

刺葡萄籽中原花青素的提取与成分分析

马玉美¹, 王辉宪¹, 谢 聘¹, 王仁才², 熊兴耀²

(1.湖南农业大学理学院, 湖南 长沙 410128; 2.湖南农业大学园艺园林学院, 湖南 长沙 410128)

摘 要: 对刺葡萄籽中原花青素的提取和纯化工艺做了初步的研究。采用传统的溶剂提取法, 对影响提取效果的 4 个主要因素——提取剂浓度、料液比、提取温度和提取时间进行了研究, 通过正交分析得出最佳提取工艺: 提取剂为 70 %乙醇, 料液比(w/v) 为 1 7, 提取温度为 60 , 提取时间为 2 h。并用有机溶剂萃取法初步分离出低聚原花青素和高聚原花青素。通过 HPLC 对原花青素低聚物进行了成分分析, 结果表明, 所提取的产品与原花青素标准品成分基本一致。

关键词: 综合利用; 刺葡萄籽; 原花青素; 提取工艺; 成分分析。

中图分类号: TS262.6; S663.1; X797 文献标识码: B 文章编号: 1001- 9286(2007) 06- 0117- 04

Extraction of Procyanidins from Grape Seed & Analysis of Its Compositions

MA Yu-mei¹, WANG Hui-xian¹, XIE Dan¹, WANG Ren-cai² and XIONG Xing-yao²

(1.College of Science, Hu'nan Agricultural University, Changsha, Hu'nan 410128; 2.College of Horticulture and Forestry Sciences, Hu'nan Agricultural University, Changsha, Hu'nan 410128, China)

Abstract: The extraction and the purification techniques of procyanidins from grape(*Vitis davidii* Foëx) seed were studied. The four main factors influencing traditional solvent extraction including extracting reagent concentration, proportion of material and extracting reagent, extracting temperature and time were investigated. The optimum technical conditions were summed up as follows through orthogonal experiments: extracting reagent was 70 % aqueous ethanol solution, proportion of material and extracting reagent was 1 7, temperature was at 60 , and extracting time was 2.0 hours. Furthermore, procyanidins low polymer and procyanidins high polymer were separated by organic reagent extraction. The composition analysis of procyanidins low polymer by HPLC showed that the compositions of the extracted product were the almost same as the compositions of standard procyanidins.

Key words: comprehensive utilization; grape seed; procyanidins; extraction techniques; composition analysis

原花青素 (Procyanidins, 简称 PC, 英文曾用名 Proanthocyanidins, Pycnogenol, Leucoan-Thocyanidin) 是植物中广泛存在的一类属于双黄酮衍生物的天然多酚化合物, 有人将其归为生物类黄酮^[1,2], 也有人将其归为缩合鞣质^[3]。这类化合物由不同数量的儿茶素或表儿茶素结合而成, 最简单的是儿茶素、表儿茶素或儿茶素与表儿茶素形成的二聚体, 此外还有三聚体、四聚体等直至十聚体。研究表明, 原花青素具有极强的抗氧化特性, 一般存在于植物的果实、种子、花和皮中, 在葡萄、山楂、花生、银杏、白桦树、松树等植物中的含量都很丰富^[4]。原花青素具有多种生物活性, 能防治多种疾病, 以其高效、低毒、高生物利用率而著称, 在植物中其主要作用是保

护植物中易被氧化的成分, 在人体内的抗氧化和清除自由基的能力是 V_E 的 50 倍、V_C 的 20 倍^[5,6], 并且还具具有保护心血管、预防高血压、抗肿瘤、抗辐射、抗突变及美容等作用^[7]。

我国葡萄资源丰富, 每年用于酿造酒和其他饮料的鲜葡萄量很大, 据统计超过 10 万 t。葡萄籽源于葡萄酒的副产品, 占整粒葡萄的 4 % ~ 6 %, 仅此每年我国生产葡萄酒后的废渣中就有 400 ~ 600 万 kg 的葡萄籽^[5,8]。葡萄籽中含有大量的原花青素, 因此充分利用好酿酒后的葡萄籽资源, 不仅物尽其用, 而且还会带来巨大的经济效益。湖南省怀化芷江地区的高山刺葡萄是湖南省农业产业调整中优先发展的一种经济水果, 为了实现对它的

基金项目: 湖南省科技厅资助项目(05SK 3083)。

收稿日期: 2007- 03- 27

作者简介: 马玉美(1982-), 女, 河北廊坊人, 硕士研究生, 主要从事植物功能成分的纯化与应用研究。

通讯作者: 熊兴耀。

综合利用,我们对其籽中的原花青素进行了提取和初步纯化,并用高效液相色谱(HPLC)对所得原花青素的成分进行了分析,初步确定其含有3种原花青素单体。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

试剂:乙醇(95%)、乙酸乙酯、正丁醇、石油醚、浓盐酸、 $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ 、NaCl均为分析纯;甲醇为色谱纯;葡萄籽为湖南省怀化芷江地区产高山刺葡萄籽;原花青素对照品(纯度95%)为天津尖峰天然产物开发公司。

仪器:食品粉碎机,组合恒温磁力搅拌器,RE-52AA旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);SHB-循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);DLSB-5/10型低温冷却液循环泵(郑州长城科工贸有限公司);LXJ-离心沉淀机(上海医用分析仪器厂);D2-2BC型真空干燥箱(天津泰斯特仪器有限公司);ES-1100电子天平(长沙湘平科技发展有限公司);VIS-7220紫外分光光度计(北京瑞利分析仪器厂);LC-10A VP高效液相色谱仪。

1.2 提取方法及影响因素

1.2.1 原花青素的提取工艺流程

葡萄籽(粉碎)→超临界 CO_2 法脱去葡萄籽中的油脂→NaCl溶液处理去除蛋白质→葡萄籽渣→提取剂提取→离心分离→(上清液)减压浓缩→乙酸乙酯萃取→减压浓缩→真空干燥→粗产品

1.2.2 原料处理

1.2.2.1 葡萄籽粉碎

新鲜的葡萄经处理后,收集葡萄籽,自然风干。将干燥好的葡萄籽用粉碎机粉碎至30~40目。

1.2.2.2 超临界 CO_2 法脱脂

为了实现对葡萄籽进行综合利用,首先用超临界 CO_2 法提取葡萄籽油(提取工艺条件和所得葡萄籽油成分分析已有另一论文发表)。

1.2.2.3 盐析法去除蛋白质

将脱脂后的葡萄籽粉阴干,用5%NaCl溶液以1:5料液比于室温下搅拌提取1h以去除其中的蛋白质,抽滤,蒸馏水洗涤葡萄籽渣,滤渣阴干备用。

1.2.3 提取剂种类对提取的影响

原花青素为极性物质,能溶于水和多种有机溶剂。选取乙醇和丙酮作为提取剂。称取100g上述处理好的滤渣10份,置于1000mL三口烧瓶内,分别加入50%、60%、70%、80%和90%的乙醇水溶液和50%、60%、70%、80%和90%的丙酮水溶液各700mL,用60℃恒温水浴加热,搅拌提取2h,冷却后在3600r/min条件下离心20min。将上清液减压蒸馏($\leq 45^\circ\text{C}$)至无馏分馏

出,离心分离。将上清液用铁盐催化比色法^[9]在546nm波长下测定其吸光度。

1.2.4 提取次数对提取的影响

称取100g上述处理好的滤渣1份,置于1000mL三口烧瓶内,加入70%乙醇提取液700mL,用60℃恒温水浴加热,搅拌提取2h,冷却后在3600r/min条件下离心20min。将上清液减压蒸馏($\leq 45^\circ\text{C}$)至无馏分馏出,离心分离。把已提取过的葡萄籽再进行第二次提取和第三次提取,后续处理同前。

分别将3次提取离心分离所得上清液用铁盐催化比色法在546nm波长下测定其吸光度。

1.2.5 正交实验

通过对上述实验结果进行初步分析,认为影响葡萄籽中原花青素提取的主要因素有乙醇水溶液浓度、料液比、提取温度和提取时间。为此设计了四因素四水平正交实验 $L_{16}(4^4)$,以优化提取条件,设计方案见表1。

表1 原花青素提取正交实验因素

水平	A 时间 (h)	B 温度 ($^\circ\text{C}$)	C 溶剂浓度 (%)	D 料液比 (w/v)
1	1.0	40	50	1:7
2	1.5	50	60	1:6
3	2.0	60	70	1:5
4	3.0	70	80	1:4

根据正交实验结果,确定提取刺葡萄籽中原花青素的最佳工艺条件。

1.3 高聚、低聚原花青素的初步分离

准确称取处理好的葡萄籽100g在最佳条件下提取,提取液用旋转蒸发仪减压蒸馏($\leq 45^\circ\text{C}$)至无馏分馏出,离心分离。上清液用4倍体积的乙酸乙酯分4次萃取,合并乙酸乙酯相,减压蒸馏($\leq 35^\circ\text{C}$)至有少量沉淀析出后置于真空干燥箱干燥($\leq 30^\circ\text{C}$)2h。得低聚原花青素粗产品,称重为0.4608g,计算得率为0.4608%。将乙酸乙酯萃取后的水相用3倍体积的正丁醇分5次萃取,合并萃取液,减压浓缩后置于真空干燥箱中真空干燥(40°C)2h,得高聚原花青素粗产品。称重为0.3261g,计算得率为0.3261%。

1.4 原花青素的 HPLC 检测

1.4.1 色谱条件

色谱柱,VP-ODS不锈钢柱(4.5mmID $\times$ 150mm);流动相,甲醇/水(18/86,v/v)(水为二次蒸馏水);流速为0.9mL/min;检测波长280nm;进样量20 μL 。

1.4.2 样品的制备

准确称取0.1000g原花青素标准品(纯度95%,天津尖峰天然产物开发公司),用色谱纯甲醇定容于10mL容量瓶,所得标准品浓度为10mg/mL。准确称取按最佳

工艺制取的低聚原花青素粗产品 0.1000 g, 用色谱纯甲醇定容于 10 mL 容量瓶。将两种样品溶液进行 HPLC 对照检测。

2 结果与分析

2.1 提取剂种类对提取的影响

以不同浓度的乙醇、丙酮水溶液为提取剂, 提取效果见图 1。

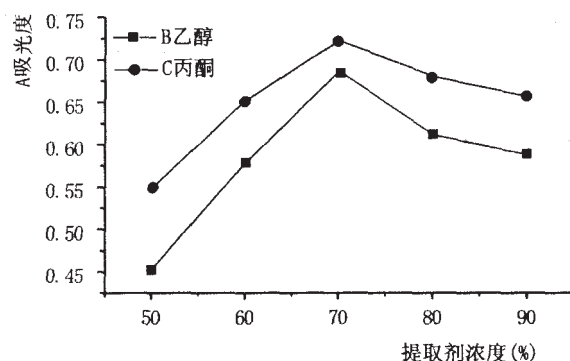


图 1 提取剂对提取的影响

由图 1 可知, 两种有机溶剂的水溶液提取葡萄籽中的原花青素, 提取率变化趋势十分相似, 丙酮的提取效果要好于乙醇, 但乙醇市面价格要远远低于丙酮, 且乙醇无毒, 更适合做天然产物的提取剂。所以, 选用乙醇为提取剂。

2.2 提取次数对提取的影响

提取次数对提取效果的影响结果见表 2。

表 2 提取次数对提取效果的影响

序号	溶剂	温度	时间	料液比	提取次数	A 吸光度
1	70%乙醇	60℃	2h	1:7	1	1.685
2	70%乙醇	60℃	2h	1:7	2	0.168
3	70%乙醇	60℃	2h	1:7	3	0.092

一般情况下, 在提取过程中, 有效成分并不会一次就被提取完全, 有可能经过多次提取才能达到最佳效果。由表 2 可知, 用乙醇做溶剂提取原花青素时, 通过前两次提取, 原花青素已经基本提取完全, 所以最佳提取工艺为提取两次, 提取后将提取液合并。

2.3 正交实验结果分析

按表 1 设计的四因素四水平的正交实验考察诸因素分析各水平的提取效果, 结果见表 3。

由表 3 可知, 第二列即因素 B(提取温度)的极差最大, 是考虑的主要因素, 它的 4 个水平所对应的 OD 平均值中, 以第三水平最大, 所以第三水平最好。第三、四列因素 C 和 D(溶剂浓度和料液比)的极差仅次于因素 B, 其四水平中分别为第二和第一水平为最佳条件。第一

表 3 正交实验结果

实验	因素				吸光度 (OD)
	时间 (h)	温度 (℃)	溶液浓度 (%)	液料比 (n:1)	
1	1	1	4	3	0.332
2	2	1	1	1	0.281
3	3	1	3	4	0.366
4	4	1	2	2	0.361
5	1	2	3	2	0.241
6	2	2	2	4	0.257
7	3	2	4	1	0.316
8	4	2	1	3	0.233
9	1	3	1	4	0.535
10	2	3	4	2	0.497
11	3	3	2	3	0.641
12	4	3	3	1	0.677
13	1	4	2	1	0.677
14	2	4	3	3	0.435
15	3	4	1	2	0.484
16	4	4	4	4	0.281
K_1	1.785	1.330	1.533	1.951	
K_2	1.470	1.047	1.936	1.641	
K_3	1.807	2.350	1.719	1.583	
K_4	1.552	1.856	1.426	1.439	
$\bar{k}_1$	0.4462	0.3325	0.3832	0.4878	
$\bar{k}_2$	0.3675	0.2618	0.4840	0.4102	
$\bar{k}_3$	0.4518	0.5875	0.4298	0.3958	
$\bar{k}_4$	0.3880	0.4640	0.3565	0.3598	
极差	0.0843	0.3257	0.1275	0.1280	
优化方案	A_3	B_3	C_2	D_1	

列因素 A(提取时间)的极差明显小于因素 B、C、D, 所以对实验指标的影响远小于 B、C、D。以上分析可以得出如下结论: 各因素对实验指标的影响按大小排列分别为: $B > D > C > A$, 在实验设计的范围内, 最好的实验方案为: $A_3B_3C_2D_1$, 即提取温度为 60℃, 料液比为 1:7, 提取液浓度为 70%, 提取时间为 2 h。分析得出的最好方案在已经做过的 16 次实验中没有出现, 与它比较接近的是 No.12 实验, 在实验 No.12 中影响最大的因素 B、D 均处于最好的水平, 因素 C 也处于较好的水平, 影响较小的因素 A 稍差, 说明找出的优化方案符合实际。为了确认正交实验的较优组合生产条件的再现性, 最后还进行了优化组合 $A_3B_3C_2D_1$ 的验证实验, 即提取条件为: 提取时间 2 h, 提取温度 60℃, 提取液浓度为 70%, 液料比为 1:7, 测得的吸光度为 0.689, 大于 No.12 实验结果。更加说明正交实验中的最好条件是正确的。因此, 在该条件下提取液中原花青素含量最高, 提取效果最佳。

2.4 原花青素的 HPLC 分析

在相同的色谱条件下, 分别测得提取所得低聚原花青素和原花青素标准样品的 HPLC 图谱, 分别见图 2 和图 3。由图 2 可知, 原花青素标准品在上述色谱条件下

可得到 4 个明显的谱带,而我们按照最佳提取条件所提取的低聚原花青素粗产品在相同检测条件下可得到 3 个与标准品相匹配的谱带(见图 3),由此可以看出,我们所提取的原花青素与原花青素标准品成分基本一致,这也为原花青素的进一步分离纯化打下了基础。

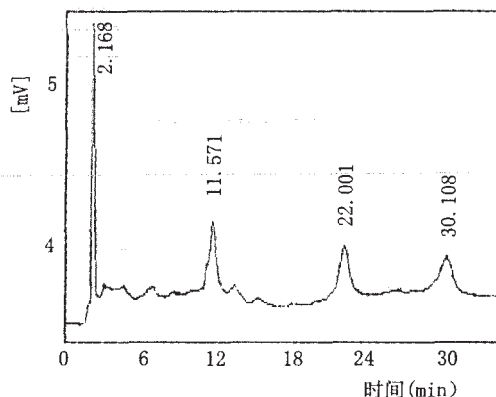


图 2 原花青素标准品色谱图

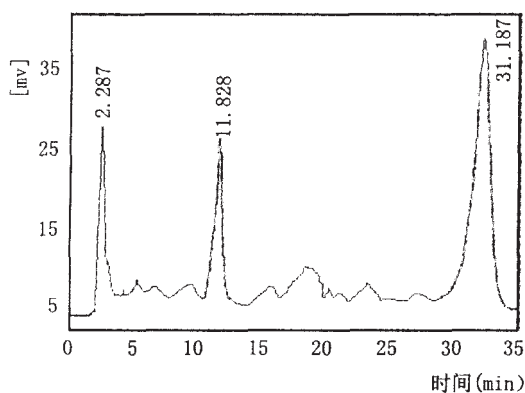


图 3 提取原花青素色谱图

3 结论

3.1 原花青素遇热不稳定,在提取的系列操作中容易

被氧化,应尽量在低温、真空的环境下完成。

3.2 以刺葡萄籽为原料,对其原花青素的提取条件进行了探讨,结果表明,乙醇是一种经济、安全、提取效率较高的提取剂。

3.3 根据正交实验结果得原花青素最佳提取方案:提取温度为 60℃,提取时间为 2 h,提取剂为 70%乙醇,料液比(w/v)为 1:7,提取次数为 2 次。

3.4 根据 HPLC 分析结果,可知在最佳提取条件下提取的低聚原花青素粗产品与原花青素标准品的成分基本一致,为我们进一步分离、纯化低聚原花青素提供了参考。

参考文献:

- [1] 王宪楷.天然药物化学[M].北京:人民卫生出版社,1985.
- [2] 吕丽爽,曹栋.薄层色谱法分离葡萄籽中的低聚原花青素[J].无锡轻工大学学报,2001,20(1): 65- 67.
- [3] 北京医学院.中草药成分化学[M].北京:人民卫生出版社,1980.
- [4] 由倍安.葡萄籽原花青素药理研究进展[J].国外医学·老年医学分册,2003, 24(3): 123- 127.
- [5] 王洪新,汤坚,吴晓燕,等.葡萄籽中抗氧化剂的精制及抗氧化性的测定[J].中国油脂,1990,15(4): 9- 14.
- [6] 万本屹,李宏,董海洲.葡萄籽原花青素提取及其应用研究进展[J].粮食与油脂,2002, (2): 43- 45.
- [7] 向阳,马龙,苏德奇.比色法测定葡萄皮和葡萄籽中原花青素的含量[J].中国公共卫生,2003,19(10): 1228- 1229.
- [8] 吕丽爽,曹栋.葡萄籽中低聚原花青素的研制[J].中国油脂,2001,26(1): 38- 49.
- [9] 傅武胜,蔡一新,林丽玉,等.铁盐催化比色法测定葡萄籽提取物中的原花青素[J].食品与发酵工业,2001,27 (10): 57- 61.
- [10] 欧阳建文.超临界 CO₂ 萃取技术提取刺葡萄籽油的研究[D].长沙:湖南农业大学,2006.

陕西太白酒业加强员工培训

本刊讯:陕西太白酒厂销售收入由 1997 年的 2000 多万元增长到去年的 3.58 亿元,实现利税也增长了 25 倍。企业为何会出现如此大的飞跃?公司董事长张吉焕总结道:企业的兴衰成败取决于人,我们这十年时间里抓职工培训从不间断,职工综合素质的提高为企业的快速发展奠定了可靠的基础。

地处眉县金渠镇的太白酒业公司,位置相对偏僻,信息相对封闭,自 1998 年以来,公司每年至少举办二期“市场营销”、“企业管理”等主题的培训,到现在已举办了 20 多期。这些培训班的举办使广大干部职工开阔了眼界,活跃了思维,提升了素质。为企业不断进行创新提供了保障,企业也从小到大,由弱到强,连续 9 年实现跨越式发展,跃入全国白酒行业百强的前 40 多名,企业先后获得中国优质酒,中国历史文化名酒,世界历史文化名酒,中国商业名牌企业,中国白酒工业百强企业,全国酿酒行业百名先进企业,全国守合同重信用企业,全国质量效益型先进企业,陕西中华老字号企业等荣誉称号,今年一季度,公司实现销售收入 8200 万元,同比增长 39.8%,实现利税 1757 万元,同比增长 46%。

为了使职工的学习和培训规范化、常态化,“五一”前夕他们专门成立了公司培训学院,恰逢首期特训班开学之际,中国商业联合会何济海会长专程来到陕西省太白酒业责任有限公司调查研究,他深情寄语公司正在培训的职工,一定要加强学习,在工作中勇挑重担、吃苦耐劳,以感恩之心为企业服务,商贸企业一定要崇尚诚信,诚信为本才能做大做强企业。(江源)