

# 油梨皮黄酮提取及大孔树脂纯化

周存山<sup>1,2</sup>, 余筱洁<sup>1</sup>, 杨虎清<sup>1</sup>, 王允祥<sup>1\*</sup>

(1. 浙江林学院农业与食品科学学院, 临安 311300; 2. 浙江工业大学生物工程研究所, 杭州 310014)

**摘要:** 该文研究了油梨皮黄酮的提取及大孔树脂纯化条件。结果表明: 油梨皮黄酮的最佳提取条件为乙醇浓度 70%、提取温度 70℃、提取时间 1.5 h、料液比 (m/V) 1:20。乙醇浓度和提取温度对提取得率有显著性 ( $P<0.05$ ) 影响。在此条件下, 黄酮的提取得率为 1.12%; AB-8 型树脂对油梨皮黄酮有较好的吸附和洗脱效果, 其纯化油梨皮黄酮的条件为柱体积 250 mL, 上样量 2.03 g, 水洗, 接着用 75% 的乙醇洗脱 (约 500 mL), 在此条件下 AB-8 型树脂可重复使用 6 次。经纯化后油梨皮黄酮相对纯度为 82.37%, 纯化后总黄酮回收率为 71.65%。

**关键词:** 油梨皮; 黄酮; 大孔树脂; 提取; 纯化

**中图分类号:** TS201.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1002-6819(2008)-8-0271-04

周存山, 余筱洁, 杨虎清, 等. 油梨皮黄酮提取及大孔树脂纯化[J]. 农业工程学报, 2008, 24(8): 271—274.

Zhou Cunshan, Yu Xiaojie, Yang Huqing, et al. Extraction of flavonoids from avocado peel and purification with macroporous resin[J]. Transactions of the CSAE, 2008, 24(8): 271—274. (in Chinese with English abstract)

## 0 引言

油梨 (*Persea americana* Mill) 属樟科 (Lauraceae) 油梨属 (*Persea*), 又名鳄梨、樟梨、酪梨或牛油果, 是一种速生常绿乔木的果实<sup>[1]</sup>。中国从 20 世纪 20 年代起开始引种栽培油梨, 目前南部省区都有栽培和分布, 品种包括哈斯、路拉、波洛克、博恩等。全世界油梨的种植面积约 20 万  $\text{hm}^2$ , 产量约 170 多万 t。油梨果肉柔软、细腻, 具有类似核桃的清香味, 富含脂肪酸, 含量高达 30%, 且不含胆固醇, 因而有“森林黄油”之美誉<sup>[2]</sup>。

目前对油梨的研究, 主要集中在油梨的栽培、保藏和油梨油的提取及利用等方面<sup>[3-7]</sup>, 油梨油加工工业化程度较高, 加工也较集中 (主要有: 英国 Kobashi 公司, Union Palm Oil Co. Ltd 等), 且市场上已有油梨油产品。生产油梨油的残渣为油梨皮和核, 为了充分利用残渣同时减少对环境的污染, 已开展了油梨皮黄酮抗氧化的研究<sup>[8]</sup>, 但尚未发现有从油梨皮中提取及纯化黄酮的工艺研究, 而分离纯化生产天然产物的重要环节, 且大孔树脂纯化黄酮法非常有效、适合产业化、具有绿色加工的潜力, 为此, 本文研究了油梨皮黄酮提取及纯化工艺, 为油梨皮黄酮产业化和油梨的综合利用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料及主要仪器

油梨: 哈斯油梨 (*Persea americana* Mill cv 'hass'),

产地海南儋州; 大孔树脂 NKA、NKA-9、AB-8、D101 和 H103 (南开大学化工厂); 芦丁对照品 (中国药品生物制品鉴定所); NaOH、HCl、NaNO<sub>2</sub>、Al (NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>、NaCl、FeCl<sub>3</sub> 均为分析纯; 721 型紫外—可见分光光度计 (上海第三仪器厂); 柱层析系统 (上海沪西分析仪器厂)。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 油梨皮黄酮的提取试验

称取一定量的油梨皮 (剪碎, 约 0.5 cm×0.5 cm) 于烧杯中, 加入一定量的乙醇, 在一定温度下浸提, 改变提取条件, 研究提取时间、提取温度、料液比及乙醇浓度对黄酮提取得率的影响, 并确定各因素的最佳值。根据上述因素, 设计 4 因素 4 水平的正交设计方案 (见表 1), 提取液经过滤, 定容后, 进行总黄酮含量测定, 并根据式 (1) 计算提取得率  $Y$ 。

$$Y = \frac{W_E}{W_0} \times 100 \quad (1)$$

式中  $Y$ ——油梨皮黄酮的提取得率, %;  $W_E$ ——提取出的油梨皮黄酮质量, g;  $W_0$ ——提取原料油梨皮的质量, g。

#### 1.2.2 油梨皮黄酮的纯化试验

##### 1) 树脂的处理

将 NKA、NKA-9、AB-8、D101 和 H103 树脂于酒精 (95%, V/V) 中浸泡 24 h, 使其充分溶胀, 然后用乙醇清洗至洗出液无白色浑浊后, 再用蒸馏水洗去乙醇; 接着大孔树脂依次用 2 倍体积 5% 的 NaOH 水溶液, 1 倍体积蒸馏水, 2 倍体积 10% 的盐酸洗涤, 最后用蒸馏水洗至中性。以乙醇湿法装柱, 用 93% 乙醇在柱上流动淋洗, 并不时检查流出的乙醇液, 至乙醇液与水以 1:5 体积比混合无白色浑浊为止, 然后用大量蒸馏水洗去乙醇<sup>[9]</sup>。

##### 2) 树脂类型的筛选

将浓度为 1% 的油梨黄酮水溶液通过上述 5 种型号的树脂 (2.6 cm×60 cm, 树脂约 250 mL), 进行动态吸附。

收稿日期: 2007-08-23 修订日期: 2008-07-04

基金项目: 浙江省科技厅资助项目 (2007F70044, 2008C32028); 浙江林学院人才启动基金 (2351000762)

作者简介: 周存山 (1979—), 男, 江苏兴化人, 博士, 主要从事食品分离技术及食品生物技术研究。临安 浙江林学院农业与食品科学学院, 311300。Email: cunshanzhou@163.com

\*通讯作者: 王允祥 (1962—), 男, 博士, 教授, 主要从事食品生物技术研究。临安 浙江林学院农业与食品科学学院, 311300。

Email: wyx@zjfc.edu.cn

用 1%FeCl<sub>3</sub> 检测流出液, 并考察上样(检测显色时停止上样)<sup>[10]</sup>。上样后, 先用水洗脱至 FeCl<sub>3</sub> 检测呈阴性后, 再用 90%乙醇洗脱至 FeCl<sub>3</sub> 检测呈阴性。总黄酮吸附量及黄酮回收率分别按式(2)和式(3)计算:

$$Ab = C_0V_1 - C_1V_2 \quad (2)$$

$$R_1 = \frac{C_2V_3}{Ab} \times 100 \quad (3)$$

式中  $Ab$ ——总黄酮吸附量, mg;  $C_0$ ——上样溶液总黄酮含量, mg/mL;  $V_1$ ——上样溶液体积;  $C_1$ ——水洗脱液中总黄酮含量, mg/mL;  $V_2$ ——水洗脱体积, mL;  $R_1$ ——黄酮回收率, %;  $C_2$ ——90%乙醇洗脱液中总黄酮含量, mg/mL;  $V_3$ ——90%乙醇洗脱体积, mL。

### 3) 上样量的确定

以 AB-8 树脂柱为吸附柱, 分别称取 0.53、1.04、2.03、4.02、6.05 g 油梨皮黄酮(真空干燥, 45℃, 0.095 MPa), 溶于 25 mL 水中, 以流量 2 mL/mL 上样, 静置 0.5 h, 用水洗至洗脱液 FeCl<sub>3</sub> 检测呈阴性, 接着用 90%的酒精洗脱至 FeCl<sub>3</sub> 检测呈阴性, 收集洗脱液, 计算总黄酮吸附量(式(2))和总黄酮回收率(式(4))。

$$R_2 = \frac{C_2V_3}{M} \times 100 \quad (4)$$

式中  $R_2$ ——总黄酮回收率, %;  $C_2$ ——90%乙醇洗脱液中总黄酮含量, mg/mL;  $V_3$ ——90%乙醇洗脱液体积, mL;  $M$ ——上样量, mg。

### 4) 洗脱条件的确定

在确定的适宜上柱条件下上样, 用水洗至洗脱液 FeCl<sub>3</sub> 检测呈阴性, 然后分别用 30%、50%、70%、90%的乙醇进行洗脱, 将洗脱液分别真空干燥(45℃, 0.095 MPa)后, 称重, 计算其相对纯度(式(5))和总黄酮回收率(式(4))。

$$P = \frac{M_1}{M_0} \times 100 \quad (5)$$

式中  $P$ ——油梨皮黄酮的相对纯度, %;  $M_1$ ——测定总黄酮量, g;  $M_0$ ——干燥后黄酮质量, g。

### 5) 树脂重复使用次数的研究

按上述确定的上样、吸附和洗脱条件, 进行重复试验 15 次, 分别计算总黄酮的吸附量。

#### 1.2.3 测定方法

总黄酮含量的测定, 采用 NaNO<sub>3</sub>-Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-NaOH 比色法<sup>[11]</sup>, 芦丁作为标准品。标准曲线方程:

$$A_{510} = 21.445C - 0.0148 \quad (6)$$

式中  $A_{510}$ ——测定 510 nm 处吸光度;  $C$ ——总黄酮质量浓度, mg/mL。

## 2 结果与分析

### 2.1 油梨皮黄酮的提取

试验结果见表 1, 从表中可以看出, 各因素的影响大小顺序为 B>A>C>D。对各因素进行方差分析, 见表 2, 乙醇浓度和提取温度对提取率影响显著( $P<0.05$ ), 提取时间和料液比影响均不显著。这可能是误差自由度过小,

导致分析的灵敏度不高; 用空列来估计误差, 它包括了一些相互效应, 进而使误差平方和较大, 导致因素效应达不到显著水平, 从表 1 中的极差结果可知, 空列的影响较这 4 个因素小。所以进一步研究可考虑重复试验, 增加分析的灵敏度。乙醇浓度和提取温度对提取率有显著影响, 类似于文献[12, 13], 一方面, 乙醇是极性溶剂, 另一方面, 提取温度对溶质溶解性有影响, 且这两个因素的影响是双重的。试验中各因素和水平对提取率  $Y$  的影响见表 1, 可验证这个影响是悬钟型, 也即存在最佳点, 同时由表 1 亦可知, 油梨皮黄酮的最佳提取工艺为 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>D<sub>2</sub>, 即乙醇浓度 70%, 提取温度 70℃, 提取时间 1.5 h, 料液比(m/V) 1:20。

采用最佳提取工艺 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>D<sub>2</sub> 进行重复试验, 获得油梨皮黄酮的提取率为 1.12%, 较正交试验中最高提取率 0.79%有所提高, 即达到较好的优化效果。

表 1 L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>) 正交试验设计及结果

Table 1 Design and results of the L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>) orthogonal experiment

处理	A (乙醇浓度 /%)	B (提取温度 /℃)	C (提取时间 /h)	D (料液比 (m/V) /g·mL <sup>-1</sup> )	E 空列	提取 得率 Y/%
1	1(50)	1(60)	1(0.5)	1(1:10)	1	0.42
2	1	2(70)	2(1.0)	2(1:20)	2	0.67
3	1	3(80)	3(1.5)	3(1:30)	3	0.66
4	1	4(90)	4(2.0)	4(1:40)	4	0.53
5	2(60)	1	2	3	4	0.59
6	2	2	1	4	3	0.74
7	2	3	4	1	2	0.70
8	2	4	3	2	1	0.67
9	3(70)	1	3	4	2	0.71
10	3	2	4	3	1	0.79
11	3	3	1	2	4	0.73
12	3	4	2	1	3	0.62
13	4(80)	1	4	2	3	0.61
14	4	2	3	1	4	0.69
15	4	3	2	4	1	0.54
16	4	4	1	3	2	0.45
k <sub>1</sub>	0.570	0.583	0.585	0.607	0.605	
k <sub>2</sub>	0.675	0.723	0.605	0.670	0.633	
k <sub>3</sub>	0.713	0.657	0.682	0.623	0.657	
k <sub>4</sub>	0.573	0.568	0.657	0.630	0.635	
R	0.143	0.155	0.097	0.063	0.052	

因素主次 B>A>C>D

最优组合 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>D<sub>2</sub>

表 2 试验结果方差分析

Table 2 Variance analysis of the experimental results

变异来源	偏差平方和	自由度	F	显著性
A	0.063	3	10.500	*
B	0.062	3	10.333	*
C	0.025	3	4.167	
D	0.009	3	1.500	
E	0.006	3	1.000	
误差	0.01	3		
总变异	0.195	18		

注: \*表示  $F \geq F_{0.05}$ ;  $F_{0.05}=9.280$ 。

2.2 油梨皮黄酮的纯化

2.2.1 树脂类型筛选

由于树脂极性、孔径、比表面积、孔容等不同,吸附和解析性质也会不同。5 种大孔树脂中,NKA 和 NKA-9 为极性,AB-8 为弱极性,D101 和 H103 为非极性。由表 3 可知,AB-8 树脂效果较好,总黄酮吸附量达到最高,且综合处理能力也最高,可能是因为油梨皮黄酮是一种弱极性物质,在弱极性柱上更容易吸附,同时其比表面积较大,相对容易洗脱,故确定纯化油梨皮黄酮的最佳树脂为 AB-8。

表 3 5 种大孔树脂对油梨皮黄酮的吸附和洗脱性能比较

Table 3 Adsorption and elution capability of five types of macroporous resin on flavonoids from avocado peel

树脂型号	总黄酮吸附量 Ab/g	黄酮回收率 R <sub>1</sub> /%	综合处理能力 (Ab×R <sub>1</sub> )/g
D101	0.84	33.26	0.28
H103	1.05	37.59	0.39
AB-8	1.39	74.21	1.03
NKA	0.91	71.34	0.65
NKA-9	0.98	75.45	0.74

注：表 3 中总黄酮吸附量是以 250 mL 湿树脂的吸附量计，下表同。

2.2.2 上样量确定

由表 4 可知,随着上样量的增大,树脂对总黄酮的吸附量也逐渐增大,但是上样量增大到一定程度后,总黄酮吸附量却变化很小,说明树脂达到了饱和吸附程度,综合考虑总黄酮的回收率,即树脂的利用效率,确定适宜的上样量为 2.03 g。

表 4 上样量对 AB-8 大孔树脂纯化油梨皮黄酮的影响

Table 4 Effect of sample loading on the purification of flavonoids from avocado peel by using AB-8 type resin

上样量/g	总黄酮吸附量 Ab/g	总黄酮回收率 R <sub>2</sub> /%
0.53	0.37	51.66
1.04	0.71	50.52
2.03	1.34	48.85
4.02	1.43	26.32
6.05	1.41	17.25

2.2.3 洗脱条件确定

由表 5 可知,乙醇浓度为 70% 和 75% 时,洗脱产物中黄酮相对含量较高分别为 83.27% 和 82.37%,但考虑总黄酮回收率,乙醇浓度越大回收率越高,说明洗脱地越彻底,乙醇浓度为 90% 时,回收率为 74.22%,但洗脱物中总黄酮含量仅为 69.16%。综合考虑,确定 75% 乙醇洗脱较适宜。

2.2.4 树脂重复使用次数的研究

从图 1 可知,AB-8 树脂重复使用 6 次后,对总黄酮吸附量明显下降,且 10~15 次之间趋于稳定的低吸收水平,需要再生后才能继续使用,故 AB-8 树脂的重复使用次数应控制在 6 次以内。

表 5 乙醇浓度对 AB-8 大孔树脂纯化油梨皮黄酮的影响

Table 5 Effect of ethanol concentration on the purification of flavonoids from avocado peel by using AB-8 type resin

乙醇浓度/%	相对纯度/%	总黄酮回收率 R <sub>2</sub> /%
30	70.39	42.27
50	78.12	56.49
70	83.27	64.31
75	82.37	71.65
80	71.42	72.18
90	69.16	74.22

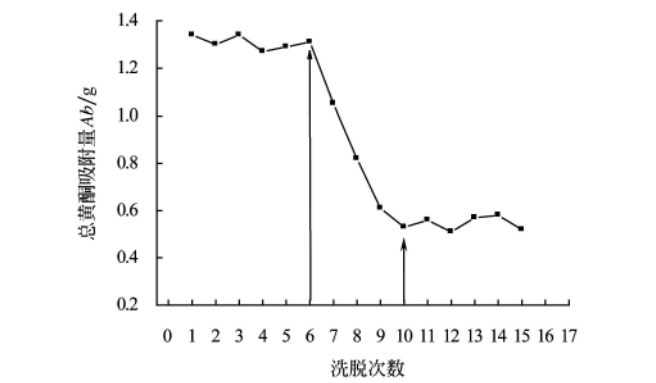


图 1 AB-8 使用次数对总黄酮吸附率的影响  
Fig.1 Effect of repeat use times of AB-8 type resin on adsorption capability of flavonoids from avocado peel

3 结 论

- 1) 油梨皮黄酮的最佳提取条件为:乙醇浓度 70%, 提取温度 70℃, 提取时间 1.5 h, 料液比 (m/V) 1 : 20, 乙醇浓度和提取温度对提取得率有显著性 ( $P<0.05$ ) 影响,在此条件下,提取得率为 1.12%。
- 2) AB-8 型树脂对油梨皮黄酮有较好的吸附和洗脱效果,用其纯化油梨皮黄酮是可行的。
- 3) AB-8 型树脂纯化油梨皮黄酮的条件为:柱体积 250 mL,上样量 2.03 g,树脂先用水洗,再用 75% 的乙醇洗脱 (约 500 mL),在此条件下该树脂可重复使用 6 次。经纯化后油梨皮黄酮相对纯度为 82.37%,纯化后总黄酮回收率 71.65%。

[参 考 文 献]

[1] 蔡胜忠,李绍鹏,张少若,等. 油梨种质的主要性状研究[J]. 热带作物研究, 1998, 12(2): 22—28.

[2] 邓 燊,章 芸. 热带地区的水果新宠—油梨[A]. 热带作物产业带建设规划研讨会—热带果树产业发展论文集[C]. 2006: 162—164.

[3] 钟秋平,夏文水. 1-MCP 结合壳聚糖涂膜延迟油梨果实后熟[J]. 中国食品学报, 2006, 6(3): 95—99.

[4] 刘四新,李从发,明飞平,等. 油梨深加工的研究[J]. 中国食品学报, 2004, 4(4): 51—54.

[5] Farines M, Soulier J, Rancure L A, et al. Influence of avocado oil processing on the nature of some unsaponifiable constituents[J]. J Am Oil Chem Soc, 1995, 72(4): 473—476.

[6] Byrne F J, Toscano N C, Urena A A, et al. Toxicity of systemic neonicotinoid insecticides to avocado thrips in

- nursery avocado trees[J]. *Pest Manag Sci*, 2007, 63(9): 860—866.
- [7] Ashton O B, Wong M, McGhie T K, et al. Pigments in avocado tissue and oil[J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(26): 10151—10158.
- [8] Naolo T, Miki S, Masatsune M. Antioxidative activity of avocado epicarp water extract[J]. *Food Sci Technol Res*, 2006, 12(1): 55—58.
- [9] 周存山, 马海乐, 余筱洁, 等. 麦胚蛋白降压肽的大孔树脂脱盐研究[J]. *食品科学*, 2006, 27(3): 142—146.
- [10] 李春美, 钟朝辉, 窦宏亮, 等. 大孔树脂分离纯化柚皮黄酮的研究[J]. *农业工程学报*, 2006, 22(3): 153—157.
- [11] 马海乐, 王超, 刘伟民. 葛根总黄酮微波辅助萃取技术[J]. *江苏大学学报(自然科学版)*, 2005, 26(2): 98—101.
- [12] 于智峰, 王敏, 张家峰. 大孔树脂精制苦荞总黄酮工艺条件的优化研究[J]. *农业工程学报*, 2007, 23(4): 253—257.
- [13] 苏东林, 单杨, 李高阳, 等. 酶法辅助提取杆桔皮总黄酮的工艺优化研究[J]. *农业工程学报*, 2008, 24(4): 240—245.

## Extraction of flavonoids from avocado peel and purification with macroporous resin

Zhou Cunshan<sup>1,2</sup>, Yu Xiaojie<sup>1</sup>, Yang Huqing<sup>1</sup>, Wang Yunxiang<sup>1\*</sup>

(1. *School of Agriculture and Food Science, Zhejiang Forestry University, Lin'an 311300, China;*

2. *Institute of Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)*

**Abstract:** The optimization of extraction technology with traditional orthogonal design and further purification with macroporous resin of flavonoids from avocado peel were studied. The results show that the optimum extraction conditions are as follows: ethanol concentration is 70%, extraction temperature is 70°C, extraction time is 1.5 h and the ratio of avocado peel to ethanol (m/V) is 1 : 20. The factors of ethanol concentration and extraction temperature have significant effects on the yield of avocado peel flavonoids. Under the optimal conditions, the yield of avocado peel flavonoids is 1.12%. The AB-8 type macroporous resin has better effect on adsorption and elution of flavonoids from avocado peel. The purification conditions are as follows: the co column volume is 250 mL, the sample quantity is 2.03 g, the column is washed with water and eluted with about 500 mL of 75% ethanol. Under these conditions the AB-8 type resin can be used six times repeatedly. Relative purity of the purified is 82.37% and the corresponding recovery is 71.65%.

**Key words:** avocado peel; flavonoids; macroporous resin; extraction; purification