

锌离子络合法快速分离纯化荞麦壳黄酮及其抗 AGEs 活性

王 玥¹, 刘子琦¹, 聂萌滋¹, 姜 鑫¹, 李鹏程¹, 闫梦华², 朴春红^{1*}, 肖盛元^{3*}

(¹吉林农业大学食品科学与工程学院 长春 130118

²吉林农业大学中药材学院 长春 130118

³吉林农业大学教育部食药菌工程研究中心 长春 130118)

摘要 研究锌离子络合法快速分离纯化荞麦壳黄酮工艺,并评价纯化组分对晚期糖基化终末产物(AGEs)生成的抑制活性。根据络合转化率和络合强度,将荞麦壳黄酮提取物(BHF)经过二次锌离子络合,分别获得荞麦壳黄酮中间提取物(IBHF)和荞麦壳黄酮组分(HBHF)。采用 Box-Behnken 响应曲面分析法优化获得 IBHF 组分的最佳工艺参数:乙酸锌与样品质量比 2:1,乙醇体积分数 30%,氨水体积分数 0.05%,室温反应 10 min。在该条件下络合转化率为 97.44%。IBHF 组分经过二次锌离子络合,分离获得 HBHF 组分,其总黄酮含量为 57.08 g RE/100 g(三氯化铝-乙酸盐比色法),其纯度比分离纯化前提高了 6.64 倍。高效液相色谱分析(HPLC)表明,HBHF 组分含有异荛草素、牡荆素、异牡荆素、芦丁、山奈酚-3-O 芸香糖苷 5 种主要黄酮,其中芦丁占比 62.34%。HBHF 组分表现出良好的抗 AGEs 活性,在质量浓度为 200 μg/mL 时,Glu-BSA 体系中的 AGEs 抑制率为 63.16%,MGO-BSA 体系中的 AGEs 抑制率为 42.98%,抑制率均显著优于阳性对照氨基酸。

关键词 锌离子络合法; 二次锌离子络合; 荞麦壳黄酮; 晚期糖基化终末产物(AGEs)

文章编号 1009-7848(2023)10-0167-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.10.018

荞麦(*Fagopyrum esculentum*)含有抗糖尿病、降血脂、降血糖和抗氧化等多种生物活性,被普遍加工成食药用品^[1-5]。荞麦壳是荞麦生产中最多的副产物,占据荞麦质量的三分之一^[6],然而,其利用途径较少,大多作为废弃物被丢弃,没有得到充分的利用。研究发现,荞麦壳富含多种生物活性成分,如黄酮类化合物、荞麦糖醇、功能性蛋白、膳食纤维等^[7-9],是天然产物开发的重要资源。

黄酮类化合物被广泛认为是荞麦壳中的主要活性成分,能够显著减轻糖尿病小鼠的胰岛素抵抗,改善脂质代谢紊乱^[10],并抑制晚期糖基化终末产物(Advanced glycation end products, AGEs)形成,可通过调节 AGE-RAGE 信号通路保护糖尿病小鼠肾脏^[11]。生物活性物质的分离纯化在功能性食品和医药行业至关重要,直接影响产品的品质和价格。目前黄酮类化合物的分离纯化方法包括萃取、大孔树脂、膜分离、高效液相色谱等^[12-13],存在纯化周期长、消耗大、成本高等缺点。金属离子

络合法操作简单、快捷、成本低、周期短,在黄酮类化合物的分离纯化中具有良好的应用前景^[14]。

金属离子络合法分离纯化黄酮类化合物的原理是:在碱性条件下,黄酮类化合物上的羟基易质子化,配合强配位的氧原子以及合适的空间构型,与部分金属盐络合形成稳定的沉淀,从而与其它可溶性杂质分离,利用更强的金属螯合剂,如乙二胺四乙酸二钠盐(EDTA-2Na),将络合态黄酮类化合物转化为游离态黄酮类化合物,达到黄酮类化合物分离纯化的目的^[15]。含 5-羟基或邻羟基的黄酮类化合物可与铅、铁、铜、锌等多种金属阳离子形成络合物,然而,铅污染环境,铁、铜等氧化能力过强,会破坏黄酮类化合物的结构^[16]。锌离子是人体必需的微量元素之一,微量存在不会危害人体健康。残留的锌离子一般以络合态存在,研究发现,络合态的锌离子同样具有抗氧化、抗癌、抗糖尿病等生物活性^[17-18]。

亚硝酸钠-三氯化铝($\text{NaNO}_2\text{-AlCl}_3$)比色法和三氯化铝-乙酸盐($\text{AlCl}_3\text{-NaAC}$)比色法用于总黄酮测定的主要化学方法,反应原理如图 1 所示。前者是酚羟基位点,后者是 3-羟基或 5-羟基位点与铝离子发生显色反应^[19]。由于植物提取物组成复杂,总黄酮的测定结果易受非黄酮类化合物的

收稿日期: 2022-10-25

基金项目: 吉林省科技发展计划项目(20200403159SF)

第一作者: 王玥,女,硕士生

通信作者: 朴春红 E-mail: piaochunhong9111@163.com

肖盛元 E-mail: xiao03435@163.com

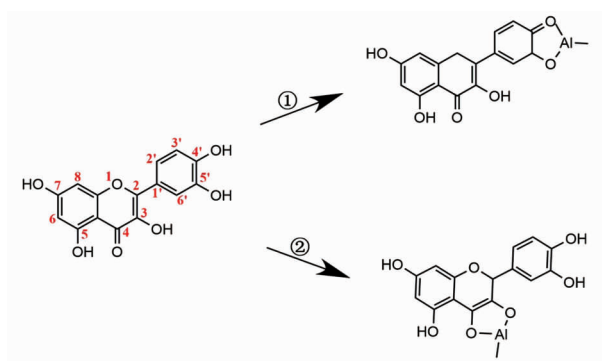
干扰,不同来源提取物的总黄酮测定方法亦有差别^[20-21]。研究表明,与 $\text{NaNO}_2\text{-AlCl}_3$ 法相比, $\text{AlCl}_3\text{-NaAC}$ 法更适合表征荞麦壳黄酮^[22]。课题组前期研究表明, $\text{NaNO}_2\text{-AlCl}_3$ 法测定荞麦壳总黄酮含量的结果与高效液相色谱法的结果差异较大^[23]。本研究选用 $\text{AlCl}_3\text{-NaAC}$ 法,采用锌离子络合法分离纯化荞麦壳黄酮,优化其工艺参数。旨在提供一种快速分离纯化荞麦壳黄酮的方法,为其高效利用以及食药用品的开发提供一定参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

荞麦壳购于内蒙古赤峰市。荞麦壳黄酮的提取参照赵梓瀛等^[23]的方法,其荞麦壳黄酮提取物(Buckwheat hull flavonoids, BHF)的总黄酮含量为8.60 g RE/100 g ($\text{AlCl}_3\text{-NaAC}$ 法)和96.61 g RE/100g ($\text{NaNO}_2\text{-AlCl}_3$ 法),RE表示芦丁当量。

Super 200 反相聚合物填料,南京亘闪生物科技有限公司;RP-C18 薄层硅胶色谱板,默克化工技术有限公司;甲醇(色谱纯),德国Meker公司;牛血清白蛋白(Bovine albumin, BSA)、丙酮醛(Methylglyoxal, MGO),美国Sigma公司;其余所



注:① $\text{NaNO}_2\text{-AlCl}_3$ 法;② $\text{AlCl}_3\text{-NaAC}$ 法。

图1 化学比色法测定黄酮的反应原理

Fig.1 Reaction principle of determination of flavonoids by chemical colorimetry

用试剂均为国产分析纯级。

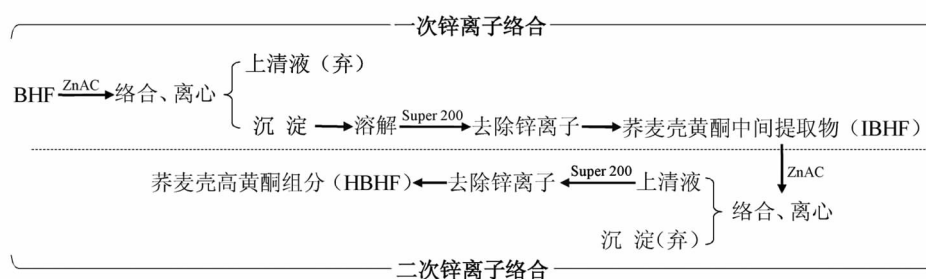
1.2 仪器与设备

Mini BIS Pro 荧光凝胶成像系统,以色列DNR公司;Agilent 1100 高效液相色谱仪,安捷伦科技有限公司;FLUOstar Omega 荧光酶标仪,德国BMG LABTECH公司。

1.3 方法

1.3.1 荞麦壳黄酮的分离纯化

1.3.1.1 分离纯化流程



1.3.1.2 操作要点

1) 一次锌离子络合 将 BHF 溶解于乙醇,与乙酸锌溶液充分混匀,加入适量氨水调节 pH,络合反应后,7 000 r/min 离心 10 min,以上清液中剩余黄酮量计算黄酮络合转化率。沉淀经 3% EDTA-2Na 溶液溶解(含 10%乙醇),Super 200 柱层析富集、70%乙醇洗脱后,真空浓缩,冷冻干燥,获得荞麦壳黄酮中间提取物(Intermediates of buckwheat hull flavonoids, IBHF)。

2) 二次锌离子络合 将 IBHF 溶解于乙醇,

与乙酸锌溶液按质量比 2:1,充分混匀,加入氨水调节 pH,络合反应后,7 000 r/min 离心 10 min,以硅胶薄层色谱检测上清液中的黄酮纯度。上清液经 Super 200 柱层析富集、70%乙醇洗脱后,真空浓缩,冷冻干燥,获得荞麦壳高黄酮组分(High purity buckwheat hull flavonoids, HBHF)。

黄酮络合转化率以锌离子络合前、后溶液中的总黄酮含量计算,公式如下:

$$\text{络合转化率}(\%) = \frac{C_0 \times V_0 - C_1 \times V_1}{C_0 \times V_0} \times 100 \quad (1)$$

式中, C_0 ——反应前溶液中的黄酮含量(mg/

mL); V_0 ——反应前溶液的体积(mL); C_1 ——反应后上清液中的黄酮含量(mg/mL); V_1 ——反应后上清液的体积(mL)。

1.3.2 IBHF 组分的分离纯化工艺参数优化

1.3.2.1 单因素实验 参照 Wang 等^[24]的方法,略

作修改。分别配制 4 mg/mL BHF 溶液与 10 mg/mL 乙酸锌溶液,络合反应一定时间,以络合转化率为指标,分别考察乙酸锌与样品质量比、氨水体积分数、乙醇体积分数、反应温度、反应时间对荞麦壳黄酮络合转化率的影响。试验因素水平见表 1。

表 1 单因素实验因素水平表

Table 1 Factor level of single factor test

水平	ZnAC:BHF 质量比/ $g \cdot g^{-1}$	氨水体积分数/%	乙醇体积分数/%	反应温度/ $^{\circ}C$	反应时间/min
1	4:1	0.03	10	25	5
2	3:1	0.04	20	40	10
3	2:1	0.05	30	60	15
4	1:1	0.06	40	80	20
5	1:2	0.07	50	95	25

1.3.2.2 Box-Behnken 响应面优化试验 在单因素实验基础上,选取乙酸锌与样品质量比、氨水体积分数、乙醇体积分数为自变量,黄酮络合转化率

为响应值,做 Box-Behnken 响应面优化试验,试验因素水平如表 2 所示。

表 2 Box-Behnken 试验因素水平表

Table 2 Factor level of Box-Behnken

水平	因素		
	A (ZnAC:BHF 质量比/ $g \cdot g^{-1}$)	B (氨水体积分数/%)	C (乙醇体积分数/%)
-1	1:1	0.03	20
0	2:1	0.04	30
1	3:1	0.05	40

1.3.3 荞麦壳黄酮检测方法

1.3.3.1 总黄酮含量测定 采用 $AlCl_3$ -NaAc 法测定样品中的总黄酮含量,方法参照 Sarker 等^[25]的方法并略作修改。将 500 μ L 样品、1 mL 三氯化铝溶液(1 mmol/L)、1.5 mL 醋酸-醋酸钠缓冲溶液(pH 5.5)置于试管中,混匀后室温静置 30 min,于 417 nm 波长处测定吸光度值。以标准对照品芦丁的质量浓度为横坐标,对应的吸光度值为纵坐标,进行回归方程分析,回归方程 $y = 2.882x + 0.0411$ ($R^2 = 0.9993$),荞麦壳总黄酮含量结果以 g RE/(100g)表示。

1.3.3.2 硅胶薄层色谱 硅胶薄层色谱法是常用于黄酮类化合物鉴定的技术手段之一,分离后的样本经过不同的方法显色,可直观的判断样本中是否存在黄酮类化合物。

将样品用 25%乙醇配成 1 mg/mL 的溶液,取

5 μ L 依次点至同一块 110 $^{\circ}C$ 活化 30 min 的硅胶板上,展开剂为 40%乙醇溶液,显色方式分别为 10%的硫酸-甲醇溶液和 254 nm 的紫外光,待样品在层析缸中展开完全后,风干,喷以显色剂烘干或直接置于紫外光下观察拍照。

1.3.3.3 紫外光谱 将样品配成 0.02 mg/mL 的溶液,以 25%乙醇为空白溶剂对照,用酶标仪进行全波长扫描,波长范围 250~500 nm,扫描间距 1 nm,扫描次数 3。以波长为横坐标,对应的吸光度值为纵坐标,绘制紫外光谱。

1.3.3.4 HPLC 色谱柱:XTerra MS C18(3.9 mm \times 150 mm,5 μ m);流动相 A:0.5%甲酸铵和 0.5%(体积分数)甲酸(pH 4.4~4.5),现用现配;流动相 B:纯甲醇;流速 0.5 mL/min,柱温 25 $^{\circ}C$,检测波长 280 nm,进样量 20 μ L。梯度洗脱程序:0~3 min,30% B;3~20 min,30%~85% B;20~23 min,85%~

95%B, 然后 2 min 内恢复到初始状态, 持续 5 min。

1.3.4 AGEs 生成抑制能力 参照赵梓瀛等^[23]的方法。制备 Glu-BSA 体系与 MGO-BSA 体系的 AGEs, 在激发波长 360 nm 和发射波长 460 nm 处检测荧光强度, 考察荞麦壳黄酮样品对不同体系 AGEs 的生成抑制能力。抑制率的计算公式:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{(F_2 - F_0) - (F_1 - F_0)}{F_2 - F_0} \times 100 \quad (2)$$

式中, F_0 ——空白组荧光值; F_1 ——试验组荧光值; F_2 ——对照组荧光值。

1.4 数据分析

试验结果用“ $\bar{x} \pm \text{SD}$ ”表示, 所有数据均做 3 个平行试验。用 Excel 软件处理试验数据, 用 GraphPad Prism 7.0 制图与方差分析, $P < 0.05$ 差异显著, 具有统计学意义。

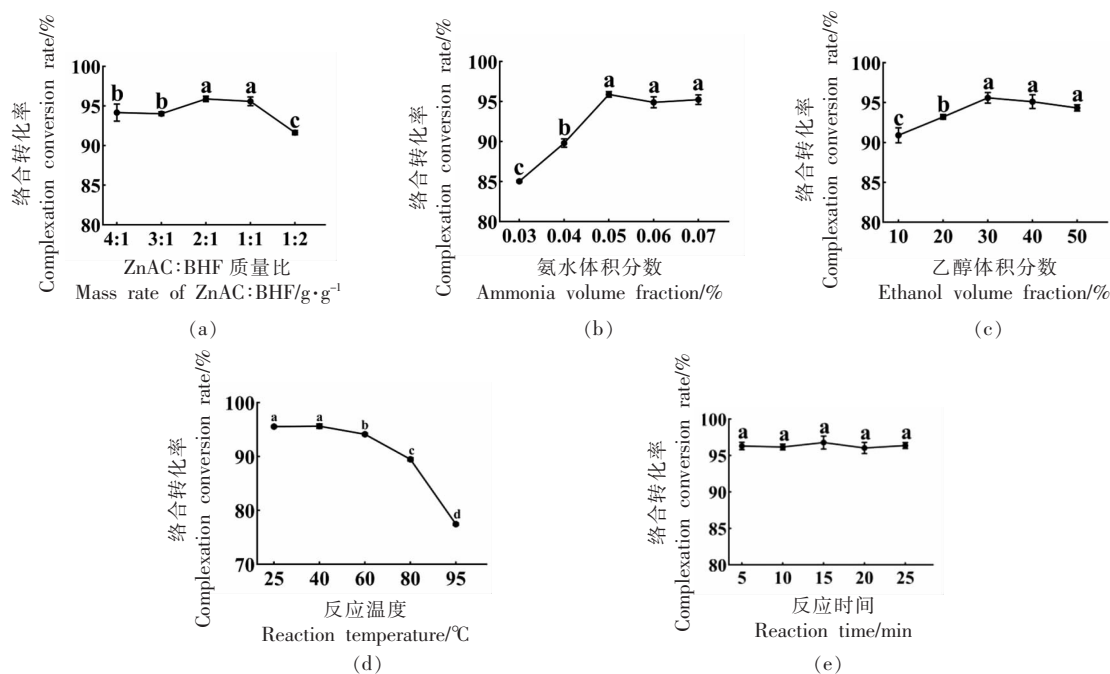
2 结果与分析

2.1 IBHF 组分的分离纯化工艺参数优化

以黄酮络合转化率为指标, 选取乙酸锌与样品质量比、氨水体积分数、乙醇体积分数、反应温

度和反应时间做单因素实验, 结果如图 2 所示。不同的乙酸锌与样品质量比、氨水体积分数和乙醇体积分数在测定范围内, 络合转化率均呈先增长后下降的趋势(图 2a~2c)。温度 40 °C 以下时, 络合转化率均可以维持在 95.6%, 而高于 40 °C 时络合转化率反而下降(图 2d)。络合反应 5 min 内基本反应完全(图 2e)。综合考虑, 选择室温下反应 10 min, 以乙酸锌与样品质量比(A)、氨水体积分数(B)和乙醇体积分数(C)为自变量, 络合转化率为响应值, 做 Box-Behnken 响应面优化试验。各因素交互作用响应面结果如图 3 所示。使用 Design-Expert 8.0.6 软件对试验数据进行回归分析, 二次多项式回归方程为 $Y = 0.97 + 0.13A + 0.48B - 0.31C - 0.058AB + 0.19AC + 0.55BC - 0.76A^2 - 0.57B^2 - 0.41C^2$, $R^2 = 0.9875$ 。从表 3 可看出, 模型的 F 值为 61.64, $P < 0.0001$, 达到极显著的水平。失拟项 $P = 0.4307 > 0.05$, 不显著, 表明方程拟合良好, 可用于荞麦壳黄酮络合过程参数的模型分析。

由上述模型可知, 荞麦壳黄酮中间提取物 IBHF 的最佳络合条件为乙酸锌与样品质量比 2:1, 乙醇体积分数 30%, 氨水体积分数 0.05%, 室温



注:不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

图2 不同质量比(a)、氨水体积分数(b)、乙醇体积分数(c)、反应温度(d)、反应时间(e)对荞麦壳黄酮络合转化率的影响

Fig.2 Effect of mass ratio (a), ammonia volume fraction (b), ethanol volume fraction (c), reaction temperature (d), reaction time (e) on complex conversion rate of buckwheat hull flavonoids

反应 10 min。此条件下黄酮络合转化率为 97.44%，验证试验得到黄酮络合平均转化率为 97.51%，表明试验结果与模型吻合良好,Box-Behnken 响应面优化的工艺参数可行。在该条件下黄酮类化合物基本与锌离子络合并产生沉淀。

林华婷等^[26]报道乙酸锌络合鼠曲草黄酮的络合转化率为 89.09%。雷永平等^[27]报道刺玫果黄酮的络合转化率为 96.94%。本研究黄酮络合转化率在 97%以上,高于目前的报道。

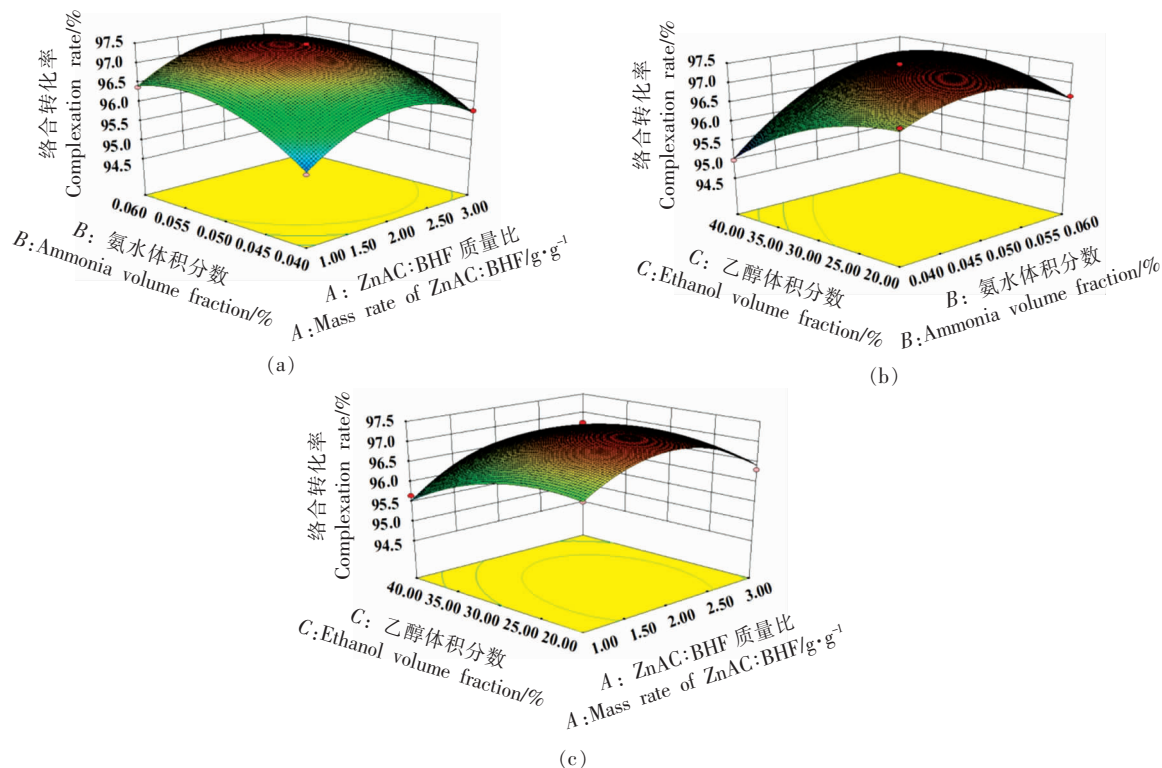


图 3 两因素交互作用对荞麦壳黄酮络合转化率的影响

Fig.3 Effect of interaction between two factors on complex conversion rate of buckwheat hull flavonoids

表 3 方差分析结果

Table 3 Analysis of variance results

方差的来源	总和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	9.05	9	1.01	61.64	<0.0001	**
A(质量比)	0.14	1	0.14	8.80	0.0209	*
B(氨水体积分数)	1.83	1	1.83	112.46	<0.001	**
C(乙醇体积分数)	0.75	1	0.75	46.23	0.0003	**
AB	0.014	1	0.014	0.84	0.3905	
AC	0.14	1	0.14	8.88	0.0205	*
BC	1.20	1	1.20	73.69	<0.001	**
A ²	2.42	1	2.42	148.17	<0.001	**
B ²	1.35	1	1.35	82.78	<0.001	**
C ²	0.71	1	0.71	43.31	0.0003	**
残差	0.11	7	0.016			
失拟向	0.053	3	0.018	1.15	0.4307	
纯误差	0.061	4	0.015			
总误差	9.16	16				

R²=0.9875

注:*,显著(P<0.05);**,极显著(P<0.01)。

2.2 IBHF 组分的二次锌离子络合

硅胶薄层色谱是鉴定黄酮类化合物较为简单的方法。在化学显色剂作用下,黄酮类化合物会出现黄色斑点。IBHF 组分的硅胶薄层色谱(图 4a)结果显示,IBHF 组分中除黄酮类化合物外,还存在一类具有金属络合活性的非黄酮类化合物,严重干扰了荞麦壳黄酮类化合物的纯化。通过控制乙酸锌与样品质量比对 IBHF 组分进行二次络合,从而使黄酮类化合物的分离。图 4b 结果显示荞麦壳非黄酮类化合物与锌离子的络合强度大于黄酮类化合物,在锌离子量不足的情况下,非黄酮类化合物首先出现于沉淀中,而黄酮类化合物大部分留在上清液中。随着乙酸锌与样品质量比的增大,越来越多的黄酮类化合物出现于沉淀中。乙酸锌与样品质量比 1:2 是二者分离的关键点,此条件下只有少量黄酮类化合物与锌离子生成沉淀,黄酮类化合物与非黄酮类化合物可基本分离。

图 5a 为 HBHF 组分的锌离子络合程序,可呈现锌离子络合法对荞麦壳黄酮的纯化效果。一次锌离子络合后,IBHF 组分颜色与 BHF 组分相近,为荞麦壳特有的棕褐色,而二次锌离子络合后,HBHF 组分颜色发生明显变化,呈黄酮类化合物

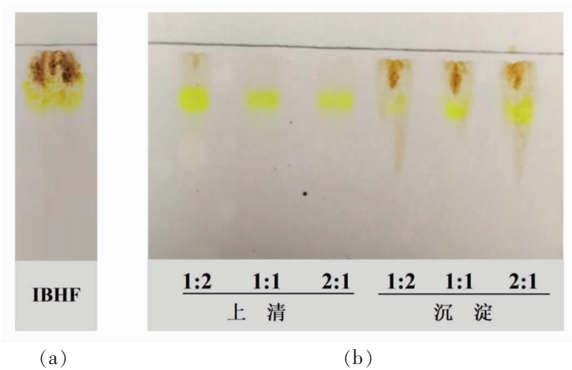


图 4 IBHF 组分(a)及不同乙酸锌与样品质量比条件下二次锌离子络合 IBHF 组分(b)的硅胶薄层色谱图
Fig.4 Silica gel TLC of IBHF (a) and IBHF separated through secondary zinc ion complexation at different zinc acetate to sample mass ratios (b)

特有的黄色。分离纯化过程中各组分的得率如图 5b 所示,IBHF 组分得率为 66.77%,去除了 33.34% 不具有金属络合活性的可溶性杂质,而 HBHF 组分得率为 18.23%,说明 IBHF 组分中黄酮类化合物占比较少,其主要成分为具有金属络合活性的非黄酮类化合物。以上结果表明,通过二次锌离子络合,IBHF 组分中黄酮类化合物与非黄酮类化合物达到成功分离。

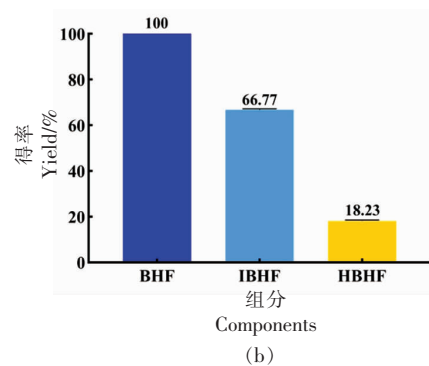
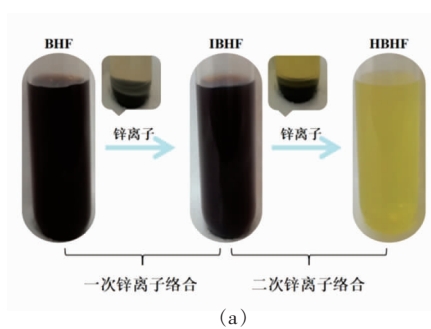


图 5 BHF 组分的锌离子络合程序(a)及得率(b)

Fig.5 Zinc ion complexation procedure (a) and yield (b) of BHF

2.3 HBHF 组分的黄酮鉴定分析

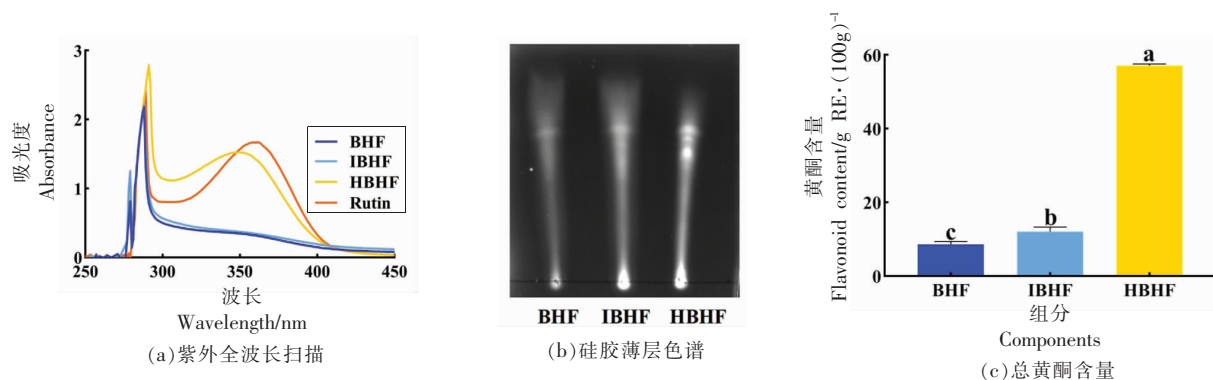
紫外光谱与硅胶薄层色谱是常用于黄酮类化合物鉴定的技术手段,不同结构的黄酮类化合物具有不同的紫外光谱,且在硅胶薄层色谱板上有不同的吸附位置。图 6a 为紫外光谱结果,HBHF 组分主要有 291 nm 和 349 nm 两个最大吸收波长处,与芦丁 289 nm 和 359 nm 处的两个特征吸收

峰相近,表明 HBHF 组分为黄酮类化合物。BHF 组分与 IBHF 组分的最大吸收波长仅出现在 287 nm 处,属于非黄酮类化合物。吸附在硅胶薄层板上的黄酮类化合物在特定紫外光下会出现荧光点。图 6b 显示 BHF 组分中仅有一个微弱荧光点,而 HBHF 组分中显现 3 个突出的荧光点,说明 BHF 组分中低丰度的黄酮类化合物在 HBHF 中得

到显著的富集。

总黄酮含量(图 6c)数值再次证明锌离子络合法纯化荞麦壳黄酮的适用性。BHF 组分的总黄酮含量为 8.60 g RE/100g, IBHF 组分为 12.09 g RE/100 g, HBHF 组分为 57.08 g RE/100 g。一次锌离子络合虽受到具有金属络合活性非黄酮类化合物的干扰,但 IBHF 组分的总黄酮含量仍提高了 1.41 倍;二次锌离子络合分离获得荞麦壳高黄酮组分 HBHF,总黄酮含量较 BHF 组分提高了 6.64 倍。Wang 等^[28]使用金属离子络合法纯化甘草黄酮,黄酮含量由 36.47% 增到 63.56%,提高了 1.74

倍;Zhang 等^[14]采用乙酸锌分离纯化银杏叶黄酮,黄酮含量由 24% 增到 55%,提高了 2.29 倍;Sun 等^[16]采用锌离子可快速有效地分离黄芩与干血斑(DBS)中的黄酮类化合物,成功去除背景物质。然而,金属离子络合法在纯化黄酮类化合物的应用中,未发现受到具有金属络合活性非黄酮类化合物干扰的报道。荞麦壳中除黄酮类化合物外,还含有单宁、膳食纤维、植酸、多糖等多种非黄酮类化合物^[29-32],因存在羟基、羧基等活性基团,故与金属离子发生络合反应。



注:图中不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

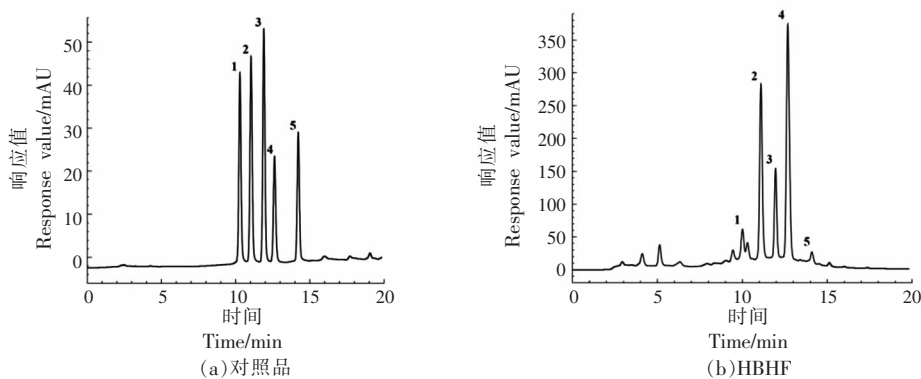
图 6 HBHF 的黄酮鉴定分析

Fig.6 Identification and analysis of flavonoids in HBHF

2.4 HBHF 组分的黄酮组成及其含量分析

荞麦壳高黄酮组分 HBHF 的 HPLC 分析结果见图 7 和表 4。HPLC 图谱结果(图 7)显示 HBHF 组分中黄酮类化合物分离效果良好,主要观察到 5 种黄酮化合物,分别为异荭草素、牡荆素、异牡

荆素、芦丁和山奈酚-3-O-芸香糖苷,这与文献[33]提到的甜荞麦壳中黄酮组成相似。黄酮含量如表 4 所示,芦丁是 HBHF 中主要的成分,占比 63.42%,其次是牡荆素、异牡荆素,异荭草素和山奈酚-3-O-芸香糖苷的含量较少。



注:1. 异荭草素; 2. 牡荆素; 3. 异牡荆素; 4. 芦丁; 5. 山奈酚-3-O-芸香糖苷。

图 7 对照品(a)与 HBHF 组分(b)的 HPLC 图谱

Fig.7 HPLC chromatogram of standard (a) and HBHF (b)

黄酮类化合物与锌离子的结合位点主要以羟基和羰基为主, 锌离子络合后黄酮的富集程度与其结构中活性基团的位置与数量有关^[34]。HBHF 组分中主要包括黄酮化合物与黄酮醇化合物两种, 牡荆素、异牡荆素、异荭草素为黄酮化合物, 芦丁和山奈酚-3-O-芸香糖苷为黄酮醇化合物, 黄酮

醇化合物的基本结构较黄酮化合物多一个 3-羟基取代位点, 且取代基多为糖苷类化合物, 提供了大量的羟基^[35]。芦丁作为典型的黄酮醇化合物, 较强的金属络合活性使其得到显著的富集, 而山奈酚-3-O-芸香糖苷含量低可能与其在荞麦壳中含量较低有关^[36]。

表 4 HPLC 法分析 HBHF 组分的黄酮组成及含量(g/100 g)
Table 4 Determination of flavonoids in HBHF by HPLC (g/100 g)

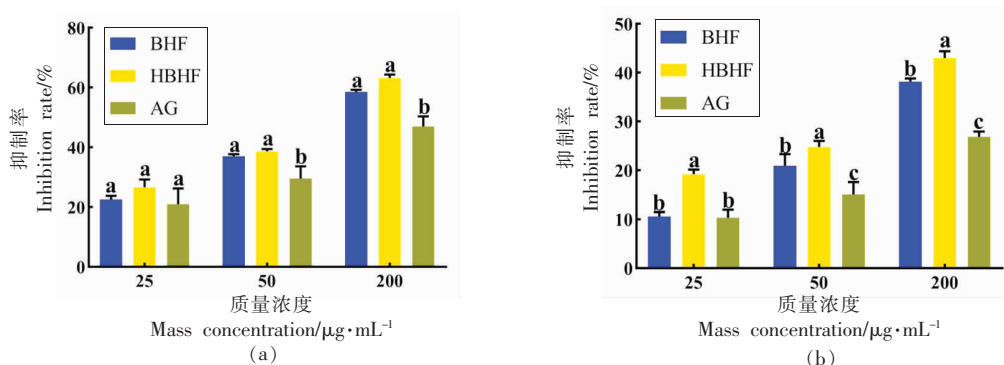
	异荭草素	牡荆素	异牡荆素	芦丁	山奈酚-3-O-芸香糖苷	总计
HBHF	1.30	8.44	5.63	28.81	1.07	45.43

2.5 HBHF 组分的抗 AGEs 活性

因 AGEs 在内源性蛋白质糖基化和美拉德反应期间不可逆转地形成并与糖尿病密切相关, 故抑制 AGEs 生成对糖尿病的预防有重要意义^[37]。Glu-BSA 与 MGO-BSA 两个体系的 AGEs 生成抑制能力如图 8 所示, 两个体系中, 所有组别的 AGEs 生成抑制率均呈剂量依赖性增长, 荞麦壳黄酮组分 HBHF 显示较强的 AGEs 生成抑制能力, 且显著优于阳性对照氨基胍 (Amino guanidine, AG)。当质量浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 在 Glu-BSA 体系中 HBHF 组分的抑制率为 63.16%, AG 为 46.94%; MGO-BSA 体系中, HBHF 组分的抑制率为 42.98%, AG 为 26.87%。天然植物的黄酮类化合物对 AGEs 活性具有普遍的抑制作用, 竹叶黄酮提取物能有效抑制体外 AGEs 的形成, 尤其是荧光 AGEs, 荭草素、异荭草素、牡荆素和异牡荆

素等黄酮单体化合物在 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 对 Glu-BSA 体系 AGEs 的抑制率均超过 60%^[38]。长叶多花植物黄酮也可显著抑制晚期糖基化终末产物的形成^[39]。

有趣的是, 总黄酮含量为 8.60 g RE/100 g 的 BHF 组分同样显示较强的 AGEs 生成抑制能力, 且显著优于阳性对照 AG, 当质量浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, Glu-BSA 体系的抑制率为 58.49%, 生成抑制能力略低于 HBHF 组分, 差异不显著; MGO-BSA 体系的抑制率为 38.16%, 生成抑制能力显著低于 HBHF 组分。以上结果表明, 荞麦壳黄酮类化合物具有较强的抗 AGEs 活性, 然而, 黄酮类化合物不是荞麦壳中唯一的活性物质, 荞麦壳非黄酮类化合物同样具有较强的 AGEs 生成抑制能力。今后对非黄酮类化合物的深入探究可为提高荞麦壳的附加值提供新的思路。



注: 图中不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图 8 HBHF 组分对 Glu-BSA 体系 (a)、MGO-BSA 体系 (b) AGEs 的生成抑制能力

Fig.8 Inhibition of HBHF on the formation of AGEs in Glu-BSA system (a) and MGO-BSA system (b)

3 结论

首次应用二次锌离子络合法纯化荞麦壳黄

酮, 确定 HBHF 组分的 AGEs 生成抑制能力。采用 Box-Behnken 响应曲面分析法获得荞麦壳黄酮中

间提取物 IBHF 的最佳工艺参数条件下的络合转化率为 97.44%。IBHF 组分经二次锌离子络合分离获得荞麦壳高黄酮组分 HBHF, 其纯度较分离纯化前提高了 6.64 倍, 主要包含异苾草素、牡荆素、异牡荆素、芦丁、山奈酚-3-O-芸香糖苷 5 种黄酮, 其中芦丁占比 62.34%。HBHF 组分对 Glu-BSA 和 MGO-BSA 两个体系中 AGEs 生成的抑制能力均显著优于阳性对照氨基胍。本研究提供了一种快速分离纯化荞麦壳黄酮的方法, 并对荞麦壳黄酮组成及 AGEs 生成抑制能力进行分析, 为荞麦壳活性成分与功能的开发提供了理论依据。

参 考 文 献

- [1] REN R, ZENG H Y, MEI Q, et al. Effects of *Monascus purpureus*-fermented tartary buckwheat extract on the blood lipid profile, glucose tolerance and antioxidant enzyme activities in KM mice [J]. Journal of Cereal Science, 2022, 105: 103465.
- [2] LEE L C, HOU Y C, HSIEH Y Y, et al. Dietary supplementation of rutin and rutin-rich buckwheat elevates endogenous glucagon-like peptide 1 levels to facilitate glycemic control in type 2 diabetic mice [J]. Journal of Functional Foods, 2021, 85: 104653.
- [3] ZIELINSKI H, SZAWARA-NOWAK D, WRONKOWSKA M. Bioaccessibility of anti-AGEs activity, antioxidant capacity and phenolics from water biscuits prepared from fermented buckwheat flours [J]. LWT, 2020, 123: 109051.
- [4] PANDE S, RANJAN R, RYAZANOVA M, et al. Buckwheat-enriched diet alleviates bisphenol A mediated oxidative stress via modulation of sirtuin 1 and antioxidant status in experimental rats [J]. Food Chemistry, 2022, 373: 131507.
- [5] YAN J, XUE Q Y, CHEN W Y, et al. Probiotic-fermented rice buckwheat alleviates high-fat diet-induced hyperlipidemia in mice by suppressing lipid accumulation and modulating gut microbiota [J]. Food Research International, 2022, 155: 111125.
- [6] 张超, 李冀新. 荞麦壳的研究进展 [J]. 粮油食品科技, 2006, 14(3): 8-9, 45.
ZHANG C, LI J X. Progress of buckwheat hull [J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2006, 14(3): 8-9, 45.
- [7] RAGUINDIN P F, ADAM-ITODO O, STOYANOV J, et al. A systematic review of phytochemicals in oat and buckwheat [J]. Food Chemistry, 2021, 338: 127982.
- [8] 李思萱, 宗丽娜, 张家瑜, 等. 甜荞麦中生物活性成分及其功效研究进展 [J]. 粮食加工, 2019, 44(6): 56-59.
LI S X, ZONG L N, ZHANG J Y, et al. Research progress on bioactive constituents and their functions in common buckwheat [J]. Grain Processing, 2019, 44(6): 56-59.
- [9] RADOS K, ČUKELJ-MUSTAČ N, DRAKULA S, et al. The effect of cryo-grinding and size separation on bioactive profile of buckwheat hulls [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2021, 57(4): 1911-1919.
- [10] LI P C, TANG Y F, LIU L M, et al. Therapeutic potential of buckwheat hull flavonoids in db/db mice, a model of type 2 diabetes [J]. Journal of Functional Foods, 2019, 52: 284-290.
- [11] LI T Z, YANG Y Y, WANG X J, et al. Flavonoids derived from buckwheat hull can break advanced glycation end-products and improve diabetic nephropathy [J]. Food Function, 2021, 12(16): 7161-7170.
- [12] 徐赫, 李荣华, 夏岩石, 等. 黄酮类化合物提取、分离纯化方法研究现状及展望 [J]. 应用化工, 2021, 50(6): 1677-1682.
XU H, LI R H, XIA Y S, et al. Research status and prospect of extraction and purification methods of flavonoids [J]. Applied Chemical Industry, 2021, 50(6): 1677-1682.
- [13] CUI J, DUAN X Q, KE L T, et al. Extraction, purification, structural character and biological properties of propolis flavonoids: A review [J]. Fitoterapia, 2022, 157: 105106.
- [14] ZHANG J, YUE L, HAYAT K, et al. Purification of flavonoid from *Ginkgo biloba* extract by zinc complexation method and its effect on antioxidant activity [J]. Separation and Purification Technology, 2010, 71(3): 273-278.
- [15] 林华婷. 鼠曲草类黄酮制备及其抗氧化抑菌活性研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2016.
LIN H T. Study on the preparation and antioxidative, antibacterial activity of gnaphalium affine D.

- Don flavonoids[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2016.
- [16] SUN C H, WANG H C, WANG Y P, et al. Rapid isolation and determination of flavones in biological samples using zinc complexation coupled with high-performance liquid chromatography [J]. *Molecules*, 2016, 21(8): 1067.
- [17] RODRIGUEZ-ARCE E, SALDIAS M. Antioxidant properties of flavonoid metal complexes and their potential inclusion in the development of novel strategies for the treatment against neurodegenerative diseases [J]. *Biomedicine Pharmacotherapy*, 2021, 43: 112236.
- [18] PELLEI M, DEL-BELLO F, PORCHIA M, et al. Zinc coordination complexes as anticancer agents[J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2021, 445: 214088.
- [19] SHRAIM A M, AHMED T A, RAHMAN M M, et al. Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A critical evaluation[J]. *LWT*, 2021, 150: 111932.
- [20] 赵振, 刘霞, 黄昭, 等. 苕麻籽总黄酮含量测定方法比较研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(18): 6195-6200.
- ZHAO Z, LIU X, HUANG Z, et al. Comparative study on determination method of total flavonoids content in ramie seeds[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2019, 10(18): 6195-6200.
- [21] 赵美, 曾亚, 周晓英. 阿尔泰金莲花中总黄酮含量测定的方法比较研究[J]. *新疆医科大学学报*, 2017, 40(10): 1342-1345.
- ZHAO M, ZENG Y, ZHOU X Y. Comparison of methods established for determination of flavones content in *Trollius altaicus*[J]. *Journal of Xinjiang Medical University*, 2017, 40 (10): 1342-1345.
- [22] 苏学军, 裘可, 宗春燕. 荞麦壳中总黄酮含量测定方法优选[J]. *化学工程师*, 2021, 35(12): 14-16, 9.
- SU X J, QIU K, ZONG C Y. Optimum method for determination of total flavonoids in buckwheat husk [J]. *Chemical Engineer*, 2021, 35 (12): 14-16, 9.
- [23] 赵梓瀛, 朴春红, 王玉华, 等. 荞麦壳提取物有效组分的分离及体外抗糖尿病活性[J]. *食品科学*, 2018, 39(3): 21-27.
- ZHAO Z Y, PIAO C H, WANG Y H, et al. Isolation and anti-diabetic activity *in vitro* of flavonoids from buckwheat hull [J]. *Food Science*, 2018, 39(3): 21-27.
- [24] WANG H L, CAO J, XU S Q, et al. Depletion of high-abundance flavonoids by metal complexation and identification of low-abundance flavonoids in *Scutellaria baicalensis* Georgi [J]. *Journal of Chromatography A*, 2013, 1315: 107-117.
- [25] SARKER U, OBA S. Response of nutrients, minerals, antioxidant leaf pigments, vitamins, polyphenol, flavonoid and antioxidant activity in selected vegetable amaranth under four soil water content[J]. *Food Chemistry*, 2018, 252: 72-83.
- [26] 林华婷, 吕峰, 黄国钞, 等. 金属络合法纯化鼠曲草类黄酮工艺[J]. *中国食品学报*, 2017, 17(4): 116-122.
- LIN H T, LV F, HUANG G C, et al. Purification of *gnaphlium affine* D. Don flavonoids by metal complex method [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2017, 17(4): 116-122.
- [27] 雷永平, 邸松, 钟方丽, 等. 刺玫果总黄酮 Zn²⁺络合物的制备及其体外抗氧化活性研究[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(19): 194-199.
- LEI Y P, DI S, ZHONG F L, et al. Preparation of Zn²⁺ complex of total flavonoids from fruit of *rosa davurica* pall and its antioxidant activity *in vitro* [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40 (19): 194-199.
- [28] WANG Z J, ZHA X H, ZHAO D M, et al. Ultrasonic microwave-assisted micellar extraction and purification of flavonoids from licorice by metal complex and antisolvent recrystallization[J]. *LWT*, 2021, 147: 111501.
- [29] ZHANG H, ZHANG L L, TANG L H, et al. Effects of metal ions on the precipitation of penta-O-galloyl-β-D-glucopyranose by protein [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69 (17): 5059-5066.
- [30] BAYE K, GUYOT J P, & MOUQUET-RIVIER C. The unresolved role of dietary fibers on mineral absorption [J]. *Critical Reviews Food Science and Nutrition*, 2017, 57(5): 949-957.
- [31] KUMAR V, SINHA A K, MAKKAR H P S, et al. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review [J]. *Food Chemistry*, 2010, 120(4): 945-959.
- [32] SCHEERDER J, BREUR R, SLAGHEK T, et al. Exopolysaccharides (EPS) as anti-corrosive additives

- for coatings[J]. *Progress in Organic Coatings*, 2012, 75(3): 224–230.
- [33] PARK B I, KIM J, LEE K, et al. Flavonoids in common and tartary buckwheat hull extracts and antioxidant activity of the extracts against lipids in mayonnaise[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2019, 56(5): 2712–2720.
- [34] SAMSONOWICZ M, REGULSKA E, KALINOWSKA M. Hydroxyflavone metal complexes—molecular structure, antioxidant activity and biological effects [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2017, 273: 245–256.
- [35] SAMSONOWICZ M, REGULSKA E. Spectroscopic study of molecular structure, antioxidant activity and biological effects of metal hydroxyflavonol complexes [J]. *Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2016, 173: 757–771.
- [36] LI J, YANG P, YANG Q H, et al. Analysis of flavonoid metabolites in buckwheat leaves using U-PLC–ESI–MS/MS[J]. *Molecules*, 2019, 24(7): 1310.
- [37] YABUUCHI J, UEDA S, YAMAGISHI S I, et al. Association of advanced glycation end products with sarcopenia and frailty in chronic kidney disease[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 17647.
- [38] LAN M Y, LI H M, TAO G, Lin, et al. Effects of four bamboo derived flavonoids on advanced glycation end products formation *in vitro*[J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 71: 103976.
- [39] RAI A K, SINGH S P, PANDEY A R, et al. Flavonoids from *Polyalthia longifolia* prevents advanced glycation end products formation and protein oxidation aligned with fructose-induced protein glycation[J]. *Natural Product Research*, 2021, 35(17): 2921–2925.

Rapid Separation and Purification of Buckwheat Hull Flavonoids by Zinc Ion Complexation and the Anti-AGEs Activity

Wang Yue¹, Liu Ziqi¹, Nie Mengzi¹, Jiang Xin¹, Li Pengcheng¹,
Yan Menghua², Piao Chunhong^{1*}, Xiao Shengyuan^{3*}

¹College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118

²College of Chinese Materia Medica, Jilin Agricultural University, Changchun 130118

³Engineering Research Center of Edible and Medicinal Fungi, Ministry of Education,
Jilin Agricultural University, Changchun 130118)

Abstract The process of rapid separation and purification of buckwheat hull flavonoids by zinc ion complexation was studied and the inhibitory activity of purified components on Advanced glycation end products (AGEs) were evaluated. The fraction of intermediates of buckwheat hull flavonoids (IBHF) was obtained by complexing buckwheat hull flavonoids (BHF) through a single zinc ion complexation based on complexation conversion rate. And the other fraction of high purity buckwheat hull flavonoids (HBHF) was obtained through a second zinc ion complexation based on complexation strength. The optimum process parameters of IBHF components obtained by Box–Behnken response surface analysis were zinc acetate to sample mass ratio of 2:1, ethanol volume fraction of 30%, ammonia volume fraction of 0.05%, and reaction time of 10 min at room temperature. Under this condition, the complexation conversion was 97.44%. IBHF component were complexed through a second zinc ion complexation to obtain HBHF component. The content of total flavonoids was 57.08 g RE/100 g (aluminum trichloride acetate colorimetry), and its purity was 6.64 times higher than that before separation and purification. High performance liquid chromatography (HPLC) analysis showed that HBHF component contained isoorientin, vitexin, isovitexin, rutin and kamanophenol-3-O-rutinoside, among which rutin accounted for 62.34%. The AGEs inhibition rate of HBHF was 63.16% in Glu–BSA system and 42.98% in MGO–BSA system at a mass concentration of 200 µg/mL, showing good anti-AGEs activity. Its activity was significantly higher than that of positive control amino guanidine.

Keywords zinc ion complexation; secondary zinc ion complexation; buckwheat hull flavonoids; advanced glycation end products (AGEs)