

牡丹中黄酮类化合物的研究进展

Research progress of peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) flavonoids

王洪新^{1,2} 吴颖¹ 寇兴然¹ 马朝阳^{1,2} 郭珣¹ 黄铁¹

WANG Hong-xin^{1,2} WU Ying¹ KOU Xing-ran¹ MA Chao-yang^{1,2} GUO Xun¹ HUANG Tie¹

(1. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 国家功能食品工程技术研究中心〔江南大学〕, 江苏 无锡 214122)

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China;

2. National Engineering Research Center for Functional Food, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

摘要:文章归纳了牡丹中黄酮类化合物的研究进展, 对其提取、分离纯化方法及生物活性作了较为系统的总结, 并对牡丹中黄酮类化合物的研究前景进行了展望, 以期为其深入开发与应用提供依据。

关键词:牡丹; 黄酮; 提取; 分离; 鉴定

Abstract: This review focused on the recent progress of peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) flavonoids. Extraction, separation, purification methods of peony flavonoids as well as their biological activities were summarized. An outlook on the peony flavonoids was also put forward for future research.

Keywords: peony; flavonoids; extraction; purification; identification

牡丹(*Paeonia suffruticosa* Andr.), 多年生落叶灌木, 属毛茛科、芍药属, 又名鹿韭、白术、木芍药、百两金、花王、国色、天香、富贵花、谷雨花^[1]。在中国牡丹种质资源丰富, 栽培面积大, 生态适应性强, 主要分布于河南、山东、湖北、甘肃、重庆、安徽等地。牡丹除具有重要的观赏、文化价值外, 还具有重要的药用和经济价值。牡丹属植物含有多酚、黄酮等多种生物活性成分, 具有抗氧化、抗凝血、镇静止痛、降低血糖、抗骨质疏松等作用^[2]。牡丹根皮可入药, 称“丹皮”, 《中国药典》2015 版记载, 丹皮可“清热凉血、活血化瘀”。丹皮主要活性成分为丹皮酚, 其具有抗动脉粥样硬化、抗心律失常、扩张血管、抗缺血再灌注损伤等作用^[2]。牡丹籽可用于榨油, 2011 年牡丹籽油已获批为新资源食品, 其富含 α -亚麻酸(38.66%), 能够抑制脂肪合成、降低血脂^[3]。此外, 牡丹籽粕还是天然多糖的优良来源^[4]。

近年来, 不断有文献报道牡丹花瓣、花蕊^{[5]9-17}、种皮^[6]、

叶^{[7]21-32}、根皮^[8-9]等部位中含有丰富的黄酮类化合物。黄酮类化合物(Flavonoids)泛指结构中含有 2 个苯环通过 3 个碳原子连接而成的一系列化合物。根据分子骨架及羟基的差异, 可分为黄酮(Flavones)、黄酮醇(Flavonols)、黄烷酮(Flavanones)、黄烷醇(Flavanonols)、二氢黄酮醇(Flavanols)、异黄酮(Isoflavones)、花青素(Anthocyanidins)^[10]。经试验^{[5]36-43[7]45-53[11-12]}证实, 牡丹中的黄酮类化合物具有抗氧化、抑菌、清除亚硝酸盐等活性, 这些研究对于深入认识和理解牡丹的药用、保健价值具有重要作用。

本文总结了国内外有关牡丹中黄酮类化合物的提取、分离纯化及生物活性的最新进展, 旨在为牡丹中黄酮类化合物的深入研究提供参考, 实现牡丹资源的高效利用, 提升其产业附加值。

1 牡丹中黄酮类化合物的提取

1.1 传统提取法

传统提取法又分为溶剂提取法、水提取法、碱液提取法、系统溶剂提取法等。对于苷类和极性较大的苷元, 可选择用甲醇、乙醇、水、乙酸乙酯、丙酮或极性较大的混合溶剂。而大部分的苷元则适宜用极性较小的溶剂, 如氯仿、乙醚等提取。以 55% 乙醇为溶剂提取牡丹花中总黄酮, 经 45 min 提取, 总黄酮提取率为 6.08%^[13]。而相较 70% 乙醇水溶液、1% 盐酸甲醇等溶剂, 用 1% β -环糊精水溶液提取菏泽牡丹花中总黄酮和花色苷的含量最高^{[5]7-11}。用甲醇提取牡丹花瓣, 再采用 HPLC-DAD、HPLC-MS 鉴定黄酮类物质结构, 最终可得到槲皮素、山柰酚、异鼠李素、木犀草素、芹菜素、甲氧基木犀草素等黄酮类物质^[14]。牡丹根皮总黄酮在料液比 1:40 (g/mL)、乙醇体积分数 60%、提取温度 55℃ 条件下总得率为 3.11 mg/g^[8]。值得注意的是, 当乙醇浓度 80%、料液比 1:20 (g/mL)、匀浆时间 4 min、匀浆次数 2 次时, 测得牡丹种皮黄酮含量高达 52.19 mg/g, 远高于其它植株部位。

基金项目:中央高校基本科研业务费专项(编号:JUSRP51501); 国家级大学生创新创业训练计划项目资助(编号:201610295052)

作者简介:王洪新(1964—), 男, 江南大学教授, 博士生导师。
E-mail: hxwang@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2016—11—30

1.2 超声辅助提取法

超声波提取法是在溶剂提取的基础上加以超声波处理的过程。该方法具有许多优点,如工艺简单、效率高、不破坏黄酮类物质热敏成分等,所以被广泛应用于植物中黄酮等生物活性物质的提取。超声波辐射压强产生骚动效应、空化效应和热效应,超声辅助提取法就是利用该原理加速目标物质的扩散及溶解,从而有效地提高目标成分的得率及含量^[15]。在70%乙醇、料液比1:20(g/mL),频率22 kHz,超声处理时间10 min条件下提取牡丹花中黄酮,提取率达91.5%^[16],较常规提取方法具有温度低、效率高、能耗低、节省溶剂等优点。而在乙醇体积分数55%、料液比1:20(g/mL)、超声时间40 min、超声功率140 W时,牡丹种皮黄酮最大得率为46.05%^[6]。在提取条件为:料液比1:20(g/mL),乙醇体积分数80%,超声频率20 kHz,超声时间30 min时,牡丹花蕊中总黄酮含量为18.85 mg/g^[17]。

1.3 微波辅助提取法

微波辅助提取是指溶剂与微波在特定的微波反应器中作用,使物料中目标成分得以溶出的过程。在微波作用时,吸收微波能力的差异,使得物料或体系中的某些特定成分被选择性加热,细胞内温度上升,压力也不断增大,而这些被加热的组分相对较易从体系中分离,进入到介电常数较小、微波吸收能力较差的萃取溶剂中,从而实现有效成分的提取。微波萃取技术具有较高的选择性、节省溶剂、快速高效、安全无污染等优点^[18-19]。在70%乙醇,料液比1:25(g/mL),微波处理20 min条件下,提取牡丹叶中总黄酮含量为1.97%,纯度为10.56%,优于超声提取得到的总黄酮^{[7]28-32}。

1.4 酶解法

酶的种类、浓度、孵育温度、酶解时间和pH值是影响牡丹总黄酮得率的重要因素^[20]。使用酶解法提取牡丹中黄酮类物质时,应根据牡丹不同植株部位、黄酮类物质种类及性质来选择最佳的酶及酶解条件,以获得较高得率。将0.2 mg/mL的纤维素酶和0.1 mg/mL的果胶酶复合,在酶解液初始pH 4.5、50℃条件下,酶解120 min,牡丹花总黄酮最终产量比传统乙醇提取法提高了19.8%^[21]。采用纤维素酶酶解牡丹叶,在最佳工艺条件下(酶用量12.5 U/mL, pH 4.5,酶解温度45℃,酶解时间4 h)黄酮提取率为2.43%^[11]。在果胶酶浓度为0.05 mg/mL、酶解温度45℃、酶解时间180 min、pH 4.5时,总黄酮得率可达到74.839 mg/g,较乙醇法提取所得黄酮的得率显著提高^[22]。

1.5 闪式提取法

闪式提取法需要使用闪式提取器,凭借闪式提取器高速运转时的剪切力,快速破碎植物组织,释放出目标成分,再通过过滤实现黄酮类物质的提取。以牡丹花粉为原料,比较闪式提取和水浴回流2种方法所得提取物的抗氧化性能,发现:DPPH自由基清除试验中,当提取物浓度为40 mg/mL, IC₅₀分别为20.3,20.9 mg/mL;还原力测定试验中,提取物浓度为15 mg/mL时,吸光度分别为0.71,0.72。2种提取方法的提取物抗氧化能力相近^[23]。

1.6 超高压提取法

超高压提取指于常温条件下,将一定压力作用于料液,保持一段时间使细胞内外压力达到平衡再迅速撤去压力。细胞内外渗透压力差突然变大,细胞膜结构发生变化,细胞内有效成分溶出,从而实现提取。在压力350 MPa、乙醇浓度70%、料液比1:40(g/mL)、压力保持时间9 min的最佳工艺时,菏泽牡丹花黄酮提取率为(1.399±0.040)%^{[5]11-18}。

2 牡丹中黄酮类化合物的分离纯化

2.1 薄层层析色谱法

采用薄层层析法对不同品种的牡丹花中黄酮物质进行初步分析,展开剂体积比为正丁酸:冰乙酸:水=6:1:2,根据薄层层析纤维板上斑点的出现及其颜色,得出白、黄、绿牡丹花中不含有花色苷,而紫红色花系则可能含有矢车菊素及其衍生物和芍药素及其衍生物,粉色、红色系花可能含有天竺葵素及其衍生物^[24]。此后依次使用氨气、浓盐酸对各样品薄层层析纤维板进行熏处理,将样品的Rf值与标品对照并结合熏蒸前后斑点颜色的变化,得出粉色系花瓣中可能含有天竺葵素-3,5-二葡萄糖苷、芍药花素-3,5-二葡萄糖苷的1种或2种;紫色系花则可能含有矢车菊素-3-葡萄糖苷,所有样品中都含有黄酮和/或黄酮醇物质。

2.2 大孔吸附树脂

大孔吸附树脂是一类有机高分子聚合物,是柱色谱常用的一种吸附剂,因其处理量大、分离效果好而被广泛应用于黄酮类物质的分离纯化。牡丹中黄酮类化合物的分离纯化主要是采用大孔吸附树脂,大孔树脂具有物理化学稳定性高、解吸条件温和、使用周期长、易于再生、操作简单、节省费用等优点。在对牡丹中黄酮类物质进行定性、定量分析及纯化精制等方面,大孔树脂具有良好应用前景。

王晶^[25]以总苷含量为指标,考察了D101、ZTC-1、DM301 3种大孔吸附树脂对牡丹皮总苷分离纯化的作用,并优化了ZTC-1树脂纯化牡丹皮总苷的工艺,牡丹皮总苷最终含量达59%。与先用超滤膜超滤后,经大孔吸附树脂吸附相比,先经大孔吸附树脂吸附,再用分子超滤膜超滤所得的黄酮得率和纯度均有提高^{[7]33-40}。因此,用大孔吸附树脂进行吸附之后进行超滤,对提高样品的含量及纯度都具有积极意义。

2.3 高效液相色谱法

牡丹中黄酮类物质的结构鉴定多采用高效液相色谱法,该法具有分析速度快、分离效果好、仪器自动化程度高等优点,且通常使用反相C₁₈色谱柱^[26]。

赵伟等^[27]先以70%乙醇提取牡丹花瓣中黄酮类物质,再用多种色谱方法对其进行分离纯化后,采用¹H-NMR、¹³C-NMR和MS波谱学数据鉴定黄酮类物质的结构,得到9种黄酮类化合物。其中,柯伊利素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷、二氢山柰酚-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷、野漆树和山柰酚-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷均为牡丹中首次分离得到。利用UPLC-PDA和UPLC-Q-TOF MS技术从“凤尾”“凤丹白”“西施”等7种江南牡丹品种的花瓣中检测出了15种类黄酮

成分,其中有 4 种花色苷成分,7 种黄酮,4 种黄酮醇^[28]。西北牡丹中含有的花色苷类物质主要为天竺葵素、矢车菊素、芍药花色素及其糖苷;黄色牡丹花中主要的黄酮类物质为芹菜素、芦丁、金圣草黄素、山柰酚、槲皮素及异鼠李素^[12]。而中原牡丹花经 HPLC 及 HPLC-DAD-ESIMS 等技术分析,可确认 5 种花色苷、3 种黄酮醇苷、6 种黄酮苷^[29]。

3 牡丹中黄酮类化合物的生物活性

目前,对牡丹中黄酮提取物生物活性的研究相对不足,且多集中于抗氧化活性方面。体外抗氧化试验发现,牡丹花黄酮的抗氧化活性与总黄酮含量及部分黄酮组分的化学结构有关:酚羟基数量越多抗氧化活性越强;苷元形式比其他糖苷形式活性强,单糖苷的抗氧化活性强于二糖苷^{[5]42-44}。牡丹叶总黄酮也具有显著的抗氧化活性,但不同提取分离纯化方法可影响牡丹叶中总黄酮的抗氧化效果。大孔吸附树脂纯化的提取物效果最好,微波萃取次之,乙醇浸泡提取物抗氧化能力最小^{[7]42-54}。牡丹叶黄酮还具有良好的清除亚硝酸盐能力,反应温度 70 ℃、pH 4.0、提取液用量 25 mL、反应时间 20 min 时,牡丹叶总黄酮对亚硝酸盐的清除率为 62.15 %^[11]。牡丹种皮黄酮提取物对 2,2-联氨-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐(ABTS)自由基的清除能力高于 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT)^[30]。

植物提取物的功能与生物活性与其所含活性成分密切相关。如前所述,牡丹黄酮提取物中主要为芹菜素、山柰酚、木犀草素等。除具有显著的抗氧化活性外,这些黄酮类化合物还具有抗炎、抗癌、保护心血管、预防神经退行性疾病、维护骨骼健康、抑制微生物等多种生物活性^[31]。了解这些黄酮类化合物的生物活性,对开展牡丹黄酮的活性研究具有重要的参考价值。

3.1 抗炎

NF- κ B 的激活会增强促炎因子、趋化因子及酶(如:TNF,IL-1,IL-6,IL-8,COX-2,iNOS)的表达。木犀草素能够在微摩尔浓度时抑制 NF- κ B 的活性^[32-33],山柰酚可抑制 NF- κ B^[34-35]、TNF- α ^[36]、IL-1 及 IL-8 的表达^[37]。激活蛋白是由许多参与炎症反应因素组成的转录调节因子,山柰酚能够抑制激活蛋白的活化^[38]。环氧合酶、脂肪氧化酶及一氧化氮合成酶通过合成类二十烷酸、增加活性氧化组分产量在炎症反应中起主要作用。据报道山柰酚可抑制 COX-2^[39]、脂肪氧化酶^[40]及 NOS^[41]的活性。芹菜素在用于治疗呼吸系统疾病时具有较强的清除氧自由基和抑制炎症作用。体内试验^[42-43]证明芹菜素可通过抑制肺组织中嗜酸性粒细胞渗出及提高免疫细胞因子水平来抑制呼吸炎症。

3.2 抗癌

木犀草素不仅可预防体内、体外由不同致癌物引起的 DNA 突变^[44],还能够诱导多种癌细胞的凋亡^[45]。芹菜素可通过抑制上皮间质转换、诱导细胞凋亡及自噬^[46]、抵抗癌症发生及发展。流行病学试验表明食用富含山柰酚的食物会降低罹患肺癌^[47]、胃癌^[48]、胰腺癌^[49]及卵巢癌^[50]等癌症的发病率。山柰酚及某些糖苷会诱导多种癌细胞的凋亡,包括

肺癌^[51]、乳腺癌^[52]、肝癌^[53]、食道癌^[54]、卵巢癌^[55]等。此外,山柰酚还可以增强抗癌药物的疗效。山柰酚能增强癌细胞对于铂化合物^[56]、5-氟尿嘧啶^[57]、阿糖胞苷^[58]、阿霉素^[59]、米托蒽醌及伊立替康代谢物^[60]的敏感性。

3.3 保护心血管

芹菜素可通过调节 PI3K/Akt 信号通路来降低细胞粘附分子的表达,从而缓解内皮细胞中由免疫细胞渗透增强及炎症级联反应引发的心血管疾病^[61]。山柰酚具有抑制血管紧张肽转酶(将血管紧张肽 I 转化成血管紧张肽 II 而造成血压上升)^[62]、诱导血管舒张^[63]、抗血小板及血栓形成^[64]的作用。异鼠李素具有抗心肌缺血缺氧,抗心律失常和降低血清胆固醇,促进血流通畅等作用,目前已用于临床心血管疾病的治疗。

3.4 预防神经退行性疾病

山柰酚、山柰酚糖苷可能具有保护神经活性,并在阿兹海默症、帕金森及亨廷顿氏舞蹈病的发展中起到保护作用^[65-66]。木犀草素及其某些糖苷可通过降低氧化应激压力、清除免疫反应及降低淀粉样蛋白产生来预防神经退行性疾病^[67]。

3.5 维护骨骼健康

山柰酚可抑制绝经后骨质流失,促进成骨细胞矿化及体内细胞的形成^[68-69]。山柰酚具有骨髓代谢活性,可充分抑制骨髓脂肪形成^[70]。体内试验证明芹菜素可提高矿物质含量及增强骨密度^[71],抑制破骨细胞活性,增强破骨细胞中钙质沉淀^[72]。

3.6 抑制微生物

山柰酚及其糖苷可协同抗生素(如:利福平、万古霉素、甲氧西林、红霉素及克林霉素)抑制耐抗生素细菌^[73],说明山柰酚可与抗生素联合用于抗菌治疗。山柰酚还可抑制单纯疱疹病毒^[74]、巨细胞病毒^[75]、流感病毒^[76]及人类免疫缺陷病毒(HIV)^[77]等病毒的活性。木犀草素及其糖苷也表现出抑菌^[78]、抗病毒^[79]及抗真菌活性^[80]。

3.7 其他活性

山柰酚及其糖苷还具有抗焦虑、止痛、过敏及平喘活性^[81]。木犀草素可通过抑制组胺释放等途径实现抗过敏活性^[82]。芹菜素可保护肝脏免于食物中呋喃、亚硝基二乙基胺等有害物质诱导的氧化应激 DNA 损伤^[83]。

值得注意的是,植物提取物中往往同时含有多种黄酮类化合物,这些黄酮类化合物之间可能存在协同或拮抗效应,从而对其抗氧化、抗炎等多种生物活性产生重要影响。例如,Maria Hidalgo 等^[84]比较了单一黄酮成分与混合黄酮成分的抗氧化能力。DPPH 清除自由基活性中,大部分黄酮混合后表现出拮抗作用,而山柰酚和杨梅素混合后则表现出协同作用。在 FRAP 指标中,表儿茶素及槲皮素-3- β -葡萄糖苷表现出最强的协同作用,而杨梅素与槲皮素则表现出拮抗作用。因此,当评价整个食物体系的抗氧化活性时,其试验结果与食物体系中含有的黄酮类化合物之间的协同或拮抗作用有关。Harasstani 等^[85]研究了白杨素、山柰酚、桑色素、水

飞蓟素、槲皮素、香叶木苷及橙皮苷在 LPS 诱导的巨噬细胞模型中抑制一氧化氮、前列腺素及肿瘤坏死因子分泌的效应,结果表明山柰酚及白杨素组合具有显著的协同作用。牡丹黄酮中含有芹菜素、山柰酚、木犀草素多种黄酮类化合物,因此在开展牡丹黄酮生物活性研究时,应对这些黄酮类化合物之间可能存在的协同或拮抗效应给予重视。

4 展望

目前国内外对牡丹中黄酮类化合物的研究尚不全面。牡丹根皮、种皮等部位植物组织木质素、纤维素含量高、质地坚硬,传统方法难以将黄酮类化合物充分提取出来。提取方法的选择,应根据提取组织部位、黄酮存在形式及其理化性质等因素综合考虑。传统溶剂提取法具有选择性差、提取不充分、黄酮类物质的活性受到影响等缺点,而超声辅助提取、微波辅助提取、超临界流体萃取、双水相萃取分离等新方法能够较好地克服这些缺点,并具有省时、高效、保护有效成分等优点。因此牡丹中黄酮类物质的提取应采用新方法并不断优化、改进,使提取过程更加高效。

尽管牡丹多个植株部位已证明含有大量黄酮类化合物(花瓣除外),但其物质组成尚未鉴定。因此,亟需采用高速逆流色谱、超高效液相串联质谱等先进的分离纯化及结构鉴定手段鉴定其物质组成,以明确牡丹黄酮提取物发挥生物活性的物质基础。

值得注意的是,在研究牡丹黄酮提取物生物活性时,黄酮类化合物之间的协同与拮抗效应、黄酮糖苷与苷元之间的消化吸收及活性差异应给予重视。

参考文献

[1] 赵兰勇. 中国牡丹栽培与鉴赏[M]. 北京: 金盾出版社, 2004: 1-22.

[2] 耿帅, 赵育林, 曾凯, 等. 丹皮酚的研究进展[J]. 中国新药与临床杂志, 2016, 35(5): 310-313.

[3] SU Jian-hui, MA Chao-yang, LIU Cheng-xiang, et al. Hypolipidemic Activity of Peony Seed Oil Rich in α -Linolenic, is Mediated Through Inhibition of Lipogenesis and Upregulation of Fatty Acid β -Oxidation[J]. Journal of Food Science, 2016, 81(4): 1 001-1 009.

[4] SHI Jun-jun, ZHANG Jian-guo, SUN Yu-han, et al. The rheological properties of polysaccharides sequentially extracted from peony seed dreg[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 91: 760-767.

[5] 袁亚光. 超高压提取牡丹花黄酮及其抗氧化性和稳定性的研究[D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2015.

[6] 王洪政, 刘伟, 张琳, 等. 正交实验优化超声辅助提取牡丹种皮总黄酮及其抗凝血活性研究[J]. 植物研究, 2014, 34(6): 856-860.

[7] 单方方. 牡丹叶总黄酮的分离纯化及抗氧化性研究[D]. 洛阳: 河南科技大学, 2011.

[8] 徐金龙, 张红梅, 徐秀泉. 响应面分析法优化牡丹皮中总黄酮的提取工艺[J]. 中国药房, 2011, 22(27): 2 536-2 538.

[9] 肖超妮, 王培, 马翠霞. 牡丹不同根部位的代谢物分布[J]. 波谱

学杂志, 2015, 32(4): 648-660.

[10] VERVERIDIS F, TRANTAS E, DOUGLAS C, et al. Biotechnology of flavonoids and other phenyl propanoid-derived natural products[J]. Biotechnology Journal, 2007, 2: 1 214-1 234.

[11] 李佩艳, 韩四海, 罗登林, 等. 牡丹叶黄酮的酶法提取及其对亚硝酸盐的清除作用[J]. 食品科学, 2016, 37(6): 77-81.

[12] WANG Liang-sheng, FUMIO Hashimoto, AYA Shiraishi, et al. Chemical taxonomy of the Xibei tree peony from China by floral pigmentation[J]. Journal of Plant Research, 2004, 117(1): 47-55.

[13] 吴存兵, 陈晓兰, 吴君艳. 响应面法优化乙醇提取牡丹花总黄酮工艺[J]. 南方农业学报, 2016, 47(8): 1 370-1 375.

[14] LI Chong-hui, DU Hui, WANG Liang-sheng. Flavonoid composition and antioxidant activity of tree penoy (paeonia section moutan) yellow flowers[J]. J. Agric. Food Chem., 2009, 57: 8 496-8 503.

[15] 唐浩国. 黄酮类化合物研究[M]. 北京: 科学出版社, 2009.

[16] 王晓, 江婷, 程传格, 等. 超声波强化提取牡丹花黄酮[J]. 山东科学, 2004, 17(3): 13-16.

[17] 吴震生, 侯昌, 毛文岳. 牡丹花蕊中总黄酮的提取与测定[J]. 食品与药品, 2013, 15(5): 344-345.

[18] 郑成, 战宇. 微波萃取技术及其在中草药中的应用[J]. 广州大学学报, 2004, 3(6): 519-521.

[19] 崔政伟, 梅成. 微波萃取技术简介[J]. 农产品加工, 2003(1): 32-33.

[20] 欧阳平, 张高勇, 康保安. 类黄酮的新兴提取技术原理、应用及前景[J]. 天然产物研究与开发, 2003, 15(6): 563-566.

[21] 王晓, 耿岩玲, 李福伟, 等. 酶法提取牡丹花总黄酮[J]. 山东科学, 2005, 18(4): 14-17.

[22] 孟庆焕, 祖元刚, 王化, 等. 酶法辅助乙醇优选牡丹种皮总黄酮[J]. 植物研究, 2015, 35(4): 628-631.

[23] 刘娟, 李楠, 王昌涛. 牡丹花粉黄酮的提取及抗氧化性研究[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(10): 39-44.

[24] 孙泽飞. 牡丹花类黄酮成分及抗氧化能力分析[D]. 陕西: 西北农林科技大学, 2015: 8-19.

[25] 王晶. 大孔吸附树脂分离纯化中药牡丹皮总苷和山植总黄酮的工艺研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2006: 10-19.

[26] 李广, 王清刚, 王义明, 等. 黄酮类化合物的定量色谱分析[J]. 食品科学, 2001, 22(2): 57-61.

[27] 赵伟, 耿岩玲, 崔莉, 等. 牡丹花黄酮类化学成分研究[J]. 中国现代中药, 2016, 18(3): 303-306.

[28] 张宝智, 胡永红, 韩继刚, 等. 七个江南牡丹品种花瓣中类黄酮分析[J]. 北方园艺, 2013(2): 61-65.

[29] FANG Jin-ling, ZHU Wen-xue, KANG Huai-bin, et al. Flavonoid constituents and antioxidant capacity in flowers of different Zhongyuan tree penoy cultivars[J]. Journal of Functional Foods, 2012(4): 147-157.

[30] 孟庆焕, 王化, 王洪政, 等. 牡丹种皮黄酮提取及对 ABTS 自由基清除作用[J]. 植物研究, 2013, 33(4): 504-507.

[31] WU Shao-hua, WU Da-gang, CHEN You-wei. Chemical Constituents and Bioactivities of Plants from Genus Paeonia[J]. Chemistry and Biodiversity, 2010(7): 90-104.

[32] KIM J S, JOBIN C. The flavonoid luteolin prevents lipopolysac-

- charide-induced NF-kappaB signalling and gene expression by blocking IkappaB kinase activity in intestinal epithelial cells and bone-marrow derived dendritic cells[J]. *Immunology*, 2005, 115(3): 375-387.
- [33] XAGORARI A, PAPAPETROPOULOS A, MAUROMATIS A, et al. Luteolin inhibits an endotoxin stimulated phosphorylation cascade and proinflammatory cytokine production in macrophages[J]. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2001, 296(1): 181-187.
- [34] PARK M J, LEE E K, HEO H S, et al. The anti-inflammatory effect of kaempferol in aged kidney tissues: the involvement of nuclear factor-kappaB via nuclear factor-inducing kinase/IkappaB kinase and mitogen-activated protein kinase pathways[J]. *Journal of Medicinal Food*, 2009, 12(2): 351-358.
- [35] KIM J M, LEE E K, KIM D H, et al. Kaempferol modulates pro-inflammatory NF-kappaB activation by suppressing advanced glycation endproducts-induced NADPH oxidase[J]. *Age*, 2010, 32(2): 197-208.
- [36] KOWALSKI J, SAMOJEDNY A, PAUL M, et al. Effect of apigenin, kaempferol and resveratrol on the expression of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha genes in J774.2 macrophages [J]. *Pharmacology Reports*, 2005, 57 (3): 390-394.
- [37] LEE S, KIM Y J, KWON S, et al. Inhibitory effects of flavonoids on TNF-alpha-induced IL-8 gene expression in HEK 293 cells[J]. *BMB Reports*, 2009, 42(5): 265-270.
- [38] GOPALAKRISHNAN A, XU C J, NAIR S S, et al. Modulation of activator protein-1 (AP-1) and MAPK pathway by flavonoids in human prostate cancer PC3 cells[J]. *Archives of Pharmacol Research*, 2006, 29(8): 633-634.
- [39] LEE K M, LEE K W, JUNG S K, et al. Kaempferol inhibits UVB-induced COX-2 expression by suppressing Src kinase activity[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2010, 80(12): 2 042-2 049.
- [40] DENG Shi-xin, PALU A K, WEST B J, et al. Lipoyxygenase inhibitory constituents of the fruits of noni (*Morindacitrifolia*) collected in Tahiti[J]. *Journal of Natural Products*, 2007, 70 (5): 859-862.
- [41] GARCIA M V, CRESPO I, COLLADO P S, et al. The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells[J]. *Pharmacology Reports*, 2007, 557(2/3): 221-229.
- [42] LI Jia-min, ZHANG Bing-feng. Apigenin protects ovalbumin-induced asthma through the regulation of Th17 cells[J]. *Fitoterapia*, 2013, 91: 298-304.
- [43] WANG J, LIU Y T, XIAO L, et al. Anti-inflammatory effects of apigenin in lipopolysaccharide-induced inflammatory in acute lung injury by suppressing COX-2 and NF-κB pathway[J]. *Inflammation*, 2014, 37: 2 085-2 090.
- [44] HORVATHOVA K, NOVOTNY L, TOTHOVA D, et al. Determination of free radical scavenging activity of quercetin, rutin, luteolin and apigenin in H₂O₂-treated human ML cells K562[J]. *Neoplasma*, 2004, 51: 395-399.
- [45] CHENG A C, HUANG T C, LAI C S, et al. Induction of apoptosis by luteolin through cleavage of Bcl-2 family in human leukemia HL-60 cells[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2005, 509(1): 1-10.
- [46] OISHI M, LIZUMI Y, TANIGUCHI T, et al. Apigenin sensitizes prostate cancer cells to Apo2L/TRAIL by targeting Adenine Nucleotide Translocase-2[J]. *Plos*, 2013, 8(2): 1-9.
- [47] CUI Y, MORGENSTERN H, GREENLAND S, et al. Dietary flavonoid intake and lung cancer-A population-based case-control study[J]. *Cancer*, 2008, 112: 2 241-2 248.
- [48] GARCIA C R, GONZALEZ C A, AGUDO A, et al. Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of gastric cancer in Spain[J]. *Cancer Causes and Control*, 1999, 10(1): 71-75.
- [49] UTE N, SUZANNE P M, LYNNE R W, et al. Flavonols and pancreatic cancer risk: the multiethnic cohort study[J]. *American Journal of Epidemiology*, 2007, 166(8): 924-931.
- [50] GATES M A, TWOROGER S S, HECHT J L, et al. A prospective study of dietary flavonoid intake and incidence of epithelial ovarian cancer [J]. *International Journal of Cancer*, 2007, 121(10): 2 225-2 232.
- [51] KIM Y K, KIM Y S, CHOI S U, et al. Isolation of flavonol rhamnosides from *Loranthus tanakae* and cytotoxic effect of them on human tumor cell lines[J]. *Archives of Pharmacol Research*, 2004, 27(1): 44-47.
- [52] BRUSSELMANS K, VROLIX R, VERHOEVEN G, et al. Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(7): 5 636-5 645.
- [53] LI Na, LIU Ji-hua, ZHANG Jian, et al. Comparative Evaluation of Cytotoxicity and Antioxidative Activity of 20 Flavonoids[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(10): 3 876-3 883.
- [54] ZHANG Qiang, ZHAO Xin-huai, WANG Zhu-jun. Flavones and flavonols exert cytotoxic effects on a human oesophageal adenocarcinoma cell line (OE33) by causing G2/M arrest and inducing apoptosis[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2008, 46(6): 2 042-2 053.
- [55] LUO Hai-tao, JIANG Bing-hua, KING S M, et al. Inhibition of cell growth and VEGF expression in ovarian cancer cells by flavonoids[J]. *Nutrition and Cancer*, 2008, 60(6): 800-809.
- [56] KIM J M, LEE E K, KIM D H, et al. Kaempferol modulates pro-inflammatory NF-kappaB activation by suppressing advanced glycationendproducts-induced NADPH oxidase[J]. *Age (Dordr.)*, 2010, 32: 197-208.
- [57] ZHANG Yu-qing, CHEN A Y, LI Min, et al. Ginkgo biloba extract kaempferol inhibits cell proliferation and induces apoptosis in pancreatic cancer cells[J]. *Journal of Surgical Research*, 2008, 148(1): 17-23.
- [58] NADOVA S, MIADOKOVA E, CIPA K L. Flavonoids potentiate the efficacy of cytarabine through modulation of drug-induced apoptosis[J]. *Neoplasma*, 2007, 54: 202-206.

- [59] SHARMA V, JOSEPH C, GHOSH S, et al. Kaempferol induces apoptosis in glioblastoma cells through oxidative stress [J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2007, 6(9): 2 544-2 553.
- [60] IMAI Y, TSUKAHARA S, ASADA S, et al. Phytoestrogens/ flavonoids reverse breast cancer resistance protein/ABCG2-mediated multidrug resistance [J]. *Cancer Research*, 2004, 64 (12): 4 346-4 352.
- [61] LII C K, LEI Y P, YAO H T, et al. Chrysanthemum morifolium Ramat. reduces the oxidized LDL-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 and E-selectin in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2010, 128(1): 213-220.
- [62] OLSZANECKI R, BUJAK G B, MADEJ J, et al. Kaempferol, but not resveratrol inhibits angiotensin converting enzyme [J]. *Physiological Pharmacology*, 2008, 59(2): 387-392.
- [63] XU Y C, LEUNG G P, WONG P Y, et al. Kaempferol stimulates large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} (BKCa) channels in human umbilical vein endothelial cells via a cAMP/PKA-dependent pathway [J]. *British Journal of Pharmacology*, 2008, 154(6): 1 247-1 253.
- [64] HANNUM S M. Potential impact of strawberries on human health: a review of the science [J]. *Food Science and Nutrition*, 2004, 44(1): 1-17.
- [65] LOPEZ S C, MARTIN R F J, SUN F, et al. Blood micromolar concentrations of kaempferol afford protection against ischemia/reperfusion-induced damage in rat brain [J]. *Brain Research*, 2007, 1 182(28): 123-137.
- [66] SILVA B, OLIVEIRA P J, DIAS A, et al. Quercetin, kaempferol and biapigenin from *Hypericum perforatum* are neuroprotective against excitotoxic insults [J]. *Neurotoxicity Research*, 2008, 13(3/4): 265-79.
- [67] SHARMA V, MISHRA M, GHOSH S, et al. Modulation of interleukin-1 β mediated inflammatory response in human astrocytes by flavonoids: implications in neuroprotection [J]. *Brain Research Bulletin*, 2007, 73(1/2/3): 55-63.
- [68] TRIVEDI R, KUMAR A, GUPTA V, et al. Effects of Egb 761 on bone mineral density, bone microstructure, and osteoblast function: Possible roles of quercetin and kaempferol [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2009, 302(1): 86-91.
- [69] KUMAR A, SINGH A K, GAUTAM A K, et al. Identification of kaempferol-regulated proteins in rat calvarial osteoblasts during mineralization by proteomics [J]. *Proteomics*, 2010, 10(9): 1 730-1 739.
- [70] TRIVEDI R, KUMAR S, KUMAR A, et al. Kaempferol has osteogenic effect in ovariectomized adult Sprague-Dawley rats [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2008, 289(1/2): 85-93.
- [71] PARK J A, HA S K, KANG T H, et al. Protective effect of apigenin on ovariectomy-induced bone loss in rats [J]. *Life Sciences*, 2008, 82(25/26): 1 217-1 223.
- [72] GOTO T, HAGIWARA K, SHIRAI N, et al. Apigenin inhibits osteoblastogenesis and osteoclastogenesis and prevents bone loss in ovariectomized mice [J]. *Cytotechnology*, 2015, 67 (2): 357-365.
- [73] LIM Y H, KIM I H, SEO J J. In vitro activity of kaempferol isolated from the *Impatiens balsamina* alone and in combination with erythromycin or clindamycin against *Propionibacterium acnes* [J]. *Microbiol.*, 2007, 45(5): 473-477.
- [74] LYU S Y, RHIM J Y, PARK W B. Antiherpetic activities of flavonoids against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) in vitro [J]. *Archives of Pharmacal Research*, 2005, 28(11): 1 293-1 301.
- [75] MITROCOTSA D, MITAKU S, AXARLIS S, et al. Evaluation of the antiviral activity of kaempferol and its glycosides against human cytomegalovirus [J]. *Planta Med.*, 2000, 66: 377-379.
- [76] JEONG H J, RYU Y B, PARK S J, et al. Neuraminidase inhibitory activities of flavonols isolated from *Rhodiolarosea* roots and their in vitro anti-influenza viral activities [J]. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2009, 17(19): 6 816-6 823.
- [77] MIN B S, TOMIYAMA M, MA Chao-mei, et al. Kaempferol acetylramnosides from the rhizome of *Dryopteris crassirhizoma* and their inhibitory effects on three different activities of human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase [J]. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2001, 49(5): 546-550.
- [78] CHUNG J G, HSIA T C, KUO H M, et al. Inhibitory actions of luteolin on the growth and arylamine N-acetyltransferase activity in strains of *Helicobacter pylori* from ulcer patients [J]. *Toxicology in Vitro*, 2001, 15(3): 191-198.
- [79] TSHIKALANGE T E, MEYER J J, HUSSEIN A A. Antimicrobial activity, toxicity and the isolation of a bioactive compound from plants used to treat sexually transmitted diseases [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, 96(3): 515-519.
- [80] MARINA P D C, VALDIR C F, ROSI Z D S, et al. Evaluation of antifungal activity of *Piper solmsianum* C. DC. var. *solmsianum* (Piperaceae) [J]. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2005, 28(8): 1 527-1 530.
- [81] LEE E J, JI G E, SUNG M K. Quercetin and kaempferol suppress immunoglobulin E-mediated allergic inflammation in RBL-2H3 and Caco-2 cells [J]. *Inflammation Research*, 2010, 59(10): 847-854.
- [82] HENDRIKS J J, ALBLAS J, VAN der Po S M, et al. Flavonoids influence monocytic GTPase activity and are protective in experimental allergic encephalitis [J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 2004, 214(6): 1 667-1 672.
- [83] ALI F, NAZ F, JYOTI S, et al. Protective effect of apigenin against N-nitrosodiethylamine (NDEA)-induced hepatotoxicity in albino rats [J]. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2014, 767: 13-20.
- [84] HIDALGO M, SÁNCHEZ-MORENO C, PASCUAL-TERESA S D. Flavonoid-flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity [J]. *Food Chemistry*, 2010, 121(3): 691-696.
- [85] HARASSTANI O A, MOIN S, THAM C L, et al. Flavonoid combinations cause synergistic inhibition of proinflammatory mediator secretion from lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 cells [J]. *Inflamm Res*, 2010, 59(9): 711-721.