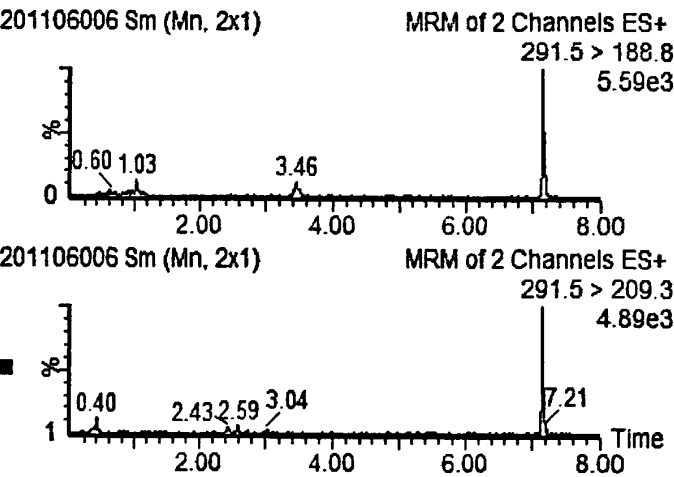


图 4.2d 槟榔中表儿茶素成分总离子流图

Fig4.2d Total Ion Chromatogram of Catechin

图 4.2 槟榔多酚样品总离子流图

Fig 4.2 Total Ion Chromatogram of areca nut polyphenols

表 4.4 槟榔多酚主要成分

Table4.4 component of areca nut polyphenols

| 多酚成分 | 特征离子对 | 相对分子量 |
|------|-------|-------|
| 芦丁   | 609.2 | 610.5 |
| 绿原酸  | 353.5 | 354.3 |
| 没食子酸 | 169.1 | 170.1 |
| 表儿茶素 | 291.5 | 290.3 |

植物多酚在在 ESI-MS 阴离子模式下容易裂解，适宜用于多酚结构的鉴定，Schieber 等<sup>[81]</sup>用 HPLC-ESI-MS 在阴离子模式下测定了芒果原浆中多酚的结构，王志远<sup>[82]</sup>使用 HPLC-ESI-MS 在阴离子模式下测定了龙眼及龙眼壳中多酚的结

构,本章通过对标准品的分析采用正负离子结合的模式对槟榔多酚样品进行分析,分析条件按照 4.1.5 及 4.1.6 中所述,平行 2 次,得到的分析图谱见图 4.2,得到的分析图谱见图 4.2,由图 4.2 可以看出槟榔多酚样品中含有质荷比  $m/z=609.2$ [M-H]<sup>-</sup>负离子特征碎片峰,与标准品对照推测其为芦丁即黄酮类成分;质荷比  $m/z=353.5$ [M-H]<sup>-</sup>负离子特征碎片峰,与标准品对照推测其为绿原酸;质荷比  $m/z=169.1$ [M-H]<sup>-</sup>负离子特征碎片峰,与标准品对照推测其为没食子酸;质荷比  $m/z=291.5$ [M+H]<sup>+</sup>正离子特征碎片峰,与标准品对照推测其为表儿茶素。槟榔多酚主要成分见表 4.4

## 4.3 讨论与小结

### 4.3.1 讨论

植物多酚的检测技术主要分为光谱检测,电化学检测及质谱检测三大类;光谱分为原子光谱及分子光谱,分子光谱又分为紫外及可见光谱,其中紫外光谱因其检测器灵敏度高,结构简单而应用广泛,在茶多酚的研究中,紫外光谱是最常用的方法。电化学检测是根据溶液或介质中的电化学性质及变化规律而进行分析的一种方法,主要有分为电位分析,伏安法,库伦分析法等几类,该方法灵敏度高,线性范围广,因此常被用作检测手段;色谱法是近代发展起来的应用最广泛的分离检测技术,在食品、生物、化学等领域发挥着越来越重要的作用,常用的色谱法有薄层色谱法,气相色谱法和高效液相色谱法,薄层色谱法操作简便快捷,分析成本较低,但分离效果较差,不适用于复杂体系,气相色谱法需要将样品汽化才能检测到信号,而大多酚类物质沸点较高而且是热敏性物质,往往需要将样品衍生化后进行检测,其操作程序繁琐,因此较少应用于酚类物质的检测,高效液相色谱是 20 世纪 60 年代发展起来的新型高校分析技术,其分析对象包括高沸点,热敏性高、分子量较大,极性差异较大的化合物及生物大分子物质,其分析灵敏度高,准确性好,因此,广泛应用于酚类物质的检测,但高效液相色谱也有其一定局限性,即对具有相似结构的物质不能达到很好的分离效果,质谱技术的出现,使得分析未知化合物的分子量等成为可能,采用高效液相色谱与质谱联用技术可以进一步确定化合物的分子量,因此可将结构相似的不同物质区分开来,因此,该技术在多酚分离检测中应用最为广泛。

付桂明,万茵,等,<sup>[83]</sup>采用液质联用技术对杜仲叶中总黄酮的成分进行了检测分析,结果表明,杜仲叶提取物中的主要成分为绿原酸、芦丁、金丝桃苷、紫

云英苷和槲皮素。2008 年罗丽平, 高荫瑜, 等, 采用液质联用技术对 18 种薯蓣原料中黄酮成份进行了分析, 从获得的质谱分子量信息初步判定薯蓣黄酮中主要存在染料木素、槲皮素、木犀草素、芹菜素、刺芒柄花素、山奈酚, 六种黄酮甙元。

#### 4.3.2 小结

本章采用超高效液相色谱与质谱联用技术对纯化后的槟榔多酚进行结构鉴定, 以表儿茶素、没食子酸、绿原酸、芦丁为标准品, 分别获得了四种标准品的特征离子对、质荷比及相对分子质量, 通过对样品的分析结果的到槟榔多酚中分别含有表儿茶素, 没食子酸、芦丁和绿原酸, 2010 年王明月, 罗金辉<sup>[37]</sup>, 采用液质联用技术对槟榔中的儿茶素组分进行了分析, 结果表明槟榔中的儿茶素组分为儿茶素和表儿茶素没食子酸酯, 与本章结果相似, 另外, 本章内容采用了四种标准品做对照, 检测出的槟榔中的多酚成分比王明月等人多, 但槟榔多酚是一种复杂的化合物, 其中尚可能含有其他类多酚物质, 因此, 有待进一步研究



## 5. 论文主要结论、创新点及展望

### 5.1 结论

本论文以海南产新鲜槟榔为原料,研究了有机溶剂萃取法对槟榔多酚的提取效果,并采用响应曲面法对提取工艺条件进行优化,在此基础上采用大孔树脂柱层析法对提取后的槟榔多酚进行了纯化,并对纯化工艺进行了优化,最后采用 HPLC-MS 对纯化后的槟榔多酚进行了结构鉴定,得到的主要结论如下:

(1) 槟榔多酚的提取:采用有机溶剂萃取法对槟榔多酚进行提取,结果得到甲醇为最佳提取剂,采用响应曲面法对提取工艺进行优化,通过模型优化得到,槟榔多酚最佳提取工艺条件为提取温度 62 °C,提取时间 53 min、料液比 1:16、甲醇浓度 86.2%,在此条件下槟榔多酚的提取率为 17.82 mg/g。

(2) 槟榔多酚的纯化:以响应曲面法优化的最佳工艺提取出的槟榔多酚为原料,采用大孔树脂吸附法对槟榔多酚进行纯化,通过树脂筛选实验得到 AB-8 型大孔树脂利于纯化槟榔多酚,采用响应曲面法对大孔树脂的动态吸附与解析实验进行优化,结果得到最佳吸附条件为上柱液浓度 2.23 mg/mL,上柱液体积 6.6 BV,上柱液 pH=2.2,此条件下,吸附率 93.81%;最佳解析条件为解析液浓度 77.4%,解析液体积 6.5BV,解析液 pH=3.8,解析率为 92.74%

(3) 槟榔多酚的结构鉴定:采用 HPLC-MS 对大孔树脂纯化后的槟榔多酚进行结构鉴定,结果表明槟榔多酚中含有芦丁,绿原酸、没食子酸和表儿茶素。

### 5.2 创新点

本论文的创新点如下:

- (1) 系统的对槟榔多酚进行了研究
- (2) 采用四种标准品对槟榔多酚进行了结构鉴定较前人有所进步。

### 5.3 展望

本论文为基础性研究,旨在促进槟榔向减害增益方向发展,提高槟榔产品附加值,促进新型槟榔产品开发,扩大槟榔应用范围。本论文对槟榔的提取、纯化及结构鉴定进行了研究,属于理论研究,但仍无法满足实际需求,在接下来的研究工作中应进行应用研究,对槟榔多酚的功能性及应用技术进行研究与开发,以达到指导生产之目的。

## 参考文献

- [1]赵扬帆,郑宝东.植物多酚类物质及其功能学研究进展[J].福建轻纺,2006,(11): 107-111.
- [2]付美云,周立祥.植物多酚在环境保护与农业生产中的应用[J],应用生态学报, 2004, (9)1673-1677.
- [3]冯丽,宋曙辉,赵霖.植物多酚种类及其生理功能的研究进展[J].江西农业学报, 2007,19 (10): 105-107.
- [4] Haslam E. Plant Polyphenols Vegetable Tannins Revisited [M].1989, cambridge: Cambridge University press. 170-185.
- [5]张力平 孙长霞 李俊清.植物多酚的研究现状及发展前景[J].林业科学, 2005,41 (6): 157-163.
- [6] Okuda T, Kimura Y, Yoshida T et al. , Chem. Pharm. Bull , 1983 , 31:1625.
- [7]石碧,狄莹.植物多酚.北京: 科学出版社,2000, 7: 102
- [8]孙达旺.1988.植物单宁化学.北京: 中国林业出版社,6 1-100
- [9] Reed J. Cranberry flavonoids, atherosclerosis and cardiovascular healthp[J], Crit Rev Food Sci Nutr, 2002, 42(3):301-316.
- [10] Augustin Scalbert, Gary Williamson. Dietary intake and bioavailability of polyphenols.[M].American Society for Nutritional Science, 2000: 2 073-2 083
- [11]蔡为荣,周慧超.荷叶多酚提取优化及其清除 DPPH · 自由基的研究[J].食品工业科技, 2009,30 (12): 186-188.
- [12]韩明. 青梅果多酚提取及其与抗氧化相关性研究[J].食品研究与开发 2007,28 (6): 31-35.
- [13]王雅,马重华,等.杏子果肉多酚超声波辅助提取工艺优化及抗氧化活性研究 [J]食品与发酵工业, 2011, 37 (12) : 193-198.
- [14]江丽芳.雪花梨梨皮多酚含量测定[J].化学工程与装备, 2011 (12): 168-172
- [15]孙延芳,陈强,等.响应面法优化微波辅助提取火龙果多酚[J]广东农业科学, 2011 (22): 83-86
- [16]李光,余霜,等.响应曲面法优化红薯叶多酚提取工艺研究[J] 广东农业科学, 2011 (22): 80-82
- [17] John Shi, Haseeb Nawaz, Joseph Pohorly *et al.* Extraction of Polyphenols from plant materials for Functional Foods-Engineering and Technology[J]. Food Review International, 2005, (21):139-166.
- [18]田成.桂花果实多酚的超声波提取及抗氧化活性研究[J]食品科学 2011, 32

- (24): 106-170
- [19]李华, 沈洁. 超声波法从葡萄籽中提取多酚的研究[J]. 酿酒科技, 2005 (5): 89-92
- [20]裴海闫, 曹学丽, 徐春明. 响应面法优化纤维素酶提取苹果渣多酚类物质. 北京农学院学报, 2009, 24 (3): 50-58.
- [21]王丽丽. 紫丁香叶多酚物质的提取及抗氧化性能研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2007
- [22] Augustin Scalbert, Gary Williamson. Dietary intake and bioavailability of polyphenols.[M]. American Society for Nutritional Science, 2000: 2 073-2 083
- [23]王如, 王承明. 大孔树脂纯化黄连木粕多酚[J]. 食品科技, 2009, 34 (11): 236-240.
- [24]侯晓丹, 袁其朋, 田海源. 大孔吸附树脂法分离石榴籽中总多酚及其抗氧化活性研究[J]. 食品科技, 2010, 35 (1): 194-199.
- [25]朱静, 陆晶晶, 袁其朋. 大孔吸附树脂对石榴皮多酚的分离纯化. [J]. 食品科技, 2010, 35 (1): 188-194.
- [26]郑锦星. 槟榔提取物功能评价的研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2007.
- [27]黄永华. 槟榔有效化学成分分析测定[J]. 食品与机械, 2002, 7 (3): 38-39.
- [28]曾琪. 槟榔化学成分的研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2007.
- [29] Maiese K, Halloway H H, Larson DM, et al. Effect of acute and chronic arecoline treatment on cerebral metabolism and blood flow in the conscious rat [J]. Brain Res, 1994, 641 (1): 65-75.
- [30] Goger J S, John S A, Caleb O, et al. Effects of chewing betel nut (Areca catechu) on the symptoms of people with schizophrenia in Palau, Micronesia [J]. B J Psych, 2000, 170 (2): 174-178.
- [31] Lee K K, Choi J D. The effects of Areca catechu L. extract on anti-inflammation and anti-melanogenesis[J]. International Journal of Cosmetic Science, 1999, 21 (4): 275-284.
- [32] Wang C K, Lee W H. Separation, Characteristics and biological activities of phenolics in Areca fruit[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996, 44 (8): 2 014-2 019.
- [33] Chia-Chi Wang. Highly oligomeric procyanidins from areca nut induce lymphocyte apoptosis via the depletion of intracellular thiols[J]. Toxicology in Vitro 2009 (23): 1234-1241.
- [34] Pei-Ling Huang, Chin-Wen Chi, Tsung-Yun Liu. Effects of Areca catechu L.

- p>containing procyanidins on cyclooxygenase-2 expression in vitro and in vivo
- 
- [J].Food and Chemical Toxicology, 2010 (48) : 306-313.
- [35] Chin-Kun Wang. Contents of Phenolics and Alkaloids in Areca catechu Linn. During Maturation [J]. Agric. Food Chem. 1997(45):1185-1188
- [36]张兴,梅文莉,曾艳波,等. 槟榔果实的酚类化学成分与抗菌活性的初步研究[J]. 热带亚热带植物学报,2009,17(1): 74-76.
- [37]王明月,罗金辉,赵振东.槟榔嫩果中儿茶素的液相色谱-质谱联用测定[J].食品科学,2010,31(6): 196-199.
- [38] Shivasankar S,Mathew A G,Natarajan C P.Post-harvest technology of.Areca nut [J]. Arecanut&Spices Bull,1976,7:59-63.
- [39]张春江,吕飞杰,台建祥,等.槟榔果及其制品中总酚和单宁含量的测定[J].食品研究与开发,2008,29(6):119-122.
- [40] Uchino K, Toukairin T Kawaguchi K, et.al.The growth inhibition of Streptococcus mutans by 5'-nucleotidase inhibitors from Arecacatechu L.[J].Journal of Chemist- ry Pharm Bull(Tokyo), 1991, 39(5): 1 323-1 324
- [41]张春江, 吕飞杰, 陶海腾。 槟榔活性成分及其功能作用的研究进展[J] 中国食物与营养 2008 (6): 50~53.
- [42] Penpun Wetwitayaklung. The study of antioxidant capacity in various parts of *Areca catechu* L.[J].Naresuan University Jurnal 2006,14(1):1-14.
- [43] A-scutt,S. Meghji,J.P. Stabilisation of collagen by betel nut polyphenols as a mechanism in oral submucous fibrosis. [J] Experientia,1987(43):391-393
- [44] Punna-wich Yenjita, Montree Issarakraisila, Warin Intanaa *et al.* Fungicidal activity of compounds extracted from the pericarp of Areca catechu against Colletotrichum gloeosporioides in vitro and in mango fruit[J]Postharvest Biology and Technology 2010(55): 129-132.
- [45] Lee K K,Cho J J,Park E J,et al.Anti-elastase and anti-hyaluronidase of phenolic substance from Areca catechu as a new anti-agingagent[J].International Journal of Cosmetic Science,2001,23 (6): 341-346.
- [46] Lee K K,Choi J D.The effects of Areca catechu L.extract on anti-aging [J]. Interna- tional Journal of Cosmetic Science,1999,2 1 (4): 285-297.
- [47]韩林,张海德. 槟榔籽总酚提取工艺优化与抗氧化活性试验[J].农业机械学报 2010, 41(4): 134-139.
- [48]郑仕宏, 任费燕, 周文化, 等. 槟榔生物酚提取工艺条件的研究[J]食品科技 2010, 35 (10): 201~204.



- [49]周文化,李忠海,崔阳阳. 槟榔固体饮料的加工工艺研究[J].中南林业科技大学学报,2009,29(5):131-136.
- [50]普义鑫,周文化.响应面法优化槟榔多酚提取工艺条件研[J]中国农学通报2010, 26(12):334-338
- [51]陈健,孙爱东,高雪娟,等. 响应面分析法优化超声波提取槟榔原花青素工艺[J]食品科学, 2011,32 (4) :82-86
- [52]KALIL S J, MAUGERI F, RODRIGUES M I. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization [J].Process Biochemistry, 2000, 35 (6): 539-550.
- [53]董发明,白喜婷..响应面法优化超声提取杜仲雄花中黄酮类化合物的工艺参数[J].食品科学, 2008, 29 (8): 227-231.
- [54]汪仁官.试验设计与分析[M].北京:中国统计出版社,1998
- [55]韩林. 槟榔中抗氧化成分的提取及分离研究[D] 海南大学, 2010.
- [56] James A, Kennedy, Y o j i Hayasaka, Stephane Vidal *et al.* Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development [J]. Agric. Food Chem, 2001, 49: 5348-5355
- [57] Sophie Remy, Helene Fulcrand, Benoit Labarbe *et al.* First confirmation in red wine of products resulting from direct anthocyanin-tannin reactions [J]. Sci Food Agric, 2000, 80: 745-751.
- [58] Rong Tsao, Raymond Yang, J. Christopher Young *et al.* Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using hight-performance liquid chromatography (HPLC) [J]. Agric.Food Chem., 2003, 51: 6347-6353.
- [59] Erwan Le Roux, Thierry Doco, Pascale Sarni-Manchado *et al.* A-Type proanthocyanidins from pericarp of litchichinensis [J]. Phytochemistry, 1998, 48: 1251-1258.
- [60]邹节明,陆浩,何斌,等. 苦玄参、黄芩与黄柏的大孔树脂提取研究[J].中草药, 2003, 34: 222-226.
- [61]严奉伟,吴谋成. 大孔树脂初步纯化菜籽多酚[J].中国粮油学报,2005,20(2): 57-61.
- [62]侯晓丹,袁其朋. 大孔吸附树脂法分离石榴籽中总多酚及其抗氧化活性研究 [J].食品科技, 2010, 35 (1): 194-199.
- [63]吴道宏,欧阳玉祝.大孔树脂对盘龙参多酚的吸附工艺优化[J]应用化工 2011, 40 (12): 2080-2085

- [64]王如, 王承明. 大孔树脂纯化黄连木粕多酚[J].食品科技, 2009, 34 (11): 236-240.
- [65]朱静, 陆晶晶, 袁其朋. 大孔吸附树脂对石榴皮多酚的分离纯化[J]. 食品科技, 2010, 35 (1): 188-194.
- [66]高晓明, 吕磊, 王瑞, 等. 苹果多酚的乙醇提取和大孔树脂纯化工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2009, 30 (11): 21-26.
- [67]张泽生, 徐英. 大孔吸附树脂对苹果渣中苹果多酚吸附性能的研究[J].食品研究与开发, 2006, 27 (9): 24-27.
- [68] ChenRongyi, ZhangXinshen, ShenJinshan, *et al.* Study on comprehensive extraction of tea polyphenols, caffeine, theanine and teapolysaccharides [J]. ShipinKexue, 2005, 26(4):174-176
- [69] Ryoyasu Sauo. Isolation and chemical structure of catechins from flesh tea leaf [J]. Agric BiolChem, 1982(7):1969-1970
- [70]杨贤强, 王岳飞, 陈留记等. 茶多酚化学[M].上海:上海科学技术出版社, 2004
- [71]刘志昌, 夏炎, 张莹等.膜分离技术纯化白藜芦醇的研究[J].时珍国医国药, 2009, 20 (1) : 203-205.
- [72]王永刚, 李卫.膜技术分离纯化对花生壳多酚提取液品质的影响[J].食品研究与开发, 2010, 31 (9) : 72-75.
- [73]王如, 王承明. 大孔树脂纯化黄连木粕多酚[J].食品科技, 2009, 34 (11) : 236-240.
- [74]侯晓丹, 袁其朋, 田海源. 大孔吸附树脂法分离石榴籽中总多酚及其抗氧化活性研究[J].食品科技, 2010, 35 (1) : 194-199.
- [75]王英锋, 焦燕, 王慧彬, 等. 半枝莲中黄酮成分的提取纯化及 LC-MS 检测[J]. 首都师范大学学报(自然科学版). 2009(5): 32-34.
- [76]章斌, 娄子洋. 液质联用技术在中药代谢物及代谢组学研究中的应用分析[J]. 第二军医大学学报. 2011(6): 658-662.
- [77]孙煌, 付瑾莹, 姜连阁, 等. 液相色谱-质谱联用技术在检测中药制剂中添加化学药物的研究进展[J]. 药物分析杂志. 2010(8): 1567-1570.
- [78]张娟红, 王荣, 谢华, 等. 快速建立 LC-MS/MS 分析生物样品的方法[J]. 分析仪器. 2010(3): 25-29.
- [79]张莉, 张丽萍, 孙成春. 液-质联用技术在中药研究中的应用[J]. 解放军药理学学报. 2010(6): 558-561.
- [80]安蓉. 液相色谱技术及液质联用技术在食品及农产品残留检测中的应用[J]. 现代科学仪器. 2003(1): 20-23.

- [81] Schieber A, Ullrich W, Carle R. Characterization of polyphenols in mango puree concentrate by HPLC with diode array and mass spectrometric detection [J]. Innovative Food Science and Emerging technology, 2000,1:161-166
- [82] 王志远. 龙眼壳与龙眼核多酚的分离纯化、结构鉴定及抗氧化活性[D]. 厦门大学, 2008
- [83] 付桂明, 万茵, 杨硕, 等. 杜仲叶总黄酮超临界流体提取工艺优化及其成分的液质联用分析[J]食品科学, 2007, 28 (12): 128-131.

附 录

攻读学位期间的主要学术成果

1) 参加项目课题

| 序号 | 项目、课题名称(下<br>达编号)                                  | 项目、课题来<br>源、属何种项<br>目 | 起讫时间      | 经费<br>(万<br>元) | 本人承担<br>任务          | 进展情况<br>有无成果                                             |
|----|----------------------------------------------------|-----------------------|-----------|----------------|---------------------|----------------------------------------------------------|
| 1  | 槟榔深加工关键技术<br>研究及产业化开<br>发,<br>项目编号<br>2007BAD76B03 | 国家科技支<br>撑计划          | 2007-2010 | 43             | 实验研究,<br>产品研究<br>开发 | 发表论文 7<br>篇,其中<br>SCI 一篇,<br>第一作者<br>三篇,其中<br>一级学报<br>一篇 |

2) 发表论文

| 序号 | 论文作者                                                                      | 论文题目                                                              | 期刊名称                                          | 发表时间(卷次、<br>页码)            |
|----|---------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------------|
| 1  | ZHOU Wen-hua,<br>JIANG Ai-min<br>PUYi-xin, ZHANG<br>Hai-de REN<br>Honghao | Study on the<br>hypolipidemic<br>function of the Areca<br>Nut Oil | Journal of<br>Medicinal<br>Plants<br>Research | 2011, 5 (11):<br>2143-2148 |
| 2  | 普义鑫, 周文化<br>蒋爱民, 张海德, 任<br>洪浩                                             | 响应面法优化槟榔中多<br>酚提取工艺条件的研究                                          | 中国农学通报                                        | 2010,26(12):334-<br>338    |
| 3  | 普义鑫, 周文化, 李<br>岚, 周文娟, 李可                                                 | 用大孔树脂纯化槟榔多<br>酚的工艺条件优化                                            | 中南林业科技<br>大学学报                                | 2012, 32 (2):<br>100-105   |
| 4  | 普义鑫, 周文化, 任<br>费燕, 蒋爱民                                                    | 分子蒸馏精制槟榔油加<br>工技术研究                                               | 粮食与油脂                                         | 2010 (12): 14-17           |
| 5  | 周文化, 蒋爱民, 普义<br>鑫                                                         | 响应面法优化槟榔油超<br>临界 CO <sub>2</sub> 提取工艺条件<br>的研究                    | 食品与机械                                         | 2010.26 (6):<br>116-119    |
| 6  | 李岚, 邓学良, 李忠<br>海, 周文化, 普义鑫                                                | 不同加热方式对槟榔油<br>品质的影响                                               | 食品科技                                          | 2012.32 (2):<br>188-192    |
| 7  | 郑仕宏, 任费燕, 周<br>文化, 张海德, 普义<br>鑫, 李忠海                                      | 槟榔生物酚提取工艺条<br>件的研究                                                | 食品科技                                          | 2010, 35 (10):<br>201-205  |

3)所获奖项

| 项目名称              | 所获奖项               | 备注    |
|-------------------|--------------------|-------|
| 大蒜露酒加工及其功能特性研究与开发 | 所获奖项：株洲市科学技术进步奖三等奖 | 第六完成人 |

3) 发明专利情况

| 专利名称           | 专利号            | 专利排名 |
|----------------|----------------|------|
| 一种槟榔固体饮料及其制备方法 | 201010121365.1 | 第二   |

## 致 谢

本论文是在导师周文化教授的悉心指导下完成的,无论是论文的选题还是实验的计划、实施、实验仪器,材料、药品的准备,周老师都给予了巨大的帮助,倾注了极大的心血和汗水。三年来,周老师在学习及科研工作中不断鼓励我,对我严格要求,培养了我严谨的治学态度,缜密的思维方式。在论文撰写方面,周老师是我不可或缺良师益友,将我一个门外汉领入科技论文写作的大门,并教会了我很多写作技巧,是我在科技论文写作方面如鱼得水。生活中周老师也给予了我无微不至的关怀,令我终生难忘,在此论文完成之际,谨向尊敬的导师表示最诚挚的敬意和谢意!

本论文实验操作过程中得到了同门李岚、周文娟、师妹陈志瑜的热情帮助,同时华南农业大学食品学院蒋爱民教授及师兄师姐对本论文进行过程中的重点、难点进行有效的指导,衷心感谢蒋老师及其研究生团队对我的无私帮助!