

沙棘叶黄酮的提取纯化及组成分析

郭建峰^{1,2}, 郟浩然¹, 王芳^{1,2*}, 王海宾^{1,2}, 刘子超¹, 胡培毅¹, 郭仕伟¹

(1. 中北大学化学工程与技术学院, 山西太原 030051)(2. 山西省沙棘药茶联合创新研发基地, 山西太原 030051)

摘要: 沙棘叶中富含多种黄酮, 但以往在加工过程中多作为废弃物抛弃, 造成资源极大浪费。为了资源的充分利用, 该研究以中国沙棘叶为原料, 采用响应面法设计试验, 优化了微波辅助乙醇溶剂提取、碱溶酸沉法和离子交换树脂纯化黄酮的工艺, 并通过 UPLC-Q-MS 对沙棘叶黄酮成分进行检测。研究表明, 工艺条件为料液比 1:30 (g/mL)、碱溶温度 92 °C、pH 9.50、酸沉 pH 2.70 时, 总黄酮得率最高为 70.98%, 黄酮含量为 42.11%; 沙棘叶黄酮共鉴定出 15 种黄酮类物质, 其中芦丁、槲皮素-3-鼠李糖苷、槲皮素-3-O-呋喃葡萄糖苷和槲皮素占总黄酮的 89.67%。该研究工艺可作为一种从沙棘叶中提取与精制高纯度黄酮产品的方法, 属于沙棘叶资源的精细加工利用领域, 可为今后沙棘叶的开发与利用提供一定的参考价值。

关键词: 沙棘叶; 黄酮; 响应面法; 超高效液相色谱-高分辨质谱 (UPLC-Q-MS)

文章编号: 1673-9078(2022)05-189-198

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.5.1170

Extraction, Purification and Composition Analysis of Flavonoids from Sea Buckthorn Leaves

GUO Jianfeng^{1,2}, QIE Haoran¹, WANG Fang^{1,2*}, WANG Haibin^{1,2}, LIU Zichao¹, HU Peiyi¹, GUO Shiwei¹

(1. College of Chemical Engineering and Technology, North University of China, Taiyuan 030051, China)

(2. Sea-buckthorn Tea Joint Innovation Research and Development Base of Shanxi, Taiyuan 030051, China)

Abstract: Sea buckthorn leaves are rich in flavonoids; nevertheless, in the past, the leaves were mostly discarded as waste after processing, resulting in a waste of resources. Herein, Chinese sea buckthorn leaves were used for flavonoid extraction. Microwave-assisted ethanol solvent extraction, isoelectric precipitation, and ion-exchange resin purification of flavonoids were optimized by response surface methodology, and the composition of the extracted flavonoids were identified by ultra-performance liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. The highest total flavonoid yield (70.98%) and associated flavonoid content (42.11%) were obtained when the processing conditions are as follow: solid-to-liquid ratio of 1:30 (g/mL), alkali dissolution at 92 °C and pH 9.50, and acid precipitation at pH 2.70. A total of 15 flavonoids were identified in the sea buckthorn leaf. In particular, rutin, quercetin-3-rhamnoside, quercetin-3-O-glucopyranoside, and quercetin accounted for 89.67% of the total flavonoid content. The herein proposed method can be used to extract and refine high-purity flavonoid products from sea buckthorn leaves, thereby contributing to the field of fine processing and utilization of sea buckthorn leaf resources in the future.

Key words: sea buckthorn leaves; flavonoid; response surface methodology; ultra-performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry

引文格式:

郭建峰, 郟浩然, 王芳, 等. 沙棘叶黄酮的提取纯化及组成分析[J]. 现代食品科技, 2022, 38(5): 189-198

GUO Jianfeng, QIE Haoran, WANG Fang, et al. Extraction, purification and composition analysis of flavonoids from sea buckthorn leaves [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(5): 189-198

中国沙棘 (*Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis*)

收稿日期: 2021-10-19

基金项目: 山西省重点研发计划项目 (201903D221068)

作者简介: 郭建峰 (1975-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 天然产物的精制、分离、发酵过程及其调控、功能高分子材料等, E-mail: jianfengguo@nuc.edu.cn

通讯作者: 王芳 (1976-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 天然产物精制及功效评价, E-mail: wangfang136@126.com

Rousi), 是胡颓子科沙棘属的沙棘亚种, 属于落叶灌木或小乔木, 我国沙棘资源丰富、分布广泛, 主要分布于山西、陕西、甘肃、青海等地^[1]。沙棘作为一种药食同源植物, 富含丰富的糖类、蛋白质、膳食纤维等营养成分, 及茶多酚、黄酮、Vc、原花青素、5-羟色胺等生物活性物质^[2,3]。而沙棘叶中黄酮含量高于沙棘的其他部位, 具有极高的利用价值^[4]。研究表明, 沙棘叶中芦丁、槲皮素、异鼠李素、山奈酚、儿茶素

等黄酮类物质具有抗血栓^[5]、降血脂与血糖^[6-8]、降低胆固醇、增强免疫力^[9]、消炎抑菌^[10]等功效^[11]。沙棘叶作为沙棘产品开发的一部分,合理利用沙棘资源,提高其附加价值,具有广阔的发展前景。

目前,黄酮的提取技术有:有机溶剂提取^[12]、微波辅助^[13]、超声波辅助^[14]、超临界萃取法、酶法^[15]等。微波辅助技术与传统方法相比,具备工艺简单、提取速度快、溶剂用量少、得率较高等优势,越来越多地用于植物提取^[16,17]。黄酮的纯化方法包括碱溶酸沉法^[18]、大孔树脂、离子交换树脂等。近年来,关于沙棘叶黄酮提取工艺已有不少相关报道^[19],但少有对黄酮提取物纯度及成分的检测。根据各类植物本身黄酮含量的不同及提取方法的差异,总黄酮得率在0.9%~45%,总黄酮含量在4%~24%范围内^[20-27]。本研究采用微波辅助乙醇提取及碱溶酸沉法,同时比较离子交换树脂和大孔树脂 AB-8 两种纯化方法对沙棘叶黄酮含量的影响,并通过超高效液相色谱-高分辨质谱(UPLC-Q-MS)对沙棘叶提取物进行成分分析,建立了一种方便、可靠地提取和纯化沙棘叶黄酮的方法,进一步提高黄酮纯度,通过考察方法的经济性,为工业化生产高纯度沙棘叶黄酮提供一定的参考价值。

1 材料与方 法

1.1 材料与设备

1.1.1 材料与试剂

中国沙棘叶,采自山西省宋家沟的小果沙棘林,选择新鲜、无病虫害的新鲜沙棘叶,自然晾干后粉碎制成沙棘叶粉。

硝酸铝,亚硝酸钠,无水乙醇,氢氧化钠,盐酸,以上试剂采购于西隆科学股份有限公司(AR, 99%);标准品:芦丁、没食子酸(HPLC≥99%),上海易恩化学技术有限公司;实验用水为蒸馏水。

1.1.2 仪器设备

ReadMax1900 型光吸收全波长酶标仪,上海闪谱生物科技有限公司;PHS-3C pH 计,上海仪电科学仪器股份有限公司;RE-52AA 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;HH-4 数显恒温水浴锅,常州朗越仪器制造有限公司;TG-18W 台式离心机,山东博科科学有限公司。数据采集仪器系统主要包括超高效液相色谱(Vanquish, UPLC, Thermo, USA)和高分辨质谱(Q Exactive, Thermo, USA)。

1.2 试验方法

1.2.1 微波提取及碱溶酸沉单因素试验

称取 80 目沙棘叶粉,分别按 1:10、1:20、1:30、1:40、1:50 的料液比加入 70% EtOH 用 500 W 微波 5 min 辅助提取 3 次,过滤,合并滤液后减压浓缩,得到浓缩液。

浓缩液用 1 mol/L NaOH 调节 pH 至 7.00~11.00 并于 75 °C~95 °C 水浴 20 min,反应结束后立即冷却,并用 1 mol/L HCl 调节 pH 至 2.00~6.00,4 °C 静置 24 h 后,4000 r/min 离心 15 min,沉淀冷冻干燥后得到沙棘叶黄酮提取物。

1.2.2 响应面优化提纯工艺

结合单因素试验,选择 A(料液比)、B(碱溶温度)、C(碱溶 pH)、D(酸沉 pH)进行 4 因素 3 水平的响应面法优化,以总黄酮得率、提取物中黄酮含量为响应值,根据 Box-Behnken 原理,运用 Design-Expert.V 12 软件进行数据分析。

表 1 Box-Behnken 中心组合试验设计

Table 1 Design of combined test of Box-Behnken

水平	因素			
	A 料液比/(g/mL)	B 碱溶温度/°C	C 碱溶 pH	D 酸沉 pH
-1	1:20	85	9	2
0	1:30	90	10	3
1	1:40	95	11	4

1.2.3 大孔树脂与离子交换树脂精制方法比较

在纯化中,比较大孔树脂 AB-8 和离子交换树脂两种方法。参考文献对大孔树脂 AB-8(2.5 cm×60 cm)方法稍作修改^[28,29],提取液以 1 BV/h 上样,吸附完全后,用 3 倍体积蒸馏水洗去多糖和蛋白质,再以 1.5 BV/h 利用 70%乙醇洗脱,洗脱液冻干得沙棘叶黄酮提取物。参考文献离子交换树脂(3.0 cm×30 cm)方法进行改进^[30],碱溶酸沉后沙棘叶黄酮提取物先调节 pH 为 6~7,再以 1 mL/min 进行上样,吸附完全得到除盐液,除盐液冻干得沙棘叶黄酮提取物。

1.2.4 成分测定

1.2.4.1 总黄酮的测定

参考《T/ISAS 001-2019 沙棘黄酮质量标准》进行改进^[31]。配置 0.3 mg/mL 芦丁标准溶液,在 96 孔板中分别稀释成梯度芦丁标准溶液,加入 40 μL 的 10% NaNO₂ 和 20% Al(NO₃)₃·9H₂O 的预混液,震荡均匀放置 6 min,再加入 100 μL 4 mol/L 的 NaOH,摇匀,室温放置 15 min,于 510 nm 处测定吸光度,绘制标准曲线方程为 $y=0.0293x+0.0319$, $R^2=0.9909$ 。取 1 mL 稀释液,按上述步骤操作,得出总黄酮得率(ρ)、提取物中黄酮含量(ω)。

$$\rho / \% = \frac{d \times C_1 \times V_1}{C_0 \times V_0} \times 100\% \quad (1)$$

$$\omega / \% = \frac{d \times C_2 \times V_2}{m} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

ρ —总黄酮得率, %;

C_0 —沙棘叶提取液中总黄酮的浓度, mg/mL;

V_0 —提取液的体积, mL;

C_1 —本工艺的提取液中黄酮的浓度, mg/mL;

V_1 —本工艺中提取液的体积, mL;

d —稀释倍数 (通常为 1 mL 稀释成 100 mL, 则其稀释倍数为 100)。

ω —提取物中黄酮含量, %;

C_2 —干物质中黄酮的浓度, mg/mL;

V_2 —溶解干物质所用溶剂的体积, mL;

m —沙棘叶黄酮产品的质量, g。

1.2.4.2 多酚含量的测定

参考《GB/T 8313-2018 茶叶中茶多酚和儿茶素类含量的检测方法》进行改进^[32]。配置 0.25 mg/mL 没食子酸标准溶液, 在 96 孔板中分别稀释成不同浓度的没食子酸标准溶液, 加入 40 μ L 30% 的福林酚, 在 3~8 min 内加入 50 μ L 的 15% Na_2CO_3 , 震荡摇匀, 超声处理 8 min, 于 765 nm 测定吸光度, 绘制标准曲线方程为 $y=0.3642x+0.0326$, $R^2=0.9913$ 。取 1 mL 稀释液, 按上述步骤操作。按照公式计算提取物中多酚含量 c :

$$c / \% = \frac{d \times C \times V}{m} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

c —多酚含量, %;

C —干物质中多酚的浓度, mg/mL;

V —溶解干物质所用溶剂的体积, mL;

m —沙棘叶黄酮产品的质量, g;

d —稀释倍数 (通常为 1 mL 稀释成 100 mL, 则其稀释倍数为 100)。

1.2.4.3 UPLC-Q-MS 分析黄酮成分

参考文献^[33,34], 对 UPLC-Q-MS 分析沙棘叶黄酮成分的程序略作修改, 具体参数如下:

UPLC 参数条件: 色谱柱 Waters HSS T3 (50 \times 2.1 mm, 1.8 μ m); 流动相 A 为超纯水 (含 0.1% 甲酸), 流动相 B 为乙腈 (含 0.1% 甲酸); 流速 0.3 mL/min; 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 2 μ L; 洗脱梯度: 0~2.0 min 90% A, 2.0~9.0 min 90%~40% A, 9.0~12.0 min 40%~90% A。

MS 参数条件: 电喷雾离子源 (ESI), 单离子检测 (SIM) 模式, 负离子扫描。鞘气 40 arb; 辅助气 10 arb; 离子喷雾电压-2800 V; 温度 350 $^{\circ}\text{C}$; 离子传输管温度 320 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.5 数据分析

每组实验重复 3 次, 采用 Origin 2019 处理数据并作图, 并分析显著性差异, $p < 0.05$ 为差异显著; $p < 0.01$ 为差异极显著。

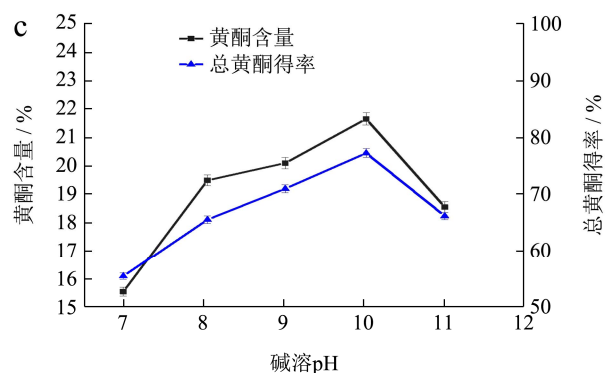
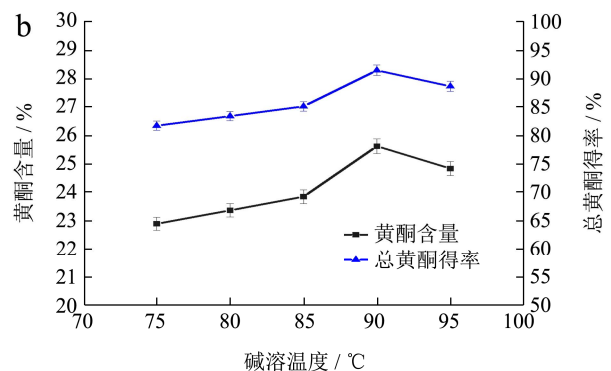
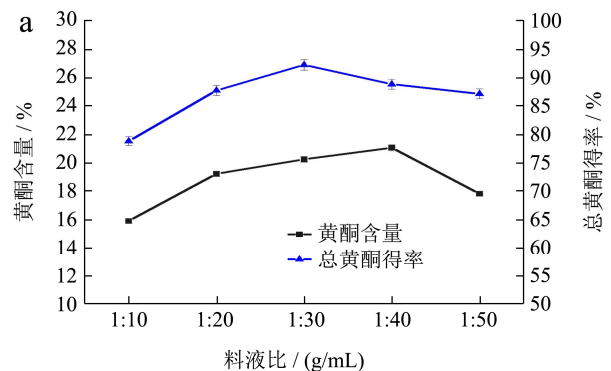
2 结果与讨论

2.1 不同因素对沙棘叶黄酮的影响

从图 1 可知, 料液比、碱溶温度、碱溶 pH、酸沉 pH 对沙棘叶总黄酮得率、提取物中黄酮含量的变化。

2.1.1 料液比

由图 1a 可看出, 沙棘叶黄酮含量与总黄酮得率随着料液比的增大逐渐增大, 当料液比为 1:30 时, 两者达到最高值, 随之不再增加。这可能是由于乙醇溶剂的增大, 造成沙棘叶中其他的活性成分或杂质溶出; 而料液比过少, 则沙棘叶粉末未完全润湿, 造成黄酮不能完全溶出, 这些都将导致黄酮含量的降低^[35]。



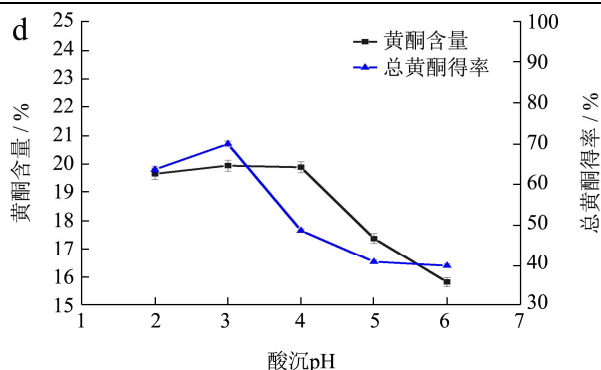


图 1 不同因素对沙棘叶黄酮提取效果的影响

Fig.1 The effect of different factors on the extraction effect of seabuckthorn leaves flavonoids

注: (a)料液比对提取效果的影响; (b)碱溶温度对提取效果的影响; (c)碱溶 pH 对提取效果的影响; (d)酸沉 pH 对提取效果的影响。

2.1.2 碱溶温度

由图 1b 可看出, 当温度小于 90 °C 时, 随着温度的提高, 沙棘叶黄酮含量与总黄酮得率呈现相同的趋势, 当温度达到 90 °C 时, 两者均达到最高值。这可能是由于温度的升高, 分子热运动加快, 破坏了细胞壁, 增强了乙醇溶出黄酮的能力; 而温度过高, 则破坏黄酮结构, 导致沙棘叶中生物活性物质的变化^[36,37]。

2.1.3 碱溶 pH

pH 值是碱溶过程中一个重要因素。由图 1c 可知, 在碱溶过程中, pH 10.0 时效果最好, 在此之前, 黄酮含量和总黄酮得率也随之增大, 这是可能因为木犀草素、山奈酚、二氢杨梅素等含有酚羟基、显弱酸性的

黄酮类物质, 与 NaOH 生成易溶于水的盐, 促进细胞内的黄酮溶解于乙醇中。但 pH 10.0 之后, 黄酮含量和得率随着 pH 增大而降低, 这可能是由于 pH 过高, 导致黄酮 C₆-C₃-C₆ 的母核被破坏, 黄酮难溶解于乙醇。

2.1.4 酸沉 pH

由图 1d 可知, 当酸沉 pH<3.0 时, 黄酮含量和总黄酮得率会随着酸沉 pH 增大而增大, 这是因为黄酮母核中吡喃环上的氧原子呈碱性, 溶液酸性过强则易生成伴盐, 导致黄酮不能全部析出^[27]。当 pH>3.0 时, 总黄酮得率随着酸沉 pH 增大而降低; 这是因为部分呈弱酸性的黄酮类物质, 难以在强酸性溶液中形成沉淀。

2.2 响应面优化提纯工艺

2.2.1 响应面试验

响应面优化工艺方案及结果如表 2 所示。

2.2.2 回归方程建立与方差分析

采用 Design-Expert12 软件对试验数据进行分析, 以沙棘叶总黄酮得率 (Y₁)、黄酮含量 (Y₂) 为响应值, 得到各因子的二次回归拟合方程为:

$$Y_1=65.09-2.70A-2.97B-10.03C+2.90D+16.60AB-3.87AC-7.61AD+23.17BC-16.66BD-0.26CD+5.10A^2-21.86B-6.92C^2-7.96D^2$$

$$Y_2=24.34+3.03A+1.87B-0.52C+2.56D-1.68AB-7.29AC+4.62AD+2.39BC-2.02BD+4.25CD+3.34A^2-4.60B^2-1.95C^2+0.355D^2$$

表 2 试验设计与结果

Table 2 Experimental design and results

序号	A	B	C	D	总黄酮得率/%	黄酮含量/%	序号	A	B	C	D	总黄酮得率/%	黄酮含量/%
1	0	0	-1	-1	64.72	28.11	16	0	0	-1	1	65.44	21.14
2	0	1	-1	0	21.99	14.66	17	0	-1	0	-1	14.53	12.14
3	0	1	0	-1	32.89	23.13	18	-1	0	0	1	77.68	21.68
4	0	0	1	-1	24.01	12.66	19	0	0	0	0	56.41	30.90
5	-1	0	-1	0	74.47	17.14	20	0	0	1	1	23.68	22.67
6	-1	-1	0	0	50.51	17.79	21	0	-1	0	1	69.75	22.95
7	0	0	0	0	67.79	23.15	22	1	1	0	0	67.85	23.23
8	0	0	0	0	73.04	23.32	23	0	1	0	1	21.48	25.84
9	0	0	0	0	56.32	21.43	24	1	0	0	1	54.76	38.80
10	1	0	0	-1	74.71	22.26	25	0	1	1	0	57.73	23.00
11	1	0	1	0	43.12	22.99	26	1	0	-1	0	59.18	37.29
12	-1	0	0	-1	67.18	23.62	27	-1	1	0	0	20.10	21.88
13	0	0	0	0	71.91	22.92	28	0	-1	1	0	17.01	14.66
14	-1	0	1	0	73.89	32.00	29	1	-1	0	0	31.87	25.87
15	0	-1	-1	0	73.95	17.89							

表3 方差分析表

Table 3 Analysis of variance table

方差来源	总黄酮得率/%		黄酮含量/%	
	F 值	P 值	F 值	P 值
模型	3.60	0.0113	4.90	0.0027
A	0.4344	0.5205	8.07	0.0131
B	0.5258	0.4803	3.08	0.1012
C	6.01	0.0279	0.2388	0.6326
D	0.5016	0.4904	5.94	0.0288
AB	5.49	0.0344	0.8307	0.3775
AC	0.2986	0.5934	15.60	0.0015
AD	1.16	0.3006	6.26	0.0253
BC	10.70	0.0056	1.68	0.2159
BD	5.53	0.0338	1.20	0.2912
CD	0.0014	0.9710	5.29	0.0374
A ²	0.8400	0.3749	5.30	0.0371
B ²	15.45	0.0015	10.07	0.0068
C ²	1.55	0.2339	1.82	0.1991
D ²	2.05	0.1741	0.0601	0.8099
失拟项	3.77	0.1062	0.9637	0.5653
R ²	0.7825		0.8256	

注: $p>0.05$ 为不显著; $p<0.05$ 为差异显著; $p<0.01$ 为差异极显著。

由表3可知,总黄酮得率(Y_1) $p<0.01$ 表示该模型显著,在这种情况下,C、AB、BC、BD、 B^2 是重要的模型项;其 $R^2=0.7825$ 说明有78.25%的变差能够由该模型解释;这些数据均表示该模型能解释响应值的变化,即该模型与实际试验拟合较好。由表3可知,各因素对总黄酮得率的影响:碱溶 pH>碱溶温度>碱溶 pH>料液比。

黄酮含量(Y_2) $p<0.01$ 表示该模型显著,在这种情况下,A、D、AC、AD、CD、 A^2 、 B^2 是重要的模型项;其 $R^2=0.8256$ 说明有82.56%的变差能够由该模型解释;这些数据均表示该模型能解释响应值的变化,即该模型与实际试验拟合较好。由表3可知,得到各因素对提取物中黄酮含量的影响:料液比>酸沉 pH>碱溶温度>碱溶 pH。

2.2.3 各因素对总黄酮得率响应面交互分析

采用 Design-Expert 12 软件对料液比、碱溶温度、碱溶 pH、酸沉 pH 之间交互作用的关系进行分析,结果如图2所示。

从图2a可看出,料液比与碱溶温度的3D图走势较陡峭、等高线密集且呈现椭圆形,说明两者的交互作用较强。同理,图2d和2e中,碱溶 pH、酸沉 pH 与碱溶温度之间的交互作用较强。而图2b和2c中碱

溶 pH、酸沉 pH 与料液比的走势平缓,等高线稀疏,说明两两自变量之间交互作用不明显。同理,图2f中碱溶 pH 与酸沉 pH 之间的交互作用不明显。

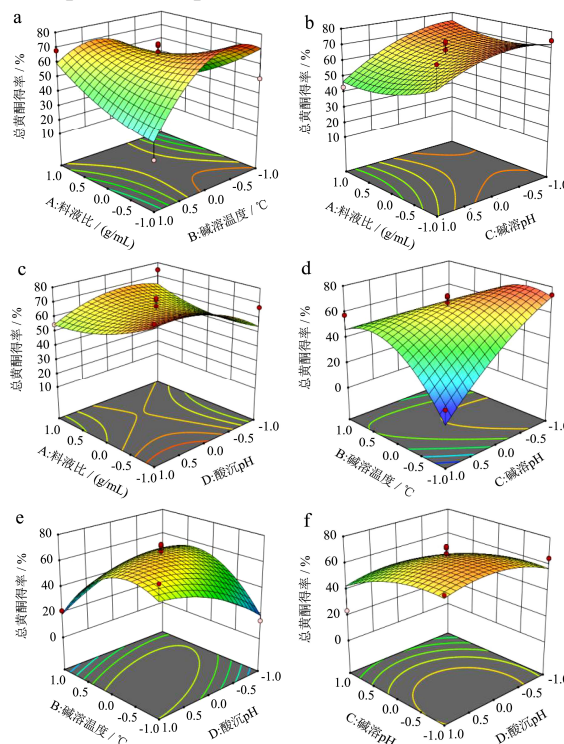


图2 各因素对总黄酮得率的交互作用

Fig.2 The interaction of various factors on the yield of total flavonoids

2.2.4 最佳工艺条件的预测和验证

经过 Design-Expert 12 对数据进行处理,沙棘叶黄酮提纯的最佳工艺为:料液比 1:29.73 (g/mL)、碱溶温度 92.38 °C、碱溶 pH 9.53、酸沉 pH 2.74。在此条件下模型预测沙棘叶总黄酮得率为 69.04%、黄酮含量为 25.64%。

考虑实际情况,对沙棘叶黄酮最佳的工艺进行修正:料液比 1:30(g/mL)、碱溶温度 92 °C、碱溶 pH 9.50、酸沉 pH 2.70。按照此条件进行了3次验证试验,实际总黄酮得率为 70.98%,RSD 为 1.19%,与模型预测值接近,表明试验结果与模型拟合良好,说明响应面法优化沙棘叶黄酮工艺条件可行且可靠。

2.3 大孔树脂与离子交换树脂精制方法比较

由图3可知,离子交换树脂纯化后沙棘叶黄酮与大孔树脂 AB-8 相比,各方面数据均显著提高,其中总黄酮得率、黄酮含量、多酚含量较大孔树脂 AB-8 分别增加了 1.43 倍、1.74 倍、1.60 倍。这可能是在碱溶酸沉中,与糖苷键结合紧密的部分黄酮被释放出来,使溶液中游离的黄酮含量增多,通过离子交换树脂后,将其他杂质包括 Na^+ 、 Cl^- 等离子洗脱除去,得到纯度

更高的沙棘叶黄酮。因此，本研究选择离子交换树脂对沙棘叶黄酮提取物进行纯化。

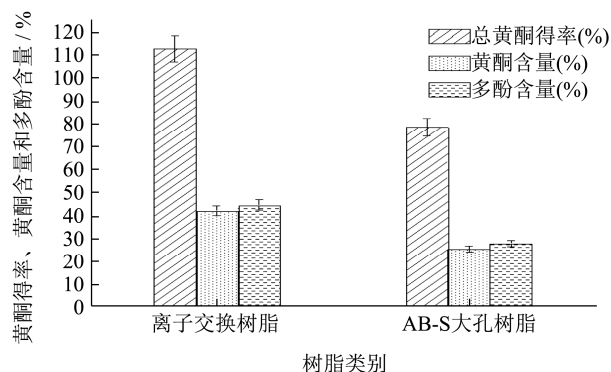


图3 大孔树脂与离子交换树脂纯化方法比较

Fig.3 Comparison of purification methods between macroporous resin and ion exchange resin

从经济角度考虑，在纯化过程中，大孔树脂 AB-8 需要大量的蒸馏水进行洗脱和除杂，造成更多的废水，使得工艺复杂，增加废水处理成本。而离子交换树脂则是将溶液中 Na⁺、Cl⁻通过离子交换与树脂结合，使样品中的盐度降低，达到除盐和节约成本的目的。

2.4 UPLC-Q-MS 成分分析

采用 UPLC-Q-MS 对沙棘叶黄酮提取物进行定量分析，16 种类黄酮混标与样品的总离子流图 (TIC) 如图 4 所示。对比混标，本研究共提取出 15 种类黄酮

物质，除柚皮苷查尔酮未检出外，其他物质均检出包括芦丁、槲皮素-3-鼠李糖苷、槲皮素-3-O-呋喃葡萄糖苷、槲皮素、儿茶素、二氢杨梅素等。由表 4 可知，芦丁占 40.89%、槲皮苷（槲皮素-3-鼠李糖苷）占 39.97%、槲皮素-3-O-呋喃葡萄糖苷占 7.67%、槲皮素占 1.03%，两类成分共占总黄酮的 89.67%。

研究表明，沙棘叶黄酮是槲皮素、异鼠李素、山奈酚及杨梅素等黄酮苷元与鼠李糖、葡萄糖及半乳糖等糖基结合形成^[38]，即槲皮素-3,7-二-O-葡萄糖苷、槲皮素-7-O-葡萄糖苷、槲皮素-3-O-葡萄糖-7-O-鼠李糖苷、槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖苷、异鼠李素-3-O-槐糖-7-O-鼠李糖苷等^[39-44]。而本研究检出芦丁、槲皮素-3-鼠李糖苷、槲皮素-3-O-呋喃葡萄糖苷、槲皮素等物质，可能由于本工艺使其中糖苷键或糖糖键断裂，形成了更简单的黄酮类物质。

与市面上银杏叶中黄酮提取物对比，本研究的沙棘叶黄酮中未含有银杏叶黄酮的槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖基(1→2)-α-L-鼠李糖苷、山奈酚-3-O-芸香糖苷、芹菜素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷、荜花素等复杂黄酮苷元，较银杏叶黄酮更适合进行黄酮物质的研究与开发^[38,45-48]。

因此，本研究认为碱溶酸沉法和离子交换树脂两者结合的方法可以较好地提取出芦丁和槲皮素类物质，为沙棘叶黄酮的开发利用提供参考价值。

表 4 沙棘叶提取物中类黄酮化合物信息

Table 4 Information of flavonoid compounds in sea buckthorn leaf extract

峰号	保留时间/min	名称	分子式	[M-H] ⁻ (m/z)	成分所占比例/%
1	5.17	Catechin	C ₁₅ H ₁₆ O ₇	289.07176	3.13
2	5.78	L-Epicatechin	C ₁₅ H ₁₆ O ₇	289.07176	0.61
3	5.97	Dihydromyricetin	C ₁₅ H ₁₂ O ₈	319.04594	1.61
4	6.36	Rutin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609.1461	40.89
5	6.44	Vitexin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431.0984	0.10
6	6.55	Quercetin-3-β-D-glucoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463.0882	7.67
7	6.83	(+)-Taxifolin	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	303.05103	0.48
8	6.91	Quercitri	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.09328	39.97
9	7.42	(+)-Dihydrokaempferol	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	287.05611	0.08
10	7.95	Luteolin	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.04046	1.86
11	7.97	Quercetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301.03538	1.03
12	8.22	Naringenin	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	-	-
13	8.3	Naringenin	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	271.0612	0.05
14	8.3	Apigenin	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269.04555	0.24
15	8.35	Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.04046	1.21
16	8.4	Isorhamnetin	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	315.05103	1.06

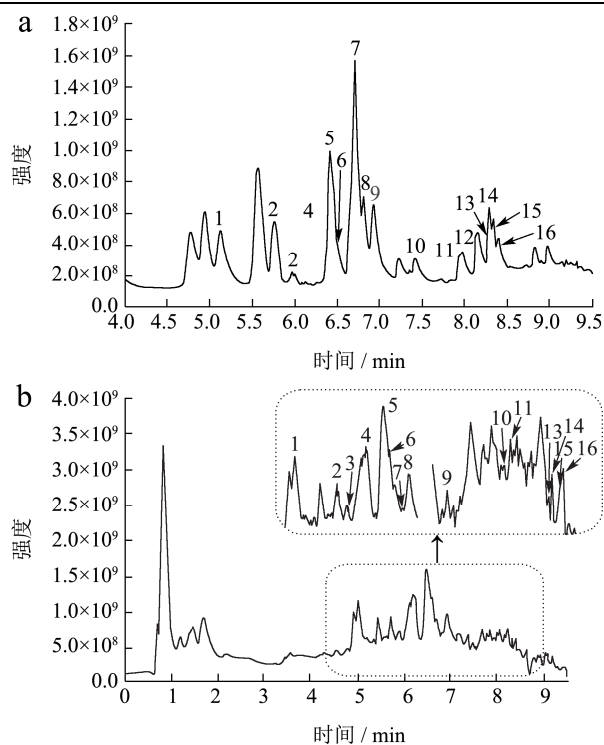


图4 UPLC-Q-MS在负离子模式(a)类黄酮物质的混标图, (b)沙棘叶黄酮提取物的总离子流图(TIC)

Fig.4 UPLC-MS in negative ion mode (a) flavonoids mixed standard, (b) sea buckthorn leaf flavonoid extract trace particle flow diagram (TIC)

注: 图中: (1)儿茶素, (2)表儿茶素, (3)二氢杨梅素, (4)芦丁, (5)牡荆素, (6)槲皮素-3-O-吡喃葡萄糖苷, (7)二氢槲皮素, (8)槲皮苷, (9)二氢山奈酚, (10)木犀草素, (11)槲皮素, (12)柚皮苷查耳酮, (13)柚皮素, (14)芹菜素, (15)山奈酚, (16)异鼠李素。

3 结论

本研究采用微波辅助提取沙棘叶黄酮, 结合碱溶酸沉和离子交换两个纯化步骤, 通过单因素和响应面试验考察了料液比、碱溶温度、碱溶pH、酸沉pH等因素对沙棘叶中总黄酮得率、黄酮含量的影响。确定了最佳工艺为: 料液比 1:30 (g/mL)、碱溶温度 92 °C、pH 9.50、酸沉 pH 2.70, 在此条件下, 沙棘叶总黄酮得率为 70.98%, 黄酮含量为 42.11%。综合对比, 本研究中所采用的方法不仅很大程度上提高了黄酮的含量, 还涉及以往相关研究中并未提及的多酚含量及黄酮物质的种类。同时, 该方法具有操作简单、提取速度快、耗能低、提取率高等优点, 对实现工业化生产沙棘叶黄酮具有一定的参考价值。

参考文献

[1] 胡建忠.我国自然分布的沙棘属植物资源[J].植物学研究,

2021,10(4):453-467

HU Jianzhong. Natural plant resources of genus *Hippophae* in China [J]. Botanical Research, 2021, 10(4): 453-467

[2] 张程慧, 祁玉霞, 程康蓉, 等. 沙棘的综合价值研究进展[J]. 食品工业科技, 2017, 38(22): 331-335

ZHANG Chenghui, QI Yuxia, CHENG Kangrong, et al. Research progress on comprehensive value of sea-buckthorn [J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(22): 331-335

[3] 王芳, 陈海银, 王海宾, 等. 山西 4 个地区沙棘叶有机物组成及茶叶适制性分析[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2021, 41(3): 17-24

WANG Fang, CHEN Haiyin, WANG Haibin, et al. Organic composition analysis and suitability for tea manufacture of sea-buckthorn leaves in four regions of Shanxi [J]. Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science Edition), 2021, 41(3): 17-24

[4] 邢金香. 沙棘不同部位总黄酮含量的比较研究[J]. 山西林业科技, 2018, 47(3): 4-5

XING Jinxiang. Comparative study on total flavonoids content in different parts of *Hippophae rhamnoides* Linn [J]. Shanxi Forestry Science and Technology, 2018, 47(3): 4-5

[5] 李路平, 岳海涛, 李天舒, 等. 沙棘提取物对急性血瘀模型大鼠血液流变学及血栓形成的影响[J]. 中草药, 2010, 41(2): 272-274

LI Luping, YUE Haitao, LI Tianshu, et al. Effects of seabuckthorn extract on hemorheology and thrombosis in acute blood stasis model rats [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2010, 41(2): 272-274

[6] Xin Y, Qian W, Zeng Run P, et al. Flavonoid-enriched extract from *Hippophae rhamnoides* seed reduces high fat diet induced obesity, hypertriglyceridemia, and hepatic triglyceride accumulation in C57BL/6 mice [J]. Pharmaceutical Biology, 2017, 55(1): 1207-1214

[7] Jiesi W, Wen Z, Dan Z, et al. Hypolipidaemic and hypoglycaemic effects of total flavonoids from seed residues of *Hippophae rhamnoides* L. in mice fed a high-fat diet [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2011, 91(8): 1446-1451

[8] Xiufeng P, Jingjing Z, Wen Z, et al. Antihypertensive effect of total flavones extracted from seed residues of *Hippophae rhamnoides* L. in sucrose-fed rats [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2008, 117(2): 325-331

[9] Mishra K P, Chanda S, Karan D, et al. Effect of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) flavone on immune system: an

- in-vitro* approach [J]. *Phytotherapy Research*, 2008, 22(11): 1490-1495
- [10] Upadhyay N K, Kumar M S, Gupta A. Antioxidant, cytoprotective and antibacterial effects of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2010, 48(12): 3443-3448
- [11] 张东, 郭国栋. 沙棘黄酮的化学成分及药理作用研究进展[J]. *中国药房*, 2019, 30(9): 1292-1296
ZHANG Dong, WU Guodong. Research progress on the chemical constituents and pharmacological effects of seabuckthorn flavonoids [J]. *China Pharmacy*, 2019, 30(9): 1292-1296
- [12] 万新焕, 陈新梅, 马山, 等. 黄酮类化合物提取新方法的应用[J]. *中草药*, 2019, 50(15): 3691-3699
WAN Xinhuan, CHEN Xinmei, MA Shan, et al. Applications of new methods in extraction of flavonoids from Chinese materiamedica [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2019, 50(15): 3691-3699
- [13] Qiuzhe L, Xiaoqing L, Baodong Z, et al. The optimization of ultrasonic-microwave assisted synergistic extraction of Lotus plumule extract rich in flavonoids and its hypoglycemic activity [J]. *Food Production, Processing and Nutrition*, 2021, 3(1): 1-11
- [14] 刘英翠, 张春媛, 梁爱军, 等. 超声波提取沙棘叶总黄酮的工艺优化试验研究[J]. *山西林业科技*, 2020, 49(4): 1-4
LIU Yingcui, ZHANG Chunyuan, LIANG Aijun, et al. Study on optimum ultrasonic extraction of total flavonoids from *Hippophae rhamnoides* L. leaves [J]. *Shanxi Forestry Science and Technology*, 2020, 49(4): 1-4
- [15] Shin K S, Lee J H. Optimization of enzymatic hydrolysis of immature citrus (*Citrus unshiu* Marcov.) for flavonoid content and antioxidant activity using a response surface methodology [J]. *Food Science and Biotechnology*, 2021, 30(5): 663-673
- [16] 王赛君, 伍振峰, 杨明, 等. 中药提取新技术及其在国内的转化应用研究[J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(8): 1360-1367
WANG Saijun, WU Zhenfeng, YANG Ming, et al. Research status and translational application of new extraction techniques of traditional Chinese medicine [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2014, 39(8): 1360-1367
- [17] Winny R, Valerie O. Microwave assisted extraction of flavonoids: a comprehensive overview [J]. *Reference Module in Food Science*, 2019, 30(8): 1-38
- [18] Shireen A, Ferdusee A, Md. Motiur R, et al. Computational and experimental studies to optimize the extraction of flavonoids from mango powder using response surface methodology [J]. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2021, 13(5): 1-12
- [19] 李柰, 王昌涛, 孙宝国. 沙棘叶中黄酮提取及大孔树脂分离纯化槲皮素[J]. *食品科学技术学报*, 2014, 32(4): 56-63, 74
LI Nai, WANG Changtao, SUN Baoguo. Water extraction and macroporous resins for purification of flavonoids from sea-buckthorn leaves [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2014, 32(4): 56-63, 74
- [20] 倪力军, 颜玮韬, 张立国. 银杏叶黄酮含量对银杏叶提取物大孔树脂纯化工艺条件的影响研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2017, 29(12): 2097-2103, 2091
NI Lijun, YAN Weitao, ZHANG Ligu. Effects of flavonoid content in ginkgo biloba leaves on macroporous resin purification process of *Ginkgo biloba* extract [J]. *Natural Product Research and Development*, 2017, 29(12): 2097-2103, 2091
- [21] 闫旭宇, 李玲. 银杏叶总黄酮超声辅助提取条件优化及其清除羟自由基能力[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(9): 200-204, 224
YAN Xuyu, LI Ling. Optimization of ultrasonic assisted extraction for total flavonoids from *Ginkgo biloba* leaves and its scavenging capacity on hydroxyl free radicals [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(9): 200-204, 224
- [22] Qingming C, Jianye Y, Zhicheng S, et al. Simultaneous optimization of ultrasound-assisted extraction for total flavonoid content and antioxidant activity of the tender stem of *Triarrhena lutarioriparia* using response surface methodology [J]. *Food Science and Biotechnology*, 2021, 30(1): 37-45
- [23] 贾晓丽, 刘改梅, 赵三虎. 咪唑类离子液体提取沙棘叶总黄酮的研究[J]. *中国食品添加剂*, 2020, 31(8): 1-8
JIA Xiaoli, LIU Gaimei, ZHAO Sanhu. Study on the extraction of total flavonoids from seabuckthorn leaves using imidazonium ionic liquids [J]. *China Food Additives*, 2020, 31(8): 1-8
- [24] 姚金昊, 刘芝涵, 李春露, 等. 基于 COSMO-RS 方法筛选低共熔溶剂及银杏叶类黄酮提取工艺优化[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(17): 181-186
YAO Jinhao, LIU Zhihan, LI Chunlu, et al. COSMO-RS-based screening of natural deep eutectic solvents and optimization of flavonoids extraction from *Ginkgo biloba* leaves [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(17): 181-186
- [25] 冯靖, 彭效明, 李翠清, 等. 响应面法优化离子液体提取银杏叶中总黄酮的工艺研究[J]. *现代化工*, 2019, 39(12): 115-120

- FENG Jing, PENG Xiaoming, LI Cuiqing, et al. Optimization of extraction process of total flavonoids from *Ginkgo biloba* leaves with ionic liquid by response surface methodology [J]. Modern Chemical Industry, 2019, 39(12): 115-120
- [26] 刘宝亮,曹桂萍.响应面分析法优化离子液体双水相提取香樟叶中总黄酮的工艺条件[J].现代食品科技,2018,34(4): 179-187
- LIU Baoliang, CAO Guiping. Response surface methodology for optimization of extraction process of total flavonoids from camphor leaves by an ionic liquid/aqueous two-phase system [J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(4): 179-187
- [27] 谷政伟,李丹,樊苏萍,等.微波辅助碱液提取花生壳黄酮工艺[J].中国粮油学报,2020,35(12):125-129
- GU Zhengwei, LI Dan, FAN Suping, et al. Microwave-assisted extraction of flavonoids from *Arachis hypogaea* L. hulls by lye [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2020, 35(12): 125-129
- [28] 李辰,袁健,邸多隆,等.5种大孔吸附树脂对沙棘叶黄酮苷元的静态吸附/解吸附性能[J].精细化工,2007,24(7):657-661
- LI Chen, YUAN Jian, DI Duolong, et al. Performance of static adsorption and desorption of five macroporous resins for flavonoid aglycones in sea buckthorn leaves [J]. Fine Chemicals, 2007, 24(7): 657-661
- [29] Qi C, Juzhao L, Litao W, et al. Sustainable deep eutectic solvents preparation and their efficiency in extraction and enrichment of main bioactive flavonoids from sea buckthorn leaves [J]. Journal of Cleaner Production, 2018, 184(20): 826-835
- [30] 井丽丽,吴志莲,董艳琳,等.离子交换树脂对山楂汁总酸与总黄酮的静态吸附动力学和热力学的影响[J].食品工业科技,2017,38(11):111-115
- JING Lili, WU Zhilian, DONG Yanlin, et al. Effects of static adsorption kinetics and thermodynamics of total acid and flavonoids in hawthorn fruit juice on D315 ion-exchange resin [J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(11): 111-115
- [31] T/ISAS 001-2019,沙棘黄酮质量标准[S]
- T/ISAS 001-2019, Seabuckthorn Flavonoids [S]
- [32] GB/T 8313-2018,茶叶中茶多酚和儿茶素类含量的检测方法[S]
- GB/T 8313-2018, Determination of Total Polyphenols and Catechins Content in Tea [S]
- [33] Jie Z, You W, Piaopiao L, et al. LC-MS-based metabolomics reveals the chemical changes of polyphenols during high-temperature roasting of large-leaf yellow tea [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(19): 5405-5412
- [34] Gaétan G, Baptiste G, Anne-Laure G, et al. Validation of the mass-extraction-window for quantitative methods using liquid chromatography high resolution mass spectrometry [J]. Analytical Chemistry, 2016, 88(6): 3264-3271
- [35] 罗磊,张冰洁,朱文学,等.响应对试验优化超声辅助提取金银花叶黄酮工艺及其抗氧化活性[J].食品科学,2016,37(6): 13-19
- LUO Lei, ZHANG Bingjie, ZHU Wenxue, et al. Ultrasonic-assisted extraction and antioxidation of flavonoids from *Lonicera japonica* Thunb. leaves: process optimization by response surface methodology and antioxidant activity evaluation [J]. Food Science, 2016, 37(6): 13-19
- [36] 闫蕊,赵玥.黄花油点草总黄酮超声提取工艺的响应面优化及抗氧化性分析[J].食品工业科技,2018,39(10):190-196, 203
- YAN Rui, ZHAO Yue. Response surface optimization of extraction technology by response surface methodology and inoxidizability of total flavonoids from *Tricyrtis maculata* Machride [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(10): 190-196, 203
- [37] 林款,徐丛焜,梁征,等.肉桂黄酮的提取纯化及其体外抗氧化活性[J].食品科技,2019,44(7):267-272
- LIN Kuan, XU Congdiao, LIANG Zheng, et al. Extraction, purification and antioxidant activities of flavonoids from cinnamomi cortex [J]. Food Science and Technology, 2019, 44(7): 267-272
- [38] Chu C, Xuemin X, Yang C, et al. Identification, quantification and antioxidant activity of acylated flavonol glycosides from sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* ssp. *sinensis*) [J]. Food Chemistry, 2013, 141(3): 1573-1579
- [39] 惠人杰,何旭,刘静怡,等.RP-HPLC-DAD法快速测定沙棘叶中6种黄酮成分[J].中国药科大学学报,2017,48(6):696-700
- HUI Renjie, HE Xu, LIU Jingyi, et al. Rapid determination of six flavonoids from seabuckthorn leaves by RP-HPLC-DAD [J]. Journal of China Pharmaceutical University, 2017, 48(6): 696-700
- [40] 郑文惠,白海英,王丽瑶,等.UPLC-QTOF-MS法分析沙棘果实、叶和枝的成分[J].中成药,2020,42(11):2940-2947
- ZHENG Wenhui, BAI Haiying, WANG Liyao, et al. Analysis

- of constituents in the fruit, leaf and twig of *Hippophae rhamnoides* by UHPL-QTOF-MS [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2020, 42(11): 2940-2947
- [41] 蔡爽,阮成江,杜维,等.高效液相色谱-串联质谱法同时测定沙棘中的 11 种黄酮类物质[J].分析科学学报,2019,35(3): 311-316
CAI Shuang, RUAN Chengjiang, DU Wei, et al. Simultaneous determination of eleven flavonoids in sea buckthorn using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Analytical Science, 2019, 35(3): 311-316
- [42] 孙燕,冯峰,黄特辉,等.基于 UPLC-Q-Exactive 技术结合 OTCML 数据库快速分析沙棘的功效成分[J].天然产物研究与开发,2019,31(7):1192-1202
SUN Yan, FENG Feng, HUANG Tehui, et al. Rapid analysis of functional components of *Hippophae rhamnoides* by UPLC-Q-exactive and OTCML database [J]. Natural Product Research and Development, 2019, 31(7): 1192-1202
- [43] D Gutzeit, V Wray, P Winterhalter, et al. Preparative isolation and purification of flavonoids and protocatechuic acid from sea buckthorn juice concentrate (*Hippophaë rhamnoides* L. ssp. *rhamnoides*) by high-speed counter-current chromatography [J]. Chromatographia, 2007, 65(1-2): 1-7
- [44] Xueying M, Oskar L, Jie Z, et al. Flavonol glycosides in berries of two major subspecies of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) and influence of growth sites [J]. Food Chemistry, 2016, 200(1): 189-198
- [45] Pop R M, Socaciu C, Pinteau A, et al. UHPLC/PDAESI/MS analysis of the main berry and leaf flavonol glycosides from different carpathian *Hippophae rhamnoides* L. varieties [J]. Phytochemical Analysis, 2013, 24(5): 484-492
- [46] 李幼林,周光明,罗庆红,等.超声辅助-离子液体微萃取-反相高效液相色谱同时测定银杏叶中 9 种活性成分[J].中华中医药杂志,2020,35(8):4149-4152
LI Youlin, ZHOU Guangming, LUO Qinghong, et al. Simultaneous determination of nine active ingredients in *Ginkgo biloba* L. by ultrasound assisted-ionic liquid microextraction coupled with reversed phase high performance liquid chromatography [J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2020, 35(8): 4149-4152
- [47] 胡蓉蓉,姚鑫.UPLC-MS/MS 测定银杏叶提取物中 10 个黄酮类成分的含量[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(24):90-95
HU Rongrong, YAO Xin. Determination of ten flavonoids in ginkgo leaves extract from different manufacturers by UPLC-MS/MS [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2017, 23(24): 90-95
- [48] Lingmei L, Yating W, Jucong Z, et al. Advances in the chemical constituents and chemical analysis of *Ginkgo biloba* leaf, extract, and phytopharmaceuticals [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2021, 193(30): 113704

(上接第 86 页)

- [15] 李勇,周文化,李彦,等.板栗-小麦混合粉的流变学和热力学特性[J].中国粮油学报,2020,35(2):1-5
LI Yong, ZHOU Wenhua, LI Yan, et al. The rheological properties and thermal properties of chestnut-wheat blend [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2020, 35(2): 1-5
- [16] 张乐,王赵改,杨慧,等.不同干燥方法对板栗品质的影响[J].核农学报,2016,30(12):2363-2372
ZHANG Le, WANG Zhaogai, YANG Hui, et al. Effects of different drying methods on the quality of Chinese chestnut [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2016, 30(12): 2363-2372
- [17] Ahmed Jasim, Al-Attar Hasan. Effect of drying method on rheological, thermal, and structural properties of chestnut flour doughs [J]. Food Hydrocolloids, 2015, 51: 76-87
- [18] 隋勇,王少华,何建军,等.小麦次粉对酥性饼干品质的影响[J].食品工业,2020,41(10):98-102
SUI Yong, WANG Shaohua, HE Jianjun, et al. The effect of wheat middlings on quality of crispy biscuit [J]. Food Industry, 2020, 41(10): 98-102