

夏海梅, 张娅, 王莉, 等. 青刺尖总黄酮提取、分离纯化工艺优化[J]. 山西农业科学, 2025, 53(1): 173-180.

XIA H M, ZHANG Y, WANG L, et al. Optimization extraction, separation and purification technology of total flavonoids from *Prinsepia utilis* royle[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2025, 53(1): 173-180.

doi:10.3969/j.issn.1002-2481.2025.01.20

青刺尖总黄酮提取、分离纯化工艺优化

夏海梅, 张 娅, 王 莉, 饶晓尧, 陆中云, 宋娜丽, 蒲亚萍

(云南省中医中药研究院, 云南 昆明 650223)

摘 要: 青刺尖是滇西北特色生物资源, 其含有黄酮类成分, 但提取率、纯度均较低。为高效提取、纯化青刺尖总黄酮, 以青刺尖总黄酮提取率为考察指标, 利用正交设计优化超声波辅助提取法提取青刺尖总黄酮的工艺参数, 筛选纯化青刺尖总黄酮的理想树脂及纯化条件; 然后采用大孔树脂联合聚酰胺柱色谱法进一步纯化, 并计算青刺尖总黄酮纯度。结果表明, 超声波辅助提取法提取青刺尖总黄酮的最佳工艺为: 乙醇为 60%、料液比 1:60 g/mL、提取时间 70 min, 该条件下青刺尖总黄酮提取率为 7.97%。其中, 各因素对青刺尖总黄酮提取率的影响由大到小依次为乙醇体积分数 > 料液比 > 提取时间。分离纯化青刺尖总黄酮的理想树脂为 HPD-500 树脂, 通过绘制静态吸附/解吸曲线获得静态吸附饱和时间为 240 min, 静态解吸平衡时间为 120 min。最佳纯化工艺参数为: 上样液 pH 值为 4, 上样液质量浓度为 1.30 mg/mL, 洗脱剂用量为 4 BV, 洗脱液为 60% 的乙醇; 该条件下纯化青刺尖总黄酮, 纯度为 33.19%。大孔树脂联合聚酰胺纯化获得的青刺尖总黄酮纯度为 62.48%, 较大孔树脂纯化后纯度增加 29.29%, 较纯化前纯度增加 54.51%。

关键词: 青刺尖; 总黄酮; 超声波辅助提取法; 大孔树脂联合聚酰胺柱色谱法; 分离纯化

中图分类号: R284.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2481(2025)01-0173-08

Optimization Extraction, Separation and Purification Technology of Total Flavonoids from *Prinsepia utilis* Royle

XIA Haimei, ZHANG Ya, WANG Li, RAO Xiaoyao, LU Zhongyun, SONG Nali, PU Yaping

(Yunnan Academy of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650223, China)

Abstract: *Prinsepia utilis* Royle is a characteristic biological resource in northwest Yunnan province, *Prinsepia utilis* Royle contains flavonoids, but the extraction rate and purity were low, and the research is limited. In order to extract and purify total flavonoids from *Prinsepia utilis* Royle efficiently, in this study, the extraction rate of *Prinsepia utilis* Royle total flavonoids was used as the evaluation index, and orthogonal design was used to optimize the extraction parameters of *Prinsepia utilis* Royle total flavonoids by ultrasonic assistance, the ideal resin and purification conditions for purifying *Prinsepia utilis* Royle total flavonoids were selected, the total flavonoids of *Prinsepia utilis* Royle were further purified by large-pore resin combined with polyamide column chromatography, and the purity of *Prinsepia utilis* Royle total flavonoids was calculated. The results showed that the optimal extraction method for *Prinsepia utilis* Royle total flavonoids by ultrasonic assistance was as follows: ethanol volume fraction of 60%, solids-to-liquid ratio of 1:60 g/mL, and extraction time of 70 min. Under these conditions, the extraction rate of *Prinsepia utilis* Royle total flavonoids was 7.97%. The factors that had the greatest impact on the extraction rate of *Prinsepia utilis* Royle total flavonoids in order of importance were ethanol volume fraction > solids-to-liquid ratio > extraction time. The ideal resin for separating and purifying *Prinsepia utilis* Royle total flavonoids was HPD-500 resin. By drawing static adsorption/desorption curves, the static adsorption saturation time was obtained and was 240 min, and the static desorption equilibrium time was 120 min. The optimal purification process parameters were as follows: pH of the feed solution was 4, feed solution concentration was 1.30 mg/mL, eluent volume was 4 BV, eluent was 60% of ethanol. Under these conditions, the purity of *Prinsepia utilis* Royle total flavonoids was 33.19%. After purification by large-pore resin

收稿日期: 2024-05-26

基金项目: 云南省科技厅中医联合专项面上项目(202301AZ070001-112; 202101AZ070001-185)

作者简介: 夏海梅, 中药师, 硕士, 主要从事中药、民族药理研究, E-mail: 1146883033@qq.com

combined with polyamide, the purity of *Prinsepia utilis* Royle total flavonoids was 62.48%, with an increase of 29.29% over the purification by large-pore resin and an increase of 54.51% over the raw material before purification.

Keywords: *Prinsepia utilis* Royle; total flavone; ultrasonic assisted extraction method; large-pore resin combined with polyamide column chromatography; separation and purification

青刺尖(*Prinsepia utilis* Royle)是蔷薇科扁核木属扁核木当年生的嫩芽及叶经干燥后制得,始载于《滇南本草》^[1],具有性散寒、味苦的特点。主要分布在云南、贵州、四川、西藏等地,其中,丽江地区资源丰富,多野生,被视为“吉祥树”、“百花王”。扁核木种植林可用于治理水土流失,保护生态,茎叶用于茶饮、酱菜等。《云南中草药》、《云南天然药物图鉴》、《中药大辞典》中记载,扁核木的根、茎、叶、果实均可入药,《中国纳西东巴医药学》用其嫩尖水煎茶饮治牙痛、贫血^[2],《云南民族药志》纳西族称 Seelddaqqgudder 四搭鼓逗、阿纳斯,嫩尖水煎服治牙痛^[3]。

蔷薇科扁核木属植物主要含三萜类、黄酮类及木脂素类成分^[4]。已有研究发现,黄酮类化合物具有抗氧化^[5]、降血脂^[6]、减重降脂等多种活性。沙棘果皮渣中总黄酮纯化物可有效抑制胰脂肪酶的活性^[7]。土茯苓总黄酮可显著降低小鼠 3T3-L1 脂肪细胞中脂滴大小和游离脂肪酸水平^[8]。狗枣猕猴桃叶总黄酮可显著降低高脂饮食组大鼠体质量,改善肝脏脂肪变性,防止肝脏脂肪沉积^[9]。高粱米糠黄酮提取物可促进脂肪的分解和调节能量代谢,达到对 C57BL/6 小鼠的降脂、降糖作用^[10]。高良姜总黄酮对营养性肥胖合并高脂血症大鼠有显著的减肥降脂作用^[11]。青刺果总黄酮可显著抑制胰脂肪酶、 α -葡萄糖苷酶活性,经肠道消化后对 2 种消化酶同样具有较强抑制作用^[12]。青刺尖含 13 种黄酮类及苷类^[13],而且已有研究发现,青刺尖可有效抑制肥胖小鼠体质量增长,改善脂肪细胞肥大,减少脂肪沉积,减肥机制可能与调节 *TGH*、*C5L2*、*Leptin*、*DGAT*、*HSL*、*ATGL*、*PPAR_γ* 表达有关^[14]。基于文献报道及前期研究结果,推测青刺尖总黄酮是青刺尖减肥的效应物质,但前期研究受试药物为粗提液、纯度低等影响,药物利用度不高。目前,纯化精制青刺尖总黄酮成为深入研究青刺尖调控减肥机制的限制因素。

本研究采用正交设计优化超声波辅助提取青刺尖总黄酮,并通过优化工艺参数,筛选大孔树脂分离纯化条件和大孔树脂联合聚酰胺树脂进一步

纯化,进而获得了较高纯度的青刺尖总黄酮,为深入研究青刺尖药效机制提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

青刺尖购自丽江仁者寿生物科技有限公司,磨碎备用。95%乙醇购自云南雅云科技有限公司,AB-8、HPD-500、D101 大孔吸附树脂和 0.075 0~0.150 mm 聚酰胺购自北京索莱宝科技有限公司,芦丁(含量 $\geq 98\%$)购自上海源叶生物科技有限公司。

1.2 仪器设备

TU1900 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),751 石英比色皿(宜兴市中科工业玻璃有限公司),HY-5 回旋振荡器(国华电器有限公司),恒温水浴锅(力辰科技),UPH-IV-20T 纯水机(云南优普科技有限公司),四氟活塞玻璃层析柱(上海垒固仪器有限公司),容量瓶(天津天玻玻璃仪器有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 制作标准曲线 称取芦丁标准品 10.100 mg,加 60%乙醇稀释得 0.404 mg/mL 的标准品溶液。吸取标准品溶液 0、0.3、0.6、0.9、1.2、1.5、1.8、2.1、2.4、2.7 mL 于 10 mL 的试管中,分别加入 5% NaNO_2 溶液 0.3 mL,振摇,放置 6 min,加入 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液 0.4 mL,摇匀,放置 6 min,加 4% NaOH 溶液 4 mL,加纯净水至 10 mL,紫外分光光度法测定吸光度(A),并制作标准曲线。

1.3.2 单因素试验 称取预处理的青刺尖粉末 2.0 g 置于 250 mL 锥形瓶,固定提取功率 100 W,温度 50 °C,设置不同乙醇体积分数 30%、40%、50%、60%、70%,不同提取时间 30、50、70、90、110 min,不同料液比 1:30、1:40、1:50、1:60、1:70 g/mL。其他条件不变,超声波辅助提取法提取 1 次,减压抽滤,60 °C 旋转蒸发仪浓缩,70 °C 水浴烘干,60%乙醇溶解,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液定容至 50 mL,取 0.7 mL 溶液于 506 nm 处测定吸光度。

1.3.3 正交试验与验证 根据单因素试验结果,正交设计优化超声波辅助提取法提取青刺尖总黄

酮的最佳提取条件(表1)。根据正交试验得出最佳工艺参数,并重复试验3次,验证最佳工艺。

表1 正交试验的因素与水平

Tab.1 Factors and levels used in orthogonal test design

水平 Level	乙醇体积分数(A)/% Ethanol volume fraction(A)	料液比(B)/(g/mL) Solids-to-liquid ratio(B)	提取时间(C)/min Extraction time(C)
1	50	1:40	70
2	60	1:50	90
3	70	1:60	110

1.3.4 大孔树脂的筛选 准确称取经预处理的AB-8、D101、HPD-500树脂2.0 g放入磨口具塞锥形瓶中,加入经最佳工艺提取所得青刺尖总黄酮溶液17.5 mL,恒温振荡器振荡吸附24 h,过滤,3 000 r/min离心10 min,取上清液测定吸光度,计算吸附量 Q (mg/g)、吸附率 E (%)。蒸馏水清洗树脂,加入60%乙醇溶液继续振荡12 h,过滤测定吸光度,计算解吸量 Qd (mg/g)、解吸率 D (%)。

$$Q = V_1(C_0 - C_1)/M \quad (1)$$

$$E = ((C_0 - C_1)/C_0) \times 100\% \quad (2)$$

$$Qd = (C_2 \times V_2)/M \quad (3)$$

$$D = Qd/Q \times 100\% \quad (4)$$

式中, V_1 为溶液体积(mL); V_2 为解吸液体积(mL); C_0 为溶液中青刺尖总黄酮的初始浓度(mg/mL); C_1 为吸附平衡后青刺尖总黄酮浓度(mg/mL); C_2 为解吸液中青刺尖总黄酮浓度(mg/mL); M 为树脂质量(g)。

1.3.5 大孔树脂静态吸附与解吸动力学试验 称取经预处理的HPD-500树脂2.0 g,加入0.57 mg/mL的青刺尖总黄酮提取液35 mL,室温下150 r振荡6 h,每间隔30 min取样1 mL测定吸光度,计算吸附率并绘制静态吸附曲线。分离树脂,蒸馏水清洗3~4次,加入35 mL的60%乙醇,振荡4 h,每间隔30 min取样1 mL测定吸光度,计算解吸率,制作静态解吸曲线。

准确称取5份经预处理的HPD-500树脂2.0 g,分别加入pH值为3、4、5、6、7的0.44 mg/ml青刺尖总黄酮提取液20 mL,(用0.1%的HCl和NaOH调节pH值),室温下150 r振荡2 h,取样1 mL测定吸光度,计算吸附量和吸附率,筛选HPD-500树脂吸附青刺尖总黄酮的最佳pH值。

1.3.6 大孔树脂动态吸附及洗脱条件的确定 称取预处理的HPD-500树脂10.0 g,湿法装柱,上样

体积为1 BV,pH值为4,控制流速2 BV/h,改变上样液浓度分别为0.8、1.1、1.3、1.6、1.9 mg/mL,洗脱剂用量分别1、2、3、4、5 BV,洗脱液浓度分别为50%、60%、70%、80%、90%,测定吸光度,筛选确定吸附及洗脱条件。

称取预处理的HPD-500树脂10.0 g,湿法装柱,加入pH值为4的1.3 mg/mL青刺尖总黄酮1 BV,流速2 BV/h,吸附饱和。依次以4 BV蒸馏水、60%乙醇洗脱,收集洗脱液($V=4$ BV),测定总黄酮浓度,干燥后称质量,计算洗脱液中固形物质量,计算总黄酮纯度。重复3次。

$$\text{纯度} = (C \times V)/M_1 \quad (5)$$

式中, C 为样液中青刺尖总黄酮浓度(mg/mL), V 为样液体积(mL), M_1 为固形物干质量(mg)

1.3.7 聚酰胺树脂纯化 称取经预处理的聚酰胺10.0 g,HPD-500纯化后的青刺尖总黄酮固形物,溶于60%乙醇,拌入树脂,水浴挥去溶剂,将吸附饱和的聚酰胺树脂装柱,分别以4 BV蒸馏水、60%乙醇洗脱,流速为2 BV/h,收集洗脱液,干燥后称质量,测定总黄酮含量,计算纯度。

1.4 统计分析

方法学验证为3平行测定,所得试验数据采用SPSS 19.0统计软件分析,Exce 2021制作图表, $P < 0.05$ 代表具有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 标准曲线

以芦丁为标准品,按照1.3.1操作后测定吸光度,得回归方程曲线, $A = 11.703C - 0.0025$ (A 为吸光度, C 为芦丁质量浓度, $R^2 = 0.9997$),芦丁质量浓度在0.012 1~0.109 1 mg/mL,线性良好。

2.2 青刺尖总黄酮的分离提取

2.2.1 青刺尖总黄酮提取的单因素试验结果 同

一条件下,改变提取条件(乙醇体积分数、料液比、提取时间),青刺尖总黄酮提取率随之改变。固定提取时间和料液比,随着乙醇体积分数增加,青刺尖总黄酮提取率先升高后下降,其中,60%乙醇提取率最高,为6.38%,乙醇体积分数70%时,提取率稍有下降,提示青刺尖中黄酮类化合物亲水性成分含量较多,乙醇体积分数较低时,提取率随浓度升高而升高,浓度超过60%后,脂溶性成分溶出增加,黄酮类成分溶出减少导致提取率下降;在一

定浓度范围内,不同料液比可以改变系统浓度差,有利于物质溶出。固定乙醇体积分数和提取时间,料液比1:60时,提取率最高,为7.20%;固定乙醇体积分数和料液比,随时间延长提取率不断增加,提取时间为70 min时,提取率最高,为6.78%,70 min以后提取率稍有下降,但无显著性差异,提示70 min时青刺尖总黄酮已提取出来,延长提取时间并不能有效增加青刺尖总黄酮的溶出(图1)。

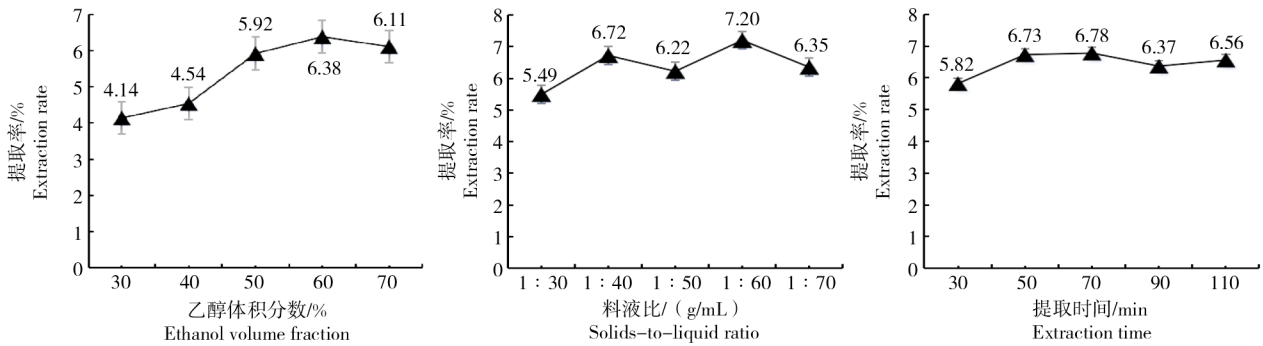


图1 不同提取条件下青刺尖总黄酮提取率

Fig.1 Extraction rate of total flavonoids from *Prinsepia utilis* Royle under different extraction conditions

2.2.2 正交试验及验证 为了进一步验证单因素试验结果,选取乙醇体积分数(%)、料液比(g/mL)、

提取时间(min)进行3因素3水平正交试验,结果见表2、3。

表2 正交试验分析结果

Tab.2 Orthogonal test analysis results

试验号 Test number	A	B	C	误差 Error	提取率/% Extraction rate	试验号 Test number	A	B	C	误差 Error	提取率/% Extraction rate
1	1	1	1	1	6.34	9	3	3	1	2	6.16
2	1	2	3	2	6.34	K ₁	19.11	19.02	19.96	19.93	
3	1	3	2	3	6.43	K ₂	22.14	19.73	19.40	19.53	
4	2	1	2	2	7.04	K ₃	17.73	20.24	19.62	19.52	
5	2	2	1	3	7.46	k ₁	6.37	6.34	6.65	6.64	
6	2	3	3	1	7.65	k ₂	7.38	6.58	6.47	6.51	
7	3	1	3	3	5.64	k ₃	5.91	6.75	6.54	6.51	
8	3	2	2	1	5.93	R	1.47	0.41	0.19	0.14	A>B>C, A ₂ B ₃ C ₁

表3 正交试验结果方差分析

Tab.3 Analysis of variance of orthogonal test results

方差来源 Source of variance	离差平方和 Sum of squares of deviation	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F值 F-number	P值 P-value	显著性 Significance
A	3.409	2.000	1.705	103.447	0.010	*
B	0.250	2.000	0.125	7.595	0.116	0.116
C	0.053	2.000	0.026	1.603	0.384	0.384
误差 Error	0.033	2.000	0.016	1.000		

注:*表示在0.05水平上显著相关(P<0.05)。

Note: * indicated that there was significant correlation at the 0.05 level(P<0.05).

由极差R值可知, $R_A > R_B > R_C$, 各因素对青刺尖总黄酮提取率的影响效力由大到小依次为乙醇体积分数 > 料液比 > 提取时间。显著性分析发现, 乙醇体积分数对提取率具有显著影响且影响最大。综合比较K、k值, 提示在试验 $A_2B_3C_1$ 组合下青刺尖总黄酮的提取率最高, 即60%乙醇、料液比1:60、提取时间70 min条件下青刺尖总黄酮溶出最多。在此条件下重复3次, 青刺尖总黄酮平均提取率为7.97%。

2.3 分离纯化

2.3.1 大孔树脂筛选 比较3种不同物理性能的树脂AB-8、D101、HPD-500对青刺尖总黄酮的吸附及解吸能力, 发现3种树脂对青刺尖总黄酮的吸附能力由大到小依次为AB-8 > HPD-500 > D101, 解吸能力由大到小依次为HPD-500 > D101 > AB-8(表4)。综合考虑, HPD-500大孔树脂为纯化青刺尖总黄酮的最佳树脂。

表4 大孔树脂吸附及解吸能力分析

Tab.4 Analysis of adsorption and desorption of large-pore resin

树脂类型 Resin type	吸附量/(mg/g) Adsorption capacity	吸附率/% Adsorption rate	解吸量/(mg/g) Desorption capacity	解吸率/% Desorption rate
HPD-500	5.21	52.24	1.00	33.63
AB-8	5.46	54.78	0.84	26.79
D101	4.51	45.22	0.90	34.91

2.3.2 树脂静态吸附和解吸曲线能力分析 制作HPD-500对青刺尖总黄酮的静态吸附和解吸曲线后, 发现在30~240 min, 树脂对青刺尖总黄酮的吸附率和吸附量均不断增加, 240 min后趋于平衡, 选择240 min作为树脂吸附平衡时间(图2)。树脂解吸率及解析量分析发现, 30~120 min树脂解吸

效力不断增加, 120 min后变化稍缓, 考虑时间成本, 选择树脂解吸平衡时间120 min(图2)。分析上样液pH值对青刺尖总黄酮吸附效力的影响, 发现pH值为4时, 吸附量和吸附率最大, 因此最佳上样液pH值为4(表5)。

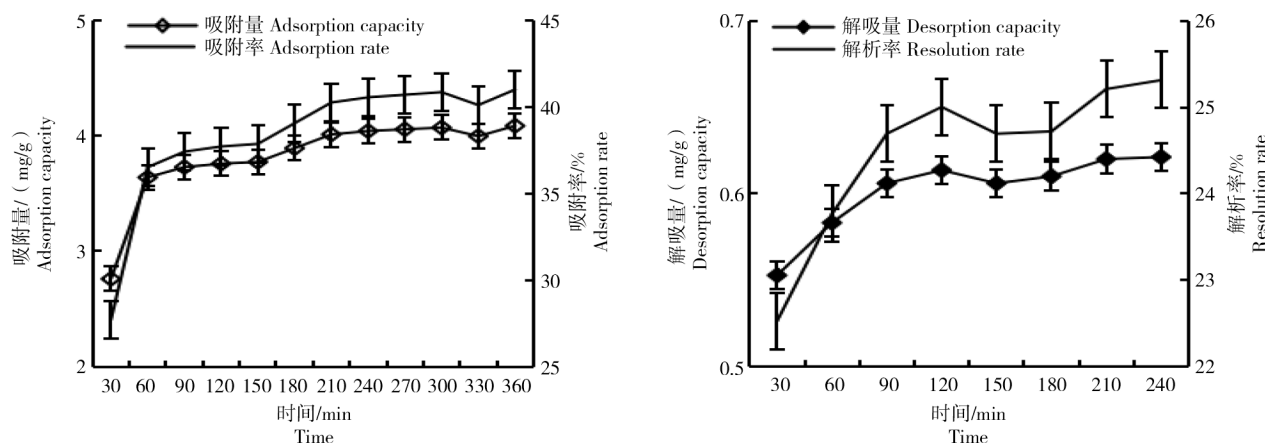


图2 树脂HPD-500的静态吸附和解吸能力分析

Fig.2 Analysis of static adsorption/desorption of HPD-500 resin

表5 上样液pH值对静态吸附的影响

Tab.5 Effect of feed solution PH on static adsorption

编号 Number	pH	吸附量/(mg/g) Adsorption capacity	吸附率/% Adsorption rate	编号 Number	pH	吸附量/(mg/g) Adsorption capacity	吸附率/% Adsorption rate
1	3	1.97	45.74	4	6	1.58	36.34
2	4	2.25	51.32	5	7	1.88	43.09
3	5	1.81	42.24				

2.3.3 上样量和洗脱条件对树脂动态吸附和解吸的影响 分析上样液浓度、洗脱剂用量及洗脱剂浓度对 HPD-500 树脂动态吸附、解吸的影响,发现上样液在浓度 0.88~1.60 mg/mL 范围内时,吸附量不断增大,上样液浓度为 1.60 mg/mL 时,树脂吸附量最大,而吸附率较 1.30 mg/mL 稍有减少。上样液浓度为 1.30 mg/mL 时,树脂吸附率最大(表 6)。因此,综合考虑吸附量和吸附率的影响,选择 1.30 mg/mL 为最佳上样液质量浓度。以 1.30 mg/mL 的青刺尖溶液上样,在 1~4 BV 范围内,解吸量和解吸率不断变小,达到 4 BV 后,解吸量和解吸率变化不显著(表 7),提示解吸趋于饱和,选择 4 BV 为最佳洗脱剂用量。分析不同乙醇体积分数对青刺尖总黄酮解吸能力的影响,发现 50%~90% 范围内,解吸率先增大后减小,60% 乙醇解吸率最大(表 8),综合考虑解吸量和解吸率,选择 60% 乙醇为最佳洗脱剂浓度。

表 6 上样液质量浓度对青刺尖总黄酮吸附效力的影响

Tab.6 Effect of mass concentration of feed solution on the adsorption efficiency of total flavonoids from *Prinsepia utilis* Royle

编号 Number	上样液质量浓度/ (mg/mL) Mass concentration of feed solution	吸附量/ (mg/g) Adsorption ca- pacity	吸附率/% Adsorption rate
1	0.88	1.73	83.36
2	1.10	2.55	81.94
3	1.30	2.69	84.33
4	1.60	3.17	84.06
5	1.90	1.34	84.14

表 7 洗脱剂用量对青刺尖总黄酮洗脱的影响

Tab.7 Effects of the eluent volume on the elution of total flavonoids from *Prinsepia utilis* Royle

编号 Number	样液体积/BV Sample volume	解吸量/(mg/g) Desorption capacity	解吸率/% Desorption rate
1	1	0.35	36.19
2	2	0.36	37.76
3	3	0.17	17.52
4	4	0.10	10.31
5	5	0.12	12.00

2.3.4 大孔树脂纯化后青刺尖总黄酮纯度 选取 HPD-500 树脂在最佳纯化条件下,重复 3 次,按照公式(5)计算纯度,发现经 HPD-500 树脂分离纯化后青刺尖总黄酮的纯度最高,达 33.39%,平均纯

度为 33.19%。

表 8 洗脱剂浓度对青刺尖总黄酮洗脱的影响

Tab.8 Effects of the eluent concentration on the elution of total flavonoids from *Prinsepia utilis* Royle

编号 Num- ber	乙醇体积分数/% Ethanol volume fraction	解吸量/(mg/g) Desorption capacity	解吸率/% Desorption rate
6	50	0.68	52.84
7	60	0.74	55.18
8	70	0.61	47.25
9	80	0.66	49.34
10	90	0.91	35.54

2.3.5 大孔树脂联合聚酰胺树脂纯化后青刺尖总黄酮纯度 取经 HPD-500 树脂纯化后的青刺尖总黄酮(纯度 33.39%)再经聚酰胺树脂纯化,结果提示经大孔树脂-聚酰胺富集纯化,青刺尖总黄酮纯度可达 62.48%,较大孔树脂纯度提高了 29.29% 较纯化前纯度提高了 54.51%(表 9)。

表 9 HPD-500 树脂与聚酰胺纯化后青刺尖总黄酮纯度分析

Tab.9 Analysis of purity c of total flavone from *Prinsepia utilis* Royle after purification by HPD-500 resin and polyamide

纯化状态 Purification state	纯化前 Before purifi- cation	大孔树脂纯化 Large-pore resin purification	聚酰胺纯化 Polyamide purification
纯度/% Purity	7.97	33.19	62.48

3 结论与讨论

提取黄酮类成分的方法有加热回流提取法、超声波辅助提取法、酶解-超声辅助双水相法、超声波辅助溶剂浸提法、索氏回流提取法、微波提取法、萃取等,其中,超声辅助提取法提取效率高,安全便捷,广泛应用于植物黄酮类成分的提取。已有研究发现^[15],研究不同提取方式对陈皮中黄酮类有效成分含量的影响,发现超声辅助提取法提取率高于索氏提取法。超声辅助提取法制备山楂叶黄酮,采用响应面法优化提取工艺,发现乙醇体积分数为 60%、料液比为 1:17 g/mL、提取时间为 110 min、提取温度为 54 °C 时黄酮提取率最高,为 7.53%^[16]。张秀秀等^[17]采用酶液提取法从扁核木叶片中提取总黄酮可达 1.379 mg/g。夏海梅等^[18]研究了 2 种提取方法对青刺尖总黄酮提取率的影响,结果发

现,加热回流提取法提取率高于索氏提取法,正交设计优化最佳提取工艺,加热回流提取法的最佳提取工艺下青刺尖总黄酮提取率为7.30%。本研究采用正交设计优选超声辅助提取工艺,发现乙醇体积分数为60%、料液比为1:60 g/mL、提取温度为50℃、提取时间为70 min时,青刺尖总黄酮提取率为7.97%。本研究在提取1次的条件下青刺尖总黄酮得率较加热回流提取法提取2次提高0.67%,表明超声辅助提取法优于加热回流提取法,后续研究为提高青刺尖总黄酮得率,可适当增加提取次数至2~3次。另外,青刺果与青刺尖来源于同一植物不同部位,已有研究报道^[19],正交设计超声波辅助法提取青刺果总黄酮,得率为5.28%。本研究结果发现,青刺尖总黄酮含量高于青刺果。目前,对青刺果总黄酮的研究多于青刺尖,因此,应更多关注并深入研究青刺尖总黄酮的化学及药理机制。

纯化精制是研究青刺尖中黄酮类物质药效机制的必须手段。纯化黄酮类物质的方法主要包括柱层析法、膜分离法等,其中,大孔树脂柱色谱法选择性好、吸附量大,聚酰胺柱色谱法分离效果较好而且应用较多^[20]。已有研究发现^[21],分离纯化总黄酮的理想树脂为AB-8、HPD-500、HPD-100、HPD-826等,而树脂类型因试验样品而异。AB-8大孔树脂纯化黄酮类化合物的纯度可达31.50%^[22]、61.42%^[23]、85.36%^[24]不等,HPD-500纯化后总黄酮纯度为57.3%^[25],HPD-826大孔树脂与聚酰胺树脂双柱联用柱层析法纯化杜仲叶总黄酮,纯度较高,为65.19%^[26]。本研究大孔树脂-聚酰胺双柱联用柱层析法分离纯化青刺尖总黄酮,发现HPD-500树脂是分离纯化青刺尖总黄酮的理想树脂,经HPD-500树脂纯化后,青刺尖总黄酮纯度为33.39%,3次重复试验的平均纯度为33.19%,重复性良好。HPD-500大孔树脂-聚酰胺精制,纯度较大孔树脂提高29.29%,说明HPD-500树脂-聚酰胺联用可有效纯化青刺尖总黄酮,但62.48%的纯度用于细胞试验纯度较低,易导致细胞死亡,且效应成分不清晰。借助HPLC-MS等手段分离、定量、定性分析纯化提高青刺尖总黄酮纯度,将为开展细胞及动物试验,揭示青刺尖减重调脂作用靶点提供支持。

参考文献:

- [1] 《滇南本草》整理组. 滇南本草-第一卷[M]. 2版. 昆明:云南人民出版社,1975:426-427.
The collation group of "Diannan Bencao". Diannan Bencao - Volume 1[M]. 2nd Edition. Kunming: Yunnan People's Publishing House, 1975:426-427.
- [2] 和丽生,马伟光. 中国纳西东巴医药学[M]. 昆明:云南民族出版社,2006:309-310.
HE L S, MA W G. Chinese Naxi Dongba medicine and pharmacognosy[M]. Kunming: Yunnan Nationalities Publishing House, 2006:309-310.
- [3] 云南省药物研究所,云南省民族药工程技术研究中心. 云南民族药志-第二卷[M]. 昆明:云南民族出版社,2009:193-194.
Yunnan Institute of Materia Medica, Yunnan Engineering Research Center of Ethnic Medicine. The annals of national medicine in Yunnan[M]. Kunming: Yunnan Nationalities Publishing House, 2009:193-194.
- [4] 管斌. 青刺尖化学成分及抗肿瘤活性研究[D]. 上海:上海交通大学,2013.
GUAN B. Study on the Chemical Composition and Anti-tumor Activity of Echinopsis oxyacantha[D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2013.
- [5] 姜世豪,孙小晶,李丹丹,等. 干燥方式对山楂总黄酮含量及抗氧化性质的影响[J/OL]. 食品工业科技, 1-14[2024-12-06]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024010036>.
LOU LOU S H, SUN X J, LI D D, et al. Effects of drying methods on total flavonoids content and antioxidant properties of hawthorn[J/OL]. Food Industry Science and Technology, 1-14[2024-12-06]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024010036>.
- [6] 夏海梅,周志宏,刘因华,等. 青刺尖中黄酮类成分调节脂代谢作用研究进展[J]. 云南中医中药杂志, 2020, 41(9): 87-89.
XIA H M, ZHOU Z H, LIU Y H, et al. Research progress on the regulation of lipid metabolism by flavonoids in Acanthopanax acanthopanax[J]. Yunnan Journal of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica, 2020, 41(9): 87-89.
- [7] 孙嘉莉,江峻峰,牟晓娟,等. 沙棘果皮渣总黄酮的纯化、成分分析及对胰脂肪酶的抑制作用[J]. 食品工业科技, 2024, 45(19): 206-215.
SUN J L, JIANG J F, MOU X J, et al. Purification and component analysis of total flavonoids from sea buckthorn peel residue and its anti-pancreatic lipase[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(19): 206-215.
- [8] TU J, DENG L Q, LING Y, et al. Transcriptome profiling reveals multiple pathways responsible for the beneficial metabolic effects of *Smilax glabra* flavonoids in mouse 3T3-L1 adipocytes[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2020, 125: 110011.
- [9] YU Z X, XU H L, YU X F, et al. Hypolipidemic effects of total flavonoids extracted from the leaves of *Actinidiakolomikta* in rats fed a high-fat diet[J]. Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 2017, 20(10): 1141-1148.
- [10] 郭畅,刘佳慈,张佳欣,等. 高粱米糠黄酮提取物对肥胖C57BL/6小鼠的降血脂及降血糖功效研究[J]. 食品科技, 2023, 48(10): 203-209.
GUO C, LIU J C, ZHANG J X, et al. Hypolipidemic and hy-

- poglycemic effects of *Sorghum* rice bran flavonoid extract on obese C57BL/6 mice[J]. Food Science and Technology, 2023, 48(10):203-209.
- [11] 方月娟,夏道宗,王思为,等. 高良姜总黄酮对营养性肥胖合并高脂血症大鼠减肥降脂作用研究[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(8):2907-2910.
- FANG Y J, XIA D Z, WANG S W, et al. Study on anti-obese and hypolipidemic effects of total flavonoids from *Alpinia officinarum* Hance in rats with nutritive obesity combined with hyperlipidemia[J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2015, 30(8):2907-2910.
- [12] 张璇. 青刺果酚类物质组成及其生物活性研究[D]. 昆明:昆明理工大学, 2019.
- ZHANG X. Study on the composition and biological activity of phenolic compounds from *Nitraria utilis*[D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2019.
- [13] 杨欢,曾利,郑振兴,等. 基于UHPLC-Q/Orbitrap HRMS技术的民族药青刺尖化学成分分析[J]. 中药材, 2022, 45(9):2144-2150.
- YANG H, ZENG L, ZHENG Z X, et al. Analysis of Chemical Constituents of Chinese ethnomedicine *Acanthopanax* based on UHPLC-Q/Orbitrap HRMS[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2022, 45(9):2144-2150.
- [14] 夏海梅,李艳萍,陆中云,等. 纳西族药青刺尖对C57BL/6J肥胖小鼠的减肥作用及机制研究[J]. 中药材, 2022, 45(9):2245-2249.
- XIA H M, LI Y P, LU Z Y, et al. Effect and mechanism of Naxi Chinese medicine Green Thorn Tip on weight loss in C57BL/6J obese mice[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2022, 45(9):2245-2249.
- [15] 张婷婷,梁燕,彭灿. 不同方法提取陈皮中黄酮类有效成分含量比较[J]. 中国药业, 2021, 30(13):40-43.
- ZHANG T T, LIANG Y, PENG C. Comparison of flavonoids content in pericarpium citri reticulatae extracted by different methods[J]. China Pharmaceuticals, 2021, 30(13):40-43.
- [16] 宋璇,王汝华,于建丽,等. 山楂叶黄酮分离纯化及抗氧化活性[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(4):57-63.
- SONG X, WANG R H, YU J L, et al. Isolation, purification, and antioxidant activity of flavonoids from hawthorn leaves[J]. Food Research and Development, 2022, 43(4):57-63.
- [17] 张秀秀,魏学智,赵瑞芬,等. 酶液提取扁核木叶片总黄酮的工艺优化[J]. 山西农业科学, 2015, 43(1):81-84.
- ZHANG X X, WEI X Z, ZHAO R F, et al. Optimization of extraction process of total flavonoids from leaves of *Platylphylla* by enzymatic solution[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2015, 43(1):81-84.
- [18] 夏海梅,周志宏,张菊,等. 正交试验法优选青刺尖总黄酮提取工艺研究[J]. 云南中医中药杂志, 2021, 42(1):80-82.
- XIA H M, ZHOU Z H, ZHANG J, et al. Study on optimal extraction technology of total flavonoids from *Acanthopanax acanthopanax* by orthogonal test[J]. Yunnan Journal of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica, 2021, 42(1):80-82.
- [19] 刘招娣,刘祥义,张水滔,等. 青刺果总黄酮超声辅助提取及其抗氧化活性[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(1):20-24.
- LIU Z D, LIU X Y, ZHANG S T, et al. Ultrasonic-assisted extraction and antioxidant activity of total flavonoids from *Prinsepia utilis* royle[J]. Food Research and Development, 2018, 39(1):20-24.
- [20] 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.
- [21] 王佳琪,李敏敏,范蓓,等. 大孔树脂纯化滇黄精黄酮工艺优化及纯化前后抗氧化活性比较[J]. 饲料研究, 2024, 47(7):74-81.
- WANG J Q, LI M M, FAN B, et al. Optimization of purification process of flavonoids from *P. kingianum* Coll. by macroporous resin and comparison of antioxidant activity before and after purification[J]. Feed Research, 2024, 47(7):74-81.
- [22] 杨欢欢,赵明慧,虎涛,等. 沙棘果渣黄酮微波提取工艺优化及其纯化研究[J]. 食品工业, 2023, 44(12):85-90.
- YANG H H, ZHAO M H, HU T, et al. Study on microwave extraction technology optimization and purification of flavonoids from fruit residue of *Hippophae rhamnoides*[J]. The Food Industry, 2023, 44(12):85-90.
- [23] 马梦鸽,宋忠兴,陈琳,等. 红花叶总黄酮提取纯化工艺优化及抗急性肝损伤活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2023, 35(1):108-117.
- MA M G, SONG Z X, CHEN L, et al. Optimization of extraction and purification process of total flavonoids from *Carthamus tinctorius* L. leaf and its anti-acute liver injury activity[J]. Natural Product Research and Development, 2023, 35(1):108-117.
- [24] 杨娟娟,孙波,王卓仁,等. 响应面法优化忍冬桑黄总黄酮提取工艺[J]. 河南农业科学, 2024, 53(5):172-180.
- YANG J J, SUN B, WANG Z R, et al. optimization of extraction process of total flavonoids from *Sanguangporus lonicericola* by response surface methodology[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2024, 53(5):172-180.
- [25] 杨永涛. 罗布麻总黄酮的提取、分离纯化及其抗氧化性能研究[D]. 广州:华南理工大学, 2018.
- YANG Y T. Extraction, purification and antioxidant properties of total flavonoids from *Apocynum Apocynum*[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018.
- [26] 苏娇娇. 杜仲叶总黄酮的提取分离工艺研究及抗炎活性测试[D]. 贵阳:贵州大学, 2023.
- SU J J. Study on extraction and separation technology of total flavonoids from *Eucommia Ulmoides* leaves and test of anti-inflammatory activity[D]. Guiyang: Guizhou University, 2023.