

# 木芙蓉叶乙酸乙酯部位抗氧化与抗炎作用研究及 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 分析

黄李璐<sup>1,2</sup>, 夏厚林<sup>2</sup>, 冯丽萍<sup>2</sup>,  
叶磊<sup>2</sup>, 严鑫<sup>1</sup>, 熊静<sup>1</sup>, 冯五文<sup>2</sup>, 胡攀<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>成都市中草药研究所, 成都 610016; <sup>2</sup>成都中医药大学药学院, 成都 611137

**摘要:**研究木芙蓉叶乙酸乙酯部位的抗氧化与抗炎作用, 并对其化学成分进行分析鉴定。采用 CCK-8 法测定木芙蓉叶不同极性部位对细胞存活率的影响, 木芙蓉叶不同极性部位浓度为 25 ~ 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 对 HaCaT 细胞和 RAW 264.7 细胞无毒性。利用  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导 HaCaT 细胞氧化应激反应, 发现木芙蓉叶乙酸乙酯部位能最显著降低细胞内 ROS 含量 ( $P < 0.001$ ); 采用 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞建立炎症模型, 通过实时荧光定量 PCR 检测发现木芙蓉叶乙酸乙酯部位能抑制 TNF- $\alpha$ 、IL-6、iNOS、COX-2 炎症因子的表达, 从细胞水平发现木芙蓉叶乙酸乙酯部位具有良好的体外抗氧化和抗炎作用。运用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱技术 (UPLC-Q-Orbitrap HRMS) 对乙酸乙酯部位的化学成分进行快速的分析, 鉴定出 28 个化学成分: 10 个黄酮类、9 个有机酸类、2 个香豆素类、2 个酚类、2 个核苷类及 3 个其他类成分, 黄酮类成分和有机酸类成分是其中主要化学成分, 为其主要的活性物质基础, 为进一步研究木芙蓉叶的药效物质基础以及开发利用提供了一定的理论基础。

**关键词:**木芙蓉叶; 乙酸乙酯部位; 抗氧化; 抗炎; UPLC-Q-Orbitrap HRMS; 化学成分

中图分类号: R284.1; R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)9-1528-12

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.9.007

## Anti-oxidation and anti-inflammatory effects and UPLC-Q-Orbitrap HRMS analysis of ethyl acetate extract from Hibisci Mutabilis Folium

HUANG Li-lu<sup>1,2</sup>, XIA Hou-lin<sup>2</sup>, FENG Li-ping<sup>2</sup>,  
YE Lei<sup>2</sup>, YAN Xin<sup>1</sup>, XIONG Jing<sup>1</sup>, FENG Wu-wen<sup>2</sup>, HU Pan<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Chengdu Institution of Chinese Herbal Medicine, Chengdu 610016, China;

<sup>2</sup>College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

**Abstract:** The antioxidant and anti-inflammatory effects of the ethyl acetate extract of Hibisci Mutabilis Folium were studied, and the chemical constituents of the ethyl acetate extract were analyzed and identified. The CCK-8 method was used to determine the effect of different polar extracts of Hibisci Mutabilis Folium on the survival rate of cells. The concentration of different polar extracts of Hibisci Mutabilis Folium was 25-200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , which was non-toxic to HaCaT cells, and non-toxic to RAW 264.7 cells. The ethyl acetate extract of Hibisci Mutabilis Folium was able to significantly reduce intracellular ROS content ( $P < 0.001$ ) when  $\text{H}_2\text{O}_2$  was used to induce the oxidative stress response of HaCaT cells. LPS-induced RAW 264.7 cells were used to establish an inflammation model, and the expression of inflammatory factors TNF- $\alpha$ , IL-6, iNOS and COX-2 was inhibited by real-time quantitative fluorescence PCR. It was found that the ethyl acetate extract of Hibisci Mutabilis Folium had marvelous in vitro antioxidant and anti-inflammatory effects at the cellular level. The chemical constituents of ethyl acetate extract were rapidly analyzed and identified by UPLC-Q-Orbitrap HRMS, 28 chemical constituents were identified, including ten flavonoids, nine organic acids, two coumarins, two phenols, two nucleosides and three others. Flavonoids and organic acids were the main chemical constituents that formed the basis of their active ingredients. It provides a certain theoretical basis for

further research into the pharmacodynamic material basis and the utilization of *Hibisci Mutabilis Folium*.

**Key words:** *Hibisci Mutabilis Folium*; ethyl acetate extract; antioxidant; anti-inflammatory; UPLC-Q-Orbitrap HRMS; chemical constituents

木芙蓉叶为锦葵科木槿属植物木芙蓉 (*Hibiscus mutabilis* L.) 的干燥叶, 收载于 2020 版《中国药典》, 主产我国四川、湖南、广东、云南等地。气微, 味辛平, 具有凉血、解毒、消肿、止痛等功效<sup>[1]</sup>。《神农本草经》<sup>[2]</sup>记载:“夏末秋初之气, 故其味辛, 辛属金化, 故能清肺, 其气平平即凉也, 故能凉血散热解毒, 兼治一切痈疽肿毒恶疮, 排脓止痛, 小儿疳积。”现代药理学研究表明, 木芙蓉叶有良好的抑菌、抗感染和抗病毒作用<sup>[3]</sup>, 对肾缺血再灌注损伤和慢性肝损伤具有保护作用<sup>[4,5]</sup>。木芙蓉叶中的主要化学成分有黄酮类、有机酸类、酚类、氨基酸、鞣质、糖类、甾体类化合物及挥发油类<sup>[6]</sup>。

课题组前期<sup>[7]</sup>通过木芙蓉叶对 DPPH 自由基和 ABTS 自由基的清除率, 已初步确定木芙蓉叶乙酸乙酯部位具有较好的抗氧化活性, 黄酮类成分可能为其药效物质基础之一。但体外化学法无法准确反映活性物质在生物体内的真实作用, 故本研究构建 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 HaCaT 细胞氧化应激损伤模型, 测定活性氧 (ROS) 的产生, 探究木芙蓉叶不同极性部位对 HaCaT 细胞氧化应激损伤的保护作用, 建立 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞炎症模型, 测定乙酸乙酯部位抑制细胞炎症因子表达的程度, 从细胞层面上对其抗氧化和抗炎作用进一步研究, 并基于 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术对木芙蓉叶乙酸乙酯部位化学成分进行鉴定, 对药效部位精准分析, 研究发现乙酸乙酯部位的主要成分为黄酮及其苷类成分, 为全面阐释木芙蓉叶药效物质基础及其开发利用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞

HaCaT 细胞 (人永生角质形成细胞)、RAW 264.7 细胞 (小鼠单核巨噬细胞) 购自中国科学院昆明细胞库。

#### 1.1.2 药物与试剂

30% 过氧化氢 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 批号: 2021051801, 成都市科隆化学品有限公司); 胎牛血清 (批号: 12B052)、双抗 (批号: 04052938)、DMEM 低糖培养基 (批号: 8121295) (上海泰坦科技股份有限公司);

0.25% EDTA-胰蛋白酶 (批号: CR2012027, Service-bio 公司); CCK-8 试剂盒 (批号: 20010149, Proteintech 公司); ROS 检测试剂盒 (批号: 101121220118)、脂多糖 (LPS, 批号: ST-1470)、地塞米松 (DXM, 批号: 2066651) (上海碧云天生物技术有限公司); ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix (批号: 027E2232EA)、RNA isolater Total RNA Extraction Reagen (批号: 017E2231FA) (南京诺唯赞生物科技股份有限公司); 秦皮素 (批号: MUST-21103019, 成都曼斯特生物科技有限公司); 芦丁 (批号: MUST-21012102)、异槲皮苷 (批号: wkq20060104) (四川省维克奇生物科技有限公司); 山柰酚-3-O-芸香糖苷 (批号: DSTDS007501, 成都乐美天医药科技有限公司); 银槲苷 (批号: CHB180214, 成都克洛玛生物科技有限公司), 纯度均 ≥ 98%。

木芙蓉叶样品于 2020 年 10 月中旬采收于成都市植物园 (成都市金牛区外北天回镇蓉都大道 1116 号), 经成都中医药大学龙飞教授鉴定为锦葵科植物木芙蓉 *Hibiscus mutabilis* L. 的叶。

#### 1.1.3 仪器

SpectraMax I d5 多功能酶标仪 (美国 Molecular Device 公司); qTOWER3 G touch 荧光定量基因扩增仪 (德国耶拿分析仪器股份公司); DS-11 超微量紫外可见分光光度计 (美国丹诺尔 Denovix 公司); ForeAmp-SN695 基因扩谱仪 (成都凡晶生物技术有限公司); Thermo Scientific Q Exactive-MS 高分辨质谱仪 (美国 Thermo Fisher)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 样品的制备

取木芙蓉叶中粉 10 g, 加 10 倍量 70% 乙醇回流提取 2 次, 分别为 2 h、1.5 h, 滤过、合并滤液, 浓缩至无醇味, 加水至 100 mL 使成混悬液, 依次使用等体积石油醚、乙酸乙酯、水饱和正丁醇进行萃取, 各萃取 3 次, 分别合并、减压浓缩、干燥为浸膏, 萃取后的剩余水溶液, 减压浓缩、干燥, 即得石油醚部位 (petroleum ether extract, E1)、乙酸乙酯部位 (ethyl acetate extract, E2)、正丁醇部位 (n-butanol extract, E3) 和水部位 (aqueous extract, E4)。精密称取各部

位样品适量,加入 DMSO 溶解,制成 200 mg/mL 的储备液。用完全培养基(含 DMEM 低糖培养基,10% 胎牛血清,1% 双抗)稀释储备液,得到质量浓度分别为 25、50、100、200、400、800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的木芙蓉叶不同极性部位供试品溶液。

### 1.2.2 CCK-8 法测定细胞存活率

取对数生长期 HaCaT 细胞以  $1 \times 10^4$  个/mL 的密度接种于 96 孔细胞培养板中,每孔 100  $\mu\text{L}$ ,并设置加入 100  $\mu\text{L}$  完全培养基,不含细胞的孔作为空白组,37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中孵育 12 h。吸弃细胞培养孔中的完全培养基,重新加入 100  $\mu\text{L}$  完全培养基作为对照组(control, CON),加入 100  $\mu\text{L}$  浓度为 25、50、100、200、400、800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的木芙蓉叶不同极性部位供试品溶液作为给药组,每组 5 个复孔,置于 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱孵育 24 h。吸弃原培养基,每孔加入 110  $\mu\text{L}$  CCK-8 测试液(100  $\mu\text{L}$  完全培养基与 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 检测液配制),将 96 孔板在培养箱内孵育 3 h,用酶标仪于检测波长 450 nm 处测定吸光度值。同法测定给药组为 25、50、100、200、400、800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的木芙蓉叶不同极性部位供试品溶液对 RAW 264.7 细胞存活率的影响,酶标仪于检测波长 450 nm 处测定吸光度值,计算细胞存活率,细胞存活率 =  $[(A_s - A_b) / (A_c - A_b)] \times 100\%$ ,  $A_s$ : 给药孔吸光度,  $A_c$ : 对照孔吸光度,  $A_b$ : 空白孔吸光度。

### 1.2.3 HaCaT 细胞内 ROS 含量测定

利用荧光探针 DCFH-DA 检测 HaCaT 细胞内 ROS 水平,按照  $1 \times 10^4$  个/孔密度接种细胞于黑色不透光 96 孔板,置于 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱孵育 24 h。除去完全培养基,对照组和模型组(model, MOD)加入 200  $\mu\text{L}$  无血清培养基(含 DMEM 低糖培养基,1% 双抗),给药组分别加入 200  $\mu\text{L}$  无血清培养基稀释储备液后浓度为 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的木芙蓉叶不同极性部位溶液以及 25、50、100、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的木芙蓉叶乙酸乙酯部位溶液,每组 6 个复孔。在培养箱内孵育 2 h 后,模型组和给药组每孔加入 250  $\mu\text{mol}/\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ,继续置于培养箱中孵育 24 h。24 h 后除去培养基,用适量的 PBS 洗涤细胞 3 次,加入适当体积用无血清培养基稀释至浓度为 10  $\mu\text{mol}/\text{L}$  的 DCFH-DA,于 37  $^{\circ}\text{C}$  细胞培养箱内孵育 20 min。用无血清培养基洗涤细胞 3 次,使用荧光酶标仪测定每组在 488 nm 激发波长,525 nm 发射波长处的荧光强度。

### 1.2.4 q-PCR 测定炎症因子表达

将 RAW 264.7 细胞按每孔  $2 \times 10^5$  个/孔均匀

铺于六孔板,置于 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱孵育 24 h,至细胞密度达 80% 以上。将细胞分为对照组、给药组、模型组,每组 3 个复孔。给药组加入 25、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  木芙蓉叶乙酸乙酯部位供试品以及 10  $\mu\text{mol}/\text{L}$  的地塞米松溶液,置于 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱孵育 2 h 后,对照组不予任何处理,给药组和模型组加入 LPS 溶液至每孔浓度为 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,放入培养箱中孵育 12 h。利用 Trizol 法提取各组细胞中 Total RNA,使用超微量紫外可见分光光度计检测 Total RNA 样品浓度值,完成体系配制,按照逆转录试剂盒的操作说明合成 cDNA。根据实验设计配置反应体系,上机检测,记录输出的 CT 值,以 GAPDH 基因为内参,以  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  计算基因的相对表达量。

### 1.2.5 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 分析木芙蓉叶乙酸乙酯部位化学成分

#### 1.2.5.1 供试品溶液的制备

精密称取“1.2.1”项下制备的木芙蓉叶乙酸乙酯部位样品适量,加入 70% 乙醇溶液溶解并定容,制备为 0.2 mg/mL 的溶液,再以 0.22  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜滤过,得供试品溶液。

#### 1.2.5.2 混合对照品溶液的制备

分别精密称取秦皮素、芦丁、异槲皮苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、银槲苷适量,用甲醇制成质量浓度分别为 32.97、44.82、48.86、18.63、102.79  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的混合对照品溶液。

#### 1.2.5.3 色谱条件

色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC HSS T3  $\text{C}_{18}$  色谱柱(2.1 mm  $\times$  100 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ );流动相 0.1% 甲酸水(A)-乙腈(B);梯度洗脱(0.01 ~ 3 min: 5%  $\rightarrow$  11% B; 3 ~ 4 min: 11%  $\rightarrow$  12% B; 4 ~ 16 min: 12% B; 16 ~ 23 min: 12%  $\rightarrow$  15% B; 23 ~ 33 min: 15%  $\rightarrow$  19% B; 33 ~ 40 min: 19%  $\rightarrow$  26% B; 40 ~ 58 min: 26% B);流速 0.25 mL/min;柱温 25  $^{\circ}\text{C}$ ;进样量 5  $\mu\text{L}$ 。

#### 1.2.5.4 质谱条件

质谱仪为 Thermo Scientific Q Exactive-MS 高分辨质谱仪;电喷雾离子源,正/负离子模式(ESI<sup>+</sup>/ESI<sup>-</sup>);离子源温度:120  $^{\circ}\text{C}$ ,喷雾电压:3.5 kV;毛细管温度:300  $^{\circ}\text{C}$ ,探头加热器温度:350  $^{\circ}\text{C}$ ,鞘气流速:35 psi,辅助气流速:10 psi,最大喷雾电流:100 A, S-Lens 分辨率:50,在 100 ~ 1 500  $m/z$  范围内进行全扫描分析。

## 2 结果

### 2.1 木芙蓉叶不同极性部位对细胞存活率的影响

采用 CCK-8 试剂盒检测 25、50、100、200、400、800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  木芙蓉叶不同极性部位对 HaCaT 细胞的毒性,以及对 RAW 264.7 细胞的毒性,当存活率大于 90% 时,可认为该药物浓度对细胞无毒性作用,结果如图 1A 所示,木芙蓉叶不同极性部位在 25 ~ 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的质量浓度范围内,对 HaCaT 细胞无

细胞毒性,当浓度大于 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,细胞存活率明显低于 90%,HaCaT 细胞存活率显著降低 ( $P < 0.01$ )。如图 1B 所示,木芙蓉叶不同极性部位在 25 ~ 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的质量浓度范围内,对 RAW 264.7 细胞无毒性作用,浓度大于 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  后,RAW 264.7 细胞存活率显著降低 ( $P < 0.01$ ),结果说明,给药浓度过高对 HaCaT 细胞和 RAW 264.7 细胞有一定的刺激性,影响其存活率。

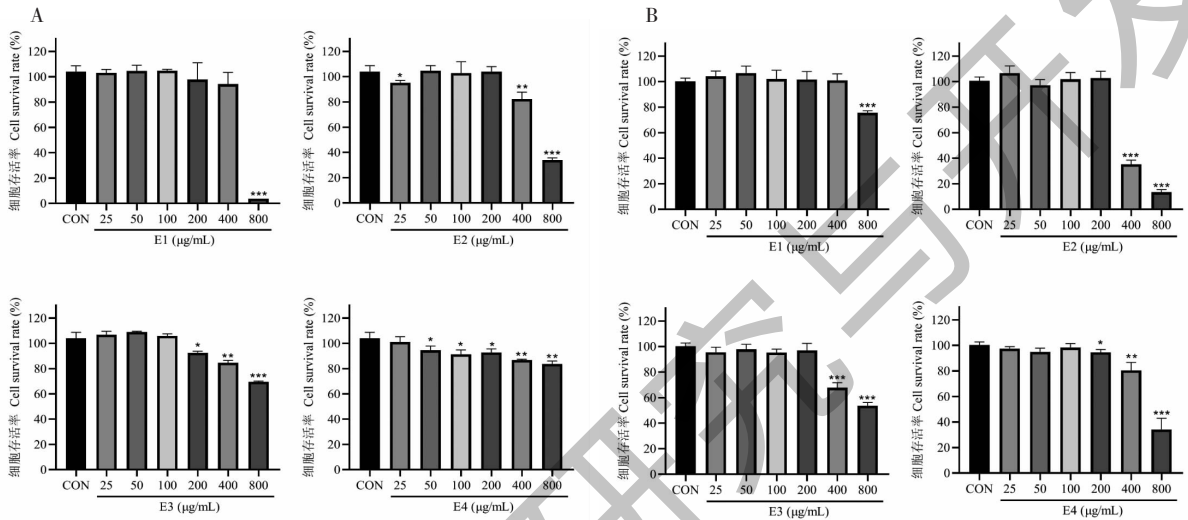


图 1 木芙蓉叶不同极性部位对细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 1 Effect of different polar extracts of Hibisci Mutabilis Folium on the survival rate of cells ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

注:A 为 HaCaT 细胞存活;B 为 RAW 264.7 细胞存活率。与对照组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ 。Note: A is the survival rate of HaCaT cells; B is the survival rate of RAW 264.7 cells. Compared with the control group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

### 2.2 木芙蓉叶不同极性部位的比较及乙酸乙酯部位对 HaCaT 细胞氧化损伤的保护

HaCaT 细胞生长较快,适应性强,稳定性高,常应用于抗氧化功效的评价,ROS 过度增加或持续存在可对细胞形成氧化应激,造成多种损伤,利用  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导 HaCaT 细胞氧化应激损伤模型是评价抗氧

化活性的重要细胞模型<sup>[8-10]</sup>。由图 2A 可知,模型组与对照组相比,ROS 含量显著升高 ( $P < 0.001$ ),说明  $\text{H}_2\text{O}_2$  能成功诱导氧化应激反应,细胞内产生了较多的 ROS,模型建造成功。与模型组对比,木芙蓉叶不同极性部位都显著降低了细胞内 ROS 含量 ( $P < 0.01$ ),降低程度依次为乙酸乙酯部位 > 水部

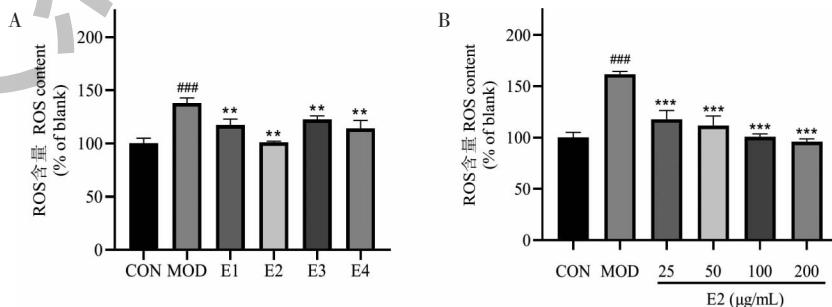


图 2 木芙蓉叶不同极性部位及乙酸乙酯部位对 HaCaT 细胞内 ROS 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 2 Effect of different polar extracts of Hibisci Mutabilis Folium on ROS content in HaCaT cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

注:与对照组相比,###  $P < 0.001$ ;与模型组相比,\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ 。Note: Compared with the control group, ###  $P < 0.001$ ; Compared with the model group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

位 > 石油醚部位 > 正丁醇部位, 其中乙酸乙酯部位供试品溶液给药后 HaCaT 细胞内 ROS 含量最低, 说明乙酸乙酯部位为木芙蓉叶不同极性部位中对细胞氧化损伤保护作用最强的部位。由图 2B 可知, 乙酸乙酯部位给药浓度为 25、50、100、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 都显著降低了细胞内 ROS 含量 ( $P < 0.001$ ), 其中, 浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 细胞内 ROS 含量与对照组相近。给药浓度越高, 清除 ROS 的能力越强, 对 HaCaT 细胞氧化损伤的保护作用越强。

### 2.3 木芙蓉叶乙酸乙酯部位对 RAW 264.7 细胞炎症模型炎症因子表达的影响

RAW 264.7 细胞在炎症因子释放、修复炎症中具有重要作用, 是体内重要的先天免疫细胞, 细胞生

长速度快, 培养方便<sup>[11]</sup>, 选择 RAW 264.7 细胞来构建炎症模型。通过 CCK-8 法测定细胞存活率, 根据给药浓度范围设置 25、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的低高浓度给药组进行实验, 进一步对木芙蓉叶乙酸乙酯部位的抗炎活性进行评价, 测定模型组、对照组和给药组 RAW 264.7 细胞 TNF- $\alpha$ 、IL-6、iNOS、COX-2 的表达量。结果见表 1 和图 3, 与对照组比较, 模型组炎症因子表达显著升高 ( $P < 0.001$ ), 说明成功建立炎症模型。乙酸乙酯部位给药浓度为 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 能明显抑制 RAW 264.7 细胞中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、iNOS、COX-2 mRNA 的表达 ( $P < 0.001$ ), 对细胞中的炎症因子具有明显的抑制作用, 具有良好的抗炎活性。

表 1 木芙蓉叶乙酸乙酯部位对 RAW 264.7 细胞炎症模型 TNF- $\alpha$ 、IL-6、iNOS、COX-2 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Effect of ethyl acetate extract of Hibisci Mutabilis Folium on the expression of TNF- $\alpha$ , IL-6, iNOS and COX-2 on RAW 264.7 cells inflammatory model ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别 Group	浓度 Concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	TNF- $\alpha$	IL-6	iNOS	COX-2
CON	-	1.00 $\pm$ 0.07	1.00 $\pm$ 0.07	1.01 $\pm$ 0.18	1.01 $\pm$ 0.16
MOD	-	7.29 $\pm$ 0.24 <sup>###</sup>	6 402.00 $\pm$ 109.80 <sup>###</sup>	1 879.00 $\pm$ 129.00 <sup>###</sup>	116.10 $\pm$ 0.28 <sup>###</sup>
DXM	3.92	2.18 $\pm$ 0.22 <sup>**</sup>	490.90 $\pm$ 1.20 <sup>**</sup>	600.40 $\pm$ 101.60 <sup>**</sup>	6.32 $\pm$ 1.05 <sup>**</sup>
E2	25	10.88 $\pm$ 2.43	48 403.00 $\pm$ 11860.00 <sup>*</sup>	1 098.00 $\pm$ 110.20 <sup>**</sup>	188.60 $\pm$ 30.82
	200	4.36 $\pm$ 0.40 <sup>***</sup>	211.20 $\pm$ 31.75 <sup>***</sup>	20.00 $\pm$ 2.86 <sup>***</sup>	12.37 $\pm$ 0.88 <sup>***</sup>

注: 与对照组相比, <sup>###</sup> $P < 0.001$ ; 与模型组相比, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ , <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ 。

Note: Compared with the control group, <sup>###</sup> $P < 0.001$ ; Compared with the model group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ , <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ .

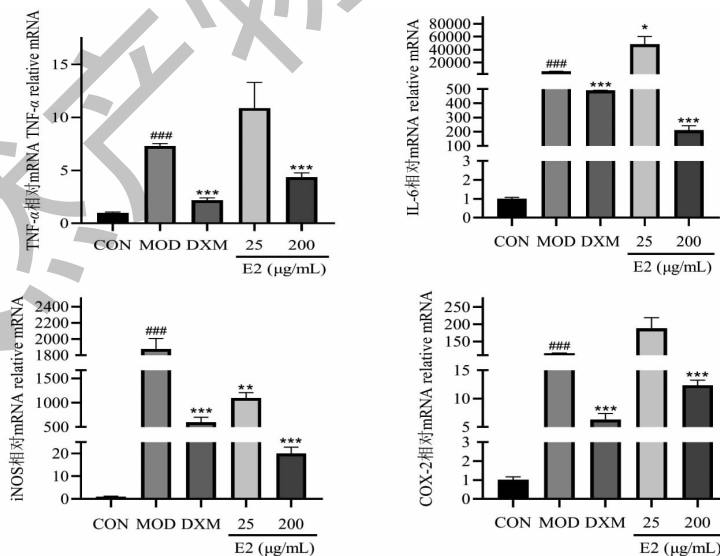


图 3 木芙蓉叶乙酸乙酯部位对 RAW 264.7 细胞炎症模型 TNF- $\alpha$ 、IL-6、iNOS、COX-2 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 3 Effect of ethyl acetate extract of Hibisci Mutabilis Folium on the expression of TNF- $\alpha$ , IL-6, iNOS and COX-2 on RAW 264.7 cells inflammatory model ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

注: 与对照组相比, <sup>###</sup> $P < 0.001$ ; 与模型组相比, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ , <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ 。Note: Compared with the control group, <sup>###</sup> $P < 0.001$ ;

Compared with the model group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ , <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ .

## 2.4 木芙蓉叶乙酸乙酯部位化学成分分析

采用 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术对木芙蓉叶乙酸乙酯部位中的化学成分进行检测分析,在正离子模式和负离子模式下的离子流图分别见图 4、图 5。根据化合物质谱裂解规律,结合 *m/z* Cloud、*m/z*

Vault、PubChem 等数据库进行匹配,通过对照品对照和文献数据比对<sup>[12-18]</sup>共鉴定出 28 个化合物,包括 10 个黄酮类、9 个有机酸类、2 个香豆素类、2 个酚类、2 个核苷类及 3 个其他类成分,其中 5 个成分经对照品比对确证,化学成分的分析见表 2。

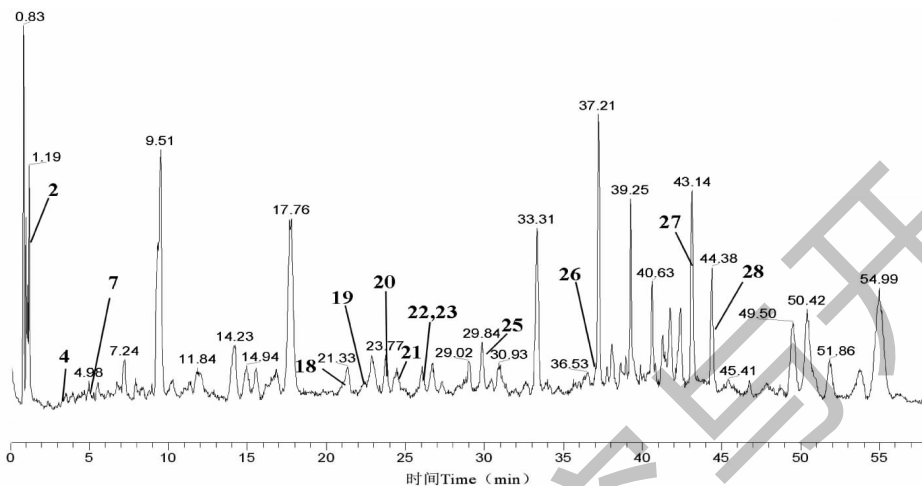


图 4 木芙蓉叶乙酸乙酯部位的 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 正离子流图

Fig. 4 Total ion chromatogram of the ethyl acetate extract of Hibiscus Mutabilis Folium by UPLC-Q-Orbitrap HRMS in positive ion mode

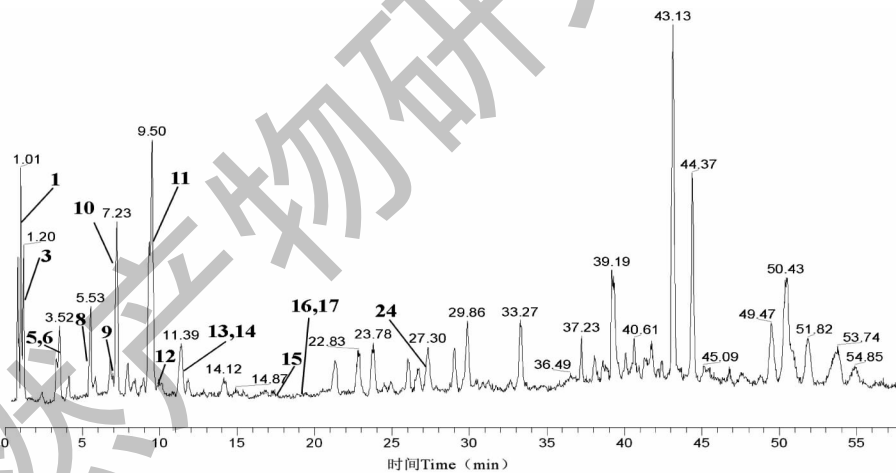


图 5 木芙蓉叶乙酸乙酯部位的 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 负离子流图

Fig. 5 Total ion chromatogram of the ethyl acetate extract of Hibiscus Mutabilis Folium by UPLC-Q-Orbitrap HRMS in negative ion mode

表 2 木芙蓉叶乙酸乙酯部位的化学成分分析

Table 2 Chemical composition analysis of ethyl acetate in Hibiscus Mutabilis Folium

编号 No.	$t_R$ (min)	离子模式 Ion mode	化合物 Compound	分子式 Molecular	计算值 Calculated value ( $m/z$ )	测定值 Observed value ( $m/z$ )	误差值 Error ( $\times 10^{-6}$ )	碎片离子 Fragment ions (MS/MS)	类型 Classify
1	1.09	$[M-H]^-$	腺嘌呤 Adenine*	$C_5H_5N_5$	134.047 2	134.047 0	-1.64	119.036 0、134.046 8	e
2	1.19	$[M+H]^+$	腺苷 Adenosine	$C_{11}H_9N_9$	268.105 4	268.105 9	1.86	94.040 9、119.036 2、 136.061 8	e

续表 2 (Continued Tab. 2)

编号 No.	$t_R$ (min)	离子模式 Ion mode	化合物 Compound	分子式 Molecular	计算值 Calculated value ( $m/z$ )	测定值 Observed value ( $m/z$ )	误差值 Error ( $\times 10^{-6}$ )	碎片离子 Fragment ions (MS/MS)	类型 Classify
3	1.21	[M-H] <sup>-</sup>	琥珀酸 Succinic acid	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	117.019 3	117.018 9	-3.25	73.028 7, 99.008 2	b
4	3.02	[M+H] <sup>+</sup>	L-苯丙氨酸 L-Phenylalanine	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	166.086 3	166.087 0	4.70	103.055 1, 120.081 6, 131.049 8, 149.060 3	f
5	3.52	[M-H] <sup>-</sup>	2,4-二羟基苯甲酸 2,4-Dihydroxybenzoic acid	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	153.019 3	153.019 2	-0.59	108.020 8, 109.028 9	b
6	3.60	[M-H] <sup>-</sup>	3-羟基扁桃酸 3-Hydroxy-mandelic acid	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	167.034 9	167.035 0	0.24	121.029 1, 123.044 8	b
7	5.08	[M+H] <sup>+</sup>	秦皮甲素 Aesculin	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>9</sub>	341.086 7	341.087 7	3.02	123.044 9, 133.029 2, 179.034 9	c
8	5.51	[M-H] <sup>-</sup>	2,5-二羟基苯甲醛 2,5-Dihydroxybenzaldehyde *	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	137.024 4	137.024 1	-2.34	109.029 0	f
9	7.17	[M-H] <sup>-</sup>	2-羟基肉桂酸 2-Hydroxycinnamic acid	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	163.040 1	163.039 9	-0.67	119.049 7	b
10	7.22	[M-H] <sup>-</sup>	咖啡酸 Caffeic acid	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	179.034 9	179.035 2	1.06	89.038 9, 117.034 2, 135.044 8	b
11	9.49	[M-H] <sup>-</sup>	秦皮素 Fraxetin <sup>#</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	207.029 9	207.030 4	2.46	147.008 6, 192.006 6	c
12	10.29	[M-H] <sup>-</sup>	香草醛 Vanillin *	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	151.040 1	151.040 1	0.07	123.045 1, 136.016 3	f
13	11.38	[M-H] <sup>-</sup>	4-硝基儿茶酚 4-Nitrocatechol *	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>4</sub>	154.014 6	154.014 5	-0.65	65.997 6, 107.012 8, 124.016 2	d
14	11.39	[M-H] <sup>-</sup>	3-香豆酸 3-Coumaric acid	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	163.040 1	163.040 1	-0.12	91.054 8, 93.034 0, 117.034 1, 119.049 7	b
15	17.54	[M-H] <sup>-</sup>	阿魏酸 Ferulic acid	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	193.050 6	193.050 9	1.81	134.036 9, 149.060 6, 178.027 2	b
16	18.94	[M-H] <sup>-</sup>	水杨酸 Salicylic acid	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	137.024 4	137.024 3	-1.24	65.038 8, 93.033 9	b
17	19.42	[M-H] <sup>-</sup>	4-硝基苯酚 4-Nitrophenol *	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>3</sub>	138.019 7	138.019 6	-0.58	93.033 8, 108.021 1	d
18	21.33	[M+H] <sup>+</sup>	芦丁 Rutin <sup>#</sup>	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	611.160 7	611.163 4	4.43	303.051 3, 465.104 5	a
19	22.83	[M+H] <sup>+</sup>	槲皮素 Quercetin	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	303.049 9	303.051 2	4.22	229.050 6, 257.045 6	a
20	23.79	[M+H] <sup>+</sup>	异槲皮苷 Isoquercitrin <sup>#</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	465.102 8	465.105 1	4.99	153.019 0, 303.051 5	a
21	24.49	[M+H] <sup>+</sup>	木犀草苷 Cynaroside	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	449.107 8	449.108 3	0.91	153.018 9, 287.056 4	a
22	26.03	[M+H] <sup>+</sup>	山奈酚-3-O-芸香糖苷 Kaempferol-3-O-rutinoside <sup>#</sup>	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	595.165 8	595.168 7	4.97	153.019 1, 287.056 4, 449.107 8	a
23	26.05	[M+H] <sup>+</sup>	木犀草素 Luteolin	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	287.055 0	287.056 3	4.63	153.019 0, 269.045 9	a
24	27.30	[M-H] <sup>-</sup>	壬二酸 Azelaic acid	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	187.097 6	187.097 8	1.28	97.065 2, 125.096 7, 143.107 6	b
25	29.85	[M+H] <sup>+</sup>	三叶豆苷 Trifolin *	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	449.107 8	449.110 0	4.90	85.029 4, 121.029 3, 153.017 9, 287.056 4	a
26	36.79	[M+H] <sup>+</sup>	柚皮素 Naringenin	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	273.075 8	273.077 0	4.69	119.049 9, 123.044 7, 147.044 8, 153.018 9	a
27	43.13	[M+H] <sup>+</sup>	银假苷 Tiliroside <sup>#</sup>	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>13</sub>	595.144 6	595.147 6	4.95	153.018 9, 287.056 4	a
28	44.39	[M+H] <sup>+</sup>	山奈酚 Kaempferol	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	287.055 0	287.056 2	3.97	153.019 1, 165.019 1, 258.053 8, 287.056 4	a

注: a. 黄酮类; b. 有机酸类; c. 香豆素类; d. 酚类; e. 核苷类; f. 其他类。<sup>#</sup>经对照品比对的化学成分; \* 首次在木芙蓉中报道的化学成分。

Note: a. Flavonoids; b. Organic acids; c. Coumarins; d. Phenols; e. Nucleosides; f. Others. <sup>#</sup> Chemical components Compared with reference substance; \* Chemical components that are first reported in Hibisci Mutabilis Foliun.

### 2.4.1 黄酮类

黄酮类化合物是木芙蓉叶中的主要化学成分,从木芙蓉叶乙酸乙酯部位中共鉴定出 10 个黄酮及其苷类成分。其中,化合物 **23** 为黄酮类,化合物 **21** 为黄酮苷类;化合物 **19**、**28** 为黄酮醇类,化合物 **18**、**20**、**22**、**25**、**27** 为黄酮醇苷类;化合物 **26** 为二氢黄酮类。以黄酮苷元为母核,糖基种类的不同、连接位置不同,产生了各种黄酮苷类化合物。黄酮苷类化合物的裂解规律以糖苷键断裂为主,过程中包括黄酮苷元 C 环上的逆狄尔斯-阿尔德反应(RDA)裂解及 CHO、CO<sub>2</sub>、CO、H<sub>2</sub>O 等中性离子的丢失<sup>[12]</sup>。

化合物 **18** 在正离子模式下的准分子离子峰  $m/z$  611.163 4 [M + H]<sup>+</sup>、633.146 7 [M + Na]<sup>+</sup>, 确定

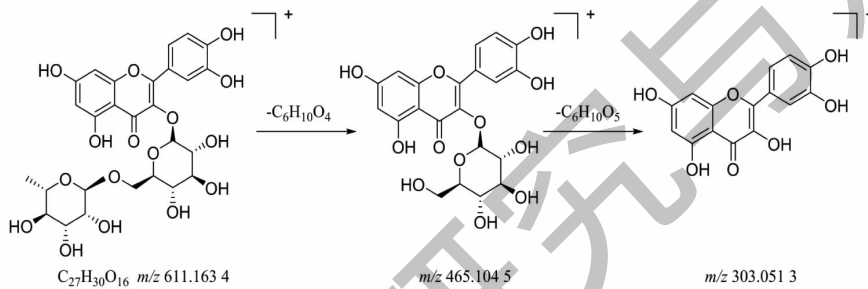


图6 芦丁的裂解途径

Fig. 6 Fragmentation pathway of rutin

### 2.4.2 有机酸类

木芙蓉叶乙酸乙酯部位中鉴定出 9 个有机酸类成分(化合物 **3**、**5**、**6**、**9**、**10**、**14**、**15**、**16**、**24**),有机酸类大多在负离子模式下有较好响应,二级质谱裂解易失去 CO、CO<sub>2</sub>、CH<sub>2</sub>、H<sub>2</sub>O 等中性碎片。化合物 **5** 在负离子模式下准分子离子峰  $m/z$  153.019 2 [M-H]<sup>-</sup>, 确定分子式为 C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub>, 裂解后形成二级碎片离子  $m/z$  108.020 8 [M-H-CHO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>,  $m/z$  109.028 9 [M-

H-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>, 根据其裂解特性以及文献报道<sup>[15]</sup>, 推测其为 2,4-二羟基苯甲酸, 裂解途径见图 7。化合物 **24** 在负离子模式下准分子离子峰  $m/z$  187.097 8 [M-H]<sup>-</sup>, 其分子式为 C<sub>9</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>, 裂解后形成二级碎片离子  $m/z$  97.065 2 [M-H-H<sub>2</sub>O-C<sub>2</sub>O<sub>3</sub>]<sup>-</sup>、125.096 7 [M-H-H<sub>2</sub>O-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>、143.107 6 [M-H-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>, 根据裂解特性及文献报道<sup>[13]</sup>, 推测其为壬二酸。

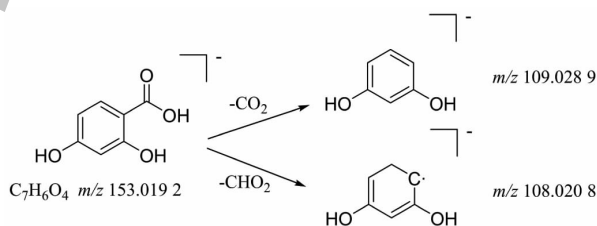


图7 2,4-二羟基苯甲酸的裂解途径

Fig. 7 Fragmentation pathway of 2,4-dihydroxybenzoic acid

### 2.4.3 香豆素类

木芙蓉叶乙酸乙酯部位中鉴定出 2 个香豆素类成分(化合物 **7**、**11**),其二级质谱裂解常失去 CO、

H<sub>2</sub>O、CH<sub>3</sub>等中性碎片。化合物 **11** 在负离子模式下准分子离子峰  $m/z$  207.030 4 [M-H]<sup>-</sup>, 确定分子式为 C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>O<sub>5</sub>, 裂解后形成二级碎片离子  $m/z$  147.008



6[M-H-CH<sub>3</sub>-CHO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>, 192.006 6[M-H-CH<sub>3</sub>]<sup>-</sup>, 根据 合物为秦皮素, 裂解途径见图 8。  
其裂解特性、文献报道<sup>[13]</sup> 及与对照品比对, 确定化

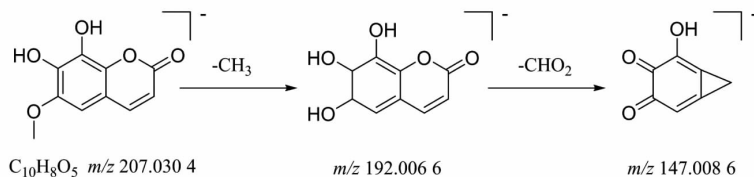


图 8 秦皮素的裂解途径

Fig. 8 Fragmentation pathway of fraxetin

#### 2.4.4 酚类

木芙蓉叶乙酸乙酯部位中鉴定出 2 个酚类成分 (化合物 13、17), 其二级质谱裂解常失去 NO<sub>2</sub>、NO、CNO<sub>2</sub>、CHO、CO、OH 等中性碎片。化合物 17 在负离子模式下准分子离子峰  $m/z$  138.019 6[M-H]<sup>-</sup>,

确定分子式为 C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>3</sub>, 裂解后形成二级碎片离子  $m/z$  93.033 8[M-H-NO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>,  $m/z$  108.021 1[M-H-NO]<sup>-</sup>, 根据其裂解特性以及文献报道<sup>[16]</sup>, 推测其为 4-硝基苯酚, 裂解途径见图 9。

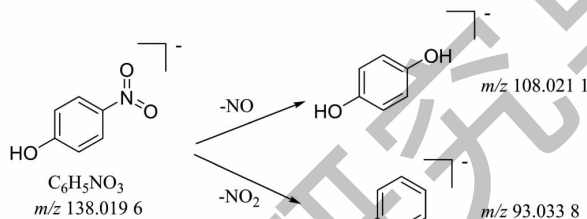


图 9 4-硝基苯酚的裂解途径

Fig. 9 Fragmentation pathway of 4-nitrophenol

#### 2.4.5 核苷类

木芙蓉叶乙酸乙酯部位中鉴定出 2 个核苷类成分 (化合物 1、2), 核苷类成分主要经历核糖碎裂, 以及碱基母核的进一步裂解, 其二级质谱裂解常失去 NH<sub>3</sub>、CHN、CO 等中性碎片。化合物 2 在正离子模式下准分子离子峰  $m/z$  268.105 9[M+H]<sup>+</sup>, 确定

分子式为 C<sub>11</sub>H<sub>9</sub>N<sub>9</sub>, 脱去呋喃核糖后形成二级碎片离子  $m/z$  94.040 9[M+H-C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>-CHN-NH<sub>2</sub>]<sup>+</sup>,  $m/z$  119.036 2[M+H-C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>,  $m/z$  136.061 8[M+H-C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 根据其裂解特性以及文献报道<sup>[13]</sup>, 推测其为腺苷, 裂解途径见图 10。

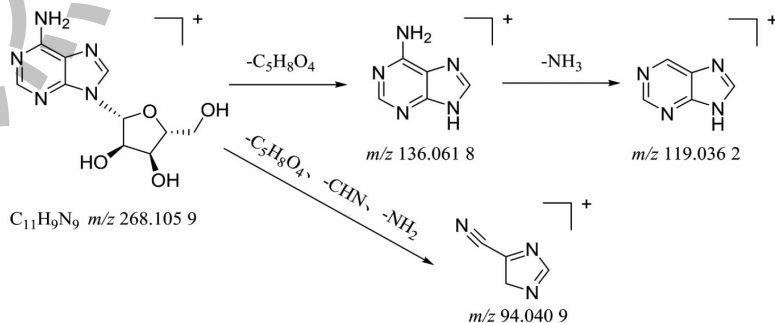


图 10 腺苷的裂解途径

Fig. 10 Fragmentation pathway of adenosine

#### 2.4.6 其他类

木芙蓉叶乙酸乙酯部位中鉴定出 3 个其他类成

分 (化合物 4、8、12), 化合物 4 在正离子模式下准分子离子峰  $m/z$  166.087 0[M+H]<sup>+</sup>, 确定分子式为

$C_9H_{11}NO_2$ , 裂解后形成二级碎片离子  $m/z$  103.055 1  $[M + H - NH_3 - HCOOH]^+$ 、120.081 6  $[M + H - HCOOH]^+$ 、131.049 8  $[M + H - NH_3 - H_2O]^+$ 、149.060 3  $[M + H - NH_3]^+$ , 根据其裂解特性以及文献报道<sup>[17]</sup>, 推测其为 L-苯丙氨酸, 裂解途径见图 11。化

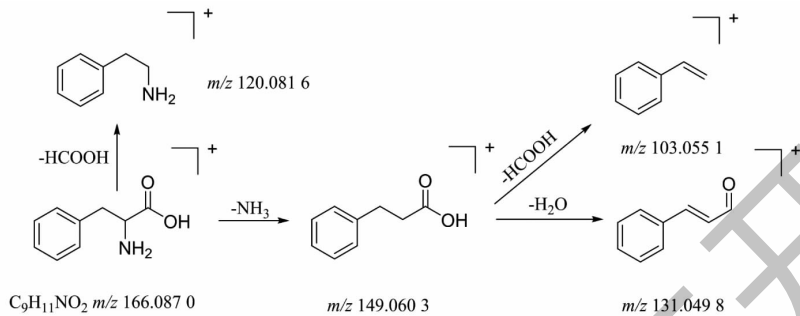


图 11 L-苯丙氨酸的裂解途径

Fig. 11 Fragmentation pathway of L-phenylalanine

### 3 讨论与结论

ROS 是细胞氧化代谢的产物, 过度增加或持续存在会造成细胞氧化损伤,  $H_2O_2$  可以诱导产生过多的 ROS, 是氧化应激损伤模型中理想的诱导物质<sup>[8, 10]</sup>, HaCaT 细胞易于获取, 适应性强, 稳定性高, 利用  $H_2O_2$  诱导 HaCaT 细胞氧化应激损伤模型是评价抗氧化活性的常见细胞模型<sup>[9, 10]</sup>。TNF- $\alpha$ 、IL-6、iNOS、COX-2 是典型的炎症因子, LPS 是常见的致炎因子, 巨噬细胞是炎症反应的重要参与者, 介导了炎症过程中各种免疫病理的发展, 利用 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞是研究炎症因子的经典细胞模型<sup>[11]</sup>。目前已发布团体标准中将这两种方法作为化妆品抗皱以及舒缓功效称谓的证据支持之一<sup>[19, 20]</sup>。本研究建立 HaCaT 细胞氧化损伤模型, 发现木芙蓉叶不同极性部位中乙酸乙酯部位具有较强的抗氧化活性, 木芙蓉叶乙酸乙酯部位在 25 ~ 200  $\mu\text{g/mL}$  浓度范围内, 明显减少 ROS ( $P < 0.001$ ) 含量, 缓解氧化应激, 对细胞氧化损伤模型具有良好的保护作用; 进一步探索木芙蓉叶乙酸乙酯部位的抗炎作用, 构建 RAW 264.7 细胞炎症模型, 乙酸乙酯部位浓度为 200  $\mu\text{g/mL}$  时, 能明显抑制 RAW 264.7 细胞中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、iNOS、COX-2 mRNA 的表达 ( $P < 0.001$ ), 具有良好的抗炎活性, 进一步阐明了木芙蓉叶抗氧化、抗炎活性部位, 为后续药效活性深入研究及化妆品应用开发提供一定的理论基础。

超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨

合物 8 在负离子模式下准分子离子峰  $m/z$  137.024 1  $[M-H]^-$ , 其分子式为  $C_7H_6O_3$ , 裂解后形成二级碎片离子  $m/z$  109.029 01  $[M-H-CO]^-$ , 根据其裂解特性以及文献报道<sup>[18]</sup>, 推测其为 2,5-二羟基苯甲醛。

质谱技术适用于中药多组分复杂体系的分析, 具有高分辨率、高质量精度、检测效率高等特点<sup>[21]</sup>。本研究首次采用 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术对木芙蓉叶乙酸乙酯有效部位中复杂组分进行全面的定性分析, 鉴定出 28 个化学成分, 其中黄酮类成分 10 个, 主要为芦丁、银椴苷、异槲皮苷等; 有机酸类成分 9 个, 主要为阿魏酸、咖啡酸、水杨酸等; 还有香豆素类、酚类、核苷类成分, 各 2 个, 以及 3 个其他类成分, 与木芙蓉叶富含黄酮类及酚酸类成分相关报道一致<sup>[22]</sup>。黄酮类成分拥有能够充当供氢分子的酚氢, 是很强的抗氧化剂, 有良好的抗炎活性<sup>[23]</sup>。芦丁在帕金森病 (PD) 模型中可以增加过氧化氢酶 (CAT) 活性和超氧化物歧化酶 (SOD) 活性<sup>[24]</sup>; 银椴苷可以抑制前列腺素 E2 (PGE2) 的产生和 NF- $\kappa$ B 和 MAPK 信号通路的激活等<sup>[25]</sup>; 槲皮素能通过上调 SOD、CAT 等酶和谷胱甘肽 (GSH) 等非酶抗氧化防御系统来抑制 ROS 介导的肝癌发生<sup>[26]</sup>; 异槲皮苷可增加 SOD 和降低 MDA 水平, 抑制 MEK/ERK 信号通路, 抑制氧化应激反应<sup>[27]</sup>。有机酸类成分中除壬二酸外都是酚酸类, 大量研究表明<sup>[28]</sup>, 酚酸由于分子结构内的多酚羟基具有极强还原性, 是一类典型的具有清除自由基作用的化合物, 例如, 阿魏酸能够提高小鼠血清的抗氧化能力, 改善抗生素对小鼠肠道代谢和炎症反应产生负面的影响<sup>[29]</sup>; 水杨酸可以诱导改善抗氧化酶活性, 减轻活性氧生物氧化等<sup>[30]</sup>。本研究发现这两类成分为木芙蓉叶乙酸乙酯部位的主要化学成分, 进一步揭示了木芙蓉叶

抗氧化和抗炎的药效物质基础以黄酮类成分和有机酸类成分为主。同时,研究还发现了木芙蓉叶中未报道的1个新的黄酮类成分为三叶豆苷,2个新的酚类成分为4-硝基苯酚和4-硝基儿茶酚,1个新的核苷类成分为腺嘌呤,2个新的醛类成分为2,5-二羟基苯甲醛和香草醛,丰富了木芙蓉叶的化学成分库。

综上所述,木芙蓉叶乙酸乙酯部位提取物可以极大地缓解细胞氧化损伤,抵抗氧化应激反应,抑制炎症因子的表达,黄酮类成分和有机酸类成分可能为其药效物质基础,为后续木芙蓉叶抗氧化、抗炎作用机制的深入研究及天然产品的开发利用提供一定理论依据。

### 参考文献

- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:第一部)[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 63.
- Miao XY. Shennong's Herbal Classic (神农本草经)[M]. Traditional Chinese Medicine Classics Press, 2002.
- Chen WY, Yu ZY, Li ZL. Anti-HBV effect of water extract of single drug of Ganduqing prescription *in vitro* [J]. J Chin Med Mater (中药材), 1999, 22: 463-465.
- Fu SC, Luo SH, Zhou LZ, et al. Effect of leaves of *Hibiscus mutabilis* L. on renal ischemia reperfusion injury of rat model [J]. Guangxi Sci (广西科学), 2004, 11: 131-133.
- Shen QH, Qin ZM, Sun ZJ. Experimental study on the effect of *Hibiscus mutabilis* L. extract on chronic liver injury in rats [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 2010, 21: 1273-1274.
- Yan WW, et al. Advances in main chemical constituents of *Hibiscus Mutabilis* Folium [J]. Food Drug (食品与药品), 2019, 21: 239-241.
- Huang LL, Zhen Y, Wang X, et al. Relationship between antioxidant activity and spectrum-effect of *Hibiscus Mutabilis* Folium [J]. Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药学), 2022, 39: 2489-2497.
- Zhao ML. The study of the protection and its mechanism of 2,3,5,6-tetramethylpyrazine against senescence induced by UVA in human dermis fibroblasts [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine (广州中医药大学), 2015: 3-4.
- Ge R, Gao G. Anti-oxidant impacts of circZNF609 silence in HaCaT cells through regulating miR-145 [J]. Artif Cell Nanomed B, 2020, 48: 384-392.
- Morelli S, Piscioneri A, Salerno S, et al. Neuroprotective effect of didymion hydrogen peroxide-induced injury in the neuronal membrane system [J]. Cells Tissues Organs, 2014, 199: 184-200.
- Brune B, Dehne N, Grossmann N, et al. Redox control of inflammation in macrophages [J]. Antioxid Redox Sign, 2013, 19: 595-637.
- Wang SS, Xu HY, Yan M, et al. Characterization and rapid identification of chemical constituents of Naoxintong capsules by UHPLC-linear ion trap/Orbitrap mass spectrometry [J]. J Pharm Biomed Anal, 2015, 111: 104-118.
- Wang Y, Feng LP, Huang LL, et al. Rapid identification on chemical constituents of *Hibiscus mutabilis* flowers by UPLC-Q-Orbitrap HRMS [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2021, 33: 2042-2052.
- Li ZH, Wei Y, Fan Y, et al. Analysis of rutin by electrospray iontrap mass spectrometry [J]. Chin J Anal Lab (分析实验室), 2015, 34: 186-189.
- Liu J, Xu DC, Sui ZY, et al. Study on components in rat serum after oral administration of Mori Cortex by UPLC-Q-TOF-MS/MS [J]. Chin Med Mater (中药材), 2022, 45: 877-881.
- Liu Y. Studies on the determinations of multiresidues multinitrophenols by chromatography [D]. Beijing: Beijing Institute of Technology (北京理工大学), 2014: 90-93.
- Yu HH, Gao XY. Identification of chemical components in capillary wormwood herb by UPLC-Q-TOF/MS<sup>E</sup> [J]. Cent South Pharm (中南药学), 2019, 17: 656-661.
- Xu DC, Sui ZY, Yang Q, et al. Analysis of chemical constituents of Xiebai powder by UPLC-Q-TOF-MS/MS [J]. Chin Arch Tradit Chin Med (中华中医药学刊), 2022, 40: 251-258.
- Shanghai Daily Chemical Industry Association. Anti-wrinkly and firming lifting efficacy test of cosmetics-*in vitro* test method of reactive oxygen species inhibition with keratinocytes (化妆品紧致、抗皱功效测试-体外角质形成细胞活性氧(ROS)抑制测试方法): T/SHRH 032-2020 [S/OL]. [2023-07-10]. <https://www.ttbz.org.cn/StandardManage/Detail/42190/>.
- Shanghai Daily Chemical Industry Association. Test the soothing properties of cosmetics-*in vitro* test method for tumor necrosis factor- $\alpha$  content with lipopolysaccharide-induced macrophage RAW 264.7 (化妆品舒缓功效测试-体外 TNF- $\alpha$  炎症因子含量测定 脂多糖诱导巨噬细胞 RAW264.7 测试方法): T/SHRH 034-2021 [S/OL]. [2023-07-10]. <https://www.ttbz.org.cn/StandardManage/Detail/42793/>.
- Zhou L, Yang Y, Wang X, et al. Berberine stimulates glucose transport through a mechanism distinct from insulin [J]. Me-

- tabolism,2007,56:405-412.
- 22 Xia XD,Huang T,Xue M,et al. Research progress in chemical constituents and pharmacological effects of *Hibiscus mutabilis* L. [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药),2017,39:2356-2360.
- 23 Chen GL,Fan MX,Wu JL,et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of flavonoids from lotus plumule[J]. Food Chem,2019,706-712.
- 24 Agati G,Azzarello E,Pollastri S,et al. Flavonoids as antioxidants in plants:location and functional significance[J]. Plant Sci,2012,196:67-76.
- 25 Grochowski DM,Locatelli M,Granica S,et al. A review on the dietary flavonoid tiliroside[J]. Compr Rev Food Sci Food Saf,2018,17:1395-1421.
- 26 Li ZQ,Wang SN,Wu C,et al. Protective effect of naringenin on hydrogen peroxide-induced injury in Hacat cells [J]. Southwest China J Agric Sci (西南农业学报),2021,34:279-285.
- 27 Chen JB,Wei LB,Li CJ,et al. Effects of isoquercitroside on MEK/ERK/Nrf1 signaling pathway and renal fibrosis in diabetic nephropathy rats[J]. Chin J Integr Tradit West Nephrol (中国中西医结合肾病杂志),2020,21:853-856.
- 28 Sun TM,Li X. Research progress of natural active substances against free radicals[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药),2000,31:191-193.
- 29 Li Y,Wu QH,Yang HL,et al. Effects of ferulic acid on serum antioxidant capacity and intestinal microflora in antibiotic stressed mice[J]. Guangdong Agric Sci(广东农业科学),2021,48:116-125.
- 30 Chen SY,Zhao XH,Liu HZ,et al. Effect of salicylic acid and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatments on antioxidative properties of fresh-cut broccoli florets[J]. Food Sci(食品科学),2015,36:260-264.