

## 沙棘籽粕低聚原花青素的制备及结构与抗氧化活性分析

郭建峰<sup>1,2</sup>, 郅浩然<sup>1</sup>, 胡培毅<sup>1</sup>, 刘子超<sup>1</sup>, 谭志超<sup>3</sup>, 王芳<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup> 中北大学化学工程与技术学院 太原 030051

<sup>2</sup> 中国露酒植物提取与健康因子山西省重点实验室 太原 030051

<sup>3</sup> 北京宝得瑞健康产业有限公司 北京 100000)

**摘要** 目的:以沙棘籽粕为原料,采用超高压前处理、超声波提取工艺制备低聚原花青素并进行结构分析和抗氧化性能测定。方法:通过单因素实验和响应面试验优化沙棘籽粕低聚原花青素制备工艺,采用红外光谱和超高效液相色谱-电喷雾-质谱分析其结构,并以 DPPH、ABTS、FRAP 法测定其抗氧化性。结果:最优工艺参数为料液比 1:15(g/mL)、超声时间 28 min、温度 45 ℃、体系 pH 2.85,沙棘籽粕原花青素得率为 6.556%,平均聚合度为 3.35,主要为二聚体、三聚体原花青素及部分黄酮类物质,二聚体包括 3 类 B 型二聚体和 1 类 A 型二聚体。低聚沙棘籽粕原花青素显示出良好的抗氧化活性,其 DPPH、ABTS、FRAP 值分别为 2.205、1.307 和 0.8143 mmol Trolox/g DW。结论:低聚沙棘籽粕原花青素有较强抗氧化性,其结构与葡萄籽粕原花青素存在差异。

**关键词** 沙棘籽粕;原花青素;抗氧化活性;超高效液相色谱-电喷雾-质谱(UPLC-ESI-MS)

**文章编号** 1009-7848(2023)06-0232-14 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.06.024

沙棘(*Hippophae rhamnoides* Linn.)是胡颓子科沙棘属多年生落叶灌木或小乔木,中国的沙棘属植物具有丰富的资源蕴藏量和多样性<sup>[1]</sup>。沙棘由果肉(68%)、种子(23%)和皮(7.75%)组成<sup>[2-3]</sup>,其中含有超过 190 种活性成分和营养物质,包括维生素类、黄酮类、多酚类、萜类、原花青素等<sup>[3]</sup>。研究表明,沙棘籽提取物中含有丰富的原花青素,已分离鉴定出原花青素的 4 种单体和 8 种二聚体,单体分别为儿茶素、表儿茶素、没食儿茶素和表没食儿茶素<sup>[4-5]</sup>。

原花青素(Procyanidins, PC)由儿茶素、表儿茶素等黄烷三醇单体通过 C4-C8 或 C4-C6 键甚至 C2-O-C7 连接而成,按聚合度分,聚合度 2~4 为低聚原花青素(Oligomeric Proanthocyanidins, OPC),聚合度  $\geq 5$  为高聚原花青素(Polymeric Proanthocyanidins, PPC)<sup>[6-10]</sup>。研究表明,原花青素具有抗氧化、清除自由基、抑菌消炎、抗辐射、神经保护作用、改善牙本质胶原、抑制癌细胞增殖与凋亡等功效<sup>[11-16]</sup>。从植物中提取的原花青素以高聚体为主。高聚体原花青素水溶性较差,可能是大的空

间位阻限制了酚羟基的活性,导致难以被人体吸收利用,只能作为低附加值产品进行利用。聚合度较低的 OPC 水溶性较好,已被报道具有抗氧化、抗菌消炎、抗癌、皮肤保健等作用,其抗氧化能力明显强于 VE 和 VC<sup>[17-18]</sup>。近年来 OPC 在保健食品和化妆品中得到广泛关注。

目前,国内外对葡萄籽原花青素的研究较多,主要集中在提取工艺、生理活性及高聚体降解方面。对高聚体的降解方法主要酸催化<sup>[19]</sup>、碱催化<sup>[20-21]</sup>、催化加氢<sup>[22]</sup>、酶法等。葡萄籽原花青素(Grape Seed Proanthocyanidins, GSPs)由儿茶素(Catechin, C)、表儿茶素(Epicatechin, EC)和表儿茶素没食子酸酯(Epicatechin gallate, ECG)3 种组成<sup>[19]</sup>。而沙棘原花青素(Sea Buckthorn Proanthocyanidins, SBPC)由儿茶素、表儿茶素、没食儿茶素(Gallocatechin, GC)和表没食儿茶素(Epigallocatechin, EGC)构成<sup>[4-5]</sup>。由于两者中前两种单体结构一致,因此导致 SBPC 与 GSPs 的抗氧化性、提高免疫力、保护心血管等生物活性是相近的。SBPC 中 GC 和 EGC 两种单体在 B 环上有 3 个连续的羟基,造成 SBPC 与 GSPs 的差异,这种特殊的结构特征直接影响 SBPC 的某些功效,如 SBPC 在抗氧化方面有突出优势。目前关于沙棘籽粕低聚原花青素制备、结构和抗氧化性的报道较

收稿日期:2022-06-09

基金项目:山西省重点研发计划项目(201903D221068)

第一作者:郭建峰,男,博士,副教授

通信作者:王芳 E-mail: wangfang136@126.com

少。

我国的沙棘属资源丰富,每年有高达数十吨的沙棘籽被浪费。为此,研究沙棘籽的精细加工、利用具有重要的现实意义。本文采用超高压前处理沙棘籽,超声提取低聚原花青素,通过 IR 和 U-PLC-ESI-MS 分析沙棘籽粕原花青素含量,旨在为沙棘籽的精细开发与利用提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与设备

1.1.1 材料与试剂 沙棘籽粕:沙棘籽通过超临界萃取沙棘籽油后,在通风处晾干或冷冻干燥制成,粉碎过 20~100 目筛。

GA、C、EC、ECG、EGCG、二聚体 B2 等标准品,上海安谱实验科技股份有限公司(HPLC $\geq$ 99%);6-羟基-2,5,7,8-四甲基色烷-2-羧酸(6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, Trolox)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl hydrate, DPPH)、2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS)、2,4,6-三(2-吡啶基)-1,3,5-三嗪(2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine, TPTZ),上海麦克林生化科技有限公司(HPLC $\geq$ 99%);香草醛等相关试剂均采购于国药集团化学试剂有限公司(AR $\geq$ 99%);试验用水为蒸馏水。

1.1.2 仪器设备 SB-3200DTS 超声波双频机,宁波新芝生物科技有限公司;ReadMax1900 型光吸收全波长酶标仪,上海闪谱生物科技有限公司;Ultimate 3000 UHPLC-Q Exactive 液质联用仪,Thermo Scientific,US。

### 1.2 试验方法

1.2.1 沙棘籽原花青素的制备工艺 首先,沙棘籽粕按(1:10~1:30)料液比加入 70%乙醇在 600 MPa 下超高压前处理 20 min,接着调整体系的 pH(2.00~5.00)在超声温度(30~50 $^{\circ}$ C)下 180 W 超声反应 10~50 min,重复提取 3 次,4 000 r/min 离心 20 min,合并滤液后,减压浓缩,得到浓缩液 A。

浓缩液 A 采用大孔树脂 AB-8(2.5 cm $\times$ 60 cm)1 BV/h 上样,吸附完全后,以 2 BV/h 的流速利用蒸馏水除去部分多糖和蛋白质,再利用 30%~70%乙醇进行解吸。收集 30%~70%乙醇洗脱液于 28 $^{\circ}$ C 减压浓缩后,得浓缩液 B,浓缩液 B 冷冻干燥后得到沙棘籽粕低聚原花青素提取物。以原花青素提取率、平均聚合度(mDP)为指标,考察各因素对原花青素效果的影响。

1.2.2 响应面优化工艺 结合单因素试验,以 A(料液比)、B(超声时间)、C(超声温度)、D(体系 pH)进行 4 因素 3 水平的响应面法优化,以沙棘籽粕原花青素的提取率、平均聚合度(mDP)为响应值,根据 Box-Behnken 原理,运用 Design-Expert.V 12 软件进行试验优化。

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 $\cdot$ mL $^{-1}$ )	B(超声时间/min)	C(超声温度/ $^{\circ}$ C)	D(体系 pH 值)
-1	1:10	20	40	2.0
0	1:15	30	45	2.5
1	1:20	40	50	3.0

### 1.2.3 平均聚合度的测定

1.2.3.1 原花青素含量的测定 参考文献[23]采用香草醛-盐酸法。取 1 mL 不同浓度的儿茶素(0~1 mg/mL)加入 2.5 mL 1.5%香草醛-甲醇溶液和 2.5 mL 30%盐酸-甲醇溶液,混合均匀,(30 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C 暗反应 15 min,于 500 nm 测吸光度,绘制标准曲线  $y=0.3113x+0.0793$ , $R^2=0.9936$ 。取 1 mL 稀释的

提取液,按上述步骤操作。按公式计算原花青素的提取率( $\rho$ ):

$$\rho(\%) = \frac{m}{M} \times 100 \quad (1)$$

式中: $\rho$ ——原花青素的提取率,%; $m$ ——冻干得到提取物的质量,g; $M$ ——原料的质量,g。

1.2.3.2 物质的量的测定 参考文献[23-24]采用

改良香草醛-盐酸法。取 1 mL 不同浓度的儿茶素标准溶液(0~4 mol/mL)加入 2.5 mL 1.5%香草醛-乙酸溶液和 2.5 mL 4%盐酸-乙酸溶液,充分摇匀,(30±1)℃暗反应 15 min,在 500 nm 测吸光度,绘制标准曲线  $y=0.2287x+0.0951$ ,  $R^2=0.9987$ 。取 1 mL 稀释的提取液,按上述步骤操作。

原花青素平均聚合度(mDP)的计算:

$$\text{mDP}=\frac{m}{(M \times n)} \quad (2)$$

式中: $m$ ——原花青素质量含量,  $\mu\text{g}$ ;  $M$ ——儿茶素相对分子质量, 290;  $n$ ——原花青素物质的量,  $\mu\text{mol}$ 。

1.2.4 红外光谱分析 利用 K-Br 方法<sup>[25-26]</sup>检测冻干沙棘籽粕的低聚原花青素提取物的红外光谱,扫描范围 4 000~500  $\text{cm}^{-1}$ 。

### 1.2.5 UPLC-ESI-MS 分析

1.2.5.1 色谱条件 色谱柱(Eclipse Plus  $\text{C}_{18}$  100 mm×4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ );柱温:30  $^{\circ}\text{C}$ ;进样量:5.0  $\mu\text{L}$ ;流速:0.5 mL/min;流动相:A:0.1%甲酸;B:乙腈。洗脱程序:0~12 min, 95%~65% A;12~18 min, 65%~5% A;18~23 min, 5% A;23~24 min, 5%~95% A;24~30 min, 95% A。

1.2.5.2 质谱条件 离子源:HESI;翹气速率:30 mL/min;辅助气速率:10 mL/min;喷雾电压:负离子 3.2 kV;毛细管温度 320  $^{\circ}\text{C}$ ;辅助气温度 300  $^{\circ}\text{C}$ ;S-lens:50%;碰撞电压:NCE: 30;扫描范围  $m/z$  200~3 000。

## 1.3 体外抗氧化活性的测定

1.3.1 DPPH 清除自由基能力的测定 参照文献[27-28],略作修改。取 0.0079 g DPPH 溶于 10 mL 无水乙醇,配置成 200  $\mu\text{mol/L}$  的母液,使用前用无水乙醇稀释为 60  $\mu\text{mol/L}$  的 DPPH 工作液。在 96 孔板中,加入 100  $\mu\text{L}$  不同浓度的 Trolox 溶液(0~1 mmol/mL)和 100  $\mu\text{L}$  DPPH 工作液,室温下暗反应 30 min,于 517 nm 测定吸光度。以 DPPH 自由基清除率为纵坐标,以 Trolox 的浓度为横坐标,绘制标准曲线  $y=1.565x+0.2009$ ,  $R^2=0.9957$ 。取 100  $\mu\text{L}$  稀释后提取液,按上述步骤测定。清除率按公式(3)计算:

$$\text{清除率}(\%)=\left[1-\frac{A_1-A_2}{A_0}\right] \times 100 \quad (3)$$

式中: $A_0$ ——无水乙醇+DPPH 的吸光度; $A_1$ ——样品+DPPH 的吸光度; $A_2$ ——样品+无水乙醇的吸光度。

1.3.2 ABTS 清除自由基能力的测定 参照文献[29],略作修改。取 5 mL 14 mmol/L 的 ABTS 溶液和 5 mL 4.9 mmol/L 的  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ,混合均匀,室温暗反应 12~16 h,得到 ABTS 工作液。将 ABTS 工作液使用前用无水乙醇稀释至  $A_{734\text{nm}}=0.700 \pm 0.02$ 。取 20  $\mu\text{L}$  不同浓度的 Trolox 溶液(0~1 mmol/mL)加入到 180  $\mu\text{L}$  ABTS 稀释液中,室温暗反应 10 min,于 734 nm 处测定吸光值。以 ABTS 自由基清除率为纵坐标,以 Trolox 的浓度为横坐标,绘制标准曲线方程  $y=0.0035x+0.13$ ,  $R^2=0.9913$ 。取 20  $\mu\text{L}$  稀释后提取液,按上述步骤操作。

1.3.3  $\text{Fe}^{3+}$ 还原能力测定(Ferric ion reducing antioxidant power, FRAP) 参考文献[29-30],略有修改。取 pH 3.60 300 mmol/L 醋酸盐缓冲液、10 mmol/L TPTZ 溶液和 20 mmol/L  $\text{FeCl}_3$  按 10:1:1 比例混匀,37  $^{\circ}\text{C}$ 暗反应 10 min 得 FRAP 工作液。在 96 孔板中,加入 20  $\mu\text{L}$  不同浓度的 Trolox(0~1 mmol/mL)和 180  $\mu\text{L}$  FRAP 工作液,振荡混匀,37  $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min,于 593 nm 处测定吸光度。以还原产物吸光度为纵坐标, Trolox 的浓度为横坐标,绘制标准曲线方程  $y=1.6309x+0.0963$ ,  $R^2=0.9944$ 。取 20  $\mu\text{L}$  稀释后提取液,按上述步骤操作。

## 2 结果与讨论

### 2.1 单因素实验结果

2.1.1 料液比对低聚原花青素提取的影响 图 1a 为料液比对原花青素的影响。随着料液比的增加, mDP 呈现先减小后增大的趋势。当料液比为 1:15 时, mDP 达到最小值,此时沙棘籽粕中原花青素的提取率达到最大值。而随着料液比的增大,体现出负作用即其 mDP 逐渐增大;这将会增加溶剂成本,同时杂质溶出量增加不利于后续精制提纯。

2.1.2 超声时间对低聚原花青素提取的影响 超声波加速提取天然产物中有效成分的理论依据是其机械作用、空化作用及热效应;其中空化和机械作用可使沙棘籽中有效成分快速溶出,热效应则使溶液内部温度升高;这些作用可加速细胞壁的破坏,同时避免温度过高造成原花青素的含量降

低<sup>[31-32]</sup>。

图 1b 为超声时间对原花青素的影响。随着超声时间的增加, mDP 呈现逐渐减小而提取率逐渐增大的趋势, 这可能是由于超声波时间增加使得溶质和溶剂间的热效应增强, 沙棘籽粕与溶剂中原花青素的浓度差逐渐缩小, 还可能是在酸性条件下长时间的温度作用使得原花青素的结构发生变化所致。

2.1.3 超声温度对低聚原花青素提取的影响 图 1c 为超声温度对原花青素的影响。当提取温度低于 45 °C 时, 沙棘籽原花青素的提取率随着超声温度增加呈增加趋势, 而 mDP 随着温度增加而逐渐减小, 温度升高有利于分子间运动如渗透、溶解等, 沙棘籽中有效成分加速溶出使其转移至溶剂

中<sup>[31]</sup>。但原花青素属于热不稳定物质, 当温度过高, 原花青素的提取率开始降低, 同时还会造成其他热稳定的杂质溶出。

2.1.4 体系 pH 值对低聚原花青素提取的影响 图 1d 为体系 pH 值对原花青素的影响。随着体系 pH 值的降低, mDP 呈现骤然减小的趋势, 这可能是由于在整个体系中添加酸性催化剂, 体系中 pH 值发生变化, 这种酸性环境更利于原花青素的解聚与提取, 使得原花青素的提取率随体系 pH 值降低而增加。而当体系 pH 值达到 4.0 左右时, 虽然环境处于酸性状态, 但已无法提供原花青素解聚所需的环境, 因此造成了 mDP 骤然增大的现象即 mDP>4 为 PPC。

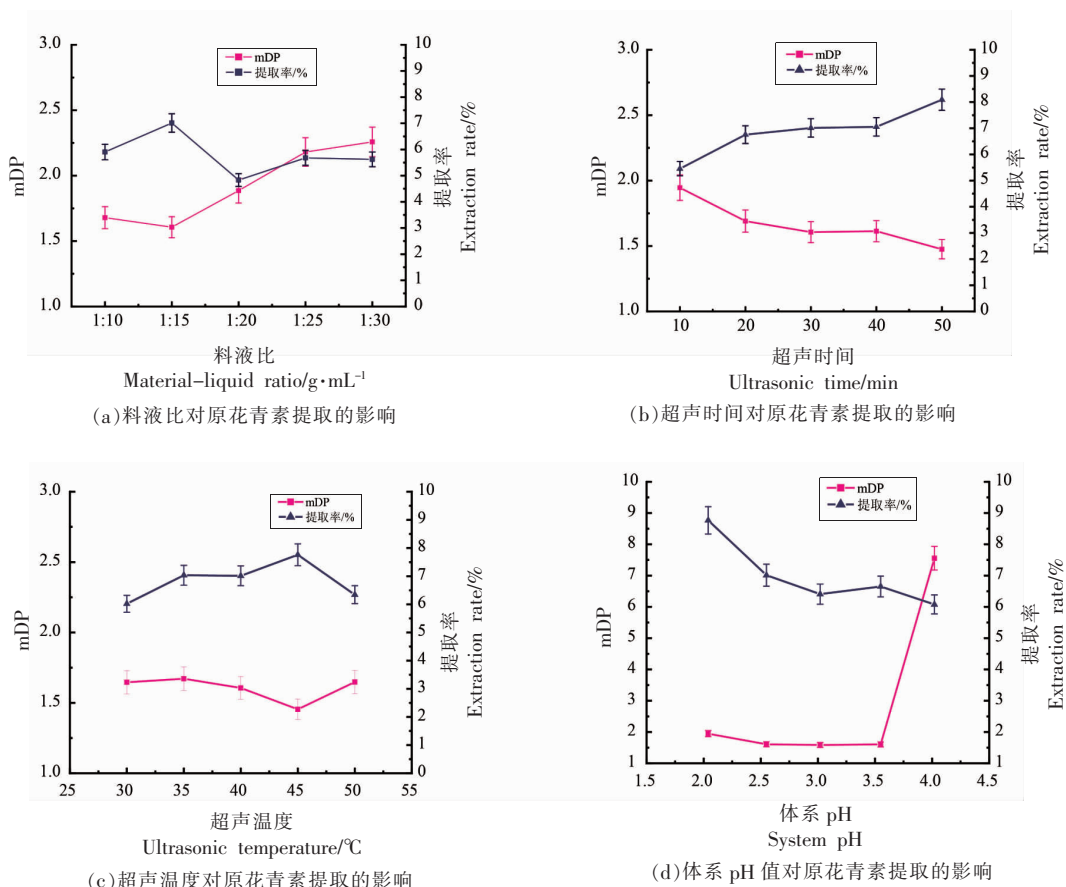


图 1 不同因素对原花青素提取率的影响

Fig.1 The effect of different factors on the extraction rate of proanthocyanidins

## 2.2 响应面优化提取工艺

2.2.1 响应面优化结果 响应面法优化方案及结果如表 2 所示。

2.2.2 回归方程与方差分析 采用 Design-Expert 12 软件对响应值和各因素进行回归拟合, 以沙棘籽粕原花青素提取率 ( $Y_1$ )、mDP ( $Y_2$ ) 为响应值, 得

到各因子的二次回归拟合方程为：

$$Y_1 = 3.81 - 0.7525A - 0.5875B - 0.1008C - 0.2425D + 0.81AB + 0.5525AC - 0.2225AD + 0.24BC - 0.2325BD - 0.6025CD + 0.2530A^2 + 0.6955B^2 + 0.7555C^2 + 0.9855D^2$$

$$Y_2 = 2.12 - 0.1704A - 0.0564B + 0.0273C - 0.0964D + 0.0351AB + 0.1058AC + 0.4840AD + 0.4773BC + 0.0922BD - 0.9585CD + 0.3086A^2 + 0.2646B^2 + 0.3518C^2 + 0.4695D^2$$

表2 试验设计与结果

Table 2 Experimental design and results

序号	A	B	C	D	提取率/%	mDP	序号	A	B	C	D	提取率/%	mDP
1	0	-1	0	1	6.10	2.561	16	-1	0	1	0	4.68	2.970
2	0	1	0	-1	5.98	2.924	17	1	0	0	1	3.62	3.317
3	1	0	-1	0	4.48	2.341	18	0	0	-1	-1	4.75	2.034
4	0	0	0	0	4.03	2.103	19	0	0	1	1	4.59	1.860
5	0	0	0	0	3.83	1.951	20	0	-1	0	-1	6.48	3.161
6	0	0	1	-1	6.01	3.899	21	0	-1	1	0	5.94	2.385
7	0	0	0	0	3.96	2.148	22	0	0	0	0	3.27	2.161
8	0	0	0	0	3.98	2.226	23	0	1	0	1	4.67	2.694
9	-1	1	0	0	4.08	2.805	24	0	1	0	0	4.05	2.231
10	0	1	1	0	4.63	3.042	25	0	0	-1	1	5.74	3.723
11	1	-1	0	0	3.26	2.439	26	1	0	1	0	4.83	2.806
12	1	0	0	-1	4.46	2.284	27	-1	-1	0	0	6.47	2.864
13	-1	0	-1	0	6.55	2.928	28	-1	0	0	1	6.03	2.642
14	1	1	0	0	4.11	2.521	29	0	-1	-1	0	6.32	3.483
15	-1	0	0	-1	5.98	3.545							

表3 方差分析表

Table 3 Analysis of variance table

方差来源	提取率/%		mDP	
	F值	P值	F值	P值
模型	7.63	0.0003	23.95	< 0.0001
A	26.43	0.0002	14.54	0.0019
B	16.11	0.0013	1.59	0.2277
C	0.4745	0.5022	0.1707	0.6857
D	2.74	0.1198	3.84	0.0704
AB	10.21	0.0065	0.2053	0.6574
AC	4.79	0.0460	1.87	0.1932
AD	0.7701	0.3950	39.08	< 0.0001
BC	0.8960	0.3599	38.02	< 0.0001
BD	0.8409	0.3747	1.42	0.2535
CD	5.65	0.0323	144.93	< 0.0001
A <sup>2</sup>	1.61	0.2246	26.52	0.0001
B <sup>2</sup>	12.20	0.0036	19.58	0.0006
C <sup>2</sup>	14.40	0.0020	31.83	< 0.0001
D <sup>2</sup>	24.50	0.0002	57.42	< 0.0001
失拟项	3.28	0.1320	2.74	0.1721
R <sup>2</sup>		0.8841		0.9599

注：P>0.05 为差异不显著；P<0.05 为差异显著；P<0.01 为差异极显著。

由表 3 可知,得率( $Y_1$ ) $P=0.0003<0.01$  表示该模型显著,在这种情况下, $A$ 、 $B$ 、 $AB$ 、 $AC$ 、 $CD$ 、 $B^2$ 、 $C^2$ 、 $D^2$  是重要的模型项;其  $R^2=0.8841$  说明 88.41% 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;各因素对沙棘籽原花青素提取率的影响:料液比>超声时间>溶剂 pH 值>超声温度。

mDP( $Y_2$ ) $P<0.0001$  表示该模型显著,在这种情况下, $A$ 、 $AD$ 、 $BC$ 、 $CD$ 、 $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$ 、 $D^2$  是重要的模

型项;其  $R^2=0.9599$  说明 95.99% 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;各因素对 mDP 的影响:料液比>体系 pH 值>超声时间>超声温度。

2.2.3 各因素间对原花青素平均聚合度的交互作用 采用 Design-Expert 12 软件对料液比、超声时间、超声温度、体系 pH 值之间交互作用的关系进行分析,结果如图 2 所示。

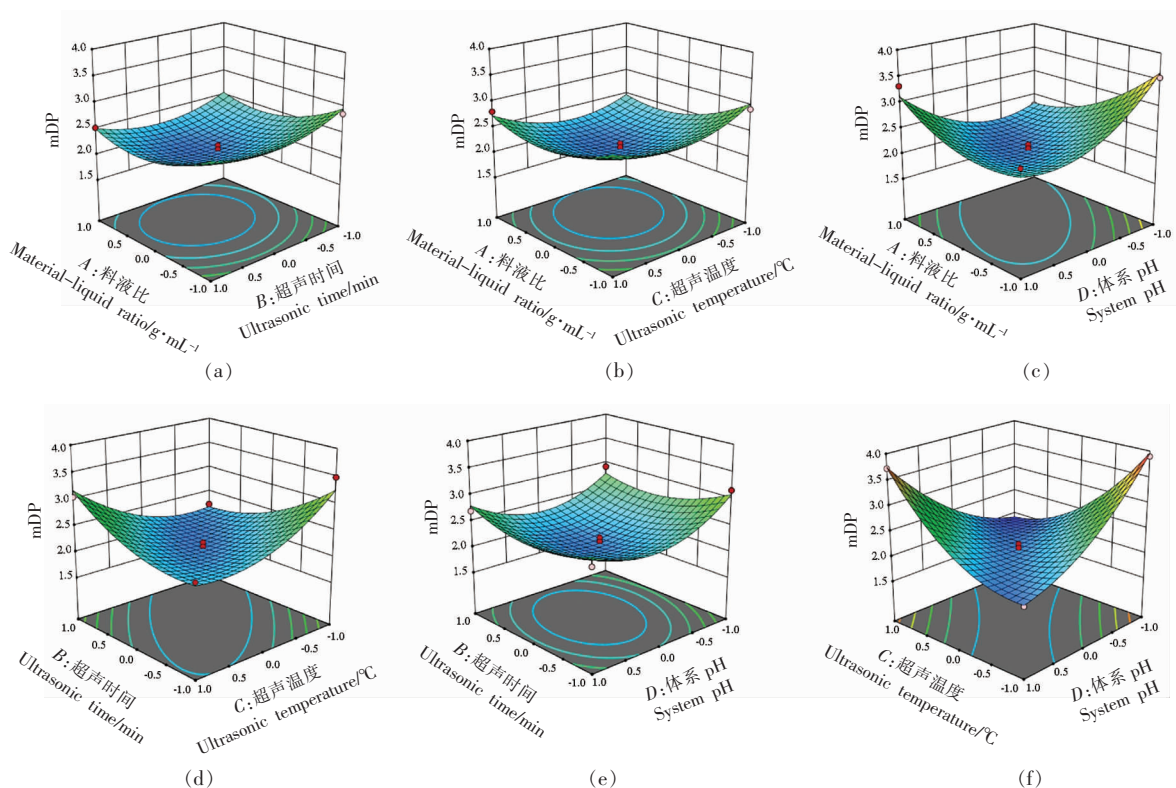


图 2 各因素对原花青素平均聚合度的交互作用

Fig.2 The interaction of various factors on the average degree of polymerization of proanthocyanidins

从图 2 可看出,料液比与超声时间、超声温度、溶剂 pH 值的 3D 图走势较陡峭,等高线密集且呈椭圆形,说明两两变量之间交互作用较强。同理,超声温度、体系 pH 值与超声时间的交互作用也较强。而图 2f 中,超声时间与体系 pH 值的 3D 图走势陡峭,等高线密集但未呈现椭圆形,说明这两者之间的交互作用较弱。由图 2 的响应面图及  $F$  值可知两因素对原花青素平均聚合度影响大小依次为: $CD>AD>BC>AC>BD>AB$ 。

2.2.4 最佳工艺条件的预测和验证 经过 De-

sign-Expert 12 对数据进行处理,分析得本研究的最佳工艺为:料液比 1:13.89 (g/mL)、超声时间 27.89 min、超声温度 42.67 °C、体系 pH 2.63。在这种条件下模型预测沙棘籽粕原花青素提取率为 6.741%、mDP 为 3.260。

考虑实际情况,对上述条件最佳工艺进行修正:料液比 1:15 (g/mL)、超声时间 28 min、超声温度 45 °C、体系 pH 2.50。在此条件下进行 3 次验证试验,沙棘籽粕原花青素平均聚合度为 3.35<4,即为 OPC,RSD 为 1.69%,表明试验结果与模型拟合

良好,说明本工艺条件可行、可靠。

### 2.3 沙棘籽粕原花青素的红外光谱分析

图3中吸收峰均发生在原花青素母核的C6-C3-C6结构上,3405  $\text{cm}^{-1}$ 为-OH伸缩振动,2926  $\text{cm}^{-1}$ 为C-H伸缩振动,1722  $\text{cm}^{-1}$ 为C=O伸缩振动,1615  $\text{cm}^{-1}$ 和1452  $\text{cm}^{-1}$ 均为苯环的C=C伸缩振动,1347  $\text{cm}^{-1}$ 为苯环的C-H弯曲振动,1203  $\text{cm}^{-1}$ 、1065  $\text{cm}^{-1}$ 可能为C环的C-O-C伸缩振动,837  $\text{cm}^{-1}$ 则是由于2,3,4位存在羟基取代形成。最后,626  $\text{cm}^{-1}$ 是C-H的面外伸缩振动。

根据文献报道,原花青素的特征骨架在1650~1000  $\text{cm}^{-1}$ 和850~700  $\text{cm}^{-1}$ 区域,850~700  $\text{cm}^{-1}$ 的吸收峰收数目直接取决于B环上羟基的数量,同时以C(EC)为主的原花青素在780~770  $\text{cm}^{-1}$ 吸收峰明显,以GC(EGC)为主的原花青素则在730  $\text{cm}^{-1}$ 左右有强吸收峰<sup>[33-34]</sup>。纯化物的红外光谱在725  $\text{cm}^{-1}$ 有1个吸收峰,表明本研究的纯化物以GC(EGC)为主,C(EC)次之。这也说明了沙棘籽粕原花青素与葡萄籽原花青素结构上的区别<sup>[33]</sup>。

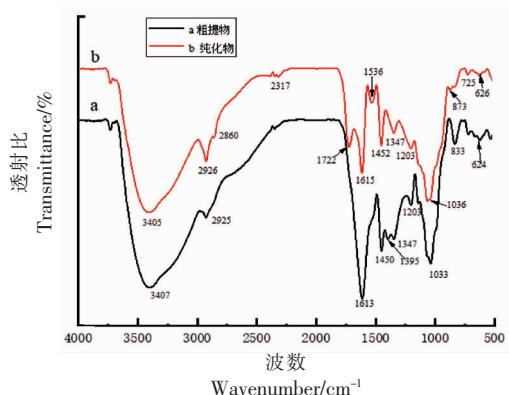


图3 沙棘籽原花青素的红外光谱

Fig.3 Infrared spectrum of sea buckthorn seeds proanthocyanidins

### 2.4 UPLC-ESI-MS 分析

沙棘籽粕原花青素成分复杂,根据国内外相关研究,选择合适的分子离子峰进行二级质谱分析,鉴定出6种单体、三类二聚体、三聚体,UPLC-ESI-MS分析结果见表4。

单体:C与EC互为同分异构体,两者分子离子峰 $[M-H]^-$   $m/z$ 均为289,并且二级质谱的碎片

峰信息中均有明显的  $m/z$  245,203,179,125,说明两者二级质谱裂解规律一致,即  $m/z$  245为 $[M-H]^-$ 失去1分子 $\text{CO}_2$ , $m/z$  203为 $[M-H]^-$ 失去两分子 $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}$ , $m/z$  179为 $[M-H]^-$ 失去1分子 $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$ , $m/z$  125为A环中1,4位置开环裂解。根据文献<sup>[4,35-36]</sup>推断保留时间1.95 min为C,8.24 min为EC。

同理,GC与EGC互为同分异构体,两者分子离子峰 $[M-H]^-$   $m/z$ 均为305,并且两者二级质谱裂解规律一致,即  $m/z$  219为 $[M-H]^-$ 失去两分子 $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}$ , $m/z$  179为 $[M-H]^-$ 失去1分子 $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$ , $m/z$  125为A环中1,4位置开环裂解。因此,推断5.58 min为GC,6.84 min为EGC<sup>[4,36]</sup>。

ECG由 $[M-H]^-$   $m/z$  441和二级质谱碎片峰  $m/z$  423,289,245,233,179,125等信息,推测其裂解规律为  $m/z$  423为失去1分子 $\text{H}_2\text{O}$ , $m/z$  289为失去没食子酸酯部分, $m/z$  245,179,125与儿茶素的二级质谱裂解规律一致,对比文献<sup>[37]</sup>,推测4.83 min为ECG。

EGCG由 $[M-H]^-$   $m/z$  457和二级质谱碎片峰  $m/z$  305,179,177,153,125等信息,推测保留时间3.79 min为EGCG<sup>[38]</sup>。其二级质谱裂解规律为  $m/z$  305为 $[M-H]^-$ 失去没食子酸酯,接着失去两分子 $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}$ 为  $m/z$  245,进一步失去1分子 $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$ 为  $m/z$  179,而  $m/z$  125为A环中1,4位置开环裂解。

通过与文献<sup>[35-38]</sup>结果比对,及分析原花青素的成键与裂解方式<sup>[39-40]</sup>,本研究中共鉴定4类不同构成的二聚体,包括3类B型二聚体、一类A型二聚体:

第1类 $[M-H]^-$   $m/z$ 为577,是由两个C(EC)构成的二聚体,其二级质谱信息中  $m/z$  407为二聚体先经RDA重排在失去1分子 $\text{H}_2\text{O}$ 得到; $m/z$  289为二聚体失去1分子单体得到, $m/z$  179,125与C(EC)的裂解规律一致。

第2类 $[M-H]^-$ 为  $m/z$  609,是由2个GC(EGC)构成的二聚体,其二级质谱信息中  $m/z$  423为二聚体先经RDA重排在失去1分子 $\text{H}_2\text{O}$ 得到; $m/z$  305为构成二聚体的连接键断裂形成。而  $m/z$  245,179,125与其单体的裂解规律一致。

第3类 $[M-H]^-$ 为  $m/z$  593,是由1个C(EC)

和 1 个 GC(EGC)构成的二聚体。其二级质谱信息中  $m/z$  407 为二聚体先发生 RDA 重排而得到的,再失去 1 分子  $H_2O$  形成, $m/z$  305 为失去 1 分子 C(EC)形成, $m/z$  289 为失去 1 分子 GC(EGC)形成, $m/z$  125 为构成单体中 A 环的 1,4 位置开环裂解。

第 4 类  $[M-H]^-$  为  $m/z$  575, 由于 A 型二聚体和 B 型二聚体在键的连接方式上存在差异, 即 A 型二聚体不仅含有  $C_4-C_8$  或  $C_4-C_6$  还有  $C_2-O-C_7$  或  $C_2-O-C_5$ , 因此两者在质谱信息中存在显著差异。根据二级质谱信息  $m/z$  423 为  $[M-H]^-$  发生 RDA 重排而得到的, 再失去 1 分子  $H_2O$  就形成  $m/z$  407; 二聚体组成单元之间的连接键断裂,  $m/z$  287 ( $[MT-3H]^-$ ) 为  $C_4$  位置断裂形成,  $m/z$  245  $[M-H]^-$  是失去 1 分子结构单元和 1 分子  $CO_2$  得到。与文献[41]~[45]A 型原花青素结果相似。目前沙棘籽粕中尚未有关于 A 型原花青素的相关报道, 本研究可能是首次鉴定出沙棘籽粕中 A 型二聚体原花青素。这也有可能是本研究工艺导致沙棘籽中高聚原花青素解聚, 形成 A 型原花青素。

三聚体  $C_{45}H_{38}O_{18}$   $m/z$  865: 其二级质谱信息中  $m/z$  407 为  $[M-H]^-$  先发生 RDA 重排再失去 1 分子结构单元形成; 三聚体组成单体之间的键断裂,  $m/z$  289 为 B-unit (base) 形成,  $m/z$  287 为 T-unit

(top)形成, 前者的离子丰度远强于后者, 与 Monagas 等<sup>[46]</sup>结果一致,  $m/z$  245 是  $[M-H]^-$  失去两分子结构单元和 1 分子  $CO_2$  得到,  $m/z$  125 为一个结构单元的 A 环中 1,4 位置开环裂解。由于 A 型原花青素易发生聚合反应,  $m/z$  865 有可能是两分子 A 型二聚体聚合后, 失去 1 个 H 并发生 quinone methide fission (QM) cleavage 分子间断裂 ( $m/z$  减少 290) 产生的<sup>[38,45]</sup>。

从相关质谱信息中得到, PPC ( $mDP \geq 5$ ) 未检出, 因此证明了本研究工艺对制备沙棘籽粕低聚原花青有显著效果。

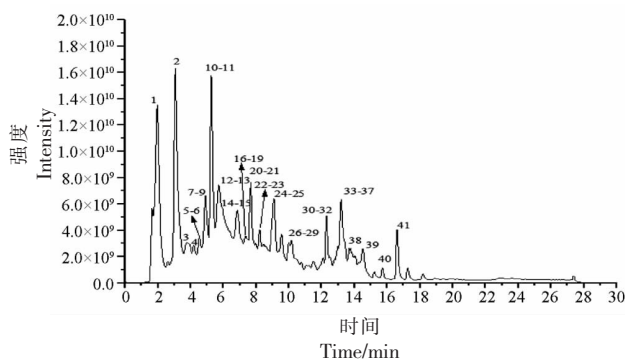


图 4 沙棘籽粕原花青素总离子流图

Fig.4 Seabuckthorn seed meal proanthocyanidin total ion chromatogram

表 4 沙棘籽粕原花青素主要质谱数据及辨析

Table 4 Main mass spectrum data and analysis of seabuckthorn seed meal proanthocyanidins

峰号	$t_R/min$	$[M-H]^-/m \cdot z^{-1}$	$MS^2$ 离子/ $m \cdot z^{-1}$	组成单位	化合物
1	1.95	289.07121	245, 203, 179, 137, 125	C	(+)-儿茶素
2	3.72	609.12634	423, 305, 179, 177, 125	(EGC)GC-GC(EGC)	原花青素二聚体
3	3.79	457.07709	305, 179, 177, 153, 125	EGCG	(-)-表没食子儿茶素没食子酸酯
4	3.85	1 087.26517	597, 479, 447, 429, 379, 311, 303, 261, 243, 177, 125	-	黄酮类化合物
5	4.18	783.20587	429, 311, 261, 177, 125	-	毛茛
6	4.54	913.18457	541, 423, 305, 243, 177, 125	contain GC(EGC)	原花青素三聚体
7	4.60	949.16156	541, 423, 305, 303, 261, 243, 177, 125	contain GC(EGC)	原花青素三聚体
8-9	4.89	609.12481	423, 305, 177, 125	(EGC)GC-GC(EGC)	原花青素二聚体
10	5.03	865.20319	407, 289, 287, 177, 125	contain C(EC)	原花青素三聚体
11	5.58	305.06702	219, 211, 179, 167, 165, 125	GC	(-)-没食子儿茶素
12	5.77	913.18494	559, 541, 423, 305, 243, 177	contain GC(EGC)	原花青素三聚体
13	5.87	441.08328	423, 283, 229, 197, 179, 125	ECG	(-)-表儿茶素没食子酸酯



(续表 4)

峰号	$t_R/\text{min}$	$[M-H]^-/m \cdot z^{-1}$	$MS^2$ 离子/ $m \cdot z^{-1}$	组成单位	化合物
14	6.83	575.23533	423, 407, 394, 287, 271, 245, 137, 125	-	原花青素 A 型二聚体
15	6.84	305.06696	219, 211, 179, 167, 165, 139, 137, 125	EGC	(-)-表没食子儿茶素
16	6.9	593.13086	407, 305, 289, 245, 177, 125	(EC)C-GC(EGC)	原花青素二聚体
17	7.10	457.07855	245, 177, 153, 125	EGCG	表没食子儿茶素没食子酸酯
18	7.11	577.13647	407, 289, 245, 161, 137, 125	(EC)C-C(EC)	原花青素二聚体
19	7.16	865.20233	407, 289, 287, 245, 161, 125		原花青素三聚体
20	7.33	289.07121	245, 203, 179, 137, 125	C	(+)-儿茶素
21	7.69	755.20459	609, 430, 285, 283	-	山奈酚-3-O-槐-7-O-鼠李糖苷
22	7.71	577	407, 289, 245, 125	(EC)C-C(EC)	原花青素二聚体
23	8.18	289.07199	245, 205, 179, 137, 125	EC	(-)-表儿茶素
24	8.21	865.20123	407, 289, 287, 245, 243, 177, 161, 125	contain C(EC)	原花青素三聚体
25	9.01	961.26349	609, 430, 285	-	黄酮类化合物
26	9.08	997.24048	815, 609, 430, 285, 284	-	原花青素三聚体
27	10.07	623.16302	315, 314	-	黄酮类化合物
28	10.09	921.30609	755, 430, 285	-	黄酮类化合物
29	10.85	575.11895	423, 407, 394, 287, 271, 245, 137, 125	-	原花青素 A 型二聚体
30	12.01	921.30627	609, 596, 285, 283	-	黄酮类化合物
31	12.03	957.28271	609, 596, 429, 285, 283	-	黄酮类化合物
32	12.37	921.30469	609, 596, 429, 285	-	黄酮类化合物
33	12.9	1 281.61377	1073, 912, 893, 749	-	原花青素四聚体
34	12.94	905.31049	593, 285, 283	-	黄酮类化合物
35	12.96	461.10928	315, 289, 287	-	黄酮类化合物
36	13.18	301.09067	178, 151, 121	-	槲皮素
37	13.21	1 127.36194	815, 609, 596, 429, 284	-	黄酮类化合物
38	13.78	1 087.40515	775, 609, 596, 429, 285	-	黄酮类化合物
39	14.42	315.05139	300, 283, 128	-	异鼠李素
40	15.73	597.19855	285, 283	-	-
41	16.6	311.22252	293, 275, 235, 223, 87	-	-

## 2.5 抗氧化活性评价

以 Trolox 标准品为对照, 结果用 Trolox 的当量( $\mu\text{mol Trolox/g DW}$ )表示, 考察料液比、超声时间、超声温度和体系 pH 值对抗氧化活性的影响, 结果如图 4 所示。

当超声时间、超声温度、体系 pH 值一定, 沙棘籽粕原花青素对 DPPH、ABTS、FRAP 的抗氧化活性随着料液比的增加逐渐降低, 这可能是料液比

影响有效成分的溶出, 导致部分杂质的溶出量增大。同理, 超声时间、超声温度、体系 pH 值这 3 个因素对 DPPH、ABTS、FRAP 的活性均为正相关, 这表明上述 3 个因素有利于沙棘籽粕原花青素的制取, 并很好地提升了原花青素的生物活性。

目前, 有研究表明原花青素中单体 ECG 的抗氧化活性高于其它单体, 且二聚体的抗氧化活性高于单体, 随着聚合度的增加抗氧化性逐渐减

弱<sup>[47-48]</sup>。本研究通过对比可以判断出低聚体含量较高的原花青素的抗氧化能力较强,造成差异较明显,这可能由于原花青素的聚合度不同导致其基

本单元的构成不同,还与其分子量、空间位阻等因素不同有关<sup>[49-50]</sup>。

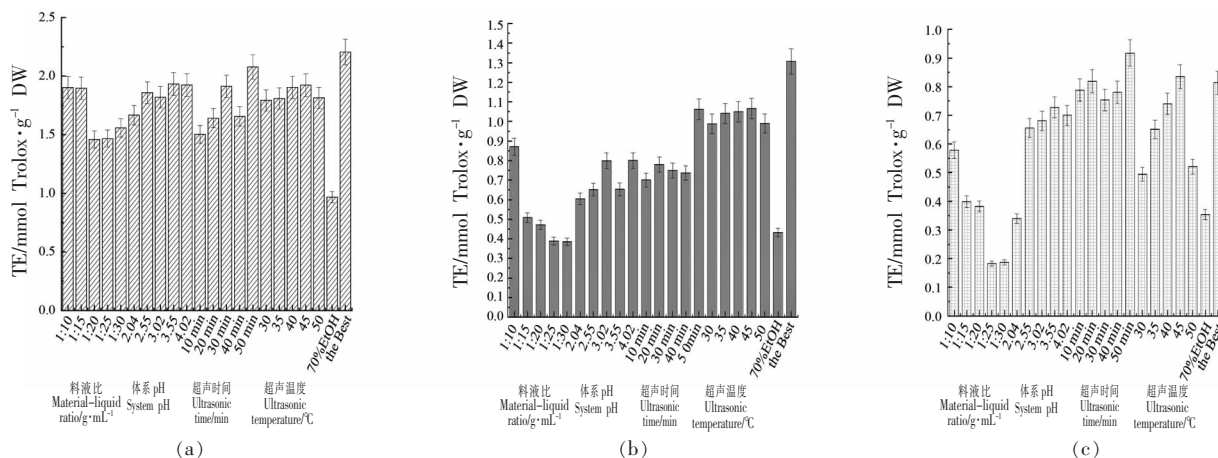


图 5 不同处理对(a)DPPH、(b)ABTS、(c)FRAP 抗氧化活性的影响

Fig.5 The effect of different treatments on (a) DPPH, (b) ABTS, (c) FRAP antioxidant activity

### 3 结论

本研究优化了在超声波辅助下,酸性解聚沙棘籽粕原花青素的工艺,其中各因素对 mDP 的影响顺序为:料液比>体系 pH 值>超声时间>超声温度。研究表明,最优工艺为料液比 1:15(g/mL)、超声时间 28 min、超声温度 45 °C、体系 pH 2.85 时,沙棘籽粕原花青素提取率达到 6.556%,mDP 为 3.35,其抗氧化性为 DPPH 2.205 mmol Trolox/g DW,ABTS 1.307 mmol Trolox/g DW,FRAP 0.8143 mmol Trolox/g DW。本研究中所利用的方法很大程度上提高了沙棘籽粕中原花青素得率和抗氧化活性,同时具有操作简单、提速快、耗能低、提取率高等优点,可为沙棘籽的精细加工利用提供依据,为沙棘籽原花青素的合理开发提供理论依据。

### 参 考 文 献

- [1] 卢顺光, 卢健, 温秀凤. 沙棘植物资源分布与营养学应用综述[J]. 中国水土保持, 2019(7): 45-49.  
LU S G, LU J, WEN X F. Summary of distribution of seabuckthorn plant resources and application of nutrition[J]. Soil and Water Conservation in China, 2019(7): 45-49.
- [2] YANG B, KALLIO H P. Fatty Acid Composition of

- Lipids in Sea Buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) Berries of Different Origins[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2001, 49(4): 1939-1947.
- [3] MBAL L T, MEDA V, NAIK S N, et al. Sea buckthorn berries: A potential source of valuable nutrients for nutraceuticals and cosmeceuticals [J]. Food Research International, 2011, 44(7): 1718-1727.
- [4] 樊金玲, 罗磊, 要萍, 等. 沙棘籽原花色素组成和结构的研究[J]. 食品科学, 2008, 21(1): 244-249.  
FAN J L, LUO L, YAO P, et al. Study on composition and structure of proanthocyanidins from sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) seeds[J]. Food Science, 2008, 21(1): 244-249.
- [5] 刘朵花, 李伟, 吴伸. 沙棘和葡萄籽中原花青素的对比研究[J]. 沙棘, 2002, 3(24): 63-65.  
LIU D H, LI W, WU S. Comparative study of proanthocyanins in sea buckthorn and grape seeds[J]. Hippophae, 2002, 3(24): 63-65.
- [6] NUNES M A, PIMENTEL F, COSTA ASG, et al. Cardioprotective properties of grape seed proanthocyanidins: An update[J]. Trends in Food Science & Technology, 2016, 57(Pt.A): 31-39.
- [7] ROBBINS R J, LEONCZAK J, LI J, et al. Determination of flavanol and procyanidin (by degree of polymerization 1-10) content of chocolate, cocoa liquors, powder (s), and cocoa flavanol extracts by

- normal phase high-performance liquid chromatography: collaborative study[J]. *Journal of AOAC International*, 2012, 95(4): 1153-1160.
- [8] RÖSCH D, MÜGGE C, FOGLIANO V, et al. Antioxidant oligomeric proanthocyanidins from sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) Pomace[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52(22): 6712-6718.
- [9] MARI A, ELETTO D, PIZZA C, et al. Integrated mass spectrometry approach to profile proanthocyanidins occurring in food supplements: Analysis of *Potentilla erecta* L. rhizomes[J]. *Food Chemistry*, 2013, 141(4): 4171-4178.
- [10] LIM H, HA J. Biosynthetic pathway of proanthocyanidins in major cash crops[J]. *Plants*, 2021, 10(9): 1792-1792.
- [11] LI X, LIU J L, CHANG Q X, et al. Antioxidant and antidiabetic activity of proanthocyanidins from fagopyrum dibotrys [J]. *Molecules*, 2021, 26(9): 2417.
- [12] AJIT A, VISHNU A G, VARKEY P. Incorporation of grape seed extract towards wound care product development[J]. *3 Biotech*, 2021, 11: 261-271.
- [13] QI Y, CHEN S L, LU Y K, et al. Grape seed proanthocyanidin extract ameliorates ionizing radiation-induced hematopoietic stem progenitor cell injury by regulating Foxo1 in mice[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2021, 174(8): 144-156.
- [14] ABDU H M, ABD E H A, ELGENDY A H, et al. Neurotoxicity and neuroinflammatory effects of bisphenol A in male rats: the neuroprotective role of grape seed proanthocyanidins [J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2022, 29(6): 9257-9268.
- [15] REIS M, ZHOU B, ALANIA Y, et al. Unveiling structure-activity relationships of proanthocyanidins with dentin collagen [J]. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials*, 2021, 37(11): 1633-1644.
- [16] ZHENG W C, FENG Y J, BAI Y J, et al. Proanthocyanidins extracted from grape seeds inhibit the growth of hepatocellular carcinoma cells and induce apoptosis through the MAPK/Akt pathway[J]. *Food Bioscience*, 2022, 45: 101337.
- [17] WOOD J E, SENTHILMOHAN S T, PESKIN A V. Antioxidant activity of procyanidin-containing plant extracts at different pHs[J]. *Food Chemistry*, 2002, 77(2): 155-161.
- [18] 辛立波, 李晓波, 於洪建, 等. 葡萄籽低聚原花青素化学成分及抗氧化研究[J]. *食品研究与开发*, 2012, 33(8): 40-43.
- XIN L B, LI X B, YU H J, et al. Isolation, Purification and antioxidant activities of oligomeric proanthocyanidins in grape seeds[J]. *Food Research and Development*, 2012, 33(8): 40-43.
- [19] LUO L X, CUI Y, CHENG J H, et al. An approach for degradation of grape seed and skin proanthocyanidin polymers into oligomers by sulphurous acid[J]. *Food Chemistry*, 2018, 256(aug. 1): 203-211.
- [20] 张杰, 王文雅, 袁其朋. NaOH处理对霞多丽葡萄籽原花青素的影响[J]. *食品科学*, 2020, 41(4): 41-51.
- ZHANG J, WANG W Y, YUAN Q P. Effect of NaOH pretreatment on depolymerization and in vitro antioxidant activity of Chardonnay grape seed procyanidins[J]. *Food Science*, 2020, 41(4): 41-51.
- [21] WHITE B L, HOWARD L R, PRIOR R L. Release of bound procyanidins from cranberry pomace by alkaline hydrolysis[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(13): 7572-7579.
- [22] LIN Q, CAO Q L, HUO Q. Study on degradation process of procyanidins[J]. *Asian Journal of Chemistry*, 2014, 26(19): 6665-6668.
- [23] 李春阳, 许时婴, 王璋. 香草醛-盐酸法测定葡萄籽、梗中原花青素含量的研究[J]. *食品科学*, 2004, 25(2): 157-161.
- LI C Y, XU S Y, WANG Z. Vanillin-HCl assay for the proanthocyanidins content of grape seed and stem[J]. *Food Science*, 2004, 25(2): 157-161.
- [24] 魏冠红, 魏作君, 苏宝根, 等. 测定原花青素平均聚合度的一种新方法[J]. *中国食品学报*, 2006, 6(6): 112-116.
- WEI G H, WEI Z J, SU B G. A new method for determination of the average degree of polymerization (DP) of proanthocyanidins[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2006, 6(6): 112-116.
- [25] 赵晓辉, 聂志鑫, 张连水, 等. 茶叶及其组份的红外光谱研究[J]. *光学学报*, 2009, 29(2): 533-536.
- ZHAO X H, NIE Z C, ZHANG L S, et al. Study on tea and its principal components by infrared

- spectroscopy[J]. *Acta Optica Sinica*, 2009, 29(2): 533-536.
- [26] 刘磊, 李科, 郝霞, 等. 黄芪药渣中阿拉伯木聚糖 (AX-I-1) 的提取纯化、结构分析及体外抗氧化作用[J]. *高等学校化学学报*, 2016, 37(12): 2168-2175.
- LIU L, LI K, HAO X, et al. Extraction, separation, structural analysis and antioxidant activity in vitro of arabinoxylans (AX-I-1) from the residue of astragalus root[J]. *Chemical Research In Chinese Universities*, 2016, 37(12): 2168-2175.
- [27] TAS N, EMINE, ÖTLES, et al. The optimization of solid-liquid extraction of polyphenols from olive stone by response surface methodology[J]. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2019, 13(2): 1497-1507.
- [28] XU C M, YAGIZ Y, BOREJSZA-WYSOCKI W, et al. Enzyme release of phenolics from muscadine grape (*Vitis rotundifolia Michx*) skins and seeds[J]. *Food Chemistry*, 2014, 157(4): 20-29.
- [29] OLDONI T L, MELO P S, MASSARIOLI A P, et al. Bioassay-guided isolation of proanthocyanidins with antioxidant activity from peanut (*Arachis hypogaea*) skin by combination of chromatography techniques[J]. *Food Chemistry*, 2016, 192(1): 306-312.
- [30] XIA Q, WANG L P, XU C C, et al. Effects of germination and high hydrostatic pressure processing on mineral elements, amino acids and antioxidants in vitro, bioaccessibility, as well as starch digestibility in brown rice (*Oryza sativa L.*) [J]. *Food Chemistry*, 2017, 214(1): 533-542.
- [31] 李瑞丽, 张珂婕, 赵琪, 等. 响应面法优化超声辅助浸提葡萄籽原花青素[J]. *食品研究与开发*, 2021, 42(15): 53-60.
- LI R L, ZHANG D J, ZHAO Q, et al. Optimization of ultrasonic assisted extraction of procyanidins from grape seeds based on response surface method [J]. *Food Research and Development*, 2021, 42(15): 53-60.
- [32] MUÑOZ-LABRADOR A, PRODANOV M, VIL-LAMIEL M. Effects of high intensity ultrasound on disaggregation of a macromolecular procyanidin-rich fraction from *Vitis vinifera L.* seed extract and evaluation of its antioxidant activity[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2018, 50: 74-81.
- [33] 李春阳, 许时婴, 王璋. 葡萄籽原花青素结构单元的红外光谱分析[J]. *食品与生物技术学报*, 2005, 24(4): 47-51.
- LI C Y, XU S Y, WANG Z. The Analysis of the infrared spectra of grape seed proanthocyanidins[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2005, 24(4): 47-51.
- [34] FOO L Y. Proanthocyanidins: Gross chemical structures by infrared spectra[J]. *Phytochemistry*, 1981, 20(6): 1397-1402.
- [35] 刘国强, 董静, 王弘, 等. 4种儿茶素类化合物电喷雾质谱裂解规律的研究[J]. *高等学校化学学报*, 2009, 30(8): 1566-1570.
- LIU G Q, DONG J, WANG H, et al. ESI fragmentation studies of four tea catechins[J]. *Chemical Research in Chinese Universities*, 2009, 30(8): 1566-1570.
- [36] 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 W H, BAI H Y, WANG L Y, 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.
- [37] 李春阳, 张红城, 王乃富, 等. 葡萄籽原花青素的纯化与结构研究[J]. *食品科学*, 2009, 30(23): 218-223.
- LI C Y, ZHANG H C, WANG N F, et al. Purification and structural characterization of proanthocyanidin from grape seed[J]. *Food Science*, 2009, 30(23): 218-223.
- [38] 陈洋, 王冰, 玉佳男, 等. RP-HPLC-ESI-MS/MS分离鉴定花生红衣原花青素A型和B型二聚体[J]. *食品科学*, 2013, 34(23): 142-146.
- CHEN Y, WANG B, YU J N, et al. Separation and identification of A-type and B-type dimers of procyanidins from peanut skin by RP-HPLC-ESI-MS/MS[J]. *Food Science*, 2013, 34(23): 142-146.
- [39] PRIOR R L, LAZARUA S A, CAO G H, et al. Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium spp.*) using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49(3): 1270-1276.
- [40] FRIEDRICH W, ELBERHARDT A, GALENSA R.

- Investigation of proanthocyanidins by HPLC with electrospray ionization mass spectrometry[J]. *European Food Research and Technology* volume, 2000, 211(1): 56–64.
- [41] MIRANDA –HERNÁNDEZADIANA A M, MUÑIZ –MÁRQUEZBJORGE D B, WONG –PAZ J E, et al. Characterization by HPLC –ESI –MS2 of native and oxidized procyanidins from litchi (*Litchi chinensis*) pericarp[J]. *Food Chemistry*, 2019, 291(11): 129–131.
- [42] LI S Y, XIAO J, CHEN L, et al. Identification of A –series oligomeric procyanidins from pericarp of Litchi chinensis by FT –ICR –MS and LC –MS[J]. *Food Chemistry*, 2012, 135(1): 31–38.
- [43] HSN C Y, LIN G M, LIN H Y, et al. Characteristics of proanthocyanidins in leaves of *Chamaecyparis obtusa* var. *formosana* as strong  $\alpha$  –glucosidase inhibitors[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2018, 98(10): 3806–3814.
- [44] 赵莉, 卢凯, 王小红, 等. 花生红衣中原花青素 A1 的分离鉴定及其对丙烯酰胺的抑制效果[J]. *食品科学*, 2018, 39(20): 1–6.
- ZHAO L, LU K, WANG X H, et al. Isolation and Identification of Procyanidin A1 from peanut skins and its inhibitory effect on the formation of acrylamide[J]. *Food Science*, 2018, 39(20): 1–6.
- [45] KOERNER J L, HSU V L, LEE J, et al. Determination of proanthocyanidin A2 content in phenolic polymer isolates by reversed –phase high –performance liquid chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216(9): 1403–1409.
- [46] MONAGAS M, GÓMEZ –CORDOVÉS C, BARTOLOMÉ B, et al. Monomeric, oligomeric, and polymeric flavan –3 –ol composition of wines and grapes from *Vitis vinifera* L. Cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51(22): 6475–6481.
- [47] ZHANG S T, CUI Y, LI L X, et al. Preparative HSCCC isolation of phloroglucinolysis products from grape seed polymeric proanthocyanidins as new powerful antioxidants [J]. *Food Chemistry*, 2015, 188(1): 422–429.
- [48] CAILLET S, COTE J, DOYON G, et al. Antioxidant and antiradical properties of cranberry juice and extracts[J]. *Food Research International*, 2011, 44(5): 1408–1413.
- [49] LUO L X, BAI R F, ZHAO Y Q, et al. Protective effect of grape seed procyanidins against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> –induced oxidative stress in PC –12 neuroblastoma cells: Structure –activity relationships[J]. *Journal of Food Science*, 2018, 83(10/11/12): 2622–2628.
- [50] IVANA K, DANIJELA M, NADA N, et al. Total polyphenols from *Solanum retroflexum* Dun. fruit: extraction and optimization by response surface methodology [J]. *Journal of Food Measurement and Characterization* volume, 2018, 12(3): 1772–1778.

### Preparation of Oligomeric Proanthocyanidins from Seabuckthorn Seed Meal and Analysis of Structure and Antioxidant Activity

Guo Jianfeng<sup>1,2</sup>, Qie Haoran<sup>1</sup>, Hu Peiyi<sup>1</sup>, Liu Zichao<sup>1</sup>, Tan Zhichao<sup>3</sup>, Wang Fang<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>College of Chemical Engineering and Technology, North University of China, Taiyuan 030051

<sup>2</sup>Shanxi Provincial Key Laboratory for Chinese Lujiu Plant Extraction and Health, Taiyuan 030051

<sup>3</sup>Beijing Baoderui Health Industry Co., Ltd., Beijing 100000

**Abstract** Objective: To prepare oligoprocyandins from Seabuckthorn seed meal by ultra–high pressure pretreatment and ultrasonic extraction, and analyze its structure and antioxidant properties. Box–Behnken adopted to optimize the preparation process of oligoprocyandins from seabuckthorn seed meal. Infrared Spectroscopy (IR) and Ultra performance liquid chromatography–mass (UPLC–ES–MS) spectrometry were used to analyzed the structure and the antioxidant activity was determined by DPPH, ABTS and FRAP. Result: The optimal process parameters were 1:15 (g/mL) material–to–liquid ratio, ultrasonic time 28 min, ultrasonic temperature 45 °C, solvent pH 2.85, the sea buckthorn seed meal proanthocyani-

din yield was 6.556%, and the average degree of polymerization was 3.35, which mainly composed of dimer, trimer proanthocyanidins and some flavonoids. The dimers include three B-type dimers and one A-type dimer. The Sea buckthorn meal oligoprocyanidins showed good antioxidant activity, with DPPH, ABTS and FRAP values of 2.205, 1.307 and 0.8143 mmol Trolox/g DW, respectively. Conclusion: oligoprocyanidins from seabuckthorn seed meal have strong antioxidant activity, and are structurally distinct from proanthocyanidins from grape seed meal.

**Keywords** sea buckthorn seed meal; proanthocyanidins; antioxidant activity; ultra performance liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry (UPLC-ESI-MS)