

熊诗蓓, 邓闯, 范益飞, 等. 山茶各部位黄酮提取工艺优化及提取物成分分析 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(15): 168–179. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023070010

XIONG Shibei, DENG Chuang, FAN Yifei, et al. Extraction Optimization of Flavonoid Compounds from Various Parts of *Camellia japonica* and Constituent Analysis of the Extracts[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(15): 168–179. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023070010

· 工艺技术 ·

山茶各部位黄酮提取工艺优化及 提取物成分分析

熊诗蓓, 邓 闯, 范益飞, 杨灵光*

(宜春学院化学与生物工程学院, 江西宜春 336000)

摘 要:目的: 优化山茶花瓣、叶和花蕊三部位黄酮提取量, 比较抗氧化活性并分析其化学成分。方法: 以总黄酮提取量为评价指标, 通过单因素实验和正交试验优化超声波辅助酶解法黄酮提取工艺。采用 DPPH、ABTS⁺自由基清除实验和还原力实验评价优化后总黄酮提取物的抗氧化能力。通过超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用技术 (UPLC-QTOF-MS/MS) 分析各部位的化学成分。结果: 在最优提取工艺下, 山茶各部位总黄酮提取量依次为叶 (63.14 RE mg/g) > 花蕊 (58.77 RE mg/g) > 花瓣 (20.26 RE mg/g)。抗氧化活性测定结果表明, 花瓣、叶、花蕊中黄酮清除 DPPH 自由基的 IC₅₀ 值分别为 7.28、2.51、1.15 mg/mL, 清除 ABTS⁺自由基的 IC₅₀ 值分别为 2.85、0.95、0.59 mg/mL, 还原力分别为 63.25、214.11、475.90 Trolox mg/g, 其抗氧化强弱顺序为: 花蕊 > 叶 > 花瓣。通过 UPLC-QTOF-MS/MS 从花瓣、叶、花蕊三部位共鉴定出 29 种化合物, 且 B 型原花青素二聚体、表儿茶素、槲皮素-3-O-半乳糖苷等黄酮单体化合物在三个部位中的分布规律与总黄酮提取量一致。结论: 超声波辅助酶法能够有效提高黄酮类化合物的提取量, 且山茶的叶和花蕊部位具有较高黄酮含量及抗氧化活性。

关键词:山茶, 不同部位, 黄酮类化合物, 超声波辅助酶法, 抗氧化活性, UPLC-QTOF-MS/MS

中图分类号: TS201.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2024)15-0168-12

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023070010



本文网刊:

Extraction Optimization of Flavonoid Compounds from Various Parts of *Camellia japonica* and Constituent Analysis of the Extracts

XIONG Shibei, DENG Chuang, FAN Yifei, YANG Lingguang*

(College of Chemistry and Bioengineering, Yichun University, Yichun 336000, China)

Abstract: Objective: To optimize the extraction amount of flavonoid from petals, leaves, stamens and pistils of *Camellia japonica*, respectively, and compare the antioxidant activity and analyze the chemical constituents of the extracts. Method: The total flavonoids extraction amount was used as evaluation index, and single-factor experiments and orthogonal tests were used to optimize the ultrasonic-assisted enzymatic extraction process of flavonoids. The antioxidant capacity of optimized flavonoids extract was evaluated by DPPH and ABTS⁺ free radical scavenging and reducing power experiment. And the chemical constituents of extracts from each part were qualitatively analyzed by ultra-performance-liquid-chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-QTOF-MS/MS). Results: In the optimum extraction condition, the total flavonoids extraction amount from each part of *Camellia japonica* were in the order as follows: Leaves (63.14 RE mg/g) > stamens and pistils (58.77 RE mg/g) > petals (20.26 RE mg/g). Meanwhile, the results of antioxidant activity determination showed that the IC₅₀ values of DPPH and ABTS⁺ free radical scavenging assay of extracts from petals, leaves, stamens and pistils were 7.28, 2.51, 1.15 mg/mL, and 2.85, 0.95, 0.59 mg/mL, respectively. And the reducing power value of extracts from petals, leaves, stamens and pistils were 63.25, 214.11, 475.90 Trolox mg/g. Therefore, the

收稿日期: 2023-07-04

基金项目: 江西省教育厅科学技术研究青年项目 (GJJ211644, GJJ2201743); 宜春学院大学生创新创业项目 (X202310417007, X202310417002)。

作者简介: 熊诗蓓 (1999-), 女, 大学本科, 研究方向: 植物次生代谢, E-mail: x18162241076@163.com。

* 通信作者: 杨灵光 (1992-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 植物次生代谢与蛋白质结构生物学, Email: yanglingguangxdjqz@163.com。

antioxidant activities of the extracts were in the order of stamens and pistils>leaves>petals. At last, a total of 29 flavonoid-related compounds were identified from the three parts by UPLC-QTOF-MS/MS, and the distribution pattern of B-type procyanidin dimer, epicatechin, quercetin-3-O-galactoside and some other flavonoid compounds in the three parts was consistent with that of total flavonoids extraction amount. Conclusion: Ultrasound-assisted enzymatic extraction effectively improved the extraction amount of flavonoids, and the leaves and stamens and pistils parts of *Camellia japonica* possessed higher flavonoid contents and stronger antioxidant activity.

Key words: *Camellia japonica*; different parts; flavonoids; ultrasound-assisted enzymatic extraction; antioxidant activity; UPLC-QTOF-MS/MS

山茶(*Camellia japonica* L.)为山茶科山茶属的植物,又名洋茶、山茶花,常绿灌木或小乔木,广泛分布于中国台湾、山东、江西等地,常作为城市绿化和校园观赏树种。同时也是现代纺织染色、化妆品及食品等领域的重要资源^[1-3]。山茶具有多种药理活性,包括抗氧化、抗肿瘤、抗大鼠肝纤维化、抗血小板聚集和抑制血栓等^[4]。其生物活性成分主要是黄酮、多酚和生物碱等化合物^[5]。由于黄酮类化合物具有高效清除自由基和抑制活性氧的能力,被看作是自然界中抗氧化作用较强的一类天然化合物^[6-8],故对山茶中黄酮类物质进行高效提取具有广阔的应用前景。研究表明,存在于植物不同部位黄酮含量通常存在一定的差异^[9-10],通过研究各部位黄酮含量可最大程度地开发天然产物的价值。近年关于山茶的研究主要集中于花瓣和种籽中化学成分的提取、鉴定及抗氧化能力评价等方面^[11-13],而对山茶各部位黄酮类化合物的比较分析研究相对较少。因此,亟需系统分析对比山茶各部位黄酮含量及化学成分,从而服务于山茶资源的全方位深度开发利用。

目前,多种从植物中提取黄酮类化合物的方法得到报道,包括超声波提取法^[14]、微波提取法^[15]、回流提取法^[16]、酶法^[17]等。超声波提取法能够促进药材中活性成分的溶出,具有缩短提取时间、提高收率和避免高温破坏活性成分等优点^[18]。酶法能够破坏细胞壁从而加速有效成分的溶解,显著改善黄酮的提取量^[19]。超声波辅助酶法能够结合两者优势,提高生物活性成分的提取效率及提取量,是目前从植物中提取活性成分的研究热点。超声波辅助酶法已在湖北海棠叶^[20]、绿豆皮^[21]、桑叶^[22]等植物材料的黄酮提取过程中体现出较高效率,但尚未应用于山茶黄酮提取中。

综上所述,本实验以山茶的花瓣、叶和花蕊为研究对象,首次采用超声波辅助纤维素酶法优化提取山茶三部位中的总黄酮,并比较其抗氧化能力,通过超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱联用(UPLC-QTOF-MS/MS)技术对各部位提取液物质进行定性分析,探究其化学成分组成,为山茶在食品和化妆品等领域的深度开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

山茶‘赤丹’(*Camellia japonica* L. ‘chidan’, 经宜

春学院副教授尹培培鉴定) 采集于江西省宜春市宜春学院; 甲醇、乙腈 色谱纯, 天津市大茂化学试剂厂; 2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)、水溶性维生素 E(Trolox) 上海源叶生物科技有限公司; 2,2 联苯基-1-苦基肼基(DPPH) 上海阿拉丁生化科技有限公司; 芦丁标准品 北京博奥拓科技有限公司; 纤维素酶(10000 U/g) 上海化源世纪贸易有限公司; 其它试剂均为分析纯。

Tecan Infinite 200 多功能酶标仪 瑞士帝肯公司; UPLC-QTOF-MS/MS 美国安捷伦公司; KQ 2200E 超声波提取仪 昆山市超声仪器。

1.2 实验方法

1.2.1 山茶的预处理 将山茶(图 1a)清水洗净后分为花瓣(图 1b)、叶(图 1c)和花蕊(图 1d)三部分,将三组样品于 105 ℃ 烘箱杀青 15 min,置于 60 ℃ 烘箱干燥后粉碎并称重保存至-20 ℃ 冰箱。



图 1 山茶各部位外观性状

Fig.1 Morphological traits of different parts of *C. japonica*
注: a 山茶花; b 花瓣; c 叶; d 花蕊。

1.2.2 总黄酮的提取 准确称取山茶的花瓣、叶、花蕊样品各 0.5 g, 分别置于 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 纤维素酶溶液(pH4.8), 50 ℃ 加热酶解 15 min。100 ℃ 水浴灭酶 30 s, 加入 10 mL 95% 乙醇溶液置于恒定功率 100 W 超声波提取仪中, 并在不同的超声温度和超声时间下进行提取, 过滤得上清液, 于冰箱 4 ℃ 保存备用。

1.2.3 总黄酮提取量的测定 参考尹培培等^[23]方法并稍加改动。取 120 μ L 的芦丁标准品和样品溶液于 96 孔板, 加入 8 μ L 亚硝酸钠溶液(0.05 g/mL)在室温下反应 6 min, 再加入 8 μ L 氢氧化铝溶液(0.1 g/mL)反应 5 min, 最后加入 100 μ L 氢氧化钠溶

液(0.04 g/mL)反应 30 min, 于 410 nm 波长下用酶标仪检测, 每份样品重复三次。以芦丁标准溶液的浓度 $C(\text{mg/L})$ 为横坐标, 吸光度值 A 为纵坐标, 绘制得到回归方程曲线 $y=0.0043x+0.0551$, 决定系数 $R^2=0.9997$ 。总黄酮提取量用芦丁当量(rutin equivalent, RE)表示, 表达为 RE mg/g, 按公式(1)计算总黄酮提取量。

$$\text{总黄酮提取量(RE mg/g)} = (C \times V \times N) / m \quad \text{式 (1)}$$

式中: C 为总黄酮提取液的质量浓度, mg/mL; V 为总黄酮提取液的体积, mL; N 为稀释倍数; m 为样品的质量, g。

1.2.4 单因素实验设计 参照 1.2.2 中方法进行总黄酮提取, 固定其他条件(纤维素酶含量 25 U/mL, 超声温度 40 ℃, 超声时间 30 min)依次考察不同超声温度(20、40、60、80 ℃)、不同超声时间(10、30、50、70 min)、不同含量的纤维素酶(15、25、35、45 U/mL)对山茶各部位总黄酮提取量的影响。提取量以 1.2.3 中方法进行计算。

1.2.5 正交试验设计 在单因素实验基础上, 选用 $L_9(3^4)$ 正交表, 以总黄酮提取量为指标, 选取酶含量、超声温度和超声时间进行正交试验, 以确定山茶各部位黄酮的最佳提取工艺。因素水平见表 1。

表 1 正交试验因素水平表
Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平	A 超声温度(℃)	B 超声时间(min)	C 酶含量(U/mL)
1	40	10	15
2	60	30	25
3	80	50	35

1.2.6 抗氧化活性的测定

1.2.6.1 DPPH 自由基清除能力测定 参照尹培培等^[23]的方法, 稍作修改。花瓣、叶、花蕊各样品溶液按照 1.2.5 正交试验确定的最佳工艺进行提取, 提取液以提取溶剂(47.5% 乙醇)进行稀释, 用于后续的抗氧化活性鉴定。取 Trolox 标准溶液、稀释至合适倍数的样品溶液和空白溶液各 10 μL 于 96 孔板中, 依次加入 40 μL 的 DPPH 甲醇溶液和 190 μL 的甲醇溶液, 避光静置 30 min 后, 使用酶标仪在 517 nm 波长处进行检测, 每组实验重复三次。以 Trolox 溶液浓度($\mu\text{g/mL}$)作横坐标, DPPH 自由基清除率(%)作纵坐标, 绘制得到回归方程曲线 $y=0.2215x+0.4905$, 决定系数 $R^2=0.9988$ 。按照公式(2)计算清除率。

$$\text{DPPH 自由基清除率(}\%) = (A_0 - A_s) / A_0 \times 100 \quad \text{式 (2)}$$

式中: A_s 为提取物溶液吸光度值, A_0 为空白溶液吸光度值。

1.2.6.2 ABTS⁺自由基清除能力测定 参照尹培培等^[23]的方法, 样品溶液提取方法同 1.2.6.1。分别取 Trolox 标准溶液、样品溶液和空白溶液各 5 μL 加入

到 200 μL 的 ABTS 标准溶液中, 混匀后避光静置 5 min, 测定其在 734 nm 波长处的吸光度值, 每组实验重复三次。以 Trolox 溶液浓度($\mu\text{g/mL}$)作横坐标, ABTS⁺自由基清除率(%)作纵坐标, 绘制得到回归方程曲线 $y=0.1616x-0.8973$, 决定系数 $R^2=0.9993$ 。按照公式(3)计算清除率。

$$\text{ABTS}^+ \text{ 自由基清除率(}\%) = (A_0 - A_s) / A_0 \times 100 \quad \text{式 (3)}$$

式中: A_s 为提取物溶液吸光度值, A_0 为空白溶液吸光度值。

1.2.6.3 还原力清除能力测定 参照尹培培等^[23]的方法, 以 Trolox 作标准品, 样品溶液提取方法同 1.2.6.1。在 400 μL 的样品溶液中依次加入磷酸缓冲液和铁氰化钾溶液, 充分混匀后于 50 ℃ 水浴中静置 20 min; 再加入 500 μL 三氯乙酸溶液并静置 10 min。量取 1000 μL 上清液, 加入 1000 μL 的蒸馏水和 200 μL 的氯化铁溶液充分混匀, 于 700 nm 波长处进行检测, 吸光度值越大, 表明还原力越强。以 Trolox 浓度($\mu\text{g/mL}$)为横坐标, 吸光度值(A)为纵坐标, 绘制得到回归方程曲线 $y=0.001x+0.0298$, 决定系数 $R^2=0.9957$ 。样品的还原力抗氧化活性表示为 Trolox mg/g, 按照公式(4)计算当量。

$$\text{还原力(Trolox mg/g)} = (C \times V \times N) / m \quad \text{式 (4)}$$

式中: C 为总黄酮提取液的质量浓度, mg/mL; V 为总黄酮提取液的体积, mL; N 为稀释倍数; m 为样品的质量, g。

1.2.7 UPLC-QTOF-MS/MS 成分分析

1.2.7.1 样品的制备 取花瓣、叶、花蕊各 0.5 g, 按照 1.2.5 正交试验确定的最佳工艺进行提取, 将提取液过滤, 取 2 mL 上清液涡旋 2 次, 用微孔滤膜(0.22 μm)滤过后进样。

1.2.7.2 色谱和质谱采集条件 参照 Hong 等^[24]的方法, 稍作修改。色谱柱: Agilent C_{18} 色谱柱(2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.8 μm), 扫描波长为 190~400 nm。流动相 A 为乙腈溶液, 流动相 B 为 0.1% 甲酸水溶液, 梯度洗脱程序: 0~15 min, 98%~80% B; 15~20 min, 80%~60% B; 20~25 min, 60%~20% B; 25~27 min, 20%~0% B; 27~27.1 min, 0%~98% B; 27.1~30 min, 98% B。流速为 0.3 mL/min, 提取物溶液的进样量为 5 μL 。

质谱条件: 电喷雾离子源扫描方式, 采用负离子模式(ESI^-), 毛细管电压为 3.5 kV, 离子源加热温度为 320 ℃, 锥孔电压为 65 V, 碰撞能量为 25 eV, 扫描范围为 100~1700 m/z 。根据总离子扫描图确定母离子, 再通过二级质谱分析, 找出二级质谱中响应信号较强的碎片离子与已有文献和 Metlin、HMDB 等液质数据库对比, 以确定化合物的主要成分。对各化合物总离子流色谱峰进行积分得到峰面积, 并对三个部位中各化合物峰面积进行整体归一化。将最小峰

面积归一化为 1, 得到其他化合物峰面积的对应倍数, 以此进行相对含量描述。

1.3 数据处理

本研究实验均重复三次, 实验结果以平均值 $\pm$ 标准差(SD)表示。采用软件 SPSS 22.0 进行单因素方差分析(one-way ANOVA)和 IC_{50} 的计算, $P<0.05$ 被设定为差异显著。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 超声温度对总黄酮提取量的影响 由图 2 可知, 超声温度对山茶各部位黄酮的提取具有较大影响, 在 20~80 $^{\circ}\text{C}$ 范围内, 花瓣(图 2A)总黄酮提取量随超声温度的增加呈先上升后平稳的趋势, 在 60 $^{\circ}\text{C}$ 时达到最大值; 叶(图 2B)和花蕊(图 2C)总黄酮提取量随超声温度的升高而先呈现增加趋势, 在 60 $^{\circ}\text{C}$ 时总黄酮提取量达到最高, 此后随着温度的继续上升,

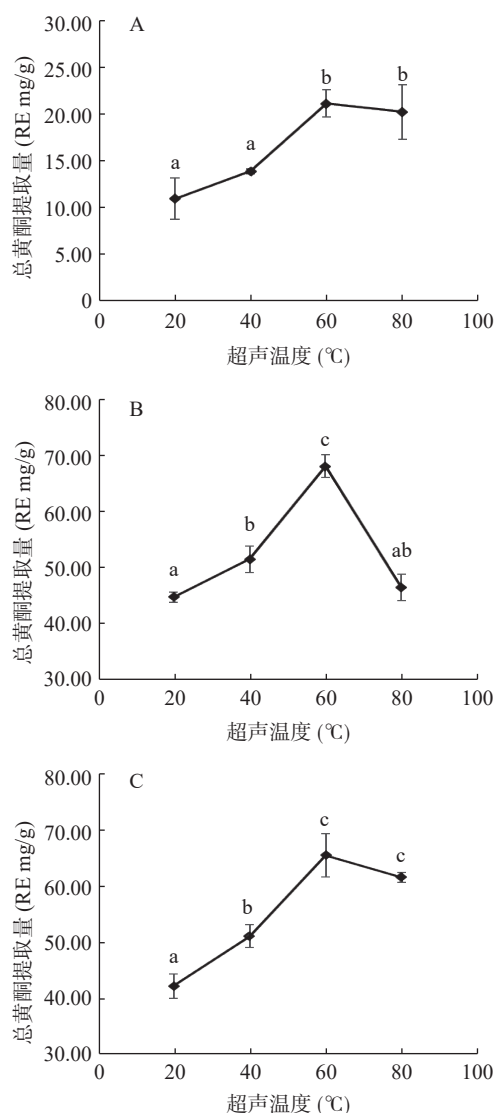


图 2 超声温度对山茶各部位总黄酮提取量的影响

Fig.2 Effect of ultrasonic temperature on the extraction amount of total flavonoids in various parts of *C. japonica*

注: A: 花瓣, B: 叶, C: 花蕊; 不同小写字母间表示具有显著性差异($P<0.05$), 图 3~图 7 同。

样品中的黄酮类溶出量呈显著性下降($P<0.05$)。高温有利于黄酮类物质的溶出, 一定范围内温度上升越高, 分子热运动速度越快, 总黄酮提取量越高。但是当温度超出一定范围后, 过高温会导致黄酮类物质内部结构被破坏, 导致提取量降低^[25]。综上所述, 从提取效率和条件可控性方面考虑, 以超声温度 40、60、80 $^{\circ}\text{C}$ 进行正交试验。

2.1.2 超声时间对总黄酮提取量的影响 由图 3 可知, 山茶各部位总黄酮提取量随着超声时间的增加而逐渐增加, 在 10~30 min 范围内增长速度较快, 此时花瓣、叶、花蕊细胞壁逐渐被破坏, 在超声波作用下黄酮类物质不断溶出。当超声时间继续增加时, 花瓣(图 3A)和叶(图 3B)两部位的总黄酮提取量在 50 min 后, 花蕊(图 3C)在 30 min 后呈下降趋势。在过长的超声时间下, 黄酮类化合物会氧化、分解, 致使总黄酮提取量减少^[26]。综上所述, 从总黄酮提取量、节约时间和成本等方面考虑, 选择超声时间 10、30、50 min 进行正交试验。

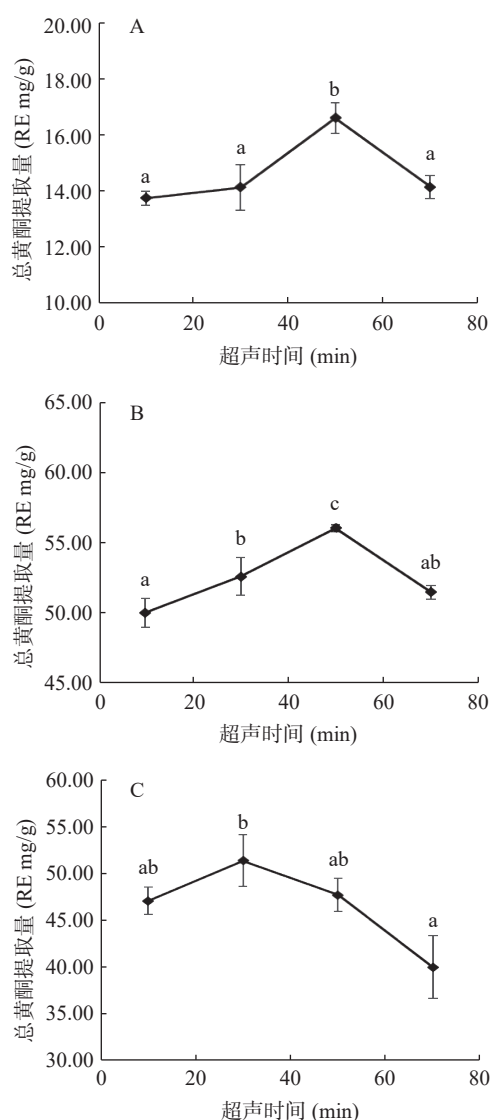


图 3 超声时间对山茶各部位总黄酮提取量的影响

Fig.3 Effect of ultrasonic time on the extraction amount of total flavonoids in various parts of *C. japonica*

2.1.3 酶含量对总黄酮提取量的影响 从图 4 中可以看出,在纤维素酶含量 15~35 U/mL 范围时,随着酶含量增加的越多,各部位的总黄酮提取量均呈显著上升趋势($P<0.05$),这是由于纤维素酶能够催化植物细胞壁中 β -D-葡萄糖苷键的水解,改变细胞的通透性,酶含量增加时,酶会促进黄酮类物质与提取溶剂的接触,使黄酮提取效率增高;当酶含量超过 35 U/mL 后,花瓣(图 4A)、花蕊(图 4C)无显著性变化,趋于平稳状态,而叶(图 4B)中显著下降($P<0.05$)。这可能是因为酶浓度过高的情况下,过多的酶会覆盖在山茶花各部位的表面,阻碍黄酮类物质的溶出^[27]。综上所述,基于改善提取效率和节约材料的目的,选择纤维素酶含量 15、25、35 U/mL 进行正交试验。

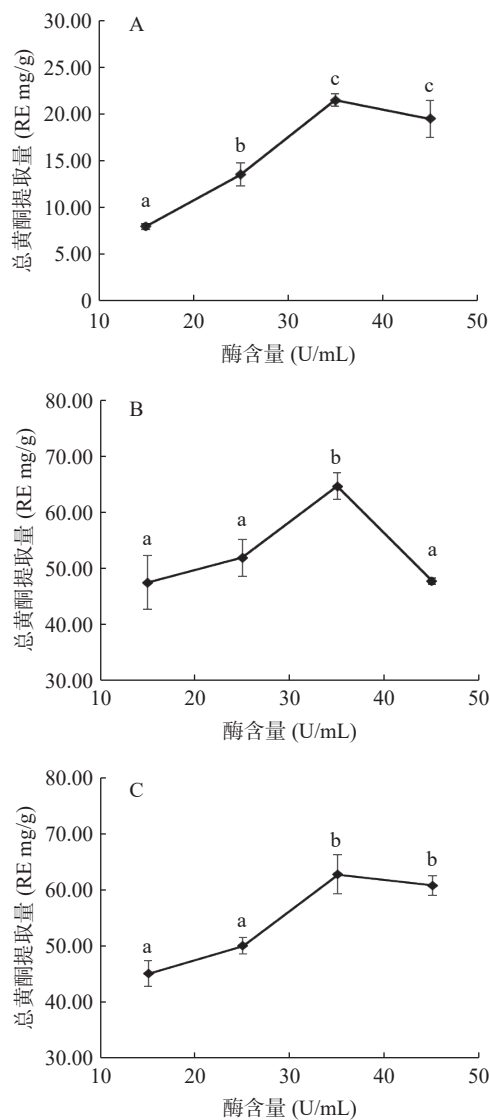


图 4 酶含量对山茶各部位总黄酮提取量的影响

Fig.4 Effect of enzyme contents on the extraction amount of total flavonoids in various parts of *C. japonica*

2.2 正交试验

2.2.1 正交试验优化提取工艺 正交试验优化结果如表 2 所示,以 $L_9(3^4)$ 正交试验设计。由极差分析结果可知,影响花瓣、叶、花蕊总黄酮提取量因素大

小顺序均为 A(超声温度)>B(超声时间)>C(酶含量)。花瓣部位总黄酮最佳提取工艺为 $A_2B_2C_2$, 即 60 ℃、30 min 和 25 U/mL; 叶部位为 $A_3B_2C_2$, 即 80 ℃、30 min 和 25 U/mL; 花蕊部位为 $A_3B_1C_3$, 即 80 ℃、10 min 和 35 U/mL。

表 2 正交试验结果
Table 2 Results of orthogonal experiment

试验号	A	B	C	空白	总黄酮提取量(RE mg/g)		
					花瓣	叶	花蕊
1	1	1	1	1	15.23	47.61	52.88
2	1	2	2	2	14.25	53.56	52.74
3	1	3	3	3	14.29	47.89	52.58
4	2	1	2	3	16.79	54.78	57.6
5	2	2	3	1	18.03	58.53	56.9
6	2	3	1	2	16.31	49.80	51.27
7	3	1	3	2	15.70	59.61	59.04
8	3	2	1	3	16.78	60.84	58.67
9	3	3	2	1	17.44	60.99	55.73
花瓣							
K ₁	14.59	15.91	16.11	16.90			
K ₂	17.04	16.35	16.16	15.42			
K ₃	16.64	16.01	16.01	15.95			
R	2.45	0.44	0.15	1.48			
叶							
K ₁	49.69	54.00	52.75	55.71			
K ₂	54.37	57.64	56.44	54.32			
K ₃	60.48	52.89	55.34	54.50			
R	10.79	4.75	3.69	1.39			
花蕊							
K ₁	52.73	56.51	54.27	55.17			
K ₂	55.26	56.10	55.36	54.35			
K ₃	57.81	53.19	56.17	56.28			
R	5.08	3.31	1.90	1.93			

2.2.2 正交试验结果的方差分析 对花瓣、叶、花蕊的正交试验结果进行方差分析,若 $P<0.05$,则具有显著性差异。结果如表 3 所示。花瓣和花蕊的三个因素均对黄酮的提取影响不显著,叶中仅 A(超声温度)对黄酮的提取影响显著($P<0.05$)。影响各部位总黄酮提取量的主次因素为 A(超声温度)>B(超声时间)>

表 3 正交试验结果方差分析
Table 3 Analysis of variance of orthogonal experimental results

因素	偏差平方和	自由度	F值	P值	显著性	
花瓣	A	10.36	2	3.07	0.25	
	B	0.32	2	0.10	0.91	
	C	0.04	2	0.01	0.99	
	误差	3.38	2			
叶	A	175.76	2	51.52	0.02	*
	B	37.06	2	10.86	0.08	
	C	21.58	2	6.33	0.14	
	误差	3.41	2			
花蕊	A	38.71	2	6.85	0.13	
	B	19.61	2	3.47	0.22	
	C	5.45	2	0.97	0.51	
	误差	5.65	2			

注:“*”表明因素影响显著, $P<0.05$ 。

C(酶含量),与直观分析结果一致。

2.2.3 验证实验 根据正交结果分析,筛选山茶各部位总黄酮提取的最佳工艺,制备 3 份平行试样,得到的花瓣、叶、花蕊总黄酮提取量分别为 20.26、63.14、58.77 RE mg/g,总黄酮提取量大小顺序依次为叶>花蕊>花瓣,且各部位中总黄酮提取量总体上高于正交试验表中 9 次结果,表明山茶黄酮提取优化工艺的可靠性和准确性。

本文采用超声波辅助酶法提取山茶的花瓣、叶、花蕊三个部位黄酮。与传统的提取工艺相比,采用超声波辅助法提取山茶中总黄酮工艺安全可靠,能缩短提取时间,且有效提高黄酮类物质的溶出速率。尚志春等^[28]采用传统溶剂法从南山茶中提取的总黄酮提取量仅达 1.52%,此法不仅耗时间长,且提取效率不高;Liu 等^[12]采用超声辅助法提取山茶叶中总黄酮,提取量可达 4.765%,奕志英等^[29]同样使用此法对山茶花、叶进行提取,其黄酮提取量可达 19.24 mg/g。可见,超声波辅助法在黄酮提取量上均高于传统溶剂提取法,本次实验在超声波辅助法的基础上结合酶法提取山茶各部位总黄酮,正交试验优化提取工艺下花瓣、叶、花蕊总黄酮提取量分别可达 20.26、63.14、58.77 RE mg/g,表明加入适当的酶能增加提取总黄酮的有效性。

2.3 花瓣、叶、花蕊总黄酮的抗氧化活性分析

2.3.1 花瓣、叶、花蕊总黄酮对 DPPH 自由基清除能力 山茶各部位总黄酮对 DPPH 自由基的清除作用结果如图 5 所示。在 0~25 mg/mL 范围内,花瓣中总黄酮(图 5A)对 DPPH 自由基的清除率随浓度的增

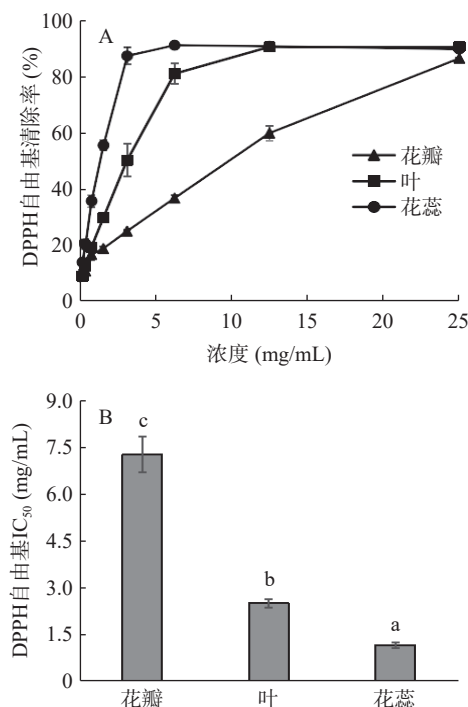


图 5 山茶各部位总黄酮对 DPPH 自由基的清除率

Fig.5 DPPH free radicals scavenging rate of total flavonoids from *C. japonica* at various parts

加而增加,在 25 mg/mL 时达到最高清除率为 87.44%;叶和花蕊总黄酮(图 5A)随浓度的增加其自由基清除率明显提高,并随浓度继续增加趋于平缓,其 DPPH 自由基清除率最高可分别达 90.65% 和 91.15%。经 SPSS 22.0 软件计算花瓣、叶、花蕊总黄酮对 DPPH 自由基清除的 IC_{50} 值分别为 7.28、2.51 和 1.15 mg/mL,叶和花蕊两部位的总黄酮对 DPPH 自由基的清除作用明显,清除效果显著高于花瓣 ($P<0.05$),即花蕊>叶>花瓣。

2.3.2 花瓣、叶、花蕊总黄酮对 ABTS⁺自由基清除能力 山茶各部位对 ABTS⁺自由基的清除作用结果如图 6 所示,在 0~25 mg/mL 时,各部位溶液的 ABTS⁺自由基清除率随浓度的增加明显增高,浓度继续增大时,花瓣和叶(图 6A)各浓度间清除率趋于平稳状态,而花蕊(图 6A)清除率呈下降趋势,花瓣、叶、花蕊清除率最高可分别达到 90.70%、90.99% 和 90.60%。经 SPSS 22.0 软件计算花瓣、叶、花蕊总黄酮对 ABTS⁺自由基清除的 IC_{50} 值分别为 2.85、0.95 和 0.59 mg/mL,故各部位总黄酮对 ABTS⁺自由基清除效果为花蕊>叶>花瓣。

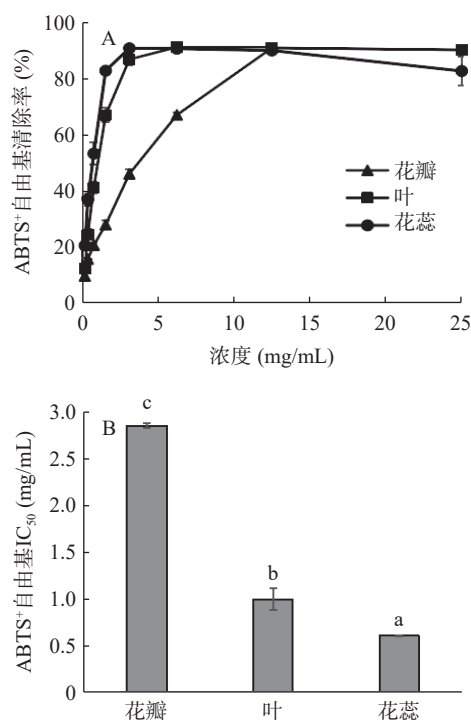


图 6 山茶各部位总黄酮对 ABTS⁺自由基的清除率

Fig.6 ABTS⁺ free radicals scavenging rate of total flavonoids from *C. japonica* at various parts

2.3.3 花瓣、叶、花蕊总黄酮还原力 山茶各部位总黄酮的还原力测定结果如图 7 所示,在 0~25 mg/mL 范围内,不同部位总黄酮的还原能力随浓度的增加而增加,提取液的浓度与总黄酮的还原力之间存在一定的量效关系,当浓度达到 25 mg/mL 时,花瓣、叶、花蕊(图 7B)的还原能力呈最大值,分别为 63.25、214.11、475.90 Trolox mg/g。经 SPSS 22.0 软件分析,各部

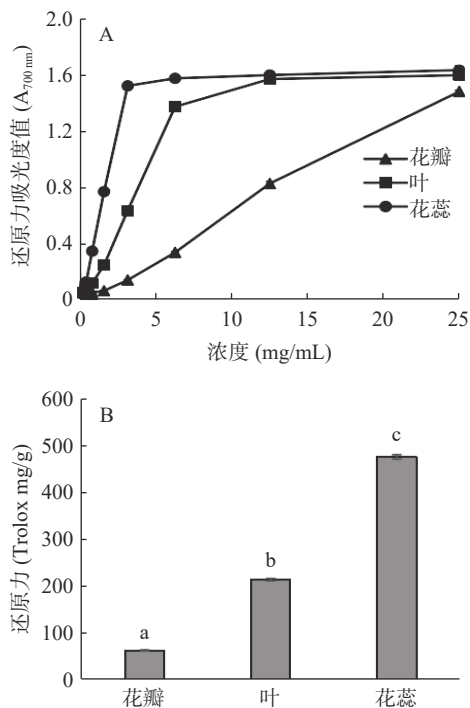


图 7 山茶各部位总黄酮的还原力
Fig.7 Reducing power of total flavonoids from *C. japonica* at various parts

位总黄酮的还原力当量存在显著性差异($P<0.05$), 综上可推断出还原能力顺序为花蕊>叶>花瓣。

黄酮类化合物是由植物通过次生代谢所产生的物质, 由于其特有的理化性质和生物活性常用于抑制过氧化物的形成, 是一类具有研究潜力的天然抗氧化剂。Liu 等^[12]、奕志英等^[29] 均通过观察山茶花对自由基的清除作用, 发现提取物中总黄酮的含量与 DPPH 自由基和羟基自由基清除能力存在明显的相关性, 结果与本研究一致。

2.4 UPLC-QTOF-MS/MS 物质分析

利用 UPLC-QTOF-MS/MS 技术分别对山茶的花瓣、叶和花蕊提取物中活性成分首先进行定性分析, 利用 Qualitative Analysis 10.0 质谱分析软件对总离子流图进行提取, 得到各化合物的母离子流图及碎片离子图谱, 结果如表 4、图 8~图 9 所示。共鉴定到 29 种化合物, 其中 10 种化合物在三个样品中均被鉴定到。

2.4.1 黄酮类化合物 在山茶各部位中共鉴定得到 21 种黄酮类物质, 其中在花瓣部位中鉴定得到 15 种, 而在叶部位中鉴定得到 14 种, 而花蕊部位中 13 种, 各部位鉴定出 8 种共有黄酮类化合物。其中,

表 4 山茶提取物的质谱分析
Table 4 Mass spectrometry analysis of extracts from *C. japonica*

类别	序号	保留时间(min)	化合物	分子式	分子离子(m/z)	碎片离子(m/z)	相对含量			液质鉴定参考文献
							花瓣	叶	花蕊	
黄酮类	1	5.222	儿茶素(Catechin)	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.07	109、123、137、151、203、245	18.91	9.80	35.90	An等 ^[30]
	2	6.042	B型原花青素二聚体(B-type procyanidin dimer)	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	577.13	289、407、425、451	5.88	29.18	7.74	Da等 ^[31]
	3	6.610	原花青素B ₂ (Procyanidin B ₂)	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	577.13	289、407、425、451	3.15	23.12	14.46	Da等 ^[31]
	4	7.220	表儿茶素(Epicatechin)	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.07	109、123、137、151、203、245	53.60	833.95	111.38	An等 ^[30]
	5	7.556	二氢山奈酚-半乳糖苷(Dihydrokaempferol-galactoside)	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	449.10	125、151、269、287	2.77	n.d.	n.d.	An等 ^[30]
	6	11.216	杨梅苷(Myricitrin)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463.08	287、316	12.40	n.d.	n.d.	Yang等 ^[32]
	7	11.363	芦丁(Rutin)	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609.14	151、300、301	1.00	318.73	24.84	Ren等 ^[33] Hao等 ^[34]
	8	11.510	槲皮素-3-O-半乳糖苷(Quercetin-3-O-galactoside)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463.08	255、300	14.30	105.84	81.36	Yang等 ^[32]
	9	11.869	儿茶素二聚体(Catechin dimer)	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	577.13	289、407、425、451	1.22	3.22	n.d.	An等 ^[30]
	10	11.953	槲皮素-3-O-葡萄糖苷(Quercetin-3-O-glucoside)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463.08	255、300	n.d.	153.30	40.77	Yang等 ^[32]
	11	12.374	槲皮素-3-O-阿拉伯呋喃糖苷(Quercetin-3-O-arabinofuranoside)	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	433.07	255、271、300	1.85	30.94	7.74	Yang等 ^[32]
	12	12.500	山奈酚-3-O-芦丁苷(Kaempferol-3-O-rutinoside)	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593.15	284、285	n.d.	3.68	49.76	Ren等 ^[33] Shen等 ^[35]
	13	12.795	木犀草苷(Luteoloside)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.09	151、227、255、285、447	5.72	10.60	45.96	Ren等 ^[33] Cao等 ^[36]
	14	12.963	槲皮素-3-O-阿拉伯吡喃糖苷(Quercetin-3-O-arabinopyranoside)	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	433.07	243、255、300	n.d.	12.36	n.d.	Yang等 ^[32]
	15	13.468	槲皮素-鼠李糖苷(Quercetin-rhamnosid)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.09	151、301	n.d.	10.34	23.97	An等 ^[30]
	16	13.489	紫云英苷(Astragalin)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.09	151、284、285	1.47	10.51	n.d.	Ren等 ^[33] Hao等 ^[34]
	17	13.529	槲皮素-3-O-鼠李糖苷(Quercetin-3-O-rhamnoside)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.09	255、271、300	1.42	n.d.	n.d.	Yang等 ^[32]
	18	14.054	山奈酚-鼠李糖苷(Kaempferol-rhamnoside)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431.09	151、285	1.23	n.d.	n.d.	An等 ^[30]

续表 4

类别	序号	保留时间 (min)	化合物	分子式	分子离子 (m/z)	碎片离子 (m/z)	相对含量			液质鉴定 参考文献
							花瓣	叶	花蕊	
酚酸类	19	15.464	山奈酚-3-O- α -L-鼠李糖苷 (Kaempferol-3-O- α -L-rhamnoside)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431.09	227、255、285	1.61	n.d.	n.d.	Yang等 ^[32]
	20	17.167	槲皮素(Quercetin)	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301.03	243、301	n.d.	n.d.	8.72	Yang等 ^[32]
	21	18.975	山奈酚(Kaempferol)	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.04	159、187、211、239	n.d.	n.d.	11.57	An等 ^[30]
	22	0.912	奎尼酸(Quinic acid)	C ₇ H ₁₂ O ₆	191.05	111、127	39.82	24.73	30.98	Yang等 ^[32]
	23	1.311	水杨酸-O-吡喃葡萄糖苷 (Salicylic acid-O-glucopyranoside)	C ₁₃ H ₁₆ O ₈	299.07	137、299	1.42	n.d.	n.d.	Cao等 ^[36] Sun等 ^[37]
	24	1.394	没食子酸(Gallic acid)	C ₇ H ₆ O ₅	169.01	125、169、241	n.d.	n.d.	6.48	Yang等 ^[32]
	25	4.107	咖啡酸-O-吡喃葡萄糖苷 (Caffeic acid-O-glucopyranoside)	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	341.08	135、179	5.69	n.d.	n.d.	Sun等 ^[37]
	26	4.759	原儿茶酸(Protocatechuic acid)	C ₇ H ₆ O ₄	153.01	108、109	n.d.	n.d.	4.77	An等 ^[30] Frolov等 ^[38]
	27	5.895	对香豆酸-O-吡喃葡萄糖苷 (p-Coumaric acid-O-glucopyranoside)	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	325.09	119、163	7.23	3.95	3.63	Sun等 ^[37]
	28	6.421	对香豆酸-O-葡萄糖基酯 (p-Coumaric acid-O-glucosyl ester)	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	325.09	119、163、205、235、 265	5.97	n.d.	n.d.	Sun等 ^[37]
	29	6.989	香草酸-O-吡喃葡萄糖苷 (Vanillic acid-O-glucopyranoside)	C ₁₄ H ₁₈ O ₉	329.08	123、167	2.68	n.d.	n.d.	Sun等 ^[37]

注: n.d.表示在此部位未检测到该成分。

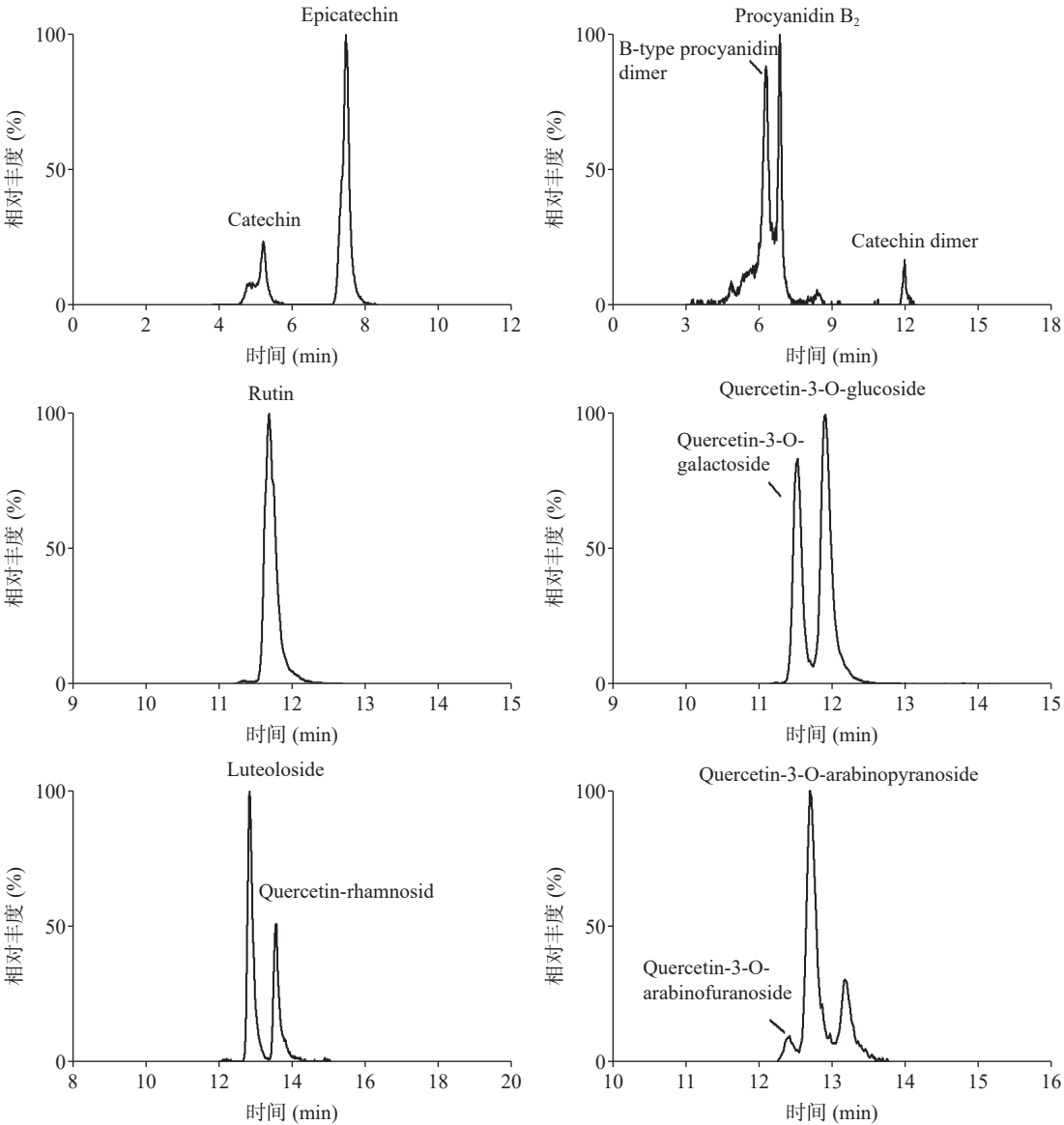


图 8 山茶提取物部分分子离子色谱图

Fig.8 Molecular ion chromatogram of extracts from *C. japonica*

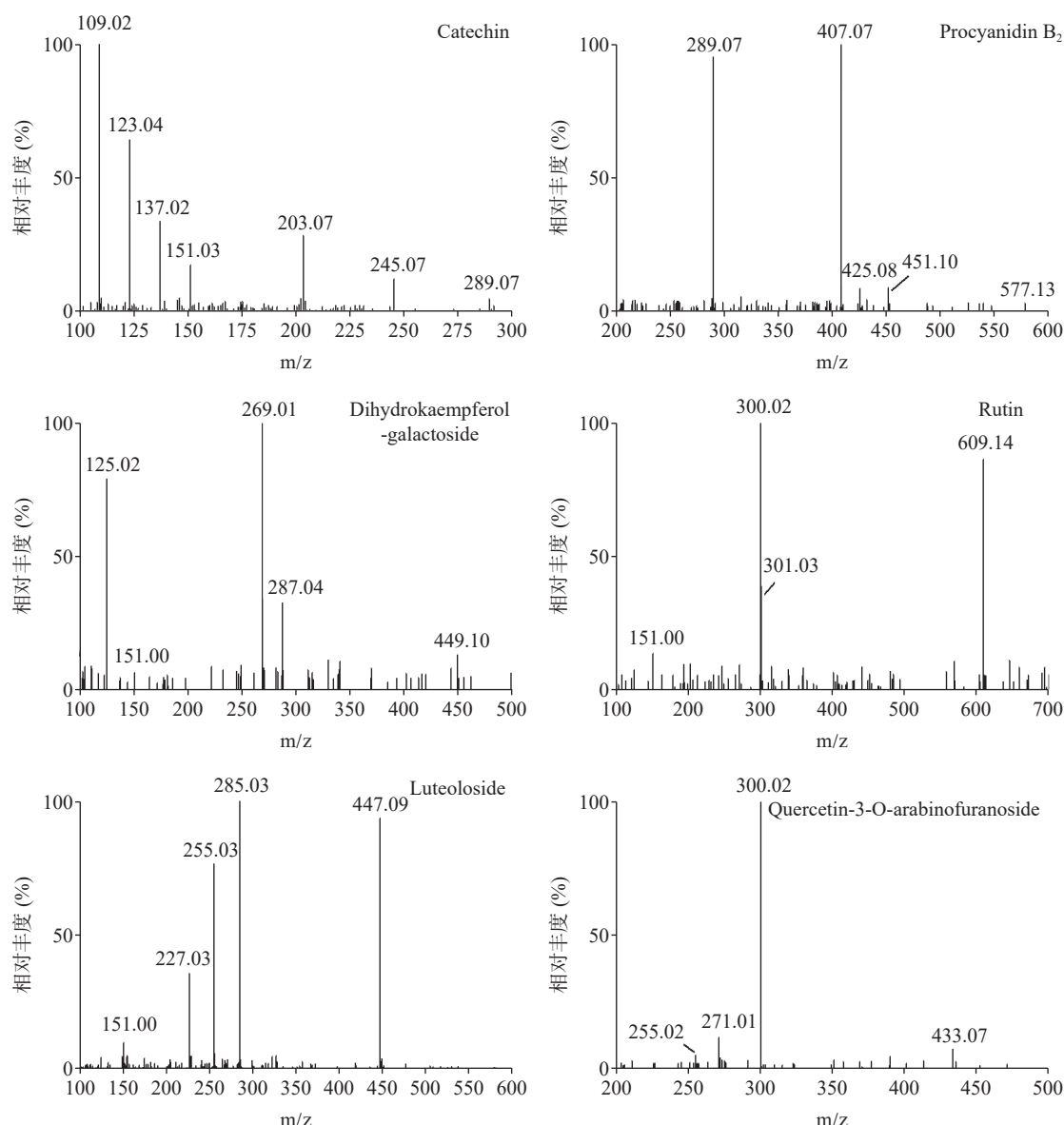


图9 山茶提取物部分碎片离子质谱图

Fig.9 Fragments ion mass spectra of extracts from *C. japonica*

儿茶素、木犀草苷成分在花蕊部位中的占比最大, B 型原花青素二聚体、原花青素 B₂、表儿茶素、芦丁、槲皮素-3-O-半乳糖苷、槲皮素 3-O-阿拉伯呋喃糖苷成分在叶部位中的占比最大。

以一级质谱中总离子流出峰时间在 5.222 min 的 1 号和 7.220 min 的 4 号化合物为例, 在此时间点时均有一个质荷比 $m/z=289.07$ 的较强的母离子峰, 其二级质谱中带有质荷比为 $m/z=109$ 、123、137、151、203 和 245 的碎片离子, 分别对应于 $C_{10}H_{12}O_3$ 、 $C_9H_{10}O_3$ 、 $C_8H_8O_3$ 、 $C_7H_6O_3$ 、 $C_4H_6O_2$ 和 CO_2 的缺失, 结合洗脱时间分别被鉴定为儿茶素和表儿茶素^[30]。儿茶素与表儿茶素是山茶中具有代表性的黄酮类成分, 报道具有多种生物活性^[30]。

由 2 号化合物 B 型原花青素二聚体和 3 号化合物原花青素 B₂ 可知, 两者一级谱图中的质核比 $m/z=577.13$, 其离子碎片 m/z 451 来自于 1,3,5-三羟基苯, 前体离子经过反应后, 失去了一个(表)儿茶素

单元, 产生 m/z 289 的碎片离子, 再根据 m/z 为 407 和 425 碎片离子鉴定以上两种化合物, 保留时间分别为 6.042 和 6.610 min^[31]。植物中的原花青素是由不同数量的儿茶素或表儿茶素结合而成的一种类黄酮化合物, 因具有抗氧化、抗炎症、保护心血管系统等多种药理作用可被应用于医疗领域^[39]。Hong 等^[24]通过 UPLC-QTOF-MS 技术也鉴定出山茶籽饼中含有原花青素 B₂ 成分。

2.4.2 酚酸类化合物 在山茶各部位中共鉴定得到 8 种酚酸类物质。其中在花瓣部位中鉴定得到 6 种, 叶部位中鉴定得到 2 种, 而花蕊部位中 4 种。

以一级质谱中总离子流出峰时间在 1.311 min 的 23 号、4.107 min 的 25 号、5.895 min 的 27 号和 6.989 min 的 29 号化合物为例, 均失去葡萄糖基后得到碎片离子, 23 号化合物得到质核比 m/z 为 137 和 299 的碎片离子, 25 号化合物得到质核比 m/z 为 135 和 179 碎片离子, 27 号化合物得到质核比 m/z

为 119、163 的碎片离子,29 号得到质核比 m/z 为 123、167 的碎片离子,并且根据已有文献的报道,初步鉴定 23 号化合物为水杨酸-O-吡喃葡萄糖苷,25 号化合物为咖啡酸-O-吡喃葡萄糖苷,27 号化合物为对香豆酸-O-吡喃葡萄糖苷,29 号化合物为香草酸-O-吡喃葡萄糖苷^[37];上述四种酚酸类化合物的裂解模式在 Cao 等^[36] 研究中也有报道。

综上所述,各部位液质鉴定结果表明,B 型原花青素二聚体、表儿茶素、槲皮素-3-O-半乳糖苷和槲皮-3-O-阿拉伯呋喃糖苷四种黄酮单体化合物在三个部位中的分布与总黄酮提取量一致,具有作为标志性活性物质的可能。此外,除鉴定出常见的几种黄酮类化合物之外,研究还发现了在天然山茶中少有报道的水杨酸-O-吡喃葡萄糖苷、木犀草苷和紫云英苷等化合物,且水杨酸-O-吡喃葡萄糖苷、咖啡酸-O-吡喃葡萄糖苷等均只存在于花瓣部位。

3 结论

本研究采用超声波辅助酶法提取山茶的花瓣、叶、花蕊三个部位黄酮,首先考察了酶含量、超声时间和超声温度等因素对总黄酮提取量的影响,并以正交试验进一步筛选出最佳提取工艺,在此条件下花瓣、叶、花蕊总黄酮提取量分别可达 20.26、63.14、58.77 RE mg/g。山茶各部位总黄酮提取物的抗氧化活性表明,山茶能够有效清除 DPPH 自由基和 ABTS⁺ 自由基,并且根据还原力测定实验,可综合判断各部位总黄酮提取物总体抗氧化活性大小依次为花蕊>叶>花瓣,说明各部位总黄酮提取物在均具有抗氧化活性的基础上,活性大小具有显著差异。通过 UPLC-QTOF-MS/MS 分析表明,从山茶各部位中共鉴定出 29 种化合物,包括儿茶素、表儿茶素、槲皮素-3-O-半乳糖苷等化学成分。其中 B 型原花青素二聚体、表儿茶素、槲皮素-3-O-半乳糖苷和槲皮-3-O-阿拉伯呋喃糖苷四种黄酮单体化合物在三个部位中的分布与总黄酮提取量一致,具有作为标志性活性物质的可能。

综上所述,超声波辅助酶法提取显著提升了山茶各部位总黄酮提取量,其提取物有显著的体外抗氧化作用。本研究进一步为山茶各部位的成分提取及生物活性探究提供了理论基础,并为推动山茶植物资源利用最大化进程做出贡献。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

[1] 刘明辉,房佳蕾,周秋宝,等.桑蚕丝织物的山茶花拓染[J].印染,2022,48(4):30-33. [LIU M H, FANG J L, ZHOU Q B, et al. Printing of mulberry silk fabric with *Camellia*[J]. *China Dyeing and Finishing*, 2022, 48(4): 30-33.]

[2] MIZUTANI T, MASAKI H. Anti-photoaging capability of antioxidant extract from *Camellia japonica* leaf[J]. *Experimental Dermatology*, 2014, 23: 23-26.

[3] 李留春.云南山茶花产业发展瓶颈及突破策略探析[J].林业调查规划,2010,35(2):69-72. [LI L C. Analysis on bottleneck for industrial development of *Camellia reticulata* and corresponding measures[J]. *Forest Inventory and Planning*, 2010, 35(2): 69-72.]

[4] 李丕睿,刘永芝,翟敏,等.山茶属华东山茶(*Camellia japonica* L.)研究进展[J].植物遗传资源学报,2016,17(6):1022-1030,1035. [LI P R, LIU Y Z, ZHAI M, et al. Recent advances in *Camellia japonica* L.[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2016, 17(6): 1022-1030,1035.]

[5] 王介华,张文华,肖强,等.长管红山茶叶片的化学成分研究[J].天然产物研究与开发,2023,35(2):236-241. [WANG J H, ZHANG W H, XIAO Q, et al. Chemical constituents from leaves of *Camellia longituba* Chang[J]. *Natural Product Research and Development*, 2023, 35(2): 236-241.]

[6] 苗润涵,靳萍,夏光辉.发酵处理对玉竹黄酮抗氧化活性的影响研究[J].中国林副特产,2023(2):16-20. [MIAO R H, JIN P, XIA G H. Study on the effects of different fermentation treatments on the antioxidant activity of flavonoids of *Polygonatum odoratum* [J]. *Forest by-Product and Speciality in China*, 2023(2): 16-20.]

[7] 许晓路,戴国庆,韦涵峰,等.双水相提取金银花叶总黄酮工艺优化及其抗氧化活性[J].食品工业科技,2023,44(13):242-248. [XU X L, DAI G Q, WEI H F, et al. Optimization of aqueous two-phase extraction technology of total flavonoids from *Lonicera japonica* Thunb. leaves and its antioxidant activity[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2023, 44(13): 242-248.]

[8] THITIMUTA S, PITHAYANUKUL P, NITHITANAKOOL S, et al. *Camellia sinensis* extract and its potential beneficial effects in antioxidant, anti-inflammatory, anti-hepatotoxic, and anti-tyrosinase activities[J]. *Molecules*, 2017, 22(3): 401.

[9] 郭小藤,刘燕,张清华,等.黄蜀葵花不同部位黄酮类成分含量的比较研究[J].食品与药品,2021,23(6):514-520. [GUO X T, LIU Y, ZHANG Q H, et al. Comparative study on contents of flavonoids in different parts of *Abelmoschi Corolla*[J]. *Food and Drug*, 2021, 23(6): 514-520.]

[10] 刘吉爽,张雅蓉,徐霖,等.葵花盘不同产地、不同部位总黄酮含量的变化分析[J].吉林中医药,2020,40(8):1080-1083. [LIU J S, ZHANG Y R, XU B, et al. Analysis of the change of total flavonoids content in *Helianthi Annu* Rhachis from different producing areas and different tissues[J]. *Jilin Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2020, 40(8): 1080-1083.]

[11] PÁSCOA R N M J, TEIXEIRA A M, SOUSA C. Antioxidant capacity of *Camellia japonica* cultivars assessed by near-and mid-infrared spectroscopy[J]. *Planta*, 2019, 249: 1053-1062.

[12] LIU Y, LUO X L, LAN Z Q, et al. Ultrasonic-assisted extraction and antioxidant capacities of flavonoids from *Camellia fascicularis* leaves[J]. *CyTA-Journal of Food*, 2018, 16(1): 105-112.

[13] 冯棋琴,汪有存,吴满梅,等.不同产地压榨山茶油活性成分比较分析[J].粮食与油脂,2020,33(4):54-57. [FENG Q Q, WANG Y C, WU M M, et al. Comparative analysis on active ingredients of *Camellia* oil from different areas[J]. *Cereals & Oils*, 2020, 33(4): 54-57.]

[14] 傅贤明,卢诗,黄欣,等.超声提取福鼎白茶总黄酮工艺优化

- 及抗氧化能力研究[J]. *粮食与油脂*, 2022, 35(12): 114-118, 122.
- [FU X M, LU S, HUANG X, et al. Study on ultrasonic extraction and antioxidant capacity of total flavonoids from Fuding white tea[J]. *Cereals & Oils*, 2022, 35(12): 114-118, 122.]
- [15] 于秋菊, 耿凤英, 张磊磊. 微波辅助低共熔溶剂提取覆盆子总黄酮的工艺优化及活性研究[J]. *中国食品添加剂*, 2023, 34(2): 43-51. [YU Q J, GENG F Y, ZHANG L L. Optimization of microwave assisted extraction of flavonoids from raspberry with deep eutectic solvents and its activity[J]. *China Food Additives*, 2023, 34(2): 43-51.]
- [16] 赫丁轩, 杨立军, 叶润, 等. 不同来源猫爪草总黄酮的提取工艺及其抗氧化活性研究[J]. *粮食与油脂*, 2023, 36(1): 101-105.
- [HE D X, YANG L J, YE R, et al. Study on the extraction technology and antioxidant activity of total flavonoids from different sources *Ranunculus ternatus* Thunb[J]. *Cereals & Oils*, 2023, 36(1): 101-105.]
- [17] FERRI M, RONDINI G, CALABRETTA M M, et al. White grape pomace extracts, obtained by a sequential enzymatic plus ethanol-based extraction, exert antioxidant, anti-tyrosinase and anti-inflammatory activities[J]. *New Biotechnology*, 2017, 39: 51-58.
- [18] 杨盛茹, 侯银臣, 张秋双, 等. 超声波辅助提取黄粉虫中黄酮类物质的工艺优化及黄酮类物质的稳定性[J]. *江苏农业学报*, 2023, 39(1): 229-237. [YANG S R, HOU Y C, ZHANG Q S, et al. Study on optimization of ultrasonic assisted extraction process and stability of flavonoids from *Tenebrio molitor*[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2023, 39(1): 229-237.]
- [19] 朱秀红, 韩钰, 茹广欣. 超声波辅助纤维素酶提取泡桐花总黄酮工艺及其抗氧化研究[J]. *饲料研究*, 2022, 45(24): 73-78.
- [ZHU X H, HAN Y, RU G X. Ultrasound-assisted cellulase of extraction process of *Paulownia* flower total flavonoids and its antioxidant research[J]. *Feed Research*, 2022, 45(24): 73-78.]
- [20] 吕凯波, 张星雨, 乐薇, 等. 响应面优化超声波辅助酶法提取湖北海棠叶抗氧化物[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(4): 218-225.
- [LÜ K B, ZHANG X Y, LE W, et al. Optimization of ultrasound-assisted enzymatic method extraction of antioxidant from *Malus hupehensis* leaves by response surface methodology[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2023, 44(4): 218-225.]
- [21] 李侠, 邹基豪, 王大为. 响应面试验优化超声波-酶法提取绿豆皮黄酮类化合物工艺[J]. *食品科学*, 2017, 38(8): 206-212.
- [LI X, ZOU J H, WANG D W. Optimization of ultrasonic-assisted enzymatic extraction of flavonoids from mung bean coat[J]. *Food Science*, 2017, 38(8): 206-212.]
- [22] 董树国, 陆钊. 酶解-超声波-表面活性剂协同提取桑叶总黄酮工艺研究[J]. *中国酿造*, 2013, 32(8): 117-119. [DONG S G, LU Z. Enzymatic hydrolysis-ultrasound-surfactant extraction technology of total flavonoids from mulberry leaves[J]. *China Brewing*, 2013, 32(8): 117-119.]
- [23] 尹培培, 杨灵光, 王桂宏, 等. 两种芦笋不同部位酚类物质及抗氧化活性研究[J]. *食品研究与开发*, 2018, 39(21): 21-27.
- [YIN P P, YANG L G, WANG G H, et al. Study of phenolic compounds and antioxidant activities in different part of two asparagus[J]. *Food Research and Development*, 2018, 39(21): 21-27.]
- [24] HONG C C, CHANG C, ZHANG H, et al. Identification and characterization of polyphenols in different varieties of *Camellia oleifera* seed cakes by UPLC-QTOF-MS[J]. *Food Research International*, 2019, 126: 108614.
- [25] 章烨雯, 臧青民, 陈荣, 等. 表面活性剂辅助超声波提取橘红胎总黄酮工艺优化及其抗氧化活性[J]. *中国食品添加剂*, 2022, 33(9): 83-90. [ZHANG Y W, ZANG Q M, CHEN R, et al. Optimization of surfactant-assisted ultrasonic extraction of total flavonoids from *Citri grandis* exocarpium fruitlet and its antioxidant activity[J]. *China Food Additives*, 2022, 33(9): 83-90.]
- [26] 郝可欣, 胡文忠, 张清洁, 等. 响应面法优化超声辅助提取代花总黄酮的工艺及其抗氧化活性研究[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(24): 159-164, 171. [HAO K X, HU W Z, ZHANG Q J, et al. Optimization of the ultrasonic-assisted extraction of total flavonoids from *Citrus aurantium* L. var *daidai* by response surface methodology and its antioxidant activity[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(24): 159-164, 171.]
- [27] 王佰灵, 陈雅婧, 谢家星, 等. 超声波辅助纤维素酶提取金荞麦总黄酮工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. *粮食与油脂*, 2021, 34(4): 123-128. [WANG B L, CHEN Y X, XIE J X, et al. Ultrasound-assisted cellulase optimization of extraction process of total flavonoids from *Fagopyrum dibotrys* Hara (D. Don) and its antioxidant activity research[J]. *Cereals & Oils*, 2021, 34(4): 123-128.]
- [28] 尚志春, 王宝昌, 张微微, 等. 正交试验优选南山茶花中总黄酮的提取工艺[J]. *中国药房*, 2013, 24(27): 2526-2528. [SHANG Z C, WANG B C, ZHANG W W, et al. Optimization of extraction technology of total flavonoids from the flowers of *Camellia semiserata* by orthogonal test[J]. *China Pharmacy*, 2013, 24(27): 2526-2528.]
- [29] 奕志英, 高宏旗, 张春雷, 等. 山茶花、叶中抗氧化物质的提取及稳定性初步研究[J]. *香料香精化妆品*, 2020(2): 12-17, 21.
- [YI Z Y, GAO H Q, ZHANG C L, et al. Preliminary study on the extraction and stability of antioxidant substances from *Camellia japonica* flowers and leaves[J]. *Flavour Fragrance Cosmetics*, 2020(2): 12-17, 21.]
- [30] AN L, ZHANG W, MA G W, et al. Neuroprotective effects of *Camellia nitidissima* Chi leaf extract in hydrogen peroxide-treated human neuroblastoma cells and its molecule mechanisms[J]. *Food Science & Nutrition*, 2020, 8(9): 4782-4793.
- [31] DA S G S, CANUTO K M, RIBEIRO P R V, et al. Chemical profiling of guarana seeds (*Paullinia cupana*) from different geographical origins using UPLC-QTOF-MS combined with chemometrics[J]. *Food Research International*, 2017, 102: 700-709.
- [32] YANG L G, YIN P P, FAN H, et al. Response surface methodology optimization of ultrasonic-assisted extraction of *Acer truncatum* leaves for maximal phenolic yield and antioxidant activity[J]. *Molecules*, 2017, 22(2): 232.
- [33] REN M C, XU W, ZHANG Y P, et al. Qualitative and quantitative analysis of phenolic compounds by UPLC-MS/MS and biological activities of *Pholidota chinensis* Lindl[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2020, 187: 113350.
- [34] HAO J, NA R, SUN L, et al. Chemical profile and quantitative comparison of constituents in different medicinal parts of *Lactuca indica* during varied harvest periods using UPLC-MS/MS method[J]. *Food Chemistry: X*, 2023, 20: 101031.
- [35] SHEN W, LI S Y, PAN Y Q, et al. *Prinsepia utilis* Royle leaf extract: Ameliorative effects on allergic inflammation and skin lesions in allergic contact dermatitis and polyphenolic profiling

through UPLC-MS/MS coupled to chemometric analysis[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2023, 305: 116093.

[36] CAO S S, HU M, YANG L L, et al. Chemical constituent analysis of *Ranunculus sceleratus* L. using ultra-high-performance liquid chromatography coupled with quadrupole-orbitrap high-resolution mass spectrometry[J]. *Molecules*, 2022, 27(10): 3299.

[37] SUN H Y, LIU M X, LIN Z T, et al. Comprehensive identification of 125 multifarious constituents in Shuang-huang-lian powder injection by HPLC-DAD-ESI-IT-TOF-MS[J]. *Journal of Phar-*

maceutical and Biomedical Analysis, 2015, 115: 86–106.

[38] FROLOV A, HENNING A, BOTTCHE C, et al. An UPLC-MS/MS method for the simultaneous identification and quantitation of cell wall phenolics in *Brassica napus* seeds[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(6): 1219–1227.

[39] 张媛雯, 赵琳, 谭伟. 植物原花青素的应用研究进展[J]. *中国果菜*, 2023, 43(7): 24–28, 41. [ZHANG Y W, ZHAO L, TAN W. Application progress of plant proanthocyanidins[J]. *China Fruit & Vegetable*, 2023, 43(7): 24–28, 41.]