

张立华,董业成,张元湖. 大孔吸附树脂纯化石榴花多酚的工艺[J]. 江苏农业科学,2015,43(10):359-362.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.10.116

大孔吸附树脂纯化石榴花多酚的工艺

张立华¹, 董业成², 张元湖³

(1. 枣庄学院生命科学院, 山东枣庄 277160; 2. 山东省枣庄市农业高新技术园区, 山东枣庄 277300;

3. 作物生物学国家重点实验室/山东农业大学, 山东泰安 271018)

摘要:通过静态吸附与解吸试验对 5 种大孔吸附树脂进行筛选,结果表明:X-5 型树脂对石榴花多酚表现出最好的吸附性能与解吸效果,适宜作为纯化石榴花多酚的树脂。通过单因素试验进一步优化 X-5 树脂对石榴花多酚的纯化条件,所得最佳上样条件为:上样液浓度 3.1 g/L, pH 值 2.0, 上样液流速 2 mL/min; 最佳洗脱条件:洗脱液为 70% 乙醇溶液,洗脱流速为 2 mL/min,洗脱体积为 80 mL。

关键词:大孔吸附树脂;静态吸附;解吸;纯化;洗脱;石榴花;多酚

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** B **文章编号:** 1002-1302(2015)10-0359-03

石榴 5—7 月开花,花期长,开花量大,不能结实的钟状花和部分筒状花会自然脱落,因此石榴花资源丰富,极具开发价值。石榴花中含有黄酮、多酚及三萜类等物质^[1-2],其中含量最丰富的是多酚,Kaur 等报道石榴花乙醇提取物中的多酚含量达 321.8 mg/g(以没食子酸为标准品)^[3]。近年来,有大量研究表明,石榴花多酚不仅具有显著的抗氧化活性^[4],还具有抑制低密度脂蛋白和胆固醇的氧化^[5],防止动脉粥样硬化,降血压,降血脂^[1],抑制乳腺癌、前列腺癌和口腔癌等癌细胞增生^[6-7],减轻对肝组织的氧化损伤^[3]等功能。因此,石榴花多酚在食品、化妆品和医药等领域有一定的应用前景。石榴花提取物中多酚总量与其多种生物活性呈明显的正相关性^[4],采用溶剂法提取的石榴花多酚还含有多种其他成分,因此需要对其进行纯化,才能提高其利用效率。目前,可用于植物多酚纯化的方法主要有溶剂萃取法^[8]、重金属沉淀法^[9]和树脂吸附法。萃取法须消耗大量三氯甲烷等有机溶剂,沉淀法须要消耗重金属,这 2 种方法容易导致产品中有机溶剂或重金属残留,而且产品收率较低。大孔树脂具有选择性强、吸附速度快、容量大、解吸容易、成本低等优点,近年来被用于分离纯化植物中的多酚^[10]、黄酮^[11]、花青素^[12]等天然产物。然而,目前在还未见有关大孔吸附树脂法纯化石榴花多酚的研究报道。本研究从 5 种国产大孔树脂中筛选出 1 种对石榴花多酚具有良好吸附和解吸性能的树脂,考察了该树脂对石榴花多酚的吸附与解吸性能及主要的影响因素,以期建立适宜的石榴花多酚纯化条件,为石榴花的深加工提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

石榴花采自山东省枣庄市石榴园,于鼓风干燥箱内

115 ℃ 杀青处理 5 min,然后在 80 ℃ 烘干至恒质量,粉碎后过孔径约 380~400 μm 筛,备用。经预处理过的 D101、AB-8、DA201、DM130 和 X-5 大孔吸附树脂由安徽三星树脂科技有限公司提供。

1.2 仪器与试剂

UV-2550 紫外可见分光光度计(日本岛津公司),旋转蒸发器 RE-52AA(上海亚荣生化仪器厂),玻璃层析柱(1.5 cm×20 cm),KQ-5200 超声波清洗器(江苏省昆山市超声仪器有限公司)。没食子酸标准品为 Sigma 公司产品,其他试剂均为国产分析纯。

1.3 分析方法

多酚含量的测定采用 Folin-Ciocalteu 试剂比色法,以没食子酸为标准品。

1.4 试验方法

1.4.1 石榴花多酚提取液的制备方法 石榴花干燥粉碎,超声波辅助提取(70%乙醇溶液,料液比 1 g:20 mL,超声波功率 80 W,温度 30 ℃,处理时间 40 min),过滤,弃去滤渣,回收滤液即为石榴花多酚提取液的母液,并用 Folin-Ciocalteu 法测定滤液中的多酚含量,不同含量的提取液由母液稀释配制。

1.4.2 树脂静态吸附与解吸试验 分别称取 5 种预处理过的大孔吸附树脂 D101、AB-8、DA201、DM130 和 X-5 各 2 g,置于 100 mL 的锥形瓶中,并加入 50 mL 多酚含量为 2.5 g/L 的石榴花粗提物样品液,在 25 ℃ 恒温环境中吸附 12 h,取其中一定量的样品液用于测定其中的多酚含量;静态吸附后过滤除去石榴花粗提物溶液,树脂用蒸馏水洗净,放入 100 mL 的锥形瓶中,加入 50 mL 无水乙醇,于相同温度下解吸,取一定量解吸液测其中的多酚含量,以比较不同树脂对石榴花多酚的吸附和解吸特性。吸附量、吸附率、解吸率、回收率的计算公式:吸附量(mg/g) = $(\rho_0 - \rho_e) \times V_0 / m$; 吸附率 = $(\rho_0 - \rho_e) / \rho_0 \times 100\%$; 解吸率 = $\rho_d / (\rho_0 - \rho_e) \times 100\%$; 回收率 = $\rho_d / \rho_0 \times 100\%$ 。其中: ρ_0 表示提取物溶液中多酚含量, g/L; ρ_e 表示上清液中多酚的含量, g/L; ρ_d 表示解吸液的多酚含量, g/L; V_0 表示提取物溶液体积, mL; V_d 表示解吸液体积,

收稿日期:2014-10-16

基金项目:山东省自然科学基金(编号:ZR2013BL018)。

作者简介:张立华(1969—),男,山东枣庄人,博士,教授,主要从事植物资源开发利用研究。E-mail: chinazhanglh@163.com。

mL; m 表示树脂质量, g。

1.4.3 树脂吸附条件的优化

1.4.3.1 上柱液 pH 值对吸附效果的影响 将预处理好的 X-5 树脂, 装入 1.5 cm × 20.0 cm 的层析柱中, 层析柱高度 (L)/层析柱内径 (D) = 13。用水洗涤平衡后上柱, 上柱条件: 流速 3 mL/min, 上样液中多酚含量 2.5 g/L, 上柱液体积 V = 160 mL, 上柱液 pH 值分别为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、8.0。检测漏出液多酚含量, 考察上柱液 pH 值对树脂吸附石榴花多酚含量的影响。

1.4.3.2 上柱液浓度对吸附效果的影响 吸附条件: 最佳 pH 值由“1.4.3.1”节确定, 石榴花提取液中多酚含量经稀释分别调整为 0.11、0.42、0.85、1.55、2.49、3.11、4.66、6.22 g/L, 各 50 mL, 置于 100 mL 锥形瓶中, 加入 5 g 预处理过的 X-5 大孔吸附树脂, 25 °C 水浴吸附 12 h, 检测上清液多酚含量, 计算 X-5 树脂对多酚的吸附量, 考察上样液浓度对吸附量的影响, 绘制静态吸附曲线。

1.4.3.3 X-5 树脂的吸附动力学 按照“1.4.3.2”节确定的最佳浓度配制石榴花粗提物溶液 50 mL, 置于 100 mL 锥形瓶中, 加入 5 g 预处理过的 X-5 大孔吸附树脂, 25 °C 水浴吸附, 分别在吸附后 1、2、3、4、5、6 h 取上清液样品 2 mL, 测定其多酚含量, 绘制吸附动力学曲线。

1.4.3.4 上样液流速对吸附效果的影响 将多酚含量为 3.1 mg/mL 的石榴花提取液 50 mL (pH 值由“1.4.3.1”节确定) 分别以 6、4、2、1 mL/min 的流速上柱, 然后用去离子水冲洗至澄清, 以 70% 乙醇作洗脱液, 流速 2 mL/min, 测定洗脱液中多酚含量, 计算树脂对多酚的吸附量, 然后以流速为横坐标、吸附量为纵坐标绘制曲线。

1.4.4 树脂洗脱条件的优化

1.4.4.1 乙醇浓度对洗脱效果的影响 取 100 mL 多酚含量为 3 mg/mL 的石榴花提取液, 加入 25 g X-5 树脂, 25 °C 下吸附 12 h, 湿法上柱, 用去离子水冲洗, 再分别用 100 mL 20%、40%、60%、70%、80% 的乙醇溶液洗脱, 流速 6 mL/min, 测定洗脱液中多酚含量, 考察乙醇浓度对洗脱效果的影响。

1.4.4.2 洗脱液体积对洗脱效果的影响 依照“1.4.3”节优化的吸附条件上柱吸附之后, 用 40 mL 水迅速冲洗树脂柱, 洗脱条件: 洗脱液由“1.4.4.1”节确定, 流速为 80 mL/h。洗脱液分步收集并测定其多酚含量, 绘制动态解吸曲线, 从而考察洗脱液体积影响洗脱效果的情况。

1.4.4.3 洗脱流速对洗脱效果的影响 按“1.4.3”节优化的吸附条件上柱吸附之后, 用 40 mL 水快速淋洗树脂柱, 洗脱条件: 洗脱液由“1.4.4.1”节确定, 洗脱液体积由“1.4.4.2”节确定, 洗脱流速分别为 6、4、2、1 mL/min。收集洗脱液并测定其含量, 考察洗脱流速对洗脱效果的影响。

2 结果与分析

2.1 树脂的筛选

通过静态吸附与解吸试验测定 5 种大孔树脂的吸附与解吸特性, 结果见表 1。其中, X-5 型大孔吸附树脂对石榴花多酚的吸附容量、吸附率、解吸率及回收率都是最高的。吸附量和解吸率是评价一种树脂性能优劣的主要参数, 前者反映树脂的吸附能力, 后者反映吸附之后能否容易洗脱下来。因

表 1 5 种大孔吸附树脂的物理性能及吸附解吸特性

| 树脂型号 | 比表面积 (m ² /g) | 平均孔径 (nm) | 吸附能力 (mg/g) | 吸附率 (%) | 解吸率 (%) | 回收率 (%) |
|-------|-----------------------------|--------------|----------------|------------|------------|------------|
| DI01 | 480 ~ 520 | 10 ~ 13 | 9.83 | 87.77 | 74.92 | 65.75 |
| X-5 | 500 ~ 600 | 18 | 13.76 | 90.84 | 80.50 | 73.12 |
| DM130 | ≥450 | 15 | 12.74 | 90.03 | 73.85 | 66.48 |
| AB-8 | ≥180 | 10 | 10.88 | 88.58 | 71.39 | 63.23 |
| DA201 | 480 ~ 550 | 13 ~ 14 | 7.49 | 85.93 | 50.59 | 43.47 |

此, X-5 树脂纯化石榴花中的多酚较为理想。

2.2 X-5 大孔吸附树脂吸附条件的优化

2.2.1 上样液 pH 值对吸附效果的影响 由图 1 可知, 其他操作条件不变, 随着 pH 值的升高, 树脂对石榴花多酚的吸附量逐渐降低, 说明低 pH 值有利于吸附。石榴花多酚含有鞣花酸、没食子酸等酚酸类物质^[2], 因此具有弱酸性, 在 pH 值较大时会解离成离子形态存在, 此时不易被大孔树脂吸附, 而以分子态存在时易被所用的大孔树脂吸附。当 pH 值下降时, 石榴花多酚多以分子态存在就易被大孔树脂吸附。因此, pH 值为 2.0 的条件最适合 X-5 树脂吸附石榴花多酚。

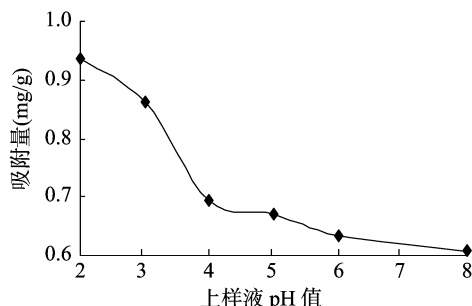


图1 上样液 pH 值对石榴花多酚吸附效果的影响

2.2.2 上样液浓度对吸附效果的影响 从图 2 可以看出, 上样液浓度较低时, X-5 树脂对石榴花多酚的吸附量随上样液浓度的增大而增大; 在石榴花多酚含量为 3.1 mg/mL 时, 吸附量达到最大; 之后, 吸附量反而随上样液浓度的增大而逐渐下降, 这种变化趋势与其他文献中的结果^[13-15]一致。上样液的浓度决定了同一时间与树脂相互作用的目标物质分子数量, 从理论上讲, 在达到饱和之前, 该数量越大越有利于目标物质的富集; 超过一定值后, 随浓度增大, 吸附量下降, 可能是由于上样液中的糖类物质在较大浓度时黏度变大, 堵塞树脂孔隙, 目标物质与树脂相互作用的机会减少, 从而对多酚的吸附量。因此, 选择 3.1 mg/mL 作为上样液浓度。

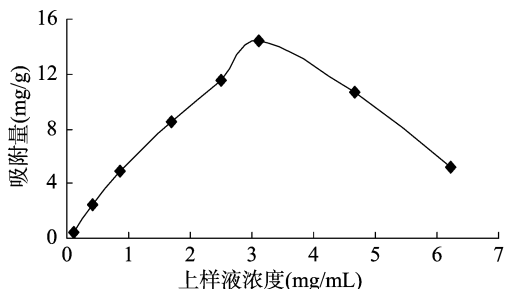


图2 上样液浓度对石榴花多酚吸附效果的影响

2.2.3 吸附动力学曲线 吸附速度也是大孔树脂吸附性能的重要参考指标。25 °C 时, X-5 树脂对石榴花多酚的静态

吸附动力学曲线见图 3。由图 3 可以看出,在 0~5 h 内,X-5 树脂对石榴花多酚的吸附量随着时间的延长而增大,之后趋于稳定,说明吸附 5 h 即可达到饱和,而 XDA-1 树脂对杜仲黄酮的吸附需要 10 h 以上才能达到平衡^[11],可见 X-5 树脂对石榴花多酚的吸附属快速吸附平衡型。

2.2.4 上样液流速对吸附效果的影响 由图 4 可见,随上柱流速的增大,对石榴花多酚的吸附量逐渐减小。流速对树脂吸附的影响主要是影响溶质向树脂表面扩散,从而对吸附效果产生影响。上柱时流速过大,石榴花多酚溶液与树脂之间接触时间变短,石榴花多酚分子来不及进入到树脂的内表面而流过,从而降低吸附率。降低流速,会使石榴花多酚分子同树脂的内表面有足够的接触时间,有利于树脂吸附石榴花多酚,减少多酚的漏出量,从而提高其吸附率;当流速过小时,会使作业周期延长,提高成本。从本试验结果来看,上柱流速为 1 mL/min 的吸附量与上柱流速为 2 mL/min 的吸附量相差不大,因此上柱流速以 2 mL/min 为宜。

2.3 X-5 树脂对多酚吸附后洗脱条件的优化

2.3.1 洗脱液浓度的选择 为尽可能提高多酚的回收率,通

常选用解吸率较高的溶剂作为解吸剂,丙酮、甲醇及乙醇是常用的解吸剂,但考虑到石榴花多酚要应用在食品及化妆品中,因此本试验选用无毒性的乙醇作为解吸剂,并考察乙醇浓度对解吸效果的影响,结果如图 5 所示。当乙醇浓度为 20%~60% 时,解吸效果很低,变化也不大;超过 60% 之后,随乙醇浓度增大,解吸效果迅速提高,当乙醇浓度为 70% 时,解吸效果最好,之后又迅速下降。因此,宜选用 70% 乙醇溶液对石榴花多酚进行洗脱。

2.3.2 洗脱液体积对解吸效果的影响 经吸附达到饱和的 X-5 树脂先用 40 mL 的水洗去树脂吸附的可溶性糖类,再用 200 mL 的 70% 乙醇溶液洗脱,洗脱速度为 2 mL/min,在室温下测定乙醇溶液对多酚物质的动态洗脱效果,结果如图 6 所示。图 6 显示,在动态条件下极易洗脱 X-5 树脂上吸附的多酚物质,很少量的洗脱液即可达到洗脱效果。多酚物质的洗脱高峰也相对比较集中,当洗脱液体积为 10~40 mL 时,洗脱液中的石榴花多酚含量较高;在洗脱液体积达到 80 mL 时,能够将吸附在 X-5 树脂上的多酚充分洗脱,因此,洗脱液体积宜选择 80 mL。

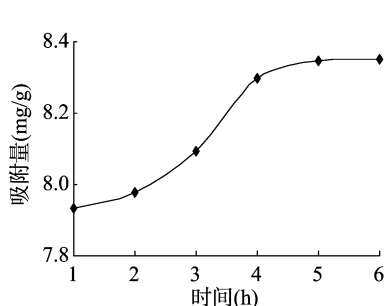


图3 X-5 树脂的吸附动力学曲线

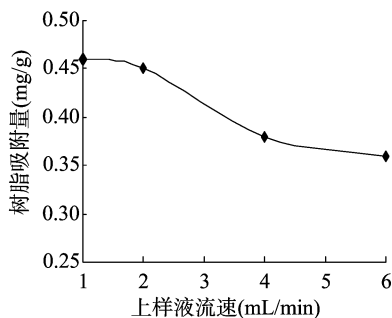


图4 上样液流速对石榴花多酚吸附效果的影响

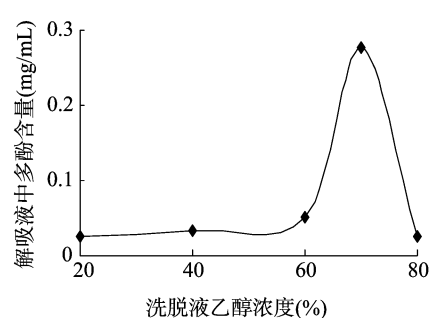


图5 乙醇溶液浓度对石榴花多酚解吸效果的影响

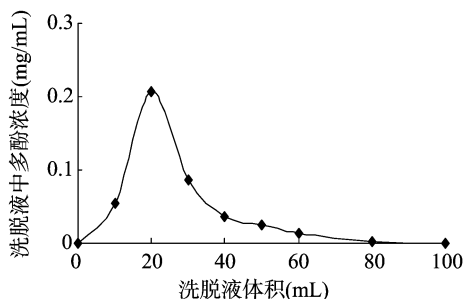


图6 X-5 树脂的动态解吸曲线

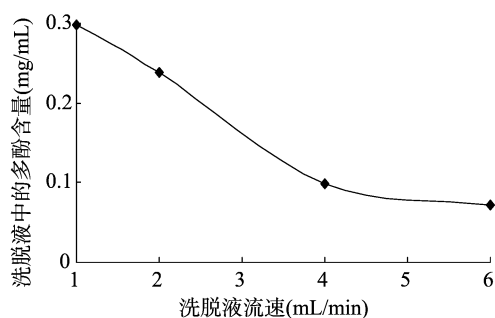


图7 洗脱液流速对石榴花多酚洗脱效果的影响

2.3.3 洗脱液流速对解吸效果的影响 图 7 显示,流速越大,洗脱效果越差,其中流速为 1 mL/min 的解吸效果是流速为 4 mL/min 的 3 倍。因流速加快,洗脱液未能与被吸附的多酚进行充分作用而将其从大孔树脂的吸附位点上置换出来;而流速太小会使作业周期延长。因此,在本研究条件下,70% 乙醇洗脱流速宜控制在 2 mL/min。

3 结论

X-5 树脂用于石榴花多酚纯化具有吸附量大、吸附率高、易解吸等特点,是纯化石榴花多酚的理想材料。选用 X-5 大孔吸附树脂纯化石榴花多酚的最佳上样条件为:上样液浓度 3.1 g/L, pH 值 2.0, 上样液流速 2 mL/min; 最佳洗脱条件:洗

脱液为 70% 乙醇溶液,流速 2 mL/min,洗脱液体积为 80 mL。

参考文献:

- [1] Huang T H W, Peng G, Kota B P, et al. Pomegranate flower improves cardiac lipid metabolism in a diabetic rat model: role of lowering circulating lipids[J]. Brit J Pharmacol, 2005, 145: 767-774.
- [2] Wang R, Wang L, Liu R, et al. Constituents of the flowers of *Punica granatum*[J]. Fitoterapia, 2006, 77(7/8): 534-537.
- [3] Kaur G, Jabbar Z, Athar M, et al. *Punica granatum* (Pomegranate) flower extract possesses potent antioxidant activity and abrogates Fe-NTA induced hepatotoxicity in mice [J]. Food and Chemical Toxicology, 2006, 44(7): 984-993.

滑金杰,袁海波,江用文,等. 响应面设计优化工夫红茶萎凋工艺参数[J]. 江苏农业科学,2015,43(10):362-366.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.10.117

响应面设计优化工夫红茶萎凋工艺参数

滑金杰,袁海波,江用文,汪芳,陈根生,刘千录

(中国农业科学院茶叶研究所/浙江省茶叶加工工程重点实验室/国家茶产业工程技术研究中心/
农业部茶树生物学与资源利用重点实验室,浙江杭州 310008)

摘要:对萎凋末期茶样的常规生化成分含量与成品茶感官品质进行相关性分析,而后以萎凋末期高相关性的品质生化组分和成茶感官总分为考察指标,运用响应面设计对萎凋温度、相对湿度、光照强度等工艺参数进行优化。结果表明:茶多酚含量与成茶感官品质呈显著正相关,儿茶素总量和 TP + AA + SS 含量(茶多酚、氨基酸、可溶性糖三者总量)与成茶感官得分呈极显著正相关。在单因素试验基础上,采用响应面分析法,以萎凋末期儿茶素总量和 TP + AA + SS 含量为响应值,对萎凋环境参数进行优化,建立影响因素与响应值之间的二次回归数学模型,获得最佳工艺参数:萎凋温度为 27 ~ 29 ℃,相对湿度为 69% ~ 72%,光照度为 5 700 ~ 6 400 lx。

关键词:响应面设计;工夫红茶;萎凋末期;生化成分;感官品质;工艺参数

中图分类号: TS272.5⁺2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)10-0362-05

萎凋作为工夫红茶首道加工工序,显著影响成茶的感官品质,现阶段国内外红茶萎凋的研究已具有很好的理论基础^[1-2],但多局限于对某一单因素的研究,如温度、光照度、相对湿度等^[3-5],并没有将多种因素综合起来探讨不同萎凋工艺参数对茶样生化成分、红茶综合品质的影响。本研究采用

SAS 软件对萎凋末期茶样的常规生化成分含量与成品茶感官品质建立相关性,选取与成茶品质显著相关的生化成分作为考察指标,在前期单因素试验基础上通过响应面设计,对生化指标和成茶感官总分建立优化的萎凋参数模型,得出较优的萎凋工艺参数,旨在为工夫红茶工业生产提供理论指导。

收稿日期:2014-11-24

基金项目:国家茶叶产业技术体系红茶加工岗位(编号:CARS-23);
中国农业科学院科研经费项目(编号:201205);浙江省农业科技推广项目。

作者简介:滑金杰(1989—),男,安徽阜阳人,硕士,主要从事茶叶加工与质量控制研究。Tel:(0571)86652327;E-mail:huajinjie@tricaas.com。

通信作者:江用文,研究员,硕士生导师,主要从事茶叶加工与质量控制研究。Tel:(0571)86650103;E-mail:jiangyw@mail.tricaas.com。

1 材料与方法

1.1 鲜叶原料

鲜叶品种为福鼎大白,采自浙江省杭州市农业科学院茶叶研究所茶园,2013 年 9 月 4—8 日采摘,标准为 1 芽 1 叶至 1 芽 2 叶初展为主。

1.2 方法

1.2.1 试验设计 在前期单因素试验基础上,选取萎凋温度、相对湿度、光照度等 3 个因素,应用响应面设计中的 Box

[4] Bektas N, Ozturk N. Antioxidant activity of *Punica granatum* (Pomegranate) flowers[J]. Toxicology Letters, 2007, 172 (Supp.): 62.

[5] Singh R P, Chidambaram M K N, Jayaprakash G K. Studies on the antioxidant activity of pomegranate peel and seed extracts using *in vitro* models[J]. J Agric Food Chem, 2002, 50: 81-86.

[6] Albrecht M, Jiang W, Kumi-Diaka J, et al. Pomegranate extracts potently suppress proliferation, xenograft growth, and invasion of human prostate cancer cells[J]. Journal of Medicinal Food, 2004, 7 (3): 274-283.

[7] Seeram N P, Adams L S, Henning S M, et al. *In vitro* antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2005, 16 (6): 360-367.

[8] John K M, Vijayan D, Kumar R R, et al. Factors influencing the efficiency of extraction of polyphenols from young tea leaves[J]. Asian J Plant Sci, 2006, 5 (1): 123-126.

[9] Tang K W, Zhpi C, Jiang X Y. Preparation of ester catechins with

high proportion by deposition adsorption[J]. J Cent South Univ Technol, 2002, 33 (3): 247-249.

[10] Li P, Wang Y H, Ma R Y. Separation of tea polyphenol from green tea leaves by a combined CATUFM 2 adsorption resin process[J]. J Food Eng, 2005, 67: 253-260.

[11] 董娟娥, 梁宗锁, 张康健, 等. 大孔吸附树脂一次性分离杜仲叶中杜仲总苷和杜仲黄酮的研究[J]. 农业工程学报, 2006, 22 (7): 154-158.

[12] Jaiswal V, Dermarderosian A, Porter J R. Anthocyanins and polyphenol oxidase from dried arils of pomegranate (*Punica granatum* L.) [J]. Food Chemistry, 2010, 118 (1): 11-16.

[13] 马希兰, 王冬梅, 苏印泉. 大孔吸附树脂对杜仲叶中绿原酸、总黄酮的分离研究[J]. 林产化学与工业, 2004, 24 (3): 47-51.

[14] 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.

[15] 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.