

板栗壳中原花青素大孔吸附树脂分离纯化工艺优化*

张海晖 段玉清 李金凤 马海乐 邵婷婷 徐菲菲

(江苏大学食品与生物工程学院, 镇江 212013)

【摘要】 比较了12种大孔吸附树脂对板栗壳中原花青素的吸附与解吸性能,在静态吸附研究基础上,筛选出效果较好的树脂进行动态试验,并对所得组分原花青素含量及其相对分子量进行分析。结果表明,AB-8大孔吸附树脂分离纯化CSPCs效果最佳,上样质量浓度为1.864 mg/mL,流速为2 mL/min;当用体积分数为50%乙醇以1 mL/min的流速洗脱4个柱体积时,CSPCs的累积回收率可达94.2%,含量为89.8%。经质谱分析,分子量范围为289.4~1 154.9,聚合度在4以内。

关键词: 原花青素 板栗壳 大孔吸附树脂 分离纯化

中图分类号: TS209 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2011)05-0156-04

Separation and Purification Procyanidins from Chestnut-shells
by Macroporous Resin

Zhang Haihui Duan Yuqing Li Jinfeng Ma Haile Shao Tingting Xu Feifei

(School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract

With the aim to separate and purify procyanidins from chestnut-shells (CSPCs) by macroporous resin, twelve macroporous resins were tested for their static adsorption/desorption performance towards CSPCs. Based on the static adsorption experiments, the suitable macroporous resin was screened to carry out dynamic adsorption experiment, the content and the relative molecular weight of CSPCs were analyzed. The results showed that AB-8 was the optimal macroporous resin for separating and purifying CSPCs, the optimum separating condition was as follows: the mass concentration and the sampling rate were 1.864 mg/mL and 2 mL/min, respectively. The total recovery of CSPCs reached 94.2% eluted with 50% ethanol of 4 BV at a flow velocity of 1 mL/min, and the content of the total CSPCs in the obtained fine product was 89.8%. Analysis of CSPCs by ESI-MS demonstrated the molecular weight ranged from 289.4 to 1 154.9 (M + H) within 4 of average polymeric degree.

Key words Procyanidins, Chestnut-shells, Macroporous resin, Separation and purification

引言

板栗生产和加工过程中近8.9%~13.5%的板栗壳仍主要以燃烧和自然腐烂方式被废弃,仅有少数利用板栗壳制备活性炭、吸附水中重金属离子和杀虫剂的文献报道^[1~7]。因此充分利用板栗废弃资

源以提高其附加值具有重要经济价值。板栗壳粗提物中富含原花青素(procyanidins from chestnut-shells, 简称CSPCs),因原花青素具有较强的清除自由基和抗氧化活性、改善心血管疾病、抗癌、抗辐射和抗病毒等生物活性^[8~9],其在农业和医药等领域得到广泛应用。因此寻找适合于原花青素工业化生

收稿日期: 2010-07-12 修回日期: 2010-08-24
* 国家自然科学基金资助项目(309700309)、国家博士后基金资助项目(20100471379)、江苏省高校自然基金资助项目(05KJB550011)、江苏大学人才基金资助项目(05JDG013、128300289)和江苏高校优势学科建设工程资助项目
作者简介: 张海晖,副教授,主要从事农副产品活性因子提取分离技术研究,E-mail: z_haihui@163.com
通讯作者: 段玉清,副教授,主要从事农产品加工与贮藏工程研究,E-mail: dyq101@ujs.edu.cn

产的分离纯化方法是非常重要的。

现已提取的板栗壳粗提物中原花青素纯度较低,需进一步分离纯化。因大孔吸附树脂具有选择性好、吸附容量大、吸附迅速和解吸容易、再生效果好等优点,其在天然产物工业化提取分离中得到广泛应用^[10-12]。本文以板栗壳粗提物为原料,通过 12 种国产大孔吸附树脂对板栗壳原花青素的吸附和解吸特性进行研究,选择对板栗壳原花青素具有优良吸附、解吸性能的树脂,并对其分离纯化原花青素的工艺进行优化,旨在为板栗壳原花青素粗提液纯化工艺提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂材料

NKA-Ⅱ、NKA、D-101、HPD-700、DM-301、D101、S-8、DM130、D1400、HPD-100、DA-201、AB-8 大孔树脂均购于南开大学化工厂。原花青素对照品(纯度大于 98%)购于天津尖峰天然产物研究开发有限公司。

1.2 方法

1.2.1 CSPCs 的总提取工艺

提取工艺为:板栗壳去杂、清洗、干燥→粉碎→过筛(40 目)→50% 乙醇溶液、料液比(物料质量(g)与乙醇溶液体积(mL)的比例)1:15、60℃ 水浴提取 2 h、提取 3 次→过滤→合并 3 次滤液→40℃ 下浓缩→过柱。

1.2.2 静态吸附和解吸试验

分别称取预处理好的 NKA-Ⅱ、NKA、D-101、HPD-700、DM-301、D101、S-8、DM130、D1400、HPD-100、DA-201、AB-8 湿树脂各 5 g,分别加入 100 mL 的具塞三角瓶中,随后分别加入质量浓度为 0.474 7 mg/mL 的原花青素粗提液 50 mL,于 25℃ 下恒温振荡 10 h,充分吸附后过滤,滤液于 280 nm 测定吸光度,各种树脂的吸附量和吸附率计算公式为

$$Q = \frac{(C_0 - C_1) V_1}{W} \tag{1}$$

$$E_1 = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100\% \tag{2}$$

式中 Q——吸附量,mg/g E₁——吸附率,%
W——树脂湿质量,g
C₀——起始质量浓度,mg/mL
C₁——达到吸附平衡时上层溶液质量浓度,mg/mL
V₁——吸附液体积,mL
过滤后的树脂用 50 mL 95% 的乙醇溶液进行洗

脱,直至洗脱液吸光度不再变化时测定原花青素的含量,各树脂的解吸率计算公式为

$$E_2 = \frac{V_2 C_2}{(C_0 - C_1) V_1} \times 100\% \tag{3}$$

式中 E₂——解吸率,%
C₂——洗脱液质量浓度,mg/mL
V₂——解吸液体积,mL

1.2.3 吸附动力学试验

取静态吸附试验中筛选出的对原花青素吸附率和解吸率较好 3 种树脂(DM-301、D101、AB-8)各 5 g,分别加入 100 mL 具塞三角瓶中,再分别加入质量浓度为 0.474 7 mg/mL 的原花青素粗提液 50 mL,于 25℃ 下共振荡 12 h,期间每隔一定时间测定上清液中原花青素质量浓度,计算吸附量 Q。

1.2.4 动态吸附和解吸试验

将处理好的树脂湿法装柱并平衡静置 12 h 后,将原花青素粗提液以不同流速上柱吸附,每 5 mL 收集 1 管,于 280 nm 处测定流出液吸光度,绘制泄漏曲线;吸附平衡后用 4 倍柱体积的蒸馏水冲洗去除水溶性多糖和色素等杂质,再用不同体积分数的乙醇溶液以一定流速洗脱,收集洗脱液于 280 nm 处测定原花青素质量浓度。

2 结果与讨论

2.1 原花青素标准曲线

配制质量浓度为 1 mg/mL 的原花青素标准溶液 50 mL,分别移取上述原花青素标准溶液 2、4、6、8、10 mL 于 10 mL 刻度试管中,加蒸馏水定容至 10 mL,混匀后,于 280 nm 处测定吸光度,绘制吸光度与原花青素质量浓度的关系曲线,其回归方程为 y = 10.863x + 0.033 3, R² = 0.997 4,表明在 0 ~ 1 mg/mL 范围内吸光度与原花青素质量浓度具有良好的线性关系。

2.2 静态吸附与解吸性能试验

大孔吸附树脂对原花青素的静态吸附-解吸性能测定结果(表 1)表明,静态吸附中 S-8 大孔树脂吸附率最大,其次是 DA-201 和 DM130,而 D-101、HPD-700、DM-301、D101、AB-8 对原花青素吸附量均在 71% ~ 76% 之间;解吸性能以 DM-301、D101、AB-8 效果最好。为此,选择吸附和解吸性能均较好的 DM-301、D101、AB-8 三种树脂进行吸附动力学研究。

2.3 吸附动力学试验

从图 1 可以看出,3 种树脂对 CSPCs 的吸附均为快速平衡型,在 6 h 内基本达到平衡,且 AB-8 的吸附量均大于 DM-301 和 D101,而且 AB-8 在 0 ~

表 1 12 种树脂对 CSPCs 的静态吸附和解吸性能

Tab. 1 Static absorption and desorption properties of 12 resins for CSPCs

树脂型号	粒径/mm	比表面积/m ² ·g ⁻¹	平均孔径/nm	极性	吸附率/%	解吸率/%
NKA-Ⅱ	0.3~1.25	160~200	14.5~15.5	极性	37.88	21.97
NKA	0.3~1.25	570~590	20.0~22.0	非极性	49.40	26.56
D-101	0.2~0.6	400~600	10.0~12.0	非极性	71.62	62.00
HPD-700	0.3~1.25	650~700	8.5~9.0	非极性	73.37	62.87
DM-301	0.3~1.25	330~380	13.0~17.0	中极性	73.73	88.84
D101	0.2~0.6	400~600	10.0~12.0	弱极性	75.81	87.00
S-8	0.315~1.25	100~120	28.0~30.0	极性	89.59	17.31
DM130	0.3~1.25	500~550	9.0~10.0	弱极性	78.03	67.01
D1400	0.3~1.25	530~570	6.5~7.5	非极性	67.96	55.29
HPD-100	0.3~1.2	650~700	8.5~9.0	非极性	69.35	43.27
DA-201	0.315~1.25	250~300	20.0~30.0	极性	79.19	52.59
AB-8	0.3~1.25	480~520	13.0~14.0	弱极性	74.83	91.83

0.5 h 之间吸附速率最大(1.077 8 mg/(g·h))。综合考虑选择 AB-8 树脂进行后续试验。

2.4 上样液质量浓度对大孔树脂吸附性能的影响

从图 2 中可以看出,上样液中原花青素质量浓度对树脂的吸附性能也会产生影响。原液质量浓度过高则泄漏早,处理量小,甚至会导致柱堵塞;原液质量浓度过低吸附时间过长,效率降低;当原液质量浓度为 1.864 mg/mL,树脂可达到最大吸附量。所以采用原花青素质量浓度为 1.864 mg/mL 上柱。

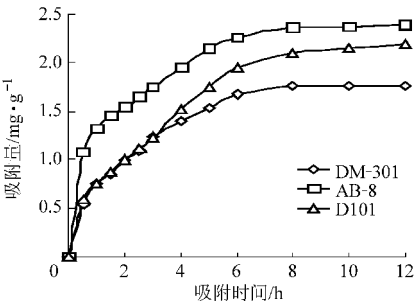


图 1 不同树脂的静态吸附动力学曲线
Fig. 1 Kinetic adsorption curves of resins

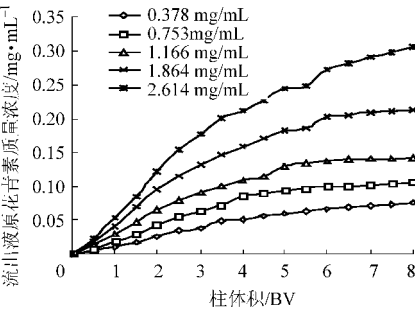


图 2 上样液质量浓度对树脂吸附性能的影响
Fig. 2 Effect of sampling concentration on adsorption property

2.5 吸附流速对大孔树脂吸附性能的影响

通过调节恒流泵的流速对上样液进行吸附流速的选择,以泄漏点最迟出现的吸附流速为宜。由图 3 可知,吸附流速越高,泄漏点出现的越早,吸附流速为 1 mL/min 时,虽然泄漏点出现的最迟,但因为流速慢,导致循环周期延长。综合考虑,吸附流速选择 2 mL/min。

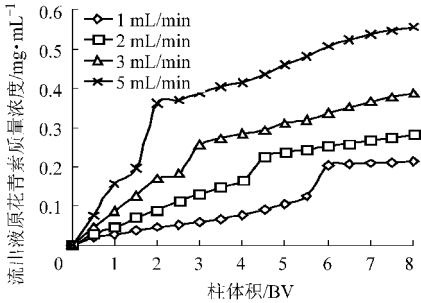


图 3 吸附流速对树脂吸附性能的影响
Fig. 3 Effect of adsorption flow rate on adsorption property

2.6 解吸流速对大孔树脂解吸性能的影响

解吸流速一般都要求较慢,因为流速过快,洗脱性能差,洗脱带宽,而且脱尾严重,洗脱不完全。但是流速过慢,则会延长生产周期。选择体积分数 50% 的乙醇为洗脱溶剂,以不同流速洗脱其结果见图 4,由图 4 可知,以 1 mL/min 的流速进行洗脱得到的峰形最窄,峰值最高;1.5 mL/min 的洗脱峰比 1 mL/min 的峰形宽且拖尾比较严重;2.5 mL/min 的峰形更宽,拖尾更加严重。由吸附流速的考察可知,吸附流速 2 mL/min 时的泄漏点出现在 4 个柱体积附近,也较为适宜。因此选择吸附流速为 2 mL/min,解吸流速为 1 mL/min。

2.7 乙醇体积分数对大孔树脂解吸性能的影响

30% 乙醇溶液解吸出来的组分原花青素质量浓

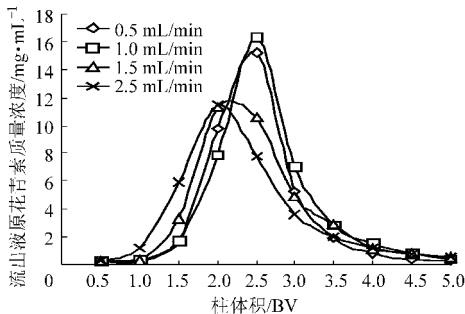


图 4 不同解吸流速下的洗脱曲线

Fig.4 Elution curves of desorption flow rates

度最高,求得原花青素的累积回收率为 90.4%。这可能是 30% 乙醇水溶液能较好地破坏原花青素和树脂之间的化学键。用 50% 的乙醇溶液进行解吸时,求得累积回收率为 94.2%,考虑收得率,选择直接用 50% 乙醇作为洗脱溶剂。收集 50% 乙醇洗脱液,40℃ 下真空减压浓缩,经冷冻干燥得原花青素粉末,经 Porter's 法^[13] 检测,测得原花青素含量为 89.8%。原花青素是由儿茶素或表儿茶素经 C4 - C6 或 C4 - C8 聚合而成的一大类酚类聚合物,本身无色,在热酸条件下降解、氧化可产生深红色花色色素离子,反应后溶液呈深红色,则表明发生了花色色素反应,其产物在 546 nm 处有强的吸收。取大孔树脂纯化后的冻干粉末经正丁醇-盐酸分析呈现阳性反应,说明粉末中有原花青素存在。

2.8 板栗壳原花青素的 ESI - MS 分析

将 100 μg/mL 的 CSPCs 直接进样,进行 ESI - MS 分析(图 5),得到经大孔树脂纯化后 CSPCs 的分子量范围为 289.4 ~ 1 154.9,为低聚原花青素,并以二聚体为主,还含有少量原花青素单体、三聚体和四

聚体原花青素,对应的 m/z (质荷比) 峰分别为 577.2、289.4、865.2、1 154.9。分析表明,本试验得到的 CSPCs 主要为儿茶素和表儿茶素通过 C4 - C6 或 C4 - C8 连接的 2 ~ 4 聚体。

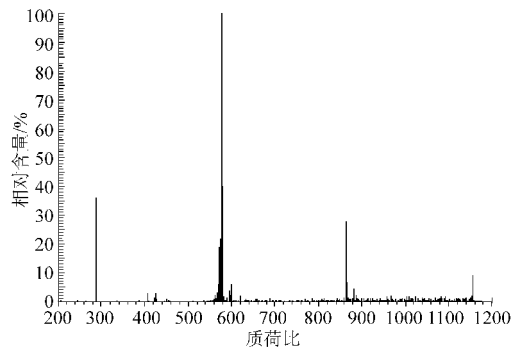


图 5 板栗壳原花青素的 ESI - MS 图

Fig.5 ESI - MS spectrum of CSPCs

3 结论

(1) AB - 8 大孔吸附树脂分离纯化 CSPCs 的最佳吸附和解吸工艺为:原花青素的粗提液上样质量浓度为 1.864 mg/mL,吸附或上样流速为 2 mL/min,以体积分数 50% 的乙醇为洗脱溶剂,解吸流速为 1 mL/min。AB - 8 大孔吸附树脂对板栗壳原花青素具有较好的吸附和解吸性能。

(2) 在最佳的吸附和解吸工艺参数条件下,原花青素的累积回收率可达 94.2%,含量为 89.8%,相对分子质量在 289.4 ~ 1 154.9 之间,以低聚体为主。

(3) AB - 8 大孔吸附树脂纯化 CSPCs 是可行的,且具有潜在的工业应用前景。

参 考 文 献

- Özçimen D, Ersoy-Meriçboyu A. A study on the carbonization of grape seed and chestnut shell [J]. Fuel Processing Technology, 2008, 89(11): 1 041 ~ 1 046.
- Vázquez G, González-Alvarez J, Santos J, et al. Evaluation of potential applications for chestnut (*Castanea sativa*) shell and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark extracts [J]. Industrial Crops and Products, 2009, 29(2 ~ 3): 364 ~ 370.
- Vázquez G, Calvo M, Sonia Freire M, et al. Chestnut shell as heavy metal adsorbent: optimization study of lead, copper and zinc cations removal [J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 172(2 ~ 3): 1 402 ~ 1 414.
- Vázquez G, Sonia Freire M, González-Alvarez J, et al. Equilibrium and kinetic modeling of the adsorption of Cd²⁺ ions onto chestnut shell [J]. Desalination, 2009, 249(2): 855 ~ 860.
- Yao Z Y, Qi J H, Wang L H. Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies on the biosorption of Cu (II) onto chestnut shell [J]. Journal of Hazardous Materials, 2010, 174(1 ~ 3): 137 ~ 143.
- Özçimen D, Ersoy-Meriçboyu A. Removal of copper from aqueous solutions by adsorption onto chestnut shell and grape seed activated carbons [J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 168(2 ~ 3): 1 118 ~ 1 125.
- Zuhra Memon G, Bhanger M I, Akhtar M. The removal efficiency of chestnut shells for selected pesticides from aqueous solutions [J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2007, 315(1): 33 ~ 40.
- Pinet M, Blade C, Salvado M J, et al. Procyanidin effects on adipocyte-related pathologies [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2006, 46(7): 543 ~ 550.