

荔枝 γ -氨基丁酸的纯化工艺

周俊萍^{1,2}, 徐玉娟^{1*}, 吴继军¹, 杜冰², 殷晓梦³, 王锦³, 李楚源⁴, 巢叶璇³, 余元善¹, 翁少全⁴,
卜智斌¹, 温靖^{1*}

(1. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 农业农村部功能食品重点实验室, 广东省农产品加工重点实验室, 广东广州 510610)(2. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)(3. 广州市从化区农业农村局, 广东广州 510925)(4. 广州王老吉大健康产业有限公司, 广东广州 510623)

摘要: 研究先后采用醇沉、树脂柱层析纯化和结晶工艺对荔枝 γ -氨基丁酸(GABA)进行分离精制, 以获得高纯度荔枝GABA。通过静态吸附实验从九种不同类型的树脂中筛选出732阳离子交换树脂, 其吸附率和解吸率高达81.56%和88.26%, 静态吸附动力学表明该树脂的吸附过程以液膜扩散为主, 同时还受到粒内扩散和颗粒内表面上的吸附-解吸作用等多元扩散的共同作用。此外, 动态洗脱实验结果表明, 上样量为8.25 mg/g时, 原料利用率最高, 同时, 综合考虑纯化效率和成本问题, 确定最佳洗脱条件为上样质量浓度1.0 mg/mL、上样流量1.0 mL/min、上样pH值为4、洗脱液浓度1.5 mol/L、洗脱流量1.0 mL/min, 在此优化条件下获得的荔枝GABA纯度为77.40%, 得率为92.05%。进一步对纯化样液结晶处理, 其纯度可提高至95.35%, 采用核磁共振解析该化合物的结构, 证明该结晶为GABA。综上, 该研究通过联合醇沉-离子交换柱层析-结晶工艺, 建立一套从荔枝中回收GABA的方法, 其纯度大于95%, 可为荔枝GABA的开发利用提供一定的技术参考。

关键词: 荔枝; γ -氨基丁酸; 纯化; 吸附动力学; 结构鉴定

文章编号: 1673-9078(2025)08-148-157

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.8.0474

Process for Purification of Litchi γ -Aminobutyric Acid

ZHOU Junping^{1,2}, XU Yujuan^{1*}, WU Jijun¹, DU Bing², YIN Xiaomeng³, WANG Jin³, LI Chuyuan⁴,
CHAO Yexuan³, YU Yuanshan¹, WENG Shaoquan⁴, BU Zhibin¹, WEN Jing^{1*}

(1. Sericultural & Agri-Food Research Institute Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Functional Foods, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangdong Key Laboratory of Agricultural Products Processing, Guangzhou 510610, China)(2. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)(3. Conghua District Bureau of Agriculture and Rural Affairs of Guangzhou, Guangzhou 510925, China)(4. Guangzhou Wanglaoji Lychee Industry Development Co. Ltd., Guangzhou 510623, China)

引文格式:

周俊萍, 徐玉娟, 吴继军, 等. 荔枝 γ -氨基丁酸的纯化工艺[J]. 现代食品科技, 2025, 41(8): 148-157.

ZHOU Junping, XU Yujuan, WU Jijun, et al. Process for purification of litchi γ -aminobutyric acid [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(8): 148-157.

收稿日期: 2024-04-12

基金项目: 国家荔枝龙眼产业技术体系(CARS-32-13); 广东省农业科学院金颖之光人才项目(R2023PY-JG015); 广东省农业科技创新及推广项目(2023KJ107-3); 广东荔枝跨县集群产业园项目; 从化区农产品加工科技支撑项目(GDGZ2023B109); 广东省农业科学院学科团队建设项目(202109TD)

作者简介: 周俊萍(1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 果蔬加工, E-mail: zhoujp1999@163.com

通讯作者: 徐玉娟(1974-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 果蔬加工, E-mail: guoshuxuyujuan@163.com; 共同通讯作者: 温靖(1978-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 果蔬加工, E-mail: jingw988@163.com

Abstract: High-purity litchi γ -aminobutyric acid (GABA) was prepared via separation and refinement through sequential alcohol precipitation, resin column chromatography, and crystallization. Through a static adsorption experiment, the 732 cation exchange resin was screened from nine different types of resins, where its adsorption and desorption rates reached 81.56% and 88.26%, respectively. Evaluation of the static adsorption kinetics indicated that adsorption on the resin was primarily controlled by liquid-film diffusion, and was also influenced by the combined effects of multiple diffusion processes, such as intraparticle diffusion and adsorption-desorption on the internal surfaces of the particles. A dynamic elution experiment revealed that the highest raw material utilization rate was achieved at a sample loading of 8.25 mg/g. By taking the purification efficiency and cost into comprehensive consideration, the optimal elution conditions were determined as follows: sample concentration: 1.0 mg/mL, sample loading flow rate: 1.0 mL/min, sample pH value: 4, eluent concentration: 1.5 mol/L, elution flow rate: 1.0 mL/min. Under these optimized conditions, the purity and yield of the obtained litchi GABA were 77.40% and 92.05%, respectively. By crystallization from the purified sample solution, the purity increased to 95.35%, and the structure of the obtained crystal was identified as GABA through nuclear magnetic resonance analysis. In conclusion, the present study demonstrated that a combination of alcohol precipitation, ion exchange column chromatography, and crystallization processes enabled the recovery of GABA from litchi at a purity of >95%. The results of this study can serve as a valuable technical reference for the development and utilization of litchi GABA.

Key words: litchi; γ -aminobutyric acid; purification; adsorption kinetics; structural identification

荔枝 (*Litchi chinensis* Sonn.) 作为一种常见的热带水果, 不仅深受消费者的青睐, 同时也因其丰富的营养成分而备受关注, 荔枝中的多糖、多酚、皂甙、蛋白质、天然色素等成分已应用于护肤品、保健品、药品、功能性饮品等一系列产品^[1-4], 尽管覆盖了食品、医药、工业等诸多领域, 但其实际的加工用量仅占荔枝总产量的 20%~30%^[5]。 γ -氨基丁酸 (GABA) 作为荔枝果肉中的一种功能性氨基酸, 果肉总氨基酸组分中约有 30% 为 GABA, 黑叶、妃子笑等品种的荔枝果肉 GABA 含量更是高达 110 mg/100 g FW^[6], 可作为 GABA 的良好植物来源。随着国内外对 GABA 研究的逐步深入, 它在情绪调节、认知功能、运动睡眠、消化蠕动、应激反应等多种生理过程和神经功能的调控使得该成分有望在各个领域得到广泛应用^[7-9], 面对当下荔枝精深加工比例不高、市场竞争力严重缺乏、加工产业急需转型升级的情况, 深入挖掘荔枝果肉活性成分, 探索一系列工序简单、成本低廉的荔枝 GABA 纯化工艺, 对推动荔枝精深加工产业和产品化的发展具有重要的意义。

离子交换树脂是一种具有多孔结构的高分子化合物, 广泛应用于水处理、食品、化工、生物制药等领域, 基于离子间的静电作用和化学亲和力来吸附和释放离子, 实现对溶液中目标物质的分离和纯化^[10]。离子交换树脂具备高选择性、高效, 可通过控制树脂的孔径大小、表面功能团的种类和密

度等参数, 实现对不同离子的高效吸附和选择性分离^[11], 同时可以通过再生和再利用来减少成本和资源浪费, 具有较好的可持续性, 是目前工业应用最广泛的纯化技术。因此, 本文采取离子交换树脂联合结晶工艺对荔枝 GABA 进行分离和精制, 阐明树脂对荔枝 GABA 的吸附机制、确定最佳纯化工艺条件并对其结构进行解析, 为实现从荔枝中获取高纯度 GABA 提供参考和借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

荔枝品种为妃子笑, 购于广东广州。001×7、001×8、HPD300、X-5、LX-28、AB-8、NKA-9、ADS-21、ADS-7 树脂, 华溢新材料科技有限公司; 普通层析柱 (9 mm×200 mm), 上海厦美生物科技有限公司; 硼酸、 β 巯基乙醇、抗坏血酸、盐酸、硫酸、无水乙醇、氨水等试剂均为国产分析纯。

LC-20AT 高效液相色谱仪, 日本岛津公司; ME204 电子分析天平, 梅特勒-托利多仪器上海有限公司; PB-10 pH 计, 梅特勒-托利多仪器上海有限公司; D3024R 高速离心机, 美国赛洛捷克公司; PBJ-S03E 破壁机, 江门市贝尔斯顿电器有限公司; EYELAN-1100 旋转蒸发仪, 东京理化器械株式会社; DL-800B 超声波清洗仪, 上海之信仪器有限公司; FDU-2110 冷冻干燥机, 上海爱朗仪器有限公司;

AVANCE NEO 600 超导核磁共振谱仪, 瑞士 Bruker 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 荔枝GABA制备液的获取

新鲜荔枝采用低压静电场联合冰温处理 6 d 后取出, 去皮去核, 果肉打浆, 以体积分数 1:2 的比例加入去离子水, 50 ℃、220 W 超声 1 h, 随后于 4 ℃、5 000 r/min 条件下离心 10 min, 上清液即为荔枝 GABA 粗提液, 经真空浓缩后, 以体积分数 1:2 的比例加入无水乙醇醇沉 24 h 以除去蛋白质等杂质, 4 ℃、5 000 r/min 离心 10 min, 上清液即为荔枝 GABA 制备液, 真空浓缩后备用。

1.2.2 树脂的筛选

树脂预处理: 树脂采用去离子水浸泡 12 h 后, 反复冲洗至出水清澈、无浑浊, 随后用 5% HCl 溶液浸泡 4 h, 去离子水洗涤至中性, 再用 5% NaOH (m/V) 溶液浸泡 4 h, 去离子水洗涤至中性, 抽滤, 备用。离子交换树脂需在碱洗后再次采用 5% HCl (V/V) 溶液洗涤, 将树脂转为 H 型, 去离子水洗涤至中性, 抽滤, 备用。

称取 9 种预处理后的树脂各 1.0 g, 分别加入 1.05 mg/mL 的 GABA 制备液 30 mL, 37 ℃、120 r/min 摇床振荡 24 h, 充分吸附, 抽滤, 收集滤液测定 GABA 的质量浓度, 同时, 向所得树脂中加入 1 mol/L 氨水溶液 30 mL, 37 ℃、120 r/min 摇床振荡 24 h, 充分解吸, 抽滤, 测定滤液中 GABA 的质量浓度。树脂吸附量、吸附率和解吸率计算公式如下:

$$Q = \frac{C_0 V_0 - C_1 V_1}{M} \quad (1)$$

$$q = \frac{C_0 V_0 - C_1 V_1}{C_0 V_0} \times 100\% \quad (2)$$

$$d = \frac{C_2 V_2}{QM} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

Q ——吸附量, mg/g;

C_0 ——GABA 溶液的初始质量浓度, mg/g;

C_1 ——GABA 溶液的平衡质量浓度, mg/g;

V_0 ——初始溶液体积, mL;

V_1 ——平衡溶液体积, mL;

q ——吸附率, %;

M ——树脂质量, g;

d ——解吸量, mg/g;

C_2 ——解吸后溶液中 GABA 的质量浓度, mg/g;

V_2 ——解吸后溶液的体积, mL。

1.2.3 静态吸附动力学

在静态吸附实验的基础上, 选择最佳树脂称取 1.0 g, 加入 1.5 mg/mL 的荔枝 GABA 制备液 30 mL, 37 ℃、120 r/min 摇床振荡 8 h, 每 30 min 测定 GABA 含量以绘制静态吸附动力学曲线。以粒子内扩散模型、拟一级动力学模型和拟二级动力学模型分析静态吸附过程。

内扩散模型:

$$q_t = k_1 t^{0.5} + C \quad (4)$$

拟一级动力学模型:

$$\ln(q_e - q_t) = \ln q_e - k_2 t \quad (5)$$

拟二级动力学模型:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{q_e^2 k_3} + \frac{1}{q_e} t \quad (6)$$

式中:

t ——吸附时间, min;

q_t —— t 时刻的吸附量, mg/g;

k_1 ——扩散速率常数, mg/(g·min^{0.5});

C ——常数;

q_e ——平衡时的吸附量, mg/g;

k_2 ——一级吸附速率常数, min⁻¹;

k_3 ——二级吸附速率常数, mg/(g·min)。

1.2.4 动态吸附及洗脱条件优化

在静态吸附实验的基础上, 选择最适树脂进行动态吸附试验和洗脱试验, 绘制泄漏曲线, 确定最佳上样量, 同时考察上样质量浓度、上样流速、样液 pH 值对吸附效果的影响, 以及洗脱流速和洗脱液质量浓度对解吸效果的影响。

1.2.4.1 泄漏曲线的绘制

称取适量树脂, 置于层析柱中, 取荔枝 GABA 制备液 500 mL, 以 1 mL/min 的流速上样, 每管 10 mL 收集流出液, 测定每管流出液的 GABA 质量浓度。

1.2.4.2 上样质量浓度对吸附效果的影响

以上述最适上样量, 分别取质量浓度为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mg/mL 的荔枝 GABA 制备液, 以 1.0 mL/min 的流速上样, 收集流出液, 并测定 GABA 的质量浓度, 计算树脂的吸附率。

1.2.4.3 上样流速对吸附效果的影响

以上述最适上样量和上样质量浓度, 分别以 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL/min 的流速上样, 收集流出液, 并测定 GABA 的质量浓度, 计算树脂的吸

附率。

1.2.4.4 样液pH值对吸附效果的影响

以上述最适上样量、上样质量浓度和上样流速,分别调整样液 pH 值为 2、3、4、5、6、7 进行上样,收集流出液,并测定 GABA 的质量浓度,计算树脂的吸附率。

1.2.4.5 洗脱液质量浓度对解吸效果的影响

以上述最适上样参数进行上样,上样完成后采用蒸馏水冲洗至流出液为中性,随后分别采用浓度为 0.05、0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 mol/L 的氨水以 1.0 mL/min 的流速进行洗脱,并测定洗脱液中 GABA 的质量浓度,计算树脂的解吸率。

1.2.4.6 洗脱流速对解吸效果的影响

以上述最适上样参数进行上样,上样完成后采用蒸馏水冲洗至流出液为中性,随后采用上述最适浓度的氨水分别以 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL/min 的流速进行洗脱,并测定洗脱液中 GABA 的质量浓度,计算树脂的解吸率。

1.2.5 GABA结晶工艺

参考赵凯飞^[12]的方法并做修改。将树脂柱层析纯化所得冻干荔枝 GABA 样品加水复溶,调 pH 值至 3.2,搅拌析出谷氨酸结晶后过滤,滤液真空浓缩至过饱和状态,在 80 °C 水浴条件下,缓慢向其中滴加 3 倍体积的无水乙醇,搅拌溶解,取出至温度降为室温后,再于 0~4 °C 条件下静置 24 h,过滤收集晶体,φ=95% 乙醇洗涤 3 次,氮吹后即获得荔枝 GABA 成品。

1.2.6 GABA含量测定

将纯化前后的荔枝 GABA 溶液进行浓缩、冻干, HPLC 测定并计算纯化前后荔枝 GABA 溶液的纯度。检测方法根据李雁琴^[13]的方法稍加修改,取 3 mL 甲醇加入 150 mg OPA 超声溶解,加入 27 mL 硼酸盐缓冲液 (0.4 mol/L, pH 值为 9.4)、500 μL 巯基乙醇和 30 mg 抗坏血酸混合均匀制成衍生试剂。准确称取 0.2 g 液氮研磨样品,适当稀释。衍生试剂和稀释液 1:1 (V/V) 混合均匀,4 °C、12 000 r/min 离心 2 min,上清液过 0.22 μm 滤膜,待测。HPLC 测定条件:采用岛津 C18 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm),以甲醇 (A) 和 0.1% 甲酸 (B) 为流动相,进样量 10 μL,流量 0.8 mL/min,柱温 30 °C,检测波长 332 nm。梯度洗脱程序:0~15 min, 35%~28% (B); 15~16 min, 28%~35% (B); 16~20 min, 35% (B)。

1.2.7 样品溶液全波长扫描

采用紫外分光光度计对纯化前后的荔枝 GABA 溶液进行全波长扫描,分析比较树脂对荔枝 GABA 制备液的脱色效果,紫外扫描范围:200~800 nm;扫描速度:中;数据间隔:1 nm。

1.2.8 洗脱溶液薄层层析

采用 TLC 薄层层析检测,分析比较树脂对荔枝 GABA 制备液的纯化效果,具体操作参考杨晶晶^[14]的方法:用铅笔在板下方 0.5 cm 处轻轻画直线,用毛细管将样品逐个点在线上,展开剂采用正丁醇:乙酸:水 (V/V/V)=4:1:1,显色剂为 0.5% 茚三酮乙醇溶液。

1.2.9 核磁共振分析

称取 20 mg 荔枝 GABA 样品,溶解于 0.65 mL 的 D₂O 溶液中,进行 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 测试。¹H NMR 测试条件:测试温度 25 °C,弛豫时间 1 s,采集时间 2.752 5 s,记录 16 次扫描;¹³C NMR 测试条件:测试温度 25 °C,弛豫时间 2 s,采集时间 0.917 5 s,记录 1 024 次扫描。

1.3 数据统计及分析

采用 Excel 处理数据,Origin 2019 作图及拟合模型,核磁共振数据采用 MestReNova 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 树脂型号筛选

选择 9 种不同种类的树脂 732 (001×7)、001×8、HPD300、X-5、LX-28、AB-8、NKA-9、ADS-21 和 ADS-7 进行静态吸附和解吸试验,结果如表 1 所示。树脂吸附量指每克树脂吸附样品中荔枝 GABA 的量,可直观表明树脂吸附荔枝 GABA 的能力^[15]。由表 1 可知,九种树脂的吸附效果由强到弱依次为 732 > 001×8 > ADS-21 > HPD300 > AB-8 > NKA-9 > ADS-7 > LX-28 > X-5,相较于大孔吸附树脂,732 和 001×8 离子交换树脂对荔枝 GABA 具有更好的吸附能力,吸附率分别达到 81.56% 和 77.08%,王姣斐等^[16]对比分析了 732、734 和 D001 三种树脂,发现 732 和 734 两种强酸型阳离子交换树脂的吸附能力强于 D001,与本研究结果相似。其主要原因可能是离子交换树脂上的功能基团可以与氨基酸中的离子基团形成离子键,增强选择吸附效果^[17],这种交互作用强于大孔树脂依靠

其内部骨架分子或功能基团与 GABA 之间的疏水作用、范德华力或静电作用^[18]。解吸效果以 HPD300、732 和 001×8 较好, 分别为 93.12%、88.26% 和 87.90%, 其他六种树脂的解吸性能相差不大, 均在 65%~80% 范围内, 因此, 综合考虑选取吸附和解吸能力较强的 732 阳离子交换树脂进行后续实验。

2.2 静态吸附动力学

动力学分析可用于描述吸附材料的吸附速率、吸附能力及传质机理^[19], 为了阐明荔枝 GABA 在 732 离子交换树脂上的吸附动力学规律和吸附机理, 利用 Weber-Morris 扩散模型方程、Lagergren 一级吸附速率方程以及 McKay 二级吸附速率方程对树脂静态吸附过程进行描述和分析。吸附速率是批量生产工艺中评估树脂吸附能效和可行性的指标, 预测树脂与物质间的交换平衡时间有利于在实际生产中把控时间节点, 节约试剂成本^[15]。图 1a 显示了 732 树脂对荔枝 GABA 的静态吸附动力学曲线, 树脂的表观吸附量先快速增大再缓慢升高, 最后趋于平缓, 结合粒子内扩散模型可知该传质过程分为三个阶段, 同时吸附过程受到多元扩散的共同调控, 荔枝 GABA 穿过液膜抵达树脂外表面 (即液膜扩散阶段), 随后扩散到树脂内部孔隙并与树脂内的质子交换结合 (粒内扩散阶段), 最后是解吸阶段^[9]。吸附量在前 180 min 内由 0 mg/g 迅速增加至 22.45 mg/g, 此时吸附过程处于液膜扩散阶段, GABA 氨基质子化可迅速吸附于树脂表面与树脂上的 H⁺ 进行交换; 180~330 min, 表观吸附量缓慢增加至 25.87 mg/g, 吸附进入膜扩散和粒内扩散阶段, 树脂膜表面及孔隙的阻力增加, 树脂吸附速度逐渐减弱; 在 330 min 左右, 树脂上吸附位点逐渐减少, 吸附逐渐达到平衡^[20,21], 此时树脂的最大表观吸附

量为 26.10 mg/g。

在拟一级动力学模型中, 假设吸附过程中的吸附速率与物质溶液的质量浓度呈线性关系, 评估不同吸附情况, 因此, 可用于解释扩散控制吸附速率的过程, 而拟二级动力学则假设吸附速率与物质溶液质量浓度的平方呈线性关系, 主要用于描述吸附速率控制步骤在树脂吸附活性位点上的情况^[22]。图 1c 和 d 中拟合直线回归方程分别为 $\ln(q_e - q_t) = 3.438\ 29 - 0.012\ 36t$ 和 $t/q_t = 2.020\ 04 + 0.033\ 59t$, 两拟合直线均不经过原点, 表明液膜扩散不是吸附初期的唯一机制, 该过程同时还受到粒内扩散等其他因素的影响, 但液膜扩散是主要控速因素。表 2 中模型参数结果显示, 拟一级动力学有较大的残差平方和 ($R^2 = 0.987\ 08$), 说明其拟合程度更高, 但预测的平衡吸附量 ($q_e = 31.13\ \text{mg/g}$) 与实验平衡表观吸附量相差较大, 不符合实际吸附机理。拟二级动力学同样具有较高的拟合程度 ($R^2 > 0.982\ 69$), 同时预测的平衡吸附量 ($q_e = 29.77\ \text{mg/g}$) 和实际吸附量相接近, 因此, 准二级动力学更适合描述吸附过程, 该结果与张杰等^[15]的研究结果类似。

2.3 泄漏曲线的绘制

泄露曲线是决定层析柱操作和动态响应的一个重要参数, 当流出溶液的质量浓度达到流入溶液质量浓度的 5% 左右时, 通常被认为是树脂动态吸附已达平衡, 该点即为泄漏点^[23]。如图 2 所示, 泄露体积达到 110 mL 后, GABA 质量浓度逐渐开始上升, 此时吸附量为 8.25 mg/g; 当泄露体积达到 300 mL 后, 流出液中 GABA 的质量浓度与原上样液质量浓度接近, 即树脂吸附达到饱和, 考虑到原料利用率, 选择泄漏点对应的上样量 (8.25 mg/g) 作为最佳条件进行后续实验。

表 1 树脂的物理参数及对荔枝GABA的吸附和解吸效果

Table 1 Physical parameters of resins and adsorption and desorption effects on litchi GABA

型号	类型	酸碱性/极性	粒径范围/mm	比表面积/(m ² /g)	吸附量/(mg/g)	吸附率/%	解吸率/%
732	凝胶	酸性	0.3~1.25	≤100	25.59	81.56	88.26
001×8	凝胶	酸性	0.3~1.25	≤100	21.89	77.08	87.90
HPD300	大孔	非极性	0.3~1.25	800~870	19.31	52.09	93.12
X-5	大孔	非极性	0.3~1.25	500~600	17.91	47.80	67.18
LX-28	大孔	非极性	0.3~1.25	650~700	18.44	49.43	68.38
AB-8	大孔	弱极性	0.3~1.25	480~520	19.17	51.66	79.41
NKA-9	大孔	极性	0.3~1.25	250~290	19.00	51.14	77.47
ADS-21	大孔	极性	0.3~1.25	450~500	19.36	52.25	73.52
ADS-7	大孔	极性	0.3~1.25	≥100	18.70	50.21	68.66

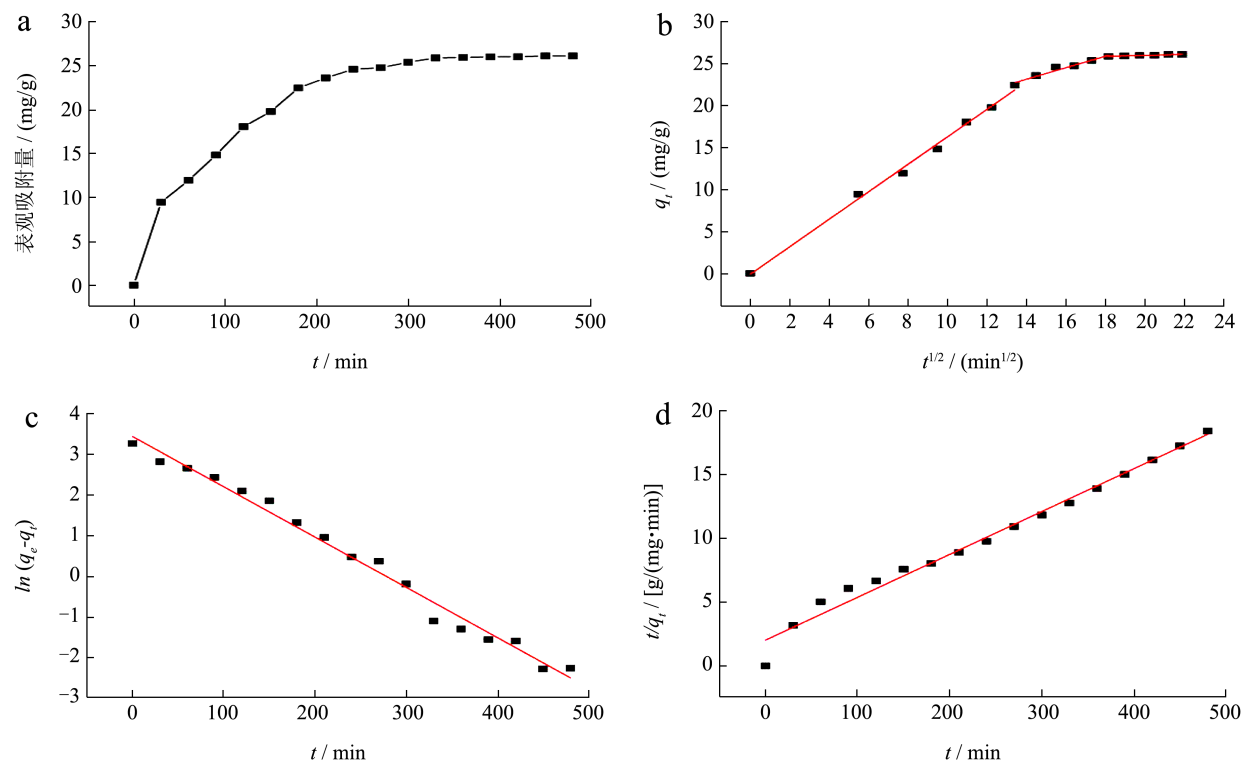


图 1 荔枝 GABA 的静态吸附动力学曲线 (a)、粒子内扩散模型 (b)、拟一级动力学模型 (c) 和拟二级动力学模型 (d) 模型拟合

Fig.1 Static adsorption kinetics curves(a), intra-particle diffusion model (b), pseudo-first-order kinetic model (c) and pseudo-second-order kinetic model (d) of litchi GABA

表 2 吸附动力学模型拟合方程及相关参数

Table 2 Adsorption kinetics model fitting equation and related parameters		
动力学模型	回归方程	模型参数
粒子内扩散模型	$q_{t1}=1.636\ 93t^{0.5}+0.095\ 15$	$K_1/(\text{min}^{-1})=1.636\ 93$
		$C_1/(\text{mg/g})=0.095\ 15$
		$R^2=0.994\ 55$
	$q_{t2}=0.686\ 21t^{0.5}+13.533\ 65$	$K_2/(\text{min}^{-1})=0.686\ 21$
		$C_2/(\text{mg/g})=13.533\ 65$
		$R^2=0.951\ 24$
拟一级动力学模型	$\ln(q_e-q_t)=3.438\ 29-0.012\ 36t$	$K_3/(\text{min}^{-1})=0.063\ 54$
		$C_3/(\text{mg/g})=24.718\ 95$
		$R^2=0.937\ 84$
拟二级动力学模型	$t/q_t=2.020\ 04+0.033\ 59t$	$k_1/(\text{min}^{-1})=0.012\ 36$
		$q_e/(\text{mg/g})=31.13$
		$R^2=0.987\ 08$
		$k_2/(\text{g}/(\text{mg}\cdot\text{min}))=0.033\ 59$
		$q_e/(\text{mg/g})=29.77$
		$R^2=0.982\ 69$

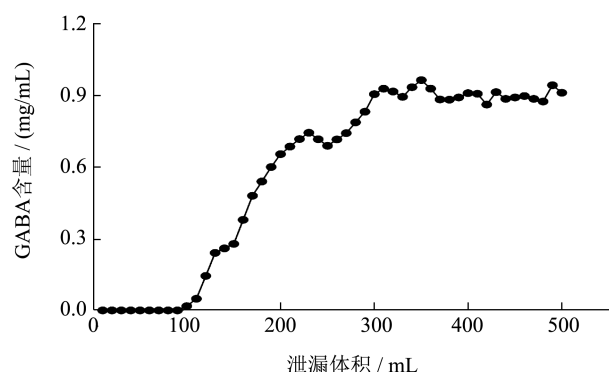


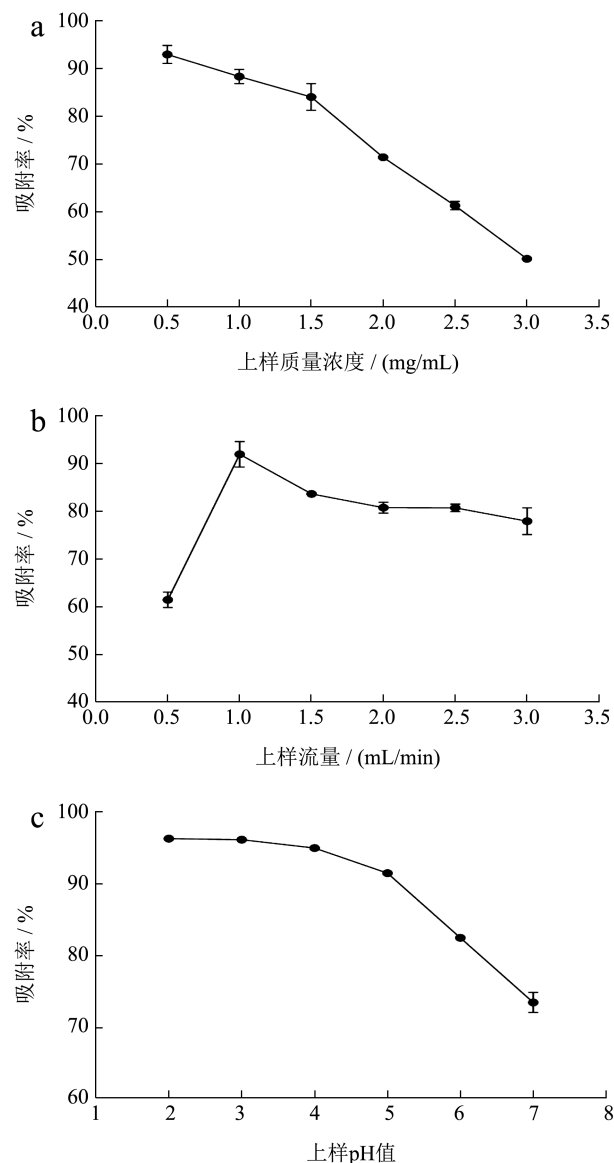
图2 732 阳离子交换树脂泄漏曲线

Fig.2 Leakage curve of 732 cation exchange resin

2.4 离子交换柱层析纯化工艺优化

为进一步优化荔枝 GABA 的动态吸附与解吸过程,对上样量、溶液质量浓度、上样流速、上样 pH 值、洗脱液质量浓度和洗脱流量进行了评估。由图 3a 可知, 732 离子交换树脂对 GABA 的吸附量与 GABA 质量浓度呈负相关, 以质量浓度为 0.5 mg/g 对应的吸附率最高, 为 92.95%。当上样质量浓度大于 1.5 mg/mL 时, 树脂的吸附率迅速降低, 可能是高浓度条件下, 溶液中其他氨基酸或对树脂亲和能力更强的杂质增多并竞争吸附位点, 导致 GABA 可结合位点减少进而提前达到吸附饱和, 同时多糖等化合物的质量浓度的增加可能减少 GABA 与树脂间的接触面积^[24]。由图 3b 可知, 随着上样流速的增大, 树脂的吸附率先升高后缓慢降低, 吸附率在上样质量浓度为 1.0 mL/min 时达到最大值 91.95%, 过高的上样流量导致荔枝 GABA 与树脂接触时间减少, 部分 GABA 还未被树脂吸附便已经流出层析柱, 而较低的流量使得 GABA 有充分的时间与树脂发生交互作用^[23]。图 3c 与图 3a 显示出相似的结果趋势, 吸附率随着上样液 pH 值的升高而减小, pH 值在 2~4 范围内树脂的吸附率相差不大, 分别为 96.30%、96.17% 和 94.99%。GABA 与其他氨基酸一样, 具有两性解离特性, 其解离方式取决于溶液的 pH 值, 当上样液 pH 值小于 GABA 的等电点 ($pI=7.3$) 时, $-COO^-$ 与树脂上的 H^+ 结合而被吸附在树脂上, 因此, 上样液 pH 值越高, GABA 解离程度越小, 树脂对其吸附能力越低^[15]。图 3d 表明洗脱率与洗脱液质量浓度整体呈正相关, 但洗脱液浓度超过 1.5 mol/L 后, 洗脱率增幅不明显, 1.5 mol/L 和 2.0 mol/L 洗脱液对荔枝 GABA 的洗脱率分别为 83.52% 和 82.91%, 洗脱液质量浓度

越大, pH 值越高, 可迅速使 GABA 的解离度降低, 从而减弱其对树脂的亲合力而被脱附, 同时, 高浓度洗脱液中的离子强度较大, 可将被吸附的 GABA 置换出来。图 3e 与图 3b 显示出相似的结果趋势, 解吸量在洗脱流速为 1.0 mL/min 时最大, 可达 92.05%, 低洗脱流速条件使 GABA 与洗脱液充分接触并解吸下来, 但过慢的洗脱速度会导致生产周期延长和能耗增加, 同时解吸的杂质增多, 而过高的洗脱流速导致洗脱液与树脂之间交换不完全, GABA 不能完全扩散到洗脱液中^[24]。因此, 综合考虑时间与试剂成本, 选择上样质量浓度 1.0 mg/mL, 上样流量 1.0 mL/min, 上样 pH 值为 4, 洗脱液浓度 1.5 mol/L 和洗脱流速 1.0 mL/min 作为最佳洗脱条件进行树脂柱层析纯化, 其得率为 92.05%, 纯度为 77.40%。



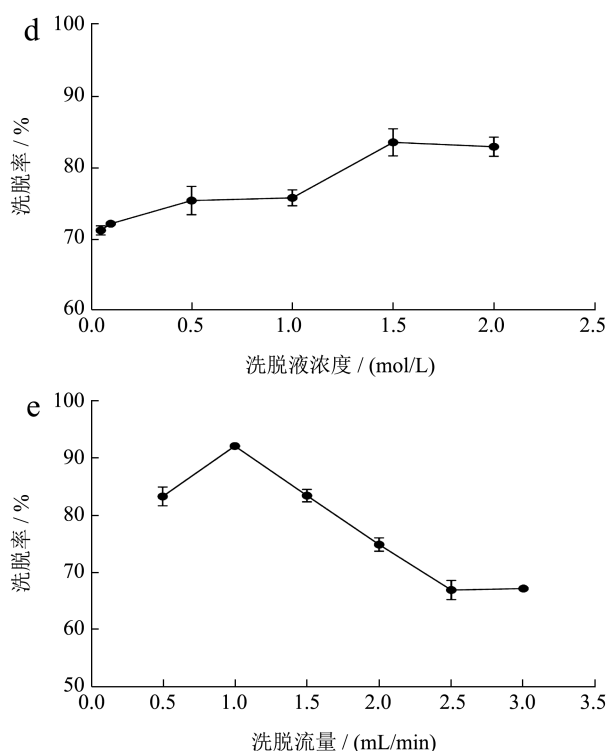


图3 上样质量浓度 (a)、上样流速 (b) 和样液 pH 值 (c) 对吸附效果的影响及洗脱液浓度 (d) 和洗脱流速 (e) 对解吸效果的影响

Fig.3 The effects of initial sample concentration (a), sample loading flow rate (b), and sample solution pH (c) on adsorption efficiency, as well as the effects of eluent concentration (d) and elution flow rate (e) on desorption efficiency

2.5 树脂柱层析纯化前后荔枝GABA样品比较

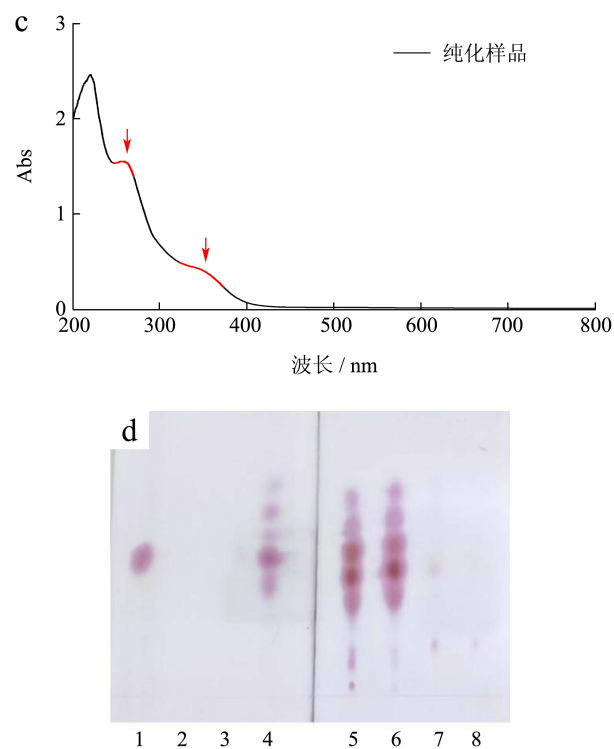
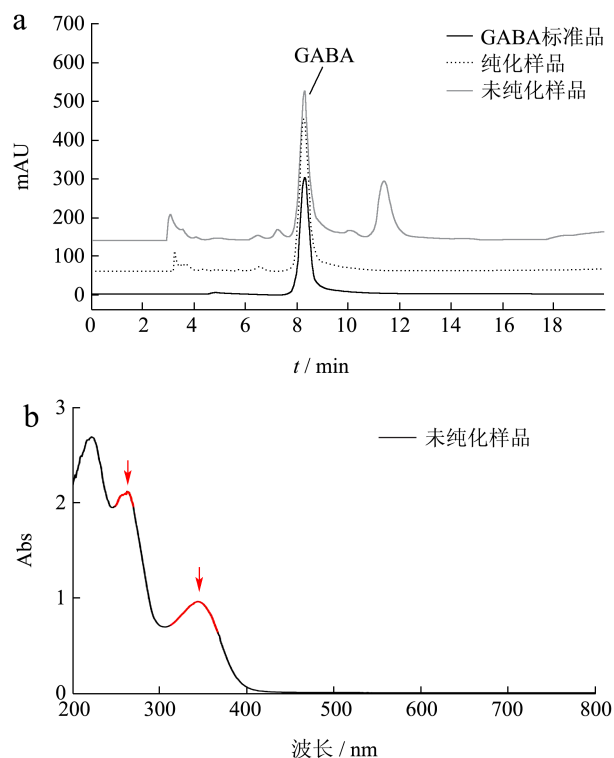


图4 样品纯化前后的 HPLC 图 (a)、样品纯化前 (b) 和纯化后 (c) 的紫外可见吸收光谱图以及纯化样品氨基酸薄层色谱图 (d)

Fig.4 HPLC chromatograms before and after sample purification (a), UV-visible absorption spectra of the sample before (b) and after (c) purification, and amino acid thin-layer chromatography (TLC) image of the purified sample (d)

注：薄层色谱图编号 1：GABA 标准品；编号 2：分管 (10 mL/管) 收集第 5 管洗脱液；编号 3：第 10 管洗脱液；编号 4：第 15 管洗脱液；编号 5：第 20 管洗脱液；编号 6：第 25 管洗脱液；编号 7：第 30 管洗脱液；编号 8：第 35 管洗脱液。

HPLC 检测结果显示，树脂柱层析纯化后样品的杂质峰减少，纯度提高至 77.40%。样品纯化后的紫外可见吸收光谱图结果同样显示其在 345 nm 和 263 nm 处的吸收减弱，表明纯化后部分杂质被除去。样品氨基酸薄层色谱图如图 4d 所示，表明纯化后的样品中还含有多种氨基酸，第 5 管和第 6 管洗脱液中谷氨酸样品点（位于 GABA 下方）显色较强，初步判断纯化样品中含有较多的谷氨酸，因此，进一步采用等电点沉淀法去除。

2.6 GABA 结晶工艺

对纯化后的荔枝 GABA 样品进行结晶、洗涤、干燥处理后，所得样品为淡黄色结晶性粉末，根据 HPLC 检测结果，GABA 结晶样品保留时间

在 8.427 min 左右, 样品纯度为 95.35%。

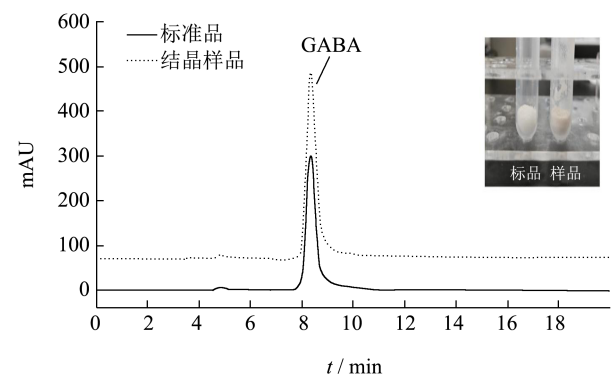


图 5 荔枝 GABA 结晶的 HPLC 图
Fig.5 HPLC chromatogram of litchi GABA crystals

2.7 核磁共振结果分析

该化合物的 ¹H NMR 谱图信息如下: ¹H NMR (600 MHz, Deuterium Oxide): δH 2.97 (t, J=6.9 Hz, 2H, H-4), 2.26 (t, J = 7.4 Hz, 2H, H-2), 1.91-1.78 (m, 2H, H-3); ¹³C NMR 谱图信息: ¹³C NMR (151 MHz, Deuterium Oxide): δC 181.52 (s, C-1), 39.26 (t, C-4) 34.35 (t, C-2), 23.65 (t, C-3)。上述数据与文献^[25]的报道一致, 进一步证明该化合物为 GABA。

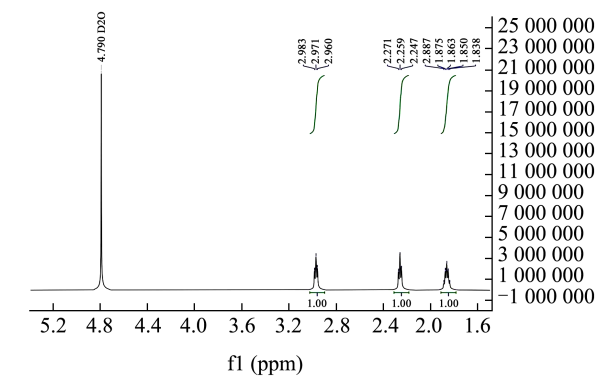


图 6 ¹H NMR 谱图
Fig.6 ¹H NMR spectrum

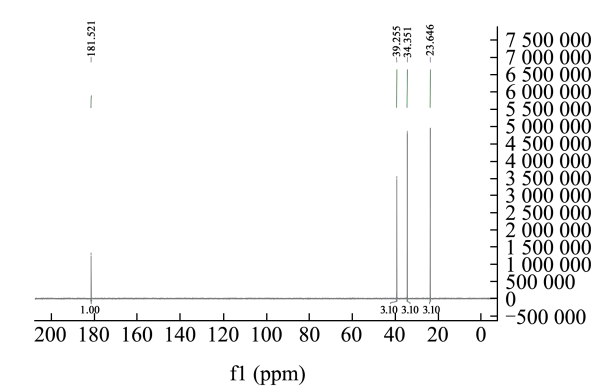


图 7 ¹³C NMR 谱图
Fig.7 ¹³C NMR spectrum

3 结论

研究结果表明, 732 阳离子交换树脂对荔枝 GABA 具有较好的分离纯化效果, 该吸附过程受到液膜扩散、粒内扩散和颗粒内表面上的吸附-解吸作用等多元扩散的共同作用。动态洗脱优化实验表明在上样质量浓度为 1.0 mg/mL, 上样流速为 1.0 mL/min, 上样 pH 值为 4, 洗脱液浓度为 1.5 mol/L、洗脱流速为 1.0 mL/min 时, 732 阳离子交换树脂对荔枝 GABA 的吸附和解吸效果最好; 进一步通过结晶工艺可获得高纯度荔枝 GABA 结晶, 其纯度可达 95.35%。本研究进一步为荔枝 GABA 的分离精制提供了一定的参考价值。

参考文献

[1] XIONG R, WANG X, WU J, et al. Polyphenols isolated from lychee seed inhibit alzheimer’s disease-associated tau through improving insulin resistance via the IRS-1/PI3K/AKT/GSK-3β pathway [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2020, 251: 112548.

[2] ZHANG Y, JIN D, AN X, et al. Lychee seed as a potential hypoglycemic agent, and exploration of its underlying mechanisms [J]. Frontiers in Pharmacology, 2021, 12: 737803.

[3] ZHANG R, ZENG M, ZHANG X, et al. Therapeutic candidates for alzheimer’s disease: saponins [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(13): 10505.

[4] JIANG L, LUO Z, LIU H, et al. Preparation and characterization of chitosan films containing lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) pericarp powder and their application as active food packaging [J]. Foods, 2021, 10(11): 2834.

[5] NANGLIA S, MAHAJAN B V C, SINGH N, et al. Combined effect of acids and shellac coating on pericarp browning, enzymatic activities, and biochemical attributes of litchi fruit during storage [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2022, 46(5): 16535.

[6] 陈卓慧,胡卓炎,吕恩利,等.不同贮藏方式对双肩玉荷包荔枝氨基酸变化的影响[J].现代食品科技,2013,29(8): 1955-1960.

[7] KIM H, KIM H, SUH H J, et al. *Lactobacillus brevis*-fermented gamma-aminobutyric acid ameliorates depression-and anxiety-like behaviors by activating the brain-derived neurotrophic factor-tropomyosin receptor kinase B signaling pathway in BALB/C mice [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(6): 2977-2988.

[8] JEONG A, HWANG J, JO K, et al. Fermented gamma

- aminobutyric acid improves sleep behaviors in fruit flies and rodent models [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(7): 3537.
- [9] CAI L, TAO Q, LI W, et al. The anti-anxiety/depression effect of a combined complex of casein hydrolysate and γ -aminobutyric acid on C57BL/6 mice [J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 971853.
- [10] 黄彩平.玉米淀粉糖生产中离子交换树脂的应用探讨[J].现代食品,2021,10:99-101.
- [11] FAN S H, LIU T T, WAN P, et al. Enrichment of the umami-taste-active amino acids and peptides from crab sauce using ethanol precipitation and anion-exchange resin [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2021, 45(5): e15390.
- [12] 赵凯飞. γ -氨基丁酸多晶型与溶剂化物研究及其结晶工艺优化[D].天津:天津大学,2017.
- [13] 李雁琴.红枣中GABA检测方法优化及其变化规律的研究[D].阿拉尔:塔里木大学,2020.
- [14] 杨晶晶.三七茎叶中 γ -氨基丁酸提取分离工艺的研究[D].昆明:昆明理工大学,2015.
- [15] 张杰,赵洋溢,林静,等.蓝莓酒离子交换树脂降酸工艺研究[J].东北农业大学学报,2022,53(7):44-56.
- [16] 王姣斐,陈野,陈远平.离子交换层析分离纯化发酵米糠中的 γ -氨基丁酸[J].食品研究与开发,2015,36(18):62-68.
- [17] WANG N W. Ion exchange in purification [J]. Bioprocess Technol, 1990, 9: 359-400.
- [18] 武彩莲,郭长江.离子交换法与氨基酸的分离纯化[J].氨基酸和生物资源,2005,4:50-53.
- [19] 黄金福.基于氢化松香酯构筑弱极性多孔树脂及其吸附三七总皂苷[D].南宁:广西民族大学,2023.
- [20] 王礼,杨光,杨波,等.海藻酸钠微球的制备优化及其吸附模型[J].食品与生物技术学报,2023,42(8):103-111.
- [21] 赵丽娟,李倩,李晨阳,等.天山莙菜秦皮乙素大孔树脂分离纯化工艺优化[J].食品与机械,2019,35(5):178-184.
- [22] 王妍惠.红树莓叶多酚提取纯化及其抗氧化活性研究[D].锦州:渤海大学,2021.
- [23] 汤丽琴.栀子黄色素的制备、生物活性及稳态化研究[D].南昌:江西农业大学,2022.
- [24] 修效友,刘芮,张文成.基于抗菌活性的银杏黄酮树脂吸附分离研究[J].食品与营养科学,2023,12(4):9.
- [25] 廖琦,贾薇,刘翠梅,等.水峰压制-核磁共振波谱用于可疑饮料中 γ -氨基丁酸、 γ -羟基丁酸、 γ -丁内酯和1,4-丁二醇的定性和定量分析[J].分析化学,2022,50(12):1907-1921.