

学分析[J]. 中成药, 2015, 37(5): 971-977.

[16] 刘继超, 刘晓风, Lormoua Kiatoukousin, 等. 地木耳粗多糖超声波辅助提取工艺优化及其动力学和热力学分析[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(2): 316-324.

[17] 张艳丽, 符华林, 卢朝成, 等. 内部沸腾法提取槐米中的芦丁及其动力学和热力学研究[J]. 中成药, 2015, 37(4): 895-898.

[18] 原姣姣, 陈锦璇, 张帆, 等. 响应面优化超声-酶辅助强化

油橄榄叶多糖的提取[J]. 中国油脂, 2019, 44(4): 128-132.

[19] 许芳, 吴雨龙, 王俏娜, 等. 超声波协同酶法提取菊苣根多糖工艺优化[J]. 食品工业科技, 2017, 38(9): 168-173; 180.

[20] 黄秀香, 赖红芳, 罗丽程. 超声波协同复合酶法提取半边莲多糖工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5): 44-46.

小构树总黄酮提取工艺优化及其抗氧化、美白活性

张意笠, 胡培豪, 黄真, 程汝滨, 钟晓明*
(浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053)

摘要: 目的 优化小构树总黄酮提取工艺, 并评价其抗氧化、美白活性。方法 在单因素试验基础上, 以乙醇体积分数、液料比、提取温度、提取时间为影响因素, 总黄酮得率为评价指标, Box-Behnken 响应面法优化提取工艺。检测总黄酮对 DPPH、ABTS 自由基的清除能力, 以及对酪氨酸酶活性的抑制作用。**结果** 最佳条件为乙醇体积分数 90%, 液料比 35 : 1, 提取温度 85 ℃, 提取时间 80 min, 总黄酮得率为 55. 14 mg/g。总黄酮对 DPPH、ABTS 自由基及酪氨酸酶单酚酶、二酚酶的 IC₅₀ 值分别为 151. 70、242. 20、24. 37、15. 64 μg/mL。**结论** 该方法稳定可靠, 可用于提取具有良好抗氧化、美白活性的小构树总黄酮。

关键词: 小构树; 总黄酮; 提取; 抗氧化活性; 美白活性; Box-Behnken 响应面法

中图分类号: R284. 2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2020)04-0842-07

doi: 10. 3969/j. issn. 1001-1528. 2020. 04. 004

Extraction process optimization and anti-oxidant, whitening activities of total flavonoids from *Broussonetia kazinoki*

ZHANG Yi-li, HU Pei-hao, HUANG Zhen, CHENG Ru-bin, ZHONG Xiao-ming*
(Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: **AIM** To optimize the extraction process for total flavonoids from *Broussonetia kazinoki* Sieb. et Zucc. and to evaluate their anti-oxidant and whitening activities. **METHODS** With ethanol concentration, liquid-solid ratio, extraction temperature and extraction time as influencing factors, total flavonoids yield as an evaluation index, the extraction process was optimized by Box-Behnken response surface method on the basis of single factor test. The scavenging capacities of total flavonoids on DPPH and ABTS free radicals, and their inhibitory effect on tyrosinase activity were detected. **RESULTS** The optimal conditions were determined to be 90% for ethanol concentration, 35 : 1 for liquid-solid ratio, 85 ℃ for extraction temperature and 80 min for extraction time, the total flavonoids yield was 55. 14 mg/g. The IC₅₀ values of total flavonoids on DPPH and ABTS free radicals, tyrosinase monophenolase and diphenolase were 151. 70, 242. 20, 24. 37, 15. 64 μg/mL. **CONCLUSION** This stable and

收稿日期: 2019-09-27

基金项目: 株式会社高丝研究所横向课题 (2016-HT-146)

作者简介: 张意笠 (1994—), 女, 硕士生, 从事中药品质评价及资源开发利用研究。Tel: 17826867289, E-mail: ZYL_pony@163.com

* 通信作者: 钟晓明 (1962—), 男, 教授, 博士生导师, 从事中药品质评价及资源开发利用研究。Tel: (0571) 61768168, E-mail: k6_zxm@sina.com

reliable method can be used for the extraction for total flavonoids from *B. kazinoki* with good anti-oxidant and whitening activities.

KEY WORDS: *Broussonetia kazinoki* Sieb. et Zucc.; total flavonoids; extraction; anti-oxidant activity; whitening activity; Box-Behnken response surface method

小构树 *Broussonetia kazinoki* Sieb. et Zucc. 为桑科构属落叶灌木，别名楮皮、葡蟠、女谷等，主要分布在我国华东、华南地区及日本，资源丰富，在林业、农业方面有广泛应用^[1]。《中华本草》记载，小构树叶具有清热解毒、祛风止痒、敛疮止血等作用^[2]；小构树根提取物被 2015 年版《已使用化妆品原料名称目录》收载，显示出该植物在化妆品领域具有一定的开发利用价值。

黄酮在植物界中广泛存在，为色原烷或色原酮衍生物，是以 α -苯基苯并吡喃酮为主体的一系列物质总称^[3-4]，具有许多药理活性，在医药、食品、化妆品等行业得到广泛应用^[5]，王中晓^[6]研究显示，银杏叶总黄酮对心肌缺氧性损伤有明显保护作用；汪光华等^[7]报道，从高良姜中提取纯化得到的高良姜素、山柰素、山柰酚、槲皮素均对金黄色葡萄球菌有较强的抑制作用；方向等^[8]从苦荞萌发物中提取出苦荞黄酮，发现它在整个紫外波段均有较强的吸收。另外，它也是构属植物主要化学成分之一，具有良好的生物活性。Lim 等^[9]发现，小构树根皮提取物异戊二烯型黄酮 Kazinol U 可减少黑色素生成，改善色素沉着；贾东辉等^[10]报道，构树叶醇提物中的成分主要为黄酮类，具有一定的抗氧化活性，并且存在量效关系。

目前，对构属植物的研究主要集中在构树，而对同属成员小构树缺少相关报道。小构树为资源丰富、分布广泛、来源廉价的药用植物，但其总黄酮提取工艺落后，提取效率较低，同时尚无系统活性评价。因此，本实验采用 Box-Behnken 响应面法优化小构树总黄酮提取工艺，并评价该成分抗氧化、美白活性，以期促进该资源和相关产品的深入开发利用。

1 材料

1.1 仪器 DZF 数显鼓风干燥箱（上海博讯实业有限公司）；AL104 电子天平 [梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司]；RE-52AA 旋转蒸发仪（上海亚荣生化仪器厂）；恒温水浴锅（上海宜昌仪器纱筛厂）；紫外分光光度计（日本岛津公司）；BLX-800 酶标仪（美国 BioTek 公司）。

1.2 试剂与药物 小构树根采自浙江省杭州市，经浙江中医药大学药学院中药资源研究所陈孔荣副教授鉴定为桑科构属小构树 *Broussonetia kazinoki* Sieb. et Zucc. 的干燥根。芦丁对照品（B20771-100 mg，纯度 $\geq 98\%$ ，批号 T27F10Z81699）、1，1-苯基-2-苦肟基自由基（DPPH）（S30629-250 mg，纯度 98%，批号 W27F10E81251）、L-酪氨酸（S20087-25 g，批号 J30M10R84464）、L-多巴（S20191-25 g，批号 O25M8K3214）、熊果苷（B21402-20 mg，纯度 $\geq 98\%$ ，批号 T17S6B1）（上海源叶生物科技有限公司）；2，2-联氮-二（3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸）二铵盐（ABTS）[酷尔化学科技（北京）有限公司，批号 54C1201V]；L-抗坏血酸（美国 Sigma 公司，批号 WXB B4747V）；酪氨酸酶（美国 Worthington 公司，批号 34A14699Y）。无水乙醇、氢氧化钠、硝酸铝、亚硝酸钠、过硫酸钾、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 总黄酮含量测定 参考文献 [11] 报道的方法。

2.1.1 对照品溶液制备 精密称取芦丁对照品 10.0 mg，75% 乙醇定容至 10 mL，摇匀，即得（1.0 mg/mL）。

2.1.2 供试品溶液制备 小构树根粉碎后过 50 目筛，精密称取粉末 1.0 g，加入 20 mL 75% 乙醇，置于 70 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅中冷凝回流提取 60 min，抽滤，滤液转移至 50 mL 量瓶中，定容至刻度，即得。

2.1.3 检测波长选择 取供试品、对照品溶液各 1 mL，置于 25 mL 比色管中，加 5% NaNO_2 溶液 1 mL，混匀后静置 6 min，加 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液 1 mL，混匀后静置 6 min，再加 4% NaOH 溶液 10 mL，蒸馏水定容至 25 mL，混匀，静置 15 min，在 200~800 nm 波长处进行扫描，发现上述 2 种溶液在 510 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 精密吸取 0.3、0.6、0.9、1.2、1.5、1.8 mL 对照品溶液于 25 mL 比色管中，按“2.1.3”项下方法处理，以蒸馏水管溶液为空

白，在 510 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 $A=0.429\ 2X-0.003\ 6$ （ $R^2=0.999\ 5$ ），在 0.3 ~ 1.8 mg/mL 范围内呈良好的线性关系。

2.1.5 精密度试验 精密吸取“2.1.1”项下对照品溶液适量，按“2.1.3”项下方法平行测定 6 次吸光度，测得其 RSD 为 0.8%，表明仪器精密度良好。

2.1.6 重复性试验 精密称取小构树根粉末 1.0 g，共 6 份，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.1.3”项下方法测定吸光度，测得其 RSD 为 1.8%，表明该方法重复性良好。

2.1.7 稳定性试验 取“2.1.2”项下供试品溶液，按“2.1.3”项下方法每隔 10 min 测定吸光度 1 次，持续 60 min，测得其 RSD 为 2.7%，表明溶液在 60 min 内稳定性良好。

2.1.8 加样回收率试验 取 6 份含有量已知的小构树根粉末，精密加入等量芦丁对照品，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.1.3”项下方法测定吸光度，测得其平均加样回收率为 95.3%，RSD 为 2.3%。

2.2 单因素试验 选择乙醇体积分数（55%、65%、75%、85%、95%）、液料比（10：1、20：1、30：1、40：1、50：1）、提取温度（50、60、70、80、90 ℃）、提取时间（30、60、90、120、150 min）进行单因素试验，平行 3 次，考察其对总黄酮得率的影响。

如图 1A 所示，总黄酮得率随着乙醇体积分数增大而先升后降，在 85% 时达到最大值，但当其过高时可能会使一些醇溶性杂质溶出增多，导致得率反而下降。如图 1B 所示，总黄酮得率随着液料比增大而先升后略降，在 30：1 时达到最大值，但其继续增加时得率反而略有降低，可能是由于其他非黄酮类可溶性杂质溶出所致。如图 1C 所示，总黄酮得率随着温度升高而先升后降，在 80 ℃ 时达到最大值，但当其过高时可能会使黄酮类成分氧化变性，导致得率下降。如图 1D 所示，总黄酮得率随着时间延长而先升后降，在 90 min 时达到最大值，但提取时间过短，黄酮类成分溶出不足；提取时间过长，可能会使一些热不稳定成分遭到破坏，导致得率下降。

综上所述，进行响应面分析的各因素水平分别为乙醇体积分数 75%、85%、95%，液料比 20：1、30：1、40：1，提取温度 70、80、90 ℃，提取时

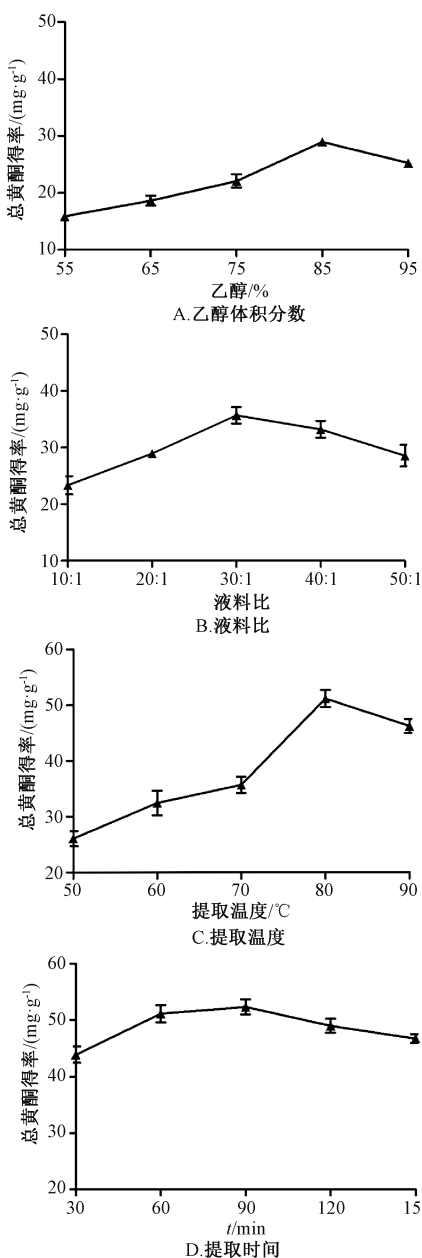


图 1 各因素对总黄酮得率的影响

Fig. 1 Effects of various factors on total flavonoids yield

间 60、90、120 min，最优提取工艺为乙醇体积分数 85%，液料比 30：1，提取温度 80 ℃，提取时间 90 min，总黄酮得率为 52.36 mg/g。

2.3 Box-Behnken 响应面法优化 在单因素试验基础上，以乙醇体积分数（ A ）、液料比（ B ）、提取温度（ C ）、提取时间（ D ）为影响因素，总黄酮得率为评价指标（ Y ）进行响应面分析，因素水平见表 1，结果见表 2。

通过 Design-Expert 8.0.6 软件进行拟合，得二阶多项式方程为 $Y=51.45+6.00A+3.48B+5.51C-0.031D+1.22AB-0.49AC+0.68AD+4.34BC-$

表 1 因素水平
Tab. 1 Factors and levels

因素	水平		
	-1	0	1
A 乙醇/%	75	85	95
B 液料比	20 : 1	30 : 1	40 : 1
C 提取温度/℃	70	80	90
D 提取时间/min	60	90	120

表 2 试验设计与结果
Tab. 2 Design and results of tests

试验号	A	B	C	D	总黄酮得率/(mg·g ⁻¹)
1	0	0	0	0	52.02
2	1	1	0	0	49.52
3	0	0	1	1	46.84
4	-1	0	1	0	37.91
5	0	1	-1	0	32.29
6	1	-1	0	0	40.80
7	1	0	-1	0	40.88
8	-1	0	0	-1	36.97
9	0	-1	0	-1	34.46
10	0	1	0	1	39.09
11	0	0	1	-1	46.75
12	0	-1	-1	0	32.02
13	-1	0	0	1	36.63
14	0	0	-1	-1	33.40
15	-1	-1	0	0	30.60
16	1	0	0	-1	46.58
17	1	0	1	0	49.30
18	0	0	0	0	51.77
19	0	0	0	0	49.47
20	0	-1	1	0	33.38
21	0	0	0	0	50.66
22	1	0	0	1	48.96
23	0	0	-1	1	32.89
24	-1	0	-1	0	27.53
25	-1	1	0	0	34.44
26	0	1	0	-1	49.75
27	0	-1	0	1	43.13
28	0	0	0	0	53.30
29	0	1	1	0	51.00

4.83BD + 0.15CD - 5.50A² - 6.71B² - 7.50C² - 3.59D², 方差分析见表 3。由此可知, 决定系数 R²=0.982 2, 修正相关系数 R_{adj}²=0.964 4, 模型 F=55.2, P<0.000 1, 表明模型有极显著意义; 失拟项 P>0.05, 表明模型与数据拟合程度良好; A、B、C、BC、BD、A²、B²、C²、D² 对总黄酮得率有极显著影响 (P<0.000 1), 各因素影响程度依次为乙醇体积分数>提取温度>液料比>提取时间。响应面分析^[12-13]见图 2。

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	1 749.684	14	124.977	55.215	<0.000 1
A	431.606	1	431.606	190.685	<0.000 1
B	144.991	1	144.991	64.057	<0.000 1
C	364.723	1	364.723	161.136	<0.000 1
D	0.011	1	0.011	0.005	0.944 6
AB	5.942	1	5.942	2.625	0.127 5
AC	0.956	1	0.956	0.422	0.526 2
AD	1.851	1	1.851	0.818	0.381 1
BC	75.229	1	75.229	33.236	<0.000 1
BD	93.423	1	93.423	41.274	<0.000 1
CD	0.089	1	0.089	0.039	0.846 0
A ²	196.321	1	196.321	86.735	<0.000 1
B ²	292.018	1	292.018	129.015	<0.000 1
C ²	364.497	1	364.497	161.036	<0.000 1
D ²	83.515	1	83.515	36.897	<0.000 1
残差	31.688	14	2.263	—	—
失拟项	23.309	10	2.331	1.113	0.499 9
纯误差	8.379	4	2.095	—	—
总和	1 781.373	28	—	—	—

由此可知, 最优提取工艺为乙醇体积分数 90.67%, 液料比 36.03 : 1, 提取温度 85.20 ℃, 提取时间 79.64 min, 总黄酮得率为 55.64 mg/g, 考虑到实际操作, 将其修正为乙醇体积分数 90%, 液料比 35 : 1, 提取温度 85 ℃, 提取时间 80 min。进行 3 次验证试验, 测得总黄酮平均得率为 55.14 mg/g, 与预测值 55.64 mg/g 接近, 与单因素所得 52.36 mg/g 比较提升了 5.31%, 表明工艺合理稳定, 可为后续相关规模化生产奠定基础。

2.4 抗氧化活性实验

2.4.1 DPPH 自由基清除率测定 配制 10、20、40、60、80、100、200、400、600、800 μg/mL 总黄酮提取物、L-抗坏血酸溶液, 各取 1 mL, 加入 5 mL 0.06 mmol/L DPPH 乙醇溶液, 充分混匀后室温下避光反应30 min, 于 517 nm 波长处测定吸光度。以 L-抗坏血酸为阳性对照, 平行 3 次, 计算清除率。

清除率 = $\left[\frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \right] \times 100\%$ (A₀ 为 1 mL 蒸馏水+5 mL DPPH 乙醇溶液时的吸光度, A₁ 为 1 mL 样品+5 mL DPPH 乙醇溶液时的吸光度, A₂ 为 1 mL 样品+5 mL 无水乙醇时的吸光度), 结果见图 3A。由此可知, 随着总黄酮提取物质量浓度升高, 其清除 DPPH 自由基的能力逐渐增强, 并存在一定量效关系, 当其质量浓度为 10 μg/mL 时清除率仅 6.88%, 而为 400 μg/mL 时达 87.77%, IC₅₀ 为 151.70 μg/mL。

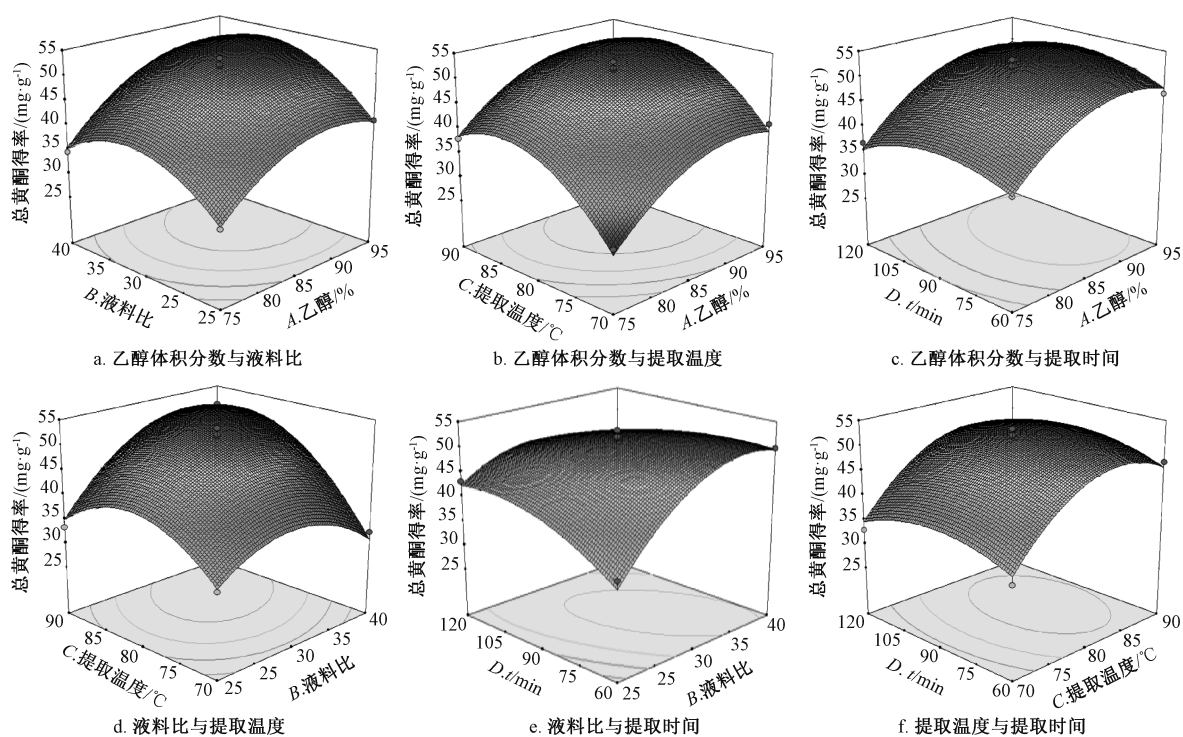


图 2 各因素响应面图
Fig. 2 Response surface plots for various factors

2.4.2 ABTS 自由基清除率测定 参考文献 [14] 报道的方法并加以改进。将 7 mmol/LABTS 溶液与 2.45 mmol/L过硫酸钾溶液按 1 : 1 比例混合均匀, 室温避光下静置过夜, 制备 ABTS 贮备液, 在 12~16 h 内测定, 其间用蒸馏水稀释, 使其在 734 nm 波长下的吸光度为 0.700±0.020。

配制 60、80、100、200、300、400、600、800 μg/mL总黄酮提取物、L-抗坏血酸溶液, 各取 0.1 mL, 加入 3.9 mL ABTS 贮备液, 充分混匀, 室温下避光反应 10 min, 于 734 nm 波长处测定吸光度。以 L-抗坏血酸为阳性对照, 平行 3 次, 按“2.4.1”项下公式计算清除率 (A_0 为 0.1 mL 蒸馏水+3.9 mL ABTS 自由基工作液时的吸光度, A_1 为 0.1 mL 样品+3.9 mL ABTS 自由基工作液时的吸光度, A_2 为 0.1 mL 样品+3.9 mL 蒸馏水时的吸光度), 结果见图 3B。由此可知, 随着总黄酮提取物质量浓度升高, 其清除 ABTS 自由基的能力逐渐增强, 并存在一定量效关系, 当其质量浓度为 60 μg/mL时清除率仅 13.11%, 而为 600 μg/mL 时接近 100%, IC_{50} 为 242.20 μg/mL。

2.5 美白活性实验 参考文献 [15] 报道的方法。

2.5.1 单酚酶抑制活性测定 在 96 孔酶标板上加

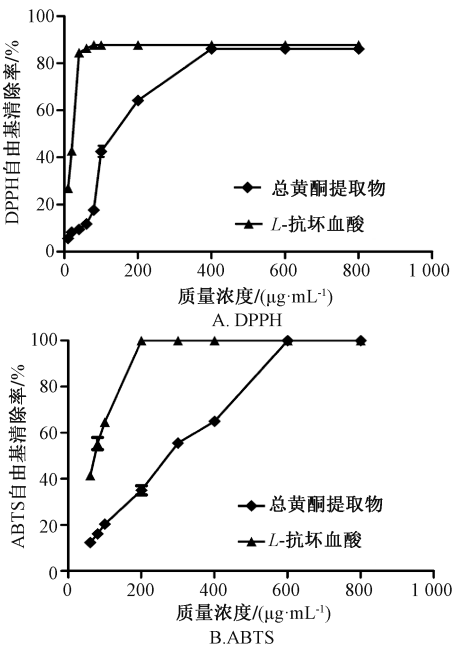


图 3 样品对 DPPH、ABTS 自由基的清除率
Fig. 3 Scavenging rates of samples on DPPH and ABTS free radicals

入 L-酪氨酸 (2.5 mmol/L) 溶液 50 μL 及总黄酮提取物、熊果苷溶液 (10、20、40、60、80、100、150、200 μg/mL) 各 25 μL, 混匀后 37 ℃ 下孵育 10 min, 加入酪氨酸酶 (250 U/mL) 溶液 50 μL,

混匀后37℃下孵育15 min，于475 nm波长处测定吸光度。以磷酸盐缓冲液（pH = 6.8）为空白对照，熊果苷为阳性对照，平行3次，计算抑制率，

公式为抑制率 =
$$\left[\frac{(A_1 - A_2) - (A_3 - A_4)}{A_1 - A_2} \right] \times 100\%$$

(A₁ 为无供试品溶液，但有酪氨酸酶时的吸光度；A₂ 为既无供试品溶液，也无酪氨酸酶时的吸光度；A₃ 为既有供试品溶液，也有酪氨酸酶时的吸光度；A₄ 为有供试品溶液，但无酪氨酸酶时的吸光度)，结果见图4A。由此可知，随着总黄酮提取物质量浓度升高，其对酪氨酸酶单酚酶的抑制能力逐渐增强，并呈剂量依赖性关系，当其质量浓度为10 μg/mL时抑制率仅42.51%，而为80 μg/mL时达74.69%，并且抑制作用强于熊果苷，总黄酮提取物、熊果苷 IC₅₀ 分别为24.37、15.05 μg/mL。

2.5.2 二酚酶抑制活性测定 在96孔酶标板上加入L-多巴（2.5 mmol/L）溶液50 μL及总黄酮提取物、熊果苷溶液（10、20、40、60、80、100、150、200 μg/mL）各25 μL，混匀后37℃下孵育10 min，加入酪氨酸酶（250 U/mL）溶液50 μL，混匀后37℃下孵育15 min，于475 nm波长处测定吸光度。以磷酸盐缓冲液（pH = 6.8）为空白对照，熊果苷为阳性对照，平行3次，按“2.5.1”项下公式计算抑制率，结果见图4B。由此可知，随着总黄酮提取物质量浓度升高，其对酪氨酸酶二酚酶的抑制能力逐渐增强，并呈剂量依赖性关系，当其质量浓度为10 μg/mL时抑制率仅43.74%，而为60 μg/mL时达68.98%，并且抑制作用强于熊果苷，总黄酮提取物、熊果苷 IC₅₀ 分别为15.64、14.50 μg/mL。

3 讨论

目前，优化植物黄酮提取工艺的方法主要有正交试验、均匀设计、Box-Behnken法等^[16-17]，其中Box-Behnken法精准性高，可完善正交试验、均匀设计等线性模型中存在的不足^[18]，本实验采用该方法优化小构树总黄酮提取工艺，发现优化后得率较单因素试验提高了5.31%，可为后期相关大规模开发应用奠定基础。刘艳清等^[19]发现，各因素对总黄酮提取量的影响程度依次为乙醇体积分数>料液比>提取时间>提取温度，而本实验为乙醇体积分数>提取温度>液料比>提取时间，表明在提取黄酮类成分过程中影响较大的因素为乙醇体积分数，故后期可重点关注其对得率的影响。此外，还可将响应面优化与超声-微波提取、酶法提取、电

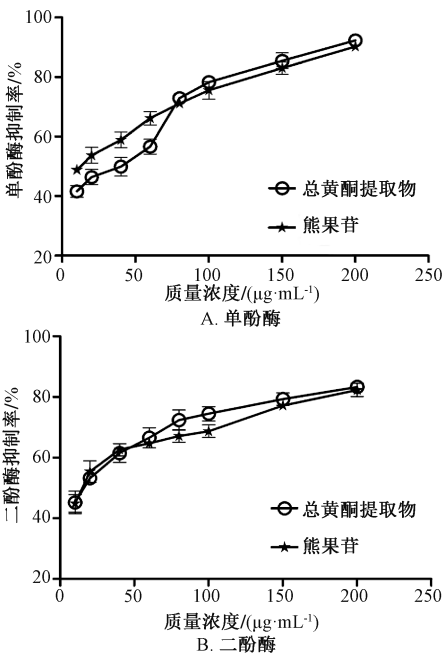


图4 样品对单酚酶、二酚酶的抑制率
Fig. 4 Inhibitory rates of samples on monophenolase and diphenolase

磁裂解等新型提取方法相结合，从而进一步提高得率。

桑科构属植物中黄酮种类丰富，已从构树叶、果实等部位分离得到多种该类化合物^[20-22]。Yang等^[23]发现，构树叶中的酚类成分具有良好的清除DPPH、ABTS自由基能力；Jang等^[24]从构树根皮中得到具有抑制酪氨酸酶活性的成分，有着一定的美白研究价值；另外，构属植物在抑制肿瘤细胞增殖、治疗糖尿病、抑菌等方面也表现出了相关性^[25-26]。

当前在国内外植物化妆品研发过程中发现，抗氧化剂不仅与抗衰老有关，与美白、抗炎等也关系密切，多种具有清除自由基、抑制酪氨酸酶活性的天然成分已得到广泛应用。吴颖等^[27]报道，抗氧化、抑制酪氨酸酶活性的强弱程度与桔梗、金盏菊、蒲公英、银杏叶、茶叶中黄酮和总酚含量高低顺序基本一致，并以茶叶最强。另外，抗氧化剂对减少黑色素合成有重要影响，可能是通过阻断或减弱酪氨酸酶活性、抑制酶表达所致，而本实验发现小构树总黄酮在抗氧化、美白方面均显示出良好的作用，提示自由基可能与其抑制酪氨酸酶活性的机理相关，后续可深入挖掘该成分在细胞、分子水平上的美白机制，以期为该植物综合开发利用提供科学依据。

参考文献:

[1] 李 涛, 韦 丹, 陈思同, 等. 中国树木文化研究进展[J]. 福建林业科技, 2019, 46(1): 134-140.

[2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.

[3] 唐传核, 彭志英. 大豆异黄酮的生理功能研究概述[J]. 粮油食品科技, 2000, 8(4): 15-17.

[4] 程 艳, 祁 彦, 王 超, 等. 抗衰老抗皱化妆品的功效评价与展望[J]. 日用化学工业, 2006, 36(3): 178-181; 195.

[5] 吴梅青. 莲子心黄酮提取测定及其抗氧化和抑菌活性进展[J]. 医药导报, 2015, 34(7): 919-922.

[6] 王中晓. 银杏叶总黄酮对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中医临床研究, 2014, 6(17): 10-11.

[7] 汪光华, 唐树平, 彭名军, 等. 高良姜中 4 种黄酮化合物的体外抗氧化能力及抑菌活性研究[J]. 食品与机械, 2017, 33(5): 168-172.

[8] 方 向, 周小理, 张婉萍. 苦苣萌发物中黄酮的防晒性研究[J]. 日用化学工业, 2013, 43(5): 362-366.

[9] Lim J, Nam S, Jeong J H, *et al.* Kazinol U inhibits melanogenesis through the inhibition of tyrosinase-related proteins via AMP kinase activation [J]. *Br J Pharmacol*, 2019, 176(5): 737-750.

[10] 贾东辉, 杨雪莹. 构树叶中黄酮成分分析和抗氧化活性的测定[J]. 职业与健康, 2006, 22(17): 1352-1353.

[11] 马俊鹏, 马 迪, 安晓晶, 等. 响应面法优化天山花楸总黄酮回流提取工艺[J]. 中成药, 2017, 39(3): 509-512.

[12] 张 丹, 王昌利, 卜雕塑, 等. Box-Behnken 响应面法优化蒲公英酚酸提取工艺[J]. 中南药学, 2019, 17(5): 667-671.

[13] 肖 珊, 罗 姣, 张斌贝, 等. 响应面法优化吴茱萸五加叶柚皮苷纯化工艺[J]. 中草药, 2019, 50(4): 868-874.

[14] 邱金东, 汤 昆. DPPH 和 ABTS 法测定核桃仁的体外抗氧化活性[J]. 中成药, 2008, 30(8): 1215-1216.

[15] 盛晓笑, 王春丽. 蔷薇花总黄酮对酪氨酸酶的抑制作用及其动力学行为[J]. 中成药, 2018, 40(1): 97-100.

[16] 魏星任, 宋晓娟, 龙洁怡, 等. 仙草总黄酮提取纯化工艺优化及其抗氧化活性[J]. 中成药, 2018, 40(5): 1185-1188.

[17] 王小明, 陈 碧, 钟翠娟, 等. 均匀设计法优化甜茶叶中总黄酮提取工艺[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(24): 55-62.

[18] 陈 婷, 徐文斌, 洪怡蓝, 等. 响应面法优化甜叶菊残渣中总黄酮提取工艺及抗氧化活性[J]. 食品科学, 2016, 37(18): 52-57.

[19] 刘艳清, 汪洪武, 蔡 璇, 等. 响应面法优化栀子总黄酮提取工艺研究[J]. 中药材, 2014, 37(2): 333-337.

[20] Zhang P C, Wang S, Wu Y, *et al.* Five new diprenylated flavonols from the leaves of *Broussonetia kazinoki* [J]. *J Nat Prod*, 2001, 64(9): 1206-1209.

[21] 黄宝康, 秦路平, 郑汉臣, 等. 楮实子的氨基酸及脂肪油成分分析[J]. 第二军医大学学报, 2003, 24(2): 213-217; 227.

[22] 王博佳, 窦德强, 熊 伟. 构树叶中挥发油的化学成分研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2009, 11(5): 184-185.

[23] Yang C Y, Li F, Du B W. *et al.* Isolation and characterization of new phenolic compounds with estrogen biosynthesis-inhibiting and antioxidation activities from *Broussonetia papyrifera* leaves [J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e94198.

[24] Jang D I, Lee B G, Jeon C O. *et al.* Melanogenesis inhibitor from paper mulberry [J]. *Cosmetics & Toiletries*, 1997, 112(3): 59-62.

[25] 豆沉着, 赵云涛, 陈绍红, 等. 构树总黄酮诱导 HepG2 细胞凋亡及其机理研究[J]. 中药药理与临床, 2016, 32(6): 109-113.

[26] 楼 洋, 苏诗韵, 李亚楠, 等. 构树黄酮类化合物及其 PTP1B 抑制活性研究[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(1): 88-94.

[27] 吴 颖, 崔彬清, 王 露, 等. 5 种天然植物提取物抗氧化性和酪氨酸酶抑制作用的比较[J]. 现代食品科技, 2018, 34(10): 81-86; 37.