

藤椒油粕黄酮类成分的提取纯化工艺及成分鉴定和抑菌作用研究

王光燕, 于涵, 杨婷, 黎坤, 黄世伟, 刘晓华, 邢春欣, 龙飞*, 吕光华*

成都中医药大学药学院, 药食两用中药研究所, 西南特色中药资源国家重点实验室, 四川成都 611137

摘要:目的 建立藤椒 *Zanthoxylum armatum* 油粕中黄酮类成分的提取纯化工艺, 鉴定提取纯化物中的化学成分, 并评价其抗细菌作用。方法 以总黄酮提取率为考察指标, 通过单因素实验和 Box-Behnken 设计-响应面法优化提取工艺。以总黄酮转移率、提取纯化物得率和总黄酮质量分数为考察指标, 通过大孔吸附树脂类型、上样溶液 pH 值和乙醇体积分数、洗脱剂种类和用量等因素考察优化纯化工艺。对整合的提取纯化工艺进行 6 次重复性试验。利用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术鉴定提取纯化物中的化学成分。采用抑菌圈法及微量稀释法检测提取纯化物的抑菌效果。结果 藤椒油粕先用石油醚回流提取 3 次, 料液比 1:10, 每次提取 60 min; 再用 65%乙醇回流提取 130 min, 料液比 1:20。提取液浓缩后, 调节乙醇体积分数为 10%~15%, 调节 pH 值至 3.0。将酸性乙醇溶液上样至 HPD500 树脂柱, 先用 5 倍柱体积水洗脱, 再用 60%乙醇洗脱。乙醇洗脱液经浓缩干燥, 得总黄酮提取纯化物。从该提取纯化物中鉴定了 32 种成分, 包括 23 种黄酮、6 种酚酸和 3 种酰胺。该提取纯化物对金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 和表皮葡萄球菌 *S. epidermidis* 的抑菌圈直径分别为 (15.43±0.25) mm 和 (15.16±0.09) mm, 最小杀菌质量浓度分别为 5 mg/mL 和 >5 mg/mL; 对大肠杆菌 *Escherichia coli* 和铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* 未形成明显的抑菌圈, 最小抑菌质量浓度分别 156.25 μg/mL 和 312.50 μg/mL。结论 建立的藤椒油粕中黄酮类成分的提取纯化工艺稳定, 提取效率高, 纯化效果好。该提取纯化物主要成分为黄酮类成分, 对金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌具有抑制作用。

关键词: 竹叶花椒; 油粕; 黄酮; 提取工艺; 成分鉴定; 抑菌活性

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)18-6196-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.18.010

Extraction-purification procedure of flavonoids in *Zanthoxylum armatum* Residue with chemical identification and antibacterial activity

WANG Guangyan, YU Han, YANG Ting, LI Kun, HUANG Shiwei, LIU Xiaohua, XING Chunxin, LONG Fei, LYU Guanghua

State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, Research Institute of Chinese Medicines as Drug & Food, School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective To develop the extraction-purification procedure of flavonoids from *Zanthoxylum armatum* Residue (ZAR), identify chemical components in the extracted-purified extract and evaluate its antibacterial activity. **Methods** The extraction rate of total flavonoid was used as indicator to evaluate extraction procedure of total flavonoids from ZAR. This procedure was optimized by single factor experiments and Box-Behnken design-response surface methodology. Then, according to the transfer rate of total flavonoids, the yield of extracts and the mass fraction of total flavonoids, the purification procedure was optimized by the macroporous adsorption resin type, pH value of sample solution, ethanol volume fraction, eluent type and dosage. Repeatability tests of the integrated extraction and purification procedure were carried out for six times. Meanwhile, the UPLC-Q-TOF-MS/MS technique was employed to identify chemical constituents from the extracted-purified extract. The antibacterial activity of extracted-purified extract was detected by the inhibition circle and microdilution method. **Results** ZAR was extracted in petroleum ether for three times by reflux, the solid-liquid ratio was 1:10, and each extraction was 60 min. Then, the defatted ZAR was extracted in 65% ethanol for 130 min by reflux,

收稿日期: 2024-02-28

基金项目: 四川省高校科研创新团队建设计划项目 (18TD0017)

作者简介: 王光燕 (1997—), 女, 硕士研究生, 主要从事中药鉴定与资源利用研究。E-mail: wangguangyan012023@163.com

*通信作者: 吕光华, 教授, 博士生导师, 主要从事中药及民族药鉴定和资源利用研究。E-mail: lughcd@aliyun.com

龙飞, 副教授, 主要从事中药品种、品质及资源利用研究。E-mail: longfei@cdutcm.edu.cn

with a solid-liquid ratio of 1:20. The ethanol extraction solution was concentrated, and adjusting the pH value to 3.0, volume fraction of ethanol to 10%—15%. The acidic ethanol solution was loaded to the HPD500 resin column. This column was firstly washed with 5-folds column volume of water, and then with 60% ethanol. Then ethanol eluent was concentrated and dried to obtain total flavonoid extracts. A total of 32 compounds were identified in the final extracted-purified extract including 23 flavonoids, six phenolic acids and three amides. The diameter of circle for flavonoid extracts inhibiting *Staphylococcus aureus* and *S. epidermidis* were (15.43 ± 0.25) mm and (15.16 ± 0.09) mm, respectively. The minimum bactericidal concentration for the flavonoid extracts on *S. aureus* and *S. epidermidis* were 5 mg/mL and more than 5 mg/mL, respectively. The flavonoid extracts did not produce an obvious antibacterial circle against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, with the minimum inhibitory concentration of 156.25 $\mu\text{g/mL}$ and 312.50 $\mu\text{g/mL}$, respectively. **Conclusion** The established extraction-purification procedure of flavonoids from ZAR is stable with high extraction efficiency and purification. This extracted-purified extract mainly contains flavonoids and has an inhibitory effect on *S. aureus* and *S. epidermidis*.

Key words: *Zanthoxylum armatum* DC.; oil-residue; flavonoid; extraction procedure; component identification; antibacterial activity

藤椒为芸香科植物竹叶花椒 *Zanthoxylum armatum* DC.的近成熟果皮,为药食两用药材,药用具有散寒、止痛、驱蛔的功效;在四川、重庆、贵州、云南等多个省广泛栽培^[1]。藤椒油的食用量和生产量很大,提取藤椒油后产生了大量废弃藤椒油粕。由于藤椒果皮含挥发油、酰胺、生物碱、黄酮、酚酸等多种类型的化学成分,而提取的藤椒油中主要成分为挥发油、酰胺和生物碱类等成分,由此推测藤椒油粕则含黄酮类、酚酸类等成分。

吴奇霄等^[2]研究表明藤椒油粕中总酚和总黄酮含量较高;与加工前相比,藤椒油粕中香味物质和麻味物质损失达90%以上,而总酚和总黄酮含量分别减少15.26%和10.17%。姜欢笑^[3]从藤椒油粕中提取了油脂、蛋白和不溶性膳食纤维。徐丹萍等^[4-5]从藤椒油粕中提取纯化多酚和多糖,纯化后多酚含量为76.3%,但未明确提取率及提取物中的化学成分。由于黄酮类和酚酸类成分具有显著的抗氧化活性^[6],金丝桃苷对肿瘤细胞生长具有明显的抑制作用,通过降低脑组织内活性氧含量发挥抗氧化作用^[7];酚酸类物质可作为尿素酶和严重急性呼吸综合征冠状病毒2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)的潜在抑制剂^[8]。

由此可见,藤椒油粕中残留的黄酮类和酚酸类成分具有潜在的利用价值。为此,本研究从藤椒油的生产厂家收集了藤椒油粕,通过单因素实验、响应面试验、大孔树脂纯化等方法建立了总黄酮的提取纯化工艺,应用超高效液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱(ultra performance liquid chromatography-tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry, UPLC-Q-TOF-MS/MS)联用技术鉴定了提取纯化物中的主要化学成分,并用抑菌圈法及微量稀释法测定了提取纯化物的抑菌活性,以期为藤椒油粕资源

的充分利用和提取纯化物的利用提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Acquity UPLC™型超高效液相色谱仪、Synapt Q-TOF G2 HDMS型高分辨质谱仪,美国Waters公司;MD SpectraMax iD5型酶标仪,美谷分子仪器(上海)有限公司;LDZX-50KKBS型立式压力蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械厂;GHP9080型隔水式恒温培养箱,上海一恒科学仪器有限公司;HR1360-IIA2型生物安全柜,青岛海尔生物医疗股份有限公司;UV-2600型双光束紫外分光光度计,天美科学仪器有限公司;PHS-3C⁺型酸度计,成都试剂方舟科技有限公司。

1.2 药品及试剂

对照品儿茶素(批号PS012798)、表儿茶素(批号PS010585)、牡荆素(批号PS010335)、芦丁(批号PS012233)、金丝桃苷(批号PS011441)、异槲皮苷(批号PS010672)、槲皮苷(批号PS011858),质量分数均>98.0%,购于成都普思生物科技股份有限公司;对照品三叶豆苷(批号DST200912-235)、异鼠李素-3-O-葡萄糖苷(批号DSTDY008301)、蒽薹苷(批号DSTDB005001),质量分数均>98.0%,购于成都乐美天医药有限公司;对照品山柰酚-3-O- β -芸香糖苷,质量分数>98.0%,批号CHB190102,成都克洛玛生物科技有限公司。大孔吸附树脂D101(批号2021041601)、AB-8(批号20190420)、NKA-9(批号20190420)、HPD500(批号HC220406)和ADS-7(批号HC220419)购于郑州和成新材料科技有限公司。甲酸、乙腈(质谱级)、氢氧化钠、亚硝酸钠、硝酸铝、无水乙醇、石油醚、盐酸(分析纯)、丙酮(分析纯)、营养肉汤培养基、平板计数琼脂培养基和Mueller-Hinton琼脂培养基购于成都市科隆

化学品有限公司。金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* (BNCC186335)、表皮葡萄球菌 *S. epidermidis* (BNCC102555)、铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* (BNCC336458)、大肠杆菌 *Escherichia coli* (BNCC352083) 购于商城北纳创联生物科技有限公司。超纯水由 Cascada 系统制备, 美谷富迪生物仪器(上海)有限公司。

1.3 样品

藤椒油粕购于四川省洪雅县和鑫农业科技发展有限公司, 由成都中医药大学药学院吕光华教授鉴定, 为芸香科植物竹叶花椒 *Z. armatum* DC. 果皮提取藤椒油后的油粕。

2 方法与结果

2.1 藤椒油粕及其提取物中总黄酮的含量测定

为了评价提取、纯化黄酮类化合物的效果, 用本实验室前期建立的紫外分光光度法^[9], 测定藤椒油粕及其提取物、提取液、洗脱液中总黄酮的含量。

2.1.1 对照品溶液的制备及其回归方程 精密称取 10 mg 芦丁对照品于 50 mL 量瓶中, 加 65%乙醇溶解, 定容至刻度, 摇匀。分别取 1、2、3、4、5、6 mL 于 25 mL 量瓶中, 加 0.72 mol/L NaNO₂ 溶液 1 mL, 混匀, 静置 6 min; 加 0.47 mol/L Al(NO₃)₃ 溶液 1 mL, 混匀, 静置 6 min; 加 2.50 mol/L NaOH 溶液 10 mL, 加 65%乙醇定容, 摇匀, 静置 15 min, 即为对照品溶液。在紫外分光光度计上 509 nm 测定吸光度, 芦丁对照品溶液在 8~48 μg/mL 质量浓度 (X) 与吸光度 (Y) 回归方程为 $Y=12.518 X-0.007$, $R^2=0.9998$ 。用本方程计算藤椒油粕和提取物中总黄酮的含量。

2.1.2 供试品溶液的制备及总黄酮含量测定 称取适量提取物于 25 mL 量瓶中, 加 65%乙醇超声溶解、定容; 或取适量提取液或洗脱液于 25 mL 量瓶中, 用 65%乙醇定容。按上述对照品溶液制备方法制成供试品溶液, 测定吸光度, 计算供试品中总黄酮的含量。

2.2 藤椒油粕总黄酮的提取工艺优化

2.2.1 藤椒油粕脱脂方法的优选 由于藤椒油粕含有的油脂、色素等脂溶性成分影响黄酮类成分的提取效果, 故用石油醚除去脂溶性成分。为此, 比较了石油醚脱脂的方法。方法(1)为藤椒油粕先用石油醚提取后, 再用 65%乙醇回流提取; 乙醇提取液经减压浓缩后经大孔吸附树脂纯化。方法(2)为藤椒油粕先用 65%乙醇回流提取; 提取液减压浓缩后,

再用石油醚萃取; 水层溶液浓缩后经大孔吸附树脂纯化。结果表明, 方法(1)总黄酮转移率、提取纯化物得率和总黄酮质量分数分别为 74.00%、6.95%和 80.00%; 方法(2)总黄酮转移率、提取纯化物得率和总黄酮质量分数分别为 73.60%、7.73%和 71.60%。虽然方法(1)提取纯化物的得率比方法(2)低 0.78%, 但是提取纯化物中总黄酮的质量分数比方法(2)高 8.4%, 并且方法(1)操作更方便, 故选择方法(1)。

2.2.2 藤椒油粕乙醇回流提取参数的优化

(1) 提取时间的选择: 称取藤椒油粕 5.0 g, 共 6 份, 按料液比 1:10 加入 60%乙醇, 分别回流提取 60、90、120、150、180、210 min。总黄酮的提取率分别为 7.97%、8.83%、11.38%、11.02%、11.33%、11.39%, 表明提取率随着提取时间的增加逐渐增加; 当提取 120 min 后, 提取率趋于稳定。故选择提取时间 90、120、150 min 为后续响应面设计试验设计的 3 个水平。

(2) 乙醇体积分数的选择: 称取藤椒油粕 5.0 g, 共 6 份, 分别按液料比 1:10 加入 30%、40%、50%、60%、70%、80%乙醇, 回流提取时间 120 min。总黄酮的提取率分别为 6.32%、7.80%、10.10%、10.73%、8.05%、7.22%, 表明乙醇体积分数为 30%~60%时, 总黄酮提取率随乙醇体积分数增高而增大; 乙醇体积分数大于 60%后, 总黄酮提取率随乙醇体积分数的增高而减小。故选择乙醇体积分数 50%、60%、70%作为后续响应面设计试验设计的 3 个水平。

(3) 料液比的选择: 称取藤椒油粕 5.0 g, 共 7 份, 分别按料液比 1:5、1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35 加入 60%乙醇, 回流提取 120 min。总黄酮的提取率分别为 6.09%、9.92%、10.00%、10.46%、10.17%、9.81%、8.97%, 表明总黄酮提取率先随着提取溶剂的增加逐渐升高; 当料液比大于 1:20 后, 提取率略呈下降趋势。故选择料液比 1:10、1:15、1:20 作为后续响应面设计试验设计的 3 个水平。

(4) Box-Behnken 响应面设计: 以乙醇体积分数 (X_1)、料液比 (X_2)、提取时间 (X_3) 为自变量, 总黄酮提取率 (Y) 为响应值, 利用 Box-Behnken 设计-响应面设计 3 因素 3 水平试验。应用 Design Expert 10 软件对响应面设计数据(表 1)进行分析, 得到藤椒油粕 Y 对 X_1 、 X_2 、 X_3 的多元二次回归方程为 $Y=11.170+1.170 X_1+0.230 X_2+0.100 X_3+0.410$

表1 Box-Behnken 设计-响应面试验设计方案及试验结果

Table 1 Experimental design and results of Box-Behnken design-response surface methodology

编号	X ₁ /%	X ₂	X ₃ /min	Y/%	编号	X ₁ /%	X ₂	X ₃ /min	Y/%	编号	X ₁ /%	X ₂	X ₃ /min	Y/%
1	60 (0)	1 : 10 (-1)	150 (+1)	10.532	7	50 (-1)	1 : 15 (0)	150 (+1)	7.568	13	60 (0)	1 : 15 (0)	120 (0)	11.500
2	60 (0)	1 : 10 (-1)	90 (-1)	10.700	8	50 (-1)	1 : 20 (+1)	120 (0)	8.210	14	60 (0)	1 : 20 (+1)	90 (-1)	11.359
3	70 (+1)	1 : 15 (0)	150 (+1)	10.629	9	60 (0)	1 : 15 (0)	120 (0)	11.080	15	70 (+1)	1 : 15 (0)	90 (-1)	10.229
4	70 (+1)	1 : 20 (+1)	120 (0)	10.720	10	60 (0)	1 : 20 (+1)	150 (+1)	11.670	16	60 (0)	1 : 15 (0)	120 (0)	10.780
5	70 (+1)	1 : 10 (-1)	120 (0)	9.877	11	50 (-1)	1 : 10 (-1)	120 (0)	9.020	17	50 (-1)	1 : 15 (0)	90 (-1)	7.313
6	60 (0)	1 : 15 (0)	120 (0)	11.150	12	60 (0)	1 : 15 (0)	120 (0)	11.328					

表2 模型方差分析

Table 2 Analysis of variance for response surface model

方差来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值	方差来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	28.450	9	3.160	14.090	0.001 1**	X ₁ ²	15.540	1	15.540	69.270	<0.000 1**
X ₁	10.920	1	10.920	48.680	0.000 2**	X ₂ ²	0.185	1	0.185	0.825	0.393 9
X ₂	0.419	1	0.419	1.870	0.214 1	X ₃ ²	0.410	1	0.410	1.830	0.218 6
X ₃	0.079	1	0.079	0.353	0.571 0	残差	1.570	7	0.224	-	-
X ₁ X ₂	0.683	1	0.683	3.050	0.124 5	失拟项	1.270	3	0.425	5.760	0.061 9
X ₁ X ₃	0.005	1	0.005	0.023	0.882 6	误差	0.295	4	0.074	-	-
X ₂ X ₃	0.057	1	0.057	0.256	0.628 6	总离差	30.020	16	-	-	-

**极显著性差异 (P<0.01)。

** significant difference (P < 0.01).

$X_1X_2 + 0.036 X_1X_3 + 0.120 X_2X_3 - 1.920 X_1^2 + 0.210 X_2^2 - 0.310 X_3^2$, 并对得到的回归模型进行方差分析, 结果见表 2。响应面试验模型 P 值为 $0.001 1 < 0.01$, 表明该模型具有统计学意义^[10]。而失拟项 P 值为 $0.061 9 (>0.05)$, 失拟项不显著, 表明模型的拟合程度高, 模型与实际实验的数据无显著性差异^[10], 能够准确反映总黄酮提取率与乙醇体积分数、提取时间、料液比之间的关系。模型的决定系数 (R) 值为 $0.994 7$, 校正决定系数 (R_{adj}) 值为 $0.880 5$, 表明模型与实验值的拟合度较好^[11-12]。说明可以利用本响应面法设计优化的模型对藤椒油粕中总黄酮的提取工艺进行分析和预测。以二次多元回归方程拟合总黄酮提取率和各因素之间的函数关系, 对回归模型进行方差分析, 再利用 Origin 2021 软件绘制响应变量之间的等高线和响应面图 (图 1)。

(5) 最佳提取工艺: 利用 Design Expert 10 软件对实验结果进行多元二次回归分析, 模拟出总黄酮的最佳提取参数为乙醇体积分数 62.77% , 料液比 $1 : 19.71$, 提取时间 126.92 min , 预测总黄酮的提取率为 11.89% 。结合实际应用, 将提取工艺的参数修正为乙醇体积分数 65% , 料液比 $1 : 20$, 提取时间为 130 min 。

(6) 工艺验证: 为验证该模型的准确性, 用优化的提取工艺进行 6 次重复试验; 总黄酮的提取率分别为 11.13% 、 11.52% 、 11.29% 、 12.03% 、 11.18% 、 11.56% , 其平均值为 11.45% , RSD 为 2.91% 。表明实验结果与预测值一致, 该模型的预测性良好, 提取工艺稳定。

2.3 大孔吸附树脂纯化提取物中黄酮类成分的工艺参数优选

在上述藤椒油粕 65% 乙醇的粗提取物中, 总黄酮的质量分数较低 (仅为 36.25%)。采用大孔吸附树脂法对藤椒油粕的粗提取物进行了纯化。为此对纯化工艺参数进行了优化。

2.3.1 大孔吸附树脂的筛选 不同大孔吸附树脂因极性和比表面积不同, 对目标成分的纯化效果差异较大^[13-14]。本研究利用静态吸附试验比较了 D101、AB-8、HPD-500、NKA-9、ADS-7 5 种大孔吸附树脂对总黄酮的吸附与解吸附效果 (表 3)。结果表明, 极性强的树脂 HPD-500、NKA-9 和 ADS-7 对藤椒油粕总黄酮的吸附率高于极性弱的树脂 D101 和 AB-8。ADS-7 和 NKA-9 树脂虽然吸附率高, 但解吸率较低, 不利于目标成分解吸^[13-15]。故选择 HPD500 树脂纯化粗提取物中的黄酮类成分。

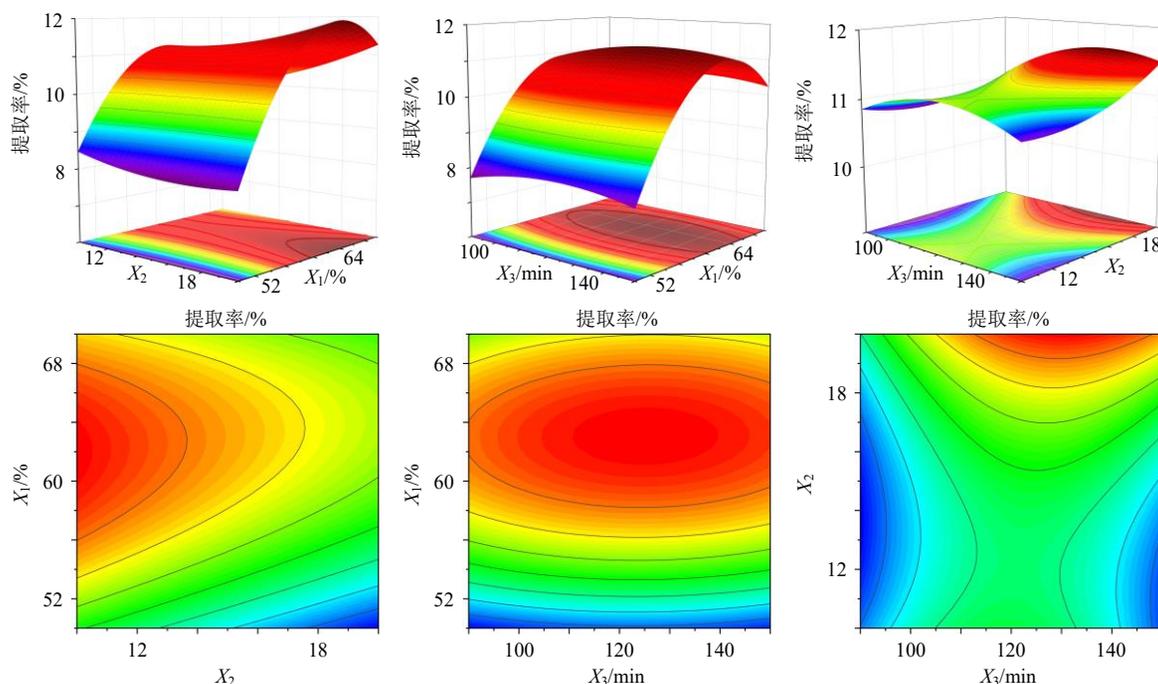


图 1 乙醇体积分数、料液比、提取时间交互作用对总黄酮提取率影响的响应面和等高线

Fig. 1 Response surface plots and contour maps of interaction of ethanol volume fraction, solid-liquid ratio, extraction time on yield of total flavonoids

表 3 不同大孔吸附树脂的吸附率和解吸率

Table 3 Adsorption rate and desorption rate of different macroporous adsorption resins

树脂型号	树脂极性	总黄酮吸附率/%	总黄酮解吸率/%
D101	非极性	76.80	76.95
AB-8	弱极性	79.93	76.94
HPD-500	极性	86.21	72.35
NKA-9	极性	86.06	67.79
ADS-7	强极性	86.43	69.48

2.3.2 上样溶液 pH 值的选择 样品溶液的酸碱性通过影响化学成分的存在状态、极性、溶解性等进而影响大孔吸附树脂对化学成分的吸附性能^[13-14]。为此,本研究以 HPD500 树脂,考察了样品溶液 pH 值为 3.0、3.5、4.0、4.5、4.8 时总黄酮的吸附率,分别为 92.06%、90.78%、90.10%、87.00%、85.56%。表明样品溶液 pH 值为 3.0 时,HPD500 树脂对藤椒油粕中的总黄酮的吸附效果最好。

2.3.3 上样量的选择 单位质量的大孔吸附树脂对目标成分的吸附量相对恒定,目标成分在该树脂的吸附能力范围内才能被有效吸附,起到较好的纯化效果^[13-14]。由于总黄酮的转移率与泄漏率成反比,故取 HPD500 树脂 100 mL,以 4 mL/min 体积流量上样,比较了上样粗提物中总黄酮质量分别为 1.56、2.01、2.45、3.01、3.23、3.35、3.46、3.57 g 时,洗

脱液中总黄酮的泄漏率分别为 0、0.78%、1.53%、2.69%、3.61%、4.14%、4.68%、5.27%,表明总黄酮的泄漏率随着上样量的增加而升高。本研究控制总黄酮的泄漏率不超过 5%,则上样粗提物中总黄酮量不超过 3.5 g。

2.3.4 上样溶液乙醇体积分数的选择 由于 65%乙醇粗提物需要加乙醇才能在水中溶解,而上样溶液中乙醇体积分数过高则导致黄酮类成分的流失而降低纯化效果。为此,以上样体积流量 4 mL/min、洗脱体积流量 6 mL/min 时,比较了上样溶液中乙醇体积分数分别为 5%、10%、15%、20%时,大孔吸附树脂对总黄酮的纯化效果(表 4)。结果表明,随着上样液乙醇体积分数的增加,提取纯化物的得率下降,而总黄酮的质量分数则上升。综合考虑,选择上样溶液中乙醇体积分数为 10%~15%。

2.3.5 水洗脱体积的选择 大孔吸附树脂在吸附目标成分时,会吸附部分盐类、多糖等杂质,可用超纯水洗涤这些杂质,提高产物纯度^[15]。如果洗脱树脂的水量过多,则导致部分极性较大的黄酮苷类成分流失。本研究以上样体积流量 4 mL/min、洗脱体积流量 6 mL/min,考察了水洗脱体积分别为 1、2、3、4、5、6、7 倍柱体积时,总黄酮的泄漏率分别为 0.30%、0.63%、0.96%、1.30%、1.68%、2.06%、2.46%。结果表明随着水洗脱体积增加,总黄酮的泄漏率增

表4 上样溶液乙醇体积分数对纯化效果的影响
Table 4 Effect of ethanol volume fraction in solvent on purification efficiency

上样液乙醇 体积分数/%	提取纯化物 得率 ^a /%	总黄酮质量 分数 ^b /%
5	5.33	81.87
10	4.88	84.89
15	4.78	85.44
20	4.50	89.86

a 为提取纯化物的量与藤椒油粕量之比; b 为提取纯化物中总黄酮量与提取纯化物量之比。

a is ratio of amount of extracted-purified extract to amount of *Z. armatum* oil-residue; b is ratio of total flavonoids in extracted-purified extract to amount of extracted-purified extract.

加。本研究控制总黄酮泄漏率不超过 2%，故选择用 5 倍柱体积超纯水洗脱，除去杂质。

2.3.6 洗脱液乙醇体积分数的选择 洗脱剂是影响纯化效果的主要因素之一，使被吸附成分与树脂之间的吸附作用减弱，并对目标成分具有较好的溶解性^[12-13]。为筛选最佳洗脱溶剂，本研究以上样体积流量 4 mL/min、洗脱体流量 6 mL/min 时，考察了不同体积分数乙醇对总黄酮的洗脱效果（表 5）。结果表明，随着乙醇体积分数增加，总黄酮转移率和提取纯化物得率均呈上升趋势，而总黄酮质量分数则先上升后下降。虽然 60%乙醇洗脱比 70%乙醇洗脱的总黄酮转移率低 0.36%，提取纯化物的得率低 3.90%，但总黄酮的质量分数高 5.79%。综合考虑总黄酮转移率、质量分数和生产成本，选择 60%乙醇为洗脱溶剂。

表5 不同体积分数乙醇的洗脱效果

Table 5 Elution effect of ethanol with different volume fractions

乙醇体积 分数/%	总黄酮转 移率 ^a /%	总黄酮质量 分数 ^b /%	提取纯化物 得率 ^c /%
30	29.52	82.44	2.09
40	62.42	91.91	3.96
50	66.09	89.44	4.31
60	71.61	91.05	4.68
70	71.87	86.07	4.87
95	80.72	83.65	5.63

a 为提取纯化物的量与藤椒油粕量之比; b 为提取纯化物中总黄酮量与提取纯化物量之比; c 为提取纯化物的量与藤椒油粕量之比。

a is ratio of amount of extracted-purified extract to amount of *Z. armatum* oil-residue; b is ratio of total flavonoids in extracted-purified extract to amount of extracted-purified extract; c is ratio of amount of extracted-purified extract to amount of oil-residue of *Z. armatum*.

2.3.7 提取纯化工艺的重复性考察 按照上述优化的提取纯化工艺进行 6 次重复性试验，总黄酮的转移率分别为 77.69%、77.63%、76.42%、79.04%、79.21%、80.07%，平均转移率为 78.34%，RSD 为 1.71%；提取纯化物得率分别为 7.00%、6.85%、6.71%、6.95%、6.81%、7.15%，平均得率为 6.91%，RSD 为 2.25%；总黄酮质量分数分别为 81.08%、79.89%、81.78%、83.11%、82.68%、81.18%，平均质量分数为 81.65%，RSD 为 1.48%。表明建立的总黄酮提取纯化工艺稳定，重复性良好。

2.4 藤椒油粕提取纯化物中化学成分的鉴定

为了明确提取纯化物的化学信息，先建立了藤椒及同属植物中已知化合物名称、结构式、分子式、分子量等信息的化学成分数据库，再用 LC-MS 鉴定了总离子流色谱上的主要峰。

2.4.1 对照品溶液的制备 分别称取儿茶素对照品 15.00 mg、表儿茶素对照品 15.00 mg、牡荆素对照品 15.68 mg、芦丁对照品 15.36 mg、金丝桃苷对照品 15.36 mg、异槲皮苷对照品 16.16 mg、三叶豆苷对照品 14.94 mg、槲皮苷对照品 16.32 mg、山柰酚-3-*O*-芸香糖对照品 12.80 mg、异鼠李素-3-*O*-葡萄糖苷对照品 15.84 mg 和蒽薹苷对照品 15.68 mg 置于 10 mL 量瓶中，加 70%甲醇溶解，定容，即为单个对照品溶液。分别吸取各对照品溶液 50 μL 置于 5 mL 量瓶中，加 70%甲醇定容，混匀，即为混合对照品溶液。

2.4.2 供试品溶液的制备 精密称取藤椒油粕黄酮提取纯化物 10 mg 于 10 mL 量瓶中，加入适量 70%甲醇，超声溶解，再加 70%甲醇定容，摇匀，制成供试品溶液。

2.4.3 色谱条件 色谱柱为 Thermo Fisher Scientific Accucore™ Vanquishi C₁₈⁺柱（100 mm×2.1 mm，1.5 μm）；流动相为 0.1%甲酸水溶液-乙腈，梯度洗脱：0~3 min，5%~11%乙腈；3~6 min，11%乙腈；6~8 min，11%~15%乙腈；8~9 min，15%乙腈；9~17 min，15%~26%乙腈；17~20 min，26%~40%乙腈；20~22 min，40%~42%乙腈；22~24 min，42%~50%乙腈；24~26 min，50%~70%乙腈；26~30 min，70%~95%乙腈；30~33 min，95%乙腈；体积流量 0.3 mL/min；进样量 3 μL；柱温 35 °C。

2.4.4 质谱条件 电喷雾离子源（ESI），正、负模式分别采集，一级全扫描（*m/z* 100~1 200）与非依赖性二级质谱扫描（DIA，*m/z* 100~1 200）；载气为

高纯度氮气；毛细管电压 2.0 kV；取样锥电压 40 V；离子源温度 150 °C；脱溶剂气温度 450 °C；脱溶剂气体体积流量 800.0 L/h；进样锥气体体积流量 50.0 L/h。总离子流色谱图见图 2。

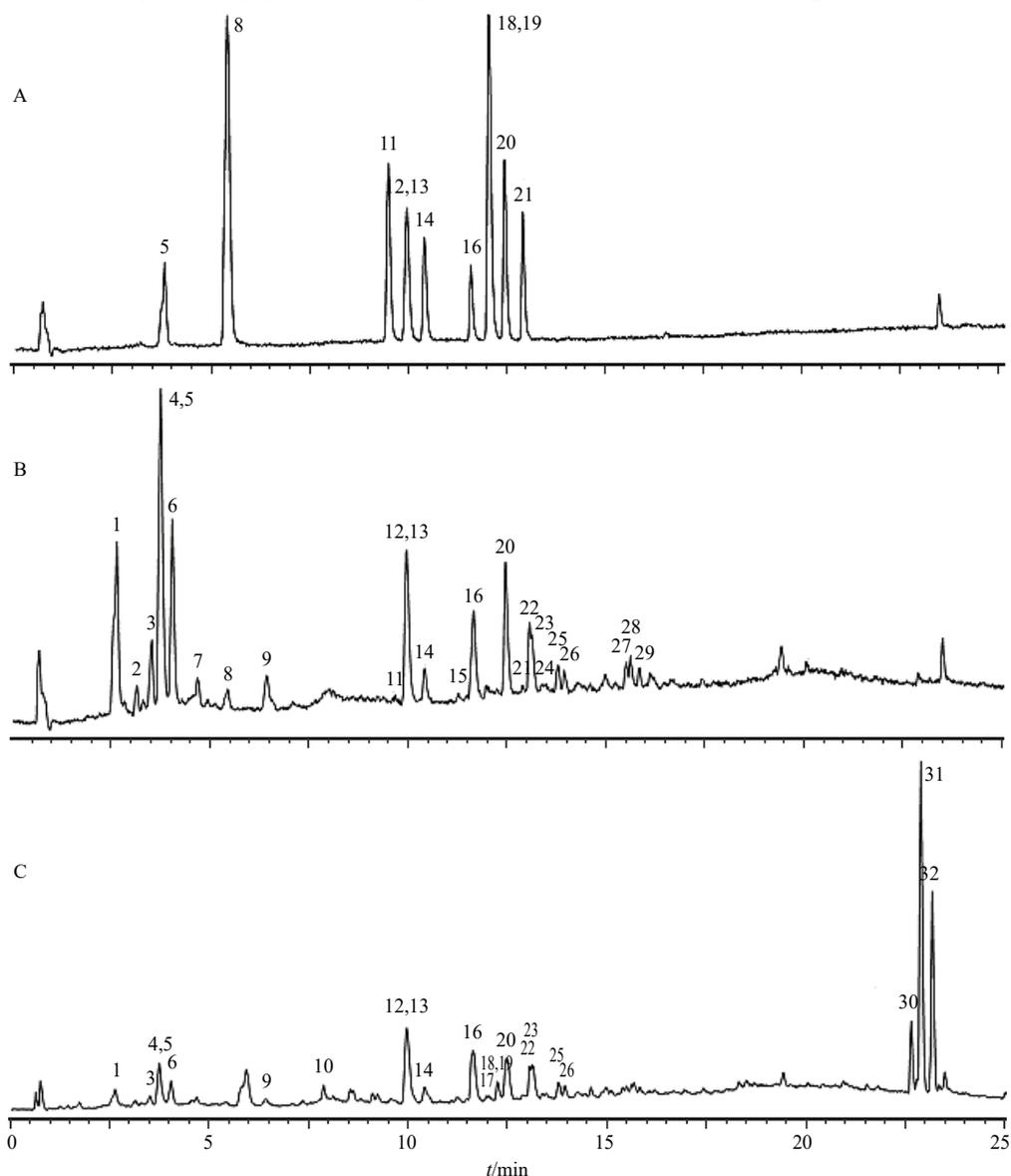


图 2 混合对照品 (A) 和供试品 (负离子模式, B; 正离子模式, C) 的总离子流色谱图

Fig. 2 Total ion current chromatograms of mixed reference substances (A) and samples for test (ESI⁻, B; ESI⁺, C)

2.4.5 具有对照品的色谱峰鉴定 总离子流色谱上 11 个峰有对照品, 通过比较保留时间和质谱数据进行鉴定。这些峰的保留时间与对照品一致 (图 2), 均检测到准分子离子峰 $[M+H]^+$ 和 $[M-H]^-$ 信号, 主要正离子和负离子碎片符合相应化合物的裂解规律, 结果见表 6。

峰 5 (儿茶素) 和峰 8 (表儿茶素) 的准分子离子峰为 m/z 291 $[M+H]^+$ 和 m/z 289 $[M-H]^-$, 失去中性分子 CO_2 产生碎片离子 m/z 245 $[M-H-CO_2]^-$, 环内裂解产生碎片离子 m/z 123; 其质谱信息与对照品一致。

峰 11 (牡荆素) 的准分子离子峰为 m/z 433 $[M+H]^+$ 和 m/z 431 $[M-H]^-$, 主要碎片为 m/z 313 $[M+H-C_4H_8O_4]^+$ 和 m/z 311 $[M-H-C_4H_8O_4]^-$; 其质谱信息与对照品一致。

峰 12 (芦丁)、13 (金丝桃苷)、14 (异槲皮苷)、19 (蒽薹苷)、20 (槲皮苷) 均为槲皮素的糖苷衍生物, 均产生槲皮素苷元离子 m/z 303, 301。槲皮素苷元发生 RDA 裂解产生 m/z 271, 255。金丝桃苷 (13) 和异槲皮苷 (14) 的配糖体分别为半乳糖和葡萄糖, 失去中性分子 $C_6H_{10}O_5$ 产生苷元 m/z 301 $[M-H-162]^-$ 。槲皮苷 (20) 的配糖体为鼠李糖, 失去中性

表 6 具有对照品的 11 种黄酮类成分的鉴定

Table 6 Identification of 11 flavonoid compounds by references

峰号	tr/ min	检测值 (<i>m/z</i>)		理论值 (<i>m/z</i>)	误差 ($\times 10^{-6}$)	主要碎片离子		分子式	鉴定结果
		正离子模式	负离子模式			ESI ⁺	ESI ⁻		
5	3.81	291.086 0 [M+H] ⁺	289.071 7 [M-H] ⁻	290.079 0	-1.68	123.047 4, 139.042 8	245.079 1	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	儿茶素
8	5.41	291.086 8 [M+H] ⁺	289.066 9 [M-H] ⁻	290.079 0	0.22	123.047 4, 139.042 8	245.082 0	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	表儿茶素
11	9.49	433.115 0 [M+H] ⁺	431.098 7 [M-H] ⁻	432.105 7	-2.03	313.073 5	311.055 0	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	牡荆素
12	9.97	611.161 5 [M+H] ⁺	609.146 2 [M-H] ⁻	610.153 4	-1.04	303.050 7, 271.026 1	463.087 4, 301.032 0	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	芦丁
13	10.00	465.103 8 [M+H] ⁺	463.087 8 [M-H] ⁻	464.095 5	-0.31	303.050 7, 271.026 1	301.032 0	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	金丝桃苷
14	10.42	465.103 4 [M+H] ⁺	463.088 1 [M-H] ⁻	464.095 5	-0.96	303.050 7, 257.049 4	301.032 0	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	异槲皮苷
16	11.61	471.090 7 [M+Na] ⁺	447.094 3 [M-H] ⁻	448.100 6	-3.49	287.059 9	285.038 4	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	三叶豆苷
18	12.01	595.166 1 [M+H] ⁺	593.151 4 [M-H] ⁻	594.158 5	-1.26	287.059 9	285.038 4	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	山柰酚-3- <i>O</i> -芸香糖苷
19	12.04	457.032 1 [M+Na] ⁺	433.075 0 [M-H] ⁻	434.084 9	4.83	303.050 7, 257.049 4	301.031 4, 255.027 9	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	蒹蓄苷
20	12.46	471.090 5 [M+Na] ⁺	447.093 7 [M-H] ⁻	448.100 6	-2.15	303.050 7, 257.043 8	301.031 4, 255.029 2	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	槲皮苷
21	12.98	479.119 7 [M+H] ⁺	477.104 5 [M-H] ⁻	478.111 1	-2.50	317.064 4, 303.046 9	315.052 6, 301.031 8	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	异鼠李素-3- <i>O</i> -葡萄糖苷

分子 C₆H₁₀O₄ 产生苷元 *m/z* 301 [M-H-146]⁻。蒹蓄苷 (19) 的配糖体为阿拉伯糖, 失去中性分子 C₅H₈O₄ 产生苷元 *m/z* 301 [M-H-132]⁻。芦丁 (12) 的配糖体由葡萄糖和鼠李糖构成, 依次失去中性分子 C₆H₁₀O₄ 和 C₆H₁₀O₅, 分别产生 *m/z* 463 [M-H-146]⁻ 和 *m/z* 301 [M-H-146-162]⁻, 与文献报道的裂解规律一致^[16-18]。

峰 16 (三叶豆苷) 和 18 (山柰酚-3-*O*-芸香糖苷) 为山柰酚衍生物, 碎片离子 *m/z* 287 和 *m/z* 285 分别为山柰酚在正离子和负离子模式下产生的特征碎片离子, 即峰 16 失去中性分子 C₆H₁₀O₅ 和峰 18 失去中性分子 C₆H₁₀O₅ 和 C₆H₁₀O₄。其质谱信息与对照品一致。

峰 21 (异鼠李素-3-*O*-葡萄糖苷) 出现准分子离子峰 *m/z* 479 [M+H]⁺ 和 *m/z* 477 [M-H]⁻, 各失去中性分子 C₆H₁₀O₅ 产生碎片离子 *m/z* 315 [M-H-C₆H₁₀O₅]⁻。其质谱信息与对照品一致。

2.4.6 无对照品的色谱峰初步鉴定 总离子流色谱上有 21 个明显的色谱峰, 由于没有相应的对照品, 则根据质谱信息, 并结合相关文献进行了初步鉴定, 结果见表 7。

峰 1、4、6 的保留时间不同, 均出现准分子离子峰 *m/z* 377 [M+Na]⁺ 和 *m/z* 353 [M-H]⁻, 推测这 3 个化合物为同分异构体, 相对分子质量为 354, 分子式为 C₁₆H₁₈O₉。这 3 个峰均产生特征碎片离子 *m/z* 191 (奎尼酸骨架离子) 和 *m/z* 179 (咖啡酸骨架离子), 与文献报道绿原酸裂解途径一致^[19], 推测这 3 个化合物为绿原酸及其同分异构体新绿原酸和隐绿

原酸。由于这 3 个化合物的质谱数据一致, 难以区分。为此, 根据文献相同或相近 HPLC 条件下这 3 个化合物的保留时间^[17-18,20], 鉴定峰 1、4、6 分别为新绿原酸、绿原酸和隐绿原酸。

峰 2 的准分子离子峰为 *m/z* 331 [M+H]⁺ 和 *m/z* 329 [M-H]⁻, 相对分子质量为 330, 推测其分子式为 C₁₄H₁₈O₉; 失去中性分子 C₆H₁₀O₅ 产生碎片离子 *m/z* 167 (香草酸骨架离子)^[21]。故鉴定峰 2 为香草酸己糖苷。

峰 3 的准分子离子峰为 *m/z* 365 [M+Na]⁺ 和 *m/z* 341 [M-H]⁻, 相对分子质量为 342, 推测其分子式为 C₁₅H₁₈O₉; 产生碎片离子 *m/z* 191 (奎尼酸骨架离子), 结合文献中酚酸类成分在 C₁₈ 反相色谱柱上的保留时间^[21], 鉴定峰 3 为 5-*O*-香草酰奎宁酸。

峰 7 的准分子离子峰为 *m/z* 579 [M+H]⁺ 和 *m/z* 577 [M-H]⁻, 相对分子质量为 578, 推测其分子式为 C₃₀H₂₆O₁₂; 产生碎片离子 *m/z* 291 和 *m/z* 289 为儿茶素的骨架离子, 推测其为儿茶素的二聚体, 结合文献数据^[22], 鉴定峰 7 为原花青素 B。

峰 9 的准分子离子峰为 *m/z* 367 [M-H]⁻, 相对分子质量为 368, 推测其分子式为 C₁₇H₂₀O₉; 产生碎片离子 *m/z* 191 (奎尼酸骨架离子), 结合文献数据^[23], 鉴定峰 9 为 5-奎宁咖啡酸。

峰 10 的准分子离子峰 *m/z* 579 [M+H]⁺, 相对分子质量为 578, 推测其分子式为 C₂₇H₃₀O₁₄; 产生的碎片离子 *m/z* 433 [M-C₆H₁₀O₄]⁻ 和 *m/z* 287 [M-2C₆H₁₀O₄]⁻, 推测存在 2 个鼠李糖, 结合文献数据^[21], 鉴定峰 10 为山柰苷。

表 7 根据质谱信息初步鉴定的 21 种化学成分

Table 7 21 Chemical components preliminarily identified based on mass spectrometry data

峰号	tr/ min	检测值 (m/z)		理论值 (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	主要碎片离子		分子式	鉴定结果
		正离子模式	负离子模式			ESI ⁺	ESI ⁻		
1	2.64	377.085 2 [M+Na] ⁺	353.086 8 [M-H] ⁻	354.095 1	1.30	163.041 0	191.056 1	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	新绿原酸
2	3.16	331.100 3 [M+H] ⁺	329.089 2 [M-H] ⁻	330.095 1	-3.39	193.052 8, 163.041 0	167.030 7	C ₁₄ H ₁₈ O ₉	香草酸己糖苷
3	3.51	365.088 8 [M+Na] ⁺	341.086 1 [M-H] ⁻	342.095 1	3.40	151.041 0	191.056 1	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	5-O-香草酰奎宁酸
4	3.76	377.085 5 [M+Na] ⁺	353.086 5 [M-H] ⁻	354.095 1	2.15	163.041 0	191.056 1	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	绿原酸
6	4.05	377.085 5 [M+Na] ⁺	353.086 5 [M-H] ⁻	354.095 1	2.15	163.041 0	191.056 1	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	隐绿原酸
7	4.70	579.148 4 [M+H] ⁺	577.131 2 [M-H] ⁻	578.142 4	3.20	425.084 0, 407.070 8, 291.092 0	409.099 4, 289.072 9	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	原花青素 B
9	6.44	-	367.105 3 [M-H] ⁻	368.111 5	-4.43	-	191.056 1	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	5-奎宁咖啡酸
10	7.87	579.173 8 [M+H] ⁺	-	578.163 6	-4.17	433.082 8, 287.059 9	-	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	山柰苷
15	11.29	507.116 2 [M+H] ⁺	505.101 6 [M-H] ⁻	506.106 0	-4.59	303.050 7	301.031 4	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₃	槲皮素-7-O-乙酰己糖苷
17	11.96	609.147 0 [M+H] ⁺	607.132 4 [M-H] ⁻	608.174 1	-2.35	303.050 7, 287.059 9	301.031 4	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₆	6'-(4-羧基-3-羟基-3-甲基丁酰基)金丝桃苷
22	13.07	347.076 9 [M+H] ⁺	-	346.068 9	-0.59	332.062 3, 287.059 9	-	C ₁₇ H ₁₄ O ₈	菠叶素
23	13.15	-	489.100 7 [M-H] ⁻	490.111 1	4.97	-	285.035 4, 255.027 9	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₂	山柰酚-乙酰己糖苷
24	13.50	507.117 2 [M+H] ⁺	505.100 6 [M-H] ⁻	506.106 0	4.71	303.050 7	301.031 4	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₃	槲皮素-3-O-乙酰己糖苷
25	13.79	317.065 4 [M+H] ⁺	-	316.058 3	2.30	302.046 9	-	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	异鼠李素
26	13.95	-	519.112 3 [M-H] ⁻	520.121 7	3.02	317.064 4, 302.040 8	315.042 7, 300.024 6	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₃	异鼠李素-乙酰己糖苷
27	15.51	581.114 6 [M+H] ⁺	579.094 6 [M-H] ⁻	580.106 4	-0.58	333.062 3	535.112 7, 331.046 1, 316.023 1	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₆	锦葵素-3-丙二酰己糖苷
28	15.62	595.127 5 [M+H] ⁺	593.120 7 [M-H] ⁻	594.122 1	4.06	347.076 9, 332.054 9	549.126 6, 345.063 0, 330.034 9	C ₂₆ H ₂₆ O ₁₆	菠叶素-丙二酰己糖苷
29	15.83	639.155 5 [M+H] ⁺	637.138 4 [M-H] ⁻	638.148 3	3.26	333.062 3	493.102 0, 331.046 1	C ₂₈ H ₃₀ O ₁₇	锦葵素-1,6-脱水葡萄糖基-葡萄糖苷
30	22.65	286.178 3 [M+Na] ⁺	-	263.188 5	0.10	246.188 8, 107.087 7	-	C ₁₆ H ₂₅ NO ₂	羟基-ε-山椒素
31	22.89	286.178 3 [M+Na] ⁺	-	263.188 5	0.10	246.188 8, 107.087 7	-	C ₁₆ H ₂₅ NO ₂	羟基-α-山椒素
32	23.18	286.178 3 [M+Na] ⁺	-	263.188 5	0.10	246.188 8, 107.087 7	-	C ₁₆ H ₂₅ NO ₂	羟基-β-山椒素

峰 15、24 的准分子离子峰分别为 m/z 507 [M+H]⁺ 和 m/z 505 [M-H]⁻，相对分子质量为 506，推测其分子式为 C₂₃H₂₂O₁₃；失去碎片离子 m/z 204 产生槲皮素的特征碎片离子 m/z 303 和 m/z 301；根据在 C₁₈ 反相色谱柱上的保留时间^[21]，鉴定峰 15、24 分别为槲皮素-7-O-乙酰己糖苷和槲皮素-3-O-乙酰己糖苷。

峰 17 的准分子离子峰为 m/z 609 [M+H]⁺ 和 m/z 607 [M-H]⁻，相对分子质量为 608，推测其分子式为 C₂₇H₂₈O₁₆；比芦丁少 2 个氢原子，并且产生特征碎片离子 m/z 303 和 m/z 287，故鉴定峰 17 为 6'-(4-羧基-3-羟基-3-甲基丁酰基)金丝桃苷。

峰 22 的准分子离子峰 m/z 347 [M+H]⁺，相对分子质量为 346，推测其分子式为 C₁₇H₁₄O₈；失去 2 个 -CH₃，产生碎片离子 m/z 332 [M+H-CH₃]⁺ 和四羟基黄酮苷元的骨架离子 m/z 287；结合文献中数据^[24]，鉴定峰 22 为菠叶素。峰 28 的准分子离子峰为 m/z 595 [M+H]⁺ 和 m/z 593 [M-H]⁻，并且出现

与峰 22 相同的二级碎片；准分子离子峰失去中性分子 CO₂ 产生碎片离子 m/z 549，与碎片离子 m/z 345 相差 204，推测结构中存在糖基酰化；结合文献数据^[21,23]，鉴定峰 28 为菠叶素-丙二酰己糖苷。

峰 23 的准分子离子峰为 m/z 489 [M-H]⁻，相对分子质量为 490，推测其分子式为 C₂₃H₂₂O₁₂；失去碎片离子 m/z 204 产生山柰酚的特征碎片离子 m/z 285 和 m/z 255；结合文献数据^[21]，鉴定峰 23 为山柰酚-乙酰己糖苷。

峰 25 的准分子离子峰为 m/z 317 [M+H]⁺，相对分子质量为 316，推测其分子式为 C₁₆H₁₂O₇；失去 -CH₃ 产生碎片离子 m/z 302 [M+H-CH₃]⁺；结合文献数据^[19]，鉴定峰 25 为异鼠李素。

峰 26 的准分子离子峰为 m/z 519 [M-H]⁻，相对分子质量为 520，推测其分子式为 C₂₄H₂₄O₁₃；失去碎片离子 m/z 204 产生异鼠李素的特征碎片离子 m/z 315 和 m/z 300；结合文献数据^[19,21]，鉴定峰 26 为异鼠李素-乙酰己糖苷。

峰 27 的准分子离子峰为 m/z 581 $[M+H]^+$ 和 m/z 579 $[M-H]^-$, 相对分子质量为 580, 推测其分子式为 $C_{25}H_{24}O_{16}$; 准分子离子峰失去中性分子 CO_2 , 产生碎片离子 m/z 535, 继续失去碎片离子 m/z 204, 产生锦葵素的特征碎片离子 m/z 331; 结合文献中数据^[21,25], 鉴定峰 27 为锦葵素-丙二酰-己糖苷。

峰 29 的准分子离子峰为 m/z 639 $[M+H]^+$ 和 m/z 637 $[M-H]^-$, 相对分子质量为 638, 推测其分子式为 $C_{28}H_{30}O_{17}$; 准分子离子峰失去中性分子 $C_6H_8O_4$ 产生碎片离子 m/z 493, 继续失去中性分子 $C_6H_{10}O_5$ 产生锦葵素的特征碎片离子 m/z 331; 结合文献中数据^[21,25], 鉴定峰 29 为锦葵素-1,6-脱水葡萄糖基-葡萄糖苷。

峰 30~32 出现相同的准分子离子峰 m/z 286 $[M+Na]^+$, 分子式为 $C_{16}H_{25}NO_2$, 相对分子质量为 263, 推测为羟基- α -山椒素及其同分异构体羟基- ε -山椒素和羟基- β -山椒素。根据在相同或相近的 HPLC 条件下, 这 3 个化合物的保留时间依次为羟基- ε -山椒素、羟基- α -山椒素、羟基- β -山椒素^[26-27], 并且羟基- α -山椒素在花椒和竹叶花椒中含量和峰面积显著高于其他羟基山椒素类成分^[27-29]。故鉴定峰 30~32 分别为羟基- ε -山椒素、羟基- α -山椒素和羟基- β -山椒素。

2.5 藤椒油粕提取纯化物的抗菌活性研究

由于多数酚酸类和黄酮类成分具有广谱抗菌活性^[30-31], 故本研究参照《抗菌药物敏感性试验的技术要求》(WS/T639-2018), 采用抑菌圈法和微量稀释法测定本提取纯化物对金黄色葡萄球菌 (G^+)、表皮葡萄球菌 (G^+)、大肠杆菌 (G^-)、铜绿假单胞菌 (G^-) 的抑制效果。

2.5.1 药物储备液的制备 精密称取提取纯化物 0.5 g, 置于 10 mL 量瓶中, 加 40% 丙酮溶液溶解, 定容, 摇匀, 经 0.22 μm 无菌微孔滤膜滤过, 即得 50 mg/mL 药物储备液。

2.5.2 菌悬液的制备 将上述 4 种菌株的单个菌落接种至营养肉汤培养液中, 在 37 $^{\circ}C$ 恒温培养箱以 210 r/min 速度振摇孵育 12 h; 用营养肉汤培养液校正菌液浓度至 1.0 麦氏浊度单位 (约 3×10^8 CFU/mL), 即为初始接种菌悬液。用营养肉汤培养液将初始接种菌悬液稀释至需要的浓度, 即为待接种菌悬液。

2.5.3 抑菌圈直径的测定 取各受试菌株的待接种菌悬液适量, 涂布接种于 MHA 培养基上; 在适当

位置打孔, 直径约 6 mm, 向孔中加入药物储备液, 空白组加入等体积 40% 丙酮溶液, 每组设置 3 个平行试验。置于恒温培养箱 37 $^{\circ}C$ 培养 20 h, 测定抑菌圈直径。结果 (图 3) 表明, 本提取纯化物对金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌的抑菌圈直径分别为 (15.43 ± 0.25) mm 和 (15.16 ± 0.09) mm; 对大肠杆菌和铜绿假单胞菌不产生明显的抑菌圈, 空白组均不产生抑菌圈。

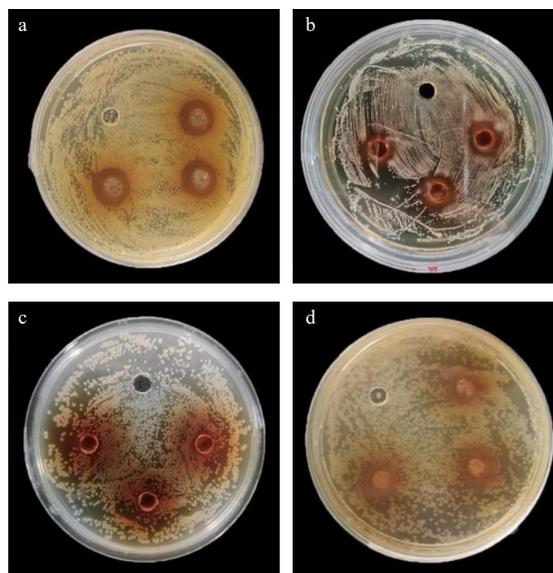


图 3 金黄色葡萄球菌 (a)、表皮葡萄球菌 (b)、大肠杆菌 (c)、铜绿假单胞菌 (d) 的抑菌圈

Fig. 3 Antibacterial circles of *S. aureus* (a), *S. epidermidis* (b), *E. coli* (c), *P. aeruginosa* (d)

2.5.4 最小抑菌质量浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 和最小杀菌质量浓度 (minimum bactericidal concentration, MBC) 的测定 用营养肉汤培养液倍比稀释药物储备液, 对照组不加药液, 空白组加等体积 40% 丙酮溶液, 各孔加入等量菌悬液。置恒温培养箱 37 $^{\circ}C$ 培养 20 h, 在酶标仪上测定 600 nm 的吸光度 (A) 值, 计算 MIC。取药液质量浓度不低于 MIC 孔药液质量浓度的菌悬液涂布接种于 PCA 培养基; 置于恒温培养箱 37 $^{\circ}C$ 培养 18~24 h。肉眼观察, 以无细菌生长的最低药物质量浓度作为 MBC (表 8)。结果表明, 本提取纯化物对金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌具有抑制作用, 而对大肠杆菌和铜绿假单胞菌抑制作用不明显。

3 讨论

藤椒为药食两用药材, 藤椒油的食用量和生产量很大。从藤椒果皮中提取藤椒油后, 产生大量的油粕废弃物。这些油粕含大量的黄酮类、酚酸类、

表 8 提取纯化物对受试菌株的 MIC 和 MBC
Table 8 MIC and MBC of extracted-purified extract on tested strains

菌株	MIC/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	MBC/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
金黄色葡萄球菌	39.06	5 000
表皮葡萄球菌	39.06	>5 000
大肠杆菌	156.25	-
铜绿假单胞菌	312.50	-

酰胺类等活性成分, 未得到利用。为了充分利用藤椒油粕资源, 本研究通过筛选、优化黄酮类成分的提取条件和纯化条件, 以提取纯化物的得率、总黄酮的质量分数及其转移率等为指标, 建立了从藤椒油粕中提取纯化黄酮类化合物的工艺, 即藤椒油粕先用石油醚回流提取 3 次, 料液比 1 : 10, 提取 60 min; 药渣待石油醚挥发后, 再用 65%乙醇回流提取 130 min, 料液比为 1 : 20。提取液经减压浓缩至小体积, 调节乙醇体积分数为 10%~15%, 用盐酸溶液调节至 pH 3.0。将酸性乙醇溶液上样至 HPD500 树脂柱, 先用 5 倍柱体积水洗脱, 用 60%乙醇洗脱, 收集乙醇洗脱液, 减压浓缩干燥, 即得总黄酮提取纯化物。本工艺 6 次重复的平均提取纯化物得率为 6.91%, 总黄酮质量分数达 81.65%, 总黄酮转移率达 78.48%。

蒋燕^[32]采用正交试验建立的藤椒油粕中总黄酮的提取工艺, 总黄酮的提取率为 23.16%, 未报道提取物得率和总黄酮质量分数。王春霞^[33]采用正交试验建立的藤椒油粕中多酚的提取工艺, 总酚得率为 6.83 mg/g, 经大孔吸附树脂纯化后的多酚质量分数为 76.30%, 未报道纯化物的得率和多酚转移率。赵志峰等^[34]用低共熔溶剂提取花椒油粕中的黄酮, 用异己烷脱脂 8~12 h, 提取物中总黄酮质量分数为 3.013 mg/g。由此可见, 本研究建立的工艺提取纯化效率更高, 产物纯度高, 操作性强, 适合于大规模生产。为了明确该提取纯化物中化学信息, 本研究应用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 联用技术, 通过比较保留时间、质谱信息, 并参考相关文献, 鉴定了藤椒油粕提取纯化物总离子流色谱上 32 个主要色谱峰, 对 11 个有对照品的黄酮类色谱峰进行了准确鉴定, 对 21 个无对照品的色谱峰进行了初步鉴定。这些成分包含 23 种黄酮类成分、6 种酚酸类成分和 3 种酰胺类成分, 为进一步开发利用提供的依据。

本研究采用抑菌圈法和微量稀释法测定了提取纯化物对 4 种细菌的敏感性, 发现本提取纯化物对

革兰阳性菌(金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌)具有抑制作用, 而对革兰阴性菌(大肠杆菌和铜绿假单胞菌)的抑制作用不明显。说明本提取纯化物可开发抗革兰阳性菌的产品, 充分利用藤椒油粕资源。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 祝磊, 陈茜, 黎江华, 等. 藤椒来源的考证与定义的思考 [J]. 中草药, 2018, 49(4): 987-992.
- [2] 吴奇霄, 刘福权, 何强, 等. 花椒油加工副产物的化学成分研究 [J]. 中国调味品, 2020, 45(1): 54-57.
- [3] 姜欢笑. 藤椒冷榨油饼粕中基本成分的提取及其理化性质的研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2015.
- [4] Xu D P, Wang C X, Zhuo Z H, *et al.* Extraction, purification and antioxidant activity of polysaccharide from cold pressed oil cake of 'Tengjiao' seed [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 163: 508-518.
- [5] 徐丹萍, 蒲彪, 叶萌, 等. 藤椒冷榨油饼粕中多酚的纯化及体外抗氧化活性 [J]. 西北农业学报, 2018, 27(11): 1690-1700.
- [6] Phuyal N, Jha P K, Raturi P P, *et al.* Total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activities of fruit, seed, and bark extracts of *Zanthoxylum armatum* DC. [J]. *Sci World J*, 2020, 2020: 8780704.
- [7] 曹纬国, 刘志勤, 邵云, 等. 黄酮类化合物药理作用的研究进展 [J]. 西北植物学报, 2003, 23(12): 2241-2247.
- [8] Challeng N, Puzari M, Chetia P, *et al.* Phenolic compounds of *Zanthoxylum armatum* DC. as potential inhibitors of urease and SARS-CoV2 using molecular docking approach and with simulation study [J]. *Nat Prod Res*, 2023, 37(12): 1993-1997.
- [9] Wang G Y, Yang T, Chen W J, *et al.* Content and antidepressant effect of total flavonoids from *Zanthoxylum pericarpium* Residue [J]. *Med Plant*, 2022, 13 (6): 55-59.
- [10] 刘晓梅, 李沛霞, 甘蓝湘, 等. 川麦冬须根总黄酮和总皂苷提取和富集工艺研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(8): 1285-1294.
- [11] 夏禹, 张文珍, 黄真, 等. 温莪术药渣再提取工艺及其美白活性研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2022, 34 (3): 457-464.
- [12] Wang X S, Wu Q N, Wu Y F, *et al.* Response surface optimized ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Sparganii Rhizoma* and evaluation of their *in vitro* antioxidant activities [J]. *Molecules*, 2012, 17(6): 6769-6783.
- [13] 杨敏, 张天锡, 史磊, 等. 大孔吸附树脂分离纯化中药成分影响因素探讨 [J]. 中草药, 2020, 51(15): 4050-4058.

- [14] 陈三达, 乔娟娟, 陆耕宇, 等. 大孔树脂富集纯化黄酮类化合物的研究进展 [J]. 广州化工, 2021, 49(17): 9-13.
- [15] 刘丹, 吴叶红, 李玮桓, 等. 大孔吸附树脂在天然产物分离纯化中的应用 [J]. 中草药, 2016, 47(15): 2764-2770.
- [16] 侯小涛, 韦棫婷, 夏中尚, 等. 基于血清药物化学的厚藤治疗急性痛风性关节炎质量标志物研究 [J]. 中草药, 2021, 52(9): 2638-2652.
- [17] Li J, Wang S P, Wang Y Q, *et al.* Comparative metabolism study on chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid and neochlorogenic acid using UHPLC-Q-TOF MS coupled with network pharmacology [J]. *Chin J Nat Med*, 2021, 19(3): 212-224.
- [18] Li W L, Wu Y, Liu Y S, *et al.* Chemical profiles and screening of potential α -glucosidase inhibitors from Sichuan pepper using ultra-filtration combined with UHPLC-Q-TOF [J]. *Ind Crops Prod*, 2020, 143: 111874.
- [19] 周孟焦, 何鑫柱, 李朝俊, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术的竹叶花椒果皮中黄酮类成分分析 [J]. 食品工业, 2023, 44(2): 308-311.
- [20] Wu T, Lv H Y, Wang F Z, *et al.* Characterization of polyphenols from *Lycium ruthenicum* fruit by UPLC-Q-TOF/MS(E) and their antioxidant activity in Caco-2 cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(11): 2280-2288.
- [21] 王燕. 基于 LC-MS 的中药多酚类化合物结构解析方法及应用研究 [D]. 昆明: 云南中医药大学, 2023.
- [22] 蒋彤, 朱童, 滕菲, 等. 广枣果皮总原花青素纯化工艺及成分鉴定研究 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(12): 2923-2930.
- [23] Chang Y Q, Zhang D, Yang G Y, *et al.* Screening of anti-lipase components of *Artemisia argyi* leaves based on spectrum-effect relationships and HPLC-MS/MS [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 675396.
- [24] Singh A, Singh P, Kumar B, *et al.* Detection of flavonoids from *Spinacia oleracea* leaves using HPLC-ESI-QTOF-MS/MS and UPLC-QqQ-LIT-MS/MS techniques [J]. *Nat Prod Res*, 2019, 33(15): 2253-2256.
- [25] 魏海蓉, 易锡斌, 谭钺, 等. 基于 UPLC-MS/MS 技术对蓝莓中花青苷类物质的定性定量分析 [J]. 山东农业科学, 2021, 53(3): 122-126.
- [26] Hou X Y, Zhang Y, Peng Z X, *et al.* Fingerprinting of hydroxyl-sanshools in fried pepper oils by HPLC-DAD in combination with chemometrics [J]. *LWT*, 2023, 183: 114935.
- [27] 杜文倩, 史波林, 欧克勤, 等. 基于麻味物质构成特征的红花椒高效液相色谱指纹图谱建立研究 [J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(3): 1138-1144.
- [28] 杨清山, 翟彦伟, 栗星, 等. 花椒及其提取物中花椒麻素的 HPLC 测定方法 [J]. 食品工业, 2019, 40(8): 328-332.
- [29] Zhao Z F, Zhu R X, Zhong K, *et al.* Characterization and comparison of the pungent components in commercial *Zanthoxylum bungeanum* oil and *Zanthoxylum schinifolium* oil [J]. *J Food Sci*, 2013, 78(10): C1516-C1522.
- [30] 李阳昱, 李庆蓉, 陈孝红, 等. 绿原酸抗菌作用及机制的研究进展 [J]. 中国抗生素杂志, 2024, 49(2): 141-150.
- [31] 王健, 张珍珍, 梅秀珍, 等. 黄酮类化合物的抗菌作用及机制研究进展 [J]. 江苏农业科学, 2023, 51(1): 1-8.
- [32] 蒋燕. 冷榨藤椒油饼粕再利用价值初探 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2016.
- [33] 王春霞. 藤椒冷榨油饼粕中多酚、多糖的提取纯化及体外抗氧化活性研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2017.
- [34] 赵志峰, 吴奇霄, 刘福权. 一种从花椒油加工副产物中提取黄酮类抗氧化剂的方法: 中国, CN109453253B [P]. 2021-06-18.

[责任编辑 郑礼胜]