

响应面法优化苦丁茶熊果酸提取工艺及其抑菌活性研究

张海全,钟晓坤,黄勤英,许丹妮,农克良*

广西民族师范学院 广西高校桂西南特色植物资源化学重点实验室培育基地,崇左 532200

摘要:为优化苦丁茶熊果酸的提取工艺,并探讨其抑菌活性。在单因素试验基础上,通过响应面分析法,研究了液料比、提取温度、乙醇浓度对苦丁茶熊果酸得率的影响。以金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、生孢梭菌、铜绿假单胞菌、大肠杆菌、白色念珠菌、黑曲霉为供试菌,探究了苦丁茶熊果酸的抑菌活性及最小抑菌浓度(Minimum inhibitory concentration, MIC)。结果表明,最优提取工艺为:液料比为 17:1 (mL/g)、乙醇浓度为 83%、提取温度 83 °C;抑菌实验表明,苦丁茶熊果酸对 7 种菌均有一定的抑制效果,对大肠杆菌、铜绿假单胞菌的 MIC 为 6.25 mg/mL,对生孢梭菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的 MIC 为 12.5 mg/mL,对白色念珠菌、黑曲霉的 MIC 为 25 mg/mL。

关键词:苦丁茶;响应面法;熊果酸;抑菌活性

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.11.021

Optimization of Extraction of Ursolic Acid from *Ilex kudingcha* C. J. Tseng by Response Surface Methodology and Its Antibacterial Activity

ZHANG Hai-quan, ZHONG Xiao-kun, HUANG Qin-ying, XU Dan-ni, NONG Ke-liang*

Guangxi Colleges and Universities Key Laboratory Breeding Base of Chemistry of Guangxi Southwest Plant Resources, Guangxi Normal University for Nationalities, Chongzuo 532200, China

Abstract: In order to optimize extraction of ursolic acid (UA) from *Ilex kudingcha* C. J. Tseng and investigate its antibacterial activity. Based on the results of single-factor tests, the ratio of liquid to solid, extraction temperature and ethanol concentration were optimized by response surface analysis. *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* were used as tested bacterial strains in this experiment to explore antibacterial activity of UA from *Ilex kudingcha* C. J. Tseng and its MIC. The results demonstrated that the process of optimum extraction were the ratio of liquid to solid of 17:1 (mL/g), ethanol concentration of 83%, extraction temperature of 83 °C. The antibacterial experiments showed that UA had a certain inhibition on 7 strains. The MIC was as following: 6.25 mg/mL to *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, 12.5 mg/mL to *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*, 25 mg/mL to *Candida albicans* and *Aspergillus niger*.

Key words: *Ilex kudingcha* C. J. Tseng; response surface methodology; ursolic acid; antibacterial activity

苦丁茶(*Ilex kudingcha* C. J. Tseng)为冬青科冬青属苦丁茶种的常绿乔木,其性味甘凉,含苦丁皂苷、多酚类、黄酮类、三萜类等多种成分^[1],能清热解毒,滋养肝肾。苦丁茶具有抗氧化、降血脂、抗衰老、抗癌等药理活性^[2-5]。熊果酸(ursolic acid)又叫乌索酸,为五环三萜类化合物,因具有显著的生物活性^[6-8]被应用于医药、美容等领域,均取得很好疗效。

随着熊果酸的广泛应用,其需求量不断增加,从天然产物提取分离熊果酸成为重要途径。研究发现,苦丁茶中的熊果酸含量高达 2.78%^[9],表明苦丁茶可作为熊果酸的重要原料。

研究表明,Liu等^[10]以β-环糊精分子印记微球为吸附剂,运用固相萃取法可以较好的分离苦丁茶中的熊果酸;超临界CO₂萃取工艺可从苦丁茶中提取熊果酸,萃取率为0.453%,熊果酸纯度为21.44%^[11];张明等^[12]利用纤维素酶酶解提取苦丁茶中的熊果酸,熊果酸提取率为1.26%;此外,微波及超声、大孔吸附树脂纯化等方法亦能从苦丁茶中提取分离熊果酸。现有方法有优点也有缺点,如工

收稿日期:2018-04-17 接受日期:2018-09-27

基金项目:广西民族师范学院科研经费资助项目(2016JX001);广西省教育厅2016年广西高校中青年教师基础能力提升项目(KY2016YB517);大学生创新创业项目(201710604044)

*通信作者 Tel:86-771-7870818;E-mail:nongkeliang@gxun.edu.cn

艺过程复杂,工艺条件难以控制,提取效率有待提高等,因此苦丁茶中熊果酸的提取分离工艺仍需进一步研究并优化。

响应面法具有试验次数少、精密度高、实验结果准确可靠、预测性好等优点,适合于多因素多水平的试验,较正交试验更简化,比均匀设计更全面,已被广泛用于药学领域的试验设计与优化工艺^[13-15]。在前人的研究基础上,本研究采用响应面法优化提取苦丁茶中的熊果酸,以大孔吸附树脂分离纯化熊果酸。苦丁茶熊果酸抑菌作用研究鲜有报道,故本研究将探讨苦丁茶熊果酸对金黄色葡萄球菌等7种致病菌的抑菌活性,以期为熊果酸及苦丁茶资源的综合利用提供可靠的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

苦丁茶购于崇左市湘君大药房,经广西民族大学农学院农克良教授鉴定为冬青科冬青属大叶冬青苦丁茶的干燥叶;熊果酸标准品(广州分析测试中心,纯度 $\geq 97.0\%$);香草醛(天津市光复精细化工研究所,分析纯);高氯酸(天津市鑫源化工有限公司,分析纯);金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、生孢梭菌、铜绿假单胞菌、大肠杆菌、白色念珠菌和黑曲霉(广西区食品药品检验所)。

UV-6100S 紫外可见分光光度计(上海元析仪器有限公司);小型中药粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司);OHAUS 电子天平(奥豪斯仪器有限公司);HH-S4 型数显恒温水浴锅(金坛市医疗仪器厂);GZX-GF101-1 BS 型电热恒温鼓风干燥箱、LRHS-250-11 型生化培养箱(上海跃进医疗器械有限公司);SG1200HE 超声波清洗器(上海冠特超声仪器有限公司);TOMY/S-500 型高压灭菌锅(日本TOMY公司);高效液相色谱,型号为 waters1525。

1.2 方法

1.2.1 熊果酸标准曲线的绘制

准确称取 0.0030 g 熊果酸标准品,用无水乙醇制备 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的熊果酸标准品原液。分别移取 0、50、100、150、200、250、300、350、400 μL 熊果酸标准品原液于 10 mL 的容量瓶中,各加入 0.2 mL 5% 的香草醛-冰醋酸溶和 0.8 mL 高氯酸,摇匀,于 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 15 min,冷却至室温,加冰醋酸定容至刻度。以不加熊果酸标准品为空白对照液,在 548 nm 测定吸光度。以熊果酸标准液的浓度为横坐标,吸

光度为纵坐标,绘制标准曲线,得到熊果酸标准曲线方程为: $Y = 0.0242X + 0.0078$ ($R^2 = 0.9971$),线性关系良好。

1.2.2 苦丁茶熊果酸供试液的制备及含量测定

苦丁茶粉碎过 80 目筛,称取 30 g 苦丁茶粉末,按一定的液料比加入一定浓度的乙醇,在一定的温度下提取一定时间,抽滤,滤液用 AB-8 大孔吸附树脂分离纯化熊果酸,操作条件为:上样浓度 0.8 ~ 1.2 mg/mL,上样流速 5 BV/h,上样体积 250 mL;洗脱时先以 30 mL 30% 乙醇除杂,再以 85% 乙醇溶液进行洗脱,洗脱剂用量 100 mL,洗脱流速 3 BV/h。熊果酸测定按 1.2.1 中的操作加入显色剂反应并测定吸光度值 A,代入熊果酸标准曲线方程计算得率。

$$\text{苦丁茶熊果酸得率}(\text{mg/g}) = \frac{(A - 0.0078) \times V \times N}{m}$$

其中:A 为稀释后提取液的吸光度;V 为提取液的体积,mL;N 为提取液稀释的倍数;m 为苦丁茶粉末的质量,g。

1.2.3 苦丁茶熊果酸的精制

将 AB-8 大孔吸附树脂分离得到的洗脱液减压浓缩至原体积的 1/3,冷却至室温,抽滤,滤渣用适量 85% 的热乙醇溶解,减压浓缩至原体积的 1/3,冷却至室温,抽滤所得滤渣用冷的 85% 乙醇淋洗,干燥得到精制的苦丁茶熊果酸。采用高效液相色谱法分析纯度,色谱条件:Hypersil C₁₈ 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm,5 μm);流动相:V(0.1% 磷酸溶液):V(水):V(无水甲醇)(3:13:84);柱温:25 $^{\circ}\text{C}$;检测波长 208 nm;流速 1 mL/min;进样量 20 μL 。

1.2.4 单因素试验

单因素试验分别考察液料比、提取时间、提取温度、乙醇浓度对熊果酸得率的影响。液料比采用 8:1、12:1、16:1、20:1、24:1 五个水平;提取时间采用 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h 五个水平;提取温度采用 70、75、80、85、90 $^{\circ}\text{C}$ 五个水平;乙醇浓度采用 75%、80%、85%、90%、95% 五个水平。

1.2.5 响应面优化试验

在单因素试验基础上,选取影响苦丁茶熊果酸得率的主要因素:液料比(A)、乙醇浓度(B)、提取温度(C)为自变量,苦丁茶熊果酸得率为评价指标,通过 Design-Expert. V8.0.6 软件的 Box-Behnken 功能,采用三因素三水平响应面分析法优化提取工艺,设计如表 1。

表1 响应面分析因素与水平表

Table 1 Factors and levels of response surface experiment

水平 Level	因素 Factor		
	A 液料比 Ratio of liquid to solid (mL/g)	B 乙醇浓度 Ethanol concentration (%)	C 提取温度 Extraction temperature (°C)
-1	12	75	80
0	16	80	85
1	20	85	90

1.2.6 苦丁茶熊果酸抑菌活性的测定

精制的苦丁茶熊果酸采用牛津杯法对金黄色葡萄球菌等7种菌进行抑菌实验。将灭菌过的相应培养基放入培养皿中,冷却凝固,用移液枪移取100 μL 菌悬液(1×10^6 CFU/mL)加入相应培养基,涂布棒均匀涂布。用无菌镊子夹取无菌牛津杯垂直置于含菌培养皿上,向牛津杯中加入100 μL 苦丁茶熊果酸溶液(浓度为50 mg/mL),同时以无菌水为空白对照,真菌、霉菌于28 $^{\circ}\text{C}$ 条件下恒温培养72 h,细菌于37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下恒温培养24 h,十字交叉法测量菌落直径,每组实验重复测定3次,结果取平均值。

1.2.7 苦丁茶熊果酸最小抑菌浓度(MIC)的测定

采用试管稀释法,取6只无菌试管,无菌条件下以相应培养基将苦丁茶熊果酸稀释为质量浓度100、50、25、12.5、6.25、3.125 mg/mL,另取1只无菌

试管设置空白对照管,各管无菌条件下加入100 μL 菌悬液(1×10^6 CFU/mL)。真菌、霉菌于28 $^{\circ}\text{C}$ 条件下恒温培养72 h,细菌于37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下恒温培养24 h,每组平行实验3次,取平均值。判断结果为以无菌生长的最低浓度作为苦丁茶熊果酸对该菌的MIC。

2 结果与分析

2.1 苦丁茶熊果酸的纯化精制

经AB-8大孔吸附树脂分离纯化后所得苦丁茶熊果酸纯度仅为56.1%,采用乙醇重结晶,经高效液相色谱分析苦丁茶熊果酸纯度,结果见图1。由图1B可知,经精制后的苦丁茶熊果酸杂质较少,保留时间为15.46 min,采用面积归一化法计算其纯度为93.1%。在16.52 min处为熊果酸的同分异构体齐墩果酸,但含量较少。

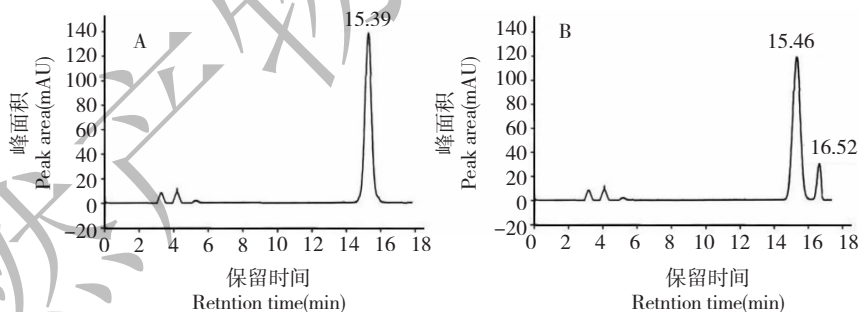


图1 熊果酸标准品(A)和供试品(B)的高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of UA standard(A) and sample(B)

2.2 单因素试验结果

由图2A可以看出料液比对苦丁茶熊果酸的得率影响较大,随液料比的增大而增大,溶剂越多,熊果酸的得率越大,考虑溶剂用量、环保等因素,选择最佳的液料比是16:1;由图2B可知,随着提取时间的增加苦丁茶熊果酸的得率先上升后下降,提取时间增多,杂质也大量溶出而不利于熊果酸的纯化,从整体看上升或下降的幅度较小,说明提取时间对苦

丁茶熊果酸的得率影响较小,最佳提取时间应为1.0 h;由图2C所示,在提取温度70 $^{\circ}\text{C}$ 至85 $^{\circ}\text{C}$ 时,苦丁茶熊果酸的得率随着温度的升高而增加,85 $^{\circ}\text{C}$ 达到最大值,之后则大幅度下降,推测其原因可能是温度升高,破坏了熊果酸的结构,故最佳提取温度为85 $^{\circ}\text{C}$;经分析图2D,苦丁茶熊果酸的得率随乙醇浓度影响较大,先增后减,估计是乙醇浓度增大改变溶液极性导致,80%的乙醇浓度可得到最大值,故选取

乙醇浓度是 80%。

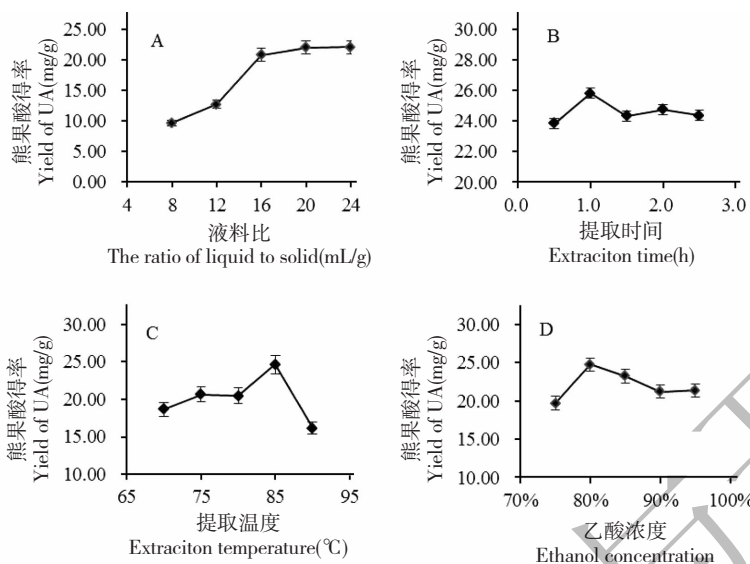


图 2 单因素试验结果

Fig. 2 The results of single factor test

2.3 响应面试验优化结果

2.3.1 回归模型及方差分析

用 Design-Expert. V8. 0. 6 软件进行优化, 得到模型二次回归方程为: $Y = 25.97 + 2.30A + 2.22B - 0.17C - 1.27AB - 0.75AC - 1.40BC - 3.13A^2 - 1.18B^2 - 5.16C^2$ 。试验结果如表 2 所示, 模型二次回归方程模型方差分析结果见表 3。

由表 3 可知, 模型的 F 值为 149.15, P 值 <

0.000 1, 说明模型具有显著性。A-料液比、B-乙醇浓度、AB、AC、BC、 A^2 、 B^2 、 C^2 的 P 值均小于 0.05, C-提取温度的 P 值大于 0.05, 表明料液比、乙醇浓度、各因素交互项和二次项具有显著影响, C-提取温度显著性较差。回归方程的 $R^2 = 0.9948$, 提示该模型拟合度好, 可行性高, 能较好预测真实实验数值。比较各单因素的 P 值和 F 值大小可知各因素的影响大小为: 料液比 > 乙醇浓度 > 提取温度。

表 2 试验设计与结果

Table 2 Design and results of experiment

试验号 No.	A 液料比 Ratio of liquid to solid (mL/g)	B 乙醇浓度 Ethanol concentration (%)	C 提取温度 Extraction temperature (°C)	熊果酸得率 Yield of UA (mg/g)
1	12	80	80	14.823
2	16	75	80	15.806
3	16	80	85	25.673
4	16	75	90	18.506
5	16	85	90	20.641
6	12	75	85	16.214
7	20	80	90	19.045
8	20	80	80	21.133
9	16	80	85	26.618
10	12	80	90	15.717
11	16	80	85	25.548
12	20	85	85	24.551
13	20	75	85	23.137

续表 2 (Continued Tab. 2)

试验号 No.	A 液料比 Ratio of liquid to solid (mL/g)	B 乙醇浓度 Ethanol concentration (%)	C 提取温度 Extraction temperature (°C)	熊果酸得率 Yield of UA (mg/g)
14	12	85	85	22.714
15	16	80	85	25.883
16	16	85	80	23.545
17	16	80	85	26.112

表 3 响应曲面二次回归方程模型方差分析结果

Table 3 Response surface equations of quadratic regression model results of analysis of variance

来源 Source	平方和 Sum of square	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F-value	P 值 P-value	显著性 Significance
模型 Model	270.96	9	30.11	149.15	< 0.0001	**
A-液料比 A-Ratio of liquid to solid	42.31	1	42.31	209.61	< 0.0001	**
B-乙醇浓度 B-Ethanol concentration	39.55	1	39.55	195.95	< 0.0001	**
C-提取温度 C-Extraction temperature	0.24	1	0.24	1.21	0.3077	
AB	6.47	1	6.47	32.04	0.0008	**
AC	2.22	1	2.22	11.01	0.0128	*
BC	7.85	1	7.85	38.9	0.0004	**
A ²	41.22	1	41.22	204.22	< 0.0001	**
B ²	5.9	1	5.9	29.24	0.001	**
C ²	112.04	1	112.04	555.06	< 0.0001	**
残差 Residual	1.41	7	0.2			
失拟误差 Lack of fit	7.00E-01	3	2.30E-01	1.31E+001	0.3882	
纯误差 Pure error	0.71	4	0.18			
总和 Cor total	272.37	16				

注: * 为差异显著($P < 0.05$); ** 为差异极显著($P < 0.01$)。

Note: * indicated significant difference ($P < 0.05$); ** indicated very significant difference ($P < 0.01$).

2.3.2 响应面分析

响应曲面坡度的平缓与陡峭程度反映因素数值发生变化时对响应值的响应灵敏程度,响应面图形的坡度越陡,响应值敏感,坡度较平缓,响应值不太敏感;等高线形状表明两因素交互作用对响应值的影响情况,椭圆形则表示两因素交互作用显著,圆形

则表示两因素交互作用不显著。由图 3 ~ 图 5 可知,液料比与乙醇浓度的交互作用、液料比与提取温度的交互作用、乙醇浓度与提取温度的交互作用影响显著,各交互因素在响应值(熊果酸得率)存在最大值。

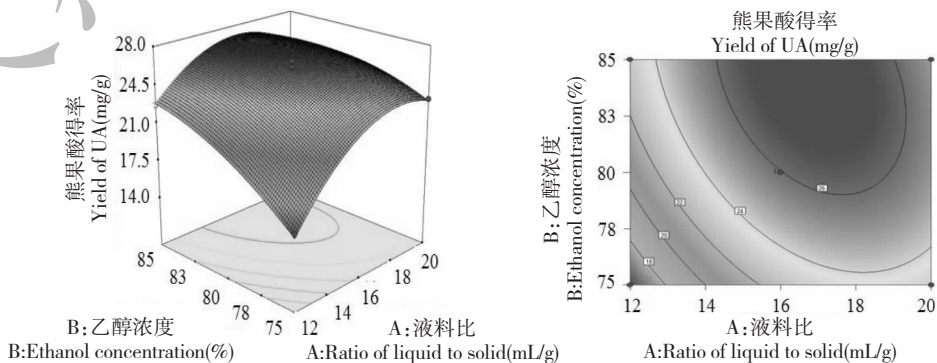


图 3 液料比与乙醇浓度对苦丁茶熊果酸得率的影响

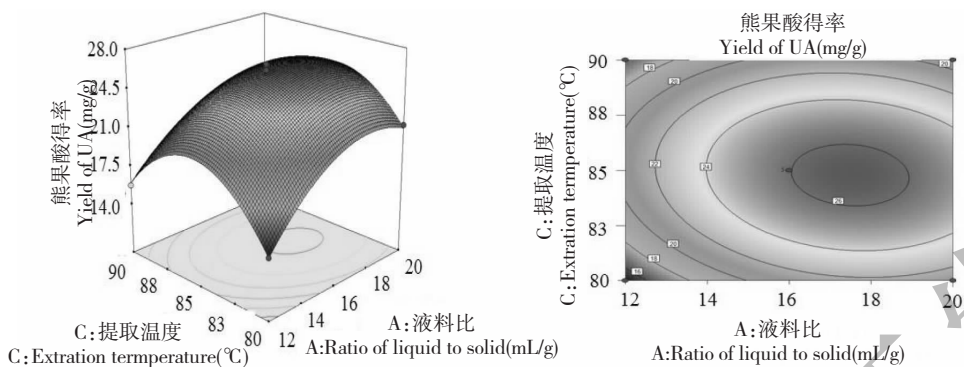


图4 液料比与提取温度对苦丁茶熊果酸得率的影响

Fig. 4 Effects of ratio of liquid to solid and extraction temperature on the yield of UA from *Ilex kudingcha* C. J. Tseng

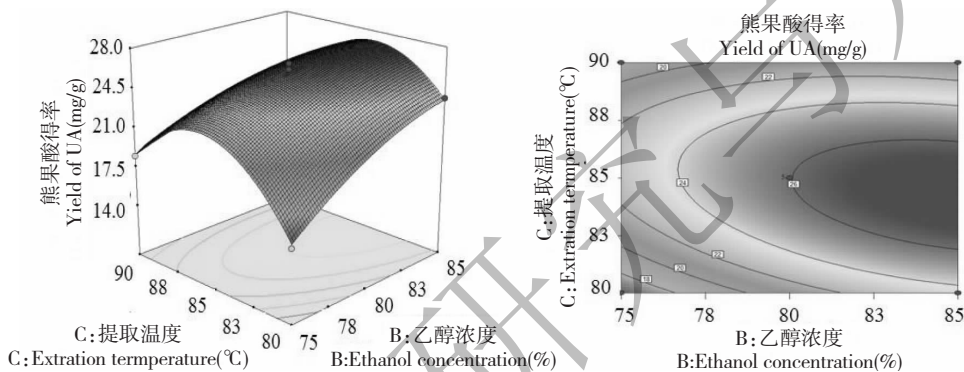


图5 乙醇浓度与提取温度对苦丁茶熊果酸得率的影响

Fig. 5 Effects of ethanol concentration and extraction temperature on the yield of UA from *Ilex kudingcha* C. J. Tseng

2.3.3 最佳优化工艺与验证试验

模型优化得到的提取工艺最优条件为:液料比为16.77:1、乙醇浓度83.48%、提取温度为83.11℃。结合实验的可操作性,最后优化为:液料比为17:1、乙醇浓度为83%、提取温度83℃。为验证实验条件,按上述条件在提取时间为1h的条件下按照单因素实验步骤进行验证实验,平行三次取平均值,得到苦丁茶中熊果酸得率为26.483 mg/g,相对标准偏差为1.36%,表明实验的重复性良好。模型的预测值为26.850 mg/g,与实验值十分相近,说明该模型与实际操作拟合情况较好。

2.4 苦丁茶熊果酸抑菌活性试验结果

由表4可知,苦丁茶熊果酸对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、生孢梭菌、铜绿假单胞菌、大肠杆菌、白色念珠菌、黑曲霉均有抑制作用。苦丁茶熊果酸对大肠杆菌、铜绿假单胞菌2种革兰氏阴性菌抑菌效果最强,对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、生孢梭菌3种革兰氏阳性菌的抑菌能力次之,对白色念珠菌、黑曲霉2种真菌的抑菌作用最弱。熊果酸对7种菌的抑菌能力大小为:大肠杆菌 > 铜绿假单胞菌 > 金黄色葡萄球菌 > 枯草芽孢杆菌 > 生孢梭菌 > 黑曲霉 > 白色念珠菌。

表4 苦丁茶熊果酸的抑菌活性

Table 4 Results of antimicrobial activity of UA from *Ilex kudingcha* C. J. Tseng

检测指标 Indicators	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	铜绿假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	生孢梭菌 <i>Clostridium sporogenes</i>	黑曲霉 <i>Aspergillus niger</i>	白色念珠菌 <i>Candida albicans</i>	对照组 Comparison group
抑菌圈直径(mm) Inhibition zone diameter	8.26 ± 0.06	8.17 ± 0.10	7.66 ± 0.10	7.62 ± 0.01	7.40 ± 0.05	6.62 ± 0.06	6.58 ± 0.04	-

注:-表示无抑菌圈产生。

Note:-Indicating had no inhibition zone diameter.

2.5 苦丁茶熊果酸最小抑菌浓度 (MIC)

由表 5 可见,苦丁茶熊果酸达到一定浓度才显示出抑菌活性。苦丁茶熊果酸对大肠杆菌、铜绿假

单胞菌的 MIC 为 6.25 mg/mL,对生孢梭菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的 MIC 为 12.5 mg/mL,对白色念珠菌、黑曲霉 MIC 为 25 mg/mL。

表 5 苦丁茶熊果酸对不同菌的 MIC

Table 5 MICs of UA from *Ilex kudingcha* C. J. Tseng against different strains

供试菌 Testing bacteria	熊果酸浓度 Concentration of UA (mg/mL)						对照管 Comparison tube
	100	50	25	12.5	6.25	3.125	
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	+	+
铜绿假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	+	+
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	+	+	+
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	+	+	+
生孢梭菌 <i>Clostridium sporogenes</i>	-	-	-	-	+	+	+
黑曲霉 <i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	+	+	+	+
白色念珠菌 <i>Candida albicans</i>	-	-	-	+	+	+	+

注: + 表示有菌生长;-表示无菌生长。

Note: + Indicating had bacteria;-Indicating had no bacteria.

3 结论

本文采用单因素试验,研究了液料比、提取时间、提取温度、乙醇浓度对苦丁茶中熊果酸得率的影响,通过响应面法优化提取工艺,得到最佳优化工艺为:液料比为 17:1、乙醇浓度为 83%、提取温度 83℃。验证试验表明实验值与模型预测值相接近,与实际操作拟合情况较好。优化后的提取工艺所得熊果酸得率较文献^[11,12]报道的要高。

研究报告,苦丁茶不同极性溶剂提取物对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、绿脓杆菌具有一定抑菌作用^[16],但提取物含多种成分,未能阐明其中抑菌的主要活性成分。本文的抑菌活性试验表明,苦丁茶熊果酸对 7 种菌均具有一定的抑制作用,其中对大肠杆菌、铜绿假单胞菌的抑菌效果最强,MIC 皆为 6.25 mg/mL;对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、生孢梭菌的抑菌能力次之,MIC 同为 12.5 mg/mL;对白色念珠菌、黑曲霉的抑菌作用最弱,MIC 都为 25 mg/mL。苦丁茶熊果酸对 7 种菌的抑菌能力大小为:大肠杆菌 > 铜绿假单胞菌 > 金黄色葡萄球菌 > 枯草芽孢杆菌 > 生孢梭菌 > 黑曲霉 > 白色念珠菌。本研究表明苦丁茶熊果酸对革兰氏阴性、阳

性菌和霉菌具有一定的抑制作用,但抑菌作用机理尚未清楚,在之后的研究中,将进一步研究苦丁茶熊果酸抑菌作用机理,为充分开发利用苦丁茶提供理论依据。

参考文献

- Wei XJ(韦晓洁),Yin HH(银慧慧),Meng F(孟菲), et al. Research progress on the effective constituents and pharmacological activities of *Ilex kudingcha* C. J. Tseng[J]. *Chin Med Herald*(中国医药导报),2017,14(24):62-65.
- Yu ZL(于志龙),Zhang C(张曾),Zhu RX(祝瑞雪), et al. Studies on the antioxidant activity of *Ligustrum robustum* (Rxb.) blume extracts[J]. *J Chin Inst Food Sci Tech*(中国食品学报),2017,17:234-240.
- Zhu KX(朱科学),Zhao SF(赵书凡),Zhu HY(朱红英), et al. A comparative study on the hypolipidemic activities of various solvent extracts derived from *Ilex kudingcha* C. J. Tseng[J]. *Sci Technol Food Ind*(食品工业科技),2017,38:330-334.
- Zhao X(赵欣),Yi RK(易若琨),Sun P(孙鹏), et al. Improvement effects of Kuding tea flavonoids extracts on D-galactose induced mice aging[J]. *Sci Technol Food Ind*(食品工业科技),2017,38:303-308.
- Zhu K, Li GJ, Sun P, et al. *In vitro* and *in vivo* anti-cancer

- activities of Kudung tea (*Ilex kudingcha* C. J. Tseng) against oral cancer [J]. *Exp Ther Med*, 2014, 7:709-715.
- 6 Wolska KI, Grudniak AM, Fiecek B, et al. Antibacterial activity of oleanolic and ursolic acids and their derivatives [J]. *Cent Eur J Biol*, 2010, 5:543-553.
 - 7 Vasconcelos MA, Royo VA, Ferreira DS, et al. In vivo analgesic and anti-inflammatory activities of ursolic acid and oleanolic acid from *Miconia albicans* (Melastomataceae) [J]. *Z Naturforsch, C: Biosci*, 2015, 61:477-482.
 - 8 Jian L (简磊), Gao MJ (高明杰), Xia X (夏旋). Ursolic acid attenuate myocardial ischemia reperfusion injury in diabetic rats [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2017, 29:843-848.
 - 9 Gu XF (顾学芳), Tian S (田澍), Huang D (黄丹). Extraction and determination of ursolic acid and oleanolic acid in Kudungcha [J]. *Food Res Dev* (食品研究与开发), 2008, 29(5):96-98.
 - 10 Liu HM, Yang CH, Zeng XJ, et al. Solid-phase extraction of ursolic acid from herb using beta-cyclodextrin-based molecularly imprinted microspheres [J]. *J Sep Sci*, 2008, 31:3573-3580.
 - 11 Li HY (李宏杨), Liu F (刘飞), Zhang FQ (张凤琴), et al. Supercritical fluid CO₂ extraction and purification of ursolic acid from *Ilex kudingcha* C. J. Tseng [J]. *J South Chin Univ Trop Agric* (热带生物学报), 2012, 3:258-260.
 - 12 Zhang M (张明), Liu SX (刘树兴). Studies on enzymatic extraction technology of ursolic acid in *Ilex kudingcha* C. J. Tseng [J]. *Food Ind* (食品工业), 2008, 2:3-5.
 - 13 Zhang Y (张艳), Li YZ (李永哲). Response surface methodology and its application in pharmacy domain [J]. *J Jilin Inst Chem Tech* (吉林化工学院学报), 2012, 29(7):21-26.
 - 14 Xing YL (邢雅丽), Bi LW (毕良武), Zhao ZD (赵振东), et al. Optimization of ultrasonic extraction of ursolic acid from *Paulownia elongata* leaves by response surface methodology [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2015, 27:301-305.
 - 15 Sun Y, Xu WQ, Zhang WQ, et al. Optimizing the extraction of phenolic antioxidants from kudungcha made from *Ilex kudingcha* C. J. Tseng by using response surface methodology [J]. *Sep Purif Technol*, 2011, 78:311-320.
 - 16 Cai J (蔡娟), Huang MT (黄敏桃), Huang YF (黄云峰), et al. Study on antimicrobial activity of different parts of guanxi Kudungcha [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2014, 36:198-201.

《天然产物研究与开发》青年编委会

青年编委 (以姓氏笔划为序)

Members

丁克	王红兵	戈惠明	尹文兵	尹胜	吕兆林
DING Ke	WANG Hongbing	GE Huiming	YIN Wenbing	YIN Sheng	LV Zhaolin
伍婉卿	刘相国	孙昊鹏	孙桂波	李芸霞	李良成
WU Wanqing	LIU Xiangguo	SUN Haopeng	SUN Guibo	LI Yunxia	LI Liangcheng
李国友	邱莉	汪海波	沐万孟	张炳火	陈益华
LI Guoyou	QIU Li	WANG Haibo	MU Wanmeng	ZHANG Binghuo	CHEN Yihua
林茂祥	林昌俊	欧阳杰	易华西	罗应刚	周文
LIN Maoxiang	LIN Changjun	OU Yangjie	YI Huaxi	LUO Yinggang	ZHOU Wen
胡友财	袁涛	夏永刚	高慧敏	唐金山	黄胜雄
HU Youcai	YUAN Tao	XIA Yonggang	GAO Huimin	TANG Jinshan	HUANG Shengxiong
韩淑燕	蓝蔚青	廖晨钟	薛永波		
HAN Shuyan	LAN Weiqing	LIAO Chenzhong	XUE Yongbo		