

# 葡萄籽原花青素的分离纯化及其自由基淬灭活性的研究（上）

马庆一，宋彦显，赵松涛

（郑州轻工业学院食品与生物工程学院，河南 郑州 450002）

**摘要：**葡萄籽经有机溶剂梯度法及酶法提取，大孔树脂初步纯化，薄层色谱法分离纯化得到原花青素单体和二聚体。结果表明，以 60%乙醇于 50℃ 下浸提 3 次、每次 30 min（固液比 1:7, w/v）效果最好；梯度提取各组分原花青素得率为：（7.73~281.49）mg/100 g 葡萄籽，其中以乙酸乙酯组分最高，其次为丙酮、乙醇、乙醚。在浓度为 0.004 g/mL 时，淬灭自由基活性最高的是乙醇组分，抑制率为 85.13%，其次是乙醚（77.60%）和乙酸乙酯组分（48.64%）。大孔树脂纯化以 40%乙醇最佳。以制备薄层法（展开体系： $V_{\text{甲苯}}:V_{\text{丙酮}}:V_{\text{乙酸}}=2:2:1$ ）分别对乙酸乙酯、乙醚组分进行纯化，前者原花青素单体和二聚体的百分含量分别为 33.25%和 16.23%，后者为 60.64%和 10.13%。

**关键词：**葡萄籽；原花青素；梯度提取；酶法提取；分离；纯化；薄层色谱；自由基淬灭活性

**中图分类号：**R284.2；**文献标识码：**A；**文章编号：**1673-9078(2007)04-0001-05

## Study on Isolation, Purification and the Free-radical Scavenging Effect of Proanthocyanidins from Grape Seed (I)

MA Qing-yi, SONG Yan-xian, ZHAO Song-tao

(Zhengzhou University Of Light Industry school of Food and Biological Engineering, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** The monomer and dimer of proanthocyanidins in grape seeds were obtained by gradient and enzymatic extraction, isolation with macroporous adsorption resin, and purification by TLC. The results showed that the optimum extraction conditions were as follows: 60% ethanol (1:7 w/v), at 50℃ and 3 times (30 min/time). The extraction ratios of proanthocyanidins in gradient extractions were (7.7341~281.494) mg/100 g grape seeds and highest content of proanthocyanidins was achieved using the ethyl acetate as extraction reagent followed by acetone, ethanol and ether. The free-radical scavenging effect of the ethanol extracts was higher (with the inhibitory ratio being of 85.13%) than those of ether extracts (77.60%) and ethyl acetate extracts (48.64%)(conc.0.004 g/mL). High content of oligomeric proanthocyanidins isolated by macroporous adsorption resin were achieved using 40% ethanol. After purification with TLC (elution system: toluene/acetone/acetic acid=2/2/1), the yields of monomer and dimer in ethyl acetate and ether components were 33.25%, 60.64% and 16.23%, 10.13%, respectively.

**Key words:** grape seeds; proanthocyanidins; enzymatic extraction; gradient extraction; isolation; purification; thin layer chromatography (TLC); free-radical scavenging effect

20 世纪 80 年代以来的医学研究发现，原花青素单体、二聚体及高聚体具有抗氧化（其清除自由基的能力是  $V_C$  的 50 倍， $V_E$  的 20 倍<sup>[1]</sup>）、抗突变、抗心血管疾病，延缓衰老等活性，并因此引起了极大的关注。但提取率低、难以纯化等困难严重制约原花青素的应用，因此亟待提取及纯化方面获得新的突破。本课题的设计着眼于葡萄籽原花青素系统的提取、分离、纯化工艺条件的优化，包括酶法提取、60%乙醇浸提、

收稿日期：2006-12-12

作者简介：马庆一(1944-)，男，教授，研究生导师，博士后，研究方向：天然抑菌剂，天然抗氧化剂，可食性涂膜保鲜，食品功能基料及保健食品等

有机溶剂梯度分离，大孔树脂初步纯化，制备薄层色谱纯化，以期最终得到原花青素单体和二聚体。所有的实验步骤均进行化学结构和抗氧化活性跟踪，以找到提取、分离、纯化葡萄籽原花青素的最佳条件和工艺方法，为葡萄籽原花青素的进一步研究与产品开发提供依据。

### 1 实验材料与方法

#### 1.1 主要仪器及试剂

721 紫外可见分光光度计；ZFQ85A 旋转蒸发器；恒温磁力搅拌器；GL-18C 高速台式离心机。

葡萄籽: 购自明权葡萄酒厂; DPPH·(1,2-二苯基-2-苦肼基): Fluka Chemie GmbH Sigma-Aldrich; 原花青素标样: 天津尖峰天然产物研究开发公司; 其余试剂均为国产分析纯。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 原花青素含量的测定<sup>[2]</sup>

标准曲线绘制: 取 6 个 10 mL 的容量瓶, 依次加入 0.5 mg/mL 的原花青素标准溶液 50  $\mu$ L、100  $\mu$ L、200  $\mu$ L、300  $\mu$ L、400  $\mu$ L、600  $\mu$ L, 再分别加 6 mL 4% 香草醛甲醇溶液、3 mL 浓盐酸, 用甲醇定容至 10 mL, 摇匀, 20 $\pm$ 1  $^{\circ}$ C 避光反应 15 min, 以甲醇代替样品溶液作空白对照, 于 500 nm 处测吸光度值, 作标准曲线, 得线性回归方程为  $y=2.3818x+0.0013$ ,  $R^2=0.9966$ 。

### 1.2.2 DPPH·(1,1-二苯基-2-苦肼基)法清除自由基活性测定

取 DPPH·( $1\times 10^{-4}$  mol/ml) 4 mL, 加入适量样品溶液, 摇匀, 25  $^{\circ}$ C 水浴 30 min, 于 517 nm 处测定吸光度值, 记为  $A_2$ ; 以相应溶剂代替 DPPH·, 加入样品, 测吸光度值, 记为  $A_1$ ; 不加 DPPH·测吸光度值, 记为  $A_3$ 。并计算抑制率(%): 抑制率(%)=( $A_3+A_1-A_2$ )/ $A_3\times 100\%$ 。

### 1.2.3 加酶提取法

取纤维素酶、果胶酶、 $\alpha$ -淀粉酶各 10.0 mg, 分别用水定容至 50 mL, 在 9 试管中分别加 3 mL 的水、纤维素酶、果胶酶、 $\alpha$ -淀粉酶、纤维素酶-果胶酶混合液 (v/v, 1:1)、纤维素酶- $\alpha$ -淀粉酶混合液 (v/v, 1:1)、果胶酶- $\alpha$ -淀粉酶混合液 (v/v, 1:1)、纤维素酶-果胶酶- $\alpha$ -淀粉酶混合液 (v/v/v, 1:1:1)、60%乙醇, 并编号为 1~9#。然后各加入 0.5 g 葡萄籽, 用柠檬酸调 pH 值至 5.0, 50  $^{\circ}$ C 水浴 14 h, 迅速升温至 70  $^{\circ}$ C 后灭菌 30 min。过滤, 定容, 用等体积乙醚萃取两次, 水相再用乙酸乙酯萃取, 乙醚相、水相及乙酸乙酯相匀浓缩至 3 mL。用硫酸-香草醛显色法初步判断化合物类型, 原花青素单体和二聚体标准品薄层色谱  $R_f$  值对照法确定产物聚合度, 测各组分原花青素含量和 DPPH·清除自由基活性。

### 1.2.4 索氏梯度提取

#### 1.2.4.1 乙醇提取和索氏梯度分离

取一定量 40 目的葡萄籽用 60%乙醇 50  $^{\circ}$ C 下搅拌浸提 3 次, 每次 30 min (固液比 1:7), 过滤, 合并滤液, 得原花青素粗提物<sup>[3,4]</sup>。粗提物浓缩至干, 加硅藻土移出, 研碎, 用有机溶剂极性由低到高 (石油醚、二氯甲烷、乙醚、乙酸乙酯、丙酮、乙醇) 的顺序依次进行索氏提取, 并测定各提取组分干重、原花青素含量及清除自由基活性。

#### 1.2.4.2 梯度分离组分显色及定性试验<sup>[5]</sup>

取直径 8cm 的圆滤纸, 分为 8 个大小均等的区域, 用毛细管在每个区域距圆心 1.2 cm 处的中央位置点样, 同时用吹风机快速吹干 (防扩散)。每 4 个样点为一组, 每张滤纸点两种不同的组分, 把石油醚、二氯甲烷、乙醚、乙酸乙酯、丙酮、乙醇组分分别记为  $A_x$ 、 $B_x$ 、 $C_x$ 、 $D_x$ 、 $E_x$ 、 $F_x$ 。点样结束在滤纸中心穿一纸芯, 用甲醇作展开剂, 在两个相扣的培养皿中展开 (滤纸芯与展开剂接触)。当层析前沿达到滤纸边缘时, 取出吹干, 并将各色谱带剪开, 分别喷 2% 的三氯化铁溶液、香草醛-硫酸、亚硝酸钠-醋酸溶液 (10%  $\text{NaNO}_2$ +HAc)、碘酸钾饱和溶液, 吹干、观察。用  $\alpha$ -萘酚法、盐酸-镁粉法、茴香醛-浓硫酸作定性实验, 观察现象。

#### 1.2.5 大孔树脂分离纯化乙酸乙酯组分<sup>[6]</sup>

##### 1.2.5.1 静态吸附实验

取定量经预处理的 D101 大孔树脂置于锥形瓶中, 加入 50 mL 乙酸乙酯提取液 (原花青素浓度为 2.00 mg/mL), 不停摇动, 每隔 30 min 从上清液中取样, 检测原花青素含量。

##### 1.2.5.2 动态吸附实验

以不同流速上样, 检测流出液中原花青素的含量, 并计算其吸附率 (%):

吸附率 (%) = (1 - 流出液中原花青素含量 / 上样总含量)  $\times 100\%$

##### 1.2.5.3 动态洗脱实验

依次用水、20%乙醇、40%乙醇、60%乙醇、80%乙醇、无水乙醇和丙酮以试验确定的最佳流速进行洗脱 (洗脱液用量均为床体积的两倍)。将各梯度洗脱液浓缩、定容, 以盐酸—香草醛法测含量, 再用 DPPH·法活性跟踪, 最后用薄层色谱法验证活性物质。

### 1.2.6 薄层色谱研究

#### 1.2.6.1 展开剂选择

以硅胶 G 制分析板, 用下列展开体系进行实验: (I) v 苯:v 丙酮:v 冰醋酸:v 氯甲烷=5:3:1:1; (II) v 苯:v 丙酮:v 冰醋酸:v 氯甲烷=5:3:3:1; (III) v 苯:v 丙酮:v 冰醋酸:v 氯甲烷:v 甲醇=5:3:1:1:10; (IV) v 甲苯:v 丙酮:v 冰醋酸=2:2:1; (V) v 甲苯:v 丙酮:v 冰醋酸=3:3:2; (VI) v 甲苯:v 丙酮:v 冰醋酸=1:1:1。显色剂: 1% 香草醛—浓硫酸或 2% 三氯化铁溶液。

#### 1.2.6.2 薄层分析实验

固定相: 硅胶 g, 展开体系: v 甲苯:v 丙酮:v 冰醋酸=2:2:1。

#### 1.2.6.3 薄层色谱法制备原花青素单体和二聚体

以硅胶 G 制成的分析板为固定相, 分别以 1.2.6.1 筛选出的最佳展开体系进行薄层层析, 初步确定各样  $R_f$  值。取一定量的待制组分, 在制备板 (硅胶为 GF254)

上分别用毛细管对一定量的不同组分点样，边点样边吹干(防扩散)，点完后，用风机吹干在层析缸中展开，展开完毕，再次吹干，在荧光灯下划分各条带(取少部分用三氯化铁显色验证)，计算各带的  $R_f$  值并与初步确定的  $R_f$  值比较。分离各条带，用乙醇浸出，浓缩并分别定容至 3 mL，分别测定原花青素含量及活性。

## 2 结果与讨论

### 2.1 加酶提取法

#### 2.1.1 各组分原花青素含量测定

测定酶处理后各组分原花青素含量如图 1 所示，由图 1 可知：(1) 三溶剂组分中的原花青素的含量以乙醚最多，乙酸乙酯次之，水最低。(2) 经酶处理后原花青素含量普遍有所增加，其中以果胶与纤维素的混合酶提取效率增加最为显著，此结果表明，是因葡萄籽原花青素与细胞壁中的纤维素和果胶键连而使其不易提取出来。(3) 酶处理的整体效果不如 60%乙醇，这可能是因为乙醇可以有效地切断原花青素与其它生物大分子结合的键，使其顺利释放出来，同时它还是原花青素的优良溶剂。

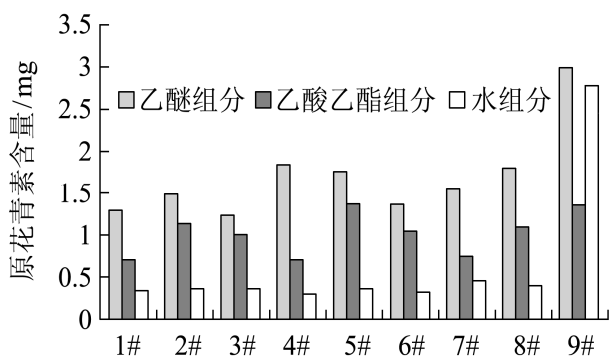


图 1 酶提取各组分原花青素含量

#### 2.1.2 DPPH·法活性测定

用 DPPH·法测定乙醚、乙酸乙酯和水等三组分的活性，其结果分别见图 2。结果表明乙醚组分中原花青素的含量虽比乙酸乙酯、水中的高，但其活性却不如两组分。

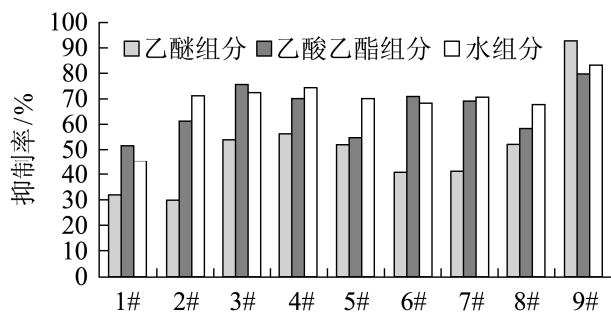


图 2 酶提取各组分清除自由基活性比较

### 2.2 索氏梯度提取

2.2.1 测得梯度提取各组分干物质质量，原花青素含量结果见图 3，各组分活性见图 4。

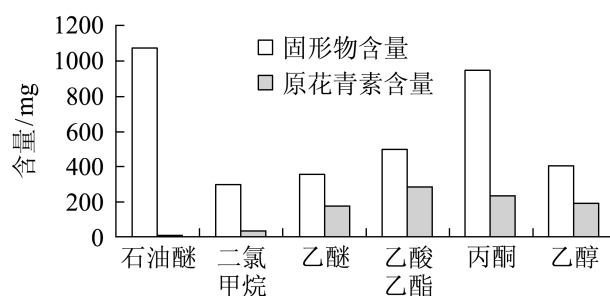


图 3 各组分固形物及原花青素含量

由图 3 可看出：梯度提取各组分固形物含量：石油醚 > 丙酮 > 乙酸乙酯 > 乙醇 > 乙醚 > 二氯甲烷，原花青素得率为：7.734~281.494 mg/100 g 葡萄籽，其中以乙酸乙酯组分最高，其次为丙酮、乙醇、乙醚，最低的是石油醚。虽然石油醚组分中固形物含量最高，但原花青素含量却最低，这说明固形物含量高并不意味着原花青素含量高。石油醚组分中可能含有大量的葡萄籽油，同时含有脂溶性色素和蜡等低极性物质，丙酮组分中含有极性相对大一些的物质如糖、蛋白质等，乙酸乙酯组分中则含有大量的低聚原花青素，乙醚组分中含有原花青素单体。

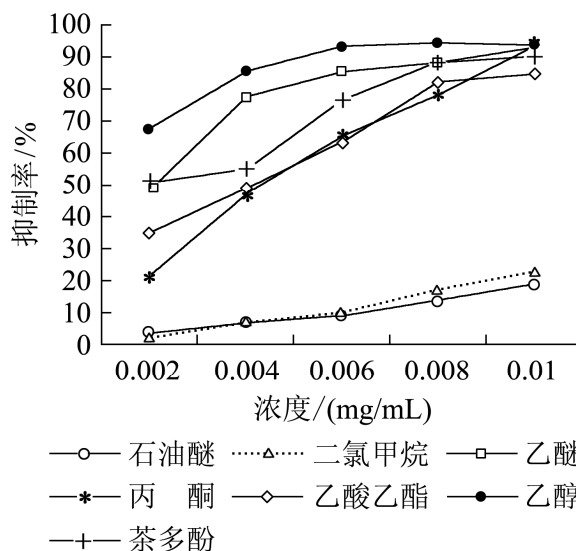


图 4 各提取组分活性比较

由图 4 看出，随着浓度增加，所有组分的抑制率都增大，浓度足够大时抑制率均接近 100%，因此选择 0.004 g/mL 的浓度比较抑制率：乙醚和乙醇组活性最高，比茶多酚还强，乙酸乙酯、丙酮组分活性稍低于茶多酚，二氯甲烷、石油醚活性很低。

#### 2.2.2 显色反应结构跟踪

从表 1 可以看出,石油醚、二氯甲烷组分中基本不存在带有邻位酚羟基、间苯三酚型、六羟基二酸酯、焙酸酯和糖等物质;而乙酸乙酯、丙酮、乙醚、乙醇

组分中含有带邻位酚羟基、间苯三酚型、六羟基二酸酯、焙酸酯和糖等物质,由此可以判定乙醚、乙酸乙酯、丙酮、乙醇组分中含有原花青素。

表 1 各梯度提取物显色反应结构跟踪

	2%三氯化铁溶液	茴香醛-硫酸	亚硝酸钠-醋酸溶液	碘酸钾饱和溶液	$\alpha$ -萘酚
石油醚	—	—	—	—	—
二氯甲烷	—	—	—	—	—
乙醚	+(蓝黑色)	+(血红色)	+(红砖褐色)	+(红砖褐色)	+(紫红色环)
乙酸乙酯	+(浅蓝黑色)	+(血红色)	+(红砖褐色)	+(红砖褐色)	+(深紫色环)
丙酮	+(蓝黑色)	+(血红色)	+(红砖褐色)	+(红砖褐色)	+(深紫色环)
乙醇	+(浅蓝黑色)	+(血红色)	+(红砖褐色)	+(红砖褐色)	+(深紫红色)

注:“+”表示显色反应呈阳性,“-”表示显色反应呈阴性。

### 2.3 大孔树脂分离纯化乙酸乙酯组分

#### 2.3.1 静态吸附

测得 D101 大孔树脂静态吸附曲线如图 5。

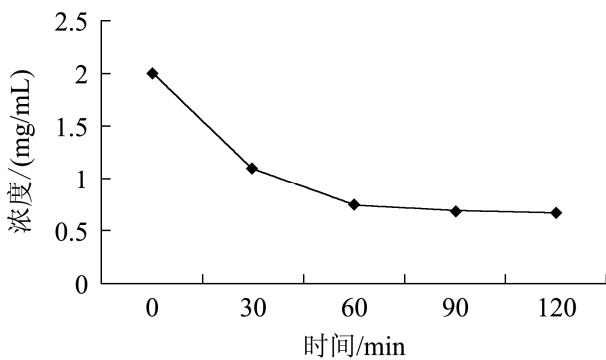


图 5 D101 大孔树脂静态吸附曲线

由图 5 可知 D101 大孔树脂在一个小时后基本达到吸附平衡。

#### 2.3.2 动态吸附

一般来说,葡萄籽提取物在不同的流速下动态吸附时,进样慢有利于提高吸附率,但太慢则会延长操作时间,如果进样流速过快则其吸附率会降低,根据反复实验,选用 50 cm/h 为易。

#### 2.3.3 动态洗脱

取 2 mL 乙酸乙酯提取物上柱,依次用水、20%乙醇、40%乙醇、60%乙醇、80%乙醇、无水乙醇和丙酮洗脱。洗脱速度 50 cm/h,每一洗脱剂使用量均定为两个柱体体积,跟踪测定各洗脱液原花色素含量,结果如图 6、表 2。

由图 6 可知,原花青素主要被 40%乙醇洗脱液洗脱。

从表 2 试验结果可以明显地看出,无水乙醇、丙酮组分增加自由基,而水、20%乙醇、40%乙醇、60%乙醇组分具有自由基抑制活性。

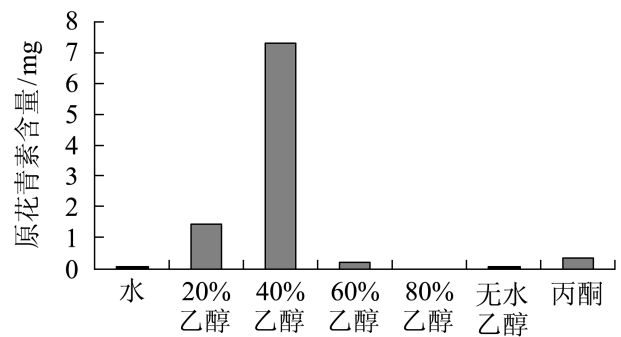


图 6 洗脱液中原花青素的含量

表 2 洗脱液 DPPH 抑制活性跟踪结果

洗脱液	水	乙醇					丙酮
		20%	40%	60%	80%	无水	
取样量/ $\mu$ L	200	60	20	200	200	200	200
溶剂+样品	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.004	0.000
样品+DPPH	0.490	0.244	0.151	0.602	0.707	0.778	0.962
DPPH+溶剂	0.666	0.664	0.675	0.682	0.678	0.668	0.673
抑制率/%	27.08	63.69	77.53	10.42	—	—	—

### 2.4 薄层色谱研究

#### 2.4.1 展开剂选择

选择合适的展开剂是薄层色谱分离成功的关键,选择的依据是吸附剂的极性和被分离样品的极性。在一个多元展开体系中各个溶剂起着不同的作用,极性较大的溶剂可以使化合物在薄层上移动加快,极性较小的溶剂降低其  $R_f$  值,中等极性的溶剂可使极性相差较大的溶剂混合均匀,在展开剂中加入少量的酸可使某些极性物质的斑点集中,减少拖尾。低聚原花青素极易溶于水,极性较大,据上述原则我们选择以硅胶 G 制成的分析板为固定相,以不同的展开体系进行实验,各个组分的  $R_f$  值见表 3。



表 3 不同的展开体系下各组分的 R<sub>f</sub> 值

体系	单体 R <sub>f</sub>	二聚体 R <sub>f</sub>	备注
I	0.553	0.096	单体、二聚体集中, 但二聚体的 R <sub>f</sub> 值较小且分离不明显
II	0.642	0.236	二聚体成带状, 分离不明显
III	0.586	0.126	二聚体成带状, 分离不明显
IV	0.671	0.335	二聚体分开
V	0.692	0.367	二聚体分开但拖尾
VI	0.697	0.390	二聚体分开但拖尾

研究发现使用过多的甲醇、冰乙酸虽可提高物质的 R<sub>f</sub> 值, 同时也是某些物质拖尾。其中苯和甲苯是增加体系的选择性, 冰乙酸是增加体系的极性, 丙酮使体系混合均匀。根据薄层扫描的需要选择体系 IV 即: v<sub>甲苯</sub>:v<sub>丙酮</sub>:v<sub>冰乙酸</sub>=2:2:1 作为展开体系进行薄层层析。

#### 2.4.2 对各个提取组分的定性研究

对梯度提取石油醚、二氯甲烷、乙醚、乙酸乙酯、丙酮、乙醇组分和梯度萃取乙醚、乙酸乙酯、水组分进行薄层分析和标准品对照可知: 梯度提取石油醚、二氯甲烷组分中几乎不含原花青素, 乙醚组分中含有大量的原花青素单体和少量的低极性物质, 乙酸乙酯组分中含有少量的单体和大量的二聚体(其中二聚体的种类很多)及部分低聚原花青素, 丙酮和乙醇组分不含单体和二聚体而含有极性不同的聚合原花青素。梯度萃取乙醚组分含有大量的原花青素单体和少量的低极性物质, 乙酸乙酯组分中含有少量的单体和大量的二聚体及部分低聚原花青素。

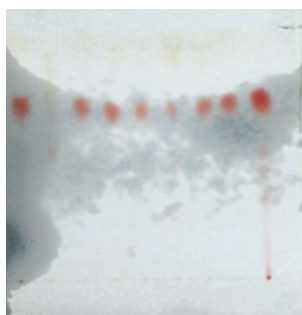


图 7 乙醚组分薄层图

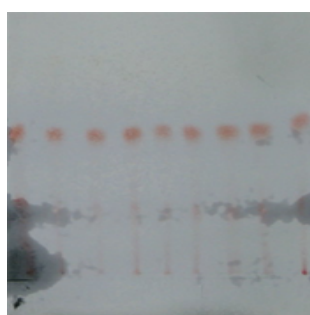


图 8 乙酸乙酯组分薄层图

#### 2.4.3 薄层色谱法制备原花青素单体和二聚体

由 2.4.2 可知原花青素的单体和二聚体主要分布在乙醚组分和乙酸乙酯组分, 故选取乙醚或乙酸乙酯组分来制备原花青素单体和二聚体。制备出的物质, 能否浸出完全, 直接影响着单体和二聚体的含量, 应依次用 20 mL 的乙醇浸泡, 过滤, 然后用园滤纸法检验滤液中是否含所需物质, 依次检验直至检不出为止(一般用 20 mL 的乙醇浸泡三次即可)。

表 4 乙酸乙酯组分经薄层后各部分活性及原花青素含量

	单体	二聚体	其它
抑制率/%	62.35	90.25	95.36
百分含量/%	33.25	16.23	50.52

注: 此处百分含量是指制备物质占原花青素总含量的百分数, 而非占组分中固形物重量的百分数(表 5 同)。

表 5 乙醚组分经薄层后各部分活性及原花青素含量

	单体	二聚体	其余
抑制率(%)	91.91	92.02	45.75
百分含量(%)	60.64	10.13	29.93

由表 4、5 可知: 乙酸乙酯组分和乙醚组中原花青素单体的百分含量分别为 33.25%和 60.64%, 原花青素二聚体的百分含量分别为 16.23%和 10.13%。

### 3 结论

3.1 制备纯原花青素的最佳条件为: 60%乙醇于 50 °C 下浸提 3 次, 每次 30 min (固液比 1:7), 过大孔树脂柱取 40%乙醇组分, 以制备薄层色谱法纯化, 展开体系为 v<sub>甲苯</sub>:v<sub>丙酮</sub>:v<sub>冰乙酸</sub>=2:2:1。

3.2 梯度提取各组分原花青素得率为: (7.73~281.49) mg/100 g 葡萄籽, 其中以乙酸乙酯组分最高, 其次为丙酮、乙醇、乙醚。在浓度为 0.004 g/mL 时, 淬灭自由基活性最高的是乙醇组分, 抑制率为 85.13%; 其次是乙醚 (77.60%) 和乙酸乙酯 (48.64%)。

3.3 乙酸乙酯、乙醚组分的原花青素单体和二聚体相对含量分别为 33.25%和 16.23%, 后者为 60.64%和 10.13%。

### 参考文献

- [1] Wood Jacqueline E, Senthilmohan Senti T, Peskin Alexander V. Antioxidant activity of procyanidin-containing plant extracts at different pH[J]. Food Chemistry, 2002,77(2):155-161.
- [2] 姚开, 何强等. 葡萄籽提取物中原花青素含量不同测定方法的研究[J]. 化学研究与应用, 2002,(4): 230-232
- [3] 吕丽爽, 曹栋. 脱脂葡萄籽中低聚原花青素的提取[J]. 无锡轻工大学学报, 2001,20,(5):207-209
- [4] 吕丽爽. 葡萄籽中低聚原花青素提取工艺初探[J]. 食品工业科技, 2002,23(1):17-20
- [5] 王宪楷. 天然产物化学[M]. 北京: 人民卫生出版社. 1980
- [6] 张峻, 吉伟等. 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):31-34