

黑莓天然维生素 E 纯化技术研究

李维林¹, 崔恩惠², 赵慧芳², 方亮², 吴文龙^{2*}

(1. 南京林业大学林学院, 南方现代林业协同创新中心, 南京 210037;

2. 江苏省中国科学院植物研究所, 南京 210014)

摘要: **目的** 建立一种硅胶柱层析纯化黑莓种籽油中天然 VE 的方法。**方法** 采用单因素实验的方法, 以维生素 E 的含量为考察指标, 对洗脱剂种类、洗脱剂配比、硅胶用量、洗脱剂用量进行优化。**结果** 黑莓天然 VE 的最优纯化工艺参数为: 硅胶与维生素 E 粗提物的质量比 3:1; 乙醇:正己烷(8:1, V/V)为洗脱剂, 洗脱剂用量为粗提物的 15 倍。在此条件下, 纯化物中维生素 E 的含量可以达到(51.5±0.530)%。**结论** 采用硅胶柱层析方法可以有效纯化黑莓天然维生素 E。

关键词: 黑莓; 维生素 E; 纯化

Study on purification technology of natural vitamin E in blackberry

LI Wei-Lin¹, CUI En-Hui², ZHAO Hui-Fang², FANG Liang², WU Wen-Long^{2*}

(1. College of Forestry, Nanjing Forestry University, Co-Innovation Center for the Sustainable Forestry in Southern China, Nanjing 210037, China; 2. Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for purifying VE from blackberry seed oil by silica gel column chromatography. **Methods** Single factor experiments were carried out to optimize the purification process of natural VE from blackberry seed oil. The eluent type, ethanol/hexane ratio, silica gel weight and eluent volume were selected by taking VE content as the index. **Results** The optimal purification process parameter of berry natural VE was: Silica gel and the quality of the crude extracted from vitamin E than 3:1; Ethanol:n-hexane (8:1, V/V) as eluent, dosage of eluent for the crude extracted of 15 times. Under these conditions, the content of vitamin E in the purified compound could reach (51.5±0.530)%. **Conclusion** Silica gel column chromatography is a feasible method for the purification of blackberry natural Vitamin E.

KEY WORDS: blackberry, vitamin E, purification

1 引言

天然维生素 E(VE)是一种脂溶性维生素, 其水解产物生育酚具有活性高, 使用安全等特点, 已经广泛应用于医药^[1,2]、食品^[3,4]、饲料^[5]、化妆品、化工等方面。黑莓是薔

薇科悬钩子属(*Rubus L.*)浆果类果树, 其果实中含有极为丰富的天然 VE、花青素、多酚等, 被誉为“生命之果”^[6]。黑莓果实中天然 V_E 的含量极为丰富^[7], 具有良好的开发应用前景。

天然 VE 的提取和纯化技术, 前人已经有很多研

基金项目: 江苏省农业科技自主创新项目(CX(18)2018)、江苏现代农业(特粮特经)产业技术体系项目(SXGC[2018]309)

Fund: Supported by the Jiangsu Independent Innovation Project of Agricultural Science and Technology (CX(18)2018) and Jiangsu Modern Agriculture (Special Grain Special Economy) Industrial Technology System Project (SXGC[2018]309)

*通讯作者: 吴文龙, 研究员, 主要研究方向为黑莓、蓝莓等小果类果树的引种栽培与加工利用。E-mail: 1964wwl@163.com

*Corresponding author: WU Wen-Long, Professor, Institute of Botany, Jiangsu Province and the Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China. E-mail: 1964wwl@163.com

究^[8-10], 其提取方法有尿素包合法、溶剂萃取法、分子蒸馏法、皂化-冷析法、超临界 CO₂ 萃取法等, 纯化方法有溶剂法、分子蒸馏法、硅胶层析法等。目前应用较多的提取方法是分子蒸馏法^[11,12]和超临界 CO₂ 萃取法^[13,14]。硅胶柱层析是最常用的 VE 纯化方法^[15-17], 具有效率高、稳定性好、成本低且操作简单易行等特点, 前期采用溶剂超声提取法得到黑莓种籽油^[18]本研究采用硅胶柱层析法对黑莓 VE 粗提物进行纯化, 通过单因素实验优化工艺参数, 以期今后黑莓天然 VE 工业化生产提供技术基础, 为黑莓的深加工利用提供参考。

2 材料与方法

2.1 材料与仪器

原料: 采用尿素包合法从黑莓种籽油中提取天然 VE, 尿素与种籽油的质量比为 3:1, 50 °C 加热 30 min, 乙醇浓度 95%, 冷析时间 4 h, 冷析温度 0 °C, 所得粗提物 VE 含量 3.21%。无水乙醇、尿素、三氯化铁、磷酸、甲醇(购自国药化学试剂有限公司), 邻菲罗啉(天津欧博凯化工有限公司)。

SHZ-III 型循环水式多用真空泵(上海亚荣生化仪器厂); RE-52AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); TU-1810 紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司); EX-200A 型电子分析天平(浙江慈溪天东衡器厂); 硅胶 100~200 目(青岛海洋化工有限公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 硅胶柱层析纯化 V_E 的方法

湿法装填硅胶柱, 称取 6 g VE 粗提物溶解于 5 mL 正己烷中, 倒入硅胶柱中。先用 15 mL 正己烷冲洗, 再用极性溶剂洗脱。洗脱液经减压浓缩, 去除溶剂, 得到 VE 纯化物。

2.2.2 V_E 含量测定方法

参照崔恩惠等^[19]的方法测定样品中的 V_E 含量, 称取 VE 纯化物 0.1 g, 用正己烷定容到 50 mL, 再吸取 0.5 mL, 加入 2.11 mmol/L 氯化铁乙醇溶液 0.2 mL, 7.32 mmol/L 的 1, 10-菲罗啉乙醇溶液和 42.58 mmol/L 磷酸 0.31 mL, 并定容到 15 mL, 反应 30 s, 测定 509 nm 下的吸光度。根据标准曲线 $Y=0.0522X+0.0128$ ($R^2=0.9987$) 计算 V_E 含量, 其中 Y 为 VE 浓度(μg/mL), X 为 A₅₀₉。

2.2.3 洗脱剂的选择

以 5 个柱体积的(5 BV)乙醇:正己烷溶液(8:1, V:V)、无水乙醇、甲醇为洗脱剂, 硅胶(与样品的质量比为 3:1)为固定相, 以纯化物中 VE 含量为指标, 考察各洗脱剂的分离效果。

2.2.4 洗脱剂的配比

分别以 5 BV 乙醇-正己烷溶液(6:1、7:1、8:1、9:1、10:1)为洗脱剂, 硅胶(与样品的质量比为 3:1)为固定相, 以纯化物中 VE 含量为指标, 考察乙醇与正己烷比例对分离效果的影响。

2.2.5 硅胶用量

以 5 BV 乙醇-正己烷溶液(8:1, V:V)为洗脱剂, 设置硅胶与粗提物质量比 1:1、2:1、3:1、4:1、5:1, 以纯化物中 VE 含量为指标, 考察不同硅胶与粗提物的质量比对分离纯化效果的影响。

2.2.6 洗脱剂的用量

以 5 BV 乙醇-正己烷溶液(8:1, V:V)为洗脱剂, 硅胶(与样品的质量比为 3:1)为固定相, 以 5 mL 为一个体积单位, 共洗脱 10 个体积单位, 通过测定每一个体积单位洗脱液中 VE 的含量来确定洗脱剂的最佳用量。

2.2.7 验证实验

根据单因素实验得到的最优试验方案进行验证实验, 考察纯化物的 VE 含量。

3 结果与分析

3.1 洗脱剂的选择

乙醇-正己烷、无水乙醇、甲醇 3 种洗脱剂的洗脱效果见表 1。由表 1 可见, 以乙醇-正己烷(8:1, V:V)为洗脱剂时, VE 的含量最高, 分离纯化效果最好, 其次是无水乙醇, 甲醇的效果最差。这 3 种洗脱剂的极性大小是乙醇-正己烷<无水乙醇<甲醇, 由此可见, 当洗脱剂极性增大时, 纯化物中 VE 的含量有所下降, 这可能是因为当极性增大时, 除 VE 以外的吸附在硅胶柱上的极性物质也洗脱下来, 导致 VE 相对含量下降。因此选择乙醇-正己烷为最佳洗脱剂。

表 1 不同洗脱剂的洗脱结果
Table 1 The elution results of different eluents

类别	乙醇:正己烷(8:1, V/V)	无水乙醇	甲醇
吸光度	0.466±0.003 ^a	0.460±0.002 ^a	0.453±0.003 ^b
VE 质量/mg	13.000±0.100 ^a	12.900±0.092 ^a	12.600±0.090 ^b
VE 含量/%	52.100±0.490 ^a	51.400±0.402 ^a	50.600±0.408 ^a

注: 文中小写字母表示不同处理间差异显著, $P<0.05$ 。

3.2 乙醇-正己烷配比的选择

设置 5 个乙醇-正己烷的比例对硅胶柱上的维生素 E 进行洗脱, 以 VE 含量为考察指标, 结果见图 1, VE 含量随乙醇与正己烷的体积比增大而增加, 当体积比增加到 8:1 时达到峰值, 随后又随乙醇-正己烷体积比的增大而减少, 也就是说当乙醇与正己烷的体积比为 8:1 时, 纯化物中 VE 的含量最高, 分离纯化的效果最好。分析认为, 当乙醇与正己烷体积比小于 8:1 时, 溶液的极性相对较少, 还不足以将吸附在硅胶上的 VE 全部洗脱下来, 而当体积比大于 8:1, 溶液极性变大, 这时不但把 VE 洗脱下来, 还把其它吸附在硅胶柱上的极性物质洗脱了下来, 因此使得纯化物种的 VE 含量有所下降。

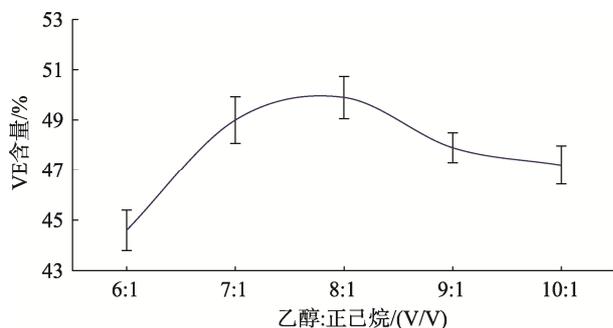


图1 乙醇-正己烷比例对维生素 E 含量的影响($n=3$)
Fig.1 Effect of ethanol/hexane ratio on VE content ($n=3$)

3.3 硅胶用量

设置了 5 个硅胶与样品质量比进行实验, 结果见图 2, 当硅胶与样品质量比从 1:1 升高至 3:1 时, 纯化物中 VE 的含量随着硅胶用量的增加而增加, 在硅胶与样品的质量比达到 3:1 时, 曲线开始逐渐平缓下来, 即 VE 含量稳定下来。在硅胶与样品的质量比小于 3:1 时, 硅胶不能把样品中的 VE 完全吸附, 随着硅胶用量增加, VE 的吸附量增加, 解吸附量也随之增加; 当硅胶与样品的质量比为 3:1 时, VE 被完全吸附, 因此在硅胶与样品的质量比进一步增大时, VE 的量维持不变。由此得出, 在硅胶与样品的质量比为 3:1 时, 样品中的 VE 被全部吸附, 分离纯化效果最佳。

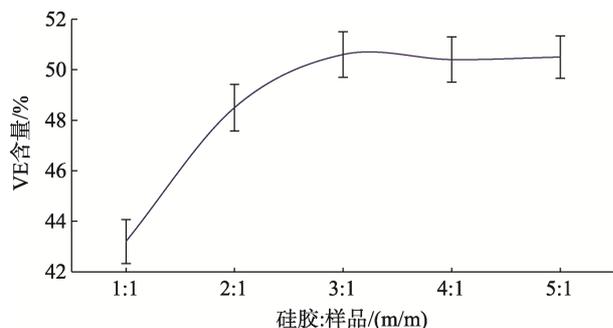


图2 硅胶用量(硅胶与样品比例)对维生素 E 含量的影响($n=3$)
Fig.2 Effect of silica gel/sample ratio on the VE content ($n=3$)

3.4 洗脱剂的用量

以 5 mL 为一个体积单位, 考察洗脱剂乙醇-正己烷(8:1)的用量, 结果见图 3。随着洗脱进程的进行, 单位体积的纯化物中 VE 的含量逐渐降低。在前两个单位中 VE 含量减少的幅度较小, 而在第三个单位中, VE 含量相比较第 2 个减少的幅度最大, 在接下来的几个单位中, VE 含量减少幅度大致相同, 直到第 7 个体积单位中, VE 含量接近 0, 即用 30 mL(6 个体积单位)极性洗脱剂可以把 2 g 样品中的 VE 全部洗脱出来。由此认为, 极性洗脱剂乙醇-正己烷(8:1)与样品的比为 15:1(m/V)时, 样品中的 VE 能够被全部洗脱出来。

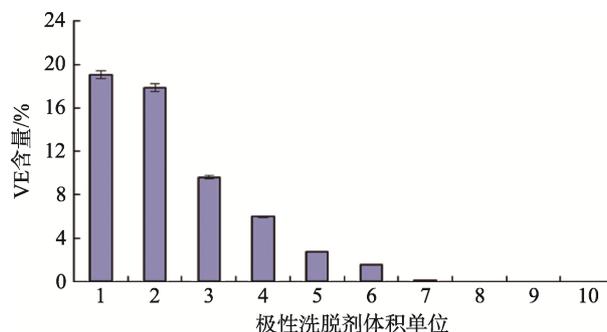


图3 洗脱剂用量对维生素 E 含量的影响
Fig.3 Effect of eluent volume on the VE content

3.5 验证试验结果

根据前述单因素试验的结果, 采用乙醇-正己烷(8:1, V:V)为洗脱剂, 硅胶与 VE 粗提物的质量比 3:1, 乙醇-正己烷用量与 VE 粗提物比 15:1(m/V)的工艺参数, 进行验证试验, 得到的纯化物中 VE 的含量为(51.5±0.530)%。

4 结论

本研究采用硅胶柱层析的方法纯化黑莓种籽天然 VE, 采用单因素试验的方法, 对洗脱剂种类、洗脱剂配比、硅胶用量、洗脱剂用量进行优化, 所确定的黑莓天然 VE 的纯化工艺为: 硅胶柱层析中硅胶与 VE 粗提物的质量比 3:1; 乙醇-正己烷(8:1, V:V)为洗脱剂, 洗脱剂用量为粗提物的 15 倍(m/V)。验证试验结果表明, 在此条件下, 纯化物中 VE 的含量可以达到(51.5±0.530)%。

参考文献

- [1] Wahiba A, Nesrine A, Fatiha B, *et al.* Modulatory role of selenium and vitamin E, natural antioxidants, against bisphenol a-induced oxidative stress in wistar albinos rats [J]. *Toxicol Res*, 2018, 34(3): 231-239.
- [2] Jiang Q. Natural forms of vitamin E as effective agents for cancer prevention and therapy [J]. *Adv Nutr Int Rev J*, 2017, 8(6): 850-867.
- [3] 李昌璞. 维生素 E 对油脂氧化的保护作用[J]. *食品安全导刊*, 2018, (24): 151.
Li CP. Protective effect of vitamin E on oil oxidation [J]. *Food safety guide*, 2018, (24): 151.
- [4] 吴军林, 万艳娟, 吴清平. 辅酶 Q10 软胶囊内容物的制备及稳定性研究[J]. *食品工业*, 2016, 37(3): 87-90.
Wu JL, Wan YJ, Wu QP. Study on preparation and stability of ubiquinone soft capsules content system [J]. *J Food Ind*, 2016, 37(3): 87-90.
- [5] 刘士杰, 刘尧君, 张建云, 等. 饲料维生素 E 水平对“京红 1 号”蛋鸡产蛋高峰期生产性能、蛋品质的影响[J]. *中国畜牧杂志*, 2018, 54(10): 75-78.
Liu SJ, Liu YJ, Zhang JY, *et al.* Effects of dietary vitamin E levels on the productive performance and egg quality during peak production period of jing hong laying hens [J]. *Chin J Animal Husbandry*, 2018, 54(10): 75-78.
- [6] 李维林, 孙醉君, 郑海燕. 黑莓鲜果及其加工品的营养成分[J]. *天然*

- 产物研究与开发, 1998, 10(1): 55-59.
- Li WL, Sun ZJ, Zheng HY. An analysis of nutrient constituents of fruit and products of blackberry [J]. *Nat Product Res Dev*, 1998, 10(1): 55-59.
- [7] 董珊珊, 杨海燕, 吴文龙, 等. 不同黑莓品种果实发育过程中生育酚合成规律研究[J]. *北方园艺*, 2019, (8): 26-31.
- Dong SS, Yang HY, Wu WL, *et al.* Study on the synthesis of vitamin E in different blackberry varieties [J]. *North Horticult*, 2019, (8): 26-31.
- [8] 王石, 王峻, 肖志明, 等. 天然维生素 E 的检测技术研究进展[J]. *中国饲料*, 2017, (15): 28-33, 38.
- Wang S, Wang J, Xiao ZM, *et al.* Research progress of natural vitamin E detection technology [J]. *Chin Feed*, 2017, (15): 28-33, 38.
- [9] 张姗姗, 张岩, 吴树国. 生育酚提取和纯化方法研究进展[J]. *山东化工*, 2015, 44(16): 63-65.
- Zhang SS, Zhang Y, Wu SG. Research progress extraction and purification of tocopherol [J]. *Shandong Chem Ind*, 2015, 44(16): 63-65.
- [10] 武文华, 曹玉平, 刘凯, 等. 天然维生素 E 提取工艺研究现状[J]. *中国油脂*, 2016, 41(8): 88-91.
- Wu WH, Cao YP, Liu K, *et al.* Advance in extraction technology of natural vitamin E [J]. *Chin Oils Fats*, 2016, 41(8): 88-91.
- [11] 贺灵芝, 旷文安, 黄镇. 山茶籽油脱臭馏出物中维生素 E 的萃取分离研究[J]. *粮食与油脂*, 2018, 31(4): 39-42.
- He LZ, Kuang WA, Huang Z. Study on extraction of vitamin E from the camellia oil deodorizer distillate [J]. *Grains Fats*, 2018, 31(4): 39-42.
- [12] 刘文玉, 潘轩, 魏长庆, 等. 酶法提取番茄籽油脱臭馏出物中维生素 E 的研究[J]. *食品工业*, 2016, 37(6): 27-31.
- Liu WY, Pan X, Wei CQ, *et al.* Study on enzymatic extraction of vitamin E from tomato seed oil deodorization distillate [J]. *J Food Ind*, 2016, 37(6): 27-31.
- [13] 崔伟斌. 基于超临界流体萃取-色谱法提大豆油中天然维生素[C]. *中国食品科学技术学会第十三届年会论文摘要集 2016: 2*.
- Cui WB. Extraction of natural vitamin E from soybean oil by supercritical fluid extraction chromatography [C]. *Abstracts of the 13th Annual Meeting of Chinese Society of Food Science and Technology*, 2016: 2.
- [14] 刘雅萍, 李鸿雁, 郑莉, 等. 超临界 CO₂ 法萃取树莓籽油的成分分析[J]. *中国油脂*, 2017, 42(12): 116-119.
- Liu YP, Li HY, Zheng L, *et al.* Component analysis of raspberry seed oil extracted by supercritical CO₂ [J]. *Chin Oils Fats*, 2017, 42(12): 116 - 119.
- [15] 代志凯, 李祥清, 赵健, 等. 硅胶柱层析法纯化生育酚和生育三烯酚的工艺研究[J]. *中国油脂*, 2016, 41(9): 91-94.
- Dai ZK, Li XQ, Zhao J, *et al.* Purification of tocopherols and tocotrienols by silica gel column chromatography [J]. *Chin Oils Fats*, 2016, 41(9): 91-94.
- [16] 王义永, 代志凯, 张莉华, 等. 硅胶柱色谱法去除天然维生素 E 中塑化剂研究[J]. *中国油脂*, 2016, 41(4): 83-86.
- Wang YY, Dai ZK, Zhang LH, *et al.* Removal of phthalic acid esters (PAEs) from natura VE by silica gel column chromatography [J]. *Chin Oils Fats*, 2016, 41(4): 83-86.
- [17] 张莉华, 许新德, 孙晓霞, 等. 硅胶柱层析法纯化天然维生素 E[J]. *中国食品添加剂*, 2008, (30): 105-109.
- Zhang LH, Xu XD, Sun XX, *et al.* The process of tocopherols purification by silica gel column chromatograph [J]. *Chin Food Addit*, 2008, (30): 105-109.
- [18] 崔恩惠, 方亮, 吴文龙, 等. 响应曲面法优化超声辅助提取黑莓种子油工艺[J]. *食品科学*, 2012, 33(4): 26-30.
- Cui EH, Fang L, WU WL, *et al.* Optimization of ultrasonic-assisted extraction of blackberry seed oil by response surface methodology [J]. *Food Sci*, 2012, 33(4): 26-30.
- [19] 崔恩惠, 方亮, 李维林, 等. 响应曲面法优化分光光度法测定天然维生素 E[J]. *食品工业科技*, 2010, 31(2): 324-328.
- Cui EH, Fang L, Li WL, *et al.* Optimization of spectrophotometric determination of natural vitamin E by response surface method [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2010, 31(2): 324-328.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



李维林, 博士, 研究员, 主要研究方向为经济林果育种栽培、药用植物资源评价和开发利用、天然产物化学。

E-mail: lwlcnbng@mail.cnbg.net



吴文龙, 研究员, 主要研究方向为黑莓、蓝莓等小果类果树的引种栽培与加工利用。

E-mail: 1964wwl@163.com