



从葡萄籽中分离纯化原花青素的研究

杨迎花, 李玉峰, 寇 丽
(天津科技大学理学院, 天津 300457)

摘 要: 研究了从葡萄籽中分离纯化原花青素的最佳浸提条件, 经过正交实验, 得出最佳浸提条件: 乙醇体积分数 60%, 提取温度 50 °C, 料液比 (g : mL) 1 : 7. AB-8 树脂较适合精制原花青素粗提物, 最佳的柱分离条件: 上样液 pH=4, 上样液流速 2.0 BV/h, 体积分数为 50% 乙醇溶液洗脱, 洗脱流速 1.0 BV/h. 经 AB-8 树脂吸附精制, 原花青素的纯度可达 91.2%.

关键词: 葡萄籽; 原花青素; 浸提; 吸附

中图分类号: O647.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-6510 (2008) 04-0052-04

Study of Extraction and Purification of Proanthocyanidins from Grape Seeds

YANG Ying-hua, LI Yu-feng, KOU Li

(College of Science, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The most optimum condition of extraction proanthocyanidins from grape seeds has been studied. The results show the optimum condition of extraction; the volume fraction of alcohol is 60%, the temperature of extraction is 50 °C, and the ratio of feedstock and solvent is 1 : 7. AB-8 is the most suitable resin to purify proanthocyanidins. The most optimum condition of column separation is that the solution pH value is 4, the solution flow rate is 2.0 BV/h, the concentration of alcohol desorption is 50%, and the eluent flow rate is 1.0 BV/h. The purity of proanthocyanidin can be up to 91.2% after adsorption and purification of AB-8.

Keywords: grape seed; proanthocyanidin; digestion; adsorption

原花青素 (简称 OPC) 由儿茶素、表儿茶素聚合而成, 即黄烷 23, 42 二醇通过 C₄-C₈ 键或 C₄-C₆ 键相连形成二聚体、三聚体, 乃至十聚体^[1,2]. 原花青素是广泛存在于植物中的一类天然多酚类化合物, 具有水溶、无毒、无过敏、安全性好等特性, 是一种天然的自由基清除剂和抗氧化剂, 而且还有抗衰老, 抗肿瘤, 抗癌变, 预防心脑血管疾病, 预防动脉粥样硬化等功能^[3,4]. 葡萄籽作为原花青素的重要来源之一, 在国外已得到很好的利用. 我国葡萄年产量约有 200 万吨, 约有 10% 用于酿酒和加工果汁, 其下角料葡萄籽约占鲜果总量的 4%~5%, 这些葡萄废弃物利用率很低, 大部分作为饲料、烧材或被丢弃, 不仅造成环

境污染, 对资源也是一种浪费. 因此, 研究和解决葡萄籽利用问题, 可以变废为宝, 防止环境污染, 具有很好的社会效益和经济效益.

中草药有效成分的提取一般通过浸提和精制两个步骤, 从葡萄籽中浸提原花青素的方法主要有溶剂提取法、超声提取法、超临界 CO₂ 萃取法^[5], 本文使用乙醇水溶液作为浸提剂. 精制原花青素的方法主要有溶剂分级精制、吸附层析、超过滤法. 溶剂分级精制中所用溶剂较多, 工艺路线长, 繁琐费时. 大孔树脂吸附法具有投资少、选择性好、操作简便、产品纯度高优点, 在天然产物的提取分离中得到广泛的应用^[6,7]. 故本文采用溶剂提取法与大孔树脂吸附法

收稿日期: 2008-04-09; 修回日期: 2008-09-19

基金项目: 天津科技大学科学研究基金资助项目 (20060226)

作者简介: 杨迎花 (1973—), 女, 山东济宁人, 讲师.

相结合,得到原花青素的最优提取、分离纯化工艺,所得产品纯度高、质量好。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

原花青素化学对照品(含量>95%),天津尖峰天然产物研究开发有限公司。大孔树脂 AB-8、X-5、

NKA-9、H-103、S-8、D3520,南开大学化工厂;树脂 DM-301,天津市海光化工有限公司;其他试剂均为国产分析纯。不同树脂的物理结构参数见表 1。

1.2 主要仪器

SP-2102PC 紫外可见分光光度计,上海光谱仪器有限公司;HZS-H 型恒温振荡水浴,哈尔滨东联电子技术开发有限公司;LD5-2A 型低速离心机,北京药用离心机厂。

表 1 7种树脂的物理结构参数
Tab. 1 Properties of seven kinds of resin

型号	极性	外观	粒径/mm	比表面积/($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$)	平均孔径/nm	孔隙率/%	孔容/($\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$)
AB-8	弱极性	乳白色不透明球状颗粒	0.3~1.25	480~520	13.0~14.0	42~46	0.73~0.77
X-5	非极性	乳白色不透明球状颗粒	0.3~1.25	500~600	29.0~30.0	50~60	1.20~1.24
NKA-9	极性	乳白色至微黄色不透明球状颗粒	0.3~1.25	250~290	15.5~16.5	46~50	—
DM-301	非极性	乳白色至黄色球状颗粒	0.3~1.25	>330	—	—	—
H-103	非极性	深棕色球状颗粒	0.3~1.25	1000~1100	8.5~9.0	55~59	1.08~1.12
S-8	极性	乳白色不透明球状颗粒	0.3~1.25	100~120	28.0~30.0	—	0.78~0.82
D3520	非极性	乳白色不透明球状颗粒	0.3~1.25	480~520	8.5~9.0	65~70	2.10~2.15

1.3 实验方法

1.3.1 葡萄籽原花青素的提取^[8,9]

天然葡萄籽用粉碎机粉碎后,经石油醚脱脂,晾干。用一定体积分数的乙醇溶液恒温水浴搅拌提取,离心取上清液,反复提取 3 次,最后洗涤残渣 2 次,将 3 次上清液和洗涤液合并,减压蒸馏得到原花青素粗提液,干燥后制得粗提物。测定原花青素含量,计算提取率。其提取流程:

葡萄籽→粉碎过筛(20目)→石油醚浸泡脱脂,晾干→乙醇溶液搅拌提取→离心→上清液+洗涤液→减压浓缩→真空干燥→粗产品。

1.3.2 树脂筛选

准确称取经预处理的 7 种树脂各 1.0 g,加入少量无水乙醇浸泡 1 h,用蒸馏水洗涤树脂以置换乙醇,用滤纸吸干树脂表面水分后加入 25 mL 已知浓度的原花青素溶液,25℃置于水浴摇床中振荡吸附 12 h,测其上清液中的原花青素浓度。滤除上清液,用去离子水洗涤树脂,过滤后加入 25 mL 体积分数为 70%的乙醇水溶液,25℃振荡解吸 12 h,测其解吸液中原花青素的浓度,计算树脂的吸附量、吸附率及解吸率。

1.3.3 洗脱剂的选择

称取 6 份已吸附饱和的 AB-8 树脂,每份 1.0 g,分别加入 25 mL 不同体积分数的乙醇水溶液,于 25℃恒温振荡解吸,每隔一定时间取样测其解吸率。

1.3.4 柱分离条件的研究

称取一定量的 AB-8 树脂,湿法装柱,按常规对柱中树脂进行处理。将葡萄籽原花青素粗提液调到一定的 pH,上柱吸附,吸附平衡后先用去离子水冲洗去除未吸附的原花青素及小分子杂质,再用体积分数为 50%的乙醇水溶液按一定的流速进行解吸,收集洗脱液,减压浓缩后冷冻干燥,测其产品质量。

1.4 检测原理及方法

原花青素为无色物质,在紫外区有唯一特性吸收峰, $\lambda_{\text{max}} = 280 \text{ nm}$ ^[10]。采用吸光度法测定样品中原花青素含量。

2 结果与讨论

2.1 葡萄籽原花青素的提取

通过对一系列影响因素的考察,选取影响原花青素提取率的 3 个主要因素:乙醇体积分数、提取温

度、料液比 (g : mL) 作为考察因素,应用 $L_9(3^3)$ 进行正交实验,结果见表 2. 从表 2 可以看出,各因素的影响主次顺序为 $A>C>B$, 即乙醇体积分数>料液比>提取温度. 最佳提取条件为 $A_2B_2C_3$, 即乙醇体积分数 60%, 提取温度 50°C , 料液比 1 : 7. 在此条件下, 葡萄籽原花青素的提取率为 4.43%. 在最优条件下提取原花青素并干燥得到原花青素粗提物, 经测定粗提物中原花青素质量分数为 60.3%.

表 2 正交实验结果
Tab. 2 Results of orthogonal experiments

实验号	(A) 乙醇体积 分数 /%	(B) 提取温度 / $^{\circ}\text{C}$	(C) 料液比	提取率 /%
1	50	40	1 : 5	2.89
2	50	50	1 : 6	3.56
3	50	60	1 : 7	3.72
4	60	40	1 : 6	4.13
5	60	50	1 : 7	4.43
6	60	60	1 : 5	3.92
7	70	40	1 : 7	3.73
8	70	50	1 : 5	3.62
9	70	60	1 : 6	3.41
K_{1j} 平均	3.39	3.58	3.48	
K_{2j} 平均	4.16	3.87	3.70	
K_{3j} 平均	3.59	3.68	3.96	
R	0.77	0.29	0.48	
优水平	A_2	B_2	C_3	
因素主次		$A>C>B$		

2.2 树脂的筛选

树脂的极性 (功能基) 和空间结构 (孔容、比表面积、孔径) 是影响其吸附特性的重要因素. 本实验考察了 7 种不同树脂对葡萄籽原花青素的静态吸附及解吸性能, 结果如表 3 所示. 可以看出极性和弱极性树脂的吸附率普遍高于非极性树脂的吸附率, 这是由于原花青素含有极性基团, 易与极性树脂发生相互作用, 有利于吸附. 但对极性较强的 NKA-9 和 S-8 树脂, 由于对原花青素的作用力太强, 难以解吸, 解吸率较低, 不适用. 综合考虑吸附与解吸情况, AB-8 树脂具有较好的吸附率和解吸率, 因此选择 AB-8 树脂对葡萄籽原花青素进一步精制.

表 3 不同树脂对葡萄籽原花青素的吸附
Tab. 3 Adsorption of OPC on different resins

树脂型号	吸附量(湿)/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	吸附率/%	解吸率/%
AB-8	216.4	93.2	96.6
X-5	97.7	59.8	49.8
NKA-9	156.3	82.0	69.6
DM-301	103.2	76.3	58.8
H-103	80.4	46.7	76.5
S-8	205.2	91.2	40.8
D3520	167.2	84.2	90.3

2.3 乙醇洗脱液体积分数的确定

通常用的洗脱剂是以最能溶解吸附质为原则, 还要求沸点低, 易于蒸馏回收, 典型的洗脱剂是甲醇、乙醇、丙酮或稀酸、稀碱等. 考虑到环境保护, 溶剂回收, 价格等方面的要求, 本实验选用乙醇水溶液为洗脱剂. 根据不同时间测得解吸率与时间的关系, 得到如图 1 所示的解吸动力学曲线, 从图 1 可以看出, 体积分数为 50% 的乙醇水溶液解吸效果最好.

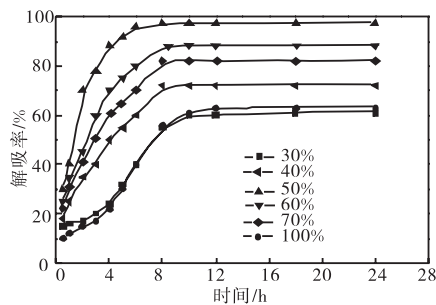


图 1 静态解吸动力学曲线
Fig. 1 Kinetics curves of static desorption

2.4 柱分离条件的研究

2.4.1 上样液 pH 的影响

在上样液流速 1.5BV/h (BV : bed volume), 50% 乙醇溶液洗脱, 洗脱流速 1.0BV/h 条件下, 上样液 pH 对化合物吸附、分离的影响见图 2. 由图 2 看出, 当 $\text{pH}=4$ 时, 原花青素的吸附率最高, 纯度也较高. 这主要是因为原花青素类化合物为多羟基酚类, 呈弱酸性, 要达到较好的吸附效果必须在弱酸性或酸性条件下以氢键的方式被吸附.

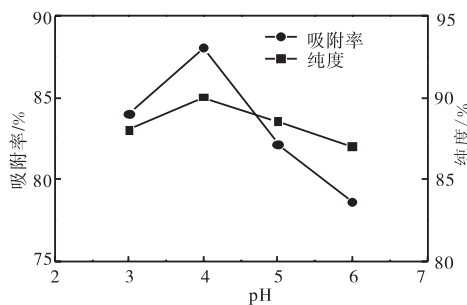


图 2 上样液 pH 对原花青素吸附率及纯度的影响
Fig. 2 Effect of solution pH values on adsorption rate and purity of procyanidins

2.4.2 上样液流速的影响

从理论上讲, 上样液的流速越慢, 原花青素的吸附越充分, 从而吸附率也越高. 从图 3 (层析条件: 上样液 $\text{pH}=4$, 50% 乙醇溶液洗脱, 洗脱流速 1.0BV/h) 可以看出, 上样液的流速为 1.5BV/h 和 2.0BV/h 时, 原花青素的吸附率及纯度相差不大, 而流速快可以缩短生产周期, 从而获得较好的经济效益. 上

样液流速为 2.5 BV/h 时,原花青素的吸附率有了较大程度的降低,造成物料的浪费.因此,选择上样液流速为 2.0 BV/h 为最佳流速.

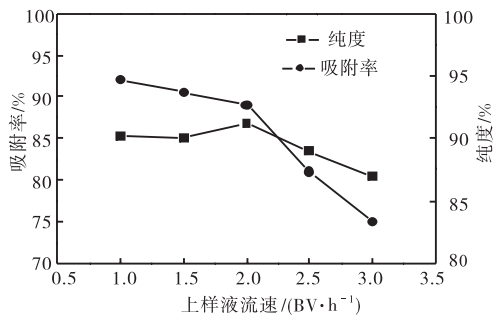


图3 上样液流速对原花青素吸附率及纯度的影响
Fig. 3 Effect of solution flow rate on adsorption rate and purity of procyanidins

2.4.3 洗脱液流速的选择

为了使洗脱液与树脂所吸附的溶质有充分的接触时间,进行有效的解吸,必须使洗脱液以合适的流速进行洗脱,因此考察了不同洗脱液流速对洗脱效果的影响.由图4(层析条件:上样液 pH=4,上样液流速 2.0 BV/h, 50%乙醇溶液洗脱)可以看出,洗脱液流速为 0.5 BV/h 和 1.0 BV/h 时,洗脱效果相差不大,而当洗脱液流速达到 1.5 BV/h 时,洗脱效果明显变差.但是如果流速太小,解吸就慢,而且给洗脱剂的浓缩回收造成麻烦,综合考虑,选择洗脱液流速为 1.0 BV/h,此时原花青素的解吸率为 95.0%,纯度为 91.2%.

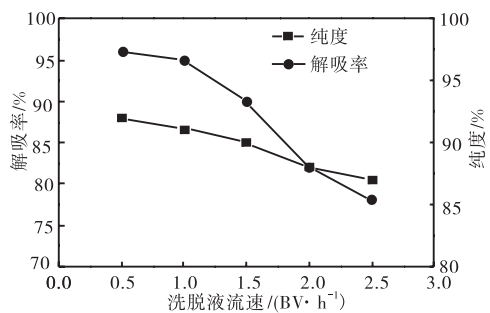


图4 乙醇洗脱液流速对原花青素解吸率及纯度的影响
Fig. 4 Effect of alcohol flow rate on desorption rate and purity of procyanidins

3 结论

从葡萄籽中分离纯化原花青素的最佳浸提条件为:乙醇体积分数 60%,提取温度 50 °C,料液比 1 : 7.

在此条件下,葡萄籽原花青素的提取率为 4.43%,粗提物中原花青素质量分数为 60.3%.

采用大孔吸附树脂纯化原花青素工艺简单,成本低,产率高,安全适用.通过对 7 种树脂吸附性能的筛选,得出 AB-8 树脂较适合精制原花青素粗提物,其最佳的柱分离条件为上样液 pH=4,上样液流速为 2.0 BV/h, 50%的乙醇水溶液洗脱,洗脱液流速 1.0 BV/h,经 AB-8 树脂吸附精制,原花青素的纯度达到 91.2%.

参 考 文 献:

- [1] Yahara N, Tofani I, Maki K, et al. Mechanical assessment of effects of grape seed proanthocyanidins extract on tibial bone diaphysis in rats [J]. *J Musculoskeletal Neuronal Interact*, 2005, 5 (2): 162—169.
- [2] Ricardo Da Silva Jorge M, Rigaud Jacques, Cheynier Véronique, et al. Procyanidin dimers and trimers from grape seeds [J]. *Phytochemistry*, 1991, 30 (4): 1259—1264.
- [3] 丰佃娟,徐贵发. 葡萄籽提取物对人体抗氧化能力的影响[J]. *山东大学学报:医学版*, 2007, 45 (10): 985—987.
- [4] Sharma S D, Katiyar S K. Dietary grape-seed proanthocyanidin inhibition of ultraviolet B-induced immune suppression is associated with induction of IL-12 [J]. *Carcinogenesis*, 2006, 27 (1): 95—102.
- [5] Yilmaz Y, Toledo R T. Health aspects of functional grape seed constituents [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2004, 15 (9): 422—433.
- [6] 王青华,张维民. 葡萄籽中原花青素提取条件的研究[J]. *食品科学*, 2007, 28 (7): 185—188.
- [7] Scordino M, Di Mauro A, Passerini A, et al. Adsorption of flavonoids on resins: cyanidin 3-glucoside [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52 (7): 1965—1972.
- [8] 姜守霞,孙威. 葡萄籽中提取原花青素的研究[J]. *应用化工*, 2005, 34 (2): 108—110.
- [9] Roy A M, Baliga M S, Elmets C A, et al. Grape seed proanthocyanidins induce apoptosis through p53, bax, and caspase 3 pathways [J]. *Neoplasia*, 2005, 7 (1): 24—36.
- [10] 赵平,宋学娟,张月萍,等. 葡萄籽原花青素含量测定[J]. *河北化工*, 2007, 30 (1): 46—48.