

张牧原,李 军,黄 佳,等. 南湖菱壳中五没食子酰葡萄糖提取工艺及其抗肿瘤活性研究[J]. 江苏农业科学,2021,49(5):173-179.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.05.032

南湖菱壳中五没食子酰葡萄糖提取工艺及其抗肿瘤活性研究

张牧原¹, 李 军², 黄 佳¹, 吴霁蓂¹, 蒋 琦¹, 高广春¹

(1. 嘉兴学院医学院, 浙江嘉兴 314001; 2. 嘉兴职业技术学院现代农业学院, 浙江嘉兴 314036)

摘要:为明确菱壳中五没食子酰葡萄糖的最佳提取工艺条件,在单因素试验的基础上采用响应面法,以提取率为评价指标研究提取工艺,并采用 CCK8 法对最优单因素和最佳提取工艺条件下的提取物进行了抗 SK-BR-3 肿瘤细胞增殖的研究。结果表明,影响提取率的因素依次为提取温度>乙醇浓度>超声时间,乙醇浓度和提取温度的交互作用最强,对提取率的影响最为显著;最佳的提取工艺为料液比 1 g:20 mL,乙醇浓度 67%,提取温度 80℃,超声时间 10 min,预测提取率为 0.674 2%,实际提取率为 0.675 5%,结果相符。各部分提取物对 SK-BR-3 乳腺癌细胞增殖具有显著的抑制作用,并且呈现一定的时间和浓度依赖性。在浓度为 100 μg/mL 时,各部分提取物对受试细胞具有极显著的抑制增殖作用($P<0.01$)。

关键词:响应面法;南湖菱壳;五没食子酰葡萄糖;抗肿瘤活性

中图分类号:TS201.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2021)05-0173-07

南湖菱(*Trapa acornis* Nakano)为菱科一年生水生草本植物,又称青菱、馄饨菱、元宝菱,主要生长在嘉兴南湖水域,是嘉兴的一种特色农产品。菱壳是菱角的非食用部分,资料显示南湖菱壳在民间食疗偏方里可用于治疗生殖系统和消化系统肿瘤^[1],药理研究表明菱壳提取物具有抗肿瘤、保肝护肝、抗氧化和降血糖的功效^[2-4]。本项目组在前期研究中对嘉兴本地的菱壳化学成分进行了 HPLC 和 UPLC-MS 分析鉴定,发现其乙醇水提取物中含有没食子酸、1,3,6-三没食子酰葡萄糖、1,2,3,6-四没食子酰葡萄糖、1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖类化合物(pentagalloylglucose, PGG)。没食子酸和没食子酰葡萄糖类化学成分是一类重要的多酚类化合物,这类化合物有很强的生理活性,如抗肿瘤、抗氧化、抗病毒、抑菌、抗过敏、降血糖等功能^[5-8]。由此推断菱壳临床疗效的化学物质基础为没食子酸

及没食子酰葡萄糖类多酚成分。随着 PGG 丰富的药理学活性被发现,其生物来源和制备方法的研究也越来越多,据报道其存在于多种植物的根、茎、叶、种子和果实等部位^[5,9-12],但未见其在菱科植物中的报道。菱壳作为菱角果实的废弃物,提取原料成本廉价,如果能利用其作为原料提取 PGG,将大大提高菱角的经济价值,也有助于缓解中药资源的短缺。本项目组一直以来从事菱壳多酚提取制备工艺和抗肿瘤活性的研究,在前期研究的基础上本研究将采用超声辅助提取南湖菱壳中的多酚类化学成分,以 PGG 的提取率作为评价指标通过响应面法优化其提取工艺,并利用 CCK8 法测定提取物对 HER2 阳性乳腺癌细胞 SK-BR-3 的细胞毒活性。本研究为南湖菱资源的综合开发利用提供理论基础,也为菱壳多酚药用价值的开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2018 年 10 月于嘉兴采收南湖菱,新鲜剥取菱壳后清洗干净,于阴凉处晾干后粉碎过 60 目筛备用。1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖对照品(纯度≥98%)购于上海雅吉生物科技有限公司。色谱甲醇、无水乙醇、乙酸、蒸馏水购于华东医药有限公司。SK-BR-3 人乳腺癌细胞购于上海锐赛生物技术有限公司。DMEM 培养基、CCK8 检测试剂盒

收稿日期:2020-06-05

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金(编号:81703667);国家大学生创新创业训练项目(编号:201810354034);嘉兴学院大学生创新能力个性化培养项目;浙江省嘉兴市科技计划(编号:2020AY10023);2020 年浙江省新苗人才计划。

作者简介:张牧原(1997—),男,河南信阳人,从事菱壳资源的综合利用研究。E-mail:849792833@qq.com。

通信作者:高广春,博士研究生,副教授,主要从事天然药物功能性成分的研究。E-mail:gaogcjx@163.com。

(Dojindo, CK04) 购于上海复申生物科技有限公司。试验于 2019 年 9 月至 2019 年 12 月在嘉兴学院医学实验中心完成。

1.2 试验仪器与设备

细胞培养箱(赛默飞世尔科技), Agilent1200 高效液相色谱仪(杭州瑞析科技有限公司), 色谱柱 Eclipse XDB-C₁₈ (250 nm × 4.6 mm, 5 μm 上海楚定分析仪器有限公司), Thermo MuLTiSKAN MK3 酶标仪(上海智岩科学仪器有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 南湖菱壳多酚的提取

1.3.1.1 供试样品的制备 精确称取 0.5 g 菱壳粉末, 按单因素及响应面设计的条件进行超声提取。将提取液过滤后离心 20 min, 准确移取上清液 1 mL, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后得菱壳多酚提取液。

1.3.1.2 单因素试验设计 精确称取 0.5 g 样品于具塞三角烧瓶中, 选取不同的乙醇浓度(10%、30%、50%、70%、90%), 不同的浸提温度(40、50、60、70、80 ℃), 不同的超声时间(10、15、20、25、30 min), 不同的料液比(1 g:10 mL、1 g:15 mL、1 g:20 mL、1 g:25 mL、1 g:30 mL) 等因素浸提菱壳中的多酚类物质, 分析不同的因素对提取菱壳多酚类成分的影响。每处理设 3 次重复。

1.3.1.3 响应面法优化 PGG 提取工艺 依据单因素试验结果, 设计 3 因素 3 水平的响应面试验, 确定 PGG 最佳提取工艺条件。

1.3.2 HPLC 法测定 PGG 的提取率

1.3.2.1 高效液相色谱条件 检测波长 280 nm, 流速 1 mL/min, 柱温 30 ℃, 进样量 5 μL。流动相 A 为甲醇, 流动相 B 为乙酸水溶液; 梯度洗脱: 0 ~ 5 min, 12% ~ 20% A; 5 ~ 15 min, 20% A; 15 ~ 25 min, 20% ~ 70% A; 25 ~ 30 min, 70% A。

1.3.2.2 标准曲线的建立 精确称取 PGG 标准品 8 mg, 置于 25 mL 容量瓶中, 甲醇溶解定容, 振荡摇匀, 得标准品贮备液。分别移取一定量的储备液于另一 10 mL 容量瓶中, 甲醇定容, 振荡摇匀后, 得质量浓度为 12.5、25.0、50.0、100.0、200.0、400.0 μg/mL 的五没食子酰葡萄糖标准溶液, 过 0.45 μm 微孔滤膜除去杂质微粒后注入 1.5 mL 进样瓶中依次编号, 在 280 nm 处测定吸收峰, 平行测定 3 次。以峰面积为纵坐标, 进样质量浓度为横坐标绘制标准曲线, 得回归方程 $y = 13.283x - 122.6$

($r^2 = 0.9993$), 五没食子酰葡萄糖(12.5 ~ 400.0 μg/mL) 与峰面积的线性关系良好。

1.3.2.3 供试样品 PGG 提取率的测定 将供试样品按照色谱条件进行色谱分析, 每样品平行测定 3 次, 记录峰面积, 用峰面积和线性回归方程计算得 PGG 提取率。

$$y(\text{五没食子酰葡萄糖}) = 13.283x - 122.6;$$

$$\text{提取率}(\%) = C \times V/w \times 10^6.$$

式中: y 为峰面积, x 、 C 为多酚含量(μg/mL), V 为溶液体积(mL), w 为南湖菱壳粉末的质量(g)。

根据单因素试验中 PGG 提取率确定响应面法试验适当的因素和水平。

1.3.3 细胞毒活性测定 采用 CCK-8 法测定 4 个最优单因素提取条件和最佳提取工艺条件下得到的提取物。对 4 个样品进行编号: 最优乙醇浓度提取物(A), 最优超声时间提取物(B), 最优提取温度提取物(C), 最优料液比提取条件(D) 和最佳提取工艺条件(E)。取处于对数生长期的细胞以每孔 1.0×10^4 个接种于 96 孔板内, 置于 37 ℃ 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。待细胞充分贴壁后, 分别加入不同浓度的菱壳多酚(25、50、100、200、400、800 μg/mL) 的提取物, 阳性对照为顺铂, 每组设 3 个平行空。药物处理 24、48、72 h 后, 每孔加入 10 μL CCK8, 混匀后培养箱中孵育 1 h, 测定 450 nm 处吸光度。细胞增殖抑制率 = $1 - \text{药物组}(D)/\text{阴性对照组}(D) \times 100\%$ 。

1.3.4 数据分析 采用 DesignExpert 8.0.6 软件, 利用响应面设计分析方法进行线性回归和二项拟合, 确定最佳提取工艺条件。细胞毒活性测定试验数据应用 GraphPad Prism 5.0 进行统计处理。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 乙醇浓度对 PGG 提取率的影响 由图 1-A 所示, 菱壳中 PGG 提取率随乙醇浓度的不断增大呈现出先升高再降低的趋势, 在乙醇浓度达到 70% 时, PGG 提取率达到峰值。原因可能为低浓度乙醇溶液对菱壳中的水溶性成分如糖类、氨基酸、蛋白质及苷类等物质的提取效果更好。随着乙醇溶液浓度的升高, 其极性逐渐减弱, 多酚类物质的溶解度随之升高; 但浓度较大时, 其对极性较低的化学成分提取效果更优, 所得总提取物中多酚类物质含量降低。因此, 选择 50%、70%、90% 等 3 个乙醇浓度进行响应面法试验。

2.1.2 超声时间对 PGG 提取率的影响 由图 1 - B 可知,菱壳中 PGG 的提取率随超声时间的不断延长呈现出先升高再降低的趋势,在超声时间达到 15 min 时,PGG 的提取率达到峰值。超声时间过长时,可能其他物质的提取率增加使得总提取物中 PGG 含量下降,因此选择 10、15、20min 等 3 个超声时间进行响应面法试验。

2.1.3 提取温度对 PGG 提取率的影响 由图 1 - C 可知,菱壳中 PGG 的提取率随提取温度的不断升高而不断升高,提取温度达到 70 ℃ 时达到峰值,随

着温度继续升高提取率趋于平缓,因此选择 60、70、80 ℃ 等 3 个温度进行响应面法试验。

2.1.4 料液比对 PGG 提取率的影响 由图 1 - D 可知,菱壳中 PGG 的提取率随料液比的不断增大呈现出先快速升高然后减缓的趋势。当料液比为 1 g : 20 mL 时,提取率较高,继续增大料液比提取率上升不明显,考虑到实际生产时料液比增大会导致后期浓缩能耗耗时从而降低效率,故选择料液比 1 g : 20 mL 作为响应面法试验的最佳工艺条件。

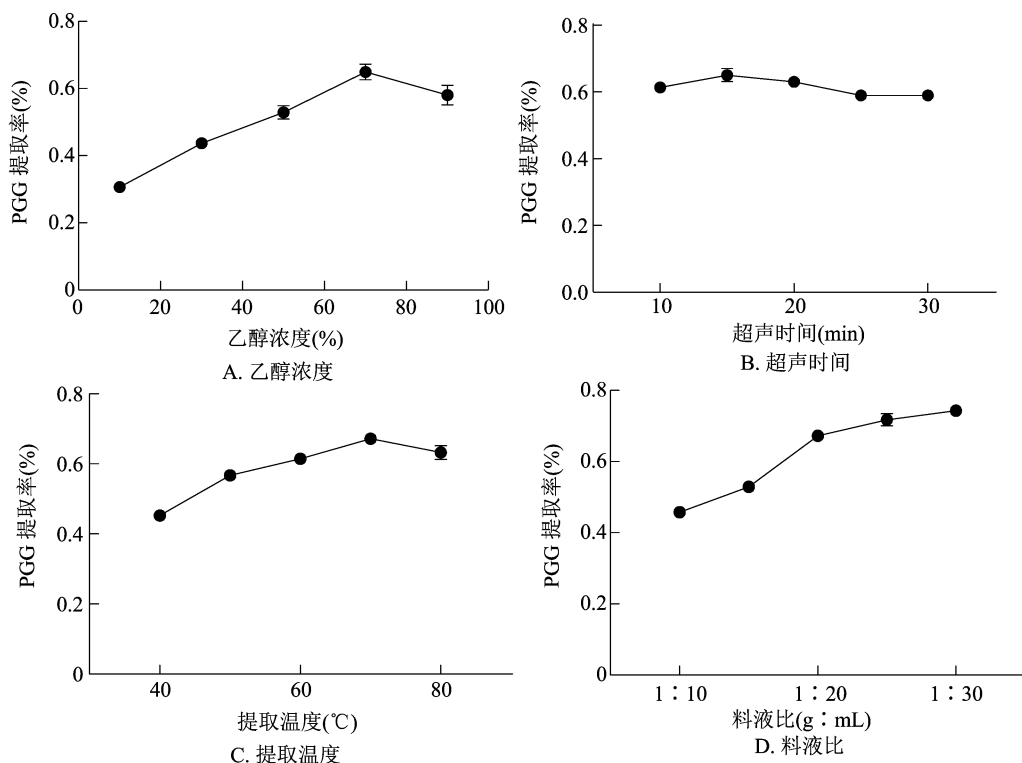


图1 4种因素对菱壳中 PGG 提取率的影响

2.2 响应面法优化菱壳中 PGG 的提取工艺

2.2.1 因素水平表 根据单因素试验结果,选取乙醇浓度(X_1)、浸提温度(X_2)、超声时间(X_3) 3 个因素作为自变量,确定出响应面试验的 3 因素 3 水平条件(表 1)。

表 1 响应面法实验因素水平

水平	提取温度 (℃)	乙醇体积分数 (%)	超声时间 (min)
-1	60	50	10
0	70	70	15
1	80	90	20

2.2.2 响应面实验设计和结果 响应面法试验方案和结果见表 2。试验数据实际测得值与拟合方程

预测数值大部分都很接近,个别有所差别,但差别不大,均在误差范围内。

2.2.3 响应面法的模型评价及分析 使用 Design - Expert 软件对表 2 数据进行二次多项式逐项回归模拟,可得到数学模型 $Y = 0.63 - 0.029A + 0.038B + 0.0031C + 0.029AB + 0.019AC - 0.00365BC - 0.063A^2 - 0.003713B^2 + 0.009863C^2$ 。式中: Y 为 PGG 提取率, A 为乙醇浓度, B 为提取温度, C 为超声时间, $P = 0.0001$,失拟项为 0.064, $R^2 = 0.9736$ 。数学模型的方差分析和各项式系数显著性分析结果见表 3。从表 3 可知,回归方程方差分析多项式回归方程中的 $P = 0.0001 < 0.05$,回归方程模型较为可靠;失拟项为 0.064 > 0.05 ,失拟不显著;方程

表 2 响应面试验设计和结果

编号	提取温度 (℃)	乙醇浓度 (%)	超声时间 (min)	PGG 提取率(%)	
				试验值	预测值
1	-1	0	-1	0.617 ± 0.021	0.62
2	0	1	1	0.676 ± 0.013	0.67
3	0	0	0	0.635 ± 0.026	0.63
4	1	-1	0	0.479 ± 0.014	0.47
5	1	0	-1	0.517 ± 0.009	0.52
6	0	0	0	0.625 ± 0.020	0.63
7	1	1	0	0.593 ± 0.033	0.60
8	-1	0	1	0.597 ± 0.024	0.59
9	1	0	1	0.571 ± 0.017	0.57
10	0	0	0	0.629 ± 0.010	0.63
11	-1	-1	0	0.588 ± 0.010	0.58
12	0	0	0	0.622 ± 0.019	0.63
13	0	-1	1	0.589 ± 0.006	0.60
14	0	1	-1	0.688 ± 0.017	0.67
15	0	-1	-1	0.586 ± 0.020	0.59
16	-1	1	0	0.588 ± 0.018	0.60
17	0	0	0	0.632 ± 0.021	0.63

的拟合相关系数 $R^2 = 0.973\ 6 > 0.9$, 表示估计值和预测值之间的匹配度较高。在选取的因素水平范围内, 比较各因素的 F 值, $A = 0.003$, $B < 0.000\ 1$, $C = 0.503\ 3$, 可知各因素对试验结果的影响大小顺序为 B (提取温度) $> A$ (乙醇浓度) $> C$ (超声时间)。方差分析结果表明, 方程的模型对 PGG 的提取率影响极显著 ($P < 0.01$)。

图 2 - A 的响应面曲线最为陡峭, 反映出乙醇浓度和提取温度的交互作用对 PGG 提取率的影响极为显著, 当乙醇浓度和提取温度适当增加时, PGG 的提取率增加且有稳定的最大值, 因此, 适当增加乙醇浓度和升高浸提温度有助于提高 PGG 的提取率。图 2 - C 的响应面曲线较为陡峭, 乙醇浓度和超声时间的交互作用对 PGG 提取率的影响显著, 当超声时间一定时, 适当增加乙醇浓度, PGG 的提取率随之升高, 继续增加乙醇浓度, 其提取率增加趋势逐渐变缓甚至略有下降。图 2 - E 的响应面曲线平缓, 表明提取温度和超声时间的交互作用对 PGG 提取率的影响不显著。由图 2 - B、图 2 - D、图 2 - F

表 3 回归模型各项方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.040	9	4.431×10^{-3}	28.68	0.000 1
A	6.653×10^{-3}	1	6.653×10^{-3}	43.06	0.000 3
B	0.011	1	0.011	74.14	$< 0.000\ 1$
C	7.688×10^{-5}	1	7.688×10^{-5}	0.50	0.503 3
AB	3.266×10^{-3}	1	3.266×10^{-3}	21.14	0.002 5
AC	1.399×10^{-3}	1	1.399×10^{-3}	9.05	0.019 7
BC	5.329×10^{-5}	1	5.329×10^{-5}	0.34	0.575 4
A^2	0.017	1	0.017	107.53	$< 0.000\ 1$
B^2	5.803×10^{-5}	1	5.803×10^{-5}	0.38	0.559 3
C^2	4.096×10^{-4}	1	4.096×10^{-4}	2.65	0.147 5
残差	1.081×10^{-3}	7	1.545×10^{-4}		
缺失项	9.785×10^{-4}	3	3.262×10^{-4}	122.67	0.064
纯误差	1.030×10^{-4}	4	2.574×10^{-5}		
总和	0.041	16			

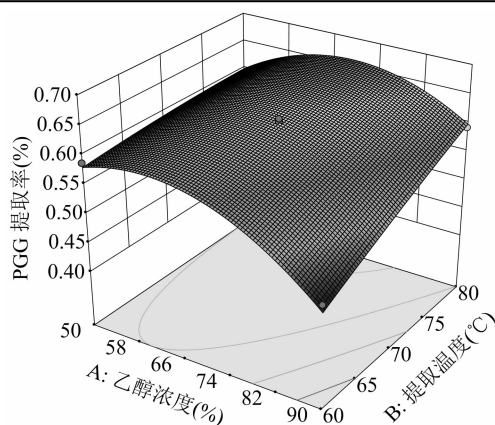
可知, 乙醇浓度和提取温度的交互作用等高线为椭圆形, 表明交互作用最强, 对 PGG 的提取率影响极为显著; 乙醇浓度和超声时间的交互作用等高线为椭圆形, 表明交互作用较强, 对 PGG 的提取率影响显著; 提取温度与超声时间的交互作用等高线没有明显的呈现椭圆形, 更接近圆形, 表明交互作用不强, 对 PGG 的提取率影响不显著。

通过最优化分析得到最佳提取条件为提取温度 80 ℃, 乙醇浓度 67%, 超声时间 10 min, 预测

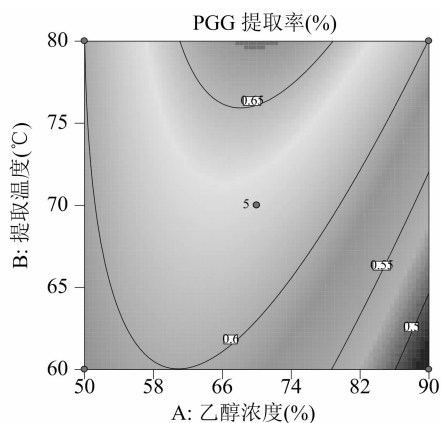
PGG 提取率为 0.674 2%。为检验结果的可靠性, 本研究采用最佳提取工艺条件重复试验 3 次, 结果显示 PGG 提取率 0.681 2%、0.680 1%、0.665 4%, 平均提取率为 0.675 5%。综上所述, 实际试验结果和回归模型的预测值基本吻合, 表明回归模型能够准确的模拟和预测 PGG 提取率。

2.3 菱壳多酚对人源 HER2 肿瘤细胞株 SK - BR - 3 的细胞毒作用

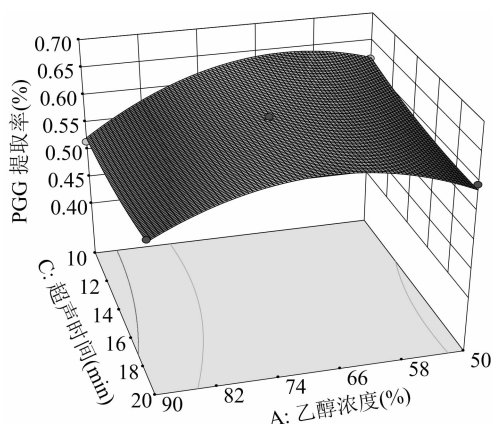
提取物 A ~ E 对人源 HER2 肿瘤细胞株 SK -



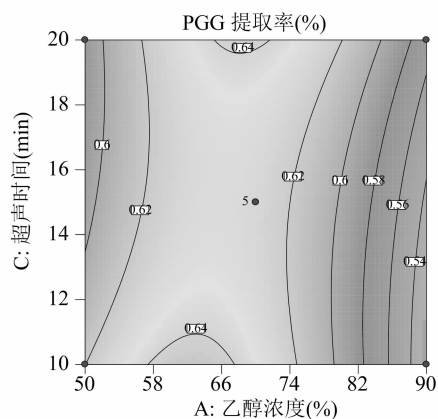
A. 乙醇浓度与提取温度交互作用对 PGG 提取率影响的响应面



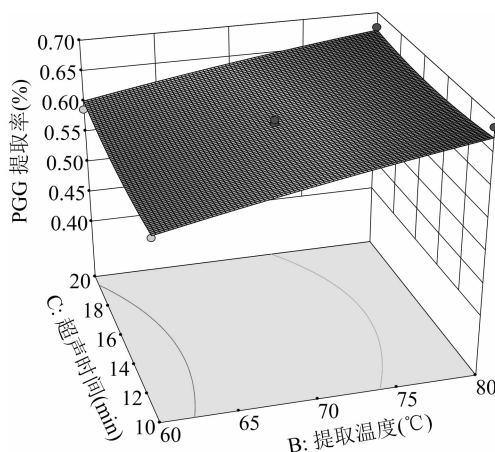
B. 乙醇浓度与提取温度交互作用对 PGG 提取率影响的等高线



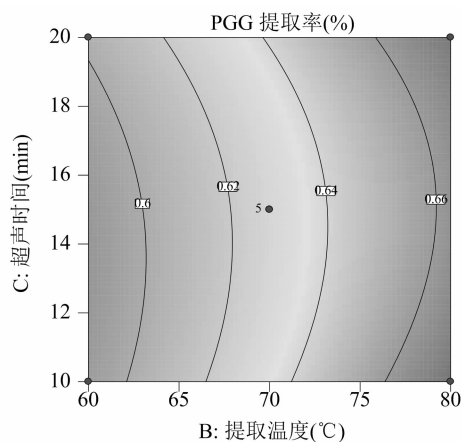
C. 乙醇浓度与超声时间交互作用对 PGG 提取率影响的响应面



D. 乙醇浓度与超声时间交互作用对 PGG 提取率影响的等高线



E. 提取温度与超声时间交互作用对 PGG 提取率影响的响应面

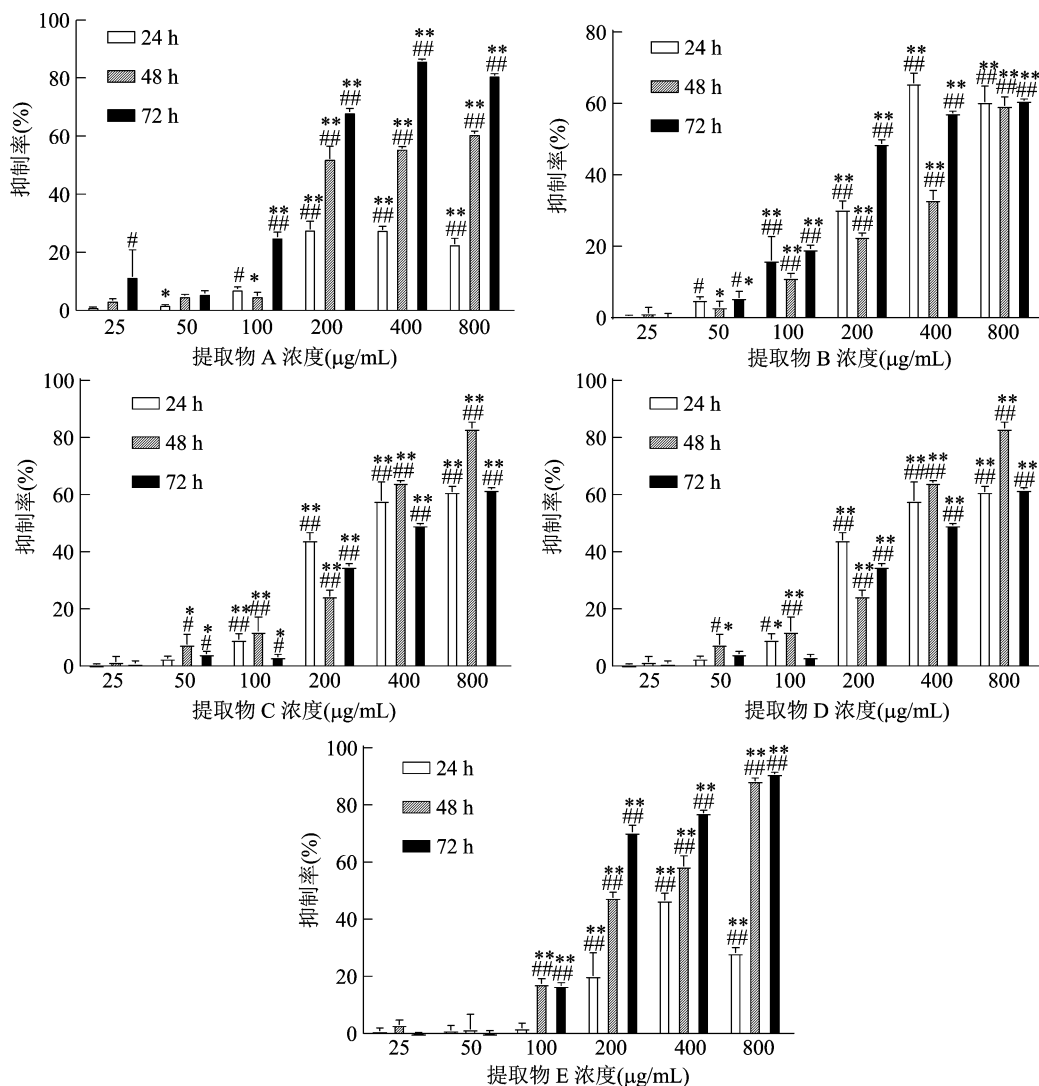


F. 提取温度与超声时间交互作用对 PGG 提取率影响的等高线

图2 因素间的交互作用对 PGG 提取率的影响

BR-3 的抑制作用见图 3, 结果显示各提取物均能不同程度地抑制 SK-BR-3 肿瘤细胞株的增殖, 抑制效果呈时间和浓度依赖性。与对照组相比, 各提取物在 25 $\mu\text{g/mL}$ 时抑制效果不明显, 50 $\mu\text{g/mL}$ 时提取物 B、C、D 表现显著的抑制作用 ($P < 0.05$), 随

着浓度的增加提取物 A~E 均表现出极显著的抑制作用 ($P < 0.01$)。同时随着处理时间的延长, 各提取物对肿瘤细胞生长的抑制率提高 ($P < 0.01$)。因此菱壳多酚提取物对人源 HER2 肿瘤细胞 SK-BR-3 的增殖具有抑制作用。



*, ** 表示与 24 h 处理相比分别在 0.05、0.01 水平差异显著;
#, ## 表示与 25 μg/mL 处理相比分别在 0.05、0.01 水平差异显著

图3 提取物 A~E 对 SK-BR-3 乳腺癌细胞株的细胞毒性

3 结论与讨论

响应面法优化提取工艺条件具有精密度高和效果预测准确等优点,是目前国内外研究中常用的方法^[13-16]。本研究在单因素试验的基础上,结合 HPLC 和响应面法确定了南湖菱壳中 PGG 的提取工艺,建立了相关性良好的拟合回归方程。由方差分析可知模型的 $P=0.0001 < 0.01$,试验所采用的二次模型显著性较强,是有意义的模型。乙醇浓度、提取温度的 P 值均小于 0.05,对提取率的影响较为显著,其中提取温度对 PGG 的提取率影响最大,乙醇浓度次之,超声时间有一定的影响。而交互项乙醇浓度和提取温度(AB)对 PGG 提取率的影响达极显著水平,乙醇浓度和超声时间(AC)对 PGG 提取

率的影响达显著水平,提取温度和超声时间(BC)对 PGG 提取率的影响不显著。最终确定最佳的提取工艺为料液比 1 g : 20 mL,乙醇浓度 67%,提取温度 80 ℃,超声时间 10 min,PGG 提取率为 0.674 2%。菱壳提取物的细胞毒活性测定结果发现,在不同条件下制备得到的提取物对人源 HER2 阳性乳腺癌细胞增殖具有显著的抑制作用,并且呈现一定的时间和浓度依赖性。在浓度为 100 μg/mL 时各部分提取物具有极显著的抑制作用($P < 0.01$)。

植物多酚类成分对人类健康具有重要的意义,功能性食品和保健品越来越受到消费者的青睐,因此对功能性食品及其添加剂的研发也如火如荼。PGG 是多酚类物质中具有很好市场应用前景的化合物^[5],其生物和化学合成、提取制备工艺、功能特

性、稳定性和毒性等一直是研究的热点。菱壳是菱角的废弃物,从中获取植物多酚和 PGG 具有很好的经济效益和社会效益。HER2 型乳腺癌在临床上约占 20% ~ 30%,虽然比例不是最高,但由于 HER2 原癌基因的多拷贝的性质使得该型肿瘤有生存率低、恶性程度高、病情发展迅速、易复发(15% ~ 24%)和临床预后较差的特点,因此被称为“最危险的乳腺癌”^[17]。现阶段治疗 HER2 阳性乳腺癌最有效的是使用单克隆抗体联合放化疗,但单克隆抗体价格较昂贵,在我国大部分地区很难常规治疗,而且许多患者还会发生复发、转移、不良反应大、药物耐药性等诸多问题^[18-19]。植物提取物具有多靶点、整体性的作用特点,在肿瘤的预防和辅助治疗方面也有较多的报道^[20-21]。因此研究开发菱壳多酚的提取制备工艺和抗肿瘤活性对于菱角资源的综合利用具有重要的指导意义。

参考文献:

- [1] 黄俊英. 发现菱角壳[N]. 观察与思考,2003-09-15.
- [2] Xie Y R. Trapa extract induced apoptosis in liver cancer cell line SMMC-7721[J]. J Chin Oncol,2011(1):34-37.
- [3] 康文艺,李园园,黄 嫒. 南湖菱壳提取物在制备保肝护肝药物方面的应用:201110297267.8[P]. 2012-01-18.
- [4] Kang W Y, Li Y Y, Gu X Z, et al. Antioxidant activities, α -glucosidase inhibitory effect *in vitro* and antihyperglycemic of *Trapa acornis* shell in alloxan-induced diabetic rats[J]. J Med Plants Res,2011,5(31):6805-6812.
- [5] Bae S, Kim S Y, Do M H, et al. Pentagalloylglucose (PGG): a valuable phenolic compound with functional properties [J]. J Funct Foods,2017,37:176-189.
- [6] Bensaad L A, Kim K H, Quah C C, et al. Anti-inflammatory potential of ellagic acid, gallic acid and punicalagin A&B isolated from *Punica granatum* [J]. BMC Complementary and Alternative Medicine,2017,17(1):47.
- [7] Tsai C L, Chiu Y M, Ho T Y, et al. Gallic acid induces apoptosis in human gastric adenocarcinoma cells[J]. Anticancer Research,2018,38(4):2057-2067.
- [8] Lima V N, Oliveira - Tintino C D, Santos E S, et al. Antimicrobial and enhancement of the antibiotic activity by phenolic compounds: gallic acid, caffeic acid and pyrogallol[J]. Microbial Pathogenesis, 2016,99:56-61.
- [9] Ramakrishnan S, Dharmalingam K, Panchanatham S, et al. Efficacy of tridham and 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucose in reversing lipid peroxidation levels and mitochondrial antioxidant status in 7,12-dimethylbenzanthracene (DMBA) induced breast cancer in sprague-dawley rats[J]. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences,2016,8(9):288-292.
- [10] Yang L G, Yin P P, Li K, et al. Seasonal dynamics of constitutive levels of phenolic components lead to alterations of antioxidant capacities in *Acer truncatum* leaves [J]. Arabian Journal of Chemistry,2018,11(1):14-25.
- [11] Tian F, Li B, Ji B P, et al. Identification and structure-activity relationship of gallotannins separated from *Galla chinensis* [J]. LWT-Food Science and Technology,2009,42(7):1289-1295.
- [12] Kim J H, Ha W R, Park J H, et al. Influence of herbal combinations on the extraction efficiencies of chemical compounds from *Cinnamomum cassia*, *Paeonia lactiflora*, and *Glycyrrhiza uralensis*, the herbal components of Gyeji-tang, evaluated by HPLC method [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2016, 129:50-59.
- [13] Severini C, Dieross A, Fiore A G. Ultrasound-assisted extraction to improve the recovery of phenols and antioxidants from spent espresso coffee ground: a study by response surface methodology and desirability approach [J]. European Food Research and Technology,2017,243(5):835-847.
- [14] Oyekanni A A, Ahmad A, Hossain K, et al. Adsorption of rhodamine B dye from aqueous solution onto acid treated banana peel: response surface methodology, kinetics and isotherm studies [J]. PLoS One,2019,14(5):e0216878.
- [15] Amiri S, Shakeri A, Sohrabi M R, et al. Optimization of ultrasonic assisted extraction of fatty acids from *Aesculus hippocastanum* fruit by response surface methodology [J]. Food Chemistry, 2019, 271 (15):762-766.
- [16] 张丽霞,魏照辉,赵婉晴. 响应面优化超声波辅助酶法提取桑叶总黄酮的工艺[J]. 江苏农业科学,2019,47(13):217-221.
- [17] Harbeck N, Gnant M. Breast cancer [J]. Lancet, 2017, 389 (10074):18-24.
- [18] 李国政. HER2 阳性乳腺癌治疗的研究进展[J]. 实用肿瘤学杂志,2020,34(1):74-78.
- [19] 陈双双,于正洪. 中药治疗乳腺癌的研究近况[J]. 现代肿瘤医学,2015,23(14):2072-2077.
- [20] 雷巧灵,侯旭灿,贾聪敏,等. 基于实体语法系统研究中药治疗乳腺癌的分子调控网络[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2019,21(4):587-595.
- [21] Liu Z, Schwimer J, Liu D, et al. Gallic acid is partially responsible for the antiangiogenic activities of *Rubus* leaf extract [J]. Phytotherapy Research,2006,20(9):806-813.