

# D101 树脂分离纯化芡实多酚的特性研究

张 余, 薛连海, 贾小丽, 孙艳辉  
(滁州学院化学与生命科学系, 安徽 滁州 239012)

**摘 要:** 采用 50% 丙酮溶液对芡实中的多酚进行分离提取。在 D101 树脂对芡实多酚吸附特性研究的基础上, 采用 D101 树脂吸附-柱层析分离法, 对芡实多酚进行纯化。结果显示, D101 树脂对溶液体系中芡实多酚的平衡吸附量为 33.21mg/g, 在蛋白质、低聚糖和多酚等组分共存的溶液体系中, D101 树脂对芡实多酚的吸附具有较高的选择性。芡实多酚经 D101 树脂吸附后, 用 pH5、50% 丙酮溶液(V/V) 洗脱, 即可将其中 91.84% 的芡实多酚洗脱下来。洗脱液经减压浓缩、干燥后, 得到纯化芡实多酚样品, 其中总酚含量达 81.38%。

**关键词:** 芡实多酚; 吸附特性; 分离; 纯化

## Purification of Polyphenols from Gorgon Nut Using D101-type Macroporous Adsorption Resin

ZHANG Cuan, XUE Lian-hai, JIA Xiao-li, SUN Yan-hui  
(Department of Chemistry and Life Science, Chuzhou University, Chuzhou 239012, China)

**Abstract:** Crude polyphenols was isolated from gorgon nut and purified using D101-type resin adsorption-column chromatography with elution of 50% acetone aqueous (V/V) at pH 5. Results revealed that D101-type resin exhibited a high adsorption capacity (33.21 mg/g) to gorgon nut polyphenols (GNPP). High adsorption specificity to GNPP was observed in D101 resin compared with impurities in the mixture solution such as proteins and carbohydrates. Under optimal purification conditions, 91.84% GNPP could be eluted from D101-type resin and the purity of polyphenols was 81.38% through condensation at reduced pressure.

**Key words:** gorgon nut polyphenols (GNPP); adsorption characteristics; isolation; purification

中图分类号: O625.31

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)20-0260-05

芡实是睡莲科(Nymphaeaceae)芡属植物(*Euryale Salisb. ex DC.*)芡(*Euryale ferox Salisb.*)的成熟种仁, 又称鸡头米<sup>[1-2]</sup>。芡为一年生水生草本植物, 其种子呈圆球形, 外被一层约 1mm 厚的硬壳, 内部为淀粉质种仁, 即芡实。芡实是我国传统的中药原料, 具有多种生理保健功能, 被视为延年益寿的上品。

芡实在印度也有大面积的种植, 当地一种芡实加工食品“Makhana”, 深受当地居民的喜爱。有关“Makhana”的营养组分及其加工过程中主要理化功能性质的变化等, Dutta 等<sup>[3]</sup>、Jha 等<sup>[4-5]</sup>分别进行过研究。在我国, 芡实一直是一种较贵重的中药材, 有关芡实食品加工方面的研究较少, 有关其功能保健作用及其保健机理一直倍受关注。

《神农本草经》中认为其具有“补中除暑疾, 益精气, 强志令耳目聪明”等作用<sup>[6]</sup>。《本草纲目》中

也有“芡能止渴益肾, 治小便不禁、遗精、白浊、带下”的记载<sup>[7]</sup>。关于其药理, 据《本草求真》中记载:“芡实如何补脾, 以其味甘之故; 芡实如何固肾, 以其味涩之故。惟其味甘补脾, 故能利湿, 而泄泻腹痛可治; 惟其味涩固肾, 故能闭气, 而使遗带、小便不禁皆愈。”古医学认为, 芡实的保健功能主要缘于其“味涩”。

虽然芡实的生理保健功能已经在长期的中医实践中得到证实, 但其中功能组分一直没有定论, 许多相关研究也由此展开。刘玉鹏等<sup>[8]</sup>研究发现, 包括芡实在内的 30 种中药, 厚朴、射干、甘草、芡实等四种中草药的乙醇-三氯甲烷(2:1, V/V)提取液显示出较高的抗氧化性。李美红等<sup>[9]</sup>对芡实 95% 甲醇提取物进行分步萃取和柱层析纯化, 共得到多肽、两种二氢黄酮、一种木脂素苷和  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\delta$ -生育酚等 9 种物质, 但含量其

收稿日期: 2009-07-16

基金项目: 安徽省应用化学省级重点学科建设项目(200802187C); 滁州学院自然科学研究项目(B2009kj017)

作者简介: 张余(1970—), 女, 讲师, 博士, 研究方向为食品化学与营养学及植物蛋白。

E-mail: zhangchuan2005@126.com

微。Das 等<sup>[10]</sup>研究发现, 芡实的水和乙醇提取物具有较强的抗氧化功能和清除 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2\cdot^-$ 的能力, 0.01%的提取物浓度即可清除几乎100%的 $\cdot\text{OH}$ 和93%的 $\text{O}_2\cdot^-$ 。动物实验结果也表明, 芡实提取物可以明显地减少老鼠心脏血管中栓塞的尺寸, 从而改善心肌局部性贫血受损的症状。

上述研究表明, 芡实中的功能保健成分不止一种或一类, 此外, 芡实保健功能与其提取物的抗氧化性密切相关。结合我国古医学文献中提及的芡实“味涩”, 邓宇等<sup>[11]</sup>的研究证实芡实植株中富含多酚类物质。因此, 推测芡实中的多酚类物质, 可能在芡实保健功能中起重要作用。

目前, 实验对芡实多酚的分子结构及其理化特性了解很少。芡实多酚物质的分离纯化是研究分析其功能特性的前提, 柱层析分离是纯化植物多酚的常用方法之一。为此, 实验就D101树脂对多组分溶液体系中芡实多酚的吸附和解吸附特性及其在芡实多酚纯化方面的应用进行研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

成熟干芡实, 购于安徽滁州市农贸市场。

芡实经粉碎, 过60目筛, 装入聚乙烯白封袋内备用。

D101大孔吸附树脂 国药集团化学试剂有限公司; FC试剂按照参考文献[6]方法配制; 所用试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

FW80多功能粉碎机 天津泰斯特公司; FA2004电子天平 上海精科天平仪器厂; HH-4恒温电热水浴锅 金坛市杰瑞尔电器有限公司; WJF722E型分光光度计 上海光谱仪器有限公司; 玻璃层析柱(1.6cm×20cm) 上海沪西分析仪器厂。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 组分测定<sup>[12]</sup>

水分和挥发性物质(GB/T 5009.3—2003); 粗蛋白质含量(GB/T 5009.5—2003); 粗脂肪(GB/T 5009.6—2003); 淀粉含量(GB/T 5009.9—2003); 灰分(GB/T 5009.4—2003); 粗纤维(GB/T 5009.10—2003)。

#### 1.3.2 芡实多酚提取与测定<sup>[13-14]</sup>

总酚提取: 准确称取一定量的芡实粉, 用50%丙酮溶液于室温下浸提1h, 期间不断搅拌。提取结束后, 过滤, 收集滤液。滤渣重复浸提两次, 合并3次滤液于100ml容量瓶内, 定容, 得样品多酚提取液。

多酚提取液减压浓缩后, 冷冻干燥, 即得芡实多酚样品, 其中主要组分含量见表1。

样品总酚含量测定: 采用Folin-Ciocalteus(FC)试剂

法, 以焦性没食子酸为标准物进行测定。

准确吸取多酚溶液0.5ml, 用蒸馏水稀释至5ml, 加入1ml FC试剂和2ml 20%碳酸钠溶液混合, 于沸水浴中加热1min, 冷却后用蒸馏水定容至10ml, 于680nm波长处比色。依据所得标准曲线方程计算样品中总酚含量。

### 1.3.3 吸附实验

#### 1.3.3.1 静态吸附<sup>[15]</sup>

分别称取1g(准确至0.0001g)的D101树脂, 放入4只干净的250ml锥形瓶中, 于4只锥形瓶内同时加入不同初始浓度的芡实多酚溶液各100ml, 在室温条件下, 磁力搅拌吸附。每隔10min测定溶液中剩余总酚的浓度, 计算被吸附剂吸附的芡实多酚的量。

以吸附时间为横轴, 以吸附剂中芡实多酚含量为纵轴, 绘制吸附剂芡实多酚静态吸附曲线。

#### 1.3.3.2 平衡吸附量<sup>[16]</sup>

称取1g吸附剂分别加入到100ml不同初始浓度的芡实多酚样品水溶液中, 于室温下搅拌吸附2h, 抽滤, 测定滤液中剩余多酚浓度, 根据吸附前后溶液中芡实多酚的浓度变化计算吸附剂对芡实多酚的平衡吸附量。

#### 1.3.3.3 柱吸附<sup>[15,17]</sup>

于玻璃层析柱内加入一定量D101树脂(加至1/2体积处), 于柱顶端以5ml/min的速度连续滴加已知浓度的芡实多酚溶液, 同时于柱末端收集流出液, 每10ml收集1次, 分析其中芡实多酚的质量浓度(mg/ml)。

以流出液体积为横轴, 以流出液中芡实多酚质量浓度为纵轴, 绘制各种吸附剂对芡实多酚的动态吸附曲线。

#### 1.3.3.4 芡实多酚的解吸附<sup>[16]</sup>

将一定量吸附了芡实多酚的D101树脂装入层析柱内, 用200ml 50%丙酮溶液为洗脱剂, 以5ml/min的速度对吸附的芡实多酚进行洗脱, 每10ml收集一次洗脱液, 测定其中总酚含量, 绘制解吸附曲线, 并计算解吸率。

$$\text{解吸率}(\%) = \frac{\text{洗脱液中总酚含量}}{\text{被吸附剂吸附的总酚含量}} \times 100$$

D101树脂对溶液中蛋白质、糖类物质的吸附率计算方法与此类似。

### 1.3.4 数据分析

采用Excel软件和DPSv7.55数据处理软件对试验数据进行分析整理, 所有样品重复测定3次, 以平均值表示最终结果。

## 2 结果与分析

表1 芡实原料和芡实多酚样品的组分分析(%，干基)

Table 1 Proximate compositions of gorgon nut powder and crude GNPP sample (%，dry basis)

项目	芡实粉	芡实多酚样品
水分和挥发性物质	14.68	13.80
粗蛋白质	11.39	24.26
可溶性糖	0.68	51.75
灰分	0.64	—
粗脂肪	0.43	—
淀粉	84.70	—
粗纤维	0.94	—
总酚类	0.093	23.12

原料组分分析结果见表1。芡实粉中总酚干基含量为0.093%，即0.93mg/g，而一般葡萄果实中的总酚含量约1.10mg/g<sup>[6]</sup>，所以芡实中的多酚含量在食品中比较丰富。以芡实粉为材料，采用50%丙酮溶液提取所得芡实多酚样品呈棕红色粉末，其中总酚含量23.12%，浓缩了200多倍。但是，除酚类物质外，其中还含有约24.26%的粗蛋白质和51.75%的可溶性糖，因此，必须对该样品做进一步的纯化。

由于芡实多酚样品中多酚物质可与蛋白质结合，因此不能通过一般的沉淀方法除去蛋白质。考虑到一些吸附剂对酚类物质的选择性吸附，可以采用吸附法将样品中的多酚物质与蛋白质和可溶性糖类杂质分离，从而得到纯度较高的多酚样品。

## 2.1 D101树脂对芡实多酚的静态吸附

吸附动力学曲线显示，D101树脂对芡实多酚的吸附很快，约10min后，吸附基本达到平衡状态。此外，溶液中芡实多酚的初始浓度对平衡吸附量及吸附速率影响较大，随初始浓度的增加，吸附量迅速增加，且吸附速度也有所增加(图1)。

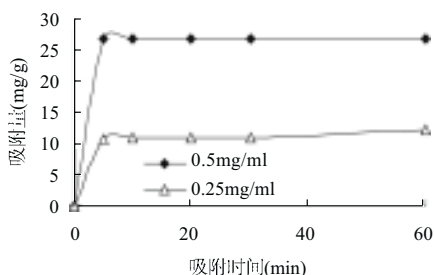


图1 D101树脂对芡实多酚的静态吸附动力学曲线  
Fig.1 Dynamic absorption curve of D101-type resin to GNPP

D101树脂对芡实多酚在室温条件下的吸附等温线如图2所示。用Langmuir方程对试验数据进行分析拟合，结果显示，D101树脂对芡实多酚的吸附过程符合Langmuir方程(图2b)。Langmuir等温吸附方程如下<sup>[15]</sup>：

$$C_e/Q_e = C_e/Q_{\max} + 1/(a Q_{\max})$$

式中： $C_e$ 为吸附平衡时溶液中多酚的质量浓度(mg/ml)； $Q_e$ 为吸附剂的平衡吸附量(mg/g)； $Q_{\max}$ 为吸附剂的最大吸附量(mg/g)； $a$ 为Langmuir常数。

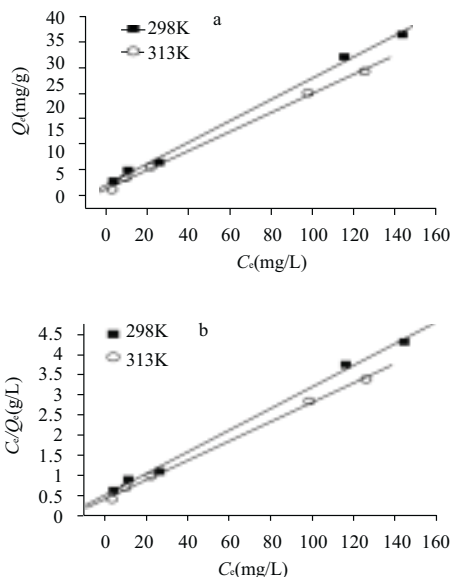


图2 不同温度下的吸附平衡曲线(a)和Langmuir拟合吸附等温线(b)  
Fig.2 Adsorption equilibrium curve and Langmuir fitting adsorption isotherms of D101-type resin to GNPP at different temperatures

表2 不同温度条件下的Langmuir参数

Table 2 Langmuir isotherm parameters at different temperatures

温度(K)	$Q_{\max}$ (mg/g)	$a$	$R^2$	实验值 $Q$ (mg/g)
298	37.175	0.049	0.9964	33.21
313	41.65	0.054	0.9976	35.49

以 $C_e/Q_e$ 对 $C_e$ 作图，即得到Langmuir拟合吸附等温线(图2b)，所得Langmuir参数见表2。结果显示，吸附温度对D101树脂吸附芡实多酚的过程有较显著的影响，适当加热有利于D101树脂对芡实多酚的吸附。

## 2.2 D101树脂对样品中其他组分的吸附

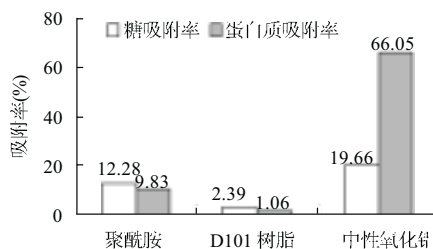


图3 3种吸附剂对多酚样品中杂质组分的吸附  
Fig.3 Comparison of adsorption capability of three adsorbents to impurities in crude GNPP sample

芡实多酚样品中含有较多的蛋白质和可溶性糖类杂质(表1)。在芡实多酚纯化过程中,比较理想的吸附剂应该对芡实多酚的吸附具有一定选择性,即在吸附芡实多酚的同时,不吸附或很少吸附溶液中的其他杂质分子。因此,选择中性氧化铝、聚酰胺和D101树脂等3种常见吸附剂,对其吸附前后溶液中蛋白质和糖类含量进行了分析,结果如图3所示。

由图3可知,中性氧化铝在吸附芡实多酚的同时,吸附了溶液中66.05%的蛋白质和19.66%的可溶性糖。聚酰胺对这两种杂质的吸附率分别为9.83%和12.28%,D101树脂对这两种杂质的吸附率最低,分别为1.06%和2.39%,对溶液中的芡实多酚显示出较高的选择性吸附。因此,D101树脂是分离纯化芡实多酚的理想吸附剂。

### 2.3 D101树脂对芡实多酚的柱吸附特性

图4是初始浓度为0.5mg/ml的芡实多酚溶液,在不同流速(2ml/min, 5ml/min)下经过D101树脂柱时的穿透曲线。

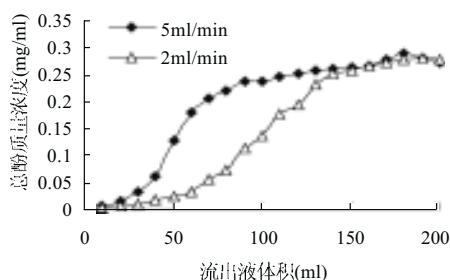


图4 D101树脂对芡实多酚柱吸附穿透曲线

Fig.4 Penetration curves of D101-type resin adsorption to GNPP

由图4可知,多酚溶液的流速对柱吸附的穿透点影响很大。多酚溶液流速为2ml/min时的穿透点为50ml,流速为5ml/min时仅有20ml。在相同条件下,曲线穿透点越高说明D101树脂对芡实多酚的吸附量越高,因此,要增加吸附剂对芡实多酚的柱吸附量,必须适当降低芡实多酚溶液的流速<sup>[14]</sup>。

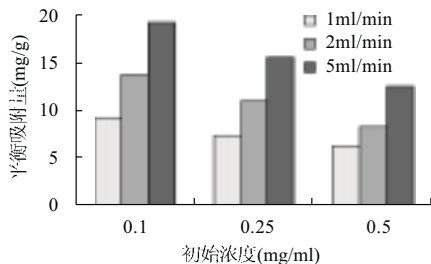


图5 芡实多酚柱吸附平衡吸附量

Fig.5 Equilibrium adsorption capacity of D101-type resin column to GNPP

由图5可知,D101树脂对芡实多酚的柱吸附量除了受溶液流速的影响外,还受溶液中总酚初始浓度的影响。在相同初始浓度下,随柱吸附时溶液流速的降低,D101树脂对芡实多酚的平衡吸附量显著增加( $P < 0.01$ )。此外,在相同的流速下,随多酚溶液中总酚初始浓度的增加,D101树脂对芡实多酚的平衡吸附量显著降低( $P < 0.05$ )。

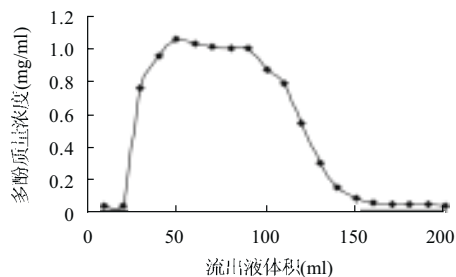


图6 芡实多酚的解吸曲线

Fig.6 Desorption curve of GNPP from D101-type resin column

### 2.4 芡实多酚的纯化

将已经饱和吸附了芡实多酚的D101树脂装入层析柱中,用pH5 50%丙酮溶液对其进行解吸附,解吸曲线如图6所示。结果表明,pH5 50%丙酮溶液是芡实多酚较理想的洗脱溶剂,经200ml溶剂的洗脱,可将其其中约91.84%的芡实多酚洗脱下来。收集洗脱液,减压浓缩、真空干燥后,得纯化芡实多酚样品,其中总酚含量达81.38%。

## 3 结论

D101树脂对溶液体系中的芡实多酚具有较高的吸附量,其平衡吸附量为33.21mg/g。在溶液中蛋白质、可溶性糖等杂质组分共存的情况下,D101树脂对芡实多酚具有较高的选择性吸附,是分离纯化芡实多酚较理想的吸附剂。总酚含量23.12%的多酚样品溶液经D101树脂吸附后,用200ml、pH5 50%丙酮溶液洗脱,即可将其其中91.84%的芡实多酚洗脱下来。洗脱液经减压浓缩、干燥后,得纯化芡实多酚样品,其中总酚含量达81.38%。

### 参考文献:

- [1] 傅立国,陈潭清,郎楷永,等.中国高等植物:第三卷[M].青岛:青岛出版社,2000.
- [2] 王宗训.中国资源植物利用手册[M].北京:中国科学技术出版社,1989.
- [3] DUTTA R N, JHA S N, JHA U N. Plant contents and quality of makhana (*Euryale ferox*)[J]. Plant and Soil, 1986, 96: 429-432.
- [4] JHA S N, PRASAD S. Determination of processing conditions for

- gorgon nut (*Euryale ferox*)[J]. J Agric Eng Res, 1996, 63: 103-112.
- [5] JHA S N. Physical and hygroscopic properties of makhana[J]. J Agric Eng Res, 1999, 72: 145-150.
- [6] 顾觀光. 神農本草經[M]. 蘭州: 蘭州大學出版社, 2004.
- [7] 李時珍. 本草綱目[M]. 3 版. 重慶: 重慶出版社, 2006.
- [8] 劉玉鵬, 劉梅, 劉俊英, 等. 30 種中草藥的抗氧化活性研究[J]. 煙台大學學報: 自然科學與工程版, 2000, 13(1): 70-73.
- [9] 李美紅, 楊雪瑛, 方直劍, 等. 芡實的化學成分[J]. 中國天然藥物, 2007, 5(1): 24-26.
- [10] DAS S, DER P, RAYCHAUDHURI U, et al. The effect of *Euryale ferox* (makhana), an herb of aquatic origin, on myocardial ischemic reperfusion injury[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2006, 289: 55-63.
- [11] 鄧宇. 表面活性劑在芡實粉膠提取中作用的初步研究[J]. 化學工業與工程技術, 2002, 23(2): 1-3.
- [12] 王竹天. 食品衛生檢驗方法(理化部分)注解. 上[M]. 北京: 中國標準出版社, 2008.
- [13] 李靜, 裴繼雲, 王孝娣, 等. Folin-Ciocalteus 法測定葡萄和葡萄酒中的總多酚[J]. 中國南方果樹, 2007, 36(6): 86-87.
- [14] MUCUWETI M, ZENDA G, AAHWELL R, et al. Sugars, organic acid and phenolic compounds of *Ziziphus mauritiana* fruit[J]. Europe Food Research Technology, 2005, 221: 570-574.
- [15] LIAO X P, LI L, SHI B. Adsorption recovery of thorium (IV) by *Myrica rubra* tannin and larch tannin immobilized onto collagen fibres[J]. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 2004, 260(3): 619-625.
- [16] 張力平, 孫長霞. 植物單寧改性樹脂吸附机理的研究[J]. 北京林業大學學報, 2006, 28(4): 6-11.
- [17] 宋應華, 朱家文, 陳葵. 大孔吸附樹脂 HZ816 對紅霉素的固定床吸附過程研究[J]. 化學工程, 2007, 35(11): 9-12.