

蒲葵子总黄酮提取工艺的优化及其体外抗肿瘤活性

朱丽¹, 黄松^{1,2,3*}, 林吉^{1,2,3}, 赖小平^{1,2,3}, 张桂芳^{1,2,3}, 贺莲⁴

(1. 广州中医药大学, 广东广州 510006; 2. 东莞广州中医药大学中医药数理工程研究院, 广东东莞 523808; 3. 广东省中医药数理工程研究院, 广东广州 510006; 4. 广东食品药品职业学院, 广东广州 510006)

摘要: 目的 优化蒲葵子总黄酮提取工艺, 并评价其体外抗肿瘤活性。方法 以提取时间、超声功率、乙醇体积分数、液料比为影响因素, 总黄酮提取率为评价指标, 星点设计-效应面法优化提取工艺。然后, MTT法检测总黄酮对SGC7901、HepG2、A549细胞的抑制作用。结果 最佳条件为提取时间30 min, 超声功率80 Hz, 乙醇体积分数65%, 液料比30:1, 总黄酮提取率11.59%。与阴性对照比较, 总黄酮对3种肿瘤细胞均具有显著抑制作用($P < 0.05$, $P < 0.01$), 并呈量效关系, 48 h内最大抑制率分别为83.77%、93.33%、74.39%。结论 该方法稳定可靠, 可用于提取具有较强体外抗肿瘤活性的蒲葵子总黄酮。

关键词: 蒲葵子; 总黄酮; 提取; 体外抗肿瘤活性; 星点设计-效应面法; MTT法

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2018)09-1959-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.09.013

Extraction optimization for total flavonoids from *Livistona chinensis* and the *in vitro* anti-tumor activity

ZHU Li¹, HUANG Song^{1,2,3*}, LIN Ji^{1,2,3}, LAI Xiao-ping^{1,2,3}, ZHANG Gui-fang^{1,2,3}, HE Lian⁴

(1. Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China; 2. Dongguan Municipal Institution for Mathematics and Theoretical Engineering Research for Traditional Chinese Medicine, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Dongguan 523808, China; 3. Guangdong Provincial Institution for Mathematics and Theoretical Engineering Research for Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China; 4. Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT: **AIM** To optimize the extraction for total flavonoids from *Livistona chinensis* (Jacq.) R. Br. and to evaluate the *in vitro* anti-tumor activity. **METHODS** With extraction time, ultrasound power, ethanol concentration and liquid-solid ratio as influencing factors, total flavonoids extraction rate as an evaluation index, central composite design-response surface method was applied to optimizing the extraction. Afterwards, the inhibition effects of total flavonoids on SGC7901, HepG2, A549 cells were detected by MTT assay. **RESULTS** The optimal conditions were determined to be 30 min for extraction time, 80 Hz for ultrasound power, 65% for ethanol concentration, and 30:1 for liquid-solid ratio, the total flavonoids extraction rate was 11.59%. Compared with negative control, total flavonoids exhibited significant inhibition effects on three tumor cells in a dose-effect manner ($P < 0.05$, $P < 0.01$), with the maximal inhibition rates of 83.77%, 93.33%, 74.39% within 48 h, respectively. **CONCLUSION** This stable and reliable method can be used for the extraction for total flavonoids from *L. chinensis* with strong *in vitro* anti-tumor activity.

KEY WORDS: *Livistona chinensis* (Jacq.) R. Br.; total flavonoids; extraction; *in vitro* anti-tumor activity; central composite design-response surface method; MTT assay

收稿日期: 2018-02-28

基金项目: 广东省省级科技计划项目(2013A022100002)

作者简介: 朱丽(1993—), 女, 硕士生, 从事中药新药研发。Tel: 15989003032, E-mail: 18370960017@163.com

*通信作者: 黄松(1973—), 男, 副教授, 博士生导师, 从事中药新药研发。Tel: 13668987309, E-mail: huangnn421@163.com

据报道,中国每年新发癌症达429万,占全球20%,其中死亡281万^[1],其防治已成为重要公共卫生问题。目前,上市的抗癌药大多副作用较大,在治疗的同时也会产生较严重的不良反应,故发现高效低毒的相关药物至关重要。

蒲葵子在民间常被用于治疗各种癌症(如肝癌、肺癌、食管癌等)^[2],为棕榈科植物蒲葵 *Livistona chinensis* (Jacq.) R. Br. 的干燥成熟果实,性味甘、淡、涩、平,具有止血抗癌功效,含有黄酮、甾体、三萜、蒽醌、多糖、鞣质等成分^[3-4],有着抗肿瘤、抗氧化、保肝等作用^[5-8]。研究表明,从蒲葵子中分离出的抗肿瘤活性成分主要为黄酮^[9-10],故本实验采用星点设计-效应面法优化蒲葵子总黄酮提取工艺,并通过MTT法考察其对SGC7901、HepG2、A549细胞的抑制作用,以期预防癌症的相关保健产品开发提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器 TU-1810紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);KQ5200数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);CP225D电子天平(十万分之一,德国Sartorius公司);Scien TZ-10 N冷冻干燥机(宁波新芝生物科技股份有限公司);HF90 CO₂培养箱[力新仪器(上海)有限公司];AE2000倒置显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司);EL×800酶标仪(美国BioTek公司);GeneSpeed 416离心机(基因有限公司)。

1.2 试药 蒲葵子由广东德鑫制药有限公司提供,经广州中医药大学中医药数理工程研究院陈建南研究员鉴定为棕榈科植物蒲葵 *Livistona chinensis* (Jacq.) R. Br. 的干燥成熟果实。芦丁对照品(批号151023,含有量≥98%,成都普菲德生物技术有限公司)。MTT(批号M2128,美国Sigma公司);DMSO(美国MP公司);高糖DMEM(批号c1995500bt,美国Gibco公司);胎牛血清、PBS、青链霉素混合液(美国Hyclone公司)。硝酸铝、亚硝酸钠、氢氧化钠、乙醇均为分析纯。

1.3 细胞 人胃癌细胞SGC7901、人肝癌细胞HepG2、人肺癌细胞A549均购自吉欧生物技术有限公司。

2 方法与结果

2.1 方法学考察

2.1.1 供试品溶液制备 药材粉碎后过50目筛,

精密称取1.000 g,加入70%乙醇20 mL,超声提取30 min,抽滤,滤液转至100 mL量瓶中,定容至刻度,即得。

2.1.2 对照品溶液制备 精密称取芦丁对照品10.0 mg,甲醇溶解,转移至50 mL量瓶中,定容至刻度,即得(质量浓度0.2 mg/mL)。

2.1.3 检测波长选择 取供试品、对照品溶液各1 mL,置于10 mL量瓶中,NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH系统显色后,在200~800 nm波长处进行扫描,发现两者在504 nm处均有最大吸收,故选择其作为检测波长。

2.1.4 线性关系考察 分别精密吸取0、0.50、1.00、2.00、3.00、4.00、5.00 mL对照品溶液于10 mL量瓶中,加5% NaNO₂溶液1 mL,混匀后静置6 min,加4% Al(NO₃)₃溶液1 mL,混匀后静置6 min,再加6% NaOH溶液3.0 mL,蒸馏水稀释至10 mL,混匀,静置15 min,第1管作为空白对照,在504 nm波长处测定吸光度。以吸光度(A)对溶液质量浓度(X)进行回归,得回归方程为 $A = 11.32284X + 0.00901$ ($r = 0.9992$),在0.01~0.1 mg/mL范围内呈良好的线性关系。

2.1.5 精密度试验 精密量取供试品溶液1 mL,按“2.1.3”项下方法测定吸光度5次,测得其RSD为1.90%,表明仪器精密度良好。

2.1.6 重复性试验 取同一批药材,按“2.1.1”项下方法平行制备供试品溶液5份,分别精密量取1 mL,按“2.1.3”项下方法测定吸光度5次,测得其RSD为1.80%,表明该方法重复性良好。

2.1.7 稳定性试验 取同一批药材,按“2.1.1”项下方法平行制备供试品溶液,按“2.1.3”项下方法每隔10 min测定吸光度1次,持续120 min,测得其RSD为2.70%,表明溶液在120 min内稳定性良好。

2.1.8 加样回收率试验 取同一批含有量已知的药材粉末(含无水芦丁6.07%)5份,每份0.1 g,精密加入芦丁对照品6.2 mg、70%乙醇2 mL,超声提取30 min后抽滤,滤液转移至10 mL量瓶中,定容至刻度,按“2.1.3”项下方法测定吸光度,测得其平均加样回收率为98.88%,RSD为1.22%。

2.2 单因素试验

2.2.1 提取方法 精密称取同一批药材粉末10.000 g,加入100 mL 70%乙醇,分别回流、超声(100 Hz)、冷浸30 min,过滤,浓缩,浓缩液

转移至 100 mL 量瓶中，70% 乙醇定容至刻度。取 1 mL，稀释 20 倍后取 1 mL 稀释液，置于 10 mL 量瓶中，按“2.1.3”项下方法测定吸光度，计算提取率 [(提取液中总黄酮质量/药材粉末质量) × 100%，下同]，平行 5 次。结果，3 种提取方法下的提取率分别为 7.95%、8.67%、5.02%，即超声提取最高。

2.2.2 超声功率 为了排除温度对实验结果的干扰，超声仪中的水处于循环更新状态。精密称取同一批药材粉末 10.000 g，加入 100 mL 70% 乙醇，超声功率选择 60、70、80、90、100 Hz，减压抽滤，浓缩，浓缩液转移至 100 mL 量瓶中，提取溶剂定容至刻度。取 1 mL，稀释 20 倍后取 1 mL 稀释液，置于 10 mL 量瓶中，计算提取率，平行 5 次。结果，5 种超声功率下的提取率分别为 6.93%、7.76%、8.74%、8.63%、8.68%，即在 80 Hz 时最大，之后反而有所下降，可能是由于超声功率过大对总黄酮化学结构有所破坏。

2.2.3 提取时间 固定超声功率 80 Hz，提取时间选择 10、20、30、40、50 min，计算提取率，平行 5 次。结果，5 种提取时间下的提取率分别为 6.25%、7.30%、8.70%、8.66%、8.69%，即在 30 min 时最高，之后趋于平衡。

2.2.4 乙醇体积分数 固定超声功率 80 Hz，提取时间 30 min，乙醇体积分数选择 50%、60%、70%、80%、95%，计算提取率，平行 5 次。结果，5 种乙醇体积分数下的提取率分别为 6.75%、7.53%、8.59%、8.41%、8.07%，即在 70% 时最高，之后有所下降。

2.2.5 液料比 固定超声功率 80 Hz，提取时间 30 min，乙醇体积分数 70%，液料比选择 10 : 1、15 : 1、20 : 1、25 : 1、30 : 1，计算提取率，平行 5 次。结果，5 种液料比下的提取率分别为 8.67%、9.27%、9.77%、10.16%、10.01%，即在 25 : 1 时最高，之后趋于平衡。

2.2.6 提取次数 固定超声功率 80 Hz，提取时间 30 min，乙醇体积分数 70%，液料比 25 : 1，选择提取次数 1、2、3、4 次，计算提取率，平行 5 次。结果，4 种提取次数下的提取率分别为 10.36%、11.73%、11.84%、11.86%，即 2 次时可基本保证完全提取，后期不再优化。

2.3 工艺优化^[14] 选择提取时间 (A)、超声功率 (B)、乙醇体积分数 (C)、液料比 (D) 作为影响因素，总黄酮提取率 (Y) 作为评价指标进行

响应面试验，因素水平见表 1，结果见表 2。

表 1 因素水平

Tab. 1 Factors and levels

因素	水平				
	-2	-1	0	1	2
A 提取时间/min	10	20	30	40	50
B 超声功率/Hz	60	70	80	90	100
C 乙醇/%	50	60	70	80	90
D 液料比	15 : 1	20 : 1	25 : 1	30 : 1	35 : 1

表 2 试验设计及结果

Tab. 2 Design and results of tests

试验号	A	B	C	D	Y 总黄酮提取率/%
1	-1	-1	-1	-1	6.14
2	1	-1	-1	-1	9.04
3	-1	1	-1	-1	8.23
4	1	1	-1	-1	8.65
5	-1	-1	1	-1	9.45
6	1	-1	1	-1	9.65
7	-1	1	1	-1	9.03
8	1	1	1	-1	9.46
9	-1	-1	-1	1	9.08
10	1	-1	-1	1	10.23
11	-1	1	-1	1	10.57
12	1	1	-1	1	10.25
13	-1	-1	1	1	8.85
14	1	-1	1	1	10.44
15	-1	1	1	1	9.46
16	1	1	1	1	9.62
17	-2	0	0	0	6.08
18	2	0	0	0	9.03
19	0	-2	0	0	9.87
20	0	2	0	0	11.48
21	0	0	-2	0	10.52
22	0	0	2	0	11.79
23	0	0	0	-2	9.58
24	0	0	0	2	10.67
25	0	0	0	0	10.68
26	0	0	0	0	11.55
27	0	0	0	0	11.84
28	0	0	0	0	11.62
29	0	0	0	0	11.84
30	0	0	0	0	11.82

然后，通过 Design-Expert 8.05b 软件进行拟合，得回归方程为 $Y = -97.449598 + 1.12404A + 0.87262B + 0.79937C + 1.68025D - 0.00321875AB - 0.0010625AC - 0.00171250AD - 0.002518175BC + 0.000262500BD - 0.00911250CD - 0.011039A^2 -$

$0.003\ 238\ 54B^2 - 0.002\ 038\ 54C^2 - 0.018\ 454D^2$ ，方差分析见表3。由表可知，二项式拟合模型 $P < 0.000\ 1$ ，表明模型显著；因素 A、D、CD、 A^2 、 B^2 、 D^2 的 $P < 0.05$ ，表明均具有显著性；失拟项 $P > 0.05$ ，表明误差小，模型拟合度较高。

表3 方差分析

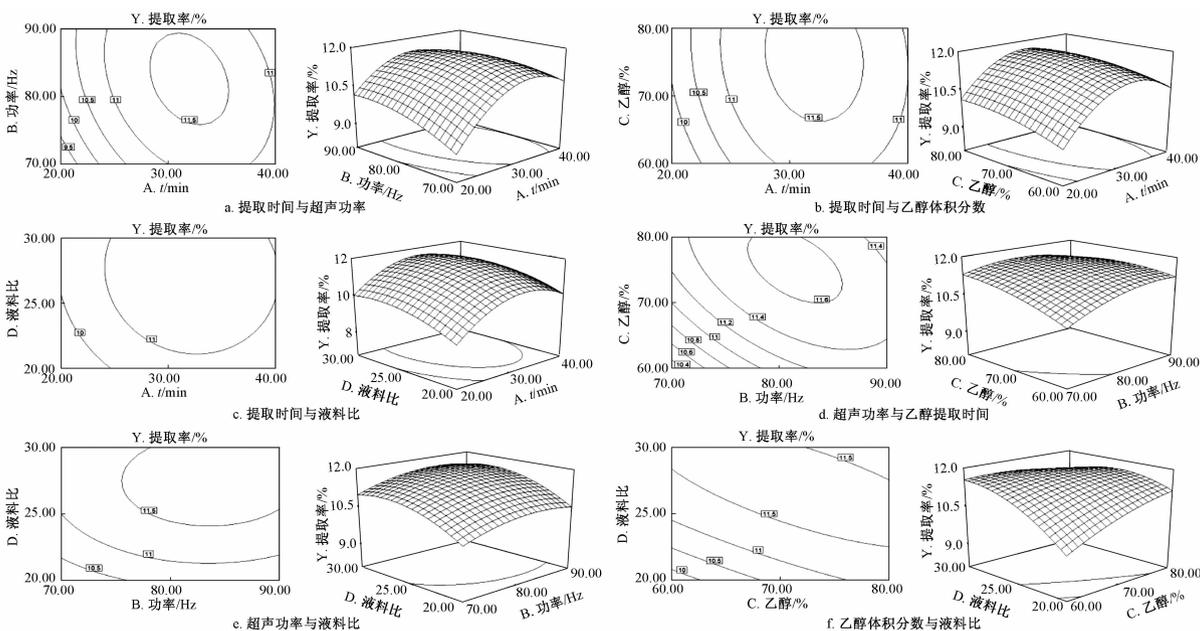
Tab. 3 Analysis of variance

来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	57.260	14	4.09	9.900	<0.000 1
A	6.440	1	6.440	15.580	0.001 3
B	1.310	1	1.310	3.170	0.095 1
C	1.660	1	1.660	4.020	0.063 5
D	5.070	1	5.070	12.270	0.003 2
AB	1.660	1	1.660	4.010	0.063 6
AC	0.200	1	0.200	0.470	0.501 7
AD	0.120	1	0.120	0.280	0.601 9
BC	1.020	1	1.020	2.460	0.137 9
BD	0.003	1	0.003	0.007	0.936
CD	3.320	1	3.320	8.040	0.012 5
A^2	33.420	1	33.420	80.900	<0.000 1
B^2	2.880	1	2.880	6.960	0.018 6
C^2	1.140	1	1.140	2.760	0.117 5
D^2	2.830	1	2.830	6.130	0.025 7
残差	6.200	15	0.410	—	—
失拟项	5.190	10	0.520	2.590	0.152 5
纯误差	1.000	5	0.20	—	—
总离差	63.460	29	—	—	—

响应面分析见图1，确定最优工艺为提取时间 31.56 min，超声功率 85.49 Hz，乙醇体积分数

63.57%，液料比 29.03 : 1，根据实际操作情况，将其修正为提取时间 30 min，超声功率 80 Hz，乙醇体积分数 65%，液料比 30 : 1。称取 5 份药材粉末，每份 10.000 g，按上述优化工艺进行验证试验，测得总黄酮提取率为 11.59%，RSD 为 1.26%，与预测值 11.76% 相当，表明该模型预测性良好。

2.4 体外抗肿瘤活性评价 取对数生长期的 HepG2、SGC 7901、A549 细胞，消化计数后 [细胞密度约为 $(3 \sim 9) \times 10^4/\text{mL}$]，按每孔 100 μL ($3 \sim 9) \times 10^3$ 个细胞接种于 96 孔细胞培养板中，四周用无菌 PBS 填充以防止边缘效应，培养 24 h 待细胞贴壁后，原培养液用移液枪移出，对半稀释方法配制成不同质量浓度 (800、400、200、100、50、25、12.5、6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，每孔设 6 个复孔，加 100 μL ，并各设 6 个阴性、阳性对照孔 (5-氟尿嘧啶，50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和 2 个调零孔，调整板内各孔液体总量，使其均为 100 μL ，不足者补充含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖型培养液。药物与肿瘤细胞分别孵育 24、48 h 后，加入 5 mg/mL MTT PBS 溶液 20 μL ，继续培养 4 h 后终止，小心吸取除去培养孔内的培养液，每孔加入 150 μL DMSO，振摇 10 min 以使形成的甲臜颗粒充分溶解，混匀后于 570 nm 波长处测定各孔吸光度 (OD 值)，计



注：左图均为等高线图，右图均为响应面图

图1 各因素响应面图

Fig. 1 Response surface plots for various factors

算抑制率,取平均值,通过 SPSS 20.0 进行统计学分析,结果见表 4~6。由表可知,总黄酮对 3 种细胞均具有显著抑制作用 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),并呈量效关系。

表 4 总黄酮对 SGC7901 细胞的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)
Tab. 4 Effects of total flavonoids on SGC7901 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

给药剂量/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	OD 值		抑制率/%	
	24 h	48 h	24 h	48 h
阴性对照组	0.969 ± 0.002	0.906 ± 0.006	-	-
800	0.202 ± 0.002 **	0.147 ± 0.005 **	79.11 ± 0.18	83.77 ± 0.45
400	0.385 ± 0.002 **	0.306 ± 0.007 **	60.2 ± 0.19	66.24 ± 0.72
200	0.497 ± 0.005 **	0.384 ± 0.008 **	48.67 ± 0.51	57.63 ± 0.75
100	0.600 ± 0.004 **	0.486 ± 0.006 **	38.08 ± 0.39	46.33 ± 0.060
50	0.675 ± 0.004 **	0.599 ± 0.008 **	30.35 ± 0.36	33.90 ± 0.75
25	0.734 ± 0.003 **	0.658 ± 0.006 **	24.18 ± 0.28	27.37 ± 0.58
12.5	0.859 ± 0.005 **	0.754 ± 0.007 **	11.32 ± 0.47	16.71 ± 0.73
6.25	0.920 ± 0.003 **	0.811 ± 0.004 **	5.06 ± 0.25	10.49 ± 0.39
阳性对照组	0.214 ± 0.003 **	0.169 ± 0.005 **	77.92 ± 0.260	81.35 ± 0.420

注:与阴性对照组比较, ** $P < 0.01$

表 5 总黄酮对 HepG2 细胞的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)
Tab. 5 Effects of total flavonoids on HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

给药剂量/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	OD 值		抑制率/%	
	24 h	48 h	24 h	48 h
阴性对照组	0.998 ± 0.002	0.912 ± 0.005	-	-
800	0.101 ± 0.002 **	0.061 ± 0.003 **	89.86 ± 0.270	93.33 ± 0.310
400	0.150 ± 0.003 **	0.105 ± 0.005 **	84.98 ± 0.330	88.49 ± 0.480
200	0.397 ± 0.006 **	0.289 ± 0.002 **	60.23 ± 0.660	68.32 ± 0.150
100	0.438 ± 0.004 **	0.318 ± 0.006 **	56.07 ± 0.480	65.18 ± 0.560
50	0.499 ± 0.004 **	0.375 ± 0.006 **	49.99 ± 0.500	58.86 ± 0.560
25	0.603 ± 0.003 **	0.509 ± 0.009 **	39.53 ± 0.350	44.23 ± 0.880
12.5	0.798 ± 0.004 **	0.633 ± 0.009 **	20.00 ± 0.600	30.62 ± 0.910
6.25	0.900 ± 0.004 **	0.739 ± 0.009 **	9.77 ± 0.630	19.02 ± 0.920
阳性对照组	0.184 ± 0.003 **	0.109 ± 0.005 **	78.91 ± 0.600	85.93 ± 0.440

注:与阴性对照组比较, ** $P < 0.01$

表 6 总黄酮对 A549 细胞的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)
Tab. 6 Effects of total flavonoids on A549 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

给药剂量/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	OD 值		抑制率/%	
	24 h	48 h	24 h	48 h
阴性对照组	0.656 ± 0.010	0.799 ± 0.035	-	-
800	0.252 ± 0.010 **	0.204 ± 0.016 **	61.59 ± 1.01 **	74.39 ± 1.62 **
400	0.294 ± 0.010 **	0.220 ± 0.010 **	55.31 ± 1.20 **	72.48 ± 1.00 **
200	0.409 ± 0.003 **	0.382 ± 0.006 **	37.67 ± 0.30 **	52.19 ± 0.58 **
100	0.499 ± 0.005 **	0.596 ± 0.003 **	24.00 ± 0.50 **	25.43 ± 0.26 **
50	0.543 ± 0.004 **	0.652 ± 0.011 *	17.33 ± 0.43 **	18.33 ± 1.06 *
25	0.612 ± 0.007 *	0.666 ± 0.003 *	6.71 ± 0.66 *	16.63 ± 0.32 *
12.5	0.629 ± 0.006 *	0.726 ± 0.011	4.10 ± 0.59 *	9.10 ± 1.11
6.25	0.643 ± 0.007	0.783 ± 0.006	2.01 ± 0.72	1.95 ± 0.51
阳性对照组	0.234 ± 0.003 **	0.179 ± 0.014 **	64.33 ± 0.002 **	77.60 ± 0.006 *

注:与阴性对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

星点设计-效应面法具有试验次数少、精度高的优点^[11-12]；超声提取在中药研究中的应用比较普遍，具有设备简单、操作方便、提取时间短、提取较完全的特点^[13-15]，故本实验采用该方法优化蒲葵子总黄酮提取工艺，可为后期相关药效学研究奠定基础，也为相关产品开发提供参考依据。另外，考虑到温度对提取率的影响较大，而本实验所用超声仪无法控制温度，故人为地使仪器中的水处于流动更替状态，以减少温度对实验结果的影响。

在高质量浓度（100 ~ 800 μg/mL）下，蒲葵子总黄酮对 SGC7901、HepG2、A549 细胞的抑制率较大，在 800 μg/mL 时作用 48 h 后达到最大，分别为 79.11%、89.86%、74.39%；低质量浓度（6.25 μg/mL）下对其抑制率较小，尤其是 A549 细胞，其原因可能是此时 3 种细胞对总黄酮敏感度较低，或提取物纯度不够高所致，需进一步富集纯化以增强其药效。

蒲葵子总黄酮提取物成分复杂，对其抑制细胞增殖的机制尚未完全明确。因此，今后将对该成分进行体内抗肿瘤活性研究，以期更全面地评价其作用。

参考文献：

[1] 佚名. 2017 年中国最新癌症数据[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2017, 24(6): 760.
[2] 黄月凤, 许海婷, 陈平, 等. 蒲葵籽的化学成分及其抗癌活性成分研究[J]. 海峡药学, 2011, 23(4): 38-40.

[3] 江苏医学院. 中药大词典（下）[M]. 上海：上海科学技术出版社, 1986: 2459.
[4] 陈艳, 姚宏, 李少光, 等. 蒲葵子化学成分研究[J]. 海峡药学, 2012, 24(8): 50-53.
[5] 刘国雄. 蒲葵子质量评价方法研究[D]. 广州：广州中医药大学, 2016.
[6] 张亮. 蒲葵子抗氧化及保肝活性研究[D]. 广州：广州中医药大学, 2016.
[7] 钟振国, 罗沛, 黄燕, 等. 蒲葵子抗癌有效部位提取物的小鼠微核实验[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(4): 775-776.
[8] 柳雷, 熊常健, 朱岳麟, 等. 蒲葵籽活性单体的分离及其抗癌活性研究[J]. 北京化工大学学报（自然科学版）, 2015, 42(6): 78-83.
[9] 王慧. 中药蒲葵子有效部位化学成分及药材质量控制的研究[D]. 成都：成都中医药大学, 2008.
[10] Zeng X B, Qiu Q, Jiang C G, et al. Antioxidant flavanes from *Livistona chinensis*[J]. *Fitoterapia*, 2011, 82(4): 609-614.
[11] 彭晓霞, 路莎莎. 响应面优化法在中药研究中的应用和发展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(19): 296-299.
[12] 吕莎, 张梦雅, 罗晓云, 等. 星点设计-效应面法优化牛樟芝总三萜提取工艺及其抗肿瘤活性研究[J]. 中草药, 2016, 47(22): 3990-3996.
[13] Belwal T, Dhyani P, Bhatt I D, et al. Optimization extraction conditions for improving phenolic content and antioxidant activity in *Berberis asiatica* fruits using response surface methodology (RSM) [J]. *Food Chem*, 2016, 207: 115-124.
[14] 徐春龙, 林书玉. 超声提取中草药成分研究进展[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(6): 933-937.
[15] Bayar N, Bouallegue T, Achour M, et al. Ultrasonic extraction of pectin from *Opuntia ficus indica* cladodes after mucilage removal: Optimization of experimental conditions and evaluation of chemical and functional properties[J]. *Food Chem*, 2017, 235: 275-282.