

AB-8大孔树脂纯化绿豆皮黄酮工艺优化及纯化前后抗氧化能力比较

李 侠¹, 臧学丽², 徐祎博³, 王大为^{1,*}

(1. 吉林农业大学食品科学与工程学院, 吉林 长春 130118; 2. 长春医学高等专科学校, 吉林 长春 130031;
3. 辽源市粮油卫生检验监测站, 吉林 辽源 136200)

摘 要: 采用AB-8大孔树脂初步分离纯化绿豆皮黄酮。分别对上样条件和洗脱条件进行优化, 考察上样液质量浓度、上样液pH值、上样流速、以及洗脱剂体积分数、洗脱剂用量、洗脱流速对吸附解吸性能的影响, 最终确定AB-8大孔树脂的分离纯化绿豆皮黄酮工艺为上样液质量浓度1.5 mg/mL、上样液pH 5.0、上样流速1.0 mL/min; 洗脱液乙醇体积分数70%、洗脱剂用量225 mL、洗脱流速2.0 mL/min, 在此条件下分离纯化, 绿豆皮黄酮纯度由27.95%提高到62.38%。经紫外-可见光谱扫描, 出现黄酮类化合物特征峰带, 经红外光谱扫描, 光谱具备黄酮类物质特征官能团, 验证了黄酮类物质的存在; 利用扫描电镜对纯化前后黄酮类物质进行微观分析, 得出被包裹的片状和粉粒状颗粒大部分被释放出来, 这可能是导致纯化后黄酮类化合物纯度增高的原因。纯化后的绿豆皮黄酮与粗提物相比具有较高的抗氧化能力。

关键词: AB-8大孔树脂; 分离纯化; 黄酮; 鉴定; 抗氧化

Optimization of Purification of Flavonoids from Mung Bean Coat by AB-8 Macroporous Resin and Comparison of Antioxidant Capacity of Crude and Purified Flavonoids

LI Xia¹, ZANG Xueli², XU Yibo³, WANG Dawei^{1,*}

(1. College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;
2. Changchun Medical College, Changchun 130031, China; 3. Liaoyuan Grain and Oil Inspection Station, Liaoyuan 136200, China)

Abstract: In this study, AB-8 macroporous resin was used to separate and purify flavonoids from mung bean coat. To establish optimized sample loading and the elution conditions, the influence of sample concentration, pH and flow rate as well as eluent concentration, volume and flow rate on the adsorption and desorption efficiencies was investigated. The optimal conditions determined were as follows: sample concentration, 1.5 mg/mL; pH, 5.0; flow rate, 1.0 mL/min; and 225 mL of 70% ethanol as eluent at a flow rate of 2.0 mL/min. Under these conditions, the purity of mung bean coat flavonoids increased from 27.95% to 62.38%. The existence of flavonoids were confirmed by their characteristic peaks in UV-visible spectra and characteristic functional groups identified by infrared spectroscopy. Scanning electron microscopy (SEM) showed that most flaky and powdery particles were released, which might contribute to the increased purity of flavonoids after initial purification. Compared with crude extract, the purified flavonoids had higher antioxidant ability.

Keywords: AB-8 macroporous resin; separation and purification; flavonoids; identification; antioxidant

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201810043

中图分类号: TS210.9

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2018) 10-0283-08

引文格式:

李侠, 臧学丽, 徐祎博, 等. AB-8大孔树脂纯化绿豆皮黄酮工艺优化及纯化前后抗氧化能力比较[J]. 食品科学, 2018, 39(10): 283-290. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201810043. <http://www.spkx.net.cn>

LI Xia, ZANG Xueli, XU Yibo, et al. Optimization of purification of flavonoids from mung bean coat by AB-8 macroporous resin and comparison of antioxidant capacity of crude and purified flavonoids[J]. Food Science, 2018, 39(10): 283-290. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201810043. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2018-01-03

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)项目(2011AA100805)

第一作者简介: 李侠(1978—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为粮食、油脂与植物蛋白工程。E-mail: 271213494@qq.com

*通信作者简介: 王大为(1960—), 男, 教授, 博士, 研究方向为粮食、油脂与植物蛋白工程。E-mail: xcpyfzx@163.com

绿豆又称为青小豆或植豆^[1],在我国有悠久的种植历史,年产量约100万 t,远高于印度、缅甸、泰国等绿豆生产国^[2-3]。绿豆生产加工过程中产生大量的绿豆皮,这些绿豆皮除了少量被用作动物饲料外,大部分被当作废料而抛弃掉,不仅给环境造成了严重污染,也给资源造成了极大浪费。绿豆皮中主要成分为膳食纤维,还含有黄酮类、多酚类、生物甾醇、生物碱、香豆素等多种功能性成分^[4-6],其中黄酮类化合物是绿豆皮中重要的功效成分之一,具有抗肿瘤、抗氧化^[7-9]、增强免疫调节作用^[10-11]、降低血脂和胆固醇^[12-14]及预防高血压^[15]等多种生理功能。

黄酮类化合物的分离纯化方法很多,常见的有重结晶法、溶剂萃取法、树脂法、膜分离法、高速离心分离法等^[16-18]。重结晶法是利用黄酮类化合物不溶于酸溶液、易溶于碱溶液及丙酮和乙醇的性质,将黄酮类化合物与其他物质成分分离,进而达到纯化的目的,重结晶的次数越多,被纯化物质的纯度越高^[19]。但在重结晶过程中,往往要通过多次重结晶,才能获得纯度较高的黄酮类化合物,所以重结晶法操作起来比较耗时、耗力。溶剂萃取是利用黄酮类化合物在两种互不相溶或微溶的溶剂中溶解度或分配系数的不同,使黄酮类化合物从一种溶剂转移到另一种溶剂中,经过反复多次萃取,将黄酮类化合物分离出来。萃取时,黄酮类化合物在两相溶剂中分配系数相差越大,分离效率越高^[20],但溶剂萃取法在萃取过程中有机溶剂易挥发,对人体易造成伤害,而且手工操作比较麻烦、费时费力、且分离效率也不高。膜分离法是利用人工合成的、具有选择透过性的膜作为分离介质,在一定的推力作用下,实现料液中不同组分的分离^[21-22]。膜分离法适合分子质量差别较大的黄酮类化合物的分离,对于分子质量相差较小,化学结构相似的黄酮类物质则不适用^[23-24]。高速离心分离法是利用待分离物质与其混合的物质间密度不同,在高速运转的离心机离心力的作用下,进行分离的物理分离分析技术,但该分离方法不适合分子质量较小的黄酮类物质的分离。树脂法在分离纯化中应用比较广泛,其原理是利用树脂与黄酮类化合物相结合,使其与杂质分离,再用洗脱剂洗脱树脂上的目标物或让杂质与树脂结合,将目标物洗脱出来。由于大孔树脂具有较好的选择性、吸附量大、吸附速度快、再生方便等特点,所以广泛应用于天然化合物的初步分离。

本实验采用AB-8大孔树脂对绿豆皮粗提物进行纯化,以达到产品初步分离的目的,并采用紫外-可见光谱和傅里叶红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)扫描,验证初步纯化后黄酮类化合物的存在,应用扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)对绿豆皮黄酮粗提物和初步纯化物

进行微观分析,分析纯化后黄酮类化合物纯度提高的原因,为综合开发绿豆皮资源提供一定参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

芦丁标准品(纯度 $\geq 98\%$) 美国Sigma公司;无水乙醇、三氯化铝、石油醚、盐酸、溴化钾(均为分析纯) 北京化工厂;纤维素酶(酶活性 ≥ 150 U/mg) 上海惠世生化试剂有限公司;聚酰胺树脂(80~100目) 国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

TU-1901双光束紫外-可见分光光度计 北京普析通用仪器有限公司;LXJ-IIIB低速大容量离心机 上海安亭科学仪器厂;UB-7酸度计 德国赛多利斯股份公司;IRPrestge-21 FTIR仪、JSM-6610A SEM仪 日本岛津公司;AUY220分析电子天平 上海精天电子仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 绿豆皮黄酮粗提物的制备

前期实验采用超声波-酶法提取绿豆皮黄酮类化合物,得到最优条件为料液比1:30(g/mL)、超声功率192 W、超声时间28 min、加酶量0.24%、酶解时间40 min,提取液真空抽滤后加入硅藻土,去除大分子蛋白和糖,再次抽滤,石油醚萃取,下层萃取液浓缩,冷冻干燥后,测得绿豆皮黄酮类化合物的纯度为27.95%,收集备用。

1.3.2 动态吸附泄漏曲线的绘制

在大孔树脂动态吸附过程中,当对有效成分的吸附量达到饱和时,有效成分吸附会被减弱或消失,这时有效成分则从树脂上泄漏流出,所以有必要对大孔树脂做动态吸附研究,为大孔树脂的用量和被分离物的上样量提供实验依据。

准确称取预处理后的AB-8大孔树脂2 g,装柱,将质量浓度为1.5 mg/mL的绿豆皮黄酮粗提液pH值调至5.0,以1 mL/min的上样流速进行连续上样,流出液10 mL收集成1管,测定每管样液的吸光度,计算流出液中黄酮类化合物的质量浓度,以流出液体积为横坐标,黄酮类化合物质量浓度为纵坐标,绘制AB-8大孔树脂动态泄漏曲线。

1.3.3 AB-8大孔吸附树脂纯化绿豆皮黄酮类化合物上样条件的优化

在吸附过程中,大孔树脂的极性、孔径以及上样液质量浓度、流速等都是影响大孔树脂吸附量重要因素,从而影响被分离物分离纯化效果^[25-27],为使绿豆皮黄酮类化合物更好得到分离,本实验以上样液质量浓度、上样

液pH值、上样流速为试验因素,分别考察3个因素对绿豆皮黄酮类化合物吸附量的影响。动态吸附量的计算公式见式(1):

$$\text{吸附量}/(\text{mg/g}) = \frac{C_0V_0 - C_1V_1}{M} \quad (1)$$

式中: C_0 、 C_1 分别为上柱前原液和上柱后流出液中黄酮类化合物的质量浓度/(mg/mL); V_0 、 V_1 分别为上柱前原液和上柱后流出液体积/mL; M 为大孔树脂质量/g。

1.3.3.1 单因素试验

准确称取处理好的AB-8大孔树脂,每份2 g,分别装入玻璃柱中,以对黄酮类化合物吸附量为考察指标,将绿豆皮黄酮提取液分别以0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mg/mL的上样液质量浓度,以0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL/min上样流速,pH值分别为3.5、4.0、4.5、5.0、5.5,上柱层析,收集流出液,测定吸光度,计算吸附量,考察3个因素对黄酮类化合物吸附量的影响。

1.3.3.2 正交试验

在单因素试验结果的基础上,以对黄酮类化合物吸附量为考察指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,优化上样条件,因素与水平见表1。

表1 $L_9(3^4)$ 正交试验因素与水平
Table 1 Code and level of independent variables used in $L_9(3^4)$ orthogonal array design

水平	因素		
	A上样液质量浓度/(mg/mL)	B pH	C上样流速/(mL/min)
1	1.0	4.5	0.5
2	1.5	5.0	1.0
3	2.0	5.5	1.5

1.3.4 AB-8大孔吸附树脂分离绿豆皮黄酮类化合物洗脱条件的优化

影响大孔树脂洗脱效果的因素除了树脂本身所具有的物理、化学性质外,还与洗脱剂的种类、洗脱剂体积分数、以及洗脱剂的用量和流速等有关^[28]。准确称取处理好的AB-8大孔树脂2 g,装入玻璃柱中,以1.3.3节中筛选出的最优条件进行上样后,用蒸馏水洗至流出液呈无色透明,再进行单因素洗脱试验,考察洗脱剂体积分数、洗脱剂用量以及洗脱流速对解吸率的影响。解吸率按式(2)计算:

$$\text{解吸率}/\% = \frac{C_2V_2}{C_0V_0 - C_1V_1} \times 100 \quad (2)$$

式中: C_0 、 C_1 、 C_2 分别为上柱前原液、上柱后流出液和洗脱后的洗脱液中黄酮类化合物质量浓度/(mg/mL); V_0 、 V_1 、 V_2 分别为上柱前原液、上柱后流出液和洗脱后的洗脱液体积/mL。

1.3.4.1 洗脱剂体积分数对解吸率的影响

准备5根玻璃层析柱,装柱上样后,分别以体

积分数10%、30%、50%、70%、90%的乙醇溶液以2 mL/min的流速进行洗脱,洗脱剂用量为5 BV(床体积),收集洗脱液,测定洗脱液中黄酮类化合物的含量,各取0.5 mL,测定其吸光度,计算每个柱子在各洗脱体积分数下的动态解吸率,考察洗脱剂体积分数对解吸率的影响。

1.3.4.2 洗脱剂用量对解吸率的影响

准备5根玻璃层析柱,装柱上样后,以体积分数70%乙醇溶液以2 mL/min的流速进行洗脱,洗脱剂用量分别为45、90、135、180、225、270 mL,收集洗脱液,测定洗脱液中黄酮类化合物的含量,各取0.5 mL,测定吸光度,计算每个柱子在各洗脱剂用量下的动态解吸率,考察洗脱剂用量对解吸率的影响。

1.3.4.3 洗脱流速对解吸率的影响

准备5根玻璃层析柱,装柱上样后,以70%乙醇溶液为洗脱溶剂,分别以1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL/min的洗脱流速进行洗脱。收集洗脱液,测定洗脱液中黄酮类化合物的含量,各取0.5 mL,测定吸光度,计算每个柱子在不同洗脱速度下的动态解吸率,确定洗脱流速。

1.3.5 AB-8大孔吸附树脂分离绿豆皮黄酮类化合物洗脱特性曲线的绘制

按照1.3.3节确定的最佳上样条件和1.3.4节的洗脱条件进行上样洗脱,洗脱液每10 mL收集成1管,每管各取0.5 mL,测定每管洗脱液的质量浓度,以洗脱体积为横坐标,洗脱下来的黄酮类化合物质量浓度为纵坐标,绘制洗脱曲线。

1.3.6 纯度计算

黄酮类化合物的纯度按公式(3)进行计算:

$$\text{纯度}/\% = \frac{\text{黄酮类化合物质量}}{\text{干燥后样品质量}} \times 100 \quad (3)$$

1.3.7 绿豆皮黄酮类化合物的鉴定分析

1.3.7.1 紫外-可见光谱扫描分析

取样品溶液少量,用75%乙醇溶液稀释后,放入紫外-可见分光光度计中,在波长200~600 nm范围进行光谱扫描。

1.3.7.2 FTIR扫描分析

将干燥后的样品准确称量1 mg, KBr烘干后称取100 mg,研磨混合均匀后,压片,放入FTIR仪,采用红外光谱透射法进行扫描。扫描条件为:波数4 000~400 cm^{-1} ,分辨率4 cm^{-1} ,扫描32次。

1.3.7.3 SEM分析

分别取干燥后的绿豆皮黄酮粗提物和经AB-8大孔树脂纯化后的样品各少量,置于垫片上,样品表面进行喷金处理后,放入SEM下扫描。

1.3.8 抗氧化能力的测定

1.3.8.1 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)自由基清除能力

准确称取DPPH 20 mg,用无水乙醇定容至250 mL容

量瓶中, DPPH溶液浓度为 2×10^{-4} mol/L, 待用; 将VC (对照)、绿豆皮黄酮纯化物、绿豆皮黄酮粗提物用无水乙醇配制成不同质量浓度的待测液, 待用。

1) 用移液枪移取待测液100 μ L与DPPH溶液4 mL置于具塞试管中, 摇匀, 静止30 min后, 以无水乙醇为参比, 在517 nm波长下测定吸光度 A_i 。2) 用移液枪移取待测液100 μ L与无水乙醇4 mL置于具塞试管中, 摇匀, 静止30 min后, 以无水乙醇为参比, 在517 nm波长下测定吸光度 A_j 。3) 用移液枪移取无水乙醇100 μ L与DPPH溶液4 mL置于具塞试管中, 摇匀, 静止30 min后, 以无水乙醇为参比, 在517 nm波长下测定吸光度 A_c 。利用公式(4)计算待测物对DPPH自由基清除率:

$$\text{DPPH自由基清除率}/\% = (1 - \frac{A_i - A_j}{A_c}) \times 100 \quad (4)$$

1.3.8.2 羟自由基清除能力

将绿豆皮黄酮纯化物和粗提物以及VC配制成不同质量浓度的待测液, 待用。取各待测液100 μ L置于不同锥形瓶内, 各加入100 μ L的6 mmol/L硫酸亚铁溶液和100 μ L的6 mmol/L的过氧化氢溶液, 混合均匀, 静止10 min后, 加入100 μ L的6 mmol/L的水杨酸溶液, 混匀, 静止30 min后, 在510 nm波长处测定吸光度 A_i 。重复上述步骤, 以蒸馏水代替水杨酸再次在510 nm波长处测定吸光度 A_j , 用蒸馏水代替样品溶液在510 nm波长下测得的吸光度 A_0 , 则待测液对羟自由基清除率的计算为公式(5):

$$\text{羟自由基清除率}/\% = (1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}) \times 100 \quad (5)$$

2 结果与分析

2.1 AB-8大孔树脂动态吸附泄漏曲线

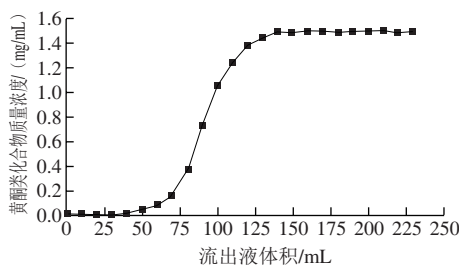


图1 大孔树脂动态吸附泄漏曲线

Fig. 1 Dynamic adsorption leakage curve of macroporous resin

当上样条件一定时, 上样液流过树脂, 黄酮类化合物会被树脂吸附, 经过一定时间后, 黄酮类化合物在树脂与上样液中分配达到平衡, 即溶液中的黄酮类化合物不断被树脂吸附, 同时吸附在树脂上的黄酮类化合物又不断脱附, 当吸附速率等于脱附速率时, 出现泄漏现

象, 由图1可知, 流出液体积为50 mL时, 达到动态平衡, 即出现泄漏现象。但在吸附树脂吸附过程中, 一般认为泄漏点为流出溶液中黄酮类化合物浓度为原上样浓度的十分之一时对应的流出液体积^[29], 即图1中流出液中黄酮类化合物质量浓度为0.15 mg/mL时对应的流出液体积70 mL为该泄漏曲线的泄漏点。从图1可以看出, 上样液体积很小时, 树脂对黄酮类化合物的吸附很好, 没有泄漏现象, 当流出液为70 mL, 黄酮类化合物开始泄漏, 流出液体积达到130 mL时, 流出的绿豆皮黄酮类化合物质量浓度与原上样液中绿豆皮黄酮类化合物质量浓度接近, 此时AB-8大孔树脂对绿豆皮黄酮类化合物的吸附已达到饱和状态, 因此可以确定, 在此上样条件下, AB-8大孔树脂分离纯化绿豆皮黄酮类化合物最大上样量不能超过130 mL。

2.2 上样条件的优化结果

2.2.1 单因素试验结果

2.2.1.1 上样液质量浓度对黄酮类化合物吸附量的影响

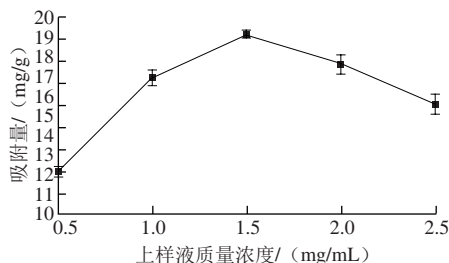


图2 上样液质量浓度对黄酮类化合物吸附量的影响

Fig. 2 Effect of sample concentration on adsorption of flavonoids

由图2可以看出, 随着上样液质量浓度的增加, AB-8大孔树脂对黄酮类化合物的吸附量先增加后减小, 当上样液质量浓度在1.5 mg/mL时, 此时有最大吸附量19.14 mg/g。上样液质量浓度未达到1.5 mg/mL时, 大孔吸附树脂上有足够的吸附空间吸附溶液中的黄酮类化合物, 所以随着上样液质量浓度的增加, 树脂对黄酮类化合物的吸附量也增加。但上样液质量浓度超过1.5 mg/mL时, 溶液中的杂质随之增多, 也被树脂所吸附, 侵占了黄酮类化合物的吸附空间, 所以, 在上样液质量浓度大于1.5 mg/mL时, 随着上样液质量浓度的增加, 树脂对黄酮类化合物的吸附量减少。

2.2.1.2 上样液pH值对黄酮类化合物吸附量的影响

由图3可以看出, 随着上样液pH值的增大, AB-8大孔树脂对黄酮类化合物的吸附量先增加后减小, 当pH值在5.0时, 此时有最大吸附量为20.67 mg/g。这是因为当上样液pH值在5.0时, 溶液中黄酮类化合物存在形式为分子形式, 有利于大孔树脂的吸附, pH值过高或过低, 黄

酮类化合物存在形式都会改变,或形成盐或分子中羟基上的 H^+ 离去,以负离子形式存在,2种存在方式都不利于AB-8大孔树脂的吸附。

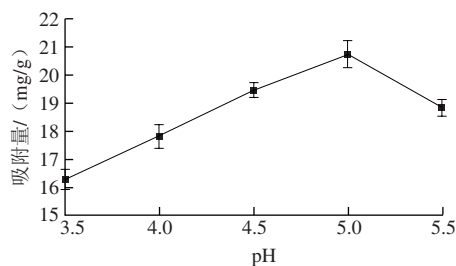


图3 pH值对黄酮类化合物吸附量的影响

Fig. 3 Effect of pH on adsorption of flavonoids

2.2.1.3 上样流速对黄酮类化合物吸附量的影响

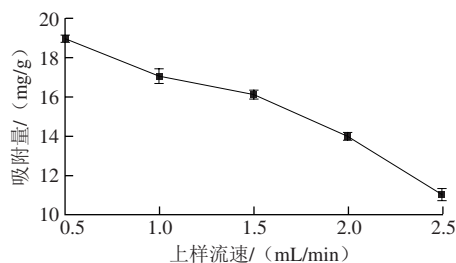


图4 上样流速对黄酮类化合物吸附量的影响

Fig. 4 Effect of sample flow rate on adsorption of flavonoids

由图4可以看出,随着上样流速的增大,AB-8大孔树脂对黄酮类化合物的吸附量逐渐减小,也就是随着上样流速的增加,层析柱流出液中含有的黄酮类化合物越来越多。这是因为,上样流速快,绿豆皮中黄酮类化合物接触大孔树脂时间短,黄酮类化合物还没来得及被吸附就流出柱体,所以呈现出上样流速快,大孔树脂对绿豆皮黄酮类化合物吸附量小,上样流速慢,大孔树脂对绿豆皮黄酮类化合物吸附量反而增高的现象。然而,在实际操作中,上样流速过慢会影响实验周期,所以选择上样流速1.0 mL/min为宜。

2.2.2 正交试验结果

由表2可以看出,AB-8大孔树脂纯化绿豆皮黄酮最优上样条件为 $A_2B_2C_3$,3个因素对绿豆皮黄酮类化合物的吸附量影响程度依次为 $A > C > B$,在正交表中最佳上样条件下对绿豆皮黄酮类化合物吸附量为21.59 mg/g,和理论上样条件 $A_2B_2C_2$ 不符。经过验证实验,在理论上样条件下得到绿豆皮黄酮类化合物吸附量为22.37 mg/g,大于实际优化值,所以AB-8大孔树脂纯化绿豆皮黄酮最优上样条件为 $A_2B_2C_2$,即上样液质量浓度1.5 mg/mL、pH 5.0、上样流速1.0 mL/min。

表2 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果

Table 2 $L_9(3^4)$ Orthogonal array design with response variable

试验号	A上样液质量浓度	B pH值	C上样流速	D空白列	吸附量/(mg/g)
1	1	1	1	1	14.26
2	1	2	2	2	19.33
3	1	3	3	3	17.28
4	2	1	2	3	20.14
5	2	2	3	1	21.59
6	2	3	1	2	17.88
7	3	1	3	2	16.51
8	3	2	1	3	15.94
9	3	3	2	1	17.43
K_1	50.87	50.91	48.08	53.28	
K_2	59.61	56.86	56.90	53.72	
K_3	49.88	52.59	55.38	53.36	
k_1	16.96	16.97	16.03	17.76	
k_2	19.87	18.95	18.97	17.91	
k_3	16.63	17.53	18.46	17.79	
R	3.24	1.98	2.94	0.15	

2.3 洗脱条件的优化结果

2.3.1 洗脱剂体积分数及洗脱剂用量的确定

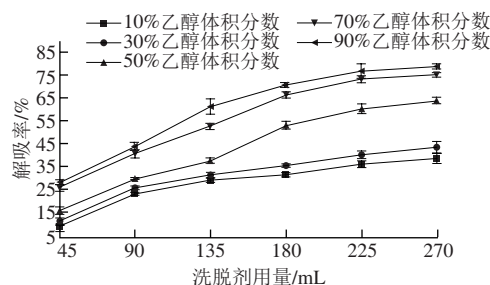


图5 洗脱剂体积分数及洗脱剂用量对黄酮解吸率的影响

Fig. 5 Effect of eluent concentration and dosage on desorption of flavonoids

由图5可知,随着洗脱剂乙醇体积分数的增加,洗脱剂对绿豆皮黄酮类化合物的解吸能力增大,即表现为乙醇体积分数越高,黄酮类化合物的解吸率越大。这是因为乙醇体积分数越高,洗脱剂的极性越弱,而弱极性的AB-8树脂吸附的极性较小的黄酮类化合物很容易被弱极性的洗脱剂洗脱下来,所以洗脱剂乙醇的体积分数越高,对黄酮类化合物的解吸能力越强,解吸率越高,但考虑到乙醇体积分数越大,除了有黄酮类化合物被洗脱出来,杂质也会随之洗脱下来,综合考虑,选择体积分数为70%的乙醇溶液作洗脱剂为宜。另外,从图5还可看出,选用70%乙醇溶液为洗脱剂时,当洗脱剂用量达到225 mL(约5倍树脂柱体积),解吸已经达到平衡,增大洗脱体积,解吸率变化不明显。

2.3.2 洗脱流速的确定

由图6可知,随着洗脱流速的增加,AB-8大孔树脂对绿豆皮黄酮类化合物的解吸率逐渐减小,洗脱效果明显减弱。这是因为洗脱流速大,洗脱剂与树脂接触时间过

短, 黄酮类化合物还没来得及被溶入洗脱液中, 洗脱剂就流出了树脂。所以洗脱流速越大, 解吸效果越差。但考虑洗脱流速过小, 影响实验进度, 所以洗脱流速选择 2.0 mL/min 为宜。

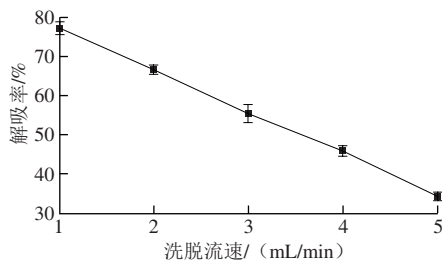


图6 洗脱流速对黄酮类化合物解吸率的影响

Fig. 6 Effect of eluent flow rate on desorption of flavonoids

2.3.3 动态洗脱曲线

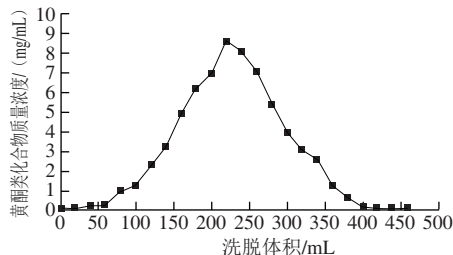


图7 动态洗脱曲线

Fig. 7 Dynamic elution curve

由图7可知, 用体积分数为70%的乙醇作为洗脱剂, 以 2.0 mL/min 的速率进行洗脱, 当洗脱剂体积为 20 mL 时, 即有黄酮类化合物被洗脱下来, 在洗脱剂体积为 220 mL 时, 黄酮类化合物质量浓度出现最高峰, 在洗脱剂体积达到 400 mL 时, 黄酮类化合物基本全部被洗脱下来。洗脱曲线出峰早, 无明显拖尾现象, 洗脱良好。

2.3.4 纯化后绿豆皮黄酮纯度的测定

按 AB-8 大孔树脂的初步分离纯化绿豆皮黄酮工艺进行 3 次重复实验, 经计算绿豆皮黄酮纯度分别为 59.91%、63.04%、64.19%, 取其平均值为 62.38%, 相对标准偏差为 3.55%。

2.4 AB-8 大孔树脂初步纯化后结构鉴定

2.4.1 紫外-可见光谱分析

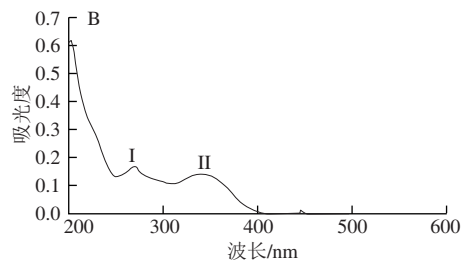
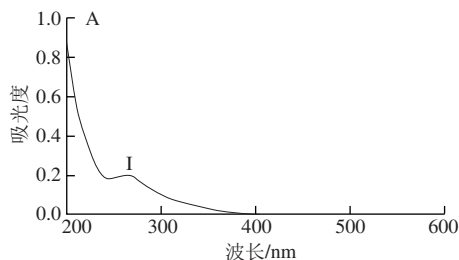


图8 AB-8大孔树脂层析后水洗(A)和醇洗(B)馏分的紫外-可见光扫描图

Fig. 8 Ultraviolet-visible absorption spectra of washing (A) and ethanol eluted (B) fractions

由图8A可知, 蒸馏水冲洗部分仅在 250~300 nm 间出现了一个峰, 即峰I, 不具备黄酮类化合物的出峰位置, 所以蒸馏水冲洗部分不含有黄酮类化合物或者含有黄酮类化合物甚微。由图8B可知, 70%醇洗部分则在 250~280 nm 和 300~400 nm 间分别出现了黄酮类化合物的 2 个明显的特征峰, 峰I和峰II, 所以 70%乙醇洗脱液中含有丰富的黄酮类化合物, 将 AB-8 大孔树脂初步纯化后的样液经旋转蒸发、冷冻干燥后, 计算得到黄酮类化合物的纯度为 62.38%。

2.4.2 FTIR 分析

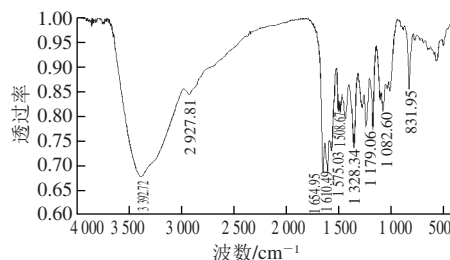


图9 AB-8大孔树脂初步纯化后FTIR图

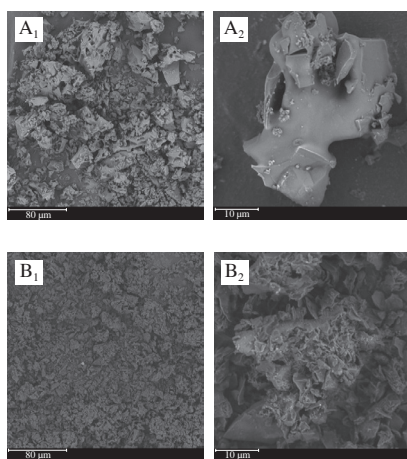
Fig. 9 FTIR spectrum of purified flavonoids

如图9所示, 经过 AB-8 大孔树脂初步纯化的绿豆皮黄酮经红外光谱扫描具备了黄酮类物质应具有的特征官能团: 波数 3 392.72 cm^{-1} 是由于羟基的存在, 分子间和分子内部相互作用使羟基缔合而形成较宽大的强吸收峰; 波数 2 927.81 cm^{-1} 是亚甲基的 C—H 伸缩振动峰; 波数 1 654.95 cm^{-1} 是由于芳酮羰基 C=O 伸缩振动所引起的特征吸收峰; 波数 1 610.49、1 575.03 cm^{-1} 和 1 508.67 cm^{-1} 为苯环中的 C=C 振动特征吸收峰; 波数 1 328.34 cm^{-1} 为羟基弯曲振动特征吸收峰; 波数 1 200~1 050 cm^{-1} 的吸收峰为酚羟基的 C—O 特征峰; 波数 831.95 cm^{-1} 为芳香环中的 =C—H 振动特征吸收峰。

2.4.3 SEM 分析

前期工作已经证实了绿豆皮黄酮类化合物主要含有牡荆素和异牡荆素 2 种黄酮单体^[30]。从图10可以看出, 超声波-酶法提取出来的黄酮粗提物中能看到片状和粉粒状

颗粒被暴露出来(图10A), 但仍有大部分这样的颗粒被包裹着, 黏在一起。经过AB-8大孔树脂纯化后的纯化物经SEM可以看出, 被包裹的片状和粉粒状颗粒大部分被释放出来(图10B)。这可能是导致纯化后黄酮类化合物纯度增高的原因。



A. 粗提物; B. 初步纯化物。1. $\times 1000$; 2. $\times 6000$ 。

图10 粗提物和AB-8大孔树脂初步纯化物SEM图

Fig. 10 SEM picture of crude and purified extract

2.5 抗氧化能力测定结果

2.5.1 对DPPH自由基清除能力的比较

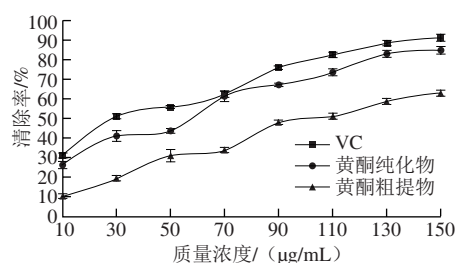


图11 DPPH自由基清除能力的比较

Fig. 11 Comparison of DPPH free radical scavenging ability between crude and purified flavonoids

由图11可以看出, 绿豆皮黄酮在纯化前后对DPPH自由基均具有一定的清除能力, 且均随着质量浓度的增大而清除能力增强, 虽然相同质量浓度下纯化前后的绿豆皮黄酮对DPPH自由基的清除能力都低于VC的清除能力, 但绿豆皮黄酮纯化物更接近VC的清除能力。绿豆皮黄酮纯化物和VC对DPPH自由基清除的半抑制质量浓度 IC_{50} 分别为57.64 $\mu\text{g/mL}$ 和28.69 $\mu\text{g/mL}$, 而黄酮粗提物对DPPH自由基清除的 IC_{50} 为108.74 $\mu\text{g/mL}$, 绿豆皮黄酮纯化物同VC一样具有很好的抗氧化能力。

2.5.2 对羟自由基清除能力的比较

从图12可以看出, 随着质量浓度的增加, 绿豆皮黄酮在纯化前后同VC一样对羟自由基清除能力逐渐增强,

但在相同质量浓度下对羟自由基的清除能力表现为VC最强, 绿豆皮黄酮纯化物次之, 绿豆皮黄酮粗提物最弱。VC、绿豆皮黄酮纯化物、绿豆皮黄酮粗提物对羟自由基清除的 IC_{50} 分别为70.04、81.19 $\mu\text{g/mL}$ 和109.83 $\mu\text{g/mL}$, 绿豆皮黄酮纯化物同VC一样具有较强的抗氧化能力。

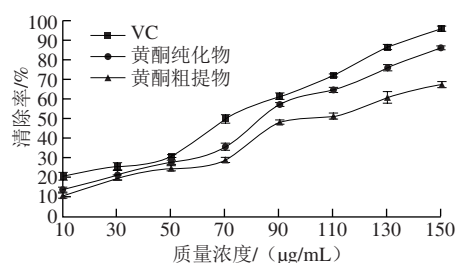


图12 对羟自由基清除能力的比较

Fig. 12 Comparison of hydroxyl free radical scavenging ability between crude and purified flavonoids

3 结论

采用AB-8大孔树脂纯化绿豆皮黄酮, 考察各因素对吸附解吸性能的影响, 得到分离纯化工艺条件为上样液质量浓度1.5 mg/mL、上样液pH 5.0、上样流速1.0 mL/min; 洗脱剂乙醇体积分数70%、洗脱剂用量225 mL、洗脱流速2.0 mL/min, 在此条件下分离纯化, 绿豆皮黄酮纯度由27.95%提高到62.38%。该方法操作简单, 成本低, 适合工业化生产。纯化后的绿豆皮黄酮通过紫外-可见分光光度计光谱扫描分别在250~280 nm和300~400 nm波长处出现2个黄酮类化合物特征峰带, 满足黄酮类化合物出峰特征, 证明黄酮类化合物的存在。利用FTIR光谱扫描, 在波数3 392.72、2 927.81、1 654.95、1 610.49、1 575.03、1 508.67、1 328.34、831.95 cm^{-1} 以及1 200~1 050 cm^{-1} 之间出现了黄酮类化合物特征官能团的吸收峰。SEM对纯化前后黄酮类物质进行微观分析, 得出片状和粉粒状颗粒在经过AB-8大孔树脂纯化后数量明显增多, 这可能是导致绿豆皮黄酮类化合物在纯化后纯度增高的原因。抗氧化实验表明, 纯化后的绿豆皮黄酮和VC一样对DPPH自由基和羟自由基都有很强的清除能力, 清除效果强于纯化前的绿豆皮黄酮粗提物, 纯化后的绿豆皮黄酮抗氧化能力大大增强, 为进一步开发和利用绿豆皮资源提供依据。

参考文献:

- [1] 王丽侠, 程须珍, 王素华. 绿豆种质资源、育种及遗传研究进展[J]. 中国农业科学, 2009, 42(5): 1519-1527. DOI:10.3864/j.issn.0578-1752.2009.05.003.
- [2] 刘笑然. 东北三省的红小豆、绿豆生产[J]. 中国粮食经济, 2013, 26(9): 38-41. DOI:10.3969/j.issn.1007-4821.2013.09.011.

- [3] 王旭. 绿豆中清热解毒成分的提取及稳定性的研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2011.
- [4] 李昀铮. 超声波辅助提取绿豆皮黄酮及其应用研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2015.
- [5] 曾志红, 王强, 林伟静, 等. 绿豆的品质特性及加工利用研究概况[J]. 作物杂志, 2011(4): 16-19. DOI:10.3969/j.issn.1001-7283.2011.04.004.
- [6] 庄艳, 陈剑. 绿豆的营养价值及综合利用[J]. 杂粮作物, 2009, 29(6): 418-419. DOI:10.3969/j.issn.2095-0896.2009.06.027.
- [7] PENG X F, ZHENG Z P, CHENG K W, et al. Inhibitory effect of mung bean extract and its constituents vitexin and isovitexin on the formation of advanced glycation endproducts[J]. Food Chemistry, 2008, 106(2): 475-481. DOI:10.1016/j.foodchem.2007.06.016.
- [8] ZHANG C Y, SHEN Y, XIAO P, et al. Nondestructive prediction of total phenolics, flavonoid contents, and antioxidant capacity of rice grain using near-infrared spectroscopy[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(10): 8268-8272.
- [9] LU H F, ZHENG H, LOU H Q, et al. Using neural networks to estimate the losses of ascorbic acid, total phenols, flavonoid, and antioxidant activity in asparagus during thermal treatments[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(10): 2995-3001.
- [10] 王宇翎, 张艳, 方明, 等. 白花蛇舌草总黄酮的免疫调节作用[J]. 中国药理学通报, 2005, 21(4): 444-447. DOI:10.3321/j.issn:1001-1978.2005.04.016.
- [11] BREINHOLT V, NOSSAINI A, SVENDSEN G W, et al. Estrogenic activity of flavonoids in mice. The importance of estrogen receptor distribution, metabolism and bioavailability[J]. Food and Chemical Toxicology, 2000, 33(7): 555-564. DOI:10.1016/S0278-6915(00)00046-6.
- [12] 吕萍, 刘景圣, 蔡丹, 等. 超声波法提取绿豆中的黄酮的最佳工艺研究[J]. 粮油加工, 2010, 12(8): 117-119.
- [13] LUO J Q, CAI W X, WU T, et al. Phytochemical distribution in hull and cotyledon of adzuki bean (*Vigna angularis* L.) and mung bean (*Vigna radiate* L.), and their contribution to antioxidant, anti-inflammatory and anti-diabetic activities[J]. Food Chemistry, 2016, 201: 350-360. DOI:10.1016/j.foodchem.2016.01.101.
- [14] 裴凌鹏, 惠伯棣, 金宗濂, 等. 黄酮类化合物的生理活性及其制备技术研究进展[J]. 食品科学, 2004, 25(2): 203-207. DOI:10.3321/j.issn:1002-6630.2004.02.048.
- [15] 耿秀芳, 孙晓丽, 王洪刚, 等. 银杏叶总黄酮降压作用的实验与临床研究[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(8): 606-608. DOI:10.3321/j.issn:1001-5302.2002.08.017.
- [16] 刘振国, 郑建萍. 黄酮类化合物的提取-分离-纯化研究进展[J]. 黑龙江科技信息, 2011(25): 20. DOI:10.3969/j.issn.1673-1328.2011.25.035.
- [17] 唐德智. 黄酮类化合物的提取、分离、纯化研究进展[J]. 海峡药学, 2009, 21(12): 101-104. DOI:10.3969/j.issn.1006-3765.2009.12.044.
- [18] 关海君, 田娟娟, 白志明. 超滤膜技术在大豆异黄酮生产中的应用[J]. 中国油脂, 2006, 31(3): 35-36. DOI:10.3321/j.issn.1003-7969.2006.03.012.
- [19] 李凤林, 李青旺, 高大威, 等. 天然黄酮类化合物分离纯化研究进展[J]. 江苏调味副食品, 2008, 25(5): 20-24. DOI:10.3969/j.issn.1006-8481.2008.05.006.
- [20] 陈峰, 陈剑锋. 膜分离-溶剂萃取法联用分离纯化栀子蓝色素[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(21): 33-37. DOI:10.3969/j.issn.1005-6521.2013.21.010.
- [21] 易克传, 岳鹏翔. 膜分离技术及其在中草药分离纯化中的应用研究[J]. 包装与食品机械, 2008, 26(2): 4-7. DOI:10.3969/j.issn.1005-1295.2008.02.002.
- [22] HERNANDEZ E, COUTURE R, ROUSEFF R, et al. Evaluation of ultrafiltration and adsorption to debitter grapefruit juice and grapefruit pulp wash[J]. Journal of Food Science, 1992, 57(3): 664-666. DOI:10.1111/j.1365-2621.1992.tb08066x.
- [23] 关海君, 田娟娟, 白志明. 超滤膜技术在大豆异黄酮生产中的应用[J]. 中国油脂, 2006, 31(3): 35-36. DOI:10.3321/j.issn.1003-7969.2006.03.012.
- [24] 华耀祖. 超滤技术与应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.
- [25] ZHANG Y, LI S F, WU X W, et al. Macroporous resin adsorption for purification of flavonoids in *Houttuynia cordata* Thunb[J]. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2007, 15(6): 872-876. DOI:10.1016/S1004-9541(08)60017-8.
- [26] 韩博, 陈文, 景文娟, 等. AB-8大孔吸附树脂对甘草总黄酮的吸附[J]. 南方医科大学学报, 2007, 27(3): 265-267. DOI:10.3321/j.issn.1673-4254.2007.03.005.
- [27] FU B Q, LIU J, LI H, et al. The application of macroporous resins in the separation of licorice flavonoids and glycyrrhizic acid[J]. Journal of Chromatography, 2005, 1089(1/2): 18-24. DOI:10.1016/j.chroma.2005.06.051.
- [28] 贾海伦. 芹菜黄酮提取及分离纯化工艺研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江大学, 2008.
- [29] 骆党委, 叶静, 黄雅燕, 等. AB-8大孔吸附树脂精制芦柑皮总黄酮及黄酮类化合物的分离[J]. 食品科学, 2014, 35(6): 30-35. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201406006.
- [30] 李侠, 邹基豪, 王大为. 响应面试验优化超声波-酶法提取绿豆皮黄酮类化合物工艺[J]. 食品科学, 2017, 38(8): 206-212. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201708032.