

## Summary of the Extracion and Separation of Procyanidins from Lotus Seed Pot

Weihang Chen\*, Binbin Feng

School of Chemical Engineering and Energy, Zhengzhou University, Zhengzhou  
Email: \*cwh295@zzu.edu.cn

Received: Nov. 8<sup>th</sup>, 2013; revised: Dec. 2<sup>nd</sup>, 2013; accepted: Dec. 10<sup>th</sup>, 2013

Copyright © 2014 Weihang Chen, Binbin Feng. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. In accordance of the Creative Commons Attribution License all Copyrights © 2014 are reserved for Hans and the owner of the intellectual property Weihang Chen, Binbin Feng. All Copyright © 2014 are guarded by law and by Hans as a guardian.

**Abstract:** More and more researchers in all kinds of fields have paid more attention to lotus seed pot procyanidins owing to their potent antioxidant effect, characteristic biological activities and pharmacological activities. The theory represents some common extraction, separation and purification methods of lotus seed pot procyanidins and analyses their merits and demerits. All of these studied results provide a theoretical basis and experimental basis for in-depth study and comprehensive utilization of lotus seed pot resources.

**Keywords:** Lotus Seed Pot; Procyanidins; Extract; Separate

## 莲房原花青素的提取分离工艺概述

陈卫航\*, 冯彬彬

郑州大学化工与能源学院, 郑州  
Email: \*cwh295@zzu.edu.cn

收稿日期: 2013年11月8日; 修回日期: 2013年12月2日; 录用日期: 2013年12月10日

**摘要:** 莲房原花青素以其显著的抗氧化效果和特有的生物活性及药理作用引起了世界各国各个领域科学家的广泛关注。本文考察了几种比较常用的莲房原花青素的提取及分离纯化方法, 对它们的优劣效果依次做了分析, 为莲房原花青素的深入研究和莲资源的综合利用提供了理论依据和实验基础。

**关键词:** 莲房; 原花青素; 提取; 分离

### 1. 引言

在我国, 莲是一种分布非常广泛的天然植物资源, 具有很高的食用与药用价值。但是在莲子的加工过程中, 莲房常常被大量丢弃, 造成植物资源的浪费及环境污染。然而, 近年来研究显示, 莲的成熟花托(莲房)中含有丰富的原花青素(procyanidins), 在欧洲、东南亚一带, 原花青素越来越受到了人们的重视。而

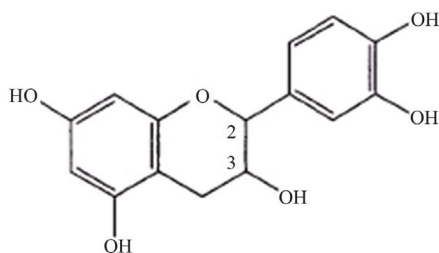
我国每年废弃的莲房高达十几万吨, 如何对莲房废弃物进行有效及综合利用一直是研究者关注的问题。研究和解决莲房的利用问题, 不仅可以防止环境污染, 而且还能生产出附加值很高的产品, 因此具有一定的经济效益和社会意义。

原花青素, 是一种有着特殊分子结构的生物类黄酮, 是目前国际上公认的清除人体内自由基最有效的天然抗氧化剂。一般为红棕色粉末, 气微、味涩, 溶于水 and 大多有机溶剂, 其分子聚合度低, 生物利用率

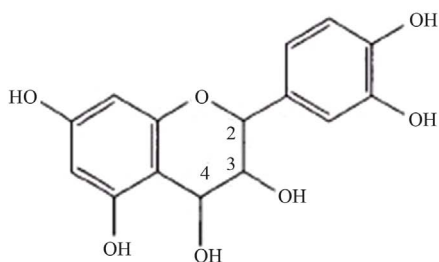
\*通讯作者。

高, 在清除自由基、抗脂质过氧化、抑制心血管疾病等方面均表现出显著的生物活性<sup>[1]</sup>。

原花青素是包括黄烷-3-醇, 黄烷-3,4-二醇等单体及黄烷醇的聚合物, 如二聚体、三聚体或高聚体等<sup>[2]</sup>。最简单的聚合物是由儿茶素、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<sup>[3]</sup>。按聚合度大小, 通常将二至四聚体称为低聚体(Procyanidolic Oligomers, 简称 OPC), 将五聚体以上的称为高聚体(Procyanidolic Polymers, 简称 PPC)。



黄烷-3-醇的结构



黄烷-3,4-二醇的结构

## 2. 原花青素的提取

在原花青素的提取方法上, 学者们不仅在原花青素的植物来源方面做了大量的研究, 也对具体的提取方法进行了深入的探讨, 主要包括下面几种方法。

### 2.1. 溶剂提取法

原花青素易溶于丙酮、乙醇、甲醇等极性溶剂<sup>[4]</sup>, 不溶于苯、四氯甲烷、石油醚等非极性溶剂, 故常用丙酮-水、乙醇-水、甲醇-水等体系提取原花青素。采用丙酮-水体系提取原花青素, 提取率较高, 但是会将油脂类一块提出, 不易纯化<sup>[5]</sup>, 李春阳<sup>[6]</sup>等人报道了有机溶剂种类和浓度对原花青素提取率的影响, 影响大小为丙酮 > 乙醇 > 甲醇, 并分析, 其原因在于丙酮的酮基容易与原花青素的羟基形成氢键。由于

丙酮有毒有害, 因此常采用乙醇进行提取, 最佳的提取条件是乙醇浓度为 50%、液料比 25:1、提取温度 55℃、提取时间 60 min, 提取 1 次, 提取率为 5.4%<sup>[7]</sup>。

### 2.2. 超声提取法

超声波在提取溶媒中产生的空化效应和机械作用, 一方面可有效地破碎植物的细胞壁, 使有效成分呈游离状态并溶入提取溶媒中, 另一方面可加速提取溶媒的分子运动, 使得提取溶媒和植物中的有效成分快速接触, 溶合、混合<sup>[8,9]</sup>。超声提取具有简便、高效、不影响提取物活性, 增大物质中分子的运动频率和速度, 增加溶剂的穿透力的优势, 因此广泛地用于植物有效成分的提取<sup>[10]</sup>。Ceferino Carrera<sup>[11]</sup>等采用超声提取葡萄籽中的多酚类物质, 最佳条件是乙醇浓度为 70%, 液料比为 18:1, 超声波功率为 600 W, 提取时间为 60 min, 提取温度为 70℃, 原花青素的提取率为 3.4%。

### 2.3. 超临界提取

超临界流体萃取(supercritical fluid extraction, SFE)是用超临界流体代替常规的有机溶剂对植物中的天然成分进行萃取和分离的一项新技术<sup>[12]</sup>。国内外都有用超临界 CO<sub>2</sub> 提取原花青素的研究。Esen<sup>[13]</sup>等人研究了超临界 CO<sub>2</sub> 流体对葡萄籽中原花青素提取条件的影响, 最佳条件是将超临界 CO<sub>2</sub> 加入乙醇-水(15:85)作为改性剂, 压力为 25 MPa, 温度为 30℃, 原花青素提取率能达到 4%。该方法中, 物质可以循环利用, 没有溶剂残留, 对环境无污染, 但是缺点在于设备复杂, 要保证较高的压力和密封环境, 成本较高。

### 2.4. 微波提取

微波辅助提取(microwave assisted extraction, MAE), 是目前工业上应用比较成熟的技术。它是采用高频率的电磁波穿透萃取媒介, 到达物料的内部, 微波能转化为热能从而使细胞内温度快速上升, 当细胞内的压力超过细胞壁的承受能力时, 细胞破裂, 细胞内的有效成分流出<sup>[14]</sup>。段玉青<sup>[15]</sup>等人研究了莲房中多酚类物质的提取, 得到最终优化条件为提取时间为 90 s, 微波输出功率为 700 W, 丙酮体积分数为 60%, 料液比为 1:25 (g/mL), 在此条件下, 得到原花青素的提取率为 5.58%。但是, 微波由于特性所限, 应用范

围受到一定限制, 只能停留在实验室水平上<sup>[16]</sup>。

## 2.5. 热回流抽提法

周芸<sup>[17]</sup>等将回流提取、渗漉提取、索氏提取综合起来, 将提取和浓缩同步进行, 将它们产生的二次蒸汽送入到回流冷凝器成冷凝液, 作为新溶剂, 回流到提取罐里的药材中, 保持较高浓度差, 起到动态渗漉作用。最佳工艺为用浓度为 50% 的乙醇, 液料比是 12:1, 提取 2.5 h, 提取温度为 90℃, 循环间隔为 30 min, 每次循环抽提 1/3, 原花青素的提取率为 6%。优点是工艺先进, 节省溶剂, 提取率高, 但是设备较复杂, 不易操作。

## 3. 原花青素的测量

原花青素的含量测定方法很多, 常用的有香草醛法、铁盐催化比色法、Folin-Ciocalteu 等。

### 3.1. 香草醛 - 浓盐酸法<sup>[18]</sup>

该方法是利用儿茶素单体或是原花青素在酸性条件下, A 环上的酚羟基能与香草醛发生缩合, 其产物在酸性作用下能形成有色的正碳离子, 在紫外分光光度计波长为 500 nm 下, 样品的浓度与颜色呈现正相关。有硫酸、盐酸两种方法, 但是由于硫酸的强氧化作用, 加入后会引引起反应体系温度急剧升高, 从而导致原花青素的氧化分解, 因此多采用浓盐酸。

### 3.2. 铁盐催化比色法<sup>[19]</sup>

铁盐催化比色法是利用原花青素在酸性条件下加热转化为红色的花青素, 原理是单体与单体之间的 C-C 键首先断裂, 形成中间产物 I、II, 然后脱去产物 II 中 C<sub>2</sub> 位上的 H, 从而形成花青素, 这个过程必须有氧化剂的存在。一定量的过渡金属离子, 如 Cu<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup> 等离子或醌类如对 - 苯醌、 $\alpha$ -萘醌、9,10-蒽醌等氧化剂均能够促进反应的进行, 但过量的醌类及 Mn<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup> 会降低吸光值, 因此采用铁盐较为适合, 尤其是三价铁盐, 如硫酸高铁铵。

### 3.3. Folin-Ciocalteu 法<sup>[20]</sup>

此法测定的是提取物中总多酚的含量, 一般以没食子酸作为对照品。原理是在碱性溶液中, 酚类化合

物可以将钨钼酸还原(由 W<sup>6+</sup>变为 W<sup>5+</sup>), 同时生成蓝色的化合物, 其颜色的深浅与多酚含量呈正相关, 蓝色化合物在 760 nm 处有最大吸收。

该方法的优点是能定量分析提取液中总多酚的含量, 缺点是不能区分多酚的种类, 例如是原花青素单体还是二聚体或是多聚体。另外蛋白质, 核酸, 抗坏血酸等易被氧化的物质也参与此反应, 不能准确辨别提取物中原花青素具体含量。同时由于单体和原花青素的反应系数不一样, 所以测定的含量和提取物中的真实含量有一定偏差。

## 4. 原花青素的分离纯化

### 4.1. 萃取分离法

萃取是利用化合物在两种互不相溶的溶剂中溶解度不同或是分配系数不同, 使化合物从一种溶剂内转移到另外一种溶剂中, 从而被提取出来的分离方法<sup>[21]</sup>。杭焯超<sup>[22]</sup>等认为可以先用乙醇或是丙酮对原花青素粗提液进行提取, 然后再用乙酸乙酯选择性萃取低聚原花青素, 之后用正丁醇选择性萃取高聚原花青素, 从而达到精制分级的目的。吕丽爽<sup>[23]</sup>等将乙醇提取物浓缩后, 加入缓冲剂, 利用等电点沉淀法去除蛋白质, 再用乙酸乙酯萃取, 最后用石油醚沉淀得到纯度为 95.6% 的产品, 收率为 14.4%。但是该工艺较为复杂, 不易操作, 且在操作中用到多种溶剂, 清除不干净易影响安全使用。

### 4.2. 沉淀法

沉淀法多用于原花青素的工业生产中, 且已有专利申报。如专利 CN200910074666.0 采用碱水提取原花青素, 再用有机相萃取, 水相中和, 过滤, 蒸发滤液得到低聚原花青素; 滤饼洗涤后得到高聚原花青素<sup>[24]</sup>。专利 CN200410053240.4 采用溶剂提取, 大孔树脂除杂, 乙醇洗脱浓缩用乙酸乙酯溶解, 再用 3~6 倍体积石油醚进行溶剂沉淀, 最终得到原花青素<sup>[25]</sup>。中国科学院华南植物研究所的魏孝义<sup>[26]</sup>等人用 60% 乙醇提取植物中的原花青素, 减压浓缩后加入 4~5 倍的丙酮沉淀, 上清液经减压浓缩干燥得到原花青素含量为 67%, 收率为 5.5%, 沉淀法工艺简单, 但是纯化的收率有待提高。

### 4.3. 柱层析法

大孔树脂是一种具有多孔网状立体结构的人工合成的高分子聚合物,主要是靠树脂和被吸附分子间的范德华力吸附<sup>[27]</sup>,而且具有选择性好,吸附速率快,容易再生等优点<sup>[28]</sup>。谭美婷<sup>[7]</sup>从10种大孔树脂中筛选出AB-8树脂作为最合适树脂分离莲房原花青素,适宜的分离工艺条件是:上样量300 mL、吸附流速2.0 BV/h、洗脱剂为50%乙醇溶液、洗脱剂用量为100 mL、解吸速率1.0 BV/h,最终得到原花青素的回收率为90.67%。

周芸<sup>[17]</sup>采用XB大孔树脂吸附莲房原花青素,上样流速为1.5 BV/h,先用水4 BV/h洗杂,用40%乙醇以2 BV/h洗脱6 BV,得到原花青素回收率为97.05%,纯度为80.7%。

段玉清<sup>[29]</sup>用DM130大孔吸附树脂分离纯化莲房原花青素的最佳吸附和解吸工艺参数为,上样浓度为2.5 mg/mL,流速为3 BV/h,饱和吸附量为4~4.5 BV;用体积分数为50%乙醇溶液为洗脱剂,流速为3 BV/h,洗脱5 BV,得到原花青素含量为95.31%,而且多是低聚体,并以活性最高的二聚体为主。

罗冠中<sup>[30]</sup>等将提取物通过大孔树脂纯化,最终得到葡萄籽原花青素提取率为9.09%,产品纯度达到94%~95%,再用Sephadex-LH20将样品继续分离,使得含量较高的一种二聚体得到了富集。

崔倩<sup>[31]</sup>等以DA-201为填充料制备层析柱,上样流速为0.8 mL/min,2.33 mg/mL的原花青素粗提取液达到吸附饱和的时间为92 min,湿树脂的动态饱和吸附量为3.4 mg/g,用70%的乙醇解吸,上柱液浓度为2.97 mg/mL,流速为0.8 mL/min,洗脱率达到84.1%。

聚酰胺是由酰胺聚合而成的一类高分子材料,聚酰胺分子内的酰胺基能与酚类的羟基形成氢键产生吸附,吴朝霞<sup>[32]</sup>在聚酰胺吸附分离原花青素实验中,得到适宜条件为上样流速为0.45 mL/min,上样浓度为5~8 mg/mL。用80%的丙酮洗脱时解析率最高,得到产物纯度达到92%。用丙酮分级洗脱时,大部分原花青素被60%的丙酮解吸,其次是40%的丙酮。何钊<sup>[33]</sup>也探讨了聚酰胺作为吸附剂的柱层析法分离原花青素,发现只有用40%以上的丙酮溶液才能洗脱出原花青素。

Sephadex LH-20,全称为羟丙基葡聚糖凝胶,它

集凝胶过滤、分配色谱及吸附性层析于一身,可以分离结构非常相近的分子<sup>[34]</sup>。徐德平<sup>[35]</sup>等用聚酰胺柱与Sephadex LH-20柱结合使用,将葡萄籽中的原花青素分离纯化得到两个纯二聚体化合物。余红军<sup>[36]</sup>等用Sephadex LH-20凝胶柱分离纯化原花青素,使用60%的丙酮水溶液作为洗脱液效果较好,洗脱出的原花青素含量为57.3%,效果优于乙醇水溶液。

### 5. 结论

目前,莲房原花青素应用广泛,效果显著,关于提取方面的报道已有很多,方法相对成熟,普遍认为最简便的方法是溶剂提取法,操作简单、方便,不需要复杂的仪器,而且提取率也较高。

对原花青素的分离纯化报道不多,且效果不佳,主要是由于原花青素是混合物,即使二聚体也有八种同分异构体,因此找不到合适的检测手段,目前研究较多效果较好的就是大孔树脂吸附法,采用静态或动态吸附,并用合适的解析液,使产品达到较高的纯度,与萃取法和沉淀法相比,溶剂不易残留,应用方便。

因此,在以后的研究中,希望能将已有的纯化手段结合,并结合新的分离手段,能够比较精细的分离出原花青素低聚体和高聚体,采用更精确的分析检测手段,准确的测定原花青素的含量,使其在生物、医药等方面的应用更加高效。

### 参考文献 (References)

- [1] Xu, J.Q., Rong, S. and Xie, B.J. (2009) Rejuvenation of antioxidant and cholinergic systems contributes to the effect of procyanidins extracted from the lotus seedpod ameliorating memory impairment in cognitively impaired aged rats. *European Neuropsychopharmacology*, **19**, 851-860.
- [2] Ferreira, D., Marais, J.P.J. and Coleman, C.M. (2010) Proanthocyanidins: Chemistry and biology. *Comprehensive Natural Products II*, **6**, 605-661.
- [3] Nandakumar, V., Singh, T. and Katiyar, S. (2008) Multi-targeted prevention and therapy of cancer by proanthocyanidins. *Cancer Letter*, **269**, 378-387.
- [4] Wu, Q., Chen, H.Y. and Lv, Z.J. (2013) Oligomeric procyanidins of lotus seedpod inhibits the formation of advanced glycation end-products by scavenging reactive carbonyls. *Food Chemistry*, **138**, 1493-1502.
- [5] Pekic, B., Kovac, V., Alonso, E., et al. (1998) Study of the extraction of proanthocyanidins from grape seeds. *Food Chemistry*, **61**, 201-206.
- [6] 李春阳, 许时婴, 王璋 (2004) 从葡萄废弃物中提取分离多酚类生物活性物质. *食品科技*, **6**, 88-93.
- [7] 谭美婷 (2012) 莲房原花青素的提取与分离纯化工艺研究. 硕士论文, 郑州大学, 郑州, 1-3.
- [8] Teng, H., Jo, I.H. and Chol, Y.H. (2010) Optimization of ultra-

- sonic-assisted extraction of phenolic compounds from Chinese quince (*Chaenomeles sinensis*) by response surface methodology. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, **53**, 618-625.
- [9] Wang, L., Wang, Z. and Li, X. (2013) Optimization of ultrasonic-assisted extraction of phenolic antioxidants from *Malus baccata* (Linn.) Borkh. using response surface methodology. *Separation Scientific*, **36**, 1652-1658.
- [10] Wang, X.S., Wu, Y.F. and Chen, G.Y. (2013) Optimisation of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from *Sparganii rhizoma* with response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, **20**, 846-854.
- [11] Carrera, C., Ruiz-Rodriguez, A. and Palma, M. (2012) Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from grapes. *Analytica Chimica Acta*, **732**, 100-104.
- [12] Prado, J.M., Dalmolin, I. and Carareto, N.D.D. (2012) Supercritical fluid extraction of grape seed: Process scale-up, extract chemical composition and economic evaluation. *Journal of Food Engineering*, **109**, 249-257.
- [13] Yilmaz, E.E., Ozvural, E.B. and Vural, H. (2011) Extraction and identification of proanthocyanidins from grape seed (*Vitis Vinifera*) using supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, **55**, 924-928.
- [14] Zhang, Y., Zheng, B.D. and Tian, Y.T. (2012) Microwave-assisted extraction and anti-oxidation activity of polyphenols from lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) seeds. *Food Science and Biotechnology*, **21**, 1577-1584.
- [15] 段玉清, 闫永胜, 张海晖等 (2009) 莲房多酚的微波辅助提取技术. *江苏大学学报(自然科学版)*, **5**, 437-440.
- [16] 黎海彬, 王邑, 李俊芳等 (2005) 微波辅助提取技术在天然产物提取中的应用. *现代食品科技*, **3**, 148-150.
- [17] 周芸 (2012) 莲房原花青素制备工艺及其抗氧化活性研究. 硕士学位论文, 浙江大学, 杭州, 3-7.
- [18] 李绮丽, 吴卫国, 彭芳刚等 (2012) 莲子皮原花青素测定方法的研究. *现代食品科技*, **2**, 241-245.
- [19] 傅武胜, 蔡一新, 林丽玉等 (2001) 铁盐催化比色法测定葡萄籽提取物中的原花青素. *食品发酵工业*, **10**, 57-61.
- [20] 冯建光 (2003) 葡萄籽提取物中有效成分不同测定方法的比较. *中国食品添加剂*, **5**, 100-103.
- [21] Emuri, A., Stanilas, G.D. and Jean, C.A. (2010) Liquid-liquid extraction: Theory, applications and difficulties. *Annales de Toxicologie Analytique*, **22**, 148-150.
- [22] 杭焯超, 李方实 (2004) 葡萄籽中主要成分提取方法的研究. *化工时刊*, **9**, 1-3.
- [23] 吕丽爽, 曹栋 (2001) 脱脂葡萄籽中低聚原花青素的提取. *无锡轻工大学学报*, **2**, 208-210.
- [24] 侯相林, 邓天昇, 齐永琴 (2009) 一种提取分离原花青素的方法. 中国专利: CN101565414A.
- [25] 苏宝根, 任其龙, 何钊等 (2005) 一种高含量原花青素的制备方法. 中国专利: CN1603320.
- [26] 魏孝义, 谢海晖, 周文华等 (2000) 原花青素的制备工艺. 中国专利: CN1273985A.
- [27] Song, Y.H. (2011) Adsorption kinetics of grape seed procyanidins on macroporous adsorbent resin. International Conference on Chemical, Material and Metallurgical Engineering, Beihai.
- [28] Song, Y.H. and Zhang, G.Z. (2011) Adsorption of grape seed procyanidins on macroporous adsorbent resin: Isotherms and thermodynamics. International Conference on Chemical, Material and Metallurgical Engineering, Beihai.
- [29] 段玉清, 张海晖, 周密 (2009) 大孔吸附树脂对莲房原花青素吸附纯化性能的研究. *离子交换与吸附*, **2**, 114-120.
- [30] 罗冠中 (2006) 原花青素的提取、分离及抗氧化性、稳定性的研究. 硕士学位论文, 天津科技大学, 天津, 30-35.
- [31] 崔倩, 蒋益虹, 戴蕾等 (2011) 莲房原花青素的提取纯化技术研究. *食品工业科技*, **8**, 238-240.
- [32] 吴朝霞, 孟宪军, 吴朝晖 (2005) 聚酰胺柱层析提纯原花青素及其产物清除 OH 自由基能力的研究. *食品科学*, **8**, 113-116.
- [33] 何钊, 任其龙. (2004) 层析法分离葡萄籽中原花青素的研究. *食品科学*, **8**, 70-73.
- [34] 解红艳, 陈昕 (2002) Sephadex LH-20(Pharmadex LH-20)在天然产物提取中的应用. 中国药学会学术年会.
- [35] 徐德平, 孙芸, 谷文英等 (2005) 葡萄籽原花青素二聚体的提取分离与结构鉴定. *中草药*, **2**, 180-182.
- [36] 余红军, 郑生宏, 李立祥 (2012) 油茶籽壳原花青素的分离纯化. *食品与发酵工业*, **9**, 196-199.