

3 种新疆沙棘黄酮的提取优化及抗氧化活性对比

李东香¹, 关荣发^{2*}, 黄海智¹, 钟浩², 刘晓凤², 杨开²

(¹中国计量大学生命科学学院 杭州 310018

²浙江工业大学食品科学与工程学院 杭州 310014)

摘要 采用超声波辅助法提取沙棘果实中的总黄酮,采用单因素实验和响应面法优化提取工艺,采用优化的工艺提取不同成熟度、不同地区沙棘果实黄酮,采用高效液相色谱法分析 4 种主要黄酮苷元的分布及含量,同时比较这些沙棘黄酮提取物的抗氧化活性。结果表明:乙醇体积分数 55%、料液比 1:45(g/mL)、超声功率 210 W 时,沙棘 A 的总黄酮提取率最高可达 3.241%。沙棘果实中主要的黄酮苷元为异鼠李素、槲皮素、山奈酚、杨梅素,而 3 种沙棘果实黄酮苷元的含量有差异。抗氧化活性测定结果表明,沙棘 C 的黄酮提取物具有更强的 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基清除率、2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)阳离子自由基清除率和还原能力,总黄酮苷元含量与 DPPH 自由基清除率、还原能力呈显著正相关。本研究结果为沙棘黄酮的综合利用开发提供数据支持。

关键词 沙棘; 黄酮; 响应面法; 抗氧化; 高效液相色谱

文章编号 1009-7848(2023)04-0157-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.04.016

沙棘 (*Hippophae Rhamnoides* L., Sea buckthorn) 为胡颓子科沙棘属落叶性灌木或乔木,又名酸醋柳、黑刺、沙枣等。作为一种药食同源植物,沙棘具有极高的营养和药用价值,如健脾消食、止咳化痰、活血化瘀、消炎杀菌、免疫调节、促进组织再生等^[1-3]。中国是沙棘资源最丰富的国家,拥有世界上 95% 以上的沙棘分布面积^[2]。沙棘中含有沙棘黄酮、维生素类、多糖、有机酸、酚酸、油脂、生物碱、微量元素、蛋白质和氨基酸等多种生物活性物质^[4],其中沙棘黄酮具有多种重要的药理活性,例如抗氧化、抗炎、抗肿瘤、抗真菌,保护心血管,缓解糖尿病损害,增强免疫力,抑制胆固醇的新生合成,进而改善肥胖和高脂血症等^[5-7]。沙棘黄酮中主要是异鼠李素、槲皮素、山奈酚、杨梅素等糖苷元组成的黄酮醇亚类,黄酮醇的组成和含量与沙棘果的成熟度、产地、亚种有关^[4]。通过比较研究不同地区和成熟度的沙棘果实中总黄酮和单一黄酮含量差异,能够为沙棘果的开发利用提供一定的参考依据。

本试验采用超声辅助法提取沙棘果实中的沙

棘总黄酮,因为相比传统的溶剂回流法,超声辅助提取法是利用强烈空化和机械振动作用,破坏目标化合物与样品基质间的相互作用,增强溶剂与样品间的相互作用,具有节约溶剂,缩短提取时间,高效环保的优点^[8]。韩丹丹等^[9]对比研究了超声提取和回流提取清见蜜柑果皮中多甲氧基黄酮提取率,结果发现超声提取省时、高效,更适合工业化提取。本试验采用响应面法优化提取工艺,旨在提高沙棘黄酮的提取率。周璇等^[10]采用超声辅助法结合响应面法优化提取女贞子中的总黄酮,含量最高为 47.4 mg/g。本试验采用高效液相色谱 (High-performance liquid chromatography, HPLC) 技术检测 3 种沙棘果实中 4 种黄酮苷元的含量与分布,并分别对其 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 自由基清除率、2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS) 阳离子自由基清除率和还原能力进行比较研究,旨在为沙棘果中黄酮类化合物生物活性的研究提供数据支持,为其综合开发利用提供依据。

收稿日期: 2022-04-20

基金项目: 浙江省重点研发计划项目(2018C02049); 杭州市重点科技研发计划项目(20180432B30)

第一作者: 李东香,女,硕士生

通信作者: 关荣发 E-mail: rongfaguan@163.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新疆塔城地区自产的大果沙棘 (Sea buck-

thorn)购自新疆一七〇兵团有机沙棘生态基地,其中,成熟(橙黄色)标记为沙棘 A,过熟(红色)标记为沙棘 B(图 1),-20 ℃保存备用;新疆阿克苏地区自产的野生沙棘,标记为沙棘 C(图 1),4 ℃保存备用。

芦丁标准品,上海索莱宝生物科技有限公司;槲皮素、山奈酚,合肥博美生物科技有限公司;杨梅素、异鼠李素,成都普瑞法科技开发有限公司;DPPH,美国 Sigma 公司;ABTS,上海易恩化学技术有限公司;乙腈、甲酸均为国产色谱级;硝酸铝九水合物、亚硝酸钠、氢氧化钠、无水乙醇、石油醚、甲醇、过硫酸钾、铁氰化钾均为国产分析纯级。

1.2 仪器与设备

PB17 破壁机,中山市金正生活电器有限公司;超声波清洗器,上海方需科技有限公司;UV-1200 紫外可见分光光度计,上海美谱达仪器有限公司;R210D 型旋转蒸发器,杭州大卫科教仪器有限公司;Allegra X-30R 高速冷冻离心机,美国 Beckman Coulter 公司;SCIENTZ-30ND 冷冻干燥机,宁波新芝生物科技股份有限公司;FA1004 电子天平,上海舜宇恒平科学仪器有限公司;LC 1100 高效液相色谱系统,美国安捷伦公司。

1.3 试验方法

1.3.1 沙棘果前处理 取适量冷冻储存的鲜果沙棘 A、沙棘 B 去杂后进行冷冻干燥,粉碎并过 60 目筛。沙棘 C 低温烘干后粉碎过 60 目筛。称取 1 g 沙棘果粉加入 80 mL 石油醚,浸泡 1 h,70 ℃水浴回流 1.5 h,抽滤,向滤渣中加入 60 mL 石油醚回流 1 h,抽滤,回收滤渣,充分挥发石油醚后,留待提取用。

1.3.2 沙棘黄酮提取 准确称取适量脱脂后的沙棘 A 果粉置于 100 mL 锥形瓶中,按一定的料液比、乙醇浓度、提取时间、功率超声提取总黄酮,重复提取 3 次,将提取液室温离心(8 000 r/min,10 min),合并上清液于容量瓶中定容,摇匀得到沙棘黄酮提取液。将提取液旋蒸浓缩至无醇味后置于-20 ℃冰箱保存,冷冻干燥得到沙棘黄酮粗提物(The total flavonoids extract,TFE)。

1.3.3 总黄酮含量测定

1.3.3.1 芦丁标准曲线绘制 采用亚硝酸钠-硝酸铝法。精密称取芦丁对照品 20 mg,用 60%乙醇



图 1 3 种新疆沙棘果实

Fig.1 Three kinds of sea buckthorn fruits

配成 0.2 mg/mL 的对照品溶液。精密量取对照品溶液 1,2,3,4,5,6 mL,分别置于 25 mL 量瓶中,各加 30%乙醇稀释至 6 mL,加 5%亚硝酸钠溶液 1 mL,混匀,静置 6 min,再加 10%硝酸铝溶液 1 mL,摇匀,静置 6 min,加 1 mol/L 氢氧化钠试液 10 mL,加 30%乙醇至刻度,摇匀,静置 15 min,以相应试剂为空白对照,在 510 nm 波长处测定吸光度。以吸光度为纵坐标,浓度为横坐标,得到芦丁标准曲线为: $y=12.27x-0.01033$, $R^2=0.9997$,表明标准品芦丁在 0.008~0.048 mg/mL 质量浓度范围内线性良好。

1.3.3.2 沙棘黄酮提取率测定 准确吸取 3 mL 提取液于 25 mL 的容量瓶中,根据 1.3.3.1 节的操作步骤,测定提取液在 510 nm 波长处的吸光值,根据标准曲线计算得到总黄酮浓度,根据公式(1)计算沙棘总黄酮提取率。

$$\text{总黄酮提取率}(\%) = \frac{C \times N \times V}{M \times 1000} \times 100 \quad (1)$$

式中, C ——沙棘果粉总黄酮质量浓度(mg/mL); N ——稀释倍数; V ——提取液总体积(mL); M ——样品的质量(g)。

1.3.4 单因素实验 分别考察料液比(1:10,1:20,1:30,1:40,1:50,g/mL),乙醇体积分数(50%,60%,70%,80%,90%),超声时间(20,30,40,50,60,70 min),超声功率(100,150,210,290,300 W)对沙棘总黄酮提取率的影响。前期通过预试验确定了脱脂的必要性和超声温度为 50 ℃最佳。刘锡建等^[11]对比发现脱脂后沙棘黄酮的提取效果更佳。田建华等^[12]亦研究发现沙棘黄酮的最佳提取温度为 50 ℃。在研究单因素变量的影响时,其它各因素固定的条件为:乙醇体积分数 60%,料液比 1:20,超声功率 270 W,超声 50 min,提取 3 次,每个试验重复 3 次。

1.3.5 Box-Behnken 试验设计 根据单因素实验

结果,应用 Box-Behnken Design 进行响应面优化试验(3 因素 3 水平),因素与水平设计见表 1。

1.3.6 沙棘黄酮提取液抗氧化能力的测定

1.3.6.1 DPPH 自由基清除能力测定 参考 Brand-Williams 等^[13]的方法并进行修改。准确称取 7.8 mg DPPH,加无水乙醇溶解得到 0.2 mmol/L DPPH 工作液。将 2 mL 梯度浓度的样品溶液与 2 mL DPPH 工作液混合,以同等浓度的抗坏血酸做阳性对照,以无水乙醇做空白对照,室温下避光静置 30 min,于 517 nm 波长处检测其吸光度。DPPH 清除率按照公式(2)计算:

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \frac{(A_{\text{白}} - A_{\text{样}})}{A_{\text{白}}} \times 100 \quad (2)$$

式中, $A_{\text{白}}$ ——未加抗氧化剂时 DPPH 的吸光度值; $A_{\text{样}}$ ——加入样品后 DPPH 的吸光度值。

1.3.6.2 ABTS 自由基清除能力测定 参考 Jo 等^[14]和沙玉欢等^[15]的方法并加以修改,称取 192.03 mg 的 ABTS 溶于 50 mL 去离子水中制得 7 mmol/L 的 ABTS 溶液;称取 66.2284 mg $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 溶于 100 mL 去离子水中制得 2.45 mmol/L 的 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 溶液,取等量上述配制好的溶液,混合均匀,室温下避光放置 12~16 h,得到 ABTS 母液。用无水乙醇按照约 1:46 的体积比将 ABTS 母液稀释直至其在 734 nm 波长处的吸光度为 0.7 ± 0.02 ,得到 ABTS 工作液。取 300 μL 梯度浓度样品溶液与 4 mL ABTS 工作液混合,室温下静置 6 min,在 734 nm 波长处检测其吸光度值,以同等浓度的抗坏血酸做阳性对照,以 ABTS 工作液和去离子水的混合液为空白组。ABTS 清除率按照公式(3)计算:

$$\text{ABTS 自由基清除率}(\%) = \frac{(A_{\text{白}} - A_{\text{样}})}{A_{\text{白}}} \times 100 \quad (3)$$

式中, $A_{\text{白}}$ ——未加抗氧化剂时 ABTS 的吸光度值; $A_{\text{样}}$ ——加入样品后 ABTS 的吸光度值。

1.3.6.3 还原能力测定 参考柳萌等^[16]和李欣等^[17]的方法,采用高铁盐-铁氰化钾比色法测定样品的还原能力。取 1 mL 样品溶液于离心管中,加入 2.5 mL 0.2 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.6) 和 2.5 mL $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 溶液(质量分数 1%),混匀后 50 $^{\circ}\text{C}$ 保温 20 min。随后加入质量分数 10% 三氯乙酸溶液 2.5 mL,混合后 4 $^{\circ}\text{C}$ 3 000 r/min 离心 10 min。取上清液 2.5 mL,加入 2.5 mL 去离子水和 0.5 mL

表 1 Box-Behnken 试验因素水平设计
Table 1 Level of independent variables used for Box-Behnken design

因素	编码水平		
	-1	0	+1
A(乙醇体积分数/%)	50	60	70
B(液料比/mL·g ⁻¹)	30:1	40:1	50:1
C(超声功率/W)	150	210	270

质量分数 0.1% FeCl_3 溶液,混匀后静置 10 min,在 700 nm 波长处测定吸光度,以其吸光度表征样品还原能力,以 0.05 mg/mL 抗坏血酸为阳性对照。

1.3.7 黄酮各组分含量测定

1.3.7.1 色谱条件 采用安捷伦 Poroshell 120 C18,反相色谱柱(3.0 mm×150 mm,2.7 μm),柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,流动相 A 相为 0.1% 甲酸溶液,B 相为色谱级乙腈溶液,进样量为 10 μL ,流速为 0.4 mL/min,检测波长为 370 nm,洗脱程序为初始比例 A 相为 90%,B 相为 10%,梯度变化至 A 相 60%,B 相 40%,保持 5 min,洗脱时间为 40 min。

1.3.7.2 溶液配制 黄酮苷元对照品溶液配制:称取芦丁、槲皮素、异鼠李素、山奈酚、杨梅素标准品适量置于容量瓶中,用甲醇定容至刻度,得到对照品溶液,过 0.22 μm 滤膜即得。

供试品溶液配制:称取 TFE 50 mg 于圆底烧瓶中,加入甲醇与质量分数为 25% 的 HCl 溶液(体积比为 4:1)50 mL,85 $^{\circ}\text{C}$ 加热回流 1 h,放冷至室温后过滤,滤液转移至 50 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度,摇匀,过 0.22 μm 滤膜即得。

1.4 数据处理与分析

采用 GraphPad Prism 8.0 软件作图和统计分析。试验均设置 3 个重复,结果以“平均值 \pm 标准差”的形式表示。采用单因素方差分析和双因素有重复试验方差分析来确定多组数据间差异的显著性,以 $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

如图 2a 所示,当乙醇体积分数在 50%~60% 范围内时,总黄酮的提取率随乙醇体积分数的增大而增加,当乙醇体积分数为 60% 时,总黄酮的提

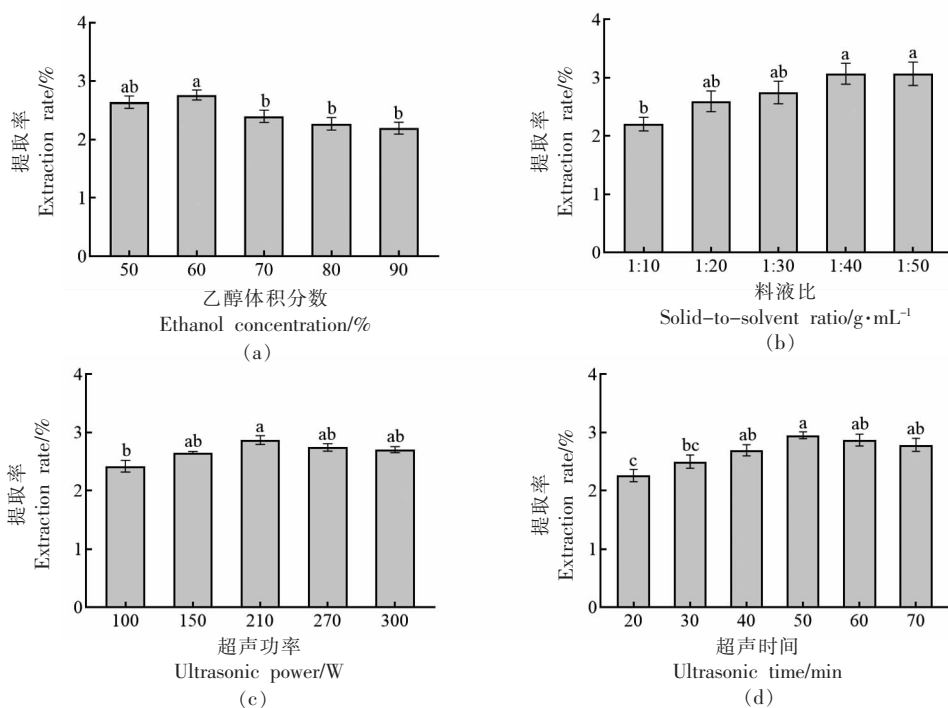
取率达到最大值 2.76%, 当乙醇体积分数继续增大时, 总黄酮的提取率开始逐渐降低。其原因可能是黄酮苷易溶于有机溶剂, 乙醇体积分数增大会使得溶剂有效地向细胞内渗透, 使得提取率增大。当乙醇体积分数大于 60% 时, 可能会使得沙棘果中其它醇溶性杂质、色素等溶出^[8], 进而使得总黄酮提取率降低。

如图 2b 所示, 总黄酮提取率与料液比呈正相关, 料液比为 1:40 时, 总黄酮提取率达到最大值为 3.07%, 当料液比大于 1:40 后, 总黄酮提取率的增长逐渐平缓。可能是因为料液比增大使得物料能够与溶剂充分接触, 同时两者之间的浓度差亦是提取过程中的推动力, 推动力越大, 提取率越高。然而, 当料液比继续增大时, 可能有大量杂质溶出, 降低了超声的工作效率, 使得提取率的增长非常平缓^[9]。同时过高的料液比会造成提取溶剂

的浪费, 也会给后续浓缩冻干工艺增加难度。

如图 2c 所示, 总黄酮提取率随超声功率的增大先升高后降低, 在 210 W 时提取率最大为 2.87%。这可能是因为超声波的空化效应和机械效应能够破坏物料的细胞膜与细胞壁, 使得总黄酮更容易溶出。然而, 超声功率过大会导致提取温度过高, 进而可能会使得溶出的总黄酮被分解破坏, 提取率降低^[8]。

如图 2d 所示, 随超声时间的延长, 总黄酮提取率整体呈升高的趋势, 超声时间为 50 min 时, 总黄酮提取率最高为 2.95%。猜测是因为 50 min 时大部分黄酮类物质已溶出, 继续延长超声时间会使其它杂质溶出或黄酮部分分解^[20], 降低提取率, 而且从经济效应来说, 应在保证提取率的前提下, 尽可能缩短提取时间, 故选择 50 min 作为超声时间较合适。



注:不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),下同。

图 2 不同提取条件对沙棘黄酮提取率的影响

Fig.2 Effects of different extraction conditions on the extraction rate of sea buckthorn flavonoids

2.2 响应面试验结果

2.2.1 Box-Behnken 试验设计结果 根据单因素试验结果,并结合 Box-Behnken 的试验设计原理,以乙醇体积分数(A)、液料比(B)、超声功率(C)为自变量,提取率(Y)为响应值,采用 Design-Expert

8.0.6 软件设计三因素三水平的试验如表 2 所示。并对试验结果进行分析,得到总黄酮提取率对自变量 A、B、C 的回归方程: $Y=3.16-0.084A+0.14B-0.013AB-0.00975AC+0.030BC-0.18A^2-0.24B^2-0.089C^2$ 。

根据方差分析结果可知,模型的 P 值为 0.0004, $P < 0.01$ 表明该模型回归极显著,在选定的因素范围内具有统计学意义;失拟误差 $P > 0.05$ 不显著,表明模型与试验数据拟合程度良好,同时模型的决定系数 $R^2 = 0.9604$,说明试验值与理论模型

有 96.04% 是相符的,模型的 CV% 为 2.13%,说明其置信度是较高。由表 3 可知,模型一次项 A 、 B 和二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 对提取率的影响极显著,通过 P 值分析,各因素的主效应关系为:液料比 $>$ 乙醇体积分数 $>$ 超声功率。

表 2 Box-Behnken 试验设计与结果

Table 2 Box-Behnken design with experimental results

序号	A(乙醇体积分数/%)	B(液料比/ $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$)	C(超声功率/W)	Y(提取率/%)	序号	A(乙醇体积分数/%)	B(液料比/ $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$)	C(超声功率/W)	Y(提取率/%)
1	60	30	270	2.689	10	60	40	210	3.159
2	60	40	210	3.164	11	50	50	210	3.052
3	50	40	270	2.969	12	70	40	270	2.873
4	60	40	210	3.068	13	60	30	150	2.744
5	60	50	150	2.923	14	50	40	150	2.897
6	70	40	150	2.840	15	60	50	270	2.987
7	50	30	210	2.704	16	60	40	210	3.185
8	60	40	210	3.195	17	70	50	210	2.768
9	70	30	210	2.470					

表 3 回归方差分析结果

Table 3 Analysis of variance for the fitted regression model

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.66	9	0.073	18.86	0.0004
A	0.056	1	0.056	14.54	0.0066**
B	0.16	1	0.16	40.72	0.0004**
C	1.625×10^{-3}	1	1.625×10^{-3}	0.42	0.5377
AB	6.250×10^{-4}	1	6.250×10^{-4}	0.16	0.6997
AC	3.803×10^{-4}	1	3.803×10^{-4}	0.098	0.7631
BC	3.540×10^{-3}	1	3.540×10^{-3}	0.91	0.3707
A^2	0.13	1	0.13	33.84	0.0007**
B^2	0.23	1	0.23	60.27	0.0001**
C^2	0.033	1	0.033	8.64	0.0217
残差	0.027	7	3.869×10^{-3}		
失拟	0.021	3	7.125×10^{-3}	4.99	0.0772
纯误差	5.711×10^{-3}	4	1.4228×10^{-3}		
总计	0.68	16			

注: $R^2=0.9622$;*表示 $P < 0.05$,差异显著;**表示 $P < 0.01$,差异极显著。

2.2.2 响应面分析 根据回归方程得到的响应面图和等高线图能够直观看到各因素间的交互作用,其中响应面图的陡峭程度和等高线图接近椭圆形的程度都能够反映各因素对响应值的影响程度^[21]。如图 b1、c1 所示,乙醇体积分数与超声功率、液料比与超声功率之前的等高线图趋向椭圆

形,交互作用显著。比较 3 组响应面图可知,乙醇体积分数和液料比的曲线相比于超声功率更加陡峭,这说明乙醇体积分数和液料比对总黄酮的提取率影响作用显著,当超声功率不变时,总黄酮提取率随乙醇体积分数增加,液料比增大,呈现先上升后下降的趋势。

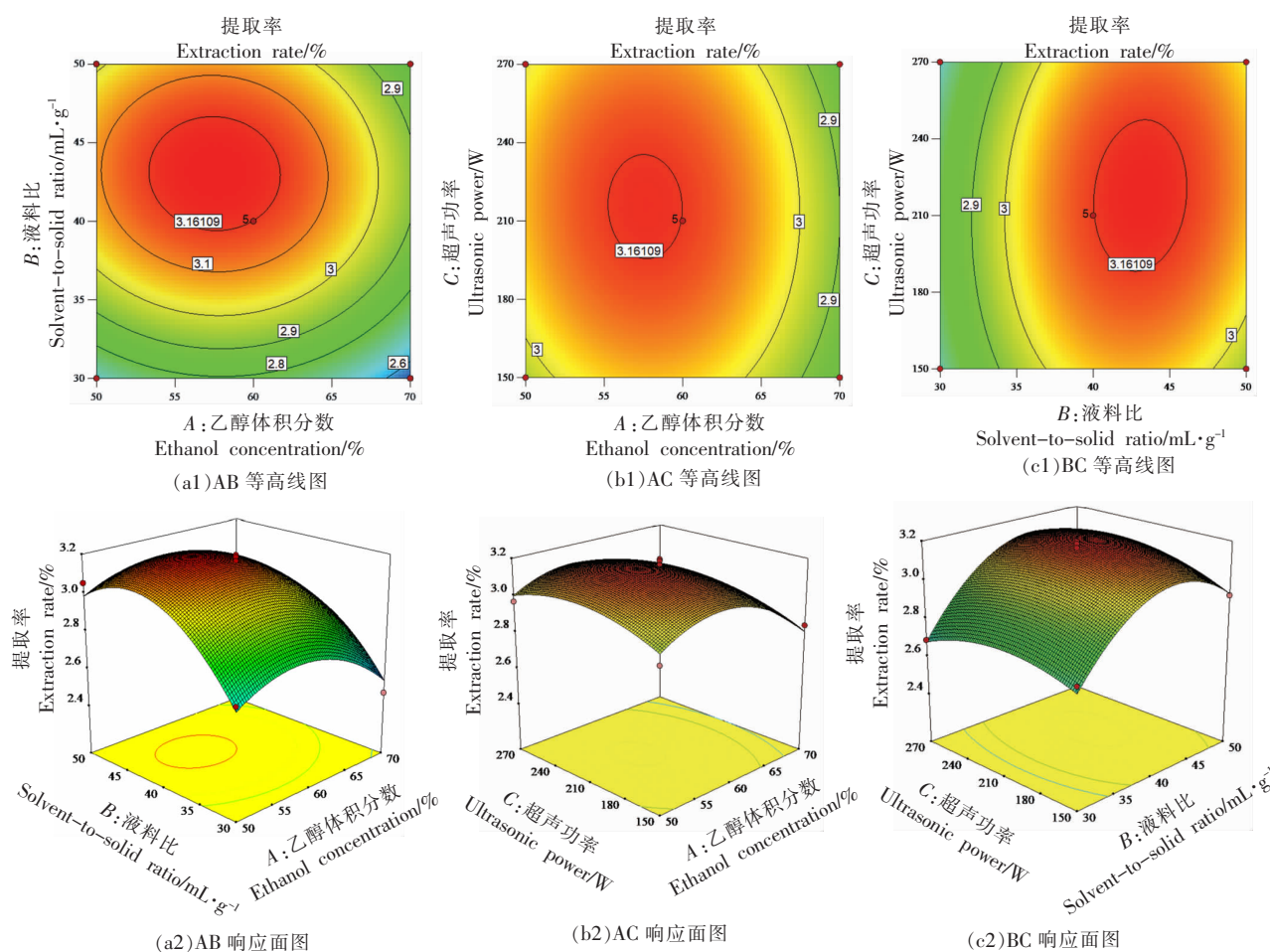


图3 各因素交互作用对黄酮提取率的响应面图与等高线图

Fig.3 Response surface plots and contour plots of the interaction of various factors on the extraction rate of flavonoids

2.2.3 验证试验 通过模型预测沙棘总黄酮提取的最佳工艺条件为:A=57.47,B=43,C=219,即超声功率为219 W,液料比为43:1,乙醇体积分数为57.5%,此时预测最大总黄酮提取率 $Y=3.194\%$ 。考虑到实际操作情况,对上述预测的最佳工艺条件进行修正,即超声功率210 W,液料比45:1,乙醇体积分数55%,在此条件下,做3次平行试验,结果测得总黄酮提取率为 $3.241\% \pm 0.13\%$,与理论预测值无显著性差异,说明以上模型对沙棘总黄酮提取的工艺优化具有实际可行性。

采用优化后的工艺条件提取沙棘B、沙棘C的总黄酮,结果测得沙棘B的总黄酮提取率为 $1.856\% \pm 0.01\%$,沙棘C的总黄酮提取率为 $3.795\% \pm 0.23\%$,对比可知总黄酮提取率:沙棘C>沙棘A>

沙棘B。

2.3 HPLC法检测沙棘黄酮中各组分含量

采用HPLC法检测3种沙棘果实中提取的总黄酮水解后各主要黄酮苷元的含量,结果如表4所示。异鼠李素在3种沙棘果实中含量都为最高,其次是槲皮素,说明异鼠李素与槲皮素是3种沙棘果实中主要的黄酮苷元,而杨梅素在3种沙棘果实中含量都较低。对比可知,3种沙棘果实中山奈酚的含量差异显著,沙棘C>沙棘A>沙棘B,且沙棘A、沙棘C中槲皮素的含量显著高于沙棘B,猜测与沙棘B的成熟度有关,过熟的沙棘果中山奈酚和槲皮素含量较低。沙棘B中异鼠李素含量显著高于沙棘C,而沙棘C中杨梅素含量显著高于沙棘A和沙棘B,猜测与产地有关,即相比于阿克苏地区,塔城地区的沙棘果实中异鼠李素含量

较高,而杨梅素含量极低。

由表 4 可知,3 种沙棘总黄酮苷元含量:沙棘 B (11.56 $\mu\text{g}/\text{mg}$)>沙棘 C (11.32 $\mu\text{g}/\text{mg}$)>沙棘 A (11.06 $\mu\text{g}/\text{mg}$),三者之间并没有显著差异,然而与

化学方法测定的沙棘提取液中总黄酮的含量有明显差异,可能是因为化学法检测的是黄酮苷和苷元的总量,使得结果偏高,亦或是提取液中有其它物质存在影响了化学法的准确性。

表 4 不同沙棘果实总黄酮中各苷元的含量

Table 4 Contents of aglycones in total flavonoids of different sea buckthorn fruits

样品	杨梅素/ $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$	槲皮素/ $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$	山奈酚/ $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$	异鼠李素/ $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$	总计/ $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$
沙棘 A	0.04 ^b	2.16 \pm 0.16 ^a	0.48 \pm 0.02 ^b	8.45 \pm 0.44 ^{ab}	11.06 \pm 0.67
沙棘 B	0.02 \pm 0.01 ^b	1.27 \pm 0.03 ^b	0.34 \pm 0.01 ^c	9.92 \pm 0.16 ^a	11.56 \pm 0.19
沙棘 C	0.16 ^a	2.83 \pm 0.08 ^a	0.64 \pm 0.01 ^a	7.69 \pm 0.22 ^b	11.32 \pm 0.31

注:同列不同肩标小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

2.4 沙棘黄酮提取物的体外抗氧化能力比较

DPPH 自由基清除试验、ABTS 自由基清除试验以及还原能力测定都是常用于表征物质抗氧化能力的体外试验^[22]。如图 4a 所示,与抗坏血酸相比,沙棘 C 的 DPPH 自由基清除率明显较高,样品质量浓度为 0.01 mg/mL 时,其 DPPH 自由基清除率显著高于抗坏血酸。同时随着样品质量浓度的增大,沙棘 A、沙棘 B 的 DPPH 自由基清除率亦逐渐增大,然而均低于抗坏血酸与沙棘 C。当样品质量浓度为 0.04 mg/mL 时,DPPH 自由基清除率:沙棘 C (95.28%)>抗坏血酸 (94.95%)>沙棘 B (87.47%)>沙棘 A (86.11%)。

如图 4b 所示,样品质量浓度为 0.01 mg/mL 时,沙棘 A、沙棘 C 的 ABTS 自由基清除率显著高于抗坏血酸。随着样品质量浓度的增大,沙棘 A、沙棘 C 的 ABTS 自由基清除率逐渐升高,且始终高于抗坏血酸;沙棘 B 的 ABTS 自由基清除率也呈上升趋势,而低于抗坏血酸,在样品质量浓度为 0.04,0.05 mg/mL 时,沙棘 B 的自由基清除率显著低于抗坏血酸。当样品质量浓度为 0.04 mg/mL 时,ABTS 自由基清除率:沙棘 C (92.50%)>沙棘 A (81.33%)>抗坏血酸 (74.12%)>沙棘 B (54.52%)。

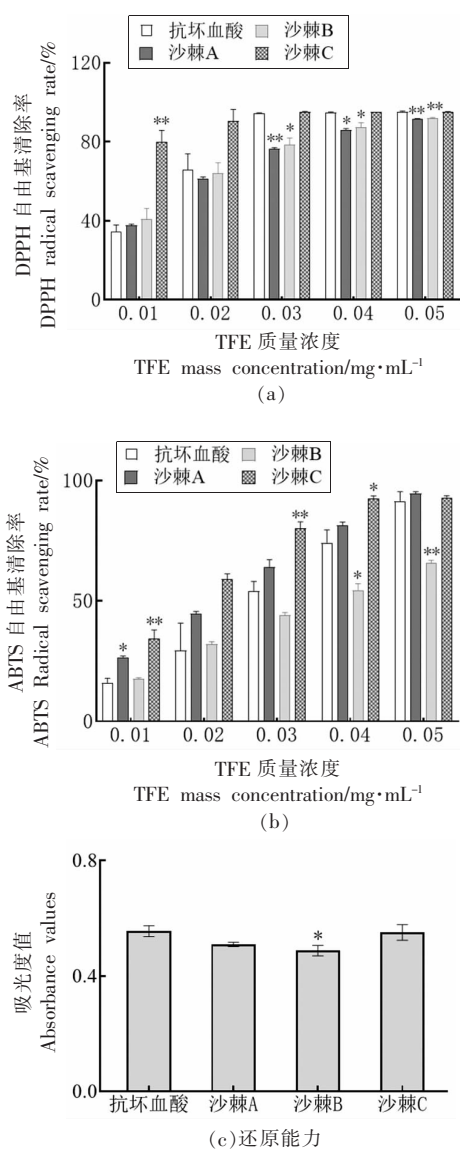
物质的还原能力越强,其抗氧化性越强,如图 4c 所示,沙棘 A、沙棘 C 的还原能力与同等质量浓度的抗坏血酸相当,其吸光度值分别为 0.510 和 0.551,而沙棘 B 的吸光度值(0.488)显著低于抗坏血酸(0.556),说明沙棘 B 的还原能力较沙棘 A 和沙棘 C 弱。综合图 4a~4c 与表 4 可知,3 种沙棘黄酮的抗氧化能力可能与各黄酮苷元的含量相关。

2.5 沙棘黄酮苷元含量与抗氧化能力的相关性分析结果

为深入了解沙棘黄酮苷元含量与其抗氧化能力的关系,对沙棘各黄酮苷元和总量与 DPPH 自由基清除率、ABTS 自由基清除率、还原能力进行 Pearson 相关性分析,结果如表 5 所示。沙棘黄酮苷元总含量与 DPPH 自由基清除率呈显著正相关,相关系数为 0.834($P=0.039$),与还原能力亦呈显著正相关,相关系数为 0.819($P=0.046$)。

3 讨论

本研究发现超声提取工艺参数对沙棘总黄酮得率具有一定影响,故采用 3 因素 3 水平的 Box-Behnken 响应面法优化沙棘 A 总黄酮提取工艺参数,结果显示:超声功率为 210 W,料液比为 1:45,乙醇体积分数为 55%时,沙棘 A 总黄酮提取率最高为 3.241%,在此条件下,沙棘 B 总黄酮提取率为 1.856%,沙棘 C 的总黄酮提取率为 3.795%,对比可知总黄酮提取率:沙棘 C>沙棘 A>沙棘 B。由此可推断新疆阿克苏地区的沙棘果实总黄酮含量略高于塔城地区,而在塔城地区,成熟度较高的沙棘果总黄酮含量较低。田建华等^[12]采用果胶酶协同超声波法提取山西沙棘果渣中的总黄酮,提取率最高达 8.91 mg/g。樊旭等^[23]采用超声辅助法提取吉林省蛟河市自培育的沙棘果实总黄酮,提取率最高为 2.665%。汪成等^[24]通过对比发现 10 个不同产地沙棘果中总黄酮含量差异显著,其中新疆青河产的沙棘果中总黄酮含量最高为 65.953 mg/g。可推测生长地域对沙棘中总黄酮的提取率



注:与抗坏血酸相比,*表示 $P < 0.05$, 差异显著;
**表示 $P < 0.01$, 差异极显著。

图4 不同沙棘果实总黄酮提取物的体外抗氧化能力
Fig.4 Antioxidant capacity of total flavonoids
from different sea buckthorn fruits *in vitro*

有较大影响。白生文等^[25]利用超声波辅助提取河西走廊沙棘果渣、果皮渣、籽粕中总黄酮,三者的提取率分别为2.55%,0.651%,1.901%。王苗苗等^[26]采用回流法提取新疆自产的大果沙棘和中亚沙棘中的总黄酮,大果沙棘中黄酮含量为7.02 mg/g,中亚沙棘中黄酮含量为9.56 mg/g。由此可见,沙棘中总黄酮的含量变化还与存在部位、品种等有密切的关系。本研究通过对不同地域、不同成熟度的沙

表5 沙棘黄酮苷元含量与抗氧化能力相关性

Table 5 Correlation coefficients between the content of sea buckthorn flavonoid aglycone and antioxidant capacity

指标	DPPH 自由基清除率	ABTS 自由基清除率	还原能力
DPPH	1		
ABTS	-0.804	1	
还原能力	0.747	-0.779	1
杨梅素	0.089	-0.204	-0.26
槲皮素	0.264	-0.065	-0.323
山奈酚	0.672	-0.472	0.127
异鼠李素	0.19	-0.25	0.702
黄酮苷元总含量	0.834*	-0.665	0.819*

注:*.表示 $P < 0.05$; **.表示 $P < 0.01$ 。

棘果实中总黄酮提取率进行对比,为新疆沙棘果实的开发利用提供理论支持。

本试验测定结果发现新疆阿克苏地区与塔城地区的沙棘总黄酮苷元的组成与含量都没有显著差异,含量较高的黄酮苷元均为异鼠李素、槲皮素、山奈酚,杨梅素含量均较低,而单一黄酮苷元含量之间有显著差异。对比阿克苏地区,塔城地区沙棘B中异鼠李素含量较高(11.56 $\mu\text{g}/\text{mg}$),杨梅素含量较低(0.02 $\mu\text{g}/\text{mg}$)。汪成等^[24]检测了10批不同地区沙棘果中单一黄酮和总黄酮的含量,发现不同产地的沙棘果中槲皮素、异鼠李素含量有显著差异,且槲皮素、异鼠李素的含量与总黄酮含量不具有一致性。由此可知,单一黄酮苷元含量与总黄酮含量之间无一致性。本研究的含量测定结果还表明,不同成熟度的沙棘果中单一黄酮苷元的含量有明显差异,成熟度更高的沙棘B中槲皮素、山奈酚含量都较低,而关于成熟度差异对沙棘果中单一黄酮苷元含量影响的研究较少。明确不同地区、不同成熟度的沙棘果中总黄酮含量与组成、单一黄酮苷元含量差异,不仅能够弹性调整沙棘果实的收获时间,减少贮藏费用,还有助于对沙棘活性成分的进一步挖掘及评价^[27],为之后开发具有明确营养功能的沙棘系列保健食品奠定基础。

体外抗氧化结果表明,3种沙棘果实总黄酮提取液都具有一定的抗氧化活性,且存在剂量-效

应关系,焦岩等^[28]也发现大果沙棘黄酮的纯度与其抗氧化活性存在量效关系。然而由于成熟度和生长地区的差异,导致 3 种沙棘果实所含抗氧化活性物质的含量有所不同,抗氧化能力存在显著差异。阿克苏地区的沙棘 C 总黄酮提取液的 DPPH 自由基清除率、ABTS 自由基清除率、还原能力均较强,猜测可能与其杨梅素、山奈酚含量较高有关。本研究通过对沙棘黄酮苷元含量与抗氧化活性之间的相关性进行研究发现,沙棘总黄酮苷元含量与 DPPH 自由基清除率、还原能力均呈显著正相关($P < 0.05$)。Guo 等^[29]研究发现细胞外抗氧化活性与沙棘提取物中的总酚和黄酮类化合物密切相关,而细胞抗氧化活性以及对 HepG2 细胞的抗增殖作用与总酚酸和黄酮苷元显著相关。由此可知,沙棘中含有除黄酮外其它重要的抗氧化成分,如维生素 C、类胡萝卜素和酚类化合物等。Sytařová 等^[27]证实了成熟度差异是导致沙棘浆果中维生素 C 和 β -胡萝卜素含量高的重要因素,进而使得晚熟品种的沙棘浆果的抗氧化活性更高。Rop 等^[30]也发现沙棘果实中多酚和总黄酮的含量与抗氧化能力之间存在很强的相关性。而本试验中 3 种沙棘果实的抗氧化活性与维生素 C、类胡萝卜素和多酚的具体关系可做进一步研究。本研究明确了 3 种沙棘黄酮的抗氧化能力,为沙棘产品的开发利用提供了数据支持。

参 考 文 献

- [1] 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 D, WU G D. Research progress on chemical composition and pharmacological effects of sea buckthorn flavonoids[J]. China Pharmacy, 2019, 30(9): 1292-1296.
- [2] 周浩楠, 胡娜, 董琦, 等. 沙棘化学成分及药理作用的研究进展[J]. 华西药学杂志, 2020, 35(2): 211-217.
ZHOU H N, HU N, DONG Q, et al. Research progress on the chemical composition and pharmacological action of *Hippophae rhamnoides* [J]. West China Journal of Pharmaceutical Sciences, 2020, 35(2): 211-217.
- [3] SURYAKUMAR G, GUPTA A. Medicinal and therapeutic potential of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2011, 138(2): 268-278.
- [4] CIESAROVÁ Z, MURKOVIC M, CEJPEK K, et al. Why is sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) so exceptional? A review[J]. Food Research International (Ottawa, Ont.), 2020, 133: 109170.
- [5] ULLAH A, MUNIR S, BADSHAH S L, et al. Important flavonoids and their role as a therapeutic agent[J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2020, 25(22): E5243.
- [6] LIU S, XIAO P, KUANG Y, et al. Flavonoids from sea buckthorn: A review on phytochemistry, pharmacokinetics and role in metabolic diseases[J]. Journal of Food Biochemistry, 2021, 45(5): e13724.
- [7] XIAO P, LIU S, KUANG Y, et al. Network pharmacology analysis and experimental validation to explore the mechanism of sea buckthorn flavonoids on hyperlipidemia [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2021, 264: 113380.
- [8] CHAVES J O, DE SOUZA M C, DA SILVA L C, et al. Extraction of flavonoids from natural sources using modern techniques[J]. Frontiers in Chemistry, 2020, 8: 507887.
- [9] 韩丹丹, 毕金峰, 谢宏, 等. 清见蜜柑果皮中多甲氧基黄酮的提取分离[J]. 中国食品学报, 2018, 18(6): 191-199.
HAN D D, BI J F, XIE H, et al. Extraction and separation of polymethoxyflavones in Kiyomi tango peels[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(6): 191-199.
- [10] 周旋, 许明祥, 蔡文卓, 等. 女贞子总黄酮超声辅助提取工艺及体外抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2019, 35(3): 182-188.
ZHOU X, XU M X, CAI W Z, et al. Ultrasonic-assisted extraction and antioxidant activity of total flavonoids from *Ligustrum lucidum* Ait by response surface methodology [J]. Food & Machinery, 2019, 35(3): 182-188.
- [11] 刘锡建, 王艳辉, 李平, 等. 沙棘果渣中总黄酮提取的研究[J]. 北京化工大学学报(自然科学版), 2004(1): 18-21.
LIU X J, WANG Y H, LI P, et al. Extraction of total flavones from marc of *Sea buckthorn*[J]. Journal of Beijing University of Chemical Technology (Natural Science Edition), 2004(1): 18-21.

- [12] 田建华, 张春媛, 魏璐. 沙棘果渣总黄酮提取工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33(1): 65-72.
TIAN J H, ZHANG C Y, WEI L, et al. Study on the extraction technology and antioxidant activity of total flavonoids from the pomace of sea buckthorn[J]. Natural Product Research and Development, 2021, 33(1): 65-72.
- [13] BRAND-WILLIAMS W, CUVELIER M E, BERSET C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity[J]. LWT - Food Science and Technology, 1995, 28(1): 25-30.
- [14] JO Y J, CHO H S, CHUN J Y. Antioxidant activity of β -cyclodextrin inclusion complexes containing trans-cinnamaldehyde by DPPH, ABTS and FRAP [J]. Food Science and Biotechnology, 2021, 30(6): 807-814.
- [15] 沙玉欢, 毛晓英, 吴庆智, 等. 核桃分心木黄酮物质的组分及其抗氧化性分析[J]. 食品科学, 2021, 42(12): 91-98.
SHA Y H, MAO X Y, WU Q Z, et al. Flavonoid composition and antioxidant activity of *Diaphragma juglandis* fructus[J]. Food Science, 2021, 42(12): 91-98.
- [16] 柳萌, 郜海燕, 房祥军, 等. 不同成熟度杨梅酚酸的超声-微波协同优化提取及其抗氧化性对比[J]. 食品科学, 2021, 42(3): 112-120.
LIU M, GAO H Y, FANG X J, et al. Optimization of ultrasonic-microwave assisted extraction of phenolic acids from Chinese Bayberries (*Morella rubra* Sieb. et Zucc) of different maturities and a comparative study of their antioxidant activities [J]. Food Science, 2021, 42(3): 112-120.
- [17] 李欣, 薛治浦, 朱文学. 丹参不同部位总酚酸和总黄酮含量分析及其抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2011, 32(3): 108-111.
LI X, XUE Z P, ZHU W X, et al. Antioxidant activities and contents of total flavonoids and phenols from different parts of *Salvia miltiorrhiza* Bunge [J]. Food Science, 2011, 32(3): 108-111.
- [18] 李萌萌, 焦天慧, 吕长鑫, 等. 红树莓籽中黄酮提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 中国食品学报, 2017, 17(2): 101-109.
LI M M, JIAO T H, LÜ C X, et al. Optimization of extraction technology of flavonoids from red raspberry and studies on its antioxidant activity[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2017, 17(2): 101-109.
- [19] 罗磊, 张冰洁, 朱文学, 等. 响应面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 L, ZHANG B J, ZHU W X, 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.
- [20] 赵刚, 顾佳丽, 励建荣. Plackett-Burman 设计及响应面法优化芹菜中总黄酮的超声提取工艺[J]. 中国食品学报, 2017, 17(8): 147-155.
ZHAO G, GU J L, LI J R, et al. Optimization of ultrasonic extraction conditions of total flavonoids from *apium graveolens* by Plackett-Burman design and response surface analysis[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2017, 17(8): 147-155.
- [21] CUI Q, LIU J Z, HUANG Y Y, et al. Enhanced extraction efficiency of bioactive compounds and antioxidant activity from *Hippophae rhamnoides* L. by-products using a fast and efficient extraction method [J]. Separation Science and Technology, Philadelphia: Taylor & Francis Inc, 2017, 52(7): 1160-1171.
- [22] WANG X, DING G, LIU B, et al. Flavonoids and antioxidant activity of rare and endangered fern: *Isoetes sinensis* [J]. PLoS One, 2020, 15(5): e0232185.
- [23] 樊旭, 周鸿立. 响应面法优化沙棘黄酮的提取和抗氧化活性的研究[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2018, 39(4): 85-90.
FAN X, ZHOU H L. Optimization of extraction and antioxidant activity of flavonoids from seabuckthorn by response surface methodology[J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2018, 39(4): 85-90.
- [24] 汪成, 王怀友, 汪蔓青, 等. 不同产地沙棘果化学成分含量及抗氧化活性的研究[J]. 华西药学杂志, 2020, 35(5): 513-517.
WANG C, WANG H Y, WANG M Q, et al. Study on content of major chemical constituents and anti-oxidation activities of Sea buckthorn fruit[J]. West China Journal of Pharmaceutical Sciences, 2020, 35(5): 513-517.

- [25] 白生文, 汤超, 田京, 等. 沙棘果渣总黄酮提取工艺及抗氧化活性分析[J]. 食品科学, 2015, 36(10): 59-64.
BAI S W, TANG C, TIAN J, et al. Extraction and antioxidant activity of total flavonoids from sea buckthorn pomace[J]. Food Science, 2015, 36(10): 59-64.
- [26] 王苗苗, 刘宗浩, 张永, 等. 2种新疆沙棘中黄酮、多酚及其抗氧化活性分析[J]. 食品工业科技, 2020, 41(18): 51-57.
WANG M M, LIU Z H, ZHANG Y, et al. Analysis of the flavonoid, polyphenol and its antioxidant activity of 2 kinds of sea buckthorn from Xinjiang[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(18): 51-57.
- [27] SYTAŘOVÁ I, ORSAVOVÁ J, SNOPEK L, et al. Impact of phenolic compounds and vitamins C and E on antioxidant activity of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) berries and leaves of diverse ripening times[J]. Food Chemistry, 2020, 310: 125784.
- [28] 焦岩, 常影, 余世锋, 等. 大果沙棘果渣黄酮体外抗氧化活性[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(9): 285-287.
JIAO Y, CHANG Y, YU S F, et al. *In vitro* antioxidant activity of large fruit sea buckthorn pomace flavonoids[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2014, 42(9): 285-287.
- [29] GUO R, GUO X, LI T, et al. Comparative assessment of phytochemical profiles, antioxidant and antiproliferative activities of Sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) berries[J]. Food Chemistry, 2017, 221: 997-1003.
- [30] ROP O, ERCISLI S, MLCEK J, et al. Antioxidant and radical scavenging activities in fruits of 6 sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) cultivars[J]. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 2014, 38(2): 224-232.

Optimization of Extraction of Flavonoids from Three Kinds of Xinjiang Sea Buckthorns and Comparative of Antioxidant Activities

Li Dongxiang¹, Guan Rongfa^{2*}, Huang Haizhi¹, Zhong Hao², Liu Xiaofeng², Yang Kai²

¹College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018

²College of Food Science and Technology, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014

Abstract In this study, ultrasonic-assisted method was used to extract total flavonoids from sea buckthorn fruits. The extraction process was optimized by the single factor test and the response surface test. The distribution and contents of four main flavonoid aglycones from sea buckthorn fruits of different maturities and different regions were determined by the optimized extraction process combined with high-performance liquid chromatography. Thereafter a comparative study of the antioxidant activity of sea buckthorn flavonoids extracts was carried out. The optimal extraction conditions were determined as follows: ethanol concentration 55%, solid-to-solvent ratio 1:45 (g/mL), and ultrasonic power 210 W. The extraction rate of sea buckthorn A total flavonoids was up to 3.241% under the optimized conditions. The main flavonoid aglycones in sea buckthorn fruits were isorhamnetin, quercetin, kaempferol and myricetin, and the content of flavonoid aglycones varied with the maturity and region of the fruit. Total flavonoids extract from the sea buckthorn C fruits exhibited strong antioxidant activities as determined by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging and ferric reducing antioxidant power assays. The total flavonoid aglycones content was significantly positively correlated with the DPPH radical scavenging capacity and ferric reducing power. In summary, this study can provide a scientific basis for the comprehensive utilization and development of sea buckthorn fruits.

Keywords sea buckthorn; flavonoids; response surface methodology; antioxidant activity; high-performance liquid chromatography