

二次柱层析制备高纯度树莓籽原花青素的工艺

张佰清, 张艳艳, 李龙杰
(沈阳农业大学食品学院, 辽宁 沈阳 110866)

摘要: 为制备高纯度树莓籽原花青素, 通过静态吸附实验从 8 种大孔吸附树脂中筛选出 HPD100C 型树脂对树莓籽原花青素吸附量大、解吸率高, 适合于树莓籽原花青素的富集。通过动态吸附实验得到其最佳吸附条件为上柱料液 pH5、上柱速率 0.5mL/min、40% 乙醇以 1.5mL/min 的流速进行洗脱。将经过大孔树脂层析分离纯化的原花青素粗品经聚酰胺柱分离, 60% 乙醇洗脱得到的原花青素纯度达 92%, 可得纯度为 57% 的原花青素。

关键词: 树莓籽; 原花青素; 大孔吸附树脂; 聚酰胺

Preparation of High Purity Procyanidins from Raspberry Seeds by Two-step Resin Column Chromatography

ZHANG Bai-qing, ZHANG Yan-yan, LI Long-jie
(College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: The purpose of the present study was to develop a two-step resin column chromatographic method for purifying crude procyanidin extract from raspberry seeds. Static adsorption and desorption experiments were carried out to comparatively investigate the adsorption and desorption performance of 8 types of macroporous resins towards raspberry seed procyanidins, and type HPD100C macroporous resin showed higher adsorption quantity and desorption rate and consequently was more suitable for enriching raspberry seed procyanidins. The optimal conditions for the dynamic adsorption and desorption of raspberry seed procyanidins on type HPD100C macroporous resin were experimentally determined as follows: sample pH 5, 0.5 mL/min sample loading flow rate, and 1.5 mL/min desorption flow rate with 40% ethanol as desorption solvent. The pooled eluate obtained was applied to polyamide resin followed by desorption with 60% ethanol, and the resulting final purity of raspberry seed procyanidins was 92%.

Key words: raspberry seeds; procyanidins; macroporous resin; polyamide

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)08-0163-04

原花青素是广泛存在于植物中的一类多酚物质的总称, 是由不同数量的儿茶素或表儿茶素聚合而成^[1-3]。原花青素具有水溶、无毒、无过敏、安全性好等特性, 是一种天然的非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^[4-6]。树莓籽粗提物中含有多糖、蛋白等多种杂质, 且原花青素低聚体含量较低, 需要进一步分离纯化。大孔树脂吸附法以投资少、选择性好、操作简便、产品纯度高等优点, 在天然产物的提取分离中得到广泛的应用^[7-11]。本实验对 8 种国产大孔吸附树脂进行筛选, 研究上样质量浓度、洗脱剂体积分数等工艺参数对原花青素的纯化分离效果。根据初步研究和文献资料^[12-14], 发现用柱层析分离原花青素是一条比较好的工艺路线, 尤其是聚酰胺柱层析和大孔树脂柱层析的联合使用, 具有独特的优越性。本实验以大孔树脂分离的原花青素为原料, 对大孔树脂、聚酰胺二次柱

层析制备高纯度原花青素的工艺条件进行探索, 旨在为高纯度树莓籽原花青素的分离制备提供參考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

D101、AB-8、HPD100C、HPD700、HPD750 树脂、聚酰胺 沧州宝恩吸附材料科技有限公司; X-5、NKA-II 树脂 天津海光化工有限公司; 儿茶素 中国药品生物制品检定所; 乙醇、盐酸(均为分析纯); 香草醛 国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

THZ88-1 台式多用恒温振荡器 江苏太仓鹿河生化仪器厂; RE-52A 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; DBS-100 电脑全自动部分收集器、DHL-A 电脑恒流泵、HD-3 紫外检测仪 上海沪西分析仪器厂; AL204 型万分之一天平 北京赛多利斯仪器系统有限公司; UV-

收稿日期: 2010-05-29

作者简介: 张佰清(1966—), 男, 副教授, 博士, 主要从事食品科学与营养学研究。E-mail: sybaiqingx1@sina.com

2000 紫外-可见分光光度计 日本 Shimadzu 公司; 真空干燥箱 天津实验仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 上柱液预处理

称取 100g 脱脂树莓籽, 以 1000mL 60% 乙醇于 60℃ 微波提取 3min, 重复 3 次。过滤后合并滤液, 60℃、0.09MPa 旋转蒸发回收乙醇, 盐析法除去粗提液中的蛋白后, 然后加入适量去离子水室温静置 12h, 滤去不溶物后用去离子水溶解并稀释至一定质量浓度, 即得上柱液。

1.3.2 静态吸附实验

在 100mL 具塞锥形瓶中加入 1g 用无水乙醇浸泡 4h 预处理的 8 种不同型号树脂和 50mL 原花青素水溶液, 然后放入 25℃ 恒温水浴振荡器中, 120r/min 振荡 24h。将树脂与吸附后的原花青素水溶液分离, 测定样液的原花青素质量浓度(mg/mL), 计算树脂的吸附率。然后分别加入 50mL 60% 乙醇进行洗脱, 测定洗脱液中原花青素的质量浓度, 计算各种树脂的吸附量、解吸量和解吸率。

原花青素质量浓度测定方法: 香草醛-盐酸法^[15]。

$$\text{平衡吸附量}/(\text{mg/g}) = \frac{C_0V_0 - C_1V_1}{m}$$

式中: C_0 为吸附液初始质量浓度/(mg/mL); C_1 为吸附液平衡质量浓度/(mg/mL); V_0 为吸附液初始体积/mL; V_1 为吸附液平衡时的体积/mL; m 为树脂质量/g。

$$\text{解吸量}/(\text{mg/g}) = \frac{C_1V_1 - C_2V_2}{m}$$

式中: C_2 为解吸后溶液的质量浓度/(mg/mL); V_2 为解吸后溶液体积/mL。

$$\text{解吸率}/\% = \frac{C_1V_1 - C_2V_2}{C_0V_0 - C_1V_1} \times 100$$

1.3.3 静态吸附动力学

选取合适的树脂, 吸干其表面水分后, 分别准确称取 1g 置于 150mL 三角瓶中, 各加入 40mL 树莓籽原花青素提取液, 置于恒温摇床, 25℃、120r/min 振荡, 每隔 30min 取 1mL 溶液测定, 连续测定 12h, 考察树脂对原花青素的吸附量与时间的关系。

1.3.4 动态吸附-洗脱条件

1.3.4.1 上样样品 pH 值对动态吸附的影响

将提取液 pH 值依次调到 2、3、4、5、6, 吸附流速 0.5mL/min, 然后用水洗脱至洗脱液澄清透明后, 用体积分数 60% 乙醇, 以 0.5mL/min 流速洗脱, 测定洗脱产物质量浓度。

1.3.4.2 吸附流速对动态吸附的影响

用装有 HPD100C 树脂的层析柱对 50mL PC 提取液进行吸附, 水洗至洗脱液为无色, 以 60% 乙醇为洗脱溶剂, 分别取吸附流速为 0.25、0.50、0.75、1.00、1.25mL/min 作比较, 测定吸附率。

1.3.4.3 乙醇体积分数对动态吸附的影响

调树莓籽 PC 提取液至 pH5、以 0.5mL/min 的速度通过层析柱, 水洗至洗脱液为无色, 然后用不同体积分数乙醇溶液以 1.5mL/min 流速洗脱, 收集洗脱液, 测定解吸率和纯度。

1.3.4.4 不同洗脱流速对洗脱效果的影响

用 40% 乙醇以 0.5~2.5mL/min 的不同流速洗脱, 将洗脱液合并、浓缩、真空干燥, 测定产物的解吸率。

1.3.5 聚酰胺柱纯化

将上述大孔树脂分离出的原花青素的干燥产物用水溶解后用聚酰胺柱分级, 流动相依次为 30%、40%、50%、60%、70% 乙醇溶液。流速均为 0.5mL/min。将不同流动相洗脱下来的组分分别收集, 真空干燥后测定纯度。

2 结果与分析

2.1 不同树脂对原花青素吸附解吸的性能参数

选择 8 种国产大孔吸附树脂, 研究其对树莓籽原花青素的静态吸附性能和解吸性能, 以原花青素的吸附量和解吸率为指标, 从中选出吸附量大、选择性强、解吸率高的树脂, 结果参见表 1。

表 1 8 种树脂对树莓籽中原花青素的平衡吸附性质
Table 1 Absorption and desorption performance of 8 types of macroporous resins towards raspberry seed procyanidins

树脂型号	平衡吸附量/(mg/g)	解吸量/(mg/g)	解吸率/%
D101	5.36	4.26	79.21
AB-8	10.30	8.91	86.56
HPD100C	12.48	11.01	88.27
HPD700	9.25	5.60	60.57
HPD750	7.7	5.63	73.18
X-5	3.27	1.60	49.13
NKA-II	4.32	2.94	68.28
聚酰胺	8.85	7.18	81.21

从表 1 可知, 8 种树脂以 HPD100C 的吸附量最高, 每克树脂可以吸附 12.48mg 树莓籽原花青素, AB-8 和 HPD700 次之, 分别为 10.30mg/g 和 9.25mg/g。其中 HPD100C 具有最大吸附量和较高的解吸率, 因而后续实验选择 HPD100C 进行。

2.2 静态吸附动力学曲线

采用初始质量浓度 14mg/mL 的葡萄籽提取液对树脂 HPD100C 进行了静态等温吸附动力学曲线研究, 结果如图 1 所示。

从图 1、2 可以看出, HPD100C 树脂在吸附的起始阶段对原花青素的吸附速度非常快, 属于快速平衡型, 在 1h 内吸附量可达 7.96mg/g, 基本已经超过其总吸附量

的60%，5h左右的吸附量11.52mg/g，超过总吸附量的90%。随着吸附的进行，溶液中的原花青素含量的减少，以及树脂自身吸附量已接近极限吸附量，曲线出现“平台”。综上所述，HPD100C吸附原花青素达到吸附终点的时间为300min。

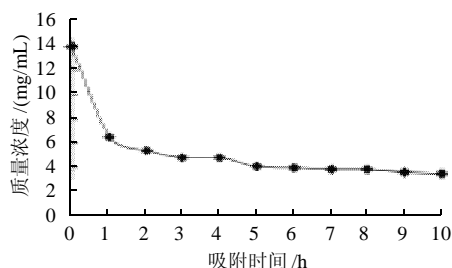


图1 HPD100C树脂的静态吸附动力学曲线

Fig.1 Static adsorption curve of raspberry seed procyanidins on type HPD100C macroporous resin

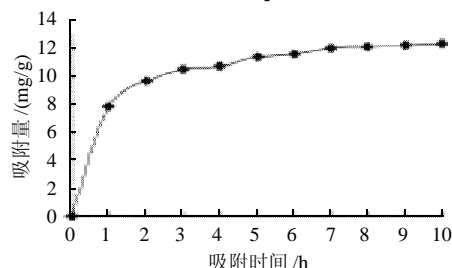


图2 HPD100C树脂吸附量与时间关系曲线

Fig.2 Time course of static adsorption of raspberry seed procyanidins on type HPD100C macroporous resin

2.3 动态吸附实验

2.3.1 进样液pH值对吸附率的影响

上柱速率为0.5mL/min、60%乙醇溶液洗脱，洗脱流速0.5mL/min，上样液pH值对原花青素吸附率的影响见图3。

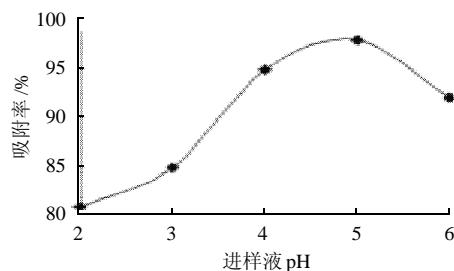


图3 进样液pH值对吸附率的影响

Fig.3 Effect of sample pH on the adsorption capacity of type HPD100C macroporous resin toward raspberry seed procyanidins

由图3可以看出，当pH5时，原花青素的吸附率最高。这主要是因为原花青素为多羟基酚类，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。pH值的变化改变体系内的分子作用力，从而影响分离效果。因此，选择pH5进样液进样最佳。

2.3.2 吸附流速对吸附量的影响

进样液pH5，测定不同吸附速率的动态吸附率，结果见图4。

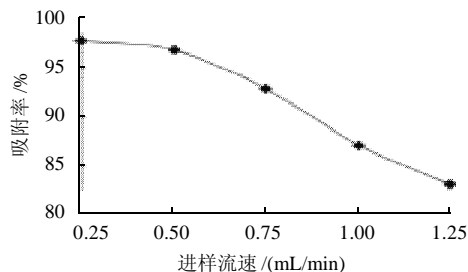


图4 进样流速对吸附率的影响

Fig.4 Effect of sample loading flow rate on the adsorption capacity of type HPD100C macroporous resin toward raspberry seed procyanidins

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。由图4可以看出，流速不同，吸附量也有所变化。流速增大，HPD100C树脂对原花青素的吸附量减小。当上柱流速为0.5mL/min时，HPD100C树脂的动态吸附率为98%；当流速提高到1.25mL/min时，其动态吸附率降至83%。这是因为流速的变化直接影响溶质向树脂内表面的扩散，从而影响吸附效果。随着上柱流速增大，树脂与料液中原花青素之间没有足够长的时间接触，溶质分子来不及扩散到树脂内表面，造成树脂的工作吸附量下降。在实际生产中应综合考虑吸附量与工作效率选择吸附速率，所以选用0.5mL/min左右的流速进行上柱。

2.3.3 洗脱剂体积分数的选择

按实验得出的吸附条件进行吸附后，控制解吸速率1.5mL/min，洗脱体积为2.0BV。不同体积分数乙醇对树莓籽中原花青素的解吸情况见图5。

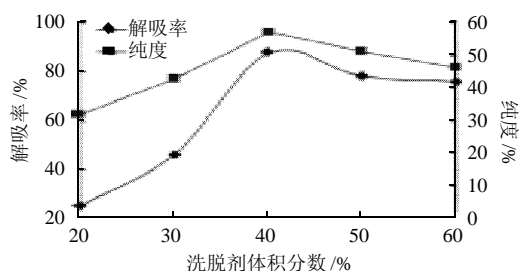


图5 洗脱剂体积分数对解吸率及纯度的影响

Fig.5 Effect of ethanol concentration on the desorption rate of raspberry seed procyanidins from type HPD100C macroporous resin

由图5可知，在一定范围内，随着乙醇体积分数的增加解吸率也提高。当乙醇体积分数为30%时，解吸率47.2%；而当乙醇体积分数提高到40%时，解吸率88.6%。此后，再增加乙醇体积分数，解吸率略有增加，但变化不明显。而乙醇体积分数过高，生产成本

增加,并且挥发性大,增加了控制操作条件的难度。因此选用40%的乙醇进行洗脱。

2.3.4 洗脱流速的选择

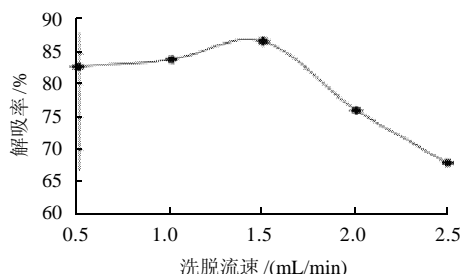


图6 洗脱流速对解吸率的影响

Fig.6 Effect of desorption flow rate on the desorption rate of raspberry seed procyanidins from type HPD100C macroporous resin

由图6可以看出,随着洗脱流速的加快,原花青素的解吸率呈下降趋势,当洗脱流速加快到1.5mL/min时,下降趋势更加明显。对于一定量的洗脱液,如加快洗脱流速,则洗脱液与树脂作用的时间缩短,那么在洗脱液对原花青素的溶解还未达到饱和时就已经达到一种动态平衡,从吸附床上流出。因此就会还有一部分的原花青素吸附在树脂上没有被洗脱下来。由于在低流速状态下,洗脱时间较长,不利于工业化生产,因此可以在不显著影响原花青素的解吸率的条件下,适当的加快洗脱流速。因此,宜选择1.5mL/min的洗脱流速。

2.4 聚酰胺柱纯化

经大孔树脂分离得到较低纯度的原花青素样品,需要经过聚酰胺进一步纯化,以得到较高纯度的原花青素。将经过大孔树脂层析分离的原花青素用聚酰胺柱纯化,流动相分别为30%、40%、50%、60%、70%的乙醇溶液。原花青素经不同体积分数洗脱液洗脱效果见图7。

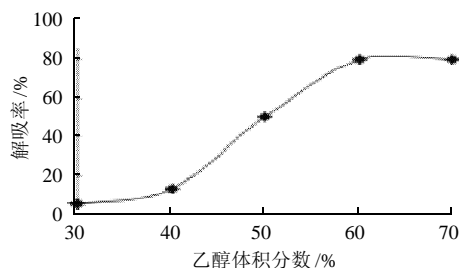


图7 乙醇体积分数对解吸率的影响

Fig.7 Effect of ethanol concentration on the desorption rate of raspberry seed procyanidins from type HPD100C macroporous resin

图7显示,当洗脱液中乙醇体积分数30%时,洗

脱液的极性相对较大,几乎不能洗脱下原花青素,当乙醇体积分数40%时,洗脱液极性仍然较大,被洗脱下来的原花青素增多;当增加到60%、70%时,可洗脱下来的原花青素达到最大值,且两者相当。收集60%乙醇洗脱部分,测得纯度是92%。

3 结论

通过对8种树脂吸附性能的筛选,得出HPD100C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pH5、上样液流速0.5mL/min、40%的乙醇溶液洗脱、洗脱液流速1.5mL/min,经HPD100C树脂吸附,原花青素的纯度达到57%。以此纯度的原花青素为原料,再用聚酰胺柱层析精制备高纯度的原花青素,得到92%高纯度的原花青素。

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 Musculoskelet Neuronal Interact, 2005, 5(2): 162-169.
- [2] RICARDO da SILVA J M, RIGAUD J, CHEYNIER V, et al. Procyanidin dimers and trimers from grape seeds[J]. Phytochemistry, 1991, 30(4): 1259-1264.
- [3] 国植, 徐莉. 原花青素: 具有广阔发展前景的植物药[J]. 国外医药: 植物药分册, 1996, 11(5): 196-204.
- [4] 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.
- [5] SHARMA S D, KATTIYAR 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.
- [6] 吕丽爽, 曹栋. 葡萄籽中低聚原花青素的抗氧化性的研究[J]. 食品科技, 2000(4): 41-42.
- [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] 贾存勤, 李阳春, 屠鹏飞. HPD系列大孔吸附树脂预处理方法研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(2): 1425-1470.
- [9] 黄红霞, 戚向阳, 肖俊松, 等. 大孔吸附树脂对原花青素吸附分离的特性[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(7): 132-134.
- [10] 周剑, 丁玉峰. 大孔吸附树脂分离中草药有效成分的应用[J]. 中国医院药学杂志, 2006, 26(1): 69-70.
- [11] SILVA E M, POMPEU D R, LARONDELLE Y, et al. Optimisation of the adsorption of polyphenols from *Inga edulis* leaves on macroporous resins using an experimental design methodology[J]. Separation and Purification Technology, 2007, 53(3): 274-280.
- [12] 刘硕谦, 刘仲华, 黄建安, 等. 大孔吸附树脂分离富集水皂角多酚[J]. 食品科学, 2004, 25(3): 55-60.
- [13] 张竣, 吉伟之, 陈晓云, 等. 吸附层析法制备低聚原花青素[J]. 天然产物研究与开发, 2002, 14(4): 31-33.
- [14] 彭永芳, 马银海, 阎孝金, 等. AB-8树脂吸附和分离红花黄色素[J]. 食品科学, 2001, 22(5): 39-40.
- [15] 李春阳, 许时婴, 王璋. 低浓度香草醛-盐酸法测定葡萄籽、梗中原花青素含量的研究[J]. 食品工业科技, 2004, 25(6): 128-130.