

· 中文核心期刊
· EI 收录期刊

ISSN 1003-5214
CN 21-1203/TQ
CODEN JIHUFJ

精细化工®

FINE CHEMICALS

第 1 期
2026年 第43卷



西南化工研究设计院有限公司
Southwest Institute of Chemical Co., Ltd.



广告

“绿氢醇新纪元，智造零碳未来”
——中化西南院引领绿色氢醇一体化工程

ISSN 1003-5214



9 771003 521267



五指毛桃黄酮提取纯化及抑制 HepG2 增殖活性

唐蓉¹, 龚舒², 刘天开², 郑顺彤², 叶晓彤²,
穆晓琨², 龚记熠¹, 乙引^{1*}, 刘文华^{2*}

(1. 贵州师范大学 生命科学学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 肇庆学院 生命科学学院 南药研究开发校级重点实验室, 广东 肇庆 526061)

摘要: 采用超声波辅助醇提法提取五指毛桃粗黄酮, 通过单因素实验和正交实验, 考察了超声时间、料液比 (g : mL, 下同)、乙醇体积分数、超声功率对五指毛桃黄酮提取量的影响。通过大孔树脂的静态和动态纯化, 探讨了大孔树脂类型、五指毛桃粗黄酮样品液质量浓度、pH 对五指毛桃黄酮纯度的影响。基于噻唑蓝法、核染色法、活性氧检测法、流式细胞术, 探究了纯化后的五指毛桃黄酮抑制 HepG2 细胞的增殖活性。结果表明, 在超声时间 90 min、料液比 1 : 40、乙醇体积分数 80% 的水溶液、超声功率 400 W 的最佳提取条件下, 五指毛桃黄酮的平均提取量为 (5.720±0.713) mg/g, 五指毛桃粗黄酮纯度为 6.05%。大孔树脂 AB-8 表现出最佳的纯化五指毛桃黄酮的性能, 其最佳静态纯化条件为五指毛桃粗黄酮样品液质量浓度为 0.7408 g/L、pH=4、解吸液为乙醇体积分数 60% 的水溶液; 动态纯化最佳条件为五指毛桃粗黄酮样品液质量浓度为 0.2408 g/L、pH=4、上样量为 75 mL、洗脱剂为乙醇体积分数 60% 的水溶液, 用量 40 mL。通过 AB-8 的动态纯化, 五指毛桃黄酮的纯度由五指毛桃粗黄酮的 6.05% 提高到 32.67%。AB-8 纯化后的五指毛桃黄酮对 HepG2 细胞的增殖有抑制效果, 可降低细胞存活率, 促进细胞凋亡。

关键词: 五指毛桃黄酮; 超声波辅助醇提法; 大孔树脂; 噻唑蓝法; 核染色法; 活性氧检测法; 流式细胞术; 中药现代化技术

中图分类号: R285 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2026) 01-0144-11

Extraction, purification of *Ficus hirta vahl* flavonoids and its inhibition activity on HepG2 cell proliferation

TANG Rong¹, GONG Shu², LIU Tiankai², ZHENG Shuntong², YE Xiaotong²,
MU Xiaokun², GONG Jiyi¹, YI Yin^{1*}, LIU Wenhua^{2*}

(1. School of Life Sciences, Guizhou Normal University, Guiyang 550025, Guizhou, China; 2. Key Laboratory for Research and Utilization of Southern medicine, School of Life Science, Zhaoqing University, Zhaoqing 526061, Guangdong, China)

Abstract: Extraction of crude flavonoids from *Ficus hirta vahl* were conducted by ultrasonic-assisted alcohol extraction method. The effects of ultrasonic time, solid-liquid ratio (g : mL, the same below), ethanol volume fraction and ultrasonic power on the flavonoids extraction amount were evaluated by single factor experiment and orthogonal experiment, while the influence of macroporous resin type, mass concentration of crude flavonoids in sample solution and pH on the flavonoids purity were analyzed by static and dynamic adsorption experiments with different macroporous resins. The inhibitory activity of purified *Ficus hirta vahl* flavonoids on HepG2 cell growth was investigated via thiazolyl blue tetrazolium bromide assay, nuclear staining, reactive oxygen species detection and flow cytometry. The results showed that under the optimal extraction conditions of ultrasonic time 90 min, solid-liquid ratio 1 : 40, aqueous solution with 80% volume fraction of ethanol and ultrasonic power 400 W, the average extraction amount of

收稿日期: 2024-12-13; 定用日期: 2025-02-12; DOI: 10.13550/j.jxhg.20240933

基金项目: 广东省普通高校重点领域专项 (2023ZDZX2070); 广东省科技厅“百千万工程”项目 (KTP20240694); 广东省教育厅创新团队项目 (2015KCXTD032)

作者简介: 唐蓉 (1998—), 女, 硕士生, E-mail: 1497582473@qq.com. 联系人: 乙引 (1967—), 男, 教授, E-mail: 100236417@qq.com; 刘文华 (1967—), 男, 教授, E-mail: wenhualiu@hotmail.com.

Ficus hirta vahl flavonoids was (5.720±0.713) mg/g, and the purity of crude flavonoids was 6.05%. The macroporous resin AB-8 displayed the best purification performance. The optimal static adsorption conditions of AB-8 resin on crude flavonoids were sample mass concentration 0.7408 g/L, pH 4, and eluent (aqueous solution with 60% ethanol volume fraction) amount 40 mL. The optimal dynamic purification conditions were sample mass concentration of crude flavonoids 0.2408 g/L, pH 4, volume of loading sample 75 mL, and eluent (aqueous solution with 60% ethanol volume fraction) amount 40 mL. The purity of flavonoids was increased from 6.05% to 32.67% after dynamic purification with AB-8 resin. The purified *Ficus hirta vahl* flavonoids could inhibit the proliferation of HepG2 cells, reduce cell survival rate, and promote cell apoptosis.

Key words: *Ficus hirta vahl* flavonoids; ultrasonic-assisted alcohol extraction; macroporous resins; thiazolyl blue tetrazolium bromide assay; nuclear staining method; reactive oxygen species detection method; flow cytometry; modernization technology of traditional Chinese medicine

五指毛桃为桑科榕属植物粗叶榕 (*Ficus hirta vahl*)^[1], 主产于广西、广东和云南等地。五指毛桃为岭南习用传统中药, 其性平, 味辛、甘, 具有利湿舒筋、健脾补肺的功效, 人们常以其入药, 用于治疗食少无力、肺癆咳嗽、盗汗、风湿痹痛、产后无乳、脾虚浮肿等病症^[2]。在广东, 五指毛桃还被广泛作为煲汤原料, 是华南地区著名药食两用植物^[3-4]。五指毛桃中的黄酮类、挥发油、香豆素类等化合物具有抗炎、抗菌、抗病毒和抗氧化等作用^[5]。

目前, 从植物中提取黄酮类物质的方法主要有超声波提取法^[6]、回流提取法^[7]、酶法^[8]、微波提取法^[9]等。超声波提取法是利用超声波的热效应、机械效应和空化效应使植物中的物质分子运动速率和频率增大, 增加溶剂的穿透力, 促进化学成分的溶出, 是一种物理性破碎过程, 具有提高收率、避免高温破坏活性成分和缩短提取时间等优点^[10-11]。大孔树脂分离纯化技术具有选择性好、产品纯度高、树脂可再生、工艺简单和利于实现大规模生产、成本低等优点^[12-14], 已被广泛用于中草药活性成分的分离纯化研究。

肝癌是威胁人类健康的癌症之一。近年来, 由于生态环境和人们饮食作息问题直接或间接导致的肝癌发病率和死亡率逐渐增加^[15]。肝细胞癌的发病机制比较复杂, 受到遗传、环境、饮食、病原等多重因素的影响^[16]。当前, 肝细胞癌的治疗手段以手术切除、肝移植或局部消融为主, 其治疗效果差强人意^[17-18]。因此, 寻找高效、低毒的天然辅助抗肝癌药物迫在眉睫。目前, 黄酮类化合物因较好的抗肿瘤活性而得到广泛关注^[19-23]。

本文拟采用超声波提取法, 以乙醇水溶液为溶剂, 五指毛桃总黄酮提取量为评价指标, 提取五指毛桃黄酮, 采用单因素和正交实验, 考察超声时间、料液比 (g : mL, 下同)、乙醇体积分数、超声功率对五指毛桃黄酮提取量的影响, 优化超声波辅助醇

提法提取五指毛桃总黄酮最佳提取工艺。采用大孔树脂分离纯化技术纯化五指毛桃粗提黄酮, 考察 AB-8、D101、NKA-9 3 种大孔树脂对五指毛桃粗提黄酮的静态、动态纯化效果。初步探究五指毛桃黄酮对 HepG2 细胞增殖的影响。以期对五指毛桃的开发利用及天然化合物抗肝癌活性研究提供一定的研究基础。

1 实验部分

1.1 材料、试剂与仪器

五指毛桃, 广东康美药业有限公司; AB-8、D101、NKA-9, 北京索莱宝科技有限公司; HepG2 细胞, 中国典型培养物保藏中心 (武汉大学保藏中心); 噻唑蓝 (MTT) 检测试剂盒、Hoechst 33342 检测试剂盒、活性氧 (ROS) 检测试剂盒、Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒, 上海碧云天生物科技有限公司。

芦丁 (质量分数 ≥ 98%), 上海源叶生物科技有限公司; 亚硝酸钠、硝酸铝, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 无水乙醇、氢氧化钠、浓盐酸 (质量分数 38%), 广州化学试剂厂; DMEM 高糖培养基、胎牛血清 (FBS)、胰蛋白酶 [含 (乙二胺四乙酸) EDTA]、胰蛋白酶 (不含 EDTA), 美国 Gibco 公司; 磷酸盐缓冲液 (PBS, 0.01 mol/L), 大连美仑生物技术有限公司; 二甲基亚砜 (DMSO), 美国 Sigma 公司。

MiLLi-Q Direct 8 型纯水系统, 美国 SigmaAldrich 公司; UV-1100 型紫外-可见分光光度计 (UV-Vis), 上海美谱达仪器有限公司; SCIENTZ-II D 型超声波细胞破碎机, 宁波新芝生物科技有限公司; ELx-800 型酶标仪, 美国 BioTek 公司; PICO-17 型高速冷冻离心机、HEARACELL150i 型二氧化碳培养箱, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; EcLipse Ts2 型倒置显微镜、EcLipse TS100 型倒置荧光显微

镜、Eclipse Ci 型正置荧光显微镜, 日本 Nikon 公司; SW-CJ-2FD 型洁净工作台, 江苏苏净集团有限公司; LS-50HD 型立式压力蒸汽灭菌锅, 江阴滨江医疗设备有限公司; CytoFLEX 型流式细胞仪, 美国 Beckman Coulter 公司。

1.2 方法

1.2.1 五指毛桃粗黄酮的提取

将五指毛桃切片, 粉碎机粉碎, 过 60 目筛, 置于托盘中铺开, 放入 70 °C 烘箱干燥 4 h, 得到五指毛桃粉末, 装袋密封, 备用。

采用超声波辅助醇提法提取五指毛桃粗黄酮。将 25 g 五指毛桃粉末放入到锥形瓶中, 向其中加入体积分数 80% 的乙醇水溶液, 其中, 料液比 (g : mL, 下同) 1 : 40, 搅拌约 3 min, 密封静置浸泡 30 min; 然后, 用超声波细胞粉碎机超声 (超声功率 400 W) 90 min, 对提取液进行抽滤, 使用体积分数 80% 的乙醇水溶液对滤液进行定容, 至 1000 mL, 即得五指毛桃粗黄酮提取液, 密封保存, 备用。

五指毛桃粗黄酮浸膏的制备: 根据正交实验得到的最佳提取条件得到五指毛桃粗黄酮提取液, 将提取液进行旋蒸 (60 °C) 至液体呈黏稠状; 随后, 置于 60 °C 鼓风干燥箱中干燥 24 h 呈较干的浸膏状。

1.2.2 五指毛桃粗黄酮静态纯化

大孔树脂预处理: 对 AB-8、D101、NKA-9 3 种树脂进行预处理, 用体积分数 95% 的乙醇浸泡 24 h; 然后, 用纯水洗 5 次, 用质量分数 4% 的盐酸浸泡 4 h, 用纯水洗至中性 (pH=7), 再用质量分数 4% 的氢氧化钠溶液浸泡 4 h, 用纯水洗至中性 (pH=7), 烘干 (25 °C, 2 h), 储存, 备用。

样品液的制备: 将五指毛桃粗黄酮浸膏 500 mg 用 50 mL 反渗透水进行溶解, 得到的溶液用紫外-可见分光光度计测其吸光度, 根据芦丁标准曲线回归方程 ($y=13.004x-0.0196$, $R^2=0.9999$) 计算黄酮的质量浓度。根据上述测试结果, 对上述溶液进行稀释, 配制成质量浓度为 0.2408 g/L, pH=4 [用 NaOH、浓盐酸 (质量分数 38%) 调节] 的溶液, 记为五指毛桃粗黄酮样品液。

将 3 g 大孔树脂放入到 250 mL 锥形瓶中, 加入 50 mL 五指毛桃粗黄酮样品液, 于 25 °C、120 r/min 恒温振荡器中吸附 24 h, 吸附完成后抽滤, 用反渗透水清洗树脂表面附着的黄酮, 并将水分滤干, 将树脂转移至 250 mL 锥形瓶中, 加入 50 mL 乙醇体积分数 80% 的水溶液, 于 25 °C、120 r/min 恒温振荡器中解吸 24 h, 即得五指毛桃黄酮解吸液。吸附、解吸过程中, 第 0.25、0.5、1、2、4、5、22、24 h 时测量吸附液、解吸液中黄酮的质量浓度, 绘制静态吸附、解吸曲线。

分离纯化过的树脂柱采用体积分数 95% 的乙醇洗脱至洗出液为无色, 然后, 用纯水淋洗 5 次, 即可进行下一次吸附分离。

1.2.3 五指毛桃粗黄酮的动态纯化

精确称取 AB-8 树脂 5 g, 湿法装入玻璃层析柱 (1.5 cm×60 cm) 中, 精确称取 D101、NKA-9 树脂各 10 g, 分别湿法装入另外两个玻璃层析柱 (2 cm×40 cm) 中, 树脂柱高均约为 5 cm。将质量浓度为 0.2408 g/L、pH=4 的五指毛桃粗黄酮样品液缓慢滴入树脂柱中, AB-8 树脂柱上样量为 128 mL, D101、NKA-9 树脂柱上样量为 200 mL。打开活塞, 使吸附液缓慢滴出, AB-8 树脂柱吸附液用 10 mL 带盖离心管先接 5 mL, 之后每 10 mL 接 1 份; D101、NKA-9 树脂柱吸附液用 50 mL 锥形瓶每 20 mL 接 1 份。用紫外-可见分光光度计测量每份流出液在 510 nm 处的吸光度, 计算黄酮的质量浓度, 建立五指毛桃黄酮动态吸附曲线, 确定动态吸附的最佳上样量。

AB-8 吸附完成后, 用反渗透水洗去多糖、蛋白质等水溶性杂质成分; 然后, 与 D101、NKA-9 都用乙醇体积分数 60% 的水溶液作为洗脱剂进行动态洗脱, 将乙醇体积分数 60% 的水溶液缓慢滴入树脂柱中, 打开活塞使洗脱液缓慢滴落。AB-8 解吸液用 10 mL 带盖离心管每 5 mL 接 1 份; D101、NKA-9 解吸液用 10 mL 带盖离心管每 10 mL 接 1 份, 测量每份洗脱液的吸光度, 计算黄酮质量浓度, 建立五指毛桃黄酮动态洗脱曲线。

1.3 结构表征与性能测试

1.3.1 五指毛桃粗黄酮含量、纯度的测定

芦丁标准曲线绘制: 精确称取 100 mg 芦丁标准品, 使用乙醇体积分数 70% 的水溶液配制质量浓度为 10 g/L 的芦丁溶液; 移取 400 μL 芦丁溶液至 10 mL 容量瓶中, 再用乙醇体积分数 70% 的水溶液定容, 得到质量浓度为 0.4 g/L 的芦丁储备液。

分别量取 0.05、0.1、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mL 的芦丁储备液置于 7 支 10 mL 带盖离心管中, 加入乙醇体积分数 70% 的水溶液至各溶液体积 2 mL, 摇匀; 再分别加入质量分数 5% 的亚硝酸钠溶液 0.3 mL, 摇匀静置 6 min; 然后, 加入质量分数 10% 的硝酸铝溶液 0.3 mL, 摇匀静置 6 min; 最后, 加入质量分数 10% 的氢氧化钠溶液 3.0 mL, 摇匀静置 15 min, 得到不同质量浓度的芦丁标准液。

另取乙醇体积分数 70% 的水溶液同上操作, 制备空白对照。使用紫外-可见分光光度计测定各溶液在 510 nm 处的吸光度, 绘制芦丁吸光度 (y)-质量浓度 (x) 标准曲线, 并拟合标准回归方程 $y=13.004x-0.0196$, $R^2=0.9999$ 。

总黄酮提取量的测定: 精密吸取五指毛桃粗黄

酮提取液 2.0 mL 于具塞试管中, 测样品液吸光度, 根据芦丁标准曲线回归方程计算质量浓度 ($\rho_{\text{总黄酮}}$, g/L), 根据式 (1) 计算五指毛桃黄酮提取量 (mg/g) 和纯度 (%)。

$$\text{黄酮提取量} = \rho_{\text{总黄酮}} \times V / m_0 \quad (1)$$

$$\text{黄酮纯度} / \% = \rho_{\text{总黄酮}} \times V / m_1 \times 100 \quad (2)$$

式中: V 为定容后五指毛桃粗黄酮提取液的体积, mL; m_0 为五指毛桃粉末的质量, g; m_1 为五指毛桃黄酮浸膏的质量, mg。

1.3.2 树脂吸附率、解吸率测定

根据式 (3) 和 (4) 计算树脂吸附率 (%)、解吸率 (%)。

$$\text{吸附率} / \% = (\rho_1 - \rho_2) / \rho_1 \times 100 \quad (3)$$

$$\text{解吸率} / \% = \rho_3 \times V_2 / [(\rho_1 - \rho_2) \times V_1] \times 100 \quad (4)$$

式中: ρ_1 、 ρ_2 分别为吸附前、后总黄酮质量浓度, g/L; ρ_3 为解吸后总黄酮质量浓度, g/L; V_1 为上样液体积, L; V_2 为解吸后溶液体积, L。

1.4 单因素实验

1.4.1 五指毛桃粗黄酮提取条件

以超声时间 90 min、料液比 1 : 30、乙醇体积分数 70%、超声功率 300 W 为单因素实验条件, 以五指毛桃总黄酮提取量为指标, 分别考察超声时间 (30、90、150、210、270 min)、料液比 (1 : 10、1 : 20、1 : 30、1 : 40、1 : 50)、乙醇体积分数 (60%、70%、80%、90%、100%) 和提取功率 (200、300、400、500、600 W) 对五指毛桃黄酮提取量的影响。

1.4.2 五指毛桃粗黄酮静态纯化条件

根据 1.2.2 节的方法和步骤, 考察不同大孔树脂 (AB-8、D101、NKA-9) 对树脂静态吸附的影响。

根据 1.2.2 节的方法和步骤, 精确称取 1 g AB-8 大孔树脂, 置于 50 mL 锥形瓶中, 加入 15 mL、pH=4 的五指毛桃粗黄酮样品液, 考察其质量浓度 (0.04808、0.2408、0.4408、0.7408、1.0408 g/L) 对树脂静态吸附的影响。

根据 1.2.2 节的方法和步骤, 将 0.3 g AB-8 大孔树脂置于 50 mL 锥形瓶中, 加入 15 mL 五指毛桃粗黄酮样品液, 考察其 pH (2、4、6、8、10) 对树脂静态吸附的影响。

根据 1.2.2 节的方法和步骤, 将 0.3 g AB-8 大孔树脂置于 50 mL 锥形瓶中, 加入 15 mL、pH=4 的五指毛桃粗黄酮样品液, 考察洗脱液乙醇体积分数 (50%、60%、70%、80%、90%) 对树脂静态吸附和解吸的影响。

1.4.3 五指毛桃粗黄酮动态纯化条件

D101、NKA-9: 称取树脂 10 g, 湿法装柱, 树脂柱规格为 (3 cm×60 cm), 树脂柱高约 3 cm, 上样液条件为五指毛桃粗黄酮样品液质量浓度 0.2408 g/L、

体积 200 mL、pH=4、洗脱剂为 100 mL 乙醇体积分数 60% 的水溶液。收集洗脱液的深色部分进行黄酮纯度测定。

AB-8: 称取预处理过的树脂 5 g, 湿法装柱, 树脂柱规格为 (2 cm×70 cm), 树脂柱高约 3 cm, 上样条件为五指毛桃粗黄酮样品液质量浓度 0.2408 g/L、体积 65 mL、pH=4、洗脱剂为 70 mL 乙醇体积分数 60% 的水溶液。收集有颜色部分进行黄酮纯度测定。

AB-8: 称取预处理过的树脂 20 g, 湿法装柱, 树脂柱规格为 (2 cm×70 cm), 树脂柱高约 12 cm, 上样条件为五指毛桃粗黄酮样品液质量浓度 0.2408 g/L、体积 260 mL、pH=4、洗脱剂为 160 mL 乙醇体积分数 60% 的水溶液。收集有颜色部分进行黄酮纯度测定。

AB-8: 称取预处理过的树脂 25 g, 湿法装柱, 树脂柱规格为 (2 cm×70 cm), 树脂柱高约 15 cm, 上样条件为: 五指毛桃粗黄酮样品液质量浓度 0.7408 g/L、体积 106 mL、pH=4、洗脱剂为 200 mL 乙醇体积分数 60% 的水溶液。收集有颜色部分进行黄酮纯度测定。

1.5 正交实验

根据五指毛桃粗黄酮提取单因素实验结果, 以超声时间 (A)、料液比 (B)、乙醇体积分数 (C) 和超声功率 (D) 为因素, 以五指毛桃黄酮提取量为评价指标, 对 4 个因素分别设置 3 个水平, 超声时间、料液比、乙醇体积分数和超声功率根据单因素实验结果选择合适的取值。

根据正交实验优化的最佳提取条件进行五指毛桃粗黄酮的提取实验, 重复 3 次, 进行验证实验。

1.6 抑制 HepG2 细胞增殖活性的测定

1.6.1 HepG2 细胞培养

将 HepG2 细胞接种于含质量分数 10% 血清的 DMEM 完全培养基中, 在恒温 (37 °C)、体积分数 5% 的 CO₂ 培养箱中培养。待细胞长到 80% 以上即可传代, 取对数生长期的细胞进行实验。

1.6.2 HepG2 细胞存活率的检测

采用 MTT 法检测 HepG2 细胞存活率。取对数生长期的 HepG2 细胞, 接种于 96 孔板中, 每孔细胞数约 1×10^4 个, 在恒温 (37 °C)、体积分数 5% 的 CO₂ 培养箱中培养 24 h, 吸除旧培养基, 加入含 AB-8 纯化后五指毛桃黄酮的完全培养基, 使培养液中五指毛桃黄酮终质量浓度为 200、400、600、800 和 1000 mg/L, 并设置 0 mg/L 为对照组, 每组 5 个复孔。培养 48 h 后, 每孔加入质量浓度 5 g/L 的 MTT 溶液 10 μ L, 在 37 °C、体积分数 5% 的细胞培养箱中孵育 2~3 h。弃细胞培养液, 每孔加入 120 μ L

DMSO, 在 37 °C、250 r/min 摇床中振荡孵育 30 min, 使蓝紫色结晶物充分溶解, 使用酶标仪在 490 nm 波长下测定各组的吸光度 (OD 值), 实验组和对照组的 OD 值分别记为 OD_实和 OD_对, 根据式(5)计算 HepG2 细胞存活率 (%), 实验重复 3 次, 取算数平均值。

$$\text{细胞存活率}/\% = \text{OD}_{\text{实}}/\text{OD}_{\text{对}} \times 100 \quad (5)$$

1.6.3 HepG2 细胞核形态观察

取对数生长期的 HepG2 细胞, 按细胞数约 3×10^4 个/孔接种于 48 孔板中, 接种前, 在孔中央放入盖玻片。每孔总培养液体积为 500 μL 。于细胞培养箱中过夜培养, 吸走旧培养基, 加入含 AB-8 纯化后五指毛桃黄酮的完全培养基, 使培养液中五指毛桃黄酮终质量浓度为 600 和 800 mg/L, 并设置 0 mg/L 为对照组。培养 48 h 后, 吸走全部培养液, 每孔用 300 μL PBS 洗涤 1 次, 吸走 PBS, 每孔加 300 μL Hoechst33342 核染料, 放培养箱培养 5 h, 之后每孔每次用 300 μL PBS 洗涤 3 次, 每次洗时用 PBS 浸泡 3 min 再吸走 PBS, 洗涤好后将盖玻片放在载玻片上, 在盖玻片边缘滴加适量 PBS, 避免细胞变干, 然后在正置显微镜下观察, 每组随机选取不同的视野拍照。

1.6.4 HepG2 细胞 ROS 检测

2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯 (DCFH-DA) 检测液的配制: 取对数生长期的 HepG2 细胞, 按细胞数 3×10^4 个/孔接种于 48 孔板中, 于细胞培养箱中过夜培养, 吸走旧培养基, 加入含五指毛桃黄酮的完全培养基, 使培养液中五指毛桃黄酮终质量浓度为 600 和 800 mg/L, 并设置 0 mg/L 为对照组。培养 48 h 后, 吸走全部培养液, 每孔用 300 μL PBS 洗涤 1 次, 吸走 PBS, 每孔加入 300 μL 现配的 DCFH-DA 检测液, 轻轻摇晃使其分布均匀。细胞培养箱中孵育 3 h。孵育结束后, 每次用 300 μL 基础培养基 (含质量分数 10% 血清的 DMEM 完全培养基) 洗涤细胞 2 次, 注意动作轻缓, 以免吹起贴壁细胞, 最后每孔加 300 μL 新鲜基础培养基, 在荧光显微镜下进行观察。每组随机选取 3 个视野进行拍摄, 利用 ImageJ 软件进行荧光强度分析。

1.6.5 HepG2 细胞凋亡检测

取对数生长期的 HepG2 细胞, 按细胞数 6×10^4 个/孔接种于 24 孔板中, 于细胞培养箱中过夜培养。吸走部分旧培养基, 加入含 AB-8 纯化后五指毛桃黄酮的完全培养基, 使培养液中五指毛桃黄酮终质量浓度为 600 和 800 mg/L, 并设置 0 mg/L 为对照组。培养 48 h 后, 把细胞培养液吸出至合适离心管内,

PBS 洗涤贴壁细胞 1 次, 加入适量胰酶 (不含 EDTA) 消化细胞。室温孵育至轻轻吹打可以使贴壁细胞吹打下来时, 加入收集的细胞培养液, 停止消

化, 并把细胞轻轻吹打下来, 转移到离心管内。在 4 °C、4500 r/min 下离心 5 min, 弃上清, 收集细胞, 用 1 mL 预冷 PBS (4 °C) 轻轻吹打重悬细胞, 在 4 °C、4500 r/min 下离心 5 min, 弃上清, 加入 97.6 μL Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞, 再加入 1 μL Annexin V-FITC 溶液, 轻轻混匀, 最后, 加入 2 μL PI 染色液, 轻轻混匀, 室温避光孵育 20~30 min, 随后将样品放在冰上通过流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.7 数据处理

实验数据以“算数平均值 \pm 标准差”表示, 采用 Excel 软件进行极差分析; SPSS27.0 软件进行平均值和标准差分析; GraphPad Prism6 进行显著性分析, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 五指毛桃粗黄酮提取单因素实验结果

2.1.1 超声时间对五指毛桃黄酮提取量的影响

图 1a 为超声时间对五指毛桃黄酮提取量的影响。

从图 1a 可以看出, 随着超声时间的增加, 五指毛桃黄酮提取量呈先增加后降低的趋势, 超声时间为 90 min 时, 五指毛桃黄酮提取量最高, 为 4.397 mg/g。这是因为, 随着超声时间 (30~90 min) 的增加, 超声波能量增加, 体系内分子运动加速, 加快了五指毛桃黄酮的溶出。但继续增加超声时间, 可能造成溶剂挥发或体系温度提升, 导致黄酮降解, 五指毛桃黄酮提取量下降^[24]。

2.1.2 料液比对五指毛桃黄酮提取量的影响

图 1b 为料液比对五指毛桃黄酮提取量的影响。

从图 1b 可以看出, 随着料液比的减小, 五指毛桃黄酮提取量呈先增加后降低的趋势, 料液比为 1:30 时, 五指毛桃黄酮提取量最高, 为 4.472 mg/g。这是因为, 随着料液比的减小, 溶剂量相对增加, 使五指毛桃粉末与溶剂更充分地接触, 更有利于黄酮的溶出。但继续减小料液比, 乙醇对五指毛桃黄酮的溶解基本达到了饱和, 再增加溶剂的量, 也不会溶解出更多的黄酮, 反而会使五指毛桃中的其他化合物溶出, 导致五指毛桃黄酮提取量下降^[25]。

2.1.3 乙醇体积分数对五指毛桃总黄酮提取量的影响

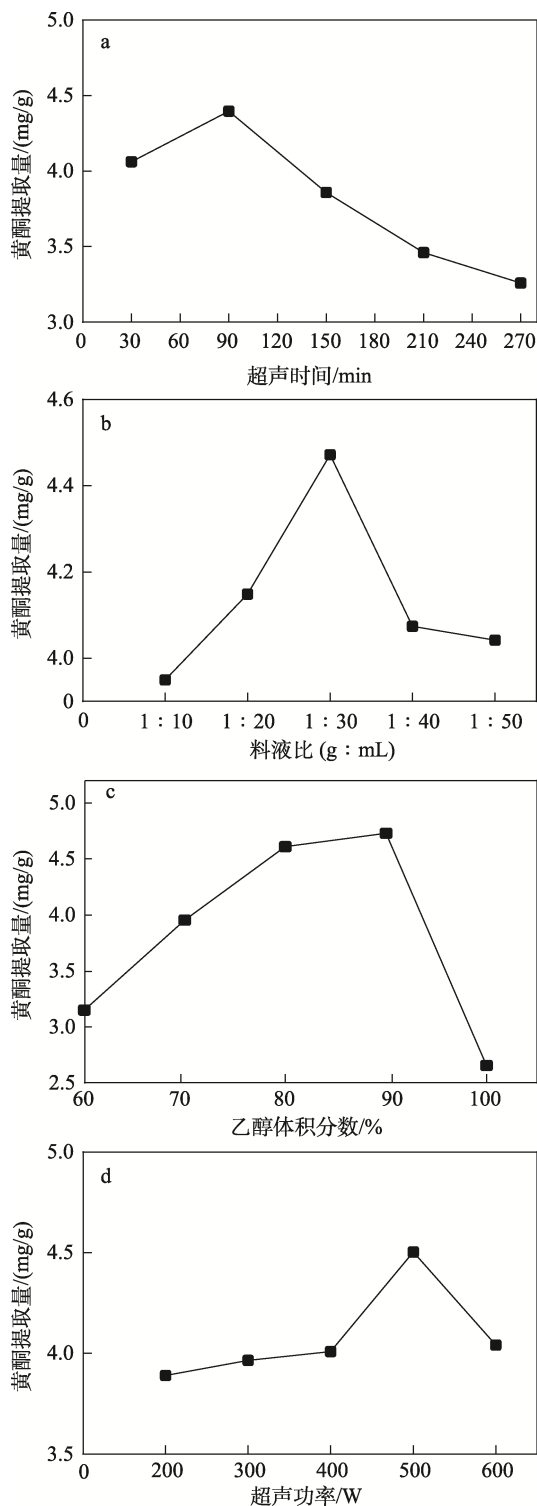
图 1c 为乙醇体积分数对五指毛桃黄酮提取量的影响。

从图 1c 可以看出, 随着乙醇体积分数的增加, 五指毛桃黄酮提取量呈先增加后降低的趋势, 乙醇体积分数为 90% 时, 五指毛桃黄酮提取量最高, 为 4.731 mg/g。这是因为, 随着乙醇体积分数 (60%~90%) 的增加, 乙醇量相对增加, 五指毛桃粉末能

与溶剂更充分接触, 更有利于黄酮的溶出。继续增加乙醇体积分数至 100% 时, 五指毛桃中其他色素或脂溶性等杂质溶出, 导致五指毛桃总黄酮提取量下降^[26]。

2.1.4 超声功率对五指毛桃黄酮提取量的影响

图 1d 为超声功率对五指毛桃黄酮提取量的影响。



a—超声时间; b—料液比; c—乙醇体积分数; d—超声功率

图 1 各因素对五指毛桃黄酮提取量的影响

Fig. 1 Effect of various factors on extraction amount of *Ficus hirta vahl* flavonoids

从图 1d 可以看出, 随着超声功率的增加, 五指毛桃黄酮提取量呈先增加后降低的趋势, 超声功率为 500 W 时, 五指毛桃黄酮提取量最高, 为 4.504 mg/g。这是因为, 超声功率 (200~500 W) 的增加使五指毛桃粉末与溶剂充分接触, 有利于五指毛桃总黄酮的溶出。继续提升超声功率至 600 W, 溶剂更容易挥发, 体系温度增加, 黄酮更易被降解, 导致五指毛桃黄酮提取量下降^[27]。

综合各单因素的考察结果, 超声波辅助醇提法提取五指毛桃粗黄酮的最佳工艺条件为: 超声时间 90 min、料液比 1:30、乙醇体积分数 90%、超声功率 500 W。

2.2 五指毛桃粗黄酮提取正交实验分析

2.2.1 正交实验结果

表 1 为超声波辅助醇提法提取五指毛桃粗黄酮的正交实验因素水平表。表 2 为正交实验结果。

表 1 正交实验因素水平
Table 1 Factor s and levels of orthogonal experiment

因素	水平		
	1	2	3
A 超声时间/min	30	90	150
B 料液比 (g : mL)	1 : 20	1 : 30	1 : 40
C 乙醇体积分数/%	70	80	90
D 超声功率/W	400	500	600

表 2 正交实验结果
Table 2 Orthogonal experimental results

序号	因素				黄酮提取量/(mg/g)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	4.321
2	1	2	3	2	4.128
3	1	3	2	3	5.376
4	2	1	3	3	4.332
5	2	2	2	1	5.646
6	2	3	1	2	4.343
7	3	1	2	2	4.687
8	3	2	1	3	3.966
9	3	3	3	1	5.549
K_1	13.825	13.340	12.630	15.516	
K_2	14.321	13.740	15.709	13.158	
K_3	14.202	15.268	14.009	13.674	
k_1	4.608	4.447	4.210	5.172	
k_2	4.774	4.580	5.236	4.386	
k_3	4.734	5.089	4.670	4.558	
R	0.165	0.643	1.026	0.786	

从表 2 可以看出, 在五指毛桃粗黄酮提取的过程中, 各因素对五指毛桃黄酮提取量的影响高低顺序为 $C>D>B>A$, 即乙醇体积分数>超声功率>料液比>超声时间。由正交实验的结果可知, 超声波辅助醇提五指毛桃粗黄酮最佳提取工艺条件为 $A_2B_3C_2D_1$, 即超声时间 90 min、料液比 1:40、乙醇体积分数 80%、

超声功率 400 W。

2.2.2 最佳工艺条件验证

在正交实验所得的最佳提取条件（超声时间 90 min、料液比 1 : 40、乙醇体积分数 80%、超声功率 400 W）下，对五指毛桃粗黄酮进行提取，重复 3 次实验。3 次实验的平均提取量为(5.720±0.713) mg/g，高于正交实验的最高提取量（5.646 mg/g），证明该最佳提取条件具有稳定性和可行性。最佳条件提取的五指毛桃粗黄酮纯度为 6.05%。

2.3 五指毛桃粗黄酮静态纯化单因素实验分析

2.3.1 树脂类型的影响

图 2 为 AB-8、D101 和 NKA-9 3 种大孔树脂对五指毛桃黄酮的静态吸附和解吸曲线。

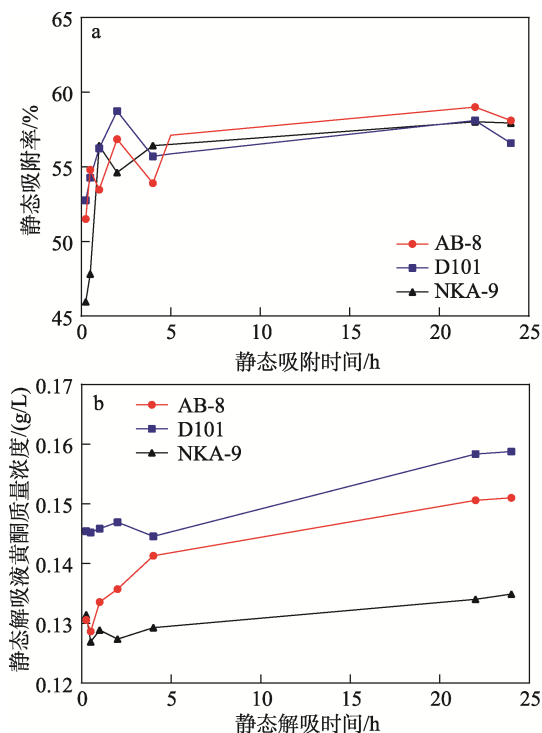


图 2 AB-8、D101 和 NKA-9 静态吸附曲线 (a) 和静态解吸曲线 (b)

Fig. 2 Static adsorption (a) and desorption (b) curves for AB-8, D101 and NKA-9

从图 2a 可以看出，0~4 h 内，AB-8、D101 和 NKA-9 3 种大孔树脂的静态吸附率均逐渐上升，相差不大，4~24 h 内，3 种大孔树脂静态吸附率趋于平稳。比较看出，AB-8 静态吸附率大于 D101 和 NKA-9。

从图 2b 可以看出，0~4 h 内，AB-8 静态吸附液黄酮质量浓度逐渐上升，而 D101 静态吸附液黄酮质量浓度先上升后下降，NKA-9 静态吸附液黄酮质量浓度先下降后上升。4~24 h 内，3 种树脂静态吸附液黄酮质量浓度均逐渐上升。从整体来看，3 种树脂静态吸附液黄酮质量浓度的大小排序为 D101>AB-8>NKA-9，但 AB-8 与 D101 相差不大。

综合吸附和解吸曲线，选择 AB-8 进行静态吸

附、解吸的主要因素考察。

2.3.2 各单因素对树脂静态吸附的影响

图 3 为五指毛桃粗黄酮样品液质量浓度、pH 对树脂静态吸附影响，以及解吸液（乙醇体积分数）对树脂静态解吸率的影响。

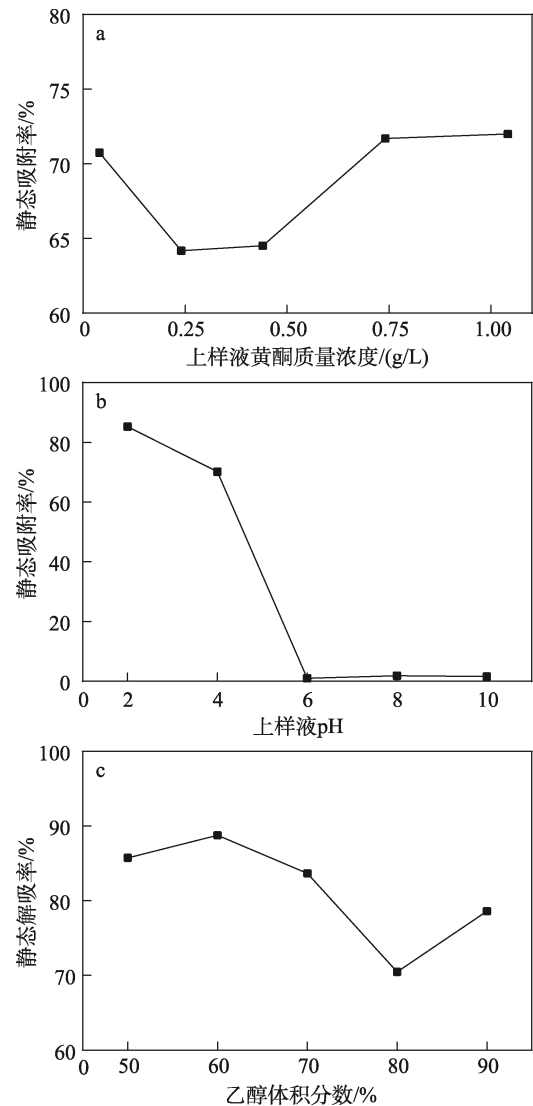


图 3 五指毛桃粗黄酮样品液质量浓度 (a)、pH (b)、乙醇体积分数 (c) 对静态吸附率和解吸率的影响

Fig. 3 Effects of crude flavonoids mass concentration (a), pH (b) and volume fraction of ethanol (c) on static adsorption and desorption rate

从图 3 可以看出，五指毛桃粗黄酮样品液质量浓度 0.7408 g/L（图 3a）、pH=2（图 3b）时，AB-8 静态吸附率最大；乙醇体积分数为 60%时，AB-8 静态解吸率达到最大（图 3c）。但考虑到五指毛桃粗黄酮样品液 pH 太低可能会影响树脂的性质，因此，AB-8 最佳静态吸附解吸条件为：五指毛桃粗黄酮样品液质量浓度 0.7408 g/L、pH=4、乙醇体积分数 60%。

2.4 五指毛桃粗黄酮动态纯化单因素实验结果

2.4.1 动态吸附和解吸结果

图 4 为 AB-8、D101、NKA-9 的动态吸附和解

吸曲线。

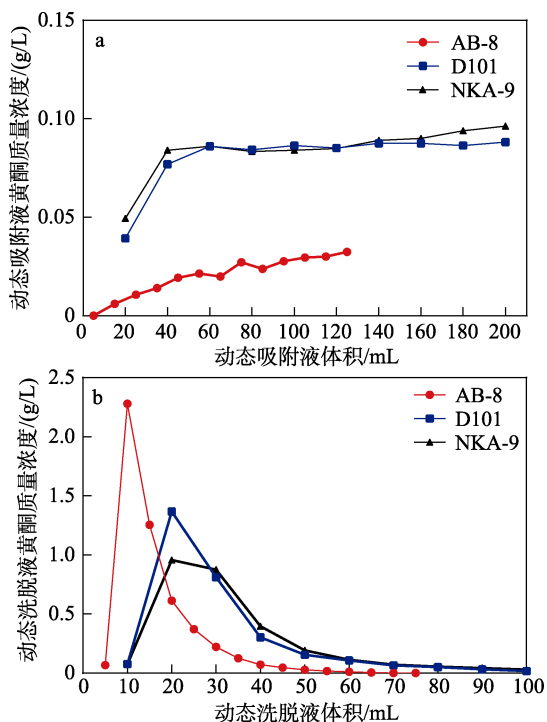


图 4 AB-8、D101、NKA-9 动态吸附曲线 (a) 和动态洗脱曲线 (b)

Fig. 4 Dynamic adsorption curves (a) and elution curves (b) of AB-8, D101 and NKA-9

从图 4a 可以看出, 相同五指毛桃粗黄酮样品液质量浓度 (0.2408 g/L) 条件下, AB-8 吸附液黄酮质量浓度随着吸附液体积的增加而逐渐增加, D101、NKA-9 吸附液黄酮质量浓度随着吸附液体积增加先迅速增加, 当吸附液体积 > 60 mL 后, 吸附液黄酮质量浓度逐渐趋于平稳。AB-8 吸附液黄酮质量浓度远低于 D101、NKA-9, 表明 AB-8 动态吸附效果比 D101、NKA-9 好。

从图 4b 可以看出, 3 种大孔树脂洗脱液黄酮质量浓度随着洗脱液体积的增加, 均呈先上升后下降的近正态分布, AB-8 的最高黄酮质量浓度高于 D101、NKA-9, 表明 AB-8 的动态洗脱效果比 D101、NKA-9 好; 同时, 五指毛桃粗黄酮样品液质量浓度为 0.2408 g/L 时, AB-8、D101、NKA-9 3 种大孔树脂的最佳上样量分别为 75、40、40 mL, 最佳洗脱剂用量分别为 40、70、70 mL。

2.4.2 AB-8、D101、NKA-9 纯化五指毛桃效果

经测定, 五指毛桃粗黄酮样品液质量浓度为 0.2408 g/L 时, AB-8、D101、NKA-9 洗脱液深色部分五指毛桃黄酮纯度分别为 23.81%、14.98%、14.86%, 而 AB-8 有颜色部分五指毛桃黄酮纯度为 32.67%。

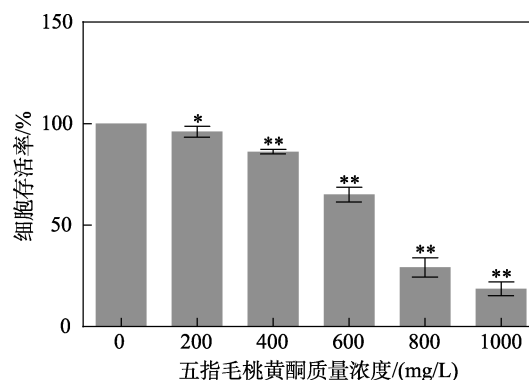
另外测定, 五指毛桃粗黄酮样品液质量浓度为 0.7408 g/L 时, AB-8 洗脱液深色部分、浅色部分的

五指毛桃黄酮纯度分别为 13.16%、19.12%, 由此可以看出, 对于 AB-8, 五指毛桃粗黄酮样品液质量浓度为 0.2408 g/L 时纯化效果更好, 洗脱液的浅色部分黄酮纯度高于深色部分, 可能是因为, 深色部分所含其他类型化合物较浅色部分多, 从而影响了黄酮的检测, 使其纯度偏低。

2.5 五指毛桃黄酮抑制 HepG2 细胞的增殖活性分析

2.5.1 对 HepG2 细胞存活率的影响

图 5 为五指毛桃黄酮质量浓度对 HepG2 细胞存活率的影响。

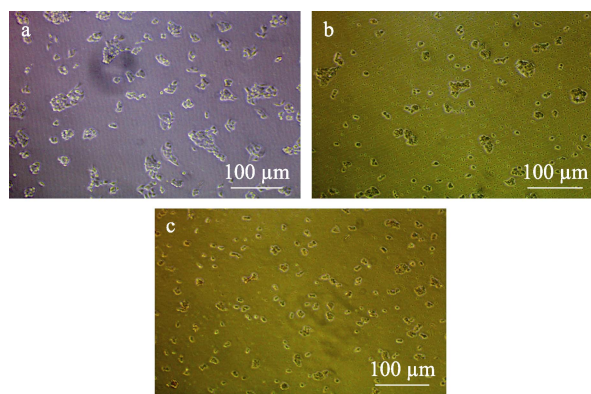


与对照组相比, “**”表示 $P < 0.01$, “*”表示 $P < 0.05$, 下同
图 5 五指毛桃黄酮质量浓度对 HepG2 细胞存活率的影响
Fig. 5 Effect of mass concentration of *Ficus hirta vahl* flavonoids on survival rate of HepG2 cells

从图 5 可以看出, 与对照组相比, 实验组 (质量浓度 200~1000 mg/L) 五指毛桃黄酮能抑制 HepG 细胞增殖, 降低细胞存活率, 促进细胞凋亡, 并呈现出一定的质量浓度依赖性。

2.5.2 对 HepG2 细胞形态的影响

图 6 为不同质量浓度 (0、600、800 mg/L) 五指毛桃黄酮处理后的 HepG2 细胞的荧光显微镜照片。



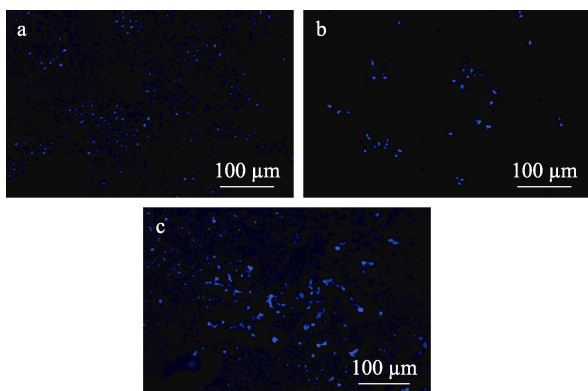
a—对照组; b—600 mg/L 组; c—800 mg/L 组
图 6 不同质量浓度五指毛桃黄酮处理后的 HepG2 细胞的荧光显微镜照片

Fig. 6 Fluorescence microscope photographs of HepG2 cells treated with different mass concentrations of *Ficus hirta vahl* flavonoids

从图 6 可以看出,对照组的 HepG2 细胞饱满且呈无规则的多边形小岛状(图 6a);五指毛桃黄酮组的 HepG2 细胞变圆且呈皱缩、疏松状态,表现出凋亡的特征(图 6b、c)。表明五指毛桃黄酮可能通过诱导细胞凋亡抑制 HepG2 细胞增殖。

2.5.3 对 HepG2 细胞细胞核形态的影响

Hoechst33342 核染料可透过细胞膜,染色后正常细胞呈弱蓝色,凋亡细胞因固缩呈现较强的蓝色荧光。图 7 为不同质量浓度(0、600、800 mg/L)五指毛桃黄酮处理后的 HepG2 细胞细胞核的荧光显微镜照片。



a—对照组; b—600 mg/L 组; c—800 mg/L 组

图 7 不同质量浓度五指毛桃黄酮处理后的 HepG2 细胞细胞核的荧光显微镜照片

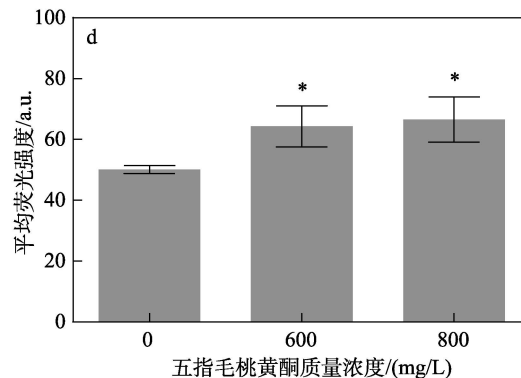
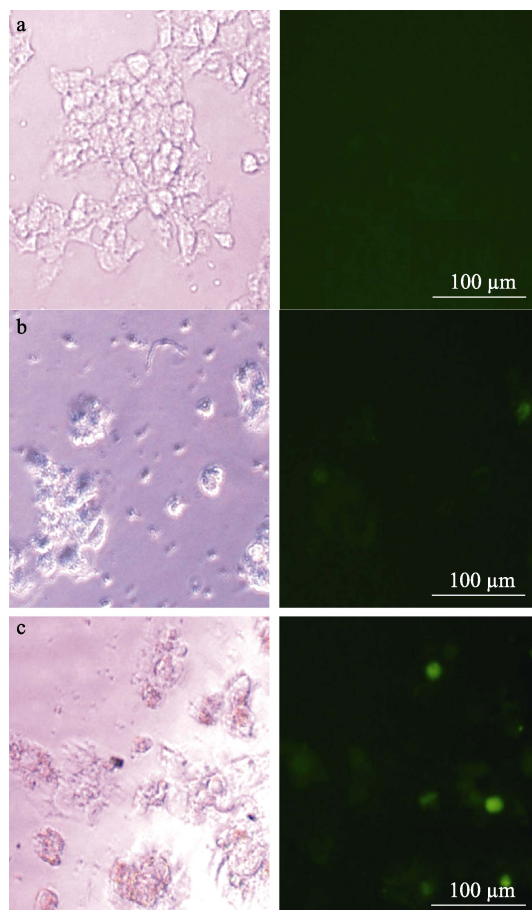
Fig. 7 Fluorescence microscopy photographs of nuclei of HepG2 cells treated with different mass concentrations of *Ficus hirta vahl* flavonoids

从图 7 可以看出,对照组中细胞呈现出低强度微蓝色荧光,细胞核形态较好(图 7a);五指毛桃黄酮组中一部分细胞呈现出颗粒状亮蓝色荧光,细胞核出现皱缩、破碎等情况(图 7b、c)。表明五指毛桃黄酮可诱导 HepG2 细胞发生凋亡。

2.5.4 对 HepG2 细胞 ROS 的影响

ROS 是正常生理条件下线粒体有氧代谢的副产物,在细胞内具有双重功能,ROS 的适度增加可以激活有关细胞增殖、分化的重要信号通路;然而,过量的 ROS 则会对细胞蛋白、脂质和核酸造成氧化损伤,进而使细胞死亡,引发细胞凋亡。图 8 为不同质量浓度(0、600、800 mg/L)五指毛桃黄酮处理后的 HepG2 细胞 ROS 的荧光显微镜照片和 ROS 水平量化结果。

从图 8 可以看出,与对照组(图 8a)相比,五指毛桃黄酮组(图 8b、c)的荧光强度较高,表明细胞内 ROS 水平较高(图 8d)。表明五指毛桃黄酮在一定范围内可增加 HepG2 细胞内 ROS 含量,促进细胞凋亡,对细胞增殖起到一定的抑制作用。



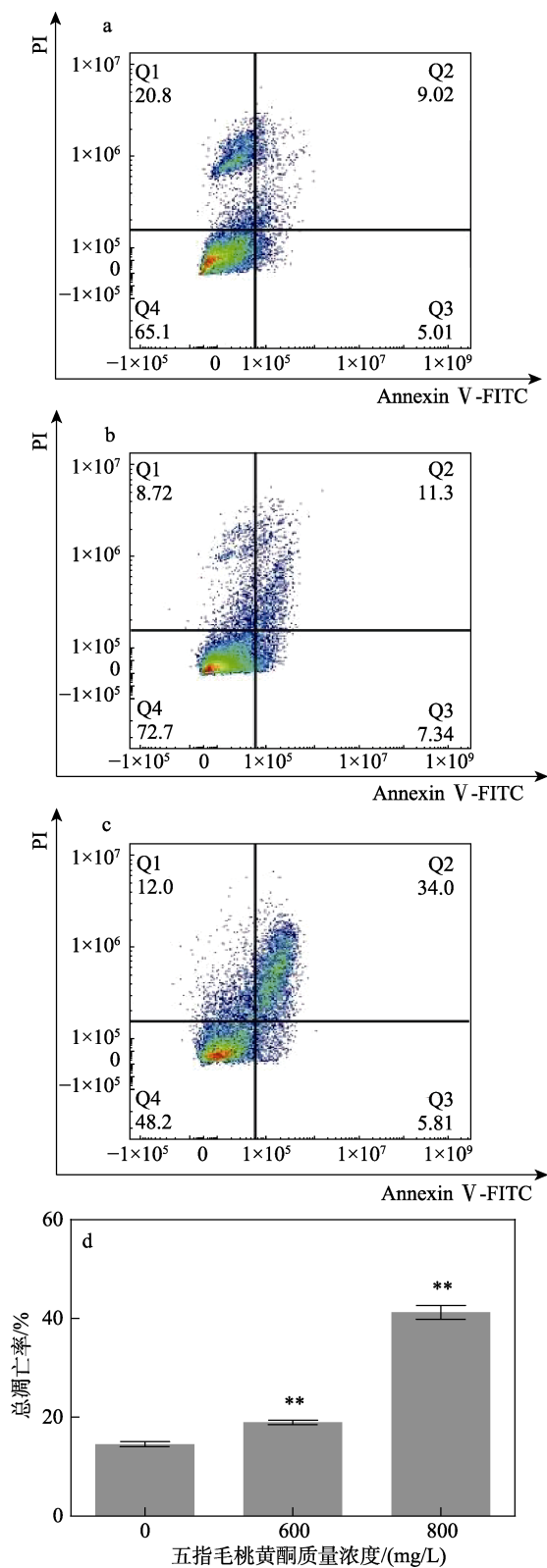
a—对照组; b—600 mg/L 组; c—800 mg/L 组

图 8 不同质量浓度五指毛桃黄酮处理后的 HepG2 细胞 ROS 的荧光显微镜照片(a~c)和 ROS 水平量化结果(d)

Fig. 8 Fluorescence microscope photos (a~c) and ROS level quantification results (d) of HepG2 cells treated with different concentrations of *Ficus hirta vahl* flavonoids

2.5.5 对 HepG2 细胞凋亡的影响

图 9 为不同质量浓度(0、600、800 mg/L)五指毛桃黄酮处理后的 HepG2 细胞流式细胞仪检测图和总凋亡率。在流式细胞仪检测图中,左下角象限为活细胞不被染色,右下角象限为早期凋亡细胞仅被 Annexin V-FITC 染色,右上角象限为晚期凋亡细胞被 Annexin V-FITC 和 PI 同时染色,左上角象限代表坏死细胞。



a—对照组; b—600 mg/L 组; c—800 mg/L 组

图 9 不同质量浓度五指毛桃黄酮处理后的 HepG2 细胞流式细胞仪检测图 (a~c) 和总凋亡率 (d)

Fig. 9 Flow cytometry of HepG2 cells treated with different concentrations of *Ficus hirta vahl* flavonoids (a~c) and total apoptosis rate (d)

从图 9 可以看出, 与对照组 (图 9a) 相比, 五指毛桃黄酮组 (图 9b、c) 中细胞总凋亡率增大,

并且细胞总凋亡率随着五指毛桃黄酮质量浓度的增加而增加。表明五指毛桃黄酮可促进 HepG2 细胞凋亡, 从而抑制细胞的增殖。

3 结论

(1) 单因素实验和正交实验优化的五指毛桃粗黄酮最佳提取条件为: 超声时间 90 min、料液比 (g : mL) 1 : 40、乙醇体积分数 80%、超声功率 400 W。在此条件下, 五指毛桃黄酮的平均提取量为 (5.720±0.713) mg/g, 五指毛桃粗黄酮纯度为 6.05%。

(2) 大孔树脂 AB-8 最佳静态纯化条件为五指毛桃粗黄酮样品液质量浓度为 0.7408 g/L、pH=4、解吸液为乙醇体积分数 60% 的水溶液; 动态纯化最佳条件为五指毛桃粗黄酮样品液质量浓度 0.2408 g/L、pH=4、上样量 75 mL、洗脱剂为乙醇体积分数 60% 的水溶液、洗脱剂用量为 40 mL。通过 AB-8 的动态纯化, 五指毛桃黄酮的纯度由原来的 6.05% 提高到 32.67%。

(3) 通过 MTT 法、核染色法、ROS 检测法以及流式细胞术的检测, 证实 AB-8 纯化后的五指毛桃黄酮能够抑制 HepG2 细胞的增殖, 促进 HepG2 细胞发生凋亡, 降低其存活率。

本文可以为五指毛桃的开发利用及天然化合物抗肝癌活性研究提供一定的研究基础和理论依据。后续研究将继续提高五指毛桃黄酮纯度, 深入研究其抑制 HepG2 细胞增殖的机制。

参考文献:

- [1] ZHENG R R (郑蓉蓉), YA J (轧霁), WANG W J (王文婧), *et al.* Chemical studies on roots of *Ficus hirta*[J]. Chinese Journal of Chinese Materia Medica (中国中药杂志), 2013, 38(21): 3696-3701.
- [2] Committee of Guangdong Chinese Materia Medica (《广东中药志》委员会). Annals of traditional chinese medicine in Guangdong[M]. Guangzhou: Guangdong Science and Technology Press (广东科技出版社), 1994.
- [3] WANG W W (王伟伟), CHEN Y (陈瑶). Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Ficus hirta*[J]. Chinese Journal of Ethnomedicine and Ethnopharmacy (中国民族民间医药), 2013, 22(3): 41-42.
- [4] LUO Q (罗菁), XI P (席萍), LIAO X Z (廖雪珍), *et al.* Experimental study on the pharmacological safety of water decoction of *Peachys chinensis*[J]. Pharmacy Today (今日药学), 2009, 19(2): 12-13.
- [5] LIN H (林慧), MEI Q X (梅全喜), ZENG C Y (曾聪彦). Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of *Fructus chinensis*[J]. Pharmacy Today (今日药学), 2012, 22(8): 484-486.
- [6] FU X M (傅贤明), LU S (卢诗), HUANG X (黄欣), *et al.* Study on ultrasonic extraction and antioxidant capacity of total flavonoids from Fuding white tea[J]. Cereals & Oils (粮食与油脂), 2022, 35(12): 114-118, 122.
- [7] HE D X (赫丁轩), YANG L J (杨立军), YE R (叶润), *et al.* Study on the extraction technology and antioxidant activity of total flavonoids from different sources *Ranunculus ternatus Thunb*[J]. Cereals & Oils

- (粮食与油脂), 2023, 36(1): 101-105.
- [8] MAURA F, GRETA R, MARIA M C, *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(Part A): 51-58.
- [9] YU Q J (于秋菊), GENG F Y (耿凤英), ZHANG L L (张磊磊). Optimization of microwave assisted extraction of flavonoids from raspberry with deep eutectic solvents and its activity[J]. *China Food Additives (中国食品添加剂)*, 2023(2): 43-51.
- [10] YANG S R (杨盛茹), HOU Y C (侯银臣), ZHANG Q S (张秋双), *et al.* Study on optimization of ultrasonic assisted extraction process and stability of flavonoids from *Tenebrio molitor*[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences (江苏农业学报)*, 2023, 39(1): 229-237.
- [11] WANG Z Y (王占一), XIN G C (辛国灿), GU B (顾宝), *et al.* Optimization of ultrasonic-assisted extraction of total flavonoids from leaves of *Euryale ferox* and the anti-lipid oxidation ability[J]. *Food Science and Technology (食品科技)*, 2024, 49(1): 218-224.
- [12] ZHAO M H (赵明慧), JIANG Z T (姜子涛), LI R (李荣). Study on microwave-assisted extraction and purification of flavonoids by macroporous resins from *Corylus heterophylla* leaves[J]. *Science and Technology of Food Industry (食品工业科技)*, 2013, 34(19): 196-200, 206.
- [13] DONG Y, ZHAO M M, SUN-WATERHOUSE D X, *et al.* Absorption and desorption behaviour of the flavonoids from *Glycyrrhiza glabra* L. leaf on macroporous resins[J]. *Food Chemistry*, 2015, 168: 538-545.
- [14] WANG Y, ZHANG H C, LIANG H, *et al.* Purification, antioxidant activity and protein-precipitating capacity of punicalin from pomegranate husk[J]. *Food Chemistry*, 2013, 138(1): 437-443.
- [15] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2021, 71(3): 209-249.
- [16] WU W L (吴文龙), WANG Q C (王权成), MENG Q (孟强), *et al.* Effect and mechanism of berberine on the activity and proliferation of hepatoma cells[J]. *Medical Journal of Chinese People's Liberation Army (解放军医学杂志)*, 2023, 48(6): 653-662.
- [17] CHEN Z Q, XIE H, HU M M, *et al.* Recent progress in treatment of hepatocellular carcinoma[J]. *American Journal of Cancer Research*, 2020, 10(9): 2993-3036.
- [18] YANG J D, HAINAUT P, GORES G, *et al.* A global view of hepatocellular carcinoma: Trends, risk, prevention and management[J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2019, 16(10): 589-604.
- [19] WANG Y, CAO H J, SUN S J, *et al.* Total flavonoid aglycones extract in *Radix scutellariae* inhibits lung carcinoma and lung metastasis by affecting cell cycle and DNA synthesis[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2016, 194: 269-279.
- [20] LI H M, JIANG D Z, ZHANG L, *et al.* Inhibition of tumor growth of human hepatocellular carcinoma HepG2 Cells in a nude mouse xenograft model by the total flavonoids from *Arachniodes exili*[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 2017: 1-9.
- [21] LI X J Y, SUN R, LIU R P, *et al.* Natural products in licorice for the therapy of liver diseases: Progress and future opportunities[J]. *Pharmacological Research*, 2019, 144: 210-226.
- [22] HUSSAIN S S, ZHANG F, ZHANG Y Y, *et al.* Stevenleaf from *Gynostemma pentaphyllum* inhibits human hepatoma cell (HepG2) through cell cycle arrest and apoptotic induction[J]. *Food Science and Human Wellness*, 2020, 9(3): 295-303.
- [23] CHEN T P, HAO J X, HE J F, *et al.* Cannabisin B induces autophagic cell death by inhibiting the AKT/mTOR pathway and s phase cell cycle arrest in HepG2 cells[J]. *Food Chemistry*, 2013, 138(2/3): 1034-1041.
- [24] QIN M Y (秦明有). Research on microwave extraction process of bamboo leaf flavonoids optimized by response surface[J]. *Feed China (饲料广角)*, 2018(2): 27-30.
- [25] XUE J (薛菁), ZHANG H S (张海生), PENG C R (彭春蓉). Ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Persimmon* and analysis of its antioxidation and bacteriostatic[J]. *Packaging and Food Machinery (包装与食品机械)*, 2017, 35(6): 21-25, 40.
- [26] CHEN T (陈婷), XU W B (徐文斌), HONG Y L (洪怡蓝), *et al.* Total flavonoids from *Stevia rebaudiana* residue: Optimization of extraction process by response surface methodology and antioxidant activity evaluation[J]. *Food Science (食品科学)*, 2016, 37(18): 52-57.
- [27] ZHU X P (朱新鹏), CHEN F (陈芳), QIN R (秦绒), *et al.* Optimization of ultrasonically assisted extraction of total flavonoids from *Hovenia Acerba*[J]. *Packaging and Food Machinery (包装与食品机械)*, 2020, 38(3): 22-27.

(上接第 77 页)

- [42] ZHAI H B, JIA L H, YANG W B, *et al.* Effect of g-C₃N₄ morphology on its performance as lubricating additive for grease[J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2023, 660: 130831.
- [43] CHIMENO T C, PACHECO M, FERNANDEZ G A, *et al.* New metal-free nanolubricants based on carbon-dots with outstanding antiwear performance[J]. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 2020, 87: 152-161.
- [44] HETTICH D, AHA B, ZIMMERMANN R, *et al.* Lubricant-reducing scrap rates in forming high alloyed steel by stable friction behavior over the temperature[J]. *Procedia Manufacturing*, 2020, 47: 561-565.
- [45] DUAN L L, LI J, DUAN H T. Nanomaterials for lubricating oil application: A review[J]. *Friction*, 2023, 11(5): 647-684.
- [46] LIU C, YIN Q, ZHANG W B, *et al.* Tribological properties of graphene-modified with ionic liquids and carbon quantum dots/bismaleimide composites[J]. *Carbon*, 2021, 183: 504-514.
- [47] LI Y B (李元宝), JI X H (纪兴华). Preparation and tribological properties of a new water-based additive[J]. *Henan Chemical Industry (河南化工)*, 2023, 40(8): 16-18.
- [48] CHER W H, FENG Y G, WAN Y, *et al.* Investigation on anti-wear and corrosion-resistance behavior of steel-steel friction pair enhanced by ionic liquid additives under conductive conditions[J]. *Tribology International*, 2023, 177: 108002.
- [49] WANG B G, ZHANG M, DAI S S, *et al.* Tailoring the tribological performance of poly(ionic liquid)s brushes capped carbon dots by transforming the anion species[J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2021, 339: 116752.
- [50] WU C, XIA Q, LI S, *et al.* Effect of carbon quantum dots' surface functional groups on tribological performance of polyethylene glycol[J]. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part C: Journal of Mechanical Engineering Science*, 2024, 238(16): 8400-8416.
- [51] YU B (于波), ZHOU K (邹坤), WANG R (王睿), *et al.* Tribological properties of quaternary ammonium salt polymeric ionic liquids as water-based lubricant additive[J]. *Tribology (摩擦学报)*, 2022, 42(6): 1246-1257.
- [52] DONG R (董瑞), WEI D Q (危得全), YU Q L (于强亮), *et al.* Tribological mechanism of sulfonic alkanolamine ionic liquid as water lubricating additive[J]. *Tribology (摩擦学报)*, 2022, 42(3): 482-492.
- [53] LI X, WANG B G, DAI S S, *et al.* Carbon dot-based nanofluids as additives for mechanical lubrication[J]. *ACS Applied Nano Materials*, 2024, 7(7): 7925-7933.
- [54] LIANG H Y, LIU M Q, YIN T Q, *et al.* Carbon dots as ligand operons to expand cluster size distribution for high load-bearing liquid superlubricity[J]. *Advanced Functional Materials*, 2024, 34(19): 2311600.