

大孔树脂分离纯化槟榔花多酚研究

吴秋生^{1,2}, 宋菲², 黄玉林², 王挥², 赵松林², 陈卫军²

(1. 华中农业大学食品科技学院, 湖北 武汉 430070;

2. 中国热带农业科学院椰子研究所, 海南 文昌 571339)

摘要: 采用大孔吸附树脂对槟榔花多酚进行分离纯化, 确定其分离纯化条件。通过静态吸附试验和动态吸附解吸试验, 考察 AB-8、SP700、SP850、XAD-7HP、D101 和 HP2MG 等 6 种型号树脂对槟榔花多酚的吸附量和解吸率, 筛选出吸附效果最好的树脂, 并得出最佳的吸附条件。结果表明, AB-8 树脂的吸附和解吸效果最好, 可以用准二级动力学方程较好地描述 AB-8 树脂对槟榔花多酚的吸附。最佳的分离纯化条件为: 槟榔花多酚粗提液 pH 为 4, 上样初始浓度为 0.4 mg/mL, 洗脱剂乙醇浓度为 60%, 上样流速和洗脱流速均为 3 BV/h。AB-8 型大孔树脂在所确定的工艺条件下, 树脂的吸附-解吸性能稳定, 且能较好地分离纯化槟榔花多酚, 多酚纯度在纯化前为 2.7%、纯化后为 34.6%。

关键词: 槟榔花; 多酚; 大孔树脂; 分离纯化

中图分类号: S567.1⁺9; TQ914

文献标识码: A

文章编号: 1004-874X (2015) 23-0122-05

Separation and purification of polyphenols from areca inflorescence by macroporous resin

WU Qiu-sheng^{1,2}, SONG Fei², HUANG Yu-lin², WANG Hui², ZHAO Song-lin², CHEN Wei-jun²

(1. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Coconut Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Wenchang 571339, China)

Abstract: Macroporous resins were used to separate and purify polyphenols from the extract of areca inflorescence, and the conditions of separation and purification were determined. The adsorption capacity and desorption rate of six kinds of resins, SP850, XAD-7HP, SP700, D101 and HP2MG, were compared to select the most suitable one, through static adsorption experiment and dynamic adsorption and desorption experiment. The results showed that AB-8 resin was the best one and the kinetic data fitted the pseudo-second-order kinetics model better. Optimal conditions were as follows: the sample pH was 4.0, concentration of ethanol used as elution agent was 60%, initial sample concentration was 0.4 mg/mL, adsorption rate and desorption rate was 3 BV/h. AB-8 resin performed great in separating and purifying polyphenols from areca inflorescence, and the purification of polyphenols was 2.7% at first and increased to 34.6% after purification.

Key words: areca inflorescence; polyphenols; macroporous resin; separation and purification

槟榔 (*Areca catechu* L.) 为棕榈科槟榔属常绿乔木, 是典型的热带经济植物, 目前主要分布在海南。槟榔位居我国四大南药之首, 综合利用经济效益高。槟榔花是槟榔的雄花, 花期为每年 3~10 月, 开花多, 花期长, 产量高^[1], 且富含多酚、多糖、生物碱等多种生理活性物质以及对人体有益的微

量元素, 具有独特的食疗和保健功效, 素以“微型营养品”、“长寿食品”著称^[2]。酚类化合物广泛存在于植物中, 具有较好的抗突变、抗病毒、抗衰老等多种功能^[3-5]。许多研究表明, 酚类化合物对抗氧化、保护脱氧核糖降解等具有重要作用^[6-8]。对槟榔花提取物的研究表明, 其具有清除 DPPH 和 ·OH 自由基、还原 Fe³⁺ 的能力^[9], 以及抗衰老^[10]、抗疲劳等功效^[11]。提取分离槟榔花多酚的研究将为槟榔花多酚的进一步深入研究提供理论基础。大孔树脂是一种不溶于酸、碱及各种有机溶剂的有机高分子聚合物, 孔径与比表面积较大, 广泛用于天然产物的提取分离, 具有吸附容量大、选

收稿日期: 2015-08-10

基金项目: 海南省自然科学基金 (314146)

作者简介: 吴秋生 (1990-), 男, 在读硕士生,

E-mail: wuqiusheng88@163.com

通讯作者: 赵松林 (1965-), 男, 研究员, E-mail:

zhaosonglin@21cn.com

择性好、吸附速度快、解吸条件温和、再生处理方便、使用周期长、节省费用等优点^[12]。本试验采用大孔树脂分离纯化槟榔花多酚,确定大孔吸附树脂吸附槟榔花多酚的动力学吸附模型,并通过静态和动态试验得到合适的吸附和洗脱条件。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 主要试剂 槟榔花由中国热带农业科学院椰子研究所半岛基地提供。大孔树脂 AB-8、SP700、SP850、XAD-7HP、D101 和 HP2MG 购自郑州勤实科技有限公司,没食子酸(纯度 $\geq 98\%$)购自美国 Sigma 公司,Folin-酚试剂、无水碳酸钠等均为分析纯。

1.1.2 主要仪器 恒温振荡器(德国 Eppendorf 股份有限公司产品)、UVLine 9400 紫外可见分光光度计(德国 SCHOTY 仪器公司产品)、HH-6 型数显恒温水浴锅(上海康仪有限公司产品)、旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂产品)、超声波清洗机(宁波海曙五方超声设备有限公司产品)、电热鼓风干燥箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂产品)。

1.2 槟榔花总酚提取与指标测定

1.2.1 材料预处理 槟榔花采收后,于 55℃ 条件下烘干 48 h,粉碎后过筛(孔径 178 μm);所有大孔吸附树脂均用无水乙醇浸泡 24 h 后,用水冲洗至无醇味,用 3% HCl 处理 3~4 h,用水洗至中性;再用 3% NaOH 浸泡 3~4 h,用水洗至中性后浸泡在无水乙醇中或直接使用^[13]。

1.2.2 槟榔花总酚提取 采用 100℃ 沸水水浴提取槟榔花总酚,提取时间为 30 min,料液比为 1:10 (W/V)。过滤收集滤液,继续沸水提取滤渣;反复提取 2 次后,合并滤液,旋转蒸发浓缩后于 4℃ 冷藏备用^[14]。

1.2.3 总酚含量测定 采用 Folin-Ciocalteu 法测定总酚含量^[15],样品中总酚含量以没食子酸当量(Gallic Acid Equivalent, GAE)表示。

1.2.4 多酚纯度测定 取一定体积的多酚提取液,按照 1.2.3 中的方法测定多酚液浓度,再乘以体积,得到提取液中多酚的质量。将提取液中的水分蒸发完全,得到提取液总的干燥质量,由此计算出提取液中多酚的纯度。计算公式如下:

$$\text{多酚纯度}(\%) = A/B \times 100$$

式中, A 为多酚质量(mg), B 为提取液干燥后质

量(mg)。

1.3 树脂筛选

取 AB-8、SP700、SP850、XAD-7HP、D101 和 HP2MG 等 6 种型号的抽干树脂各 1 g (相当于 0.40 g 干树脂),分别装入加有 25 mL 0.8 mg/mL 多酚提取液(pH4.46)的锥形瓶中,水浴振荡(25℃、115 r/min)吸附 24 h,测上清液的吸附平衡的多酚质量浓度 C_e (mg/mL)。滤去上清液后树脂经蒸馏水冲洗两次,再放入 25 mL 70% 乙醇中,于相同条件下解吸,测定解吸液中的多酚质量浓度 C_d (mg/mL)。分别按以下公式计算吸附量、吸附率、解吸量和解吸率:

$$\text{吸附率 } A = (C_0 - C_e) / C_0$$

$$\text{吸附量 } Q_e = (C_0 - C_e) \times V_0 / M$$

$$\text{解吸率 } D = C_d \times V_d / (C_0 - C_e) \times V_0$$

$$\text{解吸量} = C_d \times V_d / M$$

式中, C_0 为提取物溶液中多酚质量浓度(mg/mL), V_0 为提取物溶液体积(mL), V_d 为解吸液体积(mL), M 为树脂质量(g)。比较每种型号树脂的吸附率和解吸率,选择出合适的树脂用于后续试验。

1.4 吸附动力学

取 1 g 上述筛选出的抽干树脂置于 25 mL 多酚提取液中,振荡吸附,每 30 min 取上清液 100 μL 计算多酚质量浓度,持续 5 h,依据以下准一级动力学方程^[16]、准二级动力学方程^[17]进行拟合:

$$\text{准一级动力学方程: } \ln(q_e - q_t) = \ln q_e - k_f t$$

$$\text{准二级动力学方程: } t/q_t = 1/k_s q_e^2 + t/q_e$$

式中, q_e 为平衡吸附量拟合值(mg/g), t 为时间(h), q_t 为 t 时刻吸附量(mg/g), k_f 为准一级吸附速率常数(min^{-1}), k_s 为准二级吸附速率常数 [$\text{g}/(\text{mg} \cdot \text{min})$]

1.5 静态试验

1.5.1 pH 值对吸附的影响 分别取 1 g 抽干树脂置于 25 mL 不同 pH 值的多酚提取液(pH4、6、8、10,初始浓度为 0.8 mg/mL)中,振荡吸附,每小时取上清液 100 μL 测定槟榔花多酚浓度,连续 8 h,得到最佳的吸附 pH 值,作为后续试验条件^[18]。

1.5.2 洗脱剂乙醇浓度对解吸的影响 将 1 g 抽干树脂放于 25 mL 多酚提取液中,振荡吸附 24 h 至平衡后取上清液测得其浓度为 C_e ,过滤出树脂,用超纯水充分冲洗除去未吸附的多酚液,抽滤干燥之后分别置于 25 mL 不同浓度(20%、40%、60%、80%、100%)乙醇中,振荡解吸 24 h,取上清液计

算其解吸平衡的多酚质量浓度,比较解吸量,得到最合适的乙醇浓度作为后续试验条件。

1.6 动态试验

1.6.1 上样流速对吸附的影响 取 15 mL 树脂 (相当于 2.90 g 干树脂),湿法装柱 (1.6 cm × 30 cm)。将 160 mL 浓度为 0.4 mg/mL 的提取物溶液以不同的上样流速 (1、2、3、4 BV/h) 过柱。收集流出液,测定其浓度。比较不同上样流速对吸附量的影响,得到最佳上样流速作为后续试验条件。

1.6.2 上样浓度对吸附的影响 将 160 mL 不同浓度 (0.15、0.40、0.60、0.80 mg/mL) 的提取物溶液上样过柱,收集流出液,测定其浓度。比较不同上样浓度对吸附量的影响,得到最佳上样浓度作为后续试验条件。

1.6.3 解吸流速对解吸的影响 按照前面所得的参数条件对槟榔花多酚进行吸附。吸附结束后,用 100 mL 蒸馏水洗脱,除去树脂上未吸附的残液。用 120 mL 浓度为 60% 的乙醇溶液以不同流速 (1、2、3、4 BV/h) 进行洗脱。按照一定的体积间隔收集流出液,测定其浓度。比较不同洗脱流速对解吸量的影响,得到最佳上样流速。

2 结果与分析

2.1 大孔树脂的选型

通过吸附和解析试验,得到不同大孔树脂的吸附和解吸情况,如图 1 所示。由图 1 可知,吸附率较高的是 AB-8 和 SP850 树脂、吸附率分别为 50.32% 和 49.30%,其次为 D101 和 XAD-7HP,而 SP700 和 HP2MG 树脂吸附率均不足 40%,故不作考虑。解吸率最高的为 D101 和 AB-8,分别为 81.68% 和 77.92%,但从最终的解吸量上来看,AB-8 的解吸量最高、为 22.02 mg/g。综合考虑树脂的吸附率与解吸率,选择 AB-8 树脂对槟榔花多酚

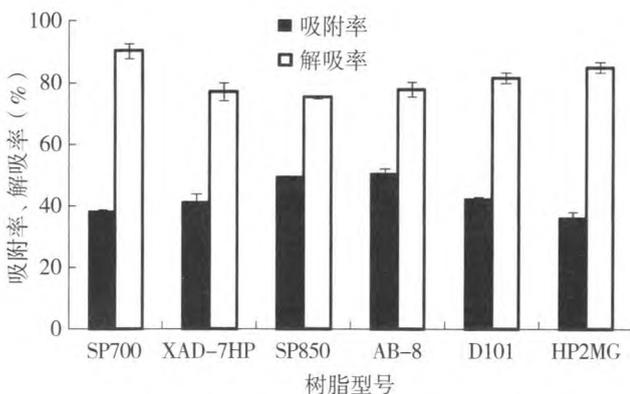


图 1 大孔树脂吸附和解吸比较

进行吸附。

2.2 吸附动力学

图 2 为 AB-8 树脂的吸附速率曲线。从图 2 可以看出,吸附 4 h 已基本达到平衡。

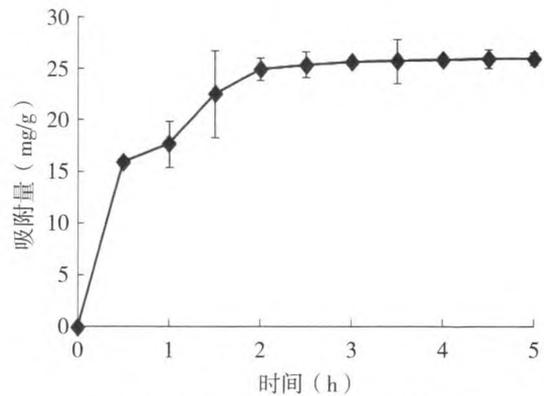


图 2 AB-8 树脂的吸附速率曲线

以 $-\ln(1-q_t/q_e)$ 对时间 t 作图可以得到准一级反应动力学方程模型, $r_1^2=0.9861$; 以 t/q_t 对时间 t 作图可以得到准二级反应动力学方程模型, $t/q_t=0.0350t+0.0144$, $r_2^2=0.9953$, $q_e=28.57$ mg/g, $k_s=0.0851$ g/(mg·min)。结果显示,准一级动力学方程和准二级动力学方程均可较好地描述大孔树脂对多酚的吸附动力学,而后者拟合度更高、达 0.9953。

2.3 静态试验

2.3.1 pH 值对吸附的影响 多酚提取液的 pH 值对吸附量的影响如图 3 所示。当 pH 为 4 时大孔树脂对槟榔花多酚的吸附效果最好,吸附量最大、为 26.16 mg/g。不同 pH 值通过影响多酚在溶液中的解离,使提取液中多酚的存在形式不同^[19],因此大孔树脂的吸附能力表现出明显差异。

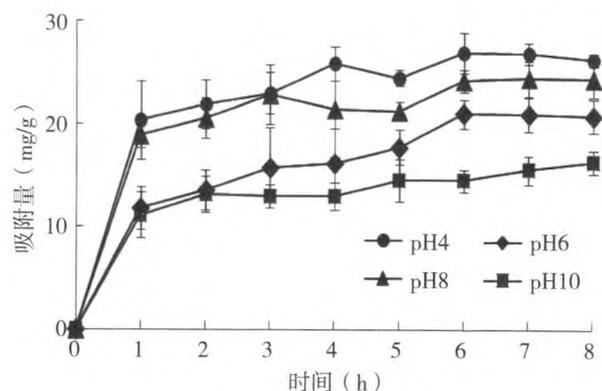


图 3 pH 值对吸附的影响

2.3.2 乙醇浓度对解吸的影响 乙醇浓度对解吸

的影响如图 4 所示。随着乙醇浓度的增加,解吸率先增大后减小。当乙醇浓度为 60% 时,解吸率达到最大值、为 74.23%。而乙醇浓度过高时,可能会使一些难以洗脱的杂质溶解在乙醇中并沉降到大孔树脂上,堵塞孔隙,阻碍多酚的溶解洗脱^[18]。因此,选择 60% 乙醇溶液作为洗脱剂。

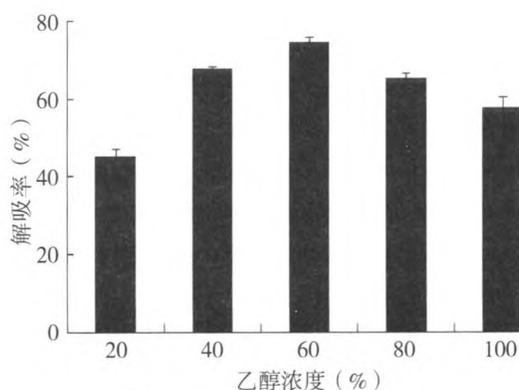


图 4 乙醇浓度对解吸的影响

2.4 动态试验

2.4.1 上样浓度对吸附的影响 不同浓度的多酚提取液吸附率如图 5 所示,浓度为 0.4 mg/mL 时,大孔树脂的吸附率最高、为 66.91%,其次是浓度 0.6 mg/mL 时吸附率为 64.13%。因此选择 0.4 mg/mL 作为上样浓度。

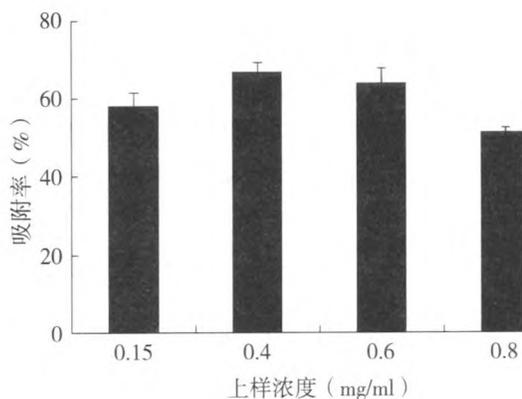


图 5 上样浓度对吸附的影响

2.4.2 上样流速对吸附的影响 不同上样流速对大孔树脂吸附效果的影响如图 6 所示。上样流速为 2、3 BV/h 时吸附量最大,且 3 BV/h 时吸附量略大于 2 BV/h,从生产效率角度考虑,选择 3 BV 作为上样流速最合适。

2.4.3 洗脱流速对解吸的影响 不同洗脱流速对大孔树脂动态解吸的影响如图 7 所示。随着洗脱体积的增加,所有洗脱流速下,流出液多酚浓度在

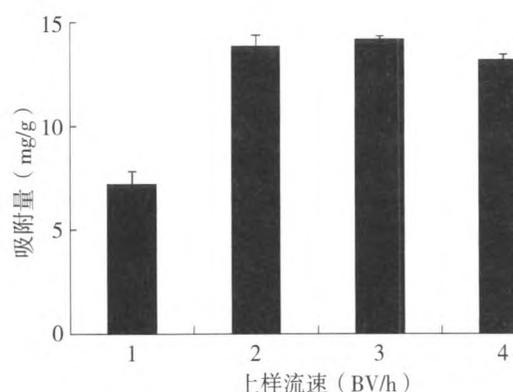


图 6 上样流速对动态吸附的影响

10 mL 处迅速增加达到最大值,之后又迅速下降。当洗脱体积为 50 mL 时,洗脱达到平衡。从解吸量上看,1、3 BV/h 洗脱流速的解吸量最大,分别为 8.51、7.78 mg/g。但是从生产效率上来看,3 BV/h 洗脱流速是 1 BV/h 的 3 倍,而解吸量是其 91.42%,所以选择 3 BV 作为洗脱流速。

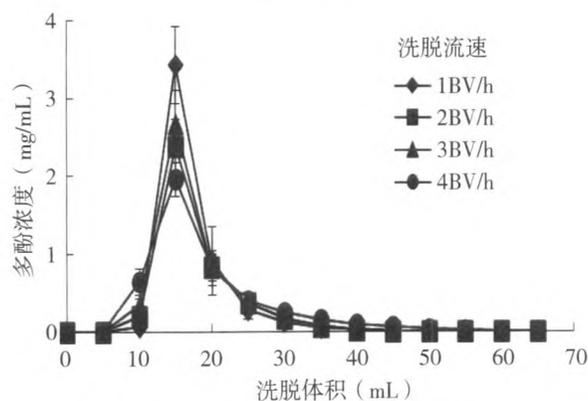


图 7 洗脱流速对解吸的影响

3 结语

本试验首次利用大孔树脂研究槟榔花多酚分离纯化的工艺条件。通过对 6 种型号的大孔树脂对槟榔花多酚粗提液吸附量和解吸量的比较,结果显示 AB-8 树脂对槟榔花多酚具有较好的吸附和解吸性能。对大孔树脂吸附动力学研究表明,AB-8 树脂对槟榔花多酚的吸附符合拟二级动力学模型,拟合度较高。槟榔花多酚提取最佳条件为槟榔花多酚粗提液浓度为 0.4 mg/mL、pH4,上样流速为 3 BV/h,乙醇浓度为 60%,洗脱流速为 3 BV/h。基于以上条件分离纯化多酚,使多酚纯度达到 34.6%,为纯化前的 12.81 倍。AB-8 大孔树脂法纯化槟榔花多酚虽然能使其纯度得到较大程度的提高,但仍不够理想,若想得到纯度更高的槟榔花多酚,还需结合其他分离纯化方法。

参考文献:

- [1] Lin E S, Li C C. Evaluation of superoxide radical scavenging capacity and reducing power of areca flower extracts [J]. *J Med Plants Res*, 2010 (4): 975-981.
- [2] 何和明. 槟榔、益智、绞股蓝的生理生态 [M]. 上海: 同济大学出版社, 1996: 240-257.
- [3] Chimi H, Cillard J, Cillard P, et al. Peroxyl and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants [J]. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 1991, 68 (5): 307-312.
- [4] Nardini M, D'Aquino M, Tomassi G, et al. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 1995, 19 (5): 541-552.
- [5] Milić B L, Djilas S M, Čanadanović-Brunet J M. Antioxidative activity of phenolic compounds on the metal-ion breakdown of lipid peroxidation system [J]. *Food Chemistry*, 1998, 61 (4): 443-447.
- [6] 王华, 姚亚平, 王毕妮, 等. 高粱籽粒提取物抗氧化活性的研究 [J]. *食品与发酵工业*, 2008, 33 (10): 123-127.
- [7] 刘杰超, 王思新, 焦中高, 等. 苹果多酚提取物抗氧化活性的体外试验 [J]. *果树学报*, 2005, 22 (2): 106-110.
- [8] 吴素芳, 曹炜, 姚亚萍, 等. 油菜蜂花粉提取物对羟基自由基介导 2-脱氧核糖损伤的抑制作用 [J]. *食品科学*, 2006, 27 (10): 544-548.
- [9] 张春梅, 沈雁, 葛畅, 等. 槟榔花提取物对羟基自由基诱导脱氧核糖降解的保护作用 [J]. *热带作物学报*, 2010 (6): 949-953.
- [10] 张春梅. 槟榔花提取物抗衰老作用研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2011.
- [11] 张明, 宋菲, 黄玉林, 等. 槟榔花提取物活性成分研究进展 [J]. *热带农业科学*, 2014, 34 (6): 89-93.
- [12] 谭胜兵. 大孔树脂在天然产物提取分离中的应用 [J]. *菏泽学院学报*, 2007, 29 (2): 81-83.
- [13] Buran T J, Sandhu A K, Li Z, et al. Adsorption/desorption characteristics and separation of anthocyanins and polyphenols from blueberries using macroporous adsorbent resins [J]. *Journal of Food Engineering*, 2014, 128: 167-73.
- [14] Chen W, Zhang C, Huang Y, et al. DNA damage protection and 5-lipoxygenase inhibiting activity of areca (*Areca catechu* L.) inflorescence extracts [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2013, 10 (55): 11696-702.
- [15] 黄玉林, 陈洋平, 陈卫军, 等. 响应面法优化提取槟榔花总酚的研究 [J]. *热带作物学报*, 2011, 32 (6): 1158-1164.
- [16] Bhattacharya A K, Venkobachar C. Removal of cadmium (II) by low cost adsorbents [J]. *Journal of Environmental Engineering*, 1984, 110 (1): 110-122.
- [17] Ho Y S, McKay G. Pseudo-second order model for sorption processes [J]. *Process Biochemistry*, 1999, 34 (5): 451-465.
- [18] Wu S, Wang Y, Gong G, et al. Adsorption and desorption properties of macroporous resins for flavonoids from the extract of Chinese wolfberry (*Lycium barbarum* L.) [J]. *Food and Bioprocess Processing*, 2015, 93: 148-155.
- [19] 吴兰兰. 龙眼核多酚的分离纯化及其结构和抗氧化活性研究 [D]. 厦门: 集美大学, 2010.

(责任编辑 崔建勋)