

HPLC-HRMS 结合多元统计分析不同提取方法 槐米提取物中黄酮类差异性成分

肖禹圣,常言言,赵孟雅,田璐,李钠,赵幻希*,修洋*

长春中医药大学吉林省人参科学研究院,长春 130117

摘要:考察加热回流和超声辅助提取的槐米中黄酮类化合物的成分和含量差异。利用高效液相色谱-高分辨质谱 (high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry, HPLC-HRMS) 技术建立芦丁、烟花苷、水仙苷和槲皮素等 4 种黄酮类化合物的定性与定量分析方法。以 4 种化合物的绝对含量为指标优化提取条件,建立优化的加热回流和超声辅助提取方法。采用主成分分析和偏最小二乘-判别分析比较两种方法提取物之间的成分差异。结果显示,4 种化合物具有不同的最优提取条件,加热回流和超声辅助提取的 4 种化合物总含量分别为 245.82 mg/g 和 303.34 mg/g,其中加热回流适合提取槐米中烟花苷和水仙苷,超声辅助适合提取芦丁和槲皮素。两种方法的提取物中 23 种成分存在显著性差异,鉴定了其中 9 个差异化合物。研究结果明确了槐米提取物在两种常用提取方法下的差异性,为槐米中黄酮类成分的高效提取提供了有益参考。

关键词:槐米;黄酮;提取;高效液相色谱-高分辨质谱;多元统计分析

中图分类号:R284.1;O657.63

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2024)12-2042-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2024.12.006

Differential flavonoid compounds in extracts of Sophorae Flos Immaturus by different extraction methods based on HPLC-HRMS combined with multivariate statistical analysis

XIAO Yu-sheng, CHANG Yan-yan,
ZHAO Meng-ya, TIAN Lu, LI Na, ZHAO Huan-xi*, XIU Yang*

Jilin Ginseng Academy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China

Abstract: The differences in the composition and content of flavonoids in Sophorae Flos Immaturus extracted by heating reflux and ultrasonic-assisted extraction were investigated. The qualitative and quantitative analyses of four flavonoids, including rutin, nicotiflorin, narcissoside and quercetin, were established using high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (HPLC-HRMS). The heating reflux and ultrasonic-assisted extraction conditions were optimized based on the absolute contents of the four flavonoid compounds, and optimized extraction methods were developed. Principal component analysis and partial least squares-discriminant analysis were employed to compare the composition differences between the extracts obtained by the two extraction methods. The results showed that the four flavonoid compounds had different optimal extraction conditions, their total contents in the heating reflux and ultrasonic-assisted extracts were 245.82 mg/g and 303.34 mg/g, respectively. Significant difference was observed between the extracts of the two extraction methods in 23 components, of which nine differential compounds, were identified. This study clarified the differences in flavonoid composition extracted from Sophorae Flos Immaturus by heating reflux and ultrasonic-assisted extraction methods, providing valuable references for the efficient extraction of flavonoid compounds in Sophorae Flos Immaturus.

Key words: Sophorae Flos Immaturus; flavonoid; extraction; HPLC-HRMS; multivariate statistical analysis

收稿日期:2024-05-13

接受日期:2024-10-29

基金项目:吉林省科技发展规划(YDZJ202401089ZYTS, YDZJ202201ZYTS261, 20210204098YY);吉林省教育厅科学基金项目(JJKH20241090KJ)

*通信作者 Tel:86-431-86763985; E-mail: xiuyang@ccucm.edu.cn

槐米(*Sophorae Flos Immaturus*)是豆科植物槐(*Sophora japonica* L.)的干燥花蕾,也是一种具有清热、凉血、止血功效的中药材。槐米始载于《日华子本草》,在《神农本草经》中被列为上品,广泛种植于中国、日本和韩国^[1]。槐米中含有黄酮类^[2]、皂苷类^[3]、多糖类^[4]、酚酸类^[5]等多种成分,其中黄酮类成分为主要活性成分,具有抗氧化^[6]、抗菌^[7]、抗癌^[8]、抗炎^[9]、保护心血管和抗血小板聚集^[10]等多种药理活性。槐米中常见的黄酮类成分包括芦丁、烟花苷、水仙苷和槲皮素,它们在槐米中的含量较高^[11],并且与槐米的药效密切相关^[12]。黄酮类化合物的提取主要采用索氏提取^[13]、加热回流^[14]和超声辅助^[15]等方法。索氏提取法的提取率高,但不适合大规模应用。加热回流和超声辅助提取方法操作简便,较为适合中药有效成分大规模快速提取。尽管这两种方法都可以高效地从槐米中提取黄酮类成分,但提取物成分存在一定差异,而这两种方法对槐米提取物成分的影响仍缺少系统的研究。此外,芦丁的含量常被用于表示槐米中的总黄酮含量^[16]。然而,槐米中黄酮类成分较多,这导致总黄酮含量的测定通常存在偏差。增加黄酮类化合物的检测数量将有助于获得更准确的总黄酮含量。高效液相色谱-高分辨质谱联用技术(HPLC-HRMS)具有准确度高、灵敏度高、动态范围广等特点,能够同时定性与定量分析中药提取物中的多种同系物并获得大量的质谱数据^[17],为槐米提取物中黄酮类化合物含量的精确测定和主要成分的差异分析提供了有效方法。

本文基于 HPLC-HRMS 技术建立了芦丁、水仙苷、烟花苷、槲皮素等 4 种黄酮类化合物的定性和定量分析方法。分别考察了提取条件对加热回流和超声辅助方法提取的槐米中 4 种黄酮类化合物含量的影响,建立了优化的提取方法。利用多元统计分析评价了两种提取方法导致的槐米提取物中黄酮类成分的差异,并鉴定了差异化合物,以期为槐米中黄酮类成分的工业化生产提供技术参考。

1 实验部分

1.1 药材

槐米(批号:200701)购自安徽元康中药饮片股份有限公司,经长春中医药大学吉林省人参科学研究院陈长宝研究员鉴定为豆科植物槐(*Sophora japonica* L.)的干燥花蕾,保存于吉林省人参科学研究院植物标本馆(标本编号:4423089)。

1.2 仪器与试剂

Ultimate 3000 型高效液相色谱、Thermo Synchronis C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm)、Q Exactive 高分辨四极杆静电场轨道阱质谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Hyper Sonic DT-A 超声波清洗器(昆山美美超声仪器有限公司);DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(河南省予华仪器有限公司);Centrifuge 5810R 冷冻高速离心机(德国 Eppendorf 公司);0.22 μm 针式过滤器(英国 Whatman 公司);XS-204 分析天平(美国 METTLER TOLEDO 公司)。

甲醇、乙腈、甲酸(色谱纯,德国 Merck 公司);无水乙醇(分析纯,天津新通精细化工有限公司);芦丁(批号:D13HB202516)、槲皮素(批号:C28J11Y115820)、水仙苷(批号:S08A8D33447)、烟花苷(批号:Y22J11H119335)标准品(纯度 ≥ 98%,上海源叶生物科技有限公司);超纯水(电阻率 18.25 MΩ/cm)由 Milli-Q 纯水机(美国 Merck Millipore 公司)制备。

1.3 实验条件

1.3.1 色谱条件

流动相:0.10% 甲酸水溶液(A)和乙腈(B);梯度洗脱程序:0 ~ 3 min, 25% B → 45% B; 3 ~ 4 min, 45% B → 70% B; 4 ~ 10 min, 70% B; 10 ~ 18 min, 70% B → 80% B; 18 ~ 18.5 min, 80% B → 25% B; 18.5 ~ 23.5 min, 25% B; 柱温:35 °C;流速:0.20 mL/min;进样量:2.00 μL。

1.3.2 质谱条件

电喷雾离子源,鞘气:241 kPa;辅助气:3.30 L/min;雾化器温度:296 °C;离子传输管温度:325 °C;喷雾电压:4 000 V;负离子扫描模式,质量范围:*m/z* 100 ~ 1 500。

1.4 实验方法

1.4.1 槐米的前处理

取适量槐米药材去杂,于 80 °C 烘箱中干燥至恒重,粉碎,过 85 目筛,于 4 °C 干燥环境下保存备用。

1.4.2 槐米的加热回流提取

精密称定干燥槐米粉末 5.00 g 置于圆底烧瓶中,加入 70% 乙醇溶液 200 mL,磁力搅拌并水浴加热至 80 °C,回流提取 60 min。冷却至室温后,8 000 r/min 离心 10 min,取上清液,用 70% 乙醇补足至 200 mL,得到槐米加热回流提取液。取 1.0 mL 提取

液以 70% 乙醇定容至 50 mL, 取 2.0 mL 过 0.22 μm 针式过滤器, 待测。

1.4.3 槐米的超声辅助提取

精密称定干燥槐米粉末 5.00 g 置于锥形瓶中, 加入 70% 乙醇溶液 200 mL, 40 kHz 室温超声辅助提取 60 min。8 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 用 70% 乙醇补足至 200 mL, 得到槐米超声提取液。取 1.0 mL 提取液以 70% 乙醇定容至 50 mL, 取 2.0 mL 过 0.22 μm 针式过滤器, 待测。

1.4.4 标准溶液的配制

精密称定芦丁、槲皮素、水仙苷、烟花苷标准品 1.00 mg, 分别以 70% 乙醇溶解并定容至 10 mL, 制得 4 种标准储备液。用 70% 乙醇将标准储备液稀

释为一系列不同浓度(0.000 2~0.100 0 mg/mL) 的标准溶液, 过 0.22 μm 针式过滤器。利用 HPLC-HRMS 检测标准溶液, 以标准溶液的浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制 4 种化合物的标准曲线。

1.4.5 单因素实验设计

基于 HPLC-HRMS 定量分析槐米提取物中 4 种黄酮类化合物的含量, 分别考察加热回流和超声辅助提取方法的提取条件对 4 种化合物提取含量的影响。考察的提取条件包括提取溶剂、提取时间、液固比、提取温度等。每个提取条件至少考察 3 个水平, 每个水平重复 3 次。具体考察条件和水平详见表 1, 使用 SPSS 软件(Version 19.0, 美国 IBM 公司)进行样本之间的差异性分析。

表 1 槐米提取的单因素考察信息

Table 1 Information on the single factor investigation of Sophorae Flos Immaturus extraction

提取方法 Extraction method	提取因素 Extraction condition	水平 Level
加热回流 Heating reflux method	乙醇浓度 Ethanol concentration	0%、10%、30%、50%、70%、100%
	液固比 Liquid to solid ratio	10、20、30、40、50 mL/g
	提取时间 Extraction time	10、30、60、90、120 min
	提取温度 Temperature	40、60、80 $^{\circ}\text{C}$
超声辅助 Ultrasonic-assisted method	乙醇浓度 Ethanol concentration	0%、10%、30%、50%、70%、100%
	液固比 Liquid to solid ratio	10、20、30、40、50 mL/g
	提取时间 Extraction time	10、30、60、90 min

1.4.6 多元统计分析

分别按“1.4.2”和“1.4.3”项下提取方法提取槐米, 每种方法平行提取 6 次。按“1.3”项下方法采集提取物的 HPLC-HRMS 轮廓数据, 将得到的数据导入 SIEVE 软件(Version 2.1, 美国 Thermo Fisher 公司)进行峰匹配、峰对齐、峰面积归一化, 得到含有样品名称、保留时间、峰强度、质荷比的数据表格。去掉同位素峰和缺失值高于 80% 的离子后, 将数据表导入 SIMCA-p 软件(Version 14.1, 瑞典 Umetrics 公司)进行主成分分析(principal component analysis, PCA)和偏最小二乘-判别分析(partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA)。利用 SPSS 软件进行独立样本 t 检验, 评价加热回流和超声辅助提取的化合物之间的差异, 显著性水平为 $P < 0.05$ 。结合一级和二级质谱数据对满足筛选条件的差异化合物进行结构鉴定。

2 结果与分析

2.1 HPLC-HRMS 分析 4 种黄酮类化合物

槐米的加热回流和超声辅助提取物的总离子流图分别如图 1A 和 1B 所示。以提取物中相对峰强度较高的 4 种黄酮类化合物为研究对象, 在图 1 中将它们依次标记为峰 1~峰 4。通过与标准品比对保留时间、 $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ 离子、二级串联质谱图可以确定峰 1~峰 4 分别为芦丁、烟花苷、水仙苷、槲皮素, 它们的色谱信息和结构信息列于表 2 中。从图 1 中可以看出, 芦丁是提取物中的主要成分, 但是除芦丁外还有其他黄酮类化合物, 因此对多种黄酮类化合物的定量分析可以获得更准确的总黄酮含量。此外, 两种方法的提取物色谱峰绝对强度不同, 表明两种方法提取的化合物含量存在差异。两种方法的提取物成分也存在差异, 如图 1B 中 5.33 min 和 5.51 min 的色谱峰并没有出现在图 1A 中。因此, 有必要进一步分析两种方法的提取物中成分和含量差异。

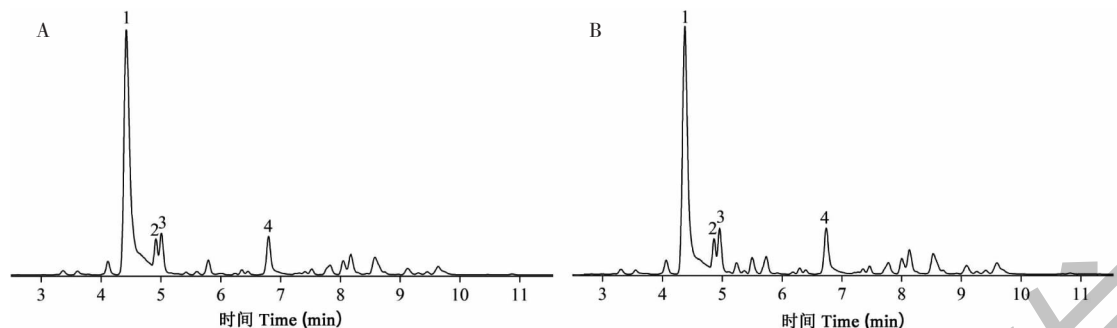


图 1 槐米加热回流提取物 (A) 和超声辅助提取物 (B) 的总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatograms of heating reflux extracts (A) and ultrasonic-assisted extracts (B) of *Sophorae Flos Immaturus*

表 2 4 种黄酮类化合物的色谱信息和结构信息

Table 2 Chromatographic and structural information of the four flavonoid compounds

编号 No.	t_R (min)	化合物 Compound	m/z [M-H] ⁻		分子式 Molecular formula	结构式 Structural formula
			测量值 Measured value	理论值 Theoretical value		
1	4.35	芦丁 Rutin	609.148 6	609.146 1	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	
2	4.85	烟花苷 Nicotiflorin	593.156 2	593.151 2	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	
3	5.01	水仙苷 Narcissoside	623.163 2	623.161 8	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	
4	6.71	槲皮素 Quercetin	301.235 6	301.230 5	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	

2.2 4 种黄酮类化合物的定量分析

如图 1A 所示,4 种黄酮类化合物可以在 12 min 内得到较好的分离。为了降低烟花苷和水仙苷的共流出对定量分析结果的影响,利用 4 种化合物的 [M-H]⁻ 离子的提取离子流图计算标准溶液的色谱

峰面积。以 7 个不同浓度的化合物色谱峰面积对化合物浓度作图,通过线性拟合得到 4 种化合物的标准曲线。如表 3 所示,4 种化合物的标准曲线的相关系数 (correlation coefficient, R) 均大于 0.996 0,显示出峰面积和浓度之间良好的线性关系,并且线性

表3 4种黄酮类化合物的标准曲线、相关系数(*R*)和线性范围Table 3 Standard curves, correlation coefficient (*R*) and linear ranges of the four flavonoid compounds

黄酮类化合物 Flavonoids	标准曲线 Standard curve	相关系数 Correlation coefficient (<i>R</i>)	线性范围 Linear range ($\mu\text{g/mL}$)
芦丁 Rutin	$y = 33\,930.17x + 421\,311.66$	0.998 2	0.5 ~ 100.0
烟花苷 Nicotiflorin	$y = 16\,627.42x + 189\,411.35$	0.996 7	0.2 ~ 50.0
水仙苷 Narcissoside	$y = 18\,415.13x + 89\,776.82$	0.997 0	0.2 ~ 50.0
槲皮素 Quercetin	$y = 35\,728.31x + 174\,446.27$	0.999 6	0.2 ~ 50.0

可以保持在两个数量级以上。

2.3 实验条件对槐米提取物含量的影响

2.3.1 溶剂对槐米提取物含量的影响

乙醇浓度对加热回流和超声辅助提取的4种黄酮类化合物含量的影响及组间显著性差异如图2所示。当乙醇浓度低于30%时,烟花苷、水仙苷和槲皮素的提取含量极低。随着乙醇浓度增加,提取物含量逐渐升高。这是由于溶剂极性与化合物极性相近,并且乙醇通过降低化合物的分子间氢键作用促进化合物的溶解,提高了提取含量^[18,19]。随着乙醇浓度增加,由于溶剂与黄酮类化合物的极性逐渐相近,并且乙醇能够降低分子间的氢键作用,因此提取物含量逐渐上升^[20]。提取水仙苷的最佳乙醇浓度为50%,提取芦丁、烟花苷、槲皮素的最佳浓度为70%,因此后续实验选用70%乙醇作为提取溶剂。此外,加热回流更适于提取烟花苷和水仙苷,超声辅助更适于提取芦丁和槲皮素。

2.3.2 液固比对槐米提取物含量的影响

图3显示了不同的液固比对加热回流和超声辅

助提取的槐米中4种黄酮类成分含量的影响及组间显著性差异。4种黄酮类化合物的提取含量均随液固比增加。当液固比达到40 mL/g时,提取物含量达到最大值,且不再随液固比继续增加。当液固比由10 mL/g增加至40 mL/g,超声辅助提取的化合物含量提高了约1.9倍,而加热回流的提取物含量仅提高了约1.2倍。这可能是因为超声辅助提取在常温下进行,提取物含量受溶剂体积的影响更大。最终确定两种提取方法的最佳液固比为40 mL/g。

2.3.3 提取时间对槐米提取物含量的影响

如图4所示,加热回流和超声辅助提取的4种黄酮类化合物的含量随提取时间延长而增加。加热回流的最佳提取时间为90 min,超声辅助的最佳提取时间为60 min。提取10 min时,加热回流已经可以得到大量的提取物,并且含量明显高于超声辅助方法。提取30 min后,超声辅助提取的芦丁和槲皮素含量明显高于加热回流方法,而烟花苷和水仙苷的含量始终低于加热回流方法。由此可见,加热回流适合烟花苷和水仙苷的提取及短时间的快速提

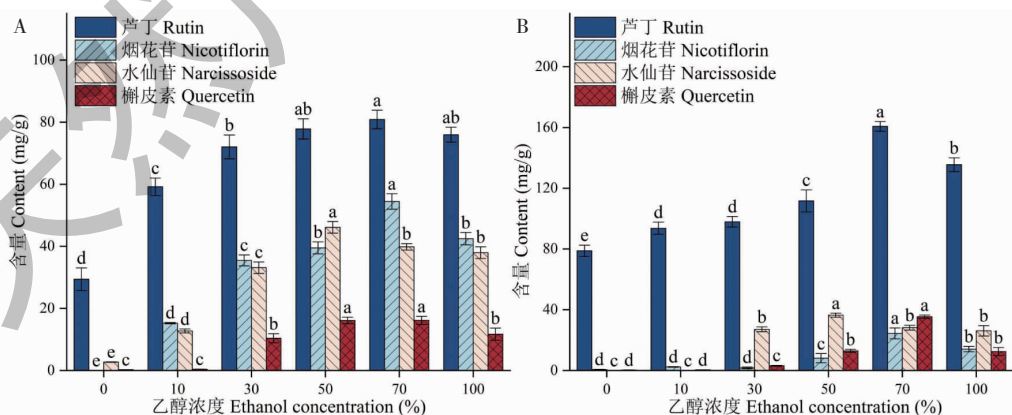


图2 乙醇浓度对加热回流(A)和超声辅助(B)提取的4种黄酮类化合物含量的影响

Fig. 2 Effect of ethanol concentration on the contents of the four flavonoid compounds extracted by heating reflux (A) and ultrasonic-assisted (B) methods

注:不同字母表示组间的显著性差异($P < 0.05$),下同。Note: Different letters indicate significant differences between groups ($P < 0.05$), the same below.

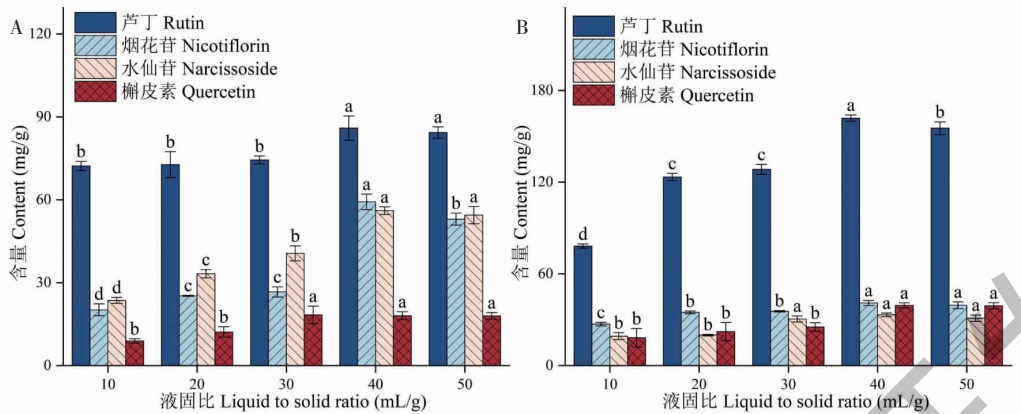


图3 液固比对加热回流 (A) 和超声辅助 (B) 提取的 4 种黄酮类化合物含量的影响

Fig. 3 Effect of liquid to solid ratio on the contents of the four flavonoid compounds extracted by heating reflux (A) and ultrasonic-assisted (B) methods

取,超声辅助适合长时间提取芦丁和槲皮素。从 10 min 到最佳提取时间,加热回流和超声辅助提取的

化合物含量分别提高了约 1.3 倍和 2.7 倍,即提取时间对超声辅助方法的影响更大。

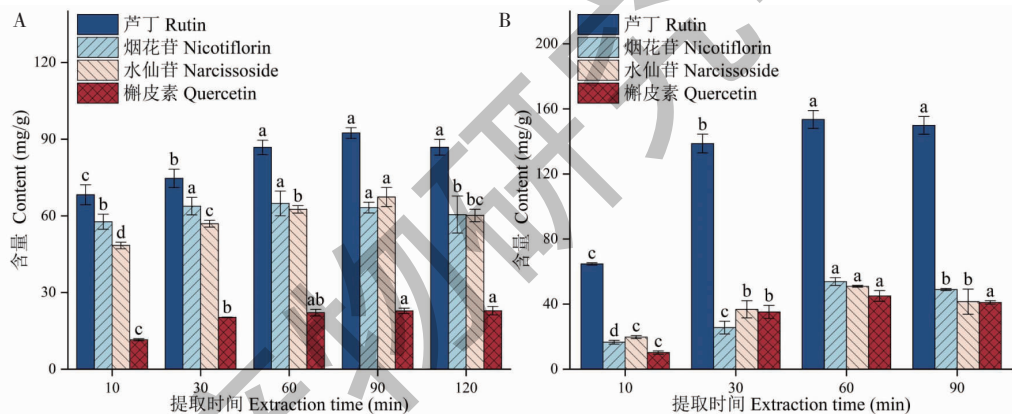


图4 提取时间对加热回流 (A) 和超声辅助 (B) 提取的 4 种黄酮类化合物含量的影响

Fig. 4 Effect of extraction time on the contents of the four flavonoid compounds extracted by heating reflux (A) and ultrasonic-assisted (B) methods

2.3.4 提取温度对槐米提取物含量的影响

4 种黄酮类化合物的提取含量均随温度的升高而增加。40 °C 时,水仙苷的提取含量最高。当提取温度升高至 80 °C 时,水仙苷的含量提高了 1.4 倍,芦丁、烟花苷和槲皮素的含量均至少提高了 1.9 倍,表明水仙苷受提取温度的影响小于其他 3 种化合物。

总的来说,水仙苷和烟花苷分别适合在 50% 和 70% 乙醇溶液中加热回流提取,芦丁和槲皮素更适合在 70% 乙醇溶液中超声辅助提取。在最佳条件下,加热回流和超声辅助提取 4 种化合物的总含量分别为 245.82 mg/g 和 303.34 mg/g。因此,超声辅助提取更适合于槐米中总黄酮的提取。

2.4 多元统计分析加热回流和超声辅助提取的差异化合物

2.4.1 PCA

单因素实验分析结果显示,加热回流和超声辅助提取的 4 种黄酮类化合物的含量存在明显差异。此外,从图 1 可以看出槐米提取物中的成分复杂。除了定量分析的 4 种化合物以外,仅通过比较 HPLC-HRMS 谱图无法直接获得两种方法提取物之间的其他差异化合物,这也表明两种方法提取的化合物相似性较高。因此采用多元统计技术区分两种提取方法的提取物并识别提取物之间的差异性成分。分别利用优化后的加热回流和超声辅助方法平行六次提取同一批槐米粉末,将提取物的 HPLC-

HRMS 数据处理后进行 PCA 分析。PCA 得分图如图 5 所示,在 95% 的置信区间内所有样品均无异常值。主成分 1 和主成分 2 分别描述了 58.2% 和 14.0% 的总变量,即图 5 代表了 72.2% 的总变量。

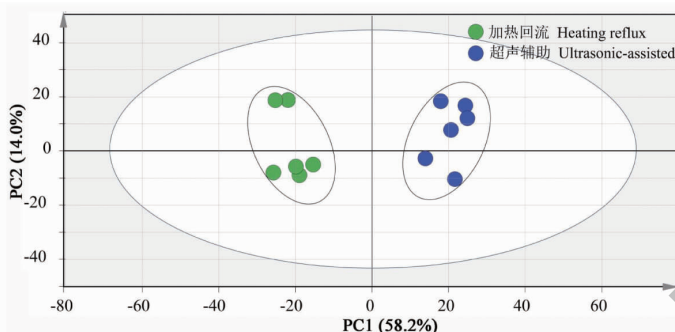


图 5 加热回流和超声辅助提取样品的 PCA 得分图

Fig. 5 PCA score plot of heating reflux and ultrasonic-assisted extracts

2.4.2 PLS-DA

利用提取物的 HPLC-HRMS 数据建立 PLS-DA 模型,如图 6A 所示。建立的模型参数分别为 $R^2 = 0.996$, $Q^2 = 0.925$,表明建立的 PLS-DA 模型具有良

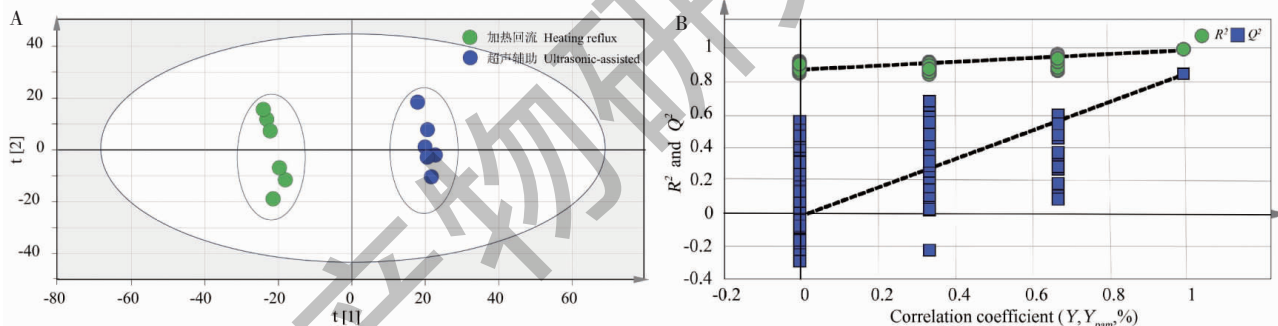


图 6 加热回流和超声辅助提取样品的 PLS-DA 得分图 (A) 和 200 次随机置换检验结果 (B)

Fig. 6 PLS-DA score plot (A) and 200 random permutation tests (B) of the heating reflux and ultrasonic-assisted extracts

从图 6A 中可以看出,加热回流和超声辅助提取的样品明显分离,说明两种方法提取的样品中存在显著不同的成分。通过建立 PLS-DA 模型的载荷图来计算对模型分组贡献差异性较大的变量并计算其变量重要性投影(variable importance for projection, VIP)值,以 VIP 值 > 1.5 为标准,筛选出 23 个差异显著的成分。独立样本 t 检验进一步验证了这些变量的显著性差异。与标准品和文献比对后,鉴定出 9 个差异化合物,详细信息见表 4。在鉴定出的 9 种差异化合物中,5 种是黄酮类化合物,4 种是皂苷类化合物。出现皂苷类成分可能是因为这些化合物的极性和黄酮类成分较为相似,适合于 70% 乙

两种方法提取的样品可以通过 PC1 被明显区分,这表明它们之间存在显著差异,即提取方法会显著影响槐米提取物中的黄酮类成分。

好的拟合和预测能力。此外,为了避免由于预测变量数远大于样本数导致模型过拟合,进行了 200 次的随机置换检验。如图 6B 所示,所有置换的 R^2 和 Q^2 均小于模型原始值,表明建立的模型没有过拟合。

醇溶液提取,并且两种提取方法对它们的提取含量有显著性的影响。定量分析的 4 种黄酮类化合物对两种提取物的差异贡献最大,这表明两种提取方法对黄酮类化合物的提取影响最大。表 4 展示了这些差异化合物的相对含量比值,即超声辅助提取与加热回流提取物峰面积的比值。可以看出, VIP 值越大的化合物通过两种方法提取的相对含量差异越大。相对含量比值大于 1 表明化合物更适合超声辅助提取,相对含量比值小于 1 则表明化合物更适合加热回流提取。结果显示,芦丁和槲皮素更适合于超声辅助提取,而烟花苷和水仙苷等化合物更适用于加热回流提取,这与单因素考察的结果一致。

表4 加热回流和超声辅助提取物之间的差异化合物

Table 4 Information on the differential compounds between the heating reflux and ultrasonic-assisted extracts

编号 No.	VIP	t_R (min)	化合物 Compound	m/z [M-H] ⁻		分子式 Molecular formula	峰面积比值 (超声辅助/加热回流) Peak area ratio(heating reflux/ ultrasonic-assisted)	参考文献 Ref.
				测量值 Measured value	理论值 Theoretical value			
1	13.82	4.45	芦丁 Rutin	609.141 2	609.146 1	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	1.429	20
2	8.74	4.93	烟花苷 Nicotiflorin	593.155 2	593.151 2	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	0.583	21
3	7.78	6.78	槲皮素 Quercetin	301.230 8	301.230 5	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	1.273	18
4	5.75	5.01	水仙苷 Narcissoside	623.168 2	623.161 8	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	0.739	22
5	3.83	5.77	槐二糖苷 Sophorabioside	577.159 2	577.156 3	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	0.830	23
6	2.67	3.32	山柰酚-3-O-槐糖苷-7-葡萄糖苷 Kaempferol-3-O-sophoroside-7-Oglucoside	771.191 8	771.198 9	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₁	0.860	24
7	2.62	8.58	赤豆皂苷 I Azukisaponin I	779.458 2	779.458 7	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	0.917	25
8	1.85	8.48	赤豆皂苷 II Azukisaponin II	795.452 1	795.453 6	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₄	0.919	26
9	1.63	7.51	异鼠李素 Isorhamnetin	315.052 2	315.051 0	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	0.950	22

3 结论

本文利用 HPLC-HRMS 结合多元统计分析技术研究了加热回流和超声辅助提取方法对槐米中黄酮类提取物成分的影响。以芦丁、烟花苷、水仙苷和槲皮素的绝对含量为指标,优化了 4 种黄酮类化合物的提取条件,建立了加热回流和超声辅助提取槐米中黄酮类成分的方法。统计分析结果显示,加热回流和超声辅助方法的提取物成分之间存在显著差异,提取方法显著影响槐米中黄酮类提取物的成分。得到了 23 个差异性成分,鉴定了其中 9 个差异化合物。两种提取方法分别适合不同化合物的提取,其中加热回流方法适合提取烟花苷和水仙苷,而超声辅助更适合提取芦丁和槲皮素。在优化的条件下,加热回流和超声辅助方法提取 4 种黄酮类化合物的总含量分别为 245.82 mg/g 和 303.34 mg/g,这表明提取槐米中的总黄酮类成分应优先选择超声辅助提取方法。当采用加热回流或超声辅助方法提取槐米中的黄酮类成分时,将可能影响提取物中 23 种成分的含量。因此应根据提取的目标成分选择更适宜的提取方法。

参考文献

1 He X, Bai Y, Zhao Z, et al. Local and traditional uses, phyto-

chemistry, and pharmacology of *Sophora japonica* L.: a review[J]. J Ethnopharmacol, 2016, 187: 160-182.

2 Gong YH, Fan LP, Wang L, et al. Flos Sophorae Immaturus: phytochemistry, bioactivities, and its potential applications [J]. Food Rev Int, 2023, 39: 3185-3203.

3 Gong YH, Li J, Li JW, et al. Effect of ultrasound-assisted freeze-dried on microstructure, bioactive substances, and antioxidant activity of Flos Sophorae Immaturus [J]. Food Biosci, 2022, 49: 101913.

4 Zhong WT, Yang CM, Zhang YZ, et al. The chemical profiling and anticancer potential of functional polysaccharides from Flos Sophorae Immaturus [J]. Mol, 2022, 27: 5978.

5 Qi Y, Sun A, Liu R, et al. Isolation and purification of flavonoid and isoflavonoid compounds from the pericarp of *Sophora japonica* L. by adsorption chromatography on 12% cross-linked agarose gel media [J]. J Chromatogr A, 2007, 1140: 219-224.

6 Huang R, Zhang Zhang Y, et al. Evaluation of the synergetic effect of Yupingfeng San and Flos Sophorae Immaturus based on free radical scavenging capacity [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 128: 110265.

7 Yang WY, Won TH, Ahn CH, et al. Streptococcus mutans sortase a inhibitory metabolites from the flowers of *Sophora japonica* [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2015, 25: 1394-1397.

- 8 Gong YH, Li J, Li JW, et al. Effect of ultrasound-assisted freeze-dried on microstructure, bioactive substances, and antioxidant activity of Flos Sophorae Immaturus[J]. Food Biosci, 2022, 49: 101913.
- 9 Li L, Huang T, Lan C, et al. Protective effect of polysaccharide from *Sophora japonica* L. flower buds against UVB radiation in a human keratinocyte cell line (HaCaT cells) [J]. J Photochem Photobiol B, 2019, 191: 135-142.
- 10 Kim JM, Yun-Choi HS. Anti-platelet effects of flavonoids and flavonoid-glycosides from *Sophora japonica* [J]. Arch Pharm Res, 2008, 31: 886-890.
- 11 Fan S, Yang G, Zhang J, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction using response surface methodology for simultaneous quantitation of six flavonoids in Flos Sophorae Immaturus and antioxidant activity [J]. Mol, 2020, 25: 1767.
- 12 Wang F, Xiong ZY, Li P, et al. From chemical consistency to effective consistency in precise quality discrimination of Sophora flower-bud and *Sophora* flower: discovering efficacy-associated markers by fingerprint-activity relationship modeling [J]. J Pharm Biomed Anal, 2017, 132: 7-16.
- 13 Yan WL. Extraction and analysis of flavonoids from Citri Reticulatae Pericarpium [J]. Henan Med Res (河南医学研究), 2018, 27: 2188-2190.
- 14 Jiang QF, Wen YJ, Yuan ZH. Study on the extraction process and antibacterial activity of total flavonoids from *Lobelia chinensis* [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2015, 27: 865-869.
- 15 Zhai ZF, Wang YB. Isolation and purification of total flavonoids from Isatidis Folium and effect on exercise endurance of mice [J]. Chem Reagents (化学试剂), 2023, 45: 88-94.
- 16 Kurkina AV, Savel'eva AE, Kurkin VA. Quantitative determination of total flavonoids in *Tagetes patula* marigold flowers [J]. Pharm Chem J, 2021, 55: 165-169.
- 17 Wang ZH, Zhao MY, Tian L, et al. Structure and pathway analysis of chemical transformation products of saikosaponins c based on HPLC-Q Exactive-Orbitrap mass spectrometry [J]. Chin J Anal Lab (分析实验室), 2023, 42: 853-859.
- 18 Liu JL, Li LY, He GH. Optimization of microwave-assisted extraction conditions for five major bioactive compounds from Flos Sophorae Immaturus (cultivars of *Sophora japonica* L.) using response surface methodology [J]. Mol, 2016, 21: 296.
- 19 Yang L, Jiang JG, Li WF, et al. Optimum extraction process of polyphenols from the bark of *Phyllanthus emblica* L. based on the response surface methodology [J]. J Sep Sci, 2009, 32: 1437-1444.
- 20 Chen SY, Chu CC, Chyau CC, et al. Djulis (*Chenopodium formosanum*) and its bioactive compounds affect vasodilation, angiotensin converting enzyme activity, and hypertension [J]. Food Biosci, 2019, 32: 100469.
- 21 Li J, Ding WH, Fan ZZ, et al. Identification and determination of 4 components in *Nymphaea candida* C. Presl by HPLC-UV-MS/MS [J]. Cent South Pharm (中南药学), 2021, 19: 2139-2143.
- 22 Ji SB, Liu WC, Zhao WL, et al. Determination of thirteen flavonoids in *Ginkgo* leaves preparations by HPLC-QQQ [J]. Drugs Clin (现代药物与临床), 2020, 35: 2137-2143.
- 23 Zhang QH, Li XZ, Han L, et al. Determination of sophorabioside in rat plasma by UPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study [J]. J Chromatographic Sci, 2018, 56: 154-159.
- 24 Managa MG, Sultanbawa Y, Sivakumar D. Effects of different drying methods on untargeted phenolic metabolites, and antioxidant activity in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. subsp. *chinensis*) and Nightshade (*Solanum retroflexum* Dun.) [J]. Mol, 2020, 25: 1326.
- 25 Stopka SA, Khattar R, Agtuca BJ, et al. Metabolic noise and distinct subpopulations observed by single cell LAESI mass spectrometry of plant cells *in situ* [J]. Front Plant Sci, 2018, 9: 1646.
- 26 Ha TJ, Lee BW, Park KH, et al. Rapid characterisation and comparison of saponin profiles in the seeds of Korean *Leguminous* species using ultra performance liquid chromatography with photodiode array detector and electrospray ionisation/mass spectrometry (UPLC-PDA-ESI/MS) analysis [J]. Food Chem, 2014, 146: 270-277.