

药用植物内生菌对青藤碱的微生物转化筛选

刘发贵, 潘 焯, 邓艾平, 罗 丹, 杨 进, 郭志勇, 邓张双*

三峡大学 天然产物研究与利用湖北省重点实验室, 宜昌 443002

摘要: 为了获得具有抗炎活性的青藤碱衍生物, 建立了药用植物内生菌对青藤碱的生物转化模型, 从 84 株药用植物内生菌中筛选出 5 株对青藤碱具有转化能力的菌株, 利用 TLC 和 NMR 技术对转化产物进行了结构鉴定, 确认为 (*S*)-disinomenine, (*R*)-disinomenine 和 sinomenine *N*-oxide。生物转化为青藤碱的结构改造提供了研究方向。

关键词: 药用植物; 内生菌; 微生物转化; 青藤碱

中图分类号: Q819

文献标识码: A

Screening of Endophytic Fungi from Medicinal Plant for Biotransformation of Sinomenine

LIU Fa-gui, PAN Ye, DENG Ai-ping, LUO Dan, YANG Jin, GUO Zhi-yong, DENG Zhang-shuang*

Hebei Key Laboratory of Natural Products Research and Development, China Three Gorges University, Hubei Yichang 443002, China

Abstract: In order to obtain sinomenine derivatives with anti-inflammatory activity, biotransformation of sinomenine was performed using endophytic fungi from medicinal plants. Among 84 endophytic fungi isolated from medicinal plants, five fungi possessed the capability of biotransforming sinomenine were screened out. The structures of metabolites were identified as (*S*)-disinomenine, (*R*)-disinomenine and sinomenine *N*-oxide by TLC and NMR. Biotransformation is going to provide a new research direction for structural modification of sinomenine.

Key words: medicinal plant; endophytic fungi; biotransformation; sinomenine

青藤碱 (Sinomenine) 是一种天然吗啡烷类生物碱, 拥有抗炎、免疫调节、镇痛、抗肿瘤、降血压、促组胺释放、神经保护等多种药理活性, 临床用于类风湿性关节炎的辅助治疗^[1]。但是, 青藤碱分子结构对光、热、碱不稳定, 且生物利用度低, 易引起肠胃不适等副作用, 限制了青藤碱作为抗炎药物的应用^[2]。为了克服这些缺陷, 国内外学者对青藤碱分子进行了化学结构修饰, 却很少发现抗炎活性突出的青藤碱衍生物^[3]。生物转化反应具有反应条件温和、反应产物立体选择性好、较易获得结构新颖的化合物等特点; 同时符合生物体代谢规律, 发现具有生理活性的代谢产物几率高^[4]。

关于青藤碱的生物转化研究国内外报道较少。陈磊^[5]报道了真菌 *Cunninghamella* M2 转化青藤碱为羟基青藤碱, 但是没有给出转化产物的结构式。

课题组在前期研究过程中, 发现真菌 *Antrodiaella semisupina* 能催化青藤碱和愈创木酚形成碳碳和碳氧交叉偶联产物 1 和 2^[6], 且能选择性的催化青藤碱及类似物转化为 (*S*)-双青藤碱类结构 3 和 4^[6-8]。Joyeau Roger 等^[9]人发现青藤碱衍生物 *O*-benzyl-sinomenine 能被真菌 *Mucor plumbeus* ATCC 4740 转化成去氮甲基产物 5 和氮氧化物 6 两种转化产物。课题组借鉴前期研究经验, 继续研究青藤碱的微生物转化反应及转化产物, 本文以药用植物内生菌为研究载体, 建立青藤碱的微生物转化筛选模型, 研究青藤碱与内生菌共培养以后的代谢产物, 以期发现具有高效抗炎效果或者结构新颖的青藤碱衍生物。

1 材料与仪器

1.1 材料与试剂

青藤碱盐酸盐: 购自成都巨龙天然药业生命科技有限公司, 经 HPLC 分析, 纯度 $\geq 97.0\%$ 。GF₂₅₄ 薄层层析硅胶板 (20 mm × 20 mm, 0.25 mm) 和正相硅胶 (300 ~ 400 目) 均购自青岛海洋化学有限公

收稿日期: 2012-11-30 接受日期: 2013-05-28

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31100080); 湖北省自然科学基金项目 (2011CDB177); 三峡大学人才科研启动基金项目 (KJ2011B003)

* 通讯作者 E-mail: d. zhangshuang@ gmail. com

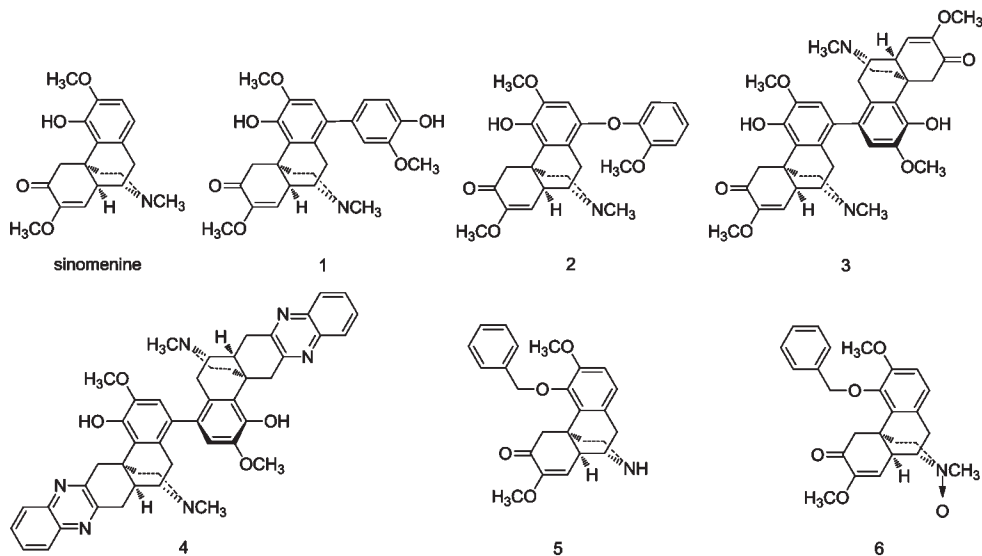


图1 青藤碱微生物转化产物

Fig. 1 Chemical structures of sinomenine and its biotransformed products

司。薄层层析条件:CHCl₃-CH₃OH(9:1, V/V), 254 nm 紫外显色。分析试剂均为色谱纯,常规试剂均为分析纯。

1.2 仪器

¹H NMR、¹³C NMR、¹H-¹H COSY、HMQC 和 HM-BC 谱由 Bruker Avance III-400 核磁共振仪测得,溶剂为 CDCl₃,内标为四甲基硅烷(Tetramethylsilane, TMS),化学位移记为 δ(ppm);化合物分子量由液相色谱-双重漏斗传输离子阱质谱仪(仪器型号为 AmozonSL + 1200,布鲁克·道尔顿公司)测得;微生物培养在恒温摇床 HQD150LB(武汉海声达仪器设备有限公司)上进行。

2 实验方法

2.1 植物组织

采自湖北省神龙架林区,分别为青风藤 [*Sinomenium acutum* (Thunb) Rehd. et Wils.]、夹竹桃 (*Nerium oleander*)、朵云 (*Botrychium daucifolium* Woll)、蛇菰 (*Balanophora japonica*),由三峡大学天然产物研究与利用湖北省重点实验室杨进副教授鉴定。

2.2 斜面培养基(SPM)

将 200 g 去皮土豆切成小块,加适量水煮沸 30 min,用纱布过滤,滤液中加入琼脂 30 g,煮沸,加入葡萄糖 20 g, KH₂PO₄ 3.0 g, MgSO₄ · 7H₂O 1.5 g, 微量维生素 B1, 调节 pH 至 6.0, 定容至 1 L, 用试管分

装(约 10 mL/1 支试管),在 121 °C 下灭菌 20 min。

2.3 微生物转化培养基(SPM)

将 200 g 去皮土豆切成小块,加适量水煮沸 30 min,用纱布过滤,滤液中加入葡萄糖 20 g, KH₂PO₄ 3.0 g, MgSO₄ · 7H₂O 1.5 g, 微量维生素 B1, 调节 pH 至 6.0, 定容至 1 L, 用 250 mL 锥形瓶分装(约 100 mL/1 个锥形瓶),在 121 °C 下灭菌 20 min。

2.4 菌株分离

取部分植物组织放入 75% 左右的酒精溶液(含少量抗生素)中荡洗,接入含抗生素的 PDA 平板中,倒置培养,观察并做好记录,待菌落开始萌发时,将单个菌落转入 PDA 平板上继续培养、分离纯化,并进行斜面保种。

2.5 转化菌株筛选

活化 7 d 的斜面菌种,转接到 100 mL 发酵培养基中,恒温振荡器上培养 4 d(25 °C, 150 rpm),利用无菌滤膜加入青藤碱盐酸盐水溶液 1 mL(20 mg/mL),同样条件下继续培养 4 d,停止培养。将发酵液过滤,滤液用 NH₃ · H₂O 调节 pH 值至 10.0,接着用 CH₂Cl₂ 萃取(100 mL × 3),合并萃取液,无水 Na₂SO₄ 干燥,过滤,旋转蒸干溶剂,得固体粉末。用少量 CHCl₃ 溶解,在 GF₂₅₄ 薄层层析硅胶板上以一定间距点样,展开剂为 CHCl₃-CH₃OH(9:1, V/V), 254 nm 紫外灯下检测,观察紫色斑点位置及大小,确定是否存在转化。同样条件下,分别以培养过程中不添加青藤碱和不接入菌种作为空白对照。

2.6 转化产物的制备

活化 7 d 的斜面菌种,转接到 200 mL 的发酵培养基(SPM)中,恒温振荡器上培养 4 d(25 °C, 150 rpm),利用无菌滤膜加入青藤碱盐酸盐水溶液 1 mL(20 mg/mL),同样条件下继续培养 4d,停止培养。将发酵液过滤,滤液用 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 调节 pH 值至 10.0,接着用 CH_2Cl_2 萃取(200 mL \times 3 \times 10),合并萃取液,无水 Na_2SO_4 干燥,过滤,旋转蒸干溶剂,得固体粉末。经硅胶层析柱、HPLC 半制备柱分离,得转化产物。

3 结果与分析

3.1 青藤碱生物转化菌株的筛选

从青风藤 [*Sinomenium acutum* (Thunb) Rehd. et Wils.]、夹竹桃 (*Nerium oleander*)、朵云 (*Botrychium daucifolium* Woll)、蛇菰 (*Balanophora japonica*) 四种植物组织中利用传统的划线分离方法共得植物内生菌 84 株,保藏在天然产物研究与利用湖北省重点实验室微生物菌种库,暂未做鉴定。采用 PDY 液体发酵方式,将青藤碱与 84 株菌株分别进行共培养,筛选出 7 株具有青藤碱转化能力的微生物菌株,菌株编号分别为 JZT01、JZT11、DY10、SD04、SD06、BY09、Q08。其转化产物经薄层色谱分析(图 2),7 株菌株在青藤碱转化能力上大致分为四种类型:(1) 菌株 Q08 具有完全转化青藤碱的能力,且转化产物单一,经 TLC 分析初步鉴定为 (*S*)-disinomenine;(2) 菌株 JZT11 和 DY10 具有完全降解青藤碱的能力,青藤碱被代谢成小分子后可能作为碳、氮源被微生物生长所消耗;(3) 菌株 SD06、SD04 和 BY09 具有部分转化青藤碱的能力。这三株菌株与青藤碱共培养 4 d 后,青藤碱并未完全转化成代谢产物,经 TLC 分析,初步鉴定转化产物均为 (*S*)-disinomenine 和 (*R*)-disinomenine,其中 (*S*)-disinomenine 为主要产物;(4) 菌株 JZT01 具有较弱的青藤碱转化能力,经 TLC 分析,转化产物非 (*S*)-disinomenine 和 (*R*)-disinomenine,可能是一种具有新结构的代谢产物。但是,该菌株代谢青藤碱的酶活较低,如何通过代谢调控提高酶活力,从而加速青藤碱的转化速度,将是课题组后续努力方向之一。

3.2 青藤碱生物转化产物的分离与结构鉴定

为了进一步确认菌株 SD06、SD04 和 BY09 转化青藤碱的产物为 (*S*)-disinomenine 和 (*R*)-disinomenine,选取菌株 SD04 进行放大培养,加入青藤碱盐酸

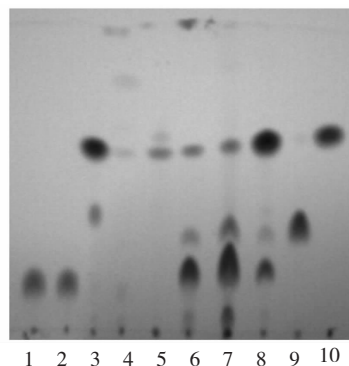


图 2 青藤碱转化产物薄层色谱(TLC)分析

Fig. 2 TLC analysis of sinomenine and its metabolites

图中数字为化合物标准品及微生物代谢产物标识,分别表示为:1:(*S*)-disinomenine;2:Q08;3:JZT01;4:JZT11;5:DY10;6:SD06;7:SD04;8:BY09;9:(*R*)-disinomenine;10:Sinomenine。其中,菌株 Q08 和 BY09 分离自青风藤;JZT01 和 JZT11 分离自夹竹桃;DY10 分离自朵云;SD06 和 SD04 分离自蛇菰。TLC 分析条件:GF₂₅₄薄层层析硅胶板,展开溶剂为 CHCl_3 - CH_3OH (9:1, V/V)。显色条件:碘蒸气熏蒸显色。图中略去微生物自身次生代谢产物 TLC 分析结果。

Symbols:1, (*S*)-disinomenine;2, Q08;3, JZT01;4, JZT11;5, DY10;6, SD06;7, SD04;8, BY09;9, (*R*)-disinomenine;10, Sinomenine. Fungus Q8 and BY09 were isolated from *Sinomenium acutum* (Thunb) Rehd. et Wils.; Fungus JZT01 and JZT11 were isolated from *Nerium oleander*; Fungus DY10 was isolated from *Botrychium daucifolium* Woll; Fungus SD06 and SD04 were isolated from *Balanophora japonica*.

Analytical conditions: Compounds were characterized by thin layer chromatography (GF₂₅₄) developing with 10% methanol in chloroform and observed when TLC plate was exposed to iodine steam. The secondary metabolites from fungus were not displayed in the TLC plate.

盐总计 530 mg,共获得转化产物粗提物 600 mg,经硅胶层析柱吸附, CH_2Cl_2 - CH_3OH (9:1, V/V)淋洗,得转化产物 S1(250 mg,产率 50%,按青藤碱加入量计算),转化产物 S2(100 mg,产率 20%,按青藤碱加入量计算)。对菌株 SD04 与青藤碱共培养的转化产物经过系统分离及 NMR 鉴定,确定青藤碱被真菌 SD04 转化为两种代谢产物 S1 和 S2,分别为 (*S*)-disinomenine 和 (*R*)-disinomenine。

化合物 S1 ^1H NMR(400 MHz, CDCl_3) δ : 6.27 (s, 1H), 6.26 (brs, 1H), 5.45 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 4.41 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.52 (s, 3H), 3.09 (t, $J = 4.0$ Hz, 1H), 3.06 (brs, 1H), 2.56 (dd, $J = 2.6, 11.8$ Hz, 1H), 2.49 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H), 2.43 (dd, $J = 5.4, 18.8$ Hz, 1H), 2.34 (s, 3H), 2.33 (d, $J = 18.8$ Hz, 1H), 2.19 (td, $J = 2.8, 11.9$

Hz, 1H), 2.03 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H), 1.93 (dd, $J = 4.4, 12.8$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 193.9, 152.4, 144.8, 143.7, 130.5, 127.7, 123.2, 115.0, 110.6, 56.2, 55.9, 54.7, 49.2, 47.1, 45.7, 42.9, 40.8, 35.8, 23.8; ESI-MS m/z 657 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。NMR 数据与文献^[6]对照, 鉴定化合物 **S1** 为 (*S*)-disinomenine。

化合物 S2 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 6.44 (s, 1H), 5.30 (brs, 1H), 4.43 (d, $J = 15.7$ Hz, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.52 (s, 3H), 3.02-2.94 (m, 2H), 2.60-2.42 (m, 3H), 2.30 (s, 3H), 2.12-1.96 (m, 2H), 1.90 (td, $J = 4.2, 12.4$ Hz, 1H), 1.77 (dd, $J = 5.0, 18.8$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 193.8, 152.3, 145.0, 143.9, 130.8, 128.0, 123.1, 114.7, 109.4, 56.2, 56.0, 54.3, 49.1, 47.2, 45.5, 43.0, 40.6, 35.6, 22.5; ESI-MS m/z 657 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。NMR 数据与文献^[6,7]对照, 鉴定化合物 **S2** 为 (*R*)-disinomenine。

菌株 JZT01 与青藤碱共培养 (0.15 mg/mL) 5 d 后得发酵液 4 L, 经调碱、萃取得浸膏 200 mg, 硅胶层析柱分离得转化产物 S3 (5 mg, 产率 0.8%, 按青藤碱加入量计算)。

化合物 S3 淡黄色, 无定型粉末, 分子式为 $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO}_5$, 分子量与青藤碱相比, 增加 16。化合物 ^1H NMR 显示化合物 **S3** 含有 22 个质子信号 (未见苯环羟基质子信号), 包括 2 个偶联的芳基质子信号 δ 6.70 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H) 和 δ 6.54 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H); 1 个烯烃质子信号 δ 5.38 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H); 2 个甲氧基质子信号 δ 3.83 (s, 3H) 和 δ 3.49 (s, 3H); 1 个氮甲基质子信号 δ 3.290 (s, 3H); 联合质子偶联常数及 HMQC 谱可分辨 4 个亚甲基质子信号 δ 1.86 (d, $J = 13.2$ Hz, 1H) 和 δ 2.67 (dd, $J = 4.4, 13.2$ Hz, 1H), δ 2.60 (d, $J = 15.2$ Hz, 1H) 和 δ 4.37 (d, $J = 15.2$ Hz, 1H), δ 2.89 (td, $J = 3.2, 12.4$ Hz, 1H) 和 δ 3.12 (dt, $J = 2.0, 12.4$ Hz, 1H), δ 3.06 (d, $J = 19.2$ Hz, 1H) 和 δ 3.293 (dd, $J = 5.6, 19.2$ Hz, 1H); 2 个次甲基质子信号 δ 4.39 (brs, 1H) 和 δ 3.67 (t, $J = 4.4$ Hz, 1H)。 ^{13}C NMR 显示化合物 S3 含有 19 个碳信号, 包括 2 个苯环烯碳信号 δ 118.5 和 δ 113.1; 1 个烯碳信号 δ 109.9; 2 个次甲基碳信号 δ 73.4 和 δ 38.9; 3 个甲基碳信号 δ 58.2、56.2 和 55.0; 4 个亚甲基碳信号 δ 61.3、47.7、31.6 和 29.1; 7 个季碳信号。与青藤碱分子 NMR 谱图相比, 可见

9、14、16 和 17 位的质子信号和碳信号明显移向低场, 其他碳氢信号与青藤碱基本一致, 说明在这 4 个位置的中心碳原子上插入了杂原子。结合上面数据分析, 可以推测在基团 NCH_3 的氮原子上插入了氧原子, 形成了 N 氧化物。NMR 数据与文献^[10]对照, 鉴定化合物 **S3** 为 sinomenine *N*-oxide。

化合物 S3 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.70 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.54 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 5.38 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 4.39 (brs, 1H), 4.37 (d, $J = 15.2$ Hz, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.67 (t, $J = 4.4$ Hz, 1H), 3.49 (s, 3H), 3.293 (dd, $J = 5.6, 19.2$ Hz, 1H), 3.290 (s, 3H), 3.12 (dt, $J = 2.0, 12.4$ Hz, 1H), 3.06 (d, $J = 19.2$ Hz, 1H), 2.89 (td, $J = 3.2, 12.4$ Hz, 1H), 2.67 (dd, $J = 4.4, 13.2$ Hz, 1H), 2.60 (d, $J = 15.2$ Hz, 1H), 1.86 (d, $J = 13.2$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 193.0, 152.7, 146.0, 145.2, 125.4, 121.2, 118.5, 113.1, 109.9, 73.4, 61.3, 58.2, 56.2, 55.0, 47.7, 39.4, 38.9, 31.6, 29.1; ESI-MS m/z 345.9 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。

4 结论

本文建立了药用植物内生菌对青藤碱的生物转化模型, 利用薄层色谱 (TLC) 及 NMR 技术对转化产物进行了结构确认, 为 (*S*)-disinomenine、(*R*)-disinomenine 和 sinomenine *N*-oxide。所得微生物对青藤碱的转化多以双青藤碱为唯一类型的转化产物, 这可能与青藤碱的刚性结构及 4 位羟基有关。青藤碱的刚性结构可能阻碍了与微生物酶的结合, 而青藤碱 4 位羟基易被微生物体内的氧化酶氧化形成偶联产物, 双青藤碱的形成进一步加剧底物与酶的结合位阻, 多方面的原因导致转化产物结构类型单一。为了获得结构丰富的微生物转化产物, 在共培养过程中, 加入氧化酶抑制剂或者改变底物结构 (如保护青藤碱 4 位羟基) 将是我们以后的研究方向。Sinomenine *N*-oxide 首次报道见于 2005 年秦国伟教授等人从植物 *Sinomenium acutum* 中分离得到, 青藤碱在 H_2O_2 存在的条件下, 也会发生氧化反应生成该化合物^[10]。课题组在前期的研究过程中, 发现邻苯二胺能诱导真菌 *Antrodia semisupina* 转化青藤碱为 Sinomenine *N*-oxide, 其生成机制不明确^[11]。本文发现了一种真菌与青藤碱共培养, 在无任何诱导剂存在的情况下, 可以直接氧化青藤碱为 Sinomenine *N*-oxide, 可为氮氧化物合成酶及类似酶促反应提供

一定参考价值。

参考文献

- Wang QX, Li XK. Immunosuppressive and anti-inflammatory activities of sinomenine. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11: 373-376.
- Lou YT, Zhou HB, Zou J, *et al.* Modification of poorly bioactive sinomenine into more potent immunosuppressive agents by embedding of drug-like fragments. *Tetrahedron Lett*, 2010, 51: 485-488.
- Xiao J(肖靛), Deng ZS(邓张双), Li JX(李建新), *et al.* Sinomenine based molecular design of anti-RA agents. *J Huazhong Normal Univ, Nat Sci*(华中师范大学学报, 自科版), 2009, 43: 83-91.
- Bruce NC, Boonstra B, Rathbone DA. Engineering novel biocatalytic routes for production of semisynthetic opiate drugs. *Biomol Eng*, 2001, 18(2): 41-47.
- Chen L(陈磊), Liu Y(刘怡), Lu JQ(卢建秋), *et al.* Synthesis of hydroxy-sinomenine by microbial transformation and optimization of its transformation conditions. *J Beijing Univ TCM*(北京中医药大学学报), 2008, 31: 702-704.
- Deng ZS, Li JX, Teng P, *et al.* Biocatalyzed cross-coupling of sinomenine and guaiacol by *Antrodiaella semisupina*. *Org Lett*, 2008, 10: 1119-1122.
- Deng ZS, Zhao Y, He CC, *et al.* pH-Dependent, stereoselective dimerization of sinomenine. *Org Lett*, 2008, 10: 3879-3882.
- Teng P, Liu HL, Deng ZS, *et al.* Synthesis and biological evaluation of unique stereodimers of sinomenine analogues as potential inhibitors of NO production. *Bioorg Med Chem*, 2011, 19: 3096-3104.
- Joyeau R, Planchon M, Abessolo J, *et al.* Combinatorial approach to the selection of active microorganisms in biotransformation: Application to sinomenine. *J Mol Catal B-Enzym*, 2013, 85-86: 65-70.
- Bao GH, Qin GW, Wang R, *et al.* Morphinane alkaloids with cell protective effects from *Sinomenium acutum*. *J Nat Prod*, 2005, 68: 1128-1130.
- Xiao L(肖靛), Deng ZS(邓张双), Li JX(李建新), *et al.* Induced biotransformation of sinomenine by phenylenediamine. *J Huazhong Univ of Sci & Tech, Nat Sci*(华中科技大学学报, 自科版), 2009, 37(8): 125-128.
- Gao W(高雯), Shen Y(沈阳), Zhang HJ(张红军), *et al.* The chemical constituents of *Potentilla chinensis*. *Pharm Care Res*(药学服务与研究), 2007, 7: 262-264.
- Yi RQ(易润青), Song FY(宋粉云). Determination of saikosaponin a and saikosaponin d in Xiaochaihu granules by capillary electrophoresis. *Chin J Pharm*(中国医药工业杂志), 2012, 43: 47-50.
- Ma YD(马应丹), Chen YJ(陈悦娇). Determination of quercetin in *Ginkgo biloba* L. leaves by TLC-UV. *J Zhongkai Agrotech Coll*(仲恺农业技术学院学报), 2000, 13(3): 43-45.
- Zhao YX(赵永昕), Patigul MHMT(帕提古丽·马合木提), Mahbuba ABDRYM(买合布白·阿不都热依木), *et al.* Determination of quercetin in the different part of the *Sorbus tianschanica* L. by HPLC. *Food Sci*(食品科学), 2006, 27: 471-473.
- Yang B(杨滨), Yue CX(乐崇熙). Morphological and histological studies on folium and stem of *Potentilla*. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 1994, 25(1): 33-36.
- Dong AW(董爱文). Study on extraction, separation and purification of apigenin from *Viola Yedoensis* Makino. *Hunan Agric Univ*(湖南农业大学), PhD. 2008.
- Sun B(孙斌), Qu WJ(瞿伟菁), Zhang XL(张晓玲). Apigenin pharmacological research. *J Chin Med Mater*(中药材), 2004, 27: 531-534.
- Zhao WZ(赵维中), Dei LM(戴俐明), Fang M(方明), *et al.* The studies on pharmacokinetics of quercetin in rabbits. *Chin Pharm Bull*(中国药理学通报), 1992, 8: 452-455.
- Wang YF(王艳芳), Wang XH(王新华), Zhu YT(朱宇同). Advancement of researches in quercetin. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 1991, 22: 182-184.

(上接第 232 页)