

大孔吸附树脂对葵仁多酚的分离富集

Separation and enrichment of polyphenols from sunflower kernel with macroporous resin

徐丹丹¹ 张文斌^{1,2} 杨瑞金^{1,2} 赵伟^{1,2} 华霄^{1,2}

XU Dan-dan¹ ZHANG Wen-bin^{1,2} YANG Rui-jin^{1,2} ZHAO Wei^{1,2} HUA Xiao^{1,2}

(1. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122)

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China; 2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

摘要:针对酸液浸提葵仁后所得的多酚粗提液(主要含 3-O-咖啡酰奎尼酸、4-O-咖啡酰奎尼酸和 5-O-咖啡酰奎尼酸),研究大孔吸附树脂对其分离富集的工艺条件。考察 9 种大孔吸附树脂的吸附解吸性能,筛选出 XDA-1 树脂用于分离纯化。结果表明:经超滤初步纯化后,粗提液纯度可由 4% 提高到 15%;将此超滤液进一步进行树脂吸附,其优化后的吸附工艺条件为进料液多酚浓度 2.0 mg/mL、pH 3.0、上样流速 2 BV/h、上样量 30 倍床体积(BV);吸附结束后,先采用 10%(V/V)的乙醇进行部分去杂,然后用 50%(V/V)的乙醇以 4 BV/h 的流速进行洗脱收集。经树脂分离纯化后所得的多酚,其回收率为 82.3%,纯度由 15% 提高到 77%。联合超滤和大孔吸附树脂分离是一种从葵花籽提取液中回收 CQA 的高效经济方法。

关键词:多酚;大孔吸附树脂;葵仁;分离;富集

Abstract: An efficient preparative separation and enrichment process of polyphenols from sunflower kernel extracted by acid solution has been developed in the present study. 3-O-caffeoylquinic acid (CQA), 4-O-CQA and 5-O-CQA were identified as the main polyphenols in crude extract. The adsorption capacity and desorption ratio for total polyphenols of nine macroporous resins had been evaluated and XDA-1 resin was found to be the most suitable resin for the separation of polyphenols. It was found that ultrafiltration as preliminary treatment could improve the purity of crude extract from 4% to 15%. After that, the extract was submitted to XDA-1 resin column. The optimized purification conditions were obtained as following: polyphenol concentration in sample solution of 2.0 mg/mL, sample pH of

3.0, flow rate of 2 bed volume (BV)/h, sample volume of 30 BV. When the adsorption is done, 10% (V/V) ethanol was applied to the column to wipe off the impurity at 4 BV/h. Then polyphenols were eluted with 50% (V/V) ethanol at 4 BV/h. With the enrichment on XDA-1 resin, the purity of polyphenol in the final product was increased from 15% to 77%, and recovery yield of 82.3% was obtained. Therefore, combination of ultrafiltration and macroporous resin separation provided an efficient and cost-effective method for recovery of CQAs from sunflower kernel extract.

Keywords: polyphenols; macroporous adsorption resin; sunflower kernel; separation; enrichment

葵花籽是重要的油料作物,其中含 40%~60% 的油脂和 21%~31% 的蛋白质^[1],此外还含有较为丰富的酚类物质,特别是绿原酸占总酚含量的 70% 以上^[2]。绿原酸(chlorogenic acid, CGA)又名 5-O-咖啡酰奎尼酸(5-O-CQA),是由奎尼酸和咖啡酸组成的缩酚酸,广泛存在于植物食品中,由于其羟基取代的高反应性和吞噬自由基的能力而有很好的抗氧化活性^[3]。研究^[4]发现,绿原酸等多酚类化合物具有延缓肿瘤发作、抑制肿瘤形成与低密度脂蛋白氧化及血小板凝集等功能,这些功能都与其抗氧化性能有关。此外,绿原酸还具有利胆、抗菌、降压、增高白血球和兴奋中枢神经系统等多种药理作用,是一种极具开发价值的潜在天然化合物^[4, 5]。

对于绿原酸类物质的分离富集,常用方法有沉淀法^[6, 7]、溶剂萃取法、超滤法^[8, 9]、大孔吸附树脂法^[10, 11]。前两者方法存在溶剂耗用量大、操作繁琐、材料不易再生等缺点,相比而言,超滤和大孔吸附树脂具有独特的优势。超滤膜分离技术具有操作简便、无污染、在常温下能连续操作等优点,特别适用于热敏性物质^[12]。根据目标物的分子量大小选取合适的超滤膜,可将提取液中的多糖、蛋白、鞣质等一系列大分子物质去除,达到分离纯化目的。而大孔吸附树脂则以高效、经济等优势越来越广泛用于生物活性物质的分离

基金项目:国家“863”计划项目(编号:2013AA102104);江苏省自然科学基金资助项目(编号:BK2012116)

作者简介:徐丹丹(1990—),女,江南大学在读硕士研究生。
E-mail: cecilia900116@163.com

通讯作者:张文斌

收稿日期:2015-07-26

纯化,这是由于大孔吸附树脂具有理想的孔径结构和较大的比表面积。大孔树脂根据化合物分子量、极性、分子形状等差异用于黄酮、皂苷、生物碱的分离纯化^[13],具有分离效果好,操作成本低、消耗溶剂少、容易再生等优点^[14, 15]。

目前,绿原酸主要从金银花和杜仲叶中提取,而葵花籽作为一种酚类丰富的植物原料,很少用于酚类提取。同时,葵仁中由于存在绿原酸等酚类,易在加工时与蛋白质发生反应,影响蛋白的色泽和功能性质,导致优质蛋白和多酚的双重浪费^[16, 17]。因此,本研究拟从葵仁中直接提取绿原酸类多酚,此粗提液经超滤初步纯化后再采用大孔吸附树脂进一步分离富集,以获取纯度较高的多酚类产品,实现葵仁资源的高附加值开发。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

脱壳葵仁:产自内蒙古河套地区,收获于2014年秋;

盐酸、乙醇:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

绿原酸:纯度 $\geq 95\%$,美国Sigma-Aldrich公司;

咖啡酸:纯度 $\geq 98\%$,美国Sigma-Aldrich公司;

大孔吸附树脂:AB-8、D101、HPD850、NKA-9、NKA-II、XDA-4、XDA16HP、XDA-1B、XDA-1型,郑州勤实科技有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

紫外可见分光光度计:UV-1100型,上海美谱达仪器有限公司;

高效液相色谱仪(配L2455DAD检测器):HITACHI-2000型,日本日立公司;

超高效液相质谱仪:Waters Acquity UPLC型,美国Waters公司;

超级恒温循环槽:MP-501A型,上海一恒科技有限公司;

超滤系统膜套:PLBC-C型,美国Millipore公司;

全温培养摇床:QYC-2102型,上海新苗有限公司;

电脑全自动部分收集器:DBS-100型,上海沪西分析仪器厂有限公司;

电脑数显恒温泵:DHL-A型,上海沪西分析仪器厂有限公司;

实验室pH计:FE20型,梅特勒-托利多仪器有限公司;

离心机:LXJ-II B型,上海安亭科学仪器厂。

1.2 试验方法

1.2.1 绿原酸类多酚粗提液制备及初步纯化 取适量葵仁与0.001 mol/L的盐酸溶液以料液比1:5($m:V$),在90℃下搅拌提取1.0 h后,用纱布分离葵仁与浸提液,待浸提液冷却后将其pH调至4.5,静置一段时间后离心(5 000 r/min,10 min),抽滤,经截留分子量为3 kDa的再生纤维素膜超滤后,得到澄清透明的提取液,调节pH至3.0,避光备用。

1.2.2 绿原酸类多酚含量的测定

(1) 紫外分光光度法测定绿原酸含量的标准曲线:取10 mg绿原酸标品稀释定容至50 mL的棕色容量瓶中,再取10 mL定容至100 mL,得20 $\mu\text{g/mL}$ 的绿原酸溶液,分别稀释成2,6,10,14,18 $\mu\text{g/mL}$,在327 nm下用紫外分光光度计测定,绘制吸光值—浓度曲线方程为 $y = 48.874x - 0.001$ ($R^2 = 0.9999$)。

(2) 高效液相法测定绿原酸含量的标准曲线:色谱条件:Agilent Zorbax SB-C₁₈色谱柱(4.6 mm $\times$ 250 mm,5 μm);流动相为乙腈:2%乙酸溶液=15:85($V:V$);流速0.5 mL/min;柱温25℃;检测波长327 nm(DAD监测波长为190~400 nm);进样量10 μL 。

标准曲线的制作:精确称取50 mg绿原酸标准样品,用甲醇溶解至浓度1 mg/mL,并进一步稀释成0.75,1.5,3,15,75,150 $\mu\text{g/mL}$ 。经0.22 μm 微孔滤膜过滤后,进样至HPLC测定。按上述色谱条件,以峰面积为纵坐标,溶质浓度为横坐标,绘制绿原酸的标准曲线方程为 $y = 22680.24x - 9820.20$ ($R^2 = 0.9998$)。

(3) 紫外分光光度法和高效液相色谱法测定多酚含量的相关性分析:将超滤处理后的多酚提取液稀释成5种不同浓度,分别采用高效液相色谱仪和紫外分光光度计测定,以液相测定浓度(mg/mL)为横坐标,紫外测定浓度(mg/mL)为纵坐标作相关性曲线,得到回归方程: $y = 1.2295x + 0.0001$ ($R^2 = 0.9994$)。

由于紫外分光光度法和高效液相色谱法在测定多酚含量时具有较高的相关性,考虑到简便,采用紫外分光光度法对多酚含量进行测定。

1.2.3 酸浸提液中产物种类的UPLC—MS/MS鉴定

(1) 色谱条件:Waters Acquity BEH C₁₈(2.1 mm $\times$ 100 mm)色谱柱;流动相A为乙腈,B为0.1%甲酸,梯度洗脱:0~0.1 min,2% A;0.1~8 min,2%~40% A;8~11 min,40%~100% A;11~12 min,100% A。流速0.3 mL/min,检测波长327 nm,DAD检测波长为200~600 nm,进样量1 μL 。

(2) 质谱条件:美国Waters质谱仪。电喷雾离子化(ESI)源,离子源温度为100℃,负离子检测,毛细管电压为3.0 kV,锥孔气流量为50 L/h,脱溶剂温度为400℃,脱溶剂气体流量为500 L/h,扫描范围 m/z 为50~1 500。

1.2.4 大孔吸附树脂静态吸附及解吸

(1) 树脂预处理及水分含量测定:采用95%(V/V)乙醇浸泡树脂24 h,过滤,然后用去离子水洗至无醇味,布氏漏斗抽干待用。称取湿树脂各3 g,精确到0.000 1 g,并置于恒重过的水分盒中,于105℃下烘至恒重,计算树脂的水分含量。

(2) 树脂的筛选:各称取树脂0.7 g(湿基),装入250 mL的锥形瓶中,加入多酚浓度为2.0 mg/mL的提取液200 mL,在25℃、120 r/min条件下振荡吸附10 h,吸附结束后测定残余溶液中多酚的浓度。将上述已吸附的树脂,用去离子水

淋洗后,置于 250 mL 锥形瓶,加入 80% (V/V) 的乙醇溶液 200 mL,在 25 ℃、120 r/min 下恒温振荡解吸 4 h,测定解吸溶液中多酚的浓度。各树脂的吸附量、解析量以及解析率分别按式(1)~(3)计算:

$$Q_e = \frac{(C_0 - C_e)V_i}{W} \quad (1)$$

$$Q_d = \frac{C_d V_d}{W} \quad (2)$$

$$D = \frac{C_d V_d}{(C_0 - C_e)V_i} \quad (3)$$

式中:

Q_e ——吸附量,mg/g·干树脂;

C_0 、 C_e ——吸附前和吸附后溶液中的多酚浓度,mg/mL;

V_i ——加入的多酚粗提液的体积,mL;

W ——树脂的干重,g;

Q_d ——解吸量,mg/g·干树脂;

D ——解吸率,%;

C_d ——解吸液中多酚浓度,mg/mL;

V_d ——解吸液体积,mL。

(3) 吸附动力学曲线的绘制:称取筛选后的湿树脂 0.7 g 置于 250 mL 锥形瓶中,加入 200 mL、2.0 mg/mL 的多酚提取液,在 25 ℃、120 r/min 条件下恒温振荡吸附,并每隔 20 min 取样测定残余多酚含量,直至吸附达到平衡,绘制吸附动力学曲线。

(4) 吸附初始 pH 的挑选:用 0.1 mol/L 的盐酸溶液将提取液的初始 pH 分别调节至 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0,计算吸附后残余溶液中多酚的浓度。并绘制以吸附量为纵坐标,pH 为横坐标的曲线。

(5) 吸附等温线的绘制:分别称取 0.7 g 湿树脂于 250 mL 锥形瓶中,加入 200 mL 不同浓度(0.7~3.6 mg/mL)的提取液,于 25 ℃下以 120 r/min 振摇吸附 10 h,测定吸附后残余液的多酚浓度。

1.2.5 大孔吸附树脂动态吸附及解吸

(1) 泄露曲线的绘制:称取约 18 g 湿树脂装于 $\Phi 1.0 \times 30$ cm 的层析柱中,其中树脂的床体积(BV)为 26 mL,将浓度为 2.0 mL/L、pH 3.0 的多酚提取液分别以 2 BV/h 和 4 BV/h 的流速进样,5 mL/管收集流出液并测定多酚浓度,直至流出液与上样液的多酚浓度相等,此时树脂已完全达到吸附饱和,停止进样。绘制泄露曲线。

(2) 梯度洗脱:将浓度为 2.0 mL/L、pH 3.0 的多酚提取液以 2 BV/h 的流速上样 30 BV,用去离子水以 2 BV/h 的流速洗去水溶性成分和树脂间未吸附的多酚,再依次用 10%、30%、50%、70%、90% (V/V) 的乙醇溶液以 4 BV/h 的流速洗脱 7 BV,测定各洗脱液的多酚浓度及纯度。

(3) 动态洗脱曲线的绘制:将浓度为 2.0 mg/mL、pH 3.0 的多酚提取液以 2 BV/h 的流速上样 30 BV,经水洗后,先用 10% (V/V) 乙醇洗脱 7 BV,然后用 50% (V/V) 乙醇分别以 1 BV/h 和 4 BV/h 的流速洗脱收集,并经适当稀释后测定多酚浓度,绘制洗脱曲线。

(4) 产物纯度的测定:将洗脱液于 55 ℃下真空旋转蒸发至 30 mL 左右,置于培养皿,并用去离子水清洗残余壁上的液体,合并后冷冻干燥。绿原酸类物质的纯度定义为洗脱液中绿原酸类质量与干燥后总物质质量的比值。

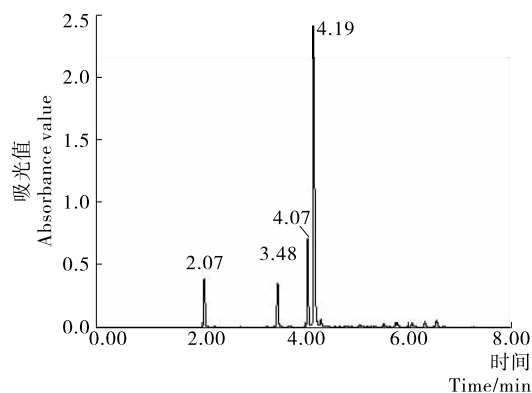
1.3 数据处理

试验得到的数据用 SPSS 17.0 统计软件进行方差分析。用 LSD 检验判别数据之间的差异性,显著差异水平 $P < 0.05$ 。重复试验 3 次,所得数据以均值±标准差表示。

2 结果与讨论

2.1 提取液成分的 UPLC—MS/MS 分析

由图 1 可知,提取液中主要含 4 种化合物。经质谱(UPLC—MS/MS)进一步检测分析(见图 2),酸液产物主要为绿原酸(5-O-CQA)、新绿原酸(3-O-CQA)、隐绿原酸(4-O-CQA)和未知化合物 X,其中 5-O-CQA 含量居多^[18-21]。Nakatani 等^[22]研究表明 3-O-CQA、4-O-CQA 和 5-O-CQA 具有相同的抗氧化能力。Kan 等^[23]也表明这 3 种物质在消除自由基和对抗癌细胞毒素能力方面几乎没差别。因此,绿原酸的异构化并不影响总酚的生物活性,将这 3 种物质一并进行富集回收。



UV 检测波长 327 nm; $t_R = 2.07$ min: 未知物; $t_R = 3.48$ min: 3-O-咖啡酰奎尼酸; $t_R = 4.07$ min: 4-O-咖啡酰奎尼酸; $t_R = 4.19$ min: 5-O-咖啡酰奎尼酸

图 1 葵仁 90 ℃下酸浸提液的 UPLC 洗脱曲线

Figure 1 UPLC elution curve of acid solution extract from intact sunflower kernel at 90 ℃

2.2 多酚粗提液的超滤纯化

经浸提后,葵仁多酚粗提液的纯度只有 4%,且体系极不稳定,在低温(4 ℃)下静置 1~2 d 便会有杂质的絮凝且变质。经截留分子量为 3 kDa 的超滤膜初步纯化后,多酚透过率达 99% 以上,蛋白截留为 62%,粗提液纯度达 15%。虽然大部分的蛋白质可经超滤截留,但是残余的蛋白质或多肽等杂质与多酚组成的体系仍不稳定,若要获得多酚这类高生物活性的物质,考虑可采用大孔吸附树脂进一步纯化。

2.3 大孔树脂静态吸附及解吸条件的确定

2.3.1 树脂的水分含量 测定了大孔吸附树脂的水分含量,见表 1。

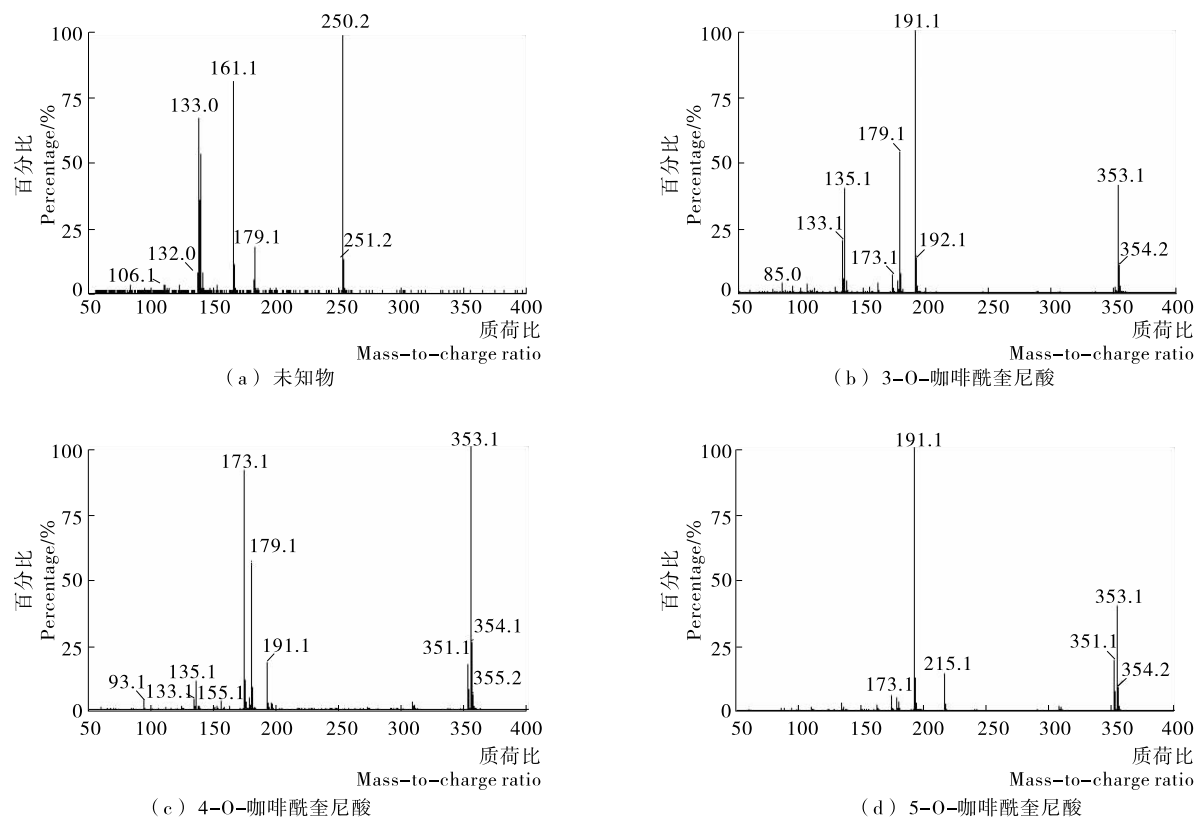


图 2 UPLC 洗脱峰的二级质谱图
Figure 2 MS/MS spectra of UPLC eluted peaks

表 1 各树脂的性能参数				
Table 1 Properties of the tested macroporous resins				
树脂名称	极性	比表面积/ (m ² · g ⁻¹)	平均孔径/Å	水分含量/%
D101	非极性	≥550	250~280	67.28
XDA-1	非极性	≥1200	85~95	60.57
XAD-4	非极性	≥750	90~100	70.62
XAD16HP	非极性	≥800	150	53.29
AB-8	弱极性	≥480	130~140	61.09
XDA-1B	弱极性	500~600	145~155	61.15
D130	弱极性	500~550	90~100	74.67
HPD850	极性	1 100~1 300	85~95	60.19
NKA-II	极性	160~200	145~155	57.96

2.3.2 大孔吸附树脂的吸附量、解吸量和解吸率 由图 3 可知,除了 HPD850 和 XAD16HP 外,其余 7 种树脂对多酚都具有较高的吸附性能,特别是 XDA-1、XDA-1B 和 NKA-II 树脂对绿原酸类的吸附能力尤为显著。至于解吸性能,这些树脂都表现出良好的解吸能力,且解吸率都在 80% 以上。

绿原酸及其两种异构体都含有羧基和 5 个羟基,为极性化合物。根据“相似相溶”原则,一般来说,极性化合物在极性树脂上具有较好的吸附能力。虽然 HPD850 和 NKA-II 同为极性树脂,但是绿原酸类在这两种树脂上的吸附差异较大,分别为 37.66,207.66 mg/g。可见,极性并非唯一的决定因素,树脂的其他一些物理特性,如比表面积和平均孔径都

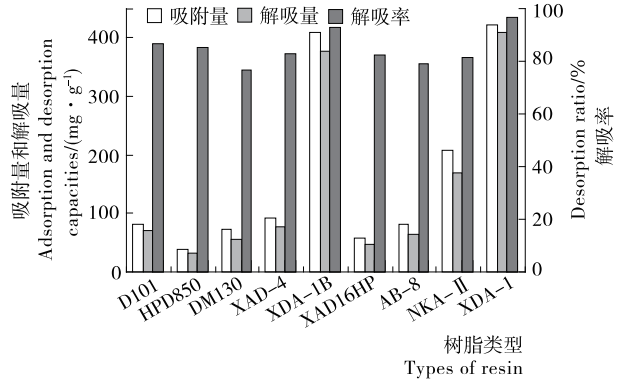


图 3 葵仁多酚在 9 种不同树脂上的吸附量、解吸量和解吸率
Figure 3 Adsorption and desorption capacities, and desorption ratio of sunflower kernel polyphenols on different resins

会影响绿原酸类物质的吸附效果,如 XDA-4 和 XDA16HP 同为非极性树脂且比表面积相近,但是 XDA-4 的吸附量(93.07 mg/g)要远远高于 XDA16HP(57.73 mg/g),可能是由于平均孔径的不同造成吸附能力的差异。事实上,除了以上这些树脂的物理特性(极性、比表面积和平均孔径),树脂的化学成分和结构同样也严重影响着吸附性能,如 AB-8 和 XDA-1B 具有类似的极性、比表面积和平均孔径,但在吸附效果上却有显著差异。

在上述所选的非极性树脂中,XDA-1 具有非常大的比表

面积,而 XDA-1B 树脂带有弱极性基团的吸附剂,是 XDA-1 树脂的补充和改进,虽然比表面积小于 XDA-1,但由于树脂内部孔表面带有弱极性基团,对水溶性差、从水相扩散到树脂相阻力较大的有机物吸附速度快,吸附量大。此外, NKA-II 也表现出良好的吸附能力。综合考虑, XDA-1、XDA-1B 和 NKA-II 更适合多酚的分离和纯化,因此对于这 3 种树脂将通过动态吸附试验进行进一步筛选。

2.3.3 树脂的吸附动力学曲线 由图 4 可知,绿原酸类物质在 3 种树脂上不仅有较高的吸附能力,还具有较好的吸附速率。在前 100 min 内 3 种树脂的吸附量迅速增加,到 120 min 后基本趋于稳定,达到吸附平衡。XDA-1 和 XDA-1B 比 NKA-II 具有更高的吸附容量,同时 XDA-1 和 XDA-1B 二者的吸附容量和吸附速率不相上下,考虑到解吸量,最终选定 XDA-1 树脂进行后续试验。

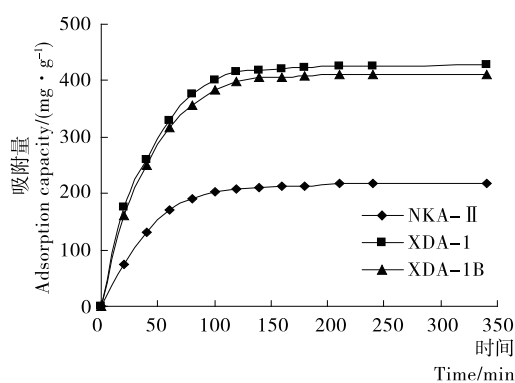


图 4 葵仁多酚在 3 种树脂上的吸附动力学

Figure 4 Adsorption kinetics of sunflower kernel polyphenols on three different resins

2.3.4 初始 pH 对吸附量的影响 初始 pH 值对吸附量的影响相当明显(见图 5)。pH 值不仅改变了绿原酸及类似物在溶液中的状态,同时也影响溶液流经树脂时目标物在树脂表面吸附能力的强弱。Sun 等^[24]研究 5-O-CQA 在极性树脂 ADS-21 上的吸附行为时发现:当 pH 值为 2 时,绿原酸在树脂上的吸附能力最大,随着 pH 值增大,吸附能力逐渐下降。这是因为 pH 值决定了绿原酸分子的电离程度,由此影响吸附性能,且在极性树脂吸附过程中,氢键可能起到非常重要的作用,若在高 pH 值下,酚羟基电离形成 H^+ 和相应的阴离子,导致 5-O-CQA 和大孔吸附树脂之间氢键作用减少。而本试验所使用的 XDA-1 树脂为非极性树脂。由图 5 可知,随着 pH 增大,特别是当 $pH > 3$ 时,绿原酸类的吸附能力明显下降,这可能是因为在较低 pH 值下,绿原酸类物质是以分子状态的形式存在于溶液中,易被树脂吸附;当在较高 pH 溶液中,绿原酸类以离子状态存在且难被树脂吸附^[25,26]。因此,最佳的吸附条件为 $pH \leq 3$,考虑到 pH 2 和 pH 3 下, XDA-1 对目标物的吸附能力相差不大(吸附量分别为 432.48, 424.41 mg/g),因此将上样溶液的 pH 值调节至 3。

2.3.5 吸附等温线 为了进一步揭示多酚在 XDA-1 树脂上的吸附规律,分别采用 Langmiur 和 Freundlich 方程进行拟合。Langmiur 方程描述的是较理想的单分子吸附,其模型通常表述为:

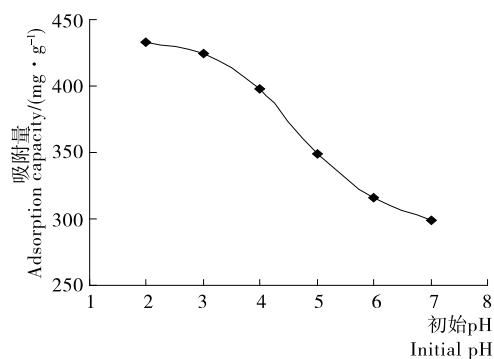


图 5 不同初始 pH 下葵仁多酚的吸附量

Figure 5 Adsorption capacities of sunflower kernel polyphenols under different initial pH

$$\frac{C_e}{Q_e} = \frac{C_e}{Q_0} - \frac{1}{KQ_0} \quad (4)$$

式中:

Q_e ——吸附量, mg/g · 干树脂;

C_e ——吸附后溶液中的总酚浓度, mg/mL;

Q_0 ——经验常数,与树脂的吸附能有关;

K ——吸附平衡常数,与最大吸附量有关。

而 Freundlich 方程适用于非理想的不均匀吸附,其模型表述为:

$$Q_e = KC_e^{1/n} \quad (5)$$

式中:

Q_e ——吸附量, mg/g · 干树脂;

C_e ——吸附后溶液中的总酚浓度, mg/mL;

K ——Freundlich 常数,反映树脂吸附能力大小;

$1/n$ ——经验常数,表明树脂的吸附强度。

由图 6 可知,随着初始浓度的增加,吸附量也随之增加。从相关性程度(R^2)来看, Langmiur 方程($R^2 = 0.9969$)的相关性比 Freundlich 方程($R^2 = 0.9869$)的要高,说明 Langmiur 方程更加适合描述绿原酸类在 XDA-1 树脂表面的吸附行为,同时表明绿原酸类在 XDA-1 树脂表面的吸附是单分子层吸附。通常当 $1/n < 0.5$ 时,表明吸附很容易发生;当 $0.5 < 1/n < 1$ 时,吸附发生较难;当 $1/n > 1$ 时,吸附几乎不可能发生^[27]。由表 2 可知, Langmiur 方程中 $1/n = 0.4022$,说明 XDA-1 树脂比较适合绿原酸类的吸附。

2.4 大孔树脂动态吸附及解吸条件的确定

2.4.1 上样流速及上样体积 树脂对目标物的吸附能力并非持续不变的,当树脂吸附到达一定量时,树脂对目标物的吸附作用会降低,进样液便从树脂柱上泄露。因此,确定上样流速和上样体积是非常必要的。一般而言,泄漏点是树

表 2 葵仁多酚在 XDA-1 树脂上的 Langmiur 和 Freundlich 的拟合方程

Table 2 Langmiur and Freundlich equations for polyphenol adsorption isotherms on XDA-1 resin

吸附等温方程	拟合曲线	R^2
Langmiur	$y = 281.46x^{0.4022}$	0.9969
Freundlich	$y = 0.0036x + 0.0005$	0.9869

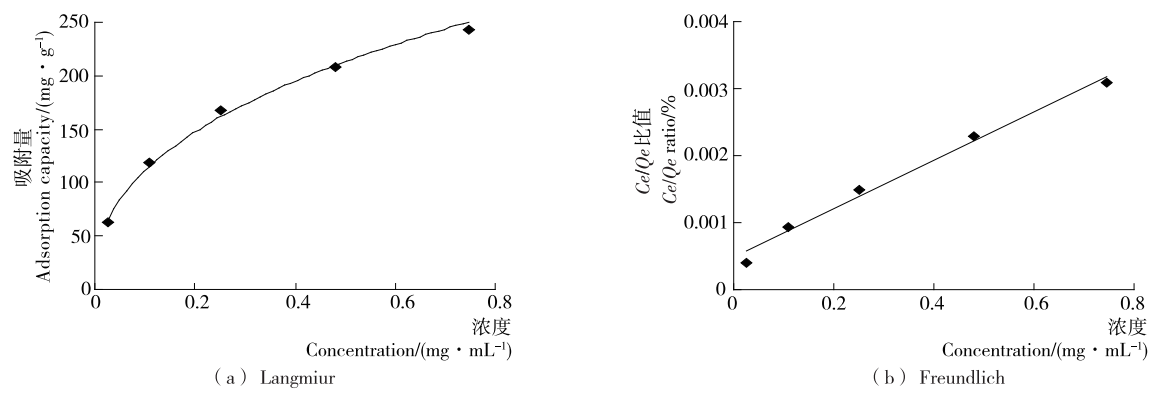


图 6 葵仁吸附等温线的拟合 Langmuir 和 Freundlich 方程

Figure 6 Fitting of adsorption isotherms with Langmuir equation and Freundlich equation

脂对目标物吸附能力突变的点,其范围定义为流出液的浓度达到上样液溶度的 1%~10%。为了确定 XDA-1 树脂对绿原酸类溶液吸附较佳的上样流速和上样体积,分别采用 2 BV/h 和 4 BV/h 的速度进行上样,其泄露曲线见图 7。通过曲线分析,当流出液的浓度达到上样液溶度的 5% 后,流出液中目标物的浓度急剧增大,说明此后 XDA-1 树脂对目标物的吸附能力显著降低,所以将 $C_t/C_0=5\%$ 定义为泄漏点,此点对应的上样体积称之为泄漏体积。当上样流速定为 4 BV/h 和 2 BV/h 时,泄漏体积分别为 20 BV 和 30 BV。假如将上样流速降低到 1 BV/h,可能会使泄露体积增大,但是同时也大大增加了上样的时间。因此在后续试验中将上样流速定为 2 BV/h,上样体积定为 30 BV。

2.4.2 梯度洗脱及组分纯度 上样结束后依次经不同浓度的乙醇梯度洗脱,其产物的洗脱比例和纯度见图 8。虽然 10%(V/V)乙醇能洗脱下 13.7% 的多酚类物质,但纯度只有

57%。大部分目标物质可以在 30%(V/V)和 50%(V/V)乙醇浓度下洗脱下来(洗脱比例分别为 48.4% 和 33.5%),且纯度都达到 70% 以上。70%(V/V)乙醇洗脱下 2.2% 的目标物,纯度为 47%,而 90%(V/V)乙醇只洗脱下 0.1%,纯度只有 9%。假如要获得较高纯度的多酚类物质,可先采用 10%(V/V)乙醇洗脱除去纯度较低的目标物,然后再用 50%(V/V)乙醇洗脱收集。

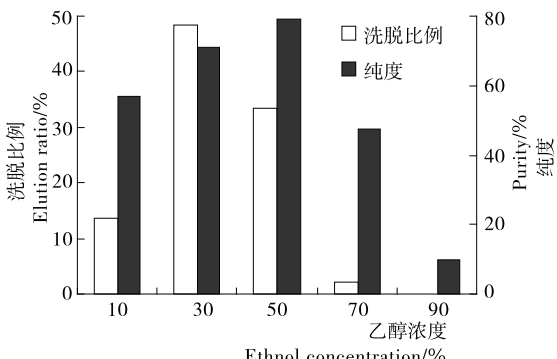


图 8 葵仁多酚在 XDA-1 树脂柱上的梯度洗脱

Figure 8 Gradient elution of sunflower kernel polyphenols on XDA-1 resin column

2.4.3 树脂动态解吸曲线 采用 10%(V/V)乙醇洗脱除去纯度较低的多酚,再用 50%(V/V)乙醇进行洗脱收集,其洗脱曲线见图 9。采用 4 BV/h 的流速进行洗脱时,2 h 后基本

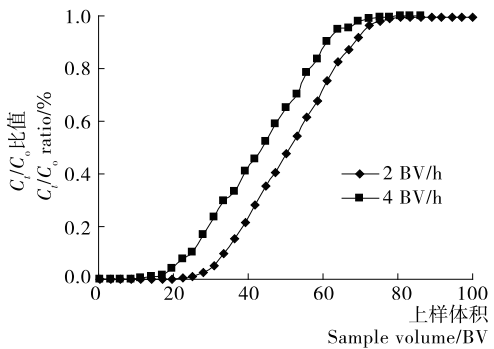


图 7 动态吸附条件下不同上样流速时的泄露曲线

Figure 7 The breakthrough curve at different flow rate under dynamic adsorption condition

表 3 不同上样流速下多酚在 XDA-1 树脂上的泄露体积和吸附量

Table 3 Breakthrough volume and capacity of polyphenols absorbed on XDA-1 resin at different flow rate

流速/(BV · h ⁻¹)	泄漏体积/BV	吸附多酚量/(mg · g ⁻¹ · 干树脂)
2	30	247.7
4	20	165.2

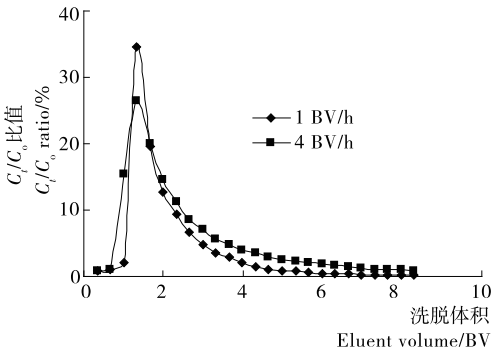


图 9 葵仁多酚在 XDA-1 树脂柱上的动态解吸曲线

Figure 9 Dynamic desorption curve of sunflower kernel polyphenols on XDA-1 resin column

洗脱完全,若将流速改为 1 BV/h,需要 5 h 才能洗脱完全,大大延长了洗脱时间,不适于工业化生产,因此采用 4 BV/h 的流速进行洗脱。经大孔吸附树脂富集纯化后,产物的回收率为 82.3%,纯度可由原来的 15% 提高到 77%。

3 结论

将酸液用于葵仁多酚的提取,可获取以绿原酸为主的大部分多酚,将此粗提液依次经超滤和大孔树脂吸附解吸可实现富集纯化。结果表明:经截留分子量为 3 kDa 的超滤膜处理后,多酚透过率为 99%,纯度由 4% 提高到 15%;超滤后的提取液经大孔吸附树脂进一步富集,其优化工艺条件为多酚浓度 2.0 mg/mL、pH 3.0、上样速度 2 BV/h、上样体积 30 BV,此时吸附达到泄漏点;吸附结束后,先采用 10% (V/V) 的乙醇进行部分去杂,然后用 50% (V/V) 乙醇以 4 BV/h 的速度进行洗脱收集,产品纯度可由 15% 提高到 77%,回收率为 82.3%。超滤和大孔吸附树脂联合可适用于葵仁多酚的富集回收。

参考文献

- 冷玉娟. 水酶法提取葵花籽油和葵花籽蛋白的回收[D]. 无锡: 江南大学, 2007.
- González-Pérez S, Vereijken J M. Sunflower proteins: overview of their physicochemical, structural and functional properties[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2007, 87(12): 2 173~2 191.
- Pajak P, Socha R, Gałkowska D, et al. Phenolic profile and antioxidant activity in selected seeds and sprouts[J]. Food Chemistry, 2014, 143(12): 300~306.
- 陈少洲. 油葵中绿原酸和咖啡酸的提取及对 α LDL 诱导损伤内皮细胞的保护作用[D]. 北京: 中国农业大学, 2003.
- 向福, 冯鹏, 刘亮, 等. 大孔树脂对罗田金银花叶中绿原酸的分离研究[J]. 食品与机械, 2013, 29(4): 141~144.
- 张星海. 金银花中绿原酸提取、分离纯化工艺和活性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2003.
- 阎巧娟, 韩鲁佳, 江正强. 金银花中绿原酸提取纯化工艺的优化[J]. 中国农业大学学报, 2002, 7(2): 22~26.
- Gokmen V, Acar J, Kahraman N. Influence of conventional clarification and ultrafiltration on the phenolic composition of golden delicious apple juice[J]. Journal of Food Quality, 2003, 26(3): 257~266.
- Wei S, Hossain M M, Saleh Z S. Concentration of rutin model solutions from their mixtures with glucose using ultrafiltration[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2010, 11(2): 672~690.
- 钟方丽, 王晓林, 王至敏, 等. 大孔吸附树脂纯化玉竹总黄酮工艺研究[J]. 食品与机械, 2013, 29(1): 131~134.
- Zhao Hui, Wang Jun, Jia Jing, et al. Enrichment and purification of total chlorogenic acids from tobacco waste extract with macroporous resins[J]. Separation Science and Technology, 2010, 45(6): 794~800.
- 杨祖金, 江燕斌, 葛发欢, 等. 超滤膜技术分离杜仲叶绿原酸的研究[J]. 中药材, 2008(4): 585~588.
- Bretag J, Kammerer D R, Jensen U, et al. Evaluation of the adsorption behavior of flavonoids and phenolic acids onto a food-grade resin using a D-optimal design[J]. European Food Research and Technology, 2009, 228(6): 985~999.
- 杜延兵, 慕鸿雁, 何忠宝, 等. D101 大孔吸附树脂纯化葵花籽粕绿原酸研究[J]. 粮食与油脂, 2013, 26(6): 50~52.
- Li Jing, Chase H A. Development of adsorptive (non-ionic) macroporous resins and their uses in the purification of pharmacologically-active natural products from plant sources[J]. Natural Product Reports, 2010, 27(10): 1 493~1 510.
- Rosa P M d, Antoniassi R, Gonçalves E B, et al. Extraction of chlorogenic acid from deffated sunflower meal[J]. Ciência Rural, 2011, 41(4): 719~724.
- 王志华. 葵花籽饮料的研制以及绿原酸提取工艺的研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2004.
- Zanoelo E F, Beninca C. Chemical kinetics of 5-O-caffeoylquinic acid in superheated steam: effect of isomerization on mate (*Ilex paraguariensis*) manufacturing[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(24): 11 564~11 569.
- Karamac M, Kosinska A, Estrella I, et al. Antioxidant activity of phenolic compounds identified in sunflower seeds[J]. European Food Research and Technology, 2012, 235(2): 221~230.
- Zhang Jia-yu, Zhang Qian, Li Ning, et al. Diagnostic fragmentation-based and extension strategy coupled to DFIs intensity analysis for identification of chlorogenic acids isomers in *Flos Loniceræ Japonicæ* by HPLC-ESI-MSⁿ[J]. Talanta, 2013, 104: 1~9.
- Clifford M N, Johnston K L, Knight S, et al. Hierarchical scheme for LC-MSⁿ identification of chlorogenic acids[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(10): 2 900~2 911.
- Nakatani N, Kayano S-I, Kikuzaki H, et al. Identification, quantitative determination, and antioxidative activities of chlorogenic acid isomers in prune (*Prunus domestica* L.)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(11): 5 512~5 516.
- Kan Shi-dong, Cheung M W M, Zhou Yan-ling, et al. Effects of boiling on chlorogenic acid and the liver protective effects of its main products against CCl₄-induced toxicity in vitro[J]. Journal of Food Science, 2014, 79(2): 157~154.
- Sun Peng-peng, Liu Ying, Yi Yue-tao, et al. Preliminary enrichment and separation of chlorogenic acid from *Helianthus tuberosus* L. leaves extract by macroporous resins[J]. Food Chemistry, 2015, 168(2): 55~62.
- Wang Jun, Lu Ding-qiang, Liang Yao, et al. Isolation of mono-caffeoylquinic acids from tobacco waste using continuous resin-based pre-separation and preparative HPLC[J]. Journal of Separation Science, 2012, 35(10~11): 1 379~1 387.
- Sun Li-jun, Guo Yu-rong, Fu Cheng-cheng, et al. Simultaneous separation and purification of total polyphenols, chlorogenic acid and phlorizin from thinned young apples[J]. Food Chemistry, 2013, 136(2): 1 022~1 029.
- Zhang Bin, Yang Rui-yuan, Zhao Yan, et al. Separation of chlorogenic acid from honeysuckle crude extracts by macroporous resins[J]. Journal of Chromatography B, 2008, 867(2): 253~258.