

荔枝多酚柱层析纯化工艺条件研究

熊何健, 郭倩倩, 乔小瑞

(集美大学 生物工程学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 通过吸附、解析试验, 筛选适合纯化荔枝多酚的大孔吸附树脂, 确立柱层析纯化工艺。结果表明, 大孔吸附树脂 XDA - 7 对荔枝果皮多酚具有良好的吸附和解析性能, 柱层析纯化条件为: 上样液质量浓度为 3.5 mg/mL, 样液 pH ≤ 4.5, 上样速率为 2~4 BV/h, 洗脱液质量浓度 6 mg/mL, 洗脱速率 6 BV/h。在此条件下, 荔枝多酚纯化样品的多酚含量为 70.6%。

关键词: 荔枝; 多酚; 柱层析; 纯化

中图分类号: TS201.1 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2010)06-1274-05

Purification Technobgy for Polyphenols from Litchi Pericarp by Colum n Chrom atography

XIONG He-jian, GUO Qian-qian, QIAO Xiao-rui

(Biengineering College, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract Adsorption and desorption experiments were carried out to screen the suitable macroporous adsorbent resin for polyphenols from lichee Pericarp. The results indicate that macroporous resin XDA - 7 possesses strong absorbend ability and desorbing property. The optimum absorption conditions for macroporous resin XDA - 7 are concentration of feed 3.5 mg/mL, pH value ≤ 4.5, feeding rate 2~4 BV/h. And the optimum desorption conditions are elute- ethanol concentration 6 mg/mL, elution rate 6 BV/h. Purified under this condition, the obtained polyphenol product is of the purity of 70.6%.

Key words Litchi; polyphenols; column chromatography; purification

荔枝 (*Litchi chinensis* Sonn.), 为亚热带无患子科 (Sapindaceae) 荔枝属植物荔枝的果实。我国是荔枝生产大国, 年产荔枝 180~200 万 t, 加工量约占总产量的 15%~20%, 产品主要为荔枝干、荔枝罐头, 以及少量的荔枝酒, 荔枝果皮通常作为生产废弃物被遗弃。研究表明, 荔枝果皮中富含植物多酚类化合物, 含量占荔枝果皮干重 5%~10%, 主要为花青素、酚酸、表儿茶素和原花青素类物质^[1-2], 具有良好的自由基清除活性^[3-4], 表现出很好的开发应用前景。

目前, 荔枝果皮中多酚类物质的研究, 多集中于单一组分的分离、鉴定^[5-6]和生理活性分析^[7-8]等方面, 而将其作为一类新的植物多酚资源进行开发的生产工艺研究却明显不足^[9]。本文在前期研究的基础上, 对荔枝果皮多酚粗提物的大孔吸附树脂柱层析纯化工艺进行研究, 通过静态-动态吸附、解析实验, 分析上样液浓度、pH 值、上样速率及洗脱剂浓度等因素对纯化效果的影响, 建立合理的柱层析纯化工艺, 对拓展荔枝产后深加工技术研究和促进荔枝资源综合利用有积极意义。

收稿日期: 2010-06-01 修回日期: 2010-09-14

基金项目: 福建省科技计划重点项目 (2009N0045)、厦门市科技项目 (3502Z20063011) 和集美大学创新团队基金项目 (2006A002)

作者简介: 熊何健 (1968-), 男, 副研究员, 主要从事食品化学与营养研究, E-mail: hxiong@jnu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 试验材料

荔枝果皮: 产自漳州龙海地区的“乌叶”荔枝。荔枝采回后及时剥离, 果皮清洗, 冻干, 放置冰箱中 - 18 ℃ 保存备用。福林 - 酚试剂、没食子酸: Sigma 公司; 大孔吸附树脂、AB-8 NKA、NKA-9 NKA-II、D101X-5 南开大学化工厂; XDA-7 XDA-6 LSA-1Q LX-28, 西安蓝晓科技有限公司; HPD-75Q HPD-45Q HPD-722 HPD-60Q 沧州宝恩化工有限公司。其它试剂均为分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 荔枝多酚粗提液的制备 荔枝果皮 → 粉碎过 40 目筛 → 15 倍体积、体积分数为 70% 乙醇溶液超声波浸提 60 min → 浸提液 45 ℃ 以下真空浓缩 → 浓缩液在 4 000 r/min 下离心 10 min → 上清液: 荔枝多酚粗提液, 备用。

1.2.2 树脂的预处理 大孔吸附树脂经体积分数为 95% 乙醇浸泡 24 h 充分溶胀后用去离子水冲洗直至无白色浑浊流出。用 40 g/L 的 NaOH 溶液浸泡 12 h 去离子水冲洗至中性, 再用 40 g/L 的 HCl 溶液浸泡 12 h 去离子水洗至中性, 备用。

1.2.3 静态吸附试验 取湿树脂 5 mL 于 250 mL 锥形瓶中, 加入一定量的荔枝多酚粗提液, 避光密封, 置于振荡器中, 100 r/min 室温振荡, 吸附一定时间后, 从上清液中取样, 测定多酚含量。根据公式计算树脂吸附量 Q (mg/mL 湿树脂):

$$Q = \frac{(C_0 - C)V}{G} \quad (1)$$

(1) 式中: C_0 : 初始浓度 (mg/mL); C : 吸附后浓度 (g/L); G : 树脂取量 (mL); V : 溶液体积 (mL)。

树脂吸附容量以树脂吸附 24 h 时的饱和吸附量计。

1.2.4 静态解吸试验 将 5 mL 充分吸附的树脂过滤, 用水冲洗后滤干, 置于锥形瓶中, 加入一定质量分数为 60% 的乙醇溶液, 密封置于振荡器中, 100 r/min 室温振荡, 解吸 24 h 后, 从上清液中取样, 检测多酚含量。根据以下公式计算解吸率:

$$\text{解吸率}(\%) = C \times V \times 100 / W \quad (2)$$

(2) 式中: C : 洗脱液多酚质量浓度 (g/L); V : 洗脱液总体积 (mL); W : 吸附总量 (mg)。

1.2.5 树脂吸附泄漏曲线的测定 采用湿法装柱法将处理好的 10 mL 大孔吸附树脂装入 $\Phi = 10$ mm 的层析柱中。荔枝多酚粗溶液分别以 2 4 6 BV/h 的流速上样, 以 1 BV 为单位收集洗脱液, 测定收集液中多酚浓度, 绘制泄漏曲线。

1.2.6 树脂吸附洗脱曲线的测定 采用湿法装柱法将处理好的 10 mL XDA-7 大孔吸附树脂装入 $\Phi = 10$ mm 的层析柱中, 按上述试验确定的吸附条件进行上样吸附, 待吸附饱和后用体积分数为 60% 的乙醇溶液分别以 2 4 6 BV/h 的流速对其进行洗脱, 并以 1 BV 为单位收集流出液, 测定收集液中多酚浓度, 绘制洗脱曲线。

1.2.7 多酚含量的测定^[10] 福林 - 酚试剂法, 样品中多酚含量以没食子酸计。以没食子酸质量浓度为横坐标, 吸光度值为纵坐标, 绘制标准曲线, 所得回归方程为: $Y = 0.0091X + 0.0076$ $R^2 = 0.9989$

2 结果与分析

2.1 树脂种类的选择

大孔吸附树脂的性能主要取决于树脂极性、空间结构和被吸附分子的极性、大小等性质, 吸附容量和解析率是大孔吸附树脂种类选择的主要依据。选用不同极性、比表面积、粒径、孔径的大孔吸附树脂 14 种, 对荔枝多酚进行静态吸附、解析试验, 计算各树脂的吸附容量和解析率, 比较不同吸附树脂对荔枝皮多酚的吸附、解析性能。由表 1 可知, 弱极性和中等极性的树脂较非极性、极性树脂表现出更好的吸附能力, 这是因为荔枝果皮中的多酚类物质主要为原花青素、表儿茶素、酚酸、花青素等, 它们具有由弱到中等不同程度的极性。各树脂中, XDA-6 XDA-7 HPD-722 和 HPD-750 这 4 种树脂的吸附容量均达到 50 mg/mL 以上, 但 XDA-7 的解析率最高, 达到 95.2%, 其余 3 种均低于 80%, 因此, 选用 XDA-7 型树脂对荔枝多酚粗提物进行纯化。

表 1 各树脂的物理性质、吸附容量和解析率

Tab 1 Physical properties ability of adsorption and ratio of desorption of different resins

树脂型号 Type of resin	比表面积 / (m ² · g ⁻¹) Specific surface area	粒径 / mm Grain diameter	平均孔径 / nm Average aperture	极性 Polarity	吸附容量 / (mg · mL ⁻¹) Adsorption capacity	解析率 % Desorption ratio
D 101	550~ 650	0.3~ 1.25	8~ 9	非极性	42.9	90.2
NKA	570~ 590	0.3~ 1.0	20~ 22	非极性	40.7	82.2
X- 5	500~ 600	0.3~ 1.25	29~ 30	非极性	41.3	62.7
AB- 8	480~ 520	0.3~ 1.2	13~ 14	弱极性	39.0	69.8
HPD- 722	485~ 530	0.3~ 1.25	13~ 14	弱极性	53.6	78.2
XDA- 7	≥800	0.3~ 1.25	16	弱极性	54.7	95.2
HPD- 450	500~ 550	0.3~ 1.2	9~ 11	中极性	35.8	71.4
LX- 28	≥500	0.3~ 1.25		中极性	40.8	80.9
LSA- 10	≥550	0.3~ 1.25	24	中极性	42.1	79.9
XDA- 6	≥630	0.3~ 1.25	30	中极性	50.0	50.5
HPD- 750	650~ 700	0.3~ 1.25	8.5~ 9.0	中极性	53.1	34.2
NKA- II	160~ 200	0.3~ 1.25	14.5~ 15.5	极性	28.0	68.1
NKA- 9	270	0.3~ 1.2	4.9	极性	33.2	70.1
HPD- 600	550~ 600	0.3~ 1.2	8	极性	37.1	67.4

2.2 吸附动力学曲线

树脂静态吸附试验中,于不同时间取样测定溶液中多酚含量,绘制 XDA-7 吸附动力学曲线。由图 1 可知,在吸附初期, XDA-7 对多酚的吸附效果随时间的增大而急剧增大,并在 6 h 时达到 50.6 mg/mL,为饱和吸附量的 92.59%, 10 h 后吸附趋向饱和,基本达到吸附平衡,吸附曲线与 Langmuir 吸附曲线相符,属于单分子层吸附类型^[11]。

2.3 XDA-7 树脂对荔枝多酚的静态吸附-解析研究

2.3.1 粗提液多酚浓度对树脂吸附效果的影响 分别配制不同浓度的多酚粗提液,进行 XDA-7 树脂

静态吸附试验(吸附时间 10 h 以下同),分析上样溶液浓度对树脂吸附效果的影响。由图 2 可知,在样液浓度较低时, XDA-7 对多酚的吸附能力随溶液浓度的增大而增大,当样液质量浓度为 3.5 mg/mL 时,其吸附量达到最大值,之后随浓度的进一步增加,吸附量略有下降。这是因为增大多酚浓度的同时,样液中与多酚竞争吸附的杂质也随其增加,占据更多可吸附多酚的有效位点,间接抑制了树脂的吸附作用。且上样浓度过高时,上样液会出现絮凝和沉淀,容易对树脂造成污染和堵塞,降低其吸附能力^[12]。因此,本试验中多酚质量浓度应控制在 3.5 mg/mL。

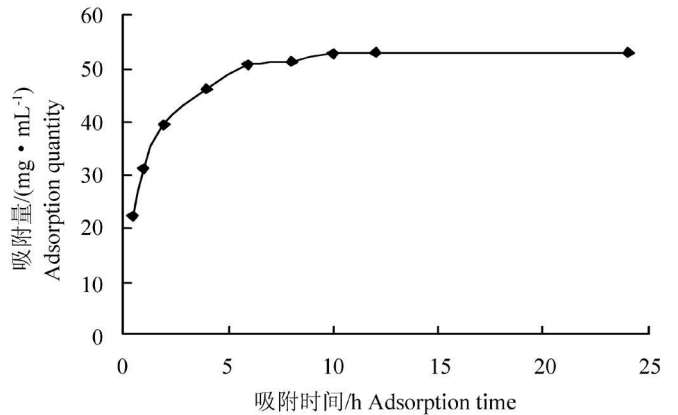


图 1 XDA-7 对荔枝多酚的静态吸附曲线

Fig 1 Static adsorption curves of XDA-7 for Litchi polyphenols

2.3.2 粗提液 pH 值对树脂吸附效果的影响 粗提液 pH 值分别调节为 2.5、3.5、4.5、5.5 和 6.5 进行

树脂静态吸附实验,分析上样溶液 pH 对树脂吸附效果的影响。由图 3 可知,荔枝多酚为多元酚结构,呈弱酸性,在酸性条件下能保持分子状态,有利于弱极性的 XDA-7 树脂的吸附, pH 值升高促进盐结构的形成,不利于吸附。在 pH 为 2.5~ 4.5 的酸性环境下,溶液 pH 值对 XDA-7 吸附量的影响不明显,之后随 pH 值的增加,吸附量开始下降,当 pH 值为 6.5 时,吸附量降为 44.297 mg/mL。因此,上样液 pH 应控制在 4.5 以下。经测定,多酚粗提液原液的 pH 值在 4.0 左右,因此可以不进行 pH 值调整,直接用多酚粗提液上柱。

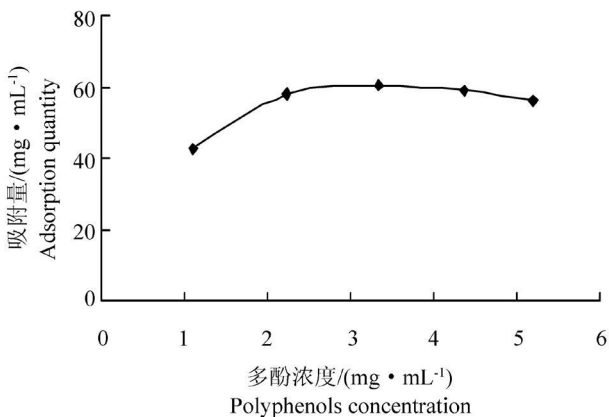


图 2 多酚浓度对 XDA - 7 吸附效果的影响

Fig 2 Effect of the polyphenols concentration on adsorption efficiency of XDA - 7

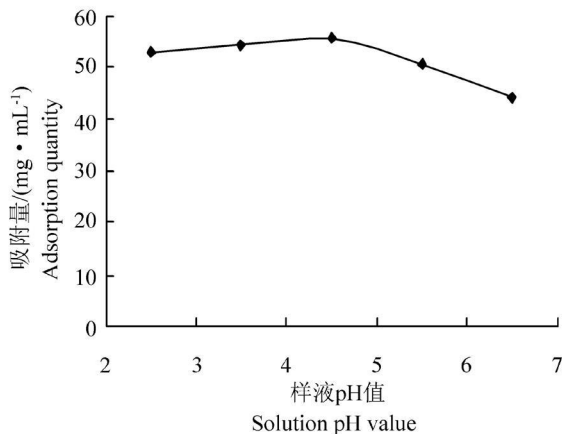


图 3 样液 pH 值对 XDA - 7 吸附效果的影响

Fig 3 Effect of solution pH on adsorption efficiency of XDA - 7

2.3.3 洗脱溶剂浓度对洗脱效果的影响 配置不同浓度的乙醇溶液, 分别对吸附饱和的 XDA - 7 大孔吸附树脂进行静态解吸实验, 考察洗脱剂浓度对解吸效果的影响。植物多酚一般应用在食品及医药领域, 因此选用乙醇作为解吸剂, 考察乙醇浓度对解吸率的影响。由图 4 可知, 乙醇体积分数在 35% ~ 60%, 解吸率随洗脱剂浓度增加快速升高; 乙醇体积分数为 60% 时, 解析率达到 90.7%; 继续增加乙醇浓度, 解析率上升缓慢, 逐渐趋于平缓。因此, 从工业生产成本考虑, 应选择体积分数为 60% 的乙醇作为洗脱剂。

2.4 XDA - 7 树脂对荔枝多酚的动态吸附 - 解析研究

2.4.1 上样速率对吸附效果影响 大孔树脂湿法装柱, 粗提液分别以 2, 4, 6 BV/h 的流速上样, 收集流出液, 检测流出液多酚浓度, 绘制泄漏曲线。上样速度慢, 有利于树脂对多酚的吸附, 流速过快, 料液中部分多酚物质会来不及扩散到树脂的内表面, 就被冲出柱子, 导致树脂的多酚吸附量降低, 但流速过低会影响到生产效率, 延长生产周期。由图 5 可知, 流速为 2~4 BV/h 时, 约在 18 BV 时才开始泄露。而流速为 6 BV/h 时, 吸附泄露严重。因此, 上样速率选择 2~4 BV/h。

2.4.2 动态洗脱曲线 分别以 2, 4, 6 BV/h 的流速对吸附饱和的 XDA - 7 树脂进行洗脱, 测定洗脱液中多酚含量, 绘制动态解析曲线。由图 6 可以看出, 荔枝多酚容易洗脱, 洗脱高峰相对集中, 洗脱速率为 6 BV/h 时, 收集 4 BV 的洗脱液, 可以洗脱 97.6% 的多酚。虽然 2 BV/h 和 4 BV/h 的洗脱速率也可以得到不错的效果, 但均不如 6 BV/h 洗脱峰集中, 因此确定洗脱速率为 6 BV/h。

按以上确定的柱层析纯化条件, 对荔枝多酚粗提液进行纯化, 洗脱液浓缩后冷冻干燥, 得纯化荔枝多酚样品, 多酚回收率为 83.2%, 纯化样品多酚含量为 (70.6 ± 0.6)% (n = 3)。

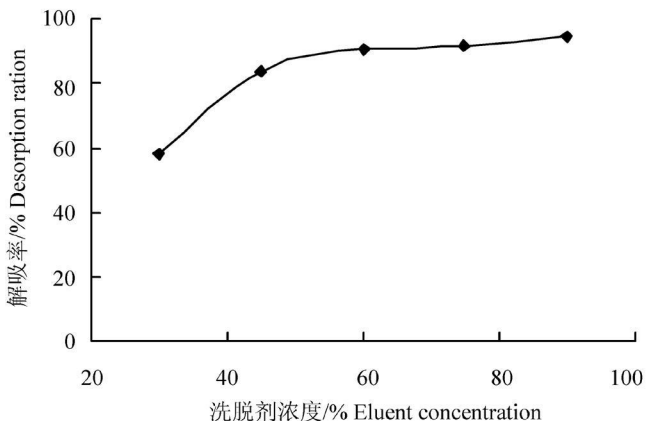


图 4 洗脱剂浓度对解吸效果的影响

Fig 4 Effect of eluent concentration on desorption rate

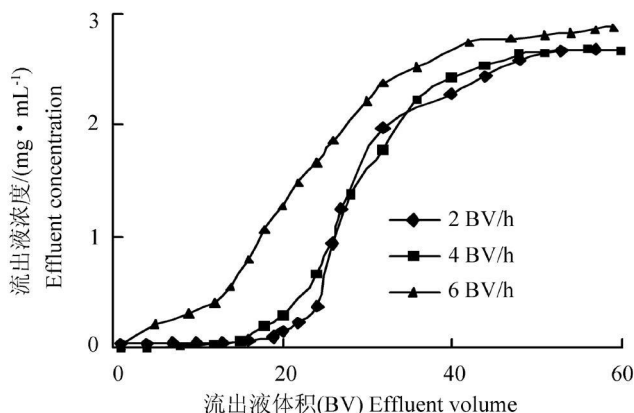


图 5 XDA - 7 大孔树脂吸附泄漏曲线

Fig 5 Breakthrough curves of XDA - 7 resin at different elution rates

3 结论与讨论

11种不同极性、孔径和比表面积大孔树脂的静态吸附-解吸试验结果表明, XDA-7型大孔吸附树脂对荔枝多酚粗提物溶液中的总多酚有较好的吸附和解吸效果。在室温下, 上样液浓度为 3.5 mg/mL, $\text{pH} \leq 4.5$ 上样速率 2~4 BV/h 时, XDA-7大孔树脂对荔枝多酚的吸附效果较好, 以体积分数为 60% 乙醇溶液作为洗脱剂, 洗脱速率 6 BV/h 时, 洗脱效果最好。

大孔吸附树脂是一种有机高分子聚合物, 内部具有三维空间立体孔网结构, 由于具有稳定性高、选择性好、吸附容量大、吸附速度快、解吸条件温和、再生容易、使用周期长、宜于构成闭路循环等诸多优点^[13], 近年来大孔吸附树脂柱层析分离技术在植物多酚的分离纯化方面得到了广泛应用^[14-16], 但对荔枝多酚的纯化研究未见报道。本试验表明, XDA-7大孔树脂是纯化荔枝多酚理想的吸附树脂, 具有吸附量大、解吸率高的优点, 荔枝多酚的动态吸附回收率达到 83%, 洗脱液浓缩、冻干, 纯化样品多酚含量达 70%。本文纯化工艺操作简便, 树脂以及洗脱剂可重复使用, 成本低, 对环境污染少, 适宜于工业化生产应用。

参考文献:

[1] Sami-Manchado Pascale, Roux Ewan Le, Guemeve Christine Le, et al. Phenolic composition of Litchi fruit pericarp[J]. J. Agric Food Chem, 2000, 48(12): 5995-6002

[2] Zhao Mouming, Yang Baowang, Jinshui, et al. Identification of the major flavonoids from pericarp tissues of lychee fruit in relation to their antioxidant activities[J]. Food Chemistry, 2006, 98(3): 539-544

[3] Li Jiangrong, Jiang Yuening. Litchi flavonoids: Isolation, identification and biological activity[J]. Molecules, 2007, 12(4): 745-758

[4] Duan Xuewu, Jiang Yuening, Su Xingq, et al. Antioxidant properties of anthocyanins extracted from Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit pericarp tissues in relation to their role in the pericarp browning[J]. Food Chemistry, 2007, 101(4): 1365-1371

[5] Zhang Zhaoqi, Xue Qunfang, Yang Chong, et al. Purification and structural analysis of anthocyanins from Litchi pericarp[J]. Food Chemistry, 2004, 84(4): 601-604

[6] Sun Jian, Jiang Yuening, Wei Xiaoyi, et al. Identification of procyanidin A2 as polyphenol oxidase substrate in pericarp tissues of Litchi fruit[J]. Journal of Food Biochemistry, 2007, 31(3): 300-313

[7] Liang Liu, Bijun Xie, Shaoqian Cao, et al. A-type procyanidins from *Litchi chinensis* pericarp with antioxidant activity[J]. Food Chemistry, 2007, 105(4): 1446-1451

[8] Wang Xujie, Wei Yuquan, Yuan Shulan, et al. Potential anticancer activity of litchi fruit pericarp extract against hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo[J]. Cancer Letters, 2006, 239(1): 144-150

[9] Ruenroengklin Neungnapa, Zhong Jia, Duan Xuewu, et al. Effects of various temperatures and pH values on the extraction yield of phenolics from Litchi fruit pericarp tissue and the antioxidant activity of the extracted anthocyanins[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2008, 9(7): 1333-1341

[10] 凌关庭. 抗氧化食品与健康[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 342-343

[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): 245-248

[12] 刘硕谦, 刘仲华, 黄建安, 等. 大孔吸附树脂分离富集水皂角多酚[J]. 食品科学, 2004, 25(3): 55-60

[13] 周林, 蔡妙颜, 郭祀远, 等. 大孔吸附树脂应用的研究进展[J]. 昆明理工大学学报: 理工版, 2003, 28(6): 99-102

[14] 黄阿根, 董瑞建, 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): 239-245

[15] 洪燕萍, 黄素华, 曹红云, 等. 香花枇杷和普通枇杷叶片抗氧化活性成分的比较[J]. 园艺学报, 2009, 36(6): 898-904

[16] 张立华, 张元湖, 安春艳, 等. 石榴皮提取物的大孔树脂纯化及其抗氧化性能[J]. 农业工程学报, 2009, 25(S1): 142-147

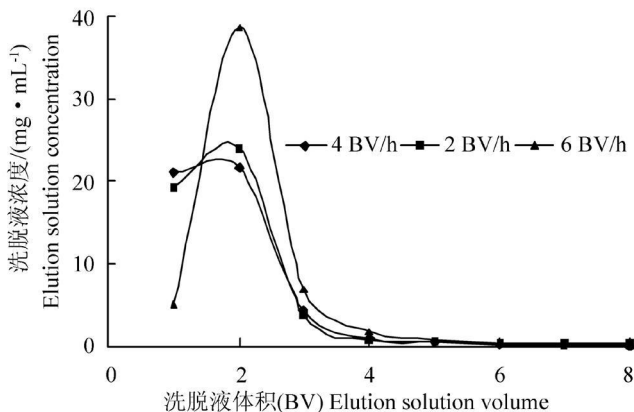


图 6 XDA-7 大孔树脂动态洗脱曲线

Fig 6 Dynamic elution curve of XDA-7 resin