

中药现代化技术

弯萼金丝桃总黄酮提取及抗氧化、降糖活性

王俊龙¹, 蔺永刚¹, 陈凤霞², 时文盼¹, 陈禹¹

(1. 伊犁师范大学 新疆生物质资源清洁转化与高值化利用重点实验室, 新疆 伊宁 835000; 2. 新疆医科大学 药学院, 新疆 乌鲁木齐 830017)

摘要: 通过单因素和响应面实验探究5种提取工艺(超声辅助提取、酸解提取、酶解提取、热水提取、热醇提取)对弯萼金丝桃总黄酮(TF)提取量的影响。采用HPLC测定并分析主要黄酮苷元的分布及含量,并进一步考察了TF与体外抗氧化活性[1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基(DPPH·)清除能力、2,2'-联氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐自由基(ABTS·)清除能力、·OH清除能力、还原能力]的相关性及对 α -葡萄糖苷酶的体外降糖能力。结果表明,超声辅助提取TF提取量最高。响应面优化最佳提取工艺为:超声提取温度68℃、提取时间23min、乙醇体积分数24%、溶剂与样品的液料比(mL:g)63:1。在该条件下,TF提取量为34.85 mg RT/g[以每克弯萼金丝桃中黄酮类化合物相当于芦丁(RT)的质量表示]。经HPLC鉴定出TF中含有7种主要黄酮类化合物,其中,含量最高的为槲皮素-3-O-洋槐糖-7-O-鼠李糖苷和槲皮素,分别为3.897和2.874 mg/g;TF质量浓度与DPPH·清除能力、ABTS·清除能力、·OH清除能力、还原能力呈显著正相关,TF对 α -葡萄糖苷酶的降糖能力可达到92.6%。

关键词: 弯萼金丝桃; 总黄酮; 提取工艺; 高效液相色谱; 抗氧化活性; 降糖活性; 中药现代化技术

中图分类号: TQ28; R932 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214(2024)05-1050-10

Total flavonoids from *Hypericum benthamii*: Extraction, antioxidant and hypoglycemic activityWANG Junlong¹, LIN Yonggang¹, CHEN Fengxia², SHI Wenpan¹, CHEN Yu¹

(1. Xinjiang Key Laboratory of Clean Conversion and High Value Utilization of Biomass Resources, Yili Normal University, Yining 835000, Xinjiang, China; 2. School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830017, Xinjiang, China)

Abstract: The influence of five extraction processes (ultrasound-assisted extraction, acid extraction, enzymatic extraction, hot water extraction, hot alcohol extraction) on the total flavonoids (TF) from *Hypericum benthamii* was investigated by single factor and response surface experiments, with the distribution and content of major flavonoid glycosides determined and analyzed by HPLC. The correlation between TF and *in vitro* antioxidant activity [1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine free radical (DPPH·) scavenging ability, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS·) scavenging ability, ·OH scavenging ability, reducing ability] along with its *in vitro* hypoglycemic ability to α -glucosidase were further investigated. The results showed that ultrasound-assisted extraction achieved the highest TF content, and the best extraction process optimized by response surface experiment was obtained. Under the conditions of ultrasonic extraction temperature 68 °C, extraction time 23 min, ethanol volume fraction 24%, liquid to material ratio of solvent to sample (mL : g) 63 : 1, the TF content reached 34.85 mg RT/g [Equivalent rutin (RT) mass per gram of TF compound expressed]. Seven major flavonoids in TF was identified by HPLC, with the most abundant flavonoid compounds of quercetin-3-O-palmitoyl-7-O-rhamnoside with 3.897 mg/g and quercetin with 2.874 mg/g. There was a significant positive correlation between TF mass concentration and DPPH· scavenging ability, ABTS· scavenging ability, ·OH scavenging ability and reducing ability. The hypoglycemic capacity of TF to α -glucosidase could reach 92.6%.

收稿日期: 2023-06-10; 定用日期: 2023-08-21; DOI: 10.13550/j.jxhg.20230469

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2022D01C455); 2023年度伊犁师范大学校级重点项目(2023YSYY002); 伊犁师范大学提升综合实力专项重点项目(22XKZZ08); 伊犁师范大学科研创新团队项目(CXZK2021003)

作者简介: 王俊龙(1993—),男,硕士,实验师, E-mail: 974881461@qq.com.

Key words: *Hypericum benthamii*; total flavonoids; extraction process; HPLC; antioxidant activity; hypoglycemic activity; modernization technology of traditional Chinese medicines

金丝桃属植物具有多种药理活性, 如抗癌、抑菌、抗抑郁、抗肿瘤和神经保护等^[1]。金丝桃属植物含有黄酮类、二萜酮类、萜酮类、萜类及间苯三酚衍生物类等^[2], 其中黄酮类化合物结构复杂多变且具有多种生物活性, 如抑菌、抗氧化、抗病毒、神经保护等^[3-4]。弯萼金丝桃 (*Hypericum curvisepalum* N. Robson) 是金丝桃科金丝桃属植物, 为灌木或多年生草本植物, 在中国主要分布于四川南部, 贵州西南部, 云南西北部、西部、中部及东北部地区, 多生长于海拔 1800~3000 m 干燥或多石的山坡及开旷林地^[5]。弯萼金丝桃在民间已有 2400 余年药用历史, 主治解毒消炎、调经活血、止血生肌及调节免疫作用, 富含黄酮类、生物碱类、甾体类和间苯三酚类化合物^[6]。目前, 关于弯萼金丝桃有效成分提取的工艺研究鲜见报道。

加拿大学者 ALTAY 等^[7]报道, 金丝桃属植物对前列腺癌、膀胱癌、乳腺癌等厌氧癌细胞具有一定抑制作用。梁君等^[8]从贯叶金丝桃石油醚提取部分分离出 8 种化合物, 其中贯叶连翘素 A 具有显著的细胞活性。黄达民等^[9]研究发现, 金丝桃通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路, 可抑制心肌细胞凋亡和氧化应激反应, 改善急性心肌梗死小鼠心功能。张元丽等^[10]研究发现, 金丝桃苷可降低大鼠胰岛素受体底物 (IRS-1) 磷酸化水平, 激活 PI3K/Akt 通路, 减轻糖尿病肾病大鼠肾组织病理损伤。王丽敏等^[11]研究发现, 金丝桃苷能够抑制胃癌细胞的侵袭和转移, 其机制可能与调控 IL-6/STAT3 信号通路有关。此外, 金丝桃苷可以通过抑制 NOXs/ROS/NLRP3 炎症小体信号通路, 从而达到预防阿霉素诱导的心脏毒性作用, 有望成为阿霉素诱导的心脏毒性治疗药物^[12]。时文盼^[13]研究发现, 从弯萼金丝桃石油醚提取部分提取的化合物 (Oxepahyperfroin) 对枯草芽孢杆菌的最小抑菌浓度 (MIC) 为 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 具有显著的抑菌活性。何秋映^[14]将弯萼金丝桃粗提物经 HPLC-UV 联用仪分析发现, 样品中存在大量与氧杂萜酮类紫外特征吸收峰相似的化合物, 并且粗提物质量浓度为 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 具有不抑制紫色杆菌生长但抑制其他色素产生的活性, 色素抑制率为 93.75%。金杜欣等^[15]研究发现, 乌腺金丝桃总黄酮 (TF) 在质量浓度为 $1 \times 10^5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 内, 对 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基 (DPPH \cdot) 清除能力的半抑制率浓度 (IC_{50}) 为 322.58 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 而对 2,2'-联氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐自由基 (ABTS \cdot) 清除能力较弱。目前,

虽然对金丝桃属植物有了一定的研究, 但是针对弯萼金丝桃研究较少, 尤其是对弯萼金丝桃的 TF 提取方法及其生物活性的研究鲜有报道。

细胞壁是提取中药材有效成分的主要屏障。目前, 天然药用植物 TF 的提取工艺有超声辅助提取、酸解法、酶解法等^[16-17]。为获得 TF 最佳提取工艺, 本文采用 5 种提取 TF 的工艺来提取弯萼金丝桃中的 TF, 并讨论提取工艺对 TF 提取量的影响, 通过 SEM 对 5 种提取后滤渣进行形貌分析, 在单因素实验基础上通过响应面分析确定 TF 最佳提取工艺。通过 HPLC 分析 TF 中主要成分的含量, 研究其体外抗氧化、降糖活性, 以期为金丝桃属植物弯萼金丝桃的开发奠定一定的理论基础。

1 实验部分

1.1 原料、试剂与仪器

弯萼金丝桃于 2022 年 10 月采自云南德钦县, 经伊犁师范大学新疆维吾尔自治区教育厅天然产物化学与应用重点实验室张维、欧阳艳教授鉴定为金丝桃属植物弯萼金丝桃。自然阴干后, 粉碎过 50 目筛, 保存备用。

无水乙醇、 NaNO_2 、 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 、氢氧化钾、铁氰化钾、磷酸三钠、无水碳酸钠、 H_2O_2 、 FeSO_4 、抗坏血酸 (V_C)、 α -葡萄糖苷酶、对硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖苷 (PNPG)、芦丁 (RT)、DPPH \cdot 、槲皮素-3-O-洋槐糖-7-O-鼠李糖苷、金丝桃苷、异槲皮素、水仙苷、金合欢素、槲皮素标准品, 均为分析纯, 阿拉丁试剂 (上海) 有限公司; 三氯乙酸、三氯化铁、水杨酸 (分析纯)、有机滤膜 (13 mm \times 0.24 μm)、2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐 (ABTS)、过硫酸钾、磷酸盐缓冲液, 上海麦克林生化科技股份有限公司; 蒸馏水, 自制。

PRI24ZH/E 电子天平, 奥豪斯仪器 (常州) 有限公司; XH-2008D 电脑智能温控低温超声波合成率取仪, 北京祥鹤科技发展有限公司; 1510-01137 全波长酶标仪, 美国 Thermo 科技公司; 7500F 扫描电子显微镜, 日本电子株式会社; UV-2550 紫外-可见分光光度计, 日本 Shimadzu 公司; H-class 液相色谱仪, 美国 Waters 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 TF 不同提取工艺优化

分别探究超声提取 (a)、酸解提取 (b)、酶解提取 (c)、热水提取 (d)、热醇提取 (e) 5 种提取

工艺对弯萼金丝桃 TF 提取量的影响。各种提取条件为: (a) 提取温度 68 °C、时间 23 min、乙醇体积分数 24%、液料比 63 : 1 mL/g; (b) 液料比 63 : 1 mL/g、乙醇体积分数 24%、提取温度 68 °C, 但在提取前加入质量分数为 1% 的盐酸, 磁力搅拌 30 min; (c) 液料比 63 : 1 mL/g、提取温度 68 °C、乙醇体积分数 24%, 提取前加入 20 mg 纤维素酶, 磁力搅拌 30 min; (d) 液料比 63 : 1 mL/g、100 °C 下采用热回流提取 2 h; (e) 液料比 63 : 1 mL/g、乙醇体积分数 100%, 在 80 °C 下热回流提取 2 h。收集不同提取工艺滤渣, -80 °C 冷冻干燥 72 h 后制样、喷金处理后, 使用 SEM 观察弯萼金丝桃滤渣表面形貌。

1.2.2 RT 标准曲线绘制与 TF 提取量测定

配制质量浓度为 0.2 g/L 的 RT 标准溶液母液(将 0.2 g RT 用无水乙醇溶解并定容至 1 L 容量瓶)。分别吸取 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL 母液置于 25 mL 容量瓶中, 分别加入体积分数为 30% 的乙醇至 6 mL, 加入质量分数为 5% 的 NaNO₂ 溶液 1 mL, 摇匀, 静置 6 min, 加入质量分数 10% 的 Al(NO₃)₃ 溶液 1 mL, 摇匀, 静置 6 min, 加入质量分数 4% 的 NaOH 溶液 10 mL, 最后用体积分数为 30% 的乙醇定容, 摇匀静置 15 min, 采用紫外-可见分光光度计于 510 nm 处测定溶液的吸光度^[18]。以吸光度 (A) 为纵坐标, RT 质量浓度 (ρ , g/L) 为横坐标, 绘制样品的标准曲线, 得到标准曲线回归方程为: $A=0.01096\rho+0.00289$, $R^2=0.9995$ 。根据 RT 标准曲线计算提取液 TF 提取量。TF 提取量 (mg RT/g) 以每克弯萼金丝桃中黄酮类化合物提取量相当于 RT 的质量表示, 根据式 (1) 计算。所有样品平行测定 3 次。

$$\text{TF 提取量} = \frac{\rho VK}{m} \quad (1)$$

式中: ρ 为待测样品稀释后的 TF 质量浓度, g/L; V 为待测样体积, mL; K 为实际提取液体积与取样液体积之比; m 为弯萼金丝桃粉末质量, g。

1.2.3 单因素实验

在 400 W 超声功率下, 分别考察提取温度 (A)、提取时间 (B)、乙醇体积分数 (C)、液料比 (D) 对 TF 提取量的影响。其中: A—20、30、40、50、60、70、80 °C; B—10、20、30、40、50、60、70 min; C—10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%; D—20 : 1、30 : 1、40 : 1、50 : 1、60 : 1、70 : 1、80 : 1 mL/g。在这项实验中首先确定一个变量, 其余条件不变同 1.2.1 节, 第 1 个单因素实验结束后, 用最佳实验结果进行第 2 个单因素实验, 以此类推, 直至单因素实验结束, 每组平行测定 3 次。参照 1.2.2 节测定 TF 提取量。

1.2.4 响应面优化实验

在单因素实验基础上, 采用 Box-Behnken 设计法, 选取与 1.2.3 节具有相同意义的 A、B、C、D 为自变量, 以 TF 提取量为响应值进行四因素三水平的响应面分析, 结果见表 1。

表 1 四因素三水平的响应面分析表
Table 1 Four-factor three-level response surface analysis table

| 因素 | 水平 | | |
|----------|--------|--------|--------|
| | -1 | 0 | 1 |
| A/°C | 50 | 60 | 70 |
| B/min | 10 | 20 | 30 |
| C/% | 20 | 30 | 40 |
| D/(mL/g) | 50 : 1 | 60 : 1 | 70 : 1 |

1.2.5 最佳提取条件及验证实验

基于单因素及响应面分析得到 TF 最佳提取条件, 并对最佳提取参数进行验证。称取 1 g 弯萼金丝粉末, 加入体积分数为 24% 乙醇 63 mL, 在 400 W, 68 °C 的条件下提取 23 min, 提取液以 4000 r/min 离心 10 min 后收集上清液, 参照 1.2.2 节测定 TF 提取量, 样品平行测定 3 次。

1.2.6 TF 主要成分鉴定

为进一步探究 TF 的主要成分, 采用 HPLC 外标法定量测定 TF 主要成分的含量 (mg/g)。色谱条件: 色谱柱为 YMC-Pack ODS-A 分析柱 (250 mm×4.6 mm×5 μ m); 检测波长 320 nm; 流动相为甲醇 (A) 和体积分数为 0.1% 甲酸水溶液 (B); 进样量 1 μ L, 进样速度 0.5 mL/min, 柱温为 38 °C。梯度洗脱程序: 0~10 min, 体积分数 25%~37% A; 10~35 min, 体积分数 37%~55% A; 35~45 min, 体积分数 55%~75% A; 45~55 min, 体积分数 75%~100% A; 55~80 min, 体积分数 100% A。

1.2.7 TF 抗氧化能力评价

根据响应面法分析确定的 TF 最佳提取工艺对 TF 进行提取, 将提取液分别移取 0.05、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 置于 25 mL 容量中, 用体积分数为 60% 乙醇定容后, 即得 0.0364、0.0729、0.1458、0.2917、0.4375、0.5874、0.7292 g/L 样液, 备用。

1.2.7.1 DPPH·清除能力测定

参照文献[19]方法, 分别向 96 孔板中加入 1.2.7 节中不同质量浓度的样液 100 μ L, 分别加入 0.2 mmol/L 的 DPPH 溶液 100 μ L, 混合均匀后室温避光保存 30 min, 采用紫外-可见分光光度计于 517 nm 处测定溶液的吸光度, 记作 $A_{\text{样品}}$, 以等体积无水乙醇代替 DPPH 溶液, 记作 $A_{\text{对照}}$, 以等体积的无水乙醇代替样液, 记作 $A_{\text{空白}}$ 。取相同浓度的 V_C 溶液作阳性对照, 每组样品平行测定 3 次取平均值。

根据式(2)计算 DPPH·清除率:

$$\text{清除率或抑制率}/\% = \left(1 - \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{空白}}}\right) \times 100 \quad (2)$$

1.2.7.2 ABTS·清除能力测定

参考文献[19]方法,移取等体积 7 mmol/L 的 ABTS 溶液和 1.4 mmol/L 过硫酸钾溶液,混合均匀避光 24 h 后,用蒸馏水调节吸光度至 0.70 ± 0.01 ,得工作液,备用。分别向 96 孔板中加入 50 μL 不同质量浓度的 1.2.7 节样液、150 μL 工作液,混合均匀后避光反应 6 min,采用紫外-可见分光光度计于 734 nm 处测定其吸光度,记作 $A_{\text{样品}}$,以 H_2O_2 替代工作液测定吸光度,记作 $A_{\text{对照}}$,以 H_2O_2 替代样液测定吸光度,记作 $A_{\text{空白}}$ 。取相同浓度的 V_C 溶液作阳性对照。每组样品平行测定 3 次取平均值。根据式(2)计算 ABTS·清除率。

1.2.7.3 羟基自由基清除能力测定

参考文献[20]方法,分别移取 1 mL 1.2.7 节不同质量浓度的样液于试管中,依次移取 1 mL 浓度为 9 mmol/L 的 FeSO_4 溶液、1 mL 浓度为 9 mmol/L 的水杨酸溶液,室温反应 10 min 后,立即加入 1 mL 浓度为 8.8 mmol/L 的 H_2O_2 终止反应,移至 37 $^\circ\text{C}$ 水浴锅反应 30 min 后,用紫外-可见分光光度计于 510 nm 测定其吸光度,记作 $A_{\text{样品}}$,用蒸馏水代替 H_2O_2 测定吸光度,记作 $A_{\text{对照}}$,蒸馏水代替样液记作 $A_{\text{空白}}$,取相同浓度的 V_C 溶液作阳性对照。每组平行测定 3 次取平均值。根据式(2)计算 $\cdot\text{OH}$ 清除率。

1.2.7.4 还原能力测定

参考文献[20]方法,分别向试管中加入 1.2.7 节不同质量浓度的样液 1 mL、2.5 mL 磷酸盐缓冲溶液 ($\text{pH}=6.86$),混合均匀后,向每支试管中加入 2.5 mL 质量分数为 1% 铁氰化钾溶液,于 50 $^\circ\text{C}$ 水浴反应 20 min 后,加入体积分数为 10% 三氯乙酸 2.5 mL,混合均匀后,3000 r/min 离心 10 min,然后取 2.5 mL 上清液置于试管中,加入质量分数为 0.1% 三氯化铁溶液 0.5 mL 和 2.5 mL 蒸馏水,摇匀后用紫外-可见分光光度计测定其在 700 nm 处的吸光度,吸光度越大,说明还原能力越强。取相同浓度的 V_C 溶液作阳性对照。所有样品平行测定 3 次取平均值。

1.2.8 体外抑制 α -葡萄糖苷酶活性测试

参考文献[21]方法,依次往试管中加入 0.5 mL 1.2.7 节不同质量浓度的样液或阳性阿卡波糖和 0.5 mL 浓度为 1.5 mol/L 的 α -葡萄糖苷酶溶液,混合均匀后于 37 $^\circ\text{C}$ 反应 10 min,然后加入 0.5 mL 浓度为 1 mol/L 的 PNPG 溶液,反应 15 min 后,加入 2 mL 浓度为 1 mol/L 的碳酸钠溶液,混合均匀后加入 1.5 mL 磷酸盐缓冲溶液 ($\text{pH}=6.86$),沸水浴反应 5 min 后

冷却至室温,用紫外-可见分光光度计于 405 nm 处测定其吸光度,记作 $A_{\text{样品}}$;磷酸盐缓冲溶液代替 α -葡萄糖苷酶溶液,测得的吸光度记作 $A_{\text{对照}}$;磷酸盐缓冲溶液代替样品溶液或阿卡波糖溶液,测得的吸光度记作 $A_{\text{空白}}$ 。所有样品平行测定 3 次取平均值。根据式(2)计算体外 α -葡萄糖苷酶抑制率。

1.2.9 数据处理

采用 Originpro 8.5 软件绘图,采用 Design Expert 10 软件对实验数据进行拟合分析。

2 结果与讨论

2.1 不同提取方法提取结果对比

为寻找最佳 TF 提取工艺,本文以 TF 提取量为评价指标,将超声提取法(a)、酸解提取法(b)、酶解提取法(c)、热水提取法(d)、热醇提取法(e) 5 种提取工艺进行比较,结果如图 1 所示。

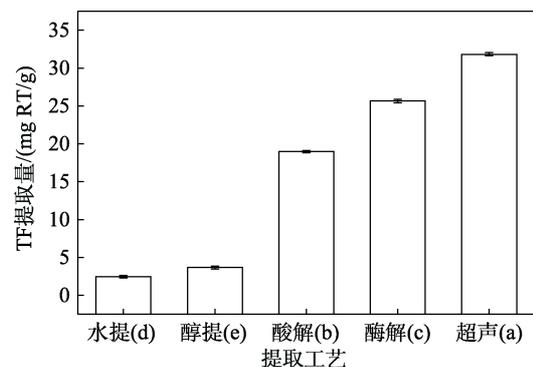


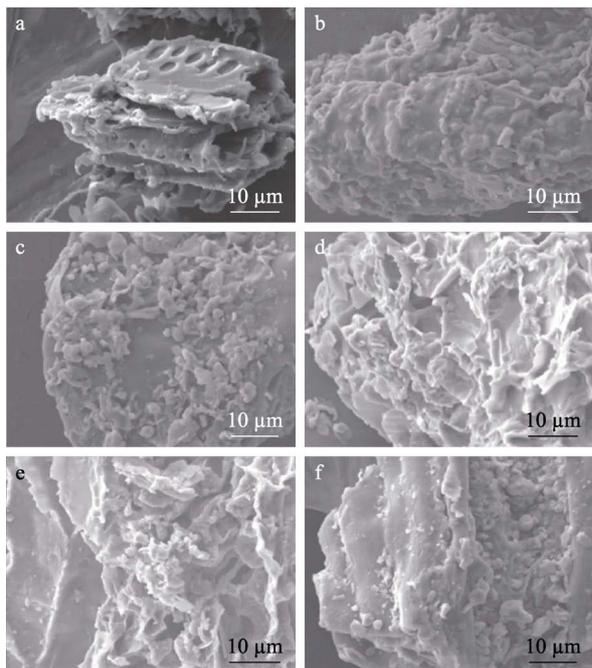
图 1 不同提取工艺下 TF 提取量

Fig. 1 TF extraction amount under different extraction processes

由图 1 可以看出,TF 提取量分别是: $a > c > b > e > d$, 超声提取工艺较其他 4 种提取方式提取量明显上升。为进一步说明超声提取高效作用的原因及机理,采用 SEM 对不同工艺提取后的滤渣粉末进行形貌观察,以提取前的弯萼金丝桃粉末样品为对照,结果见图 2。

由图 2 可知,弯萼金丝桃提取前粉末(f)形貌光滑、平整;b 法形貌有较多的凸起颗粒,但损坏并不明显;c 法与 b 法相差不大,2 种提取方式下弯萼金丝桃的表面形貌无明显的受损特征,表明酶解法与酸解法的提取效果不理想;d、e 法处理过的弯萼金丝桃表面形貌受损区域较多、受损情况较为明显,且有明显凹陷,但与 a 法相比,超声提取后的弯萼金丝桃表面受损严重,有明显的断裂情况,表面存在较大的孔洞缺陷,其微观破坏程度最为严重,产生很多孔洞,以利于黄酮类化合物的快速溶出。这是由于一方面细胞中存在吸能分子(H_2O),在超声的机械振动作用下,这些吸能分子会产生大量

气泡, 并由于“定向扩散”而趋向于增大, 形成共振腔, 这种气泡的大幅度振动会使生物结构受损, 细胞膜核生物大分子受到破坏, 加速有效成分的扩散^[22]; 另一方面, 超声能会转化为热能, 导致弯萼金丝桃内部温度瞬时升高, 加速有效成分的溶解。同时, 超声波还可通过机械撞击作用导致细胞壁破碎, 产生空穴效应, 并产生高能的冲击波, 最终导致细胞内溶物迅速通过已破碎的植物细胞壁^[23]。因此, 后续实验采用超声辅助法 (a) 作为提取 TF 方法。



a—超声提取法; b—酸解提取法; c—酶解提取法; d—热水提取法; e—热醇提取法

图 2 弯萼金丝桃粉末提取残渣 (a~e) 和弯萼金丝桃提取前粉末 (f) 的 SEM 图

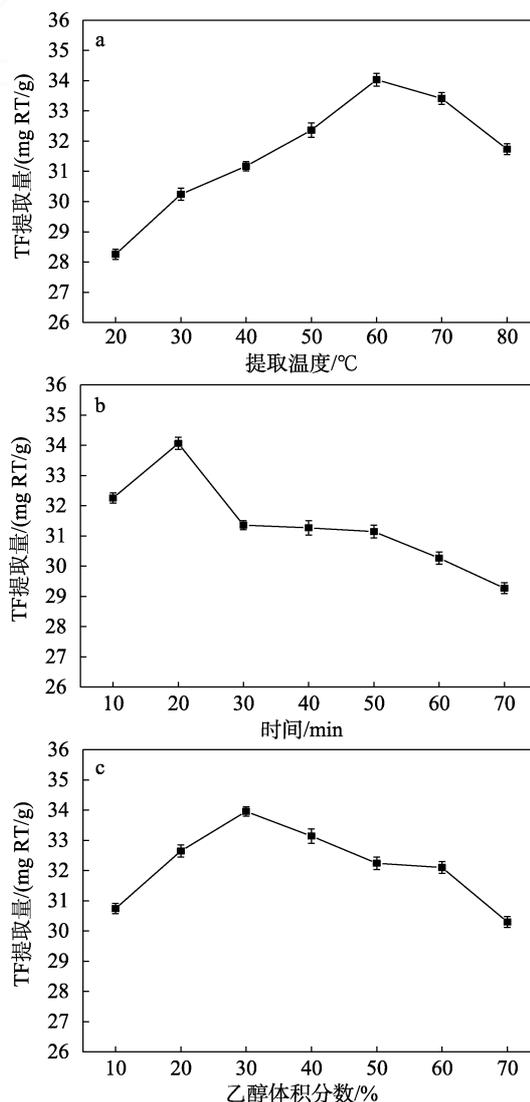
Fig. 2 SEM images of the powder extraction residue from *Hypericum benthamii* (a~e) and the powder before extraction of *Hypericum curvilineum* (f)

2.2 TF 单因素实验结果分析

按照 1.2.3 节进行单因素实验, 结果见图 3。

由图 3a~d 可知, 在提取温度 20~80 °C、提取时间 20~70 min、乙醇体积分数 10%~70%、液料比为 20:1~80:1 mL/g 范围内, TF 提取量随各因素的增大呈现出先增加后减少的趋势。当提取温度 60 °C、提取时间 20 min、乙醇体积分数 30%、液料比为 60:1 mL/g 时, TF 提取量分别达到最大, 为 34.03、34.06、33.95、33.71 mg RT/g。温度升高可使体系中分子的运动速率增大, 利于活性分子快速溶出, 但温度过高, 溶剂挥发速度也会加快, 导致单位体积内溶剂减少, 无法和样品充分接触, 并且黄酮类化合物结构遭到破坏, 导致最终提取量下降^[24]。提取时间延长, 可使溶液中的浓度梯度差逐渐减小,

扩散速度减慢, 当达到饱和状态, 黄酮提取量将不会增加, 继续延长提取时间, 极易造成活性成分缓慢分解, 导致 TF 提取量降低^[25]。不同体积分数的乙醇极性存在差异, 因此对物质的溶解力也存在差异。乙醇体积分数增大, TF 提取量随乙醇体积分数极性降低而增大, 继续提高乙醇体积分数, 一方面 TF 活性成分与溶剂的极性差增大, 溶解度降低, 导致 TF 提取量降低; 另一方面, 其他脂溶性杂质溶出, TF 提取量降低^[26]。当液料比较小时, 溶剂无法与弯萼金丝桃粉末充分接触, 细胞壁内外浓度差较低, 导致弯萼金丝桃细胞内黄酮扩散推动力较低, 黄酮类化合物无法充分溶出, 使 TF 提取量降低, 继续增大液料比, 黄酮类成分与更多的溶剂接触溶出, TF 提取量增高, 但液料比过大时, 溶解黄酮的量达到饱和状态, 其他杂质相继溶出, 导致 TF 提取量下降^[27], 并且在后续实验溶剂处理时易造成试剂浪费及溶剂处理工作量增大的问题。综合考虑将提取温度、时间、乙醇体积分数、液料比均作为进一步优化的因子。



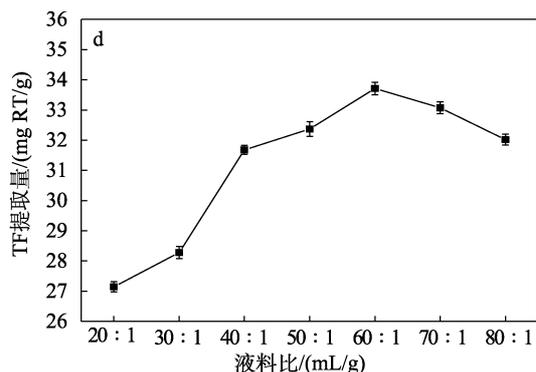


图 3 提取温度 (a)、提取时间 (b)、乙醇体积分数 (c)、液料比 (d) 对 TF 提取量的影响

Fig. 3 Effects of extraction temperature (a), extraction time (b), ethanol volume fraction (c), liquid to material ratio (d) on extraction of total flavonoids from TF

2.3 响应面法验证优化

2.3.1 响应面实验设计及结果

利用 Design Expert 10 软件对实验进行四因素三水平响应面优化分析, 响应面实验分组及结果见表 2。在单因素基础上, 设定超声功率为 400 W、提取温度 (A)、提取时间 (B)、乙醇体积分数 (C)、液料比 (D) 为考察因素, 对实验结果进行拟合, 得到回归方程为:

$$Y=32.62+0.45A+0.89B+1.24C-0.20D+0.40AB-1.16AC-0.05AD+0.24BC-0.87BD-0.07CD-8.07A^2-0.28B^2-0.54C^2-0.59D^2$$

式中: Y 为弯萼金丝桃 TF 提取量的预测值。

对该模型进行方差分析及显著性检验, 结果见表 3。由表 3 可知, 该模型差异极显著 ($P<0.0001$), 失拟项不显著 ($P=0.06$), 表明所选因素合理, 且外界因素对实验的影响较小, 不存在失拟情况, 表现出该模型具有统计学意义^[28]。其中, A 、 B 、 C 、二次项 A^2 对 TF 提取量有极显著的影响; 二次项 C^2 对 TF 提取量有显著影响; 模型较好地反映了超声提取温度 (A)、超声提取时间 (B)、乙醇体积分数 (C)、液料比 (D) 4 项因素对 TF 提取量的影响。由 F 值可知, 各项因素对弯萼金丝桃 TF 提取量影响的大小顺序为: $C>B>A>D$ 。

2.3.2 模型适用性诊断

图 4 为 TF 提取量模型适用性诊断图。由图 4a 可知, 图中大部分点的位置排布情况接近一条直线, 表明模型的精准性及稳定性, 且符合正态分布^[29]。从图 4b 的内部学生化残差图可以看出, 所有的点都均匀地分布在 ± 3.00 以内, 表明模型与所得出的 TF 实际提取量相符^[30]。因此, 可以进行下一步响应面的分析。

表 2 响应面实验设计及结果

Table 2 Experimental design and results for response surface analysis

| 编号 | 因素 | | | | TF 提取量/ (mg RT/g) |
|----|------------|------------|--------------|-----------|----------------------|
| | A 提取 温度 | B 提取 时间 | C 乙醇体 积分数 | D 液 料比 | |
| 1 | -1 | 0 | 1 | 0 | 24.12 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 34.34 |
| 3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 22.89 |
| 4 | 0 | 0 | -1 | 1 | 29.68 |
| 5 | 0 | 0 | -1 | -1 | 30.77 |
| 6 | 0 | 1 | 1 | 0 | 36.23 |
| 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 33.37 |
| 8 | 1 | 0 | 0 | 1 | 24.63 |
| 9 | 1 | 0 | -1 | 0 | 25.19 |
| 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 33.71 |
| 11 | 0 | -1 | 1 | 0 | 33.77 |
| 12 | -1 | -1 | 0 | 0 | 23.38 |
| 13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 30.74 |
| 14 | 0 | -1 | -1 | 0 | 29.08 |
| 15 | -1 | 0 | -0 | -1 | 24.42 |
| 16 | 0 | 1 | 0 | 1 | 31.60 |
| 17 | 1 | 1 | 0 | 0 | 25.70 |
| 18 | 0 | 0 | 1 | 1 | 31.81 |
| 19 | 0 | 0 | 1 | -1 | 33.19 |
| 20 | 1 | 0 | 0 | -1 | 25.90 |
| 21 | 0 | -1 | 0 | -1 | 29.13 |
| 22 | 0 | 1 | 0 | -1 | 32.16 |
| 23 | 0 | 1 | -1 | 0 | 30.58 |
| 24 | -1 | 0 | -1 | 0 | 21.80 |
| 25 | 0 | -1 | 0 | 1 | 32.07 |
| 26 | -1 | 0 | 0 | 1 | 23.36 |
| 27 | -1 | 1 | 0 | 0 | 24.64 |
| 28 | 0 | 0 | 0 | 0 | 30.94 |
| 29 | 1 | -1 | 0 | 0 | 22.85 |

2.3.3 响应面分析

图 5 为两因素相互作用对 TF 提取量影响的响应面图。由图 5 可知, 各因素之间的相互作用对 TF 提取量产生不同的影响。图像越弯曲、越陡峭, 说明 TF 提取量受各因素的影响越明显; 反之, 图像变化幅度不大、较为平缓, 说明 TF 提取量受该因素的影响不大^[31]。当响应面呈凸面时存在最大值, 而响应面呈凹面, 表明提取量存在最小值。各因素之间相互作用的响应面开口均朝下, 表明 TF 提取量随 A 、 B 、 C 、 D 因素的增加大体呈现出先增大后减小的趋势。由图 5a、b 可知, 随着提取时间不断延长, TF 提取量逐渐增加, 但提取量增幅较小, 而随着乙醇体积分数不断增大, TF 提取量增幅较大, 表明乙醇体积分数与提取温度交互作用更为明显。由图 5c、e 可知, 随着提取时间增大, TF 提取量不断增加, 与单因素结果存在差异, 这可能是由于液

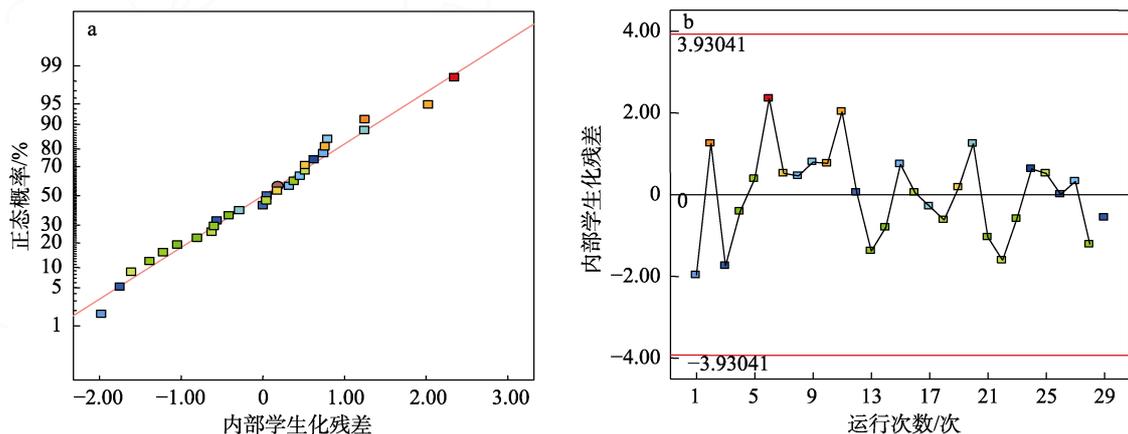
料比和提取时间相互作用的影响；随着提取温度不断升高，TF 提取量呈现的规律与单因素结果一致。由图 5d、f 可知，BC、CD 交互作用的等高线为椭圆形，表明乙醇体积分数与提取时间交互作用较为

显著。由图 5f 交互作用图可以看出，随着液料比不断增大，TF 提取量呈现先升后降的趋势，但影响不显著，与单因素结果存在差异，这可能是由于液料比和乙醇体积分数交互作用的影响。

表 3 响应面实验方差分析表
Table 3 Response surface experiment variance analysis table

| 项目 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F 值 | P 值 | 显著性 |
|----------------|--------|-----|-------|--------|---------|-----|
| 模型 | 480.25 | 14 | 34.30 | 13.94 | <0.0001 | ** |
| A 提取温度/°C | 2.45 | 1 | 2.45 | 0.99 | <0.0001 | ** |
| B 提取时间/min | 9.42 | 1 | 9.40 | 3.83 | 0.0006 | ** |
| C 乙醇体积分数/% | 18.58 | 1 | 18.58 | 7.55 | <0.0001 | ** |
| D 液料比/(mL/g) | 0.49 | 1 | 0.49 | 0.20 | 0.1742 | |
| AB | 0.63 | 1 | 0.63 | 0.26 | 0.6202 | |
| AC | 5.38 | 1 | 5.38 | 2.19 | 0.1613 | |
| AD | 0.011 | 1 | 0.011 | 0.68 | 0.7641 | |
| BC | 0.23 | 1 | 0.23 | 0.094 | 0.9476 | |
| BD | 0.31 | 1 | 0.31 | 1.24 | 0.2834 | |
| CD | 0.021 | 1 | 0.021 | 0.085 | 0.9277 | |
| A ² | 29.00 | 1 | 29.00 | 171.69 | <0.0001 | ** |
| B ² | 1.81 | 1 | 1.81 | 0.21 | 0.0651 | |
| C ² | 0.54 | 1 | 0.54 | 0.78 | 0.0393 | * |
| D ² | 0.029 | 1 | 0.029 | 0.93 | 0.3514 | |
| 残差 | 3.46 | 14 | 0.27 | | | |
| 失拟项 | 2.39 | 10 | 0.16 | 4.20 | 0.06 | |
| 纯误差 | 0.11 | 4 | 0.045 | | | |
| 总变异 | 514.71 | 28 | | | | |

注：“*”代表差异显著 ($P < 0.05$)；“**”代表差异极显著 ($P < 0.01$)。



a—正态概率图；b—内部学生化残差图

图 4 TF 提取量模型适用性诊断图

Fig. 4 Diagnostic chart of applicability of TF extraction amount model

2.3.4 响应面优化与验证

采用 Design Expert 10 软件进行响应面模型分析的结果表明，TF 的最优提取工艺为：超声提取时间 23.63 min，超声提取温度 68.30 °C，乙醇体积分数 24.21%，液料比 63 : 1 mL/g，此时理论上 TF 提取量为 (34.78±0.18) mg RT/g。为了便于实验操作，将

最优提取工艺调整为：乙醇体积分数 24%，提取温度 68 °C，液料比 63 : 1 mL/g，超声提取时间 23 min。在此条件下进行 3 次平行实验，测得 TF 平均提取量为 34.85 mg RT/g，TF 提取量与预测值相近，说明模型拟合良好，准确率高。产生差异的原因可能是温度不易控制及实验操作存在误差等。

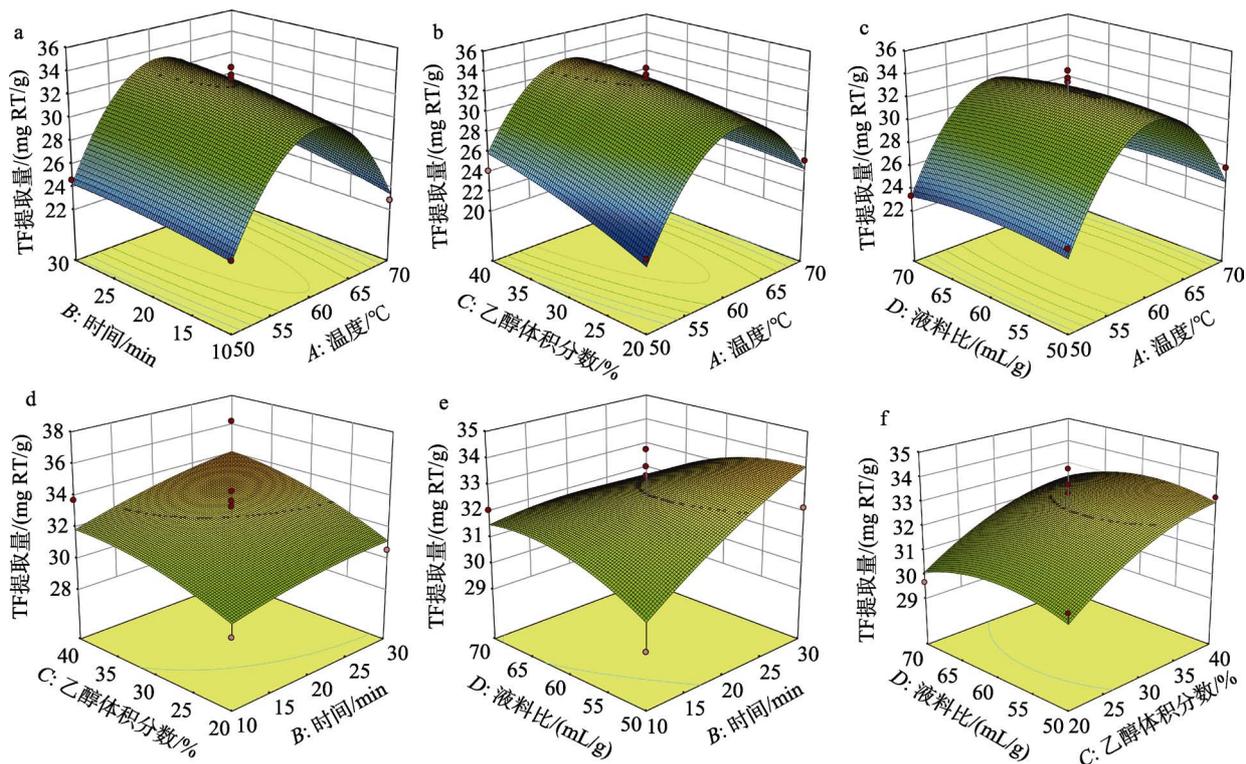


图 5 两因素相互作用对 TF 提取量影响的响应面图
Fig. 5 Response profile plots of effects of two-factor interactions on TF extraction amount

2.4 弯萼金丝桃黄酮主要成分分析

为进一步探究弯萼金丝桃黄酮物质的主要成分, 通过 HPLC 鉴定了 7 种主要黄酮类化合物, 图 6 为弯萼金丝桃黄酮提取液的 HPLC 谱图。通过与混合标准品的色谱峰保留时间作对比, 鉴定出 7 种主要黄酮类化合物分别为: 槲皮素-3-O-洋槐糖-7-O-鼠李糖苷、RT、金丝桃苷、异槲皮素、水仙苷、金合欢素、槲皮素。其中, 含量最高的黄酮化合物为槲皮素-3-O-洋槐糖-7-O-鼠李糖苷和槲皮素, 分别为 3.897 和 2.874 mg/g (见表 4), 与曹明明等^[32]的研究结果相似。DONG 等^[33]研究发现, 金丝桃苷有对心、脑、肝脏保护和抗肿瘤功效, 具体表现在抗心肌缺血损伤、抗脑缺血损伤、降血压、抗肝损伤、抗肝纤维化及治疗皮肤癌、肝癌等的增殖并诱导其凋亡。尽管金丝桃苷等其他成分含量较低, 但这些

化合物仍然是主要的抗氧化活性成分。因此, 弯萼金丝桃是生物活性黄酮类化合物的优质来源, 在药品、化妆品等精细化学品的开发中具有多种用途。

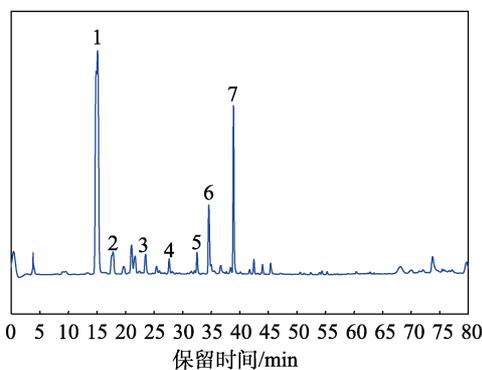


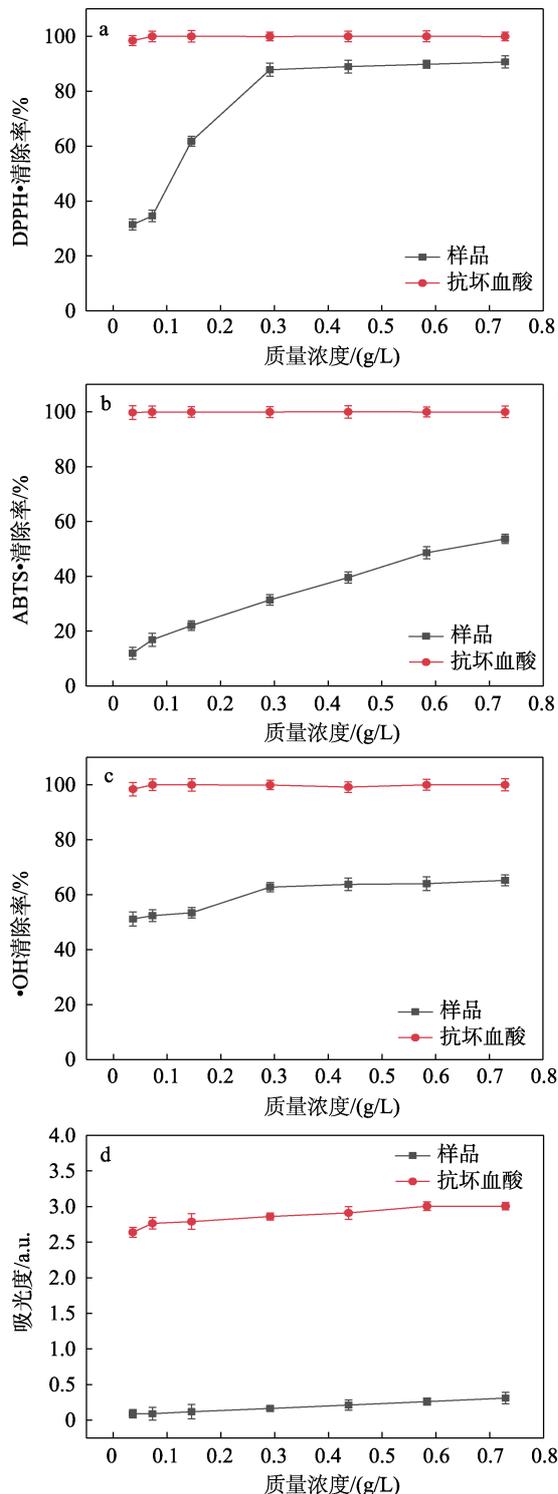
图 6 TF 主要黄酮类化合物的 HPLC 图
Fig. 6 HPLC chromatograms of TF major flavonoids

表 4 TF 中主要黄酮类化合物的含量
Table 4 Content of major flavonoids in TF

| 编号 | 成分 | 保留时间/min | 回归方程 | 相关系数 (R ²) | 含量/(mg/g) |
|----|----------------------|----------|-----------------------|------------------------|-----------|
| 1 | 槲皮素-3-O-洋槐糖-7-O-鼠李糖苷 | 15.124 | y=0.0378456x+156.3130 | 0.9992 | 3.897 |
| 2 | RT | 17.864 | y=0.0095437x+27.3722 | 0.9997 | 0.376 |
| 3 | 金丝桃苷 | 22.784 | y=0.1232584x+23.4900 | 0.9998 | 0.318 |
| 4 | 异槲皮素 | 27.294 | y=0.0039872x+36.2551 | 0.9995 | 0.274 |
| 5 | 水仙苷 | 32.674 | y=0.0027546x+39.2374 | 0.9994 | 0.423 |
| 6 | 金合欢素 | 34.026 | y=0.0655445x+84.7543 | 0.9996 | 1.274 |
| 7 | 槲皮素 | 38.953 | y=0.0584382x+139.2565 | 0.9998 | 2.874 |

2.5 弯弯金丝桃黄酮抗氧化能力分析

图 7 不同质量浓度梯度 TF 和 V_C 的抗氧化能力。



a—DPPH·清除能力；b—ABTS·清除能力；c—羟基自由基清除能力；d—还原能力

图 7 不同质量浓度梯度 TF 和 V_C 的抗氧化能力

Fig. 7 Antioxidant capacity of TF and V_C with different mass concentration gradients

由 TF 对 DPPH·的清除能力 (图 7a) 可知, 随着 TF 提取液与 V_C 质量浓度的增加, 在 0~0.73 g/L 范围内, TF 和 V_C 对 DPPH·清除能力逐渐增强, 当

TF 粗提取液质量浓度为 0.7292 g/L 时, 清除 DPPH·能力达到最强, 接近 V_C 对自由基的清除效果, 此时清除率为 90.65%, 由此得出, 弯弯金丝桃具有一定的抗氧化能力, 但其效果不如 V_C。

由 TF 对 ABTS·的清除能力 (图 7b) 可知, TF 质量浓度在 0~0.73 g/L 范围时, 弯弯金丝桃 TF 对 ABTS·清除能力不断增强, 随后清除能力趋于平缓, 当弯弯金丝桃 TF 粗提取液质量浓度为 0.7292 g/L 时, 对 ABTS·的清除能力达到最大值, 为 53.66%, 但低于 V_C 对 ABTS·的清除能力。

由 TF 对·OH 的清除能力 (图 7c) 可知, 当 TF 的质量浓度在 0~0.73 g/L 时, TF 对·OH 清除能力不断增强, 随后清除能力趋于平缓, 当 TF 粗提取液质量浓度为 0.7292 g/L 时, 对·OH 的清除能力达到最大值, 为 62.36%, 但显著低于 V_C。

由 TF 的还原能力 (图 7d) 可知, 弯弯金丝桃具有一定的还原能力, 随着 TF 粗提取液质量浓度在 0~0.73 g/L 范围内增加时, TF 还原能力不断增强, 但 TF 还原能力始终低于 V_C 的还原能力。

活性氧自由基反应性强, 能够攻击其他分子形成新的自由基, 从而引起体内蛋白质、细胞膜等大分子损伤, 是引发如老化、心血管疾病、炎症等疾病的主要原因, 弯弯金丝桃中黄酮具有较少的酚羟基, 供氢能力相对较弱, 因此, 清除体内产生的氧自由基较少, 表现出其体外抗氧化能力弱于 V_C, 但仍可作为抗氧化的主要物质基础。

2.6 弯弯金丝桃黄酮体外降血糖能力分析

人体摄入的碳水化合物代谢首先会被分解为麦芽糖, 然后在 α-葡萄糖苷酶作用下分解成小分子单糖, 包括果糖、葡萄糖等物质, 最终被肠道吸收。抑制 α-葡萄糖苷酶活性可以减慢碳水化合物在肠胃中的分解速度, 从而控制餐后血糖, 对糖尿病患者餐后血糖稳定具有显著作用, 是药用植物降血糖活性评价的体外指标^[34]。不同质量浓度梯度 TF 的体外降糖能力如图 8 所示。

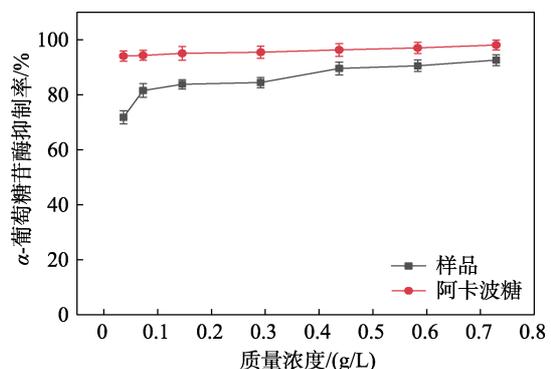


图 8 不同质量浓度梯度 TF 和阿卡波糖的降糖能力
Fig. 8 Hypoglycemic capacity of TF and acarbose with different concentration gradients

由图 8 可知, TF 的 α -葡萄糖苷酶抑制率随其质量浓度的增大而提高, 当 TF 质量浓度在 0~0.73 g/L 范围内, 最高抑制率可达 92.6%, 但其降糖能力略低于阿卡波糖。这可能与弯萼金丝桃降血糖效果是通过调控糖代谢的其他酶系有关。

本文提取的弯萼金丝桃 TF 主要成分与文献^[35]相近。结果表明, TF 质量浓度越高, 弯萼金丝桃提取物抗氧化活性和降糖活性越强, 提示 TF 可能是弯萼金丝桃抗氧化活性及降糖物质的基础, 是否存在其他抗氧化活性成分的协同作用有待进一步深入研究。

3 结论

采用超声辅助提取弯萼金丝桃中 TF, 与传统提取法相比提取量更高。在单因素实验基础上, 通过响应面实验优化得到最佳并修正提取条件为: 乙醇体积分数 24%, 超声提取温度 68 °C, 液料比 63 : 1 mL/g, 超声提取时间 23 min。在此条件下 TF 的提取量为 34.85 mg RT/g, 与模型预测值 [(34.78±0.18) mg RT/g] 误差小, 说明实验模型设计可行。

HPLC 测试共鉴定出 7 种黄酮类化合物, 分别为槲皮素-3-*O*-洋槐糖-7-*O*-鼠李糖苷、RT、金丝桃苷、异槲皮素、水仙苷、金合欢素、槲皮素, 其中含量最高的黄酮化合物为槲皮素-3-*O*-洋槐糖-7-*O*-鼠李糖苷和槲皮素, 含量分别为 3.897 和 2.874 mg/g。弯萼金丝桃中黄酮提取物具有良好的体外抗氧化能力, 但低于 V_C, 在一定质量浓度范围内, TF 提取物质量浓度与自由基清除率呈正相关, 当弯萼金丝桃 TF 质量浓度为 0.7292 g/L 时, 对 DPPH· 的清除能力达到 90.65%, 对 ABTS· 的清除能力达到 53.66%, 对 ·OH 清除能力达到 62.36%。体外降血糖实验表明, 弯萼金丝桃 TF 对 α -葡萄糖苷酶的抑制率可达 92.6%, 表现出一定的降糖能力。

参考文献:

- [1] ZHAO J, WEI F, LIU H, et al. Two aromatic acid derivatives and a xanthone from *Hypericum hengshanense*[J]. Natural Product Research, 2022, 64(2):1-8.
- [2] DIAZ J G. Chemical composition of *Hypericum coadunatum* Chr. from the Canary islands[J]. Journal of Molecular Structure, 2021, 12(4): 1314-1329.
- [3] LIN N (林楠), ZHANG Z (张卓), LIN A J (林安基), et al. To investigate the anti-Alzheimer's disease mechanism of *Hypericum perforatum* based on network pharmacology and molecular docking validation[J]. Journal of Anhui University of Chinese Medicine (安徽中医药大学学报), 2022, 41(3): 57-64.
- [4] MOHAMED F F, ANHLAN D, SCHOFBANKER M, et al. *Hypericum perforatum* and its ingredients hypericin and pseudohypericin demonstrate an antiviral activity against SARS-CoV-2[J]. Pharmaceuticals, 2022, 15(5): 530-548.
- [5] GUAN W L (关文灵), LIU F (刘芳), ZHENG S X (郑思乡). The studies on the resources of *Hypericum* plants and their gardening applications[J]. Chinese Wild Plant Resources (中国野生植物资源), 2002, 3(1): 22-23, 40.
- [6] SHI W P, ZENG H, WAN C X, et al. Amicoumacins from a desert bacterium: Quorum sensing inhibitor against *Chromobacterium*

- [7] ALTAY A, YENICEERI E K K, TASLIMI P. Phytochemical analysis and biological evaluation of *Hypericum linarioides* bosse: *In vitro* and *in silico* studies[J]. ChemistrySelect, 2022(23): 7-15.
- [8] LIANG J (梁君), WANG H J (王栢杰), HU G Q (胡国强). A new phloroglucinol and its cytotoxic activity in *Hypericum perforatum*[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials (中药材), 2023, 2(3): 635-639.
- [9] HUANG D M (黄达民), ZHANG J C (张金春), SONG L (宋蕾), et al. Effects of hypericin on cardiac function and Nrf2/HO-1 signaling pathway in mice with acute myocardial infarction[J]. Chinese Journal of Integrative Medicine on Cardio-Cerebrovascular Disease (中西医结合心脑血管病杂志), 2023, 21(5): 828-831.
- [10] ZHANG Y L (张元丽), WANG S L (王素利), ZHANG Y (张宇), et al. Protective effect of hyperoside on renal tissue damage in rats with diabetic nephropathy by regulating the insulin receptor substrate 1-phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B signaling pathway [J]. The Chinese Journal of Clinical Pharmacology (中国临床药理学杂志), 2023, 39(2): 241-245.
- [11] WANG L M (王丽敏), JIANG Z H (江智慧), ZHU Q S (朱秋双), et al. Action mechanism of hyperoside inhibiting invasion and migration of gastric cancer cells based on regulating IL-6/STAT3 signaling pathway[J]. Information on Traditional Chinese Medicine (中医药信息), 2023, 40(3): 52-54, 61.
- [12] WEI S S, MA W J, JIANG C H, et al. Hyperoside prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity by inhibiting NOXs/ROS/NLRP3 inflammasome signaling pathway[J]. Phytotherapy Research, 2023, 112(23): 1-14.
- [13] SHI W P (时文盼). Research on phloroglucinol derivatives and their antibacterial activity of *Hypericum curvisepalum*[D]. Alaar: Tarim University (塔里木大学), 2020.
- [14] HE Q Y (何秋映). Study on the separation and identification of xanthenes from *Hypericum curvisepalum* and their quorum sensing inhibiting activity[D]. Alaar: Tarim University (塔里木大学), 2022.
- [15] JIN D X (金杜欣), LUO X G (罗学刚), ZHANG K Q (张克勤), et al. Ultrasonic extraction of total flavonoids from *Hypericum attenuatum* choisy and its antioxidant activities[J]. Journal of Tianjin University of Science and Technology (天津科技大学学报), 2017, 32(5): 10-16.
- [16] ZHANG J F (张建丰), LI X J (李晓君), WANG X H (王小慧), et al. Different extraction technologies and *in vitro* antioxidant activity of polyphenols from hempseed threshing residues[J]. Food Research and Development (食品研究与开发), 2023, 44(6): 153-158.
- [17] TAKACS K, PREGI E, VAGI E, et al. Processing stabilization of polyethylene with grape peel extract: Effect of extraction technology and composition[J]. Molecule, 2023, 28(3): 1011-1020.
- [18] TIAN J H (田建华), ZHANG C Y (张春媛), WEI L (魏璐). Study on the extraction technology and antioxidant activity of total flavonoids from the pomace of sea buckthorn[J]. Natural Product Research and Development (天然产物研究与开发), 2021, 33(1): 65-72.
- [19] XIA Y H (夏雨弘), LIU Y (刘颖), ZHOU M (周茗), et al. Extraction process optimization and antioxidant activity of total flavonoids from *Haloragis micrantha* (Thunb.) R. Brown.[J]. Science and Technology of Food Industry (食品工业科技), 2023, 1(2): 14-21.
- [20] BAI Q (白琼), FU J Y (符骄阳), ZHAO X H (赵秀红), et al. Development and antioxidant activity of brown rice leaven and juice beverage[J]. The Food Industry (食品工业), 2019, 40(4): 137-140.
- [21] LI D X (李东香), GUAN R F (关荣发), HUANG H Z (黄海智), et al. Optimization of extraction of flavonoids from three kinds of Xinjiang sea buckthorns and comparative of antioxidant activities[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology (中国食品学报), 2023, 23(4): 157-167.
- [22] SAMANTA R, GHOSH M. Optimization of microwave-assisted extraction technique for flavonoids and phenolics from the leaves of *Oroxylum indicum* (L.) Kurtz using taguchi L9 orthogonal design[J]. Pharmacognosy Magazine, 2023, 19(1): 97-104.
- [23] HONGBING Z, GUOYONG X, MEI T, et al. Optimization of the ultrasonic-assisted extraction of bioactive flavonoids from *Ampelopsis grossedentata* and subsequent separation and purification of two flavonoid aglycones by high-speed counter-current chromatography [J]. Molecules, 2016, 21(8): 339-352.

- Journal of Surfactants & Detergents, 2015, 18(3): 429-438.
- [6] JUNG J, JANG H J, EOM S J, *et al.* Fermentation of red ginseng extract by the probiotic *Lactobacillus plantarum* KCCM 11613P: Ginsenoside conversion and antioxidant effects[J]. Journal of Ginseng Research, 2019, 43(1): 20-26.
- [7] SU X Y (苏曦瑶). Study on extraction and decolorization of *Sapindus Saponins*[D]. Xiamen: Xiamen University (厦门大学), 2017.
- [8] SHEN H C (沈胡驰), YANG L (杨莉), CHEN D S (陈殿松), *et al.* Study on decolorization and oil control of tea saponin[J]. China Surfactant Detergent & Cosmetics (日用化学工业), 2022, 52(5): 486-492.
- [9] ZOUBOULIS C C, DEGITZ K. Androgen action on human skin-from basic research to clinical significance[J]. Experimental Dermatology, 2004, 13(4): 5-10.
- [10] ZOUBOULIS C C, SSHAGEN S, ALESTAS T, *et al.* The sebocyte culture: A model to study the pathophysiology of the sebaceous gland in seborrhea, seborrhoea and acne[J]. Archives of Dermatological Research, 2008, 300(8): 397-413.
- [11] WROBEL A, SELTMANN H, FINMMEL S, *et al.* Differentiation and apoptosis in human immortalized sebocytes[J]. Journal of Investigative Dermatology, 2003, 120(2): 175-181.
- [12] IWATA C, AKIMOTO N, SATO T, *et al.* Augmentation of lipogenesis by 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J_2 in hamster sebaceous glands: Identification of cytochrome P-450-mediated 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J_2 production[J]. Journal of Investigative Dermatology, 2005, 125(5): 865-872.
- [13] ISHII M, NAKAHARA T, ARAHO D, *et al.* Glycolipids from spinach suppress LPS-induced vascular inflammation through eNOS and NK- κ B signaling[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017, 91: 111-120.
- [14] ZHANG Z Z. Extraction, separation and bioactivity of total flavonoids from *Fenugreek* seeds[D]. Hefei: Anhui Agricultural University (安徽农业大学), 2021.
- [15] WU Z Q (吴志强), WANG H (王欢), KUANG L (旷翎), *et al.* Clinical characteristics and drug resistance analysis of 86 clinical isolates of *Propionibacterium acnes*[J]. China Journal of Modern Medicine (中国现代医学杂志), 2023, 33(11): 50-56.
- [16] YAN Y Q (闫雅倩), ZHANG Y Z (张玉芝), FU H (付豪), *et al.* Cosmetic efficacy evaluation of *Hemerocallis citrina* Baroni fermentation broth[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2022, 39(5): 1073-1081.
- [17] WANG F L (王风楼), CHONG A, LI J (李俊), *et al.* Isolation of Himalayan soil yeast and efficacy of its fermentation filtrate on skin cell[J]. China Surfactant Detergent & Cosmetics (日用化学工业), 2022, 52(12): 1314-1319.
- [18] LIN N, CAI D L, JIN D, *et al.* Ginseng panaxoside Rb1 reduces body weight in diet-induced obese mice[J]. Cell Biochemistry and Biophysics, 2014, 68(1): 189-194.
- [19] CHEN Z J (陈志娟), JIANG S P (蒋思萍), FENG C (冯成), *et al.* Anti-obesity and hypolipidemic mechanism of total saponins from *Brassica rapa* L. in high-fat diet induced obese rats[J]. Sichuan Journal of Zoology (四川动物), 2014, 33(2): 279-282.
- [20] LIN C, LIN Y, CHEN Y, *et al.* Effects of *Momordica* saponin extract on alleviating fat accumulation in *Caenorhabditis elegans*[J]. Food & Function, 2019, 10(6): 3237-3251.
- [21] TENG F (滕菲), LI X W (李祥激), LI M (李敏), *et al.* Components and lipid-lowering effect of total saponins from underground part of *Gynostemma pentaphyllum*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica (中国中药杂志), 2022, 47(18): 5022-5031.
- [22] FARRAR M D, INGHAM E. Acne: Inflammation[J]. Clinics in Dermatology, 2004, 22(5): 380-384.
- [23] DRENO B, GOLLNICK H, KANG S, *et al.* Understanding innate immunity and inflammation in acne: Implications for management[J]. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 2015, 29(4): 3-11.
- [24] WANG R, WANG N, HAN Y, *et al.* Dulaglutide alleviates LPS-induced injury in cardiomyocytes[J]. ACS Omega, 2021, 6(12): 8271-8278.
- [25] MIN S Y, PARK C H, YU H W, *et al.* Anti-inflammatory and anti-allergic effects of saponarin and its impact on signaling pathways of RAW 264.7, RBL-2H3, and HaCaT cells[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(16): 8431.
- [26] NAGATA J, YOKODERA H, MAEDA G, *et al.* *In vitro* and *in vivo* studies on anti-inflammatory effects of traditional okinawan vegetable methanol extracts[J]. ACS Omega, 2019, 4(13): 15660-15664.
- [27] WATANABE T, NISHIO H, TANIGAWA T, *et al.* Probiotic *Lactobacillus casei* strain Shirota prevents indomethacin-induced small intestinal injury: Involvement of lactic acid[J]. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 2009, 297(3): 506-513.

(上接第 1059 页)

- [24] PROMMUAK C, DE-EKANMKUL W, SHOTIPRUK A. Extraction of flavonoids and carotenoids from Thai silk waste and antioxidant activity of extracts[J]. Separation & Purification Technology, 2008, 62(2): 444-448.
- [25] ABUDUREHEMAN B. Optimization of flavonoid extraction from *Xanthoceras sorbifolia Bunge* flowers, and the antioxidant and antibacterial capacity of the extract[J]. Molecules, 2021, 27(3): 139-157.
- [26] GUO W J (郭文娟), WANG N (王娜), WANG N N (王娜娜), *et al.* Ultrasonic-assisted ethanol extraction of flavonoids from hawthorn seed and their antioxidant activity[J]. Fine Chemical (精细化工), 2016, 33(2): 152-156.
- [27] ZHAO T, DING Y, SUN W Z, *et al.* Ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Nitraria sibirica* leaf using response surface methodology and their anti-proliferative activity on 3T3-L1 preadipocytes and antioxidant activities[J]. Journal of Food Science, 2023, 22(19): 1750-1765.
- [28] GUO W Q, REN N Q, WANG X J, *et al.* Optimization of culture conditions for hydrogen production by *Ethanoligenens harbinense* B49 using response surface methodology[J]. Bioresource Technology, 2009, 99(3): 1192-1196.
- [29] ASMUNGI A H, GHAZALI N A, ABDUL M S F, *et al.* Optimisation of rheological properties of water-based mud (WBM) with natural additives by using response surface methodology (RSM)[J]. Key Engineering Materials, 2023, 93(9): 939-945.
- [30] YING K C, KEITH M D. Monotone response surface of multi-factor condition: Estimation and bayes classifiers[J]. Journal of Royal Statistical Society, 2023, 2(85): 497-522.
- [31] WANG P (王鹏), WANG Y (王玉), MEI J (梅菊), *et al.* Study on extraction technology of hyperin from *Abelmoschus manihot*[J]. Food and Fermentation Science & Technology (食品与发酵科技), 2021, 57(3): 76-80, 89.
- [32] CAO M M (曹明明), CHE L L (车琳琳), ZHU L W (朱路文). Research progress on the pharmacological action and mechanism of hyperoside[J]. Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine (辽宁中医药大学学报), 2022, 24(6): 150-155.
- [33] DONG Y F, LI Q, GUO Y H, *et al.* Comparison of physicochemical and *in vitro* hypoglycemic activity of bamboo shoot dietary fibers from different regions of Yunnan[J]. Frontiers in Nutrition, 2023, 9(12): 1-11.
- [34] SUN M X (孙明霞), WANG X (王雪), LI X X (李晓秀), *et al.* Chemical constituents from *Hypericum curvisepalum*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica(中国中药杂志), 2021, 46(15): 3859-3864.
- [35] ZHENG Q M (郑清明), QIN L P (秦路平), ZHENG H C (郑汉臣), *et al.* Quantitative phytochemical analysis of 11 *Hypericum* species growing in China[J]. Journal of Second Military Medical University (第二军医大学学报), 2003, 24(4): 457-459.