

拐枣中总黄酮提取工艺优化及其抗黄嘌呤氧化酶活性研究

许洪波¹,李 铂¹,唐志书¹,李 圆¹,冀 春^{1,2},刘乃尧^{1,2},吴群军³,王 薇^{2*}¹陕西中医药大学陕西省中药资源产业化协同创新中心;²陕西中医药大学药学院,咸阳 712083;³旬阳太极缘生物科技有限公司,安康 725741

摘要:为了研究拐枣总黄酮(TF)最佳提取工艺及其体外抗黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase,XO)活性。在单因素试验基础上,实验选择料液比、提取时间和乙醇浓度为自变量,应用 Box-Behnken 中心组合法进行 3 因素 3 水平试验设计,以拐枣总黄酮得率为响应值,进行响应面分析,并采用 D101 大孔树脂对总黄酮进行进一步富集纯化,在此基础上研究拐枣总黄酮体外抗 XO 活性。结果表明,拐枣总黄酮的最佳提取条件为料液比 15.0 mL/g、提取时间 1.85 h、乙醇浓度 53.0%,在此条件下,拐枣总黄酮的平均提取率可达到 2.56%。体外活性结果表明,我们首次发现拐枣总黄酮具有显著的抗 XO 活性,其 IC₅₀ 为 18.63 ± 1.67 μg/mL。本研究可为从拐枣中寻找和发现天然抗 XO 活性分子提供参考,同时可为拐枣的开发利用提供思路。

关键词:拐枣;黄酮;响应面法;黄嘌呤氧化酶

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)4-0595-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.4.006

Optimization of extraction of total flavonoids from *Hovenia acerba* and its xanthine oxidase inhibitory activity

XU Hong-bo¹, LI Bo¹, TANG Zhi-shu¹, LI Yuan¹, JI Chun^{1,2}, LIU Nai-yao^{1,2}, WU Qun-jun³, WANG Wei^{2*}¹Shaanxi Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization;²College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China;³Xunyang Taijiyuan Biotechnology Co., Ltd., Ankang 725741, China

Abstract: In order to optimize extraction of total flavonoids from *Hovenia acerba* and investigate xanthine oxidase inhibitory activity. Based on the results of single-factor tests, the ratio of liquid to solid, extraction time and ethanol concentration were optimized by response surface analysis. The results showed that the process of optimum extraction were the ratio of liquid to solid of 15:1 (mL:g), ethanol concentration of 53%, extraction time of 1.85 h. Under these conditions, the extraction yield of total flavonoids was 2.56%, which was close to the predicted value. The total flavonoid (TF) was further purified by D101 macroporous resin and evaluated for its xanthine oxidase (XO) inhibitory activities *in vitro*, and the results showed that TF possessed significant enzyme inhibitory action with IC₅₀ value of 18.63 ± 1.67 μg/mL. These results indicated that the optimized extraction technology was reliable and provided a reference for further development and utilization of the *Hovenia acerba*.

Key words: *Hovenia acerba*; flavonoid; response surface methodology; xanthine oxidase

拐枣,又名万寿果,为鼠李科枳椇属枳椇(*Hovenia acerba*)的膨大果序轴(肉质果柄),其上所产种子即为中药枳椇子^[1]。拐枣中含有丰富的维生素、有机酸、氨基酸、糖苷等,是药食两用物品;入药可用

于消渴、解烦止呕等^[1,2]。此外,拐枣还具有重要的经济价值,是饮料、制醋、酿酒的常用原料^[3]。现代化学、药理学及工艺研究多集中在枳椇子方面^[4-8],很少涉及肉质果柄。

我们前期研究表明,拐枣的 50% 乙醇提取物对黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase,XO)具有明显的抑制作用,其 IC₅₀ 为 82.46 ± 5.39 μg/mL;这也是我们首次发现拐枣具有此活性。化学成分预试实验提

收稿日期:2018-11-02 接受日期:2019-03-13

基金项目:国家自然科学基金(81603284);陕西省教育厅自然科学基金研究项目(18JK0214);陕西省重点科技创新团队(2012KTC-20)

*通信作者 Tel:86-29-38182203;E-mail:vivien@sntcm.edu.cn

示,该部位主要含有黄酮类化合物。为了阐明该部位体外抗 XO 的活性物质,本研究选取拐枣为研究对象,首先采用响应面法优化其总黄酮的提取工艺,并在此基础上进一步富集纯化,最后评价所得总黄酮抑制 XO 的活性;研究结果以期为拐枣食品和天然药物开发利用提供参考。

1 材料与仪器

1.1 材料

拐枣收集于陕西安康旬阳县,经陕西中医药大学王薇教授鉴定为鼠李科枳椇属枳椇(*Hovenia acerba* Lindl.) 的肉质果柄(带少量果实)。芦丁对照品(四川省维克奇生物科技有限公司,纯度以 98.0% 计,批号:wkq16101104);黄嘌呤氧化酶、黄嘌呤、别嘌呤醇购自成都西亚化工股份有限公司,EDTA-2Na、 KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 和甲醇、乙醇等试剂均为分析纯。

1.2 仪器

UV-2600 紫外可见分光光度计(日本岛津),EYELA N-1100 旋转蒸发仪(东京理化器械株式会社),HH-2 型电热恒温水浴锅(北京科伟永兴仪器有限公司),FW-1000AD 型快速开盖高速万能粉碎机(天津鑫博得仪器有限公司),CPA2250 型电子天平(赛多利斯公司,读数精度 0.01 mg),KQ-300 DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。全波长酶标仪(Multiskan GO, Thermo Scientific, USA)。

2 实验方法

2.1 样品前处理

拐枣样品放置于鼓风干燥箱内,50 °C 条件下干燥至恒重,取出适当粉碎后保存备用。

2.2 标准曲线的绘制

总黄酮含量的测定采用 NaNO_2 - $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ - NaOH 比色法,以芦丁为对照品。具体步骤如下:精密称定 20 mg 芦丁对照品于 100 mL 容量瓶中,用 60% 乙醇溶液稀释并定容至刻度线,摇匀,即得浓度为 0.2 mg/mL 的芦丁对照品溶液。精确吸取对照品溶液 0.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 mL 于 25 mL 容量瓶中,加入 5% NaNO_2 溶液 1.0 mL,摇匀后静置 6 min,加入 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液 1.0 mL,放置 6 min,加入 10% NaOH 溶液 10.0 mL,再加 60% 乙醇溶液定容至刻度线,摇匀后放置 15 min。在 510 nm 处测定各浓度样品吸光度,以芦丁浓度(C)和吸光度(A)分别为横、纵坐标,绘制标准曲线并计算回

归方程为: $A = 5.8114C + 0.0942$ ($R^2 = 0.9993$),表明所测黄酮在 0.02 ~ 0.18 mg/mL 质量浓度范围内与吸光度有良好的线性关系。

2.3 单因素试验

准确称取 10 g 干燥的拐枣粉末,浸泡 0.5 h 后,在设定的实验条件下(考察提取次数、料液比、乙醇浓度和提取时间四个因素)回流提取,将提取液过滤,(合并)滤液浓缩至约 50 mL,转移至 100 mL 容量瓶中,用 60% 乙醇定容至刻度,摇匀作为样品溶液。精密吸取 1.0 mL 样品溶液,转移至 10 mL 容量瓶中,再用 60% 乙醇定容至刻度,摇匀,按照标准曲线绘制方法操作,测定吸光度,根据标准曲线计算出测定稀释后样品溶液总黄酮浓度 C。然后计算样品中总黄酮的提取率,总黄酮提取率计算公式如下:

$$\text{提取率}(\%) = [\text{黄酮的质量浓度}(\text{mg/mL}) \times \text{稀释倍数} \times \text{最初溶液体积}(\text{mL}) \times 10^{-1}] / \text{原料质量}(\text{g})$$

2.4 响应面实验

在单因素实验的基础上,选取料液比(A)、提取时间(B)和乙醇浓度(C)为考察因素,以总黄酮提取率为响应值,根据 Box-Behnken 实验设计原理,采用三因素三水平的响应面实验表,用 Design Expert 8.0 进行试验数据分析,最后通过模型验证确认总黄酮最佳提取条件。Box-Behnken 试验设计因素及水平见表 1。

表 1 响应面分析因素及水平表

Table 1 Factors and levels of response surface experiment

水平 Level	因素 Factors		
	A 料液比 Ratio of liquid to solid (mL/g)	B 提取时间 Extraction time (h)	C 乙醇浓度 Ethanol concentration (%)
-1	10	1.5	40
0	15	2	50
1	20	2.5	60

2.5 总黄酮的富集纯化

将经最优工艺提取的提取液,减压浓缩至无醇味,吸附于适量处理过的 D101 大孔树脂色谱柱($10 \times 80 \text{ cm}^2$)中,先用 30% 乙醇洗脱至颜色变浅,然后用体积分数 70% 的乙醇洗脱液进行洗脱,直到流出的洗脱液颜色明显变浅,将该部分洗脱液收集,浓缩即得纯化的拐枣总黄酮。

2.6 抑制黄嘌呤氧化酶活性测试

实验所用的缓冲溶液、底物溶液、酶液配置参照

前期建立的方法^[9],活性测试方法及步骤简述如下:

精密称取拐枣总黄酮适量,用缓冲液溶解备用,活性测试使用酶标仪,溶液总体积为 100 μL ,反应时先依次向 96 孔板加入样品 20 μL ,酶液 40 μL ,在酶标仪内 37 摄氏度孵育三分钟,之后加入底物黄嘌呤 40 μL ,启动反应,立即在 295 nm 处记录吸收度值(每隔 30 s 一次),共计 5 min。本实验设置样品组(加样品、底物和酶)、酶组(加底物和酶但不加样品)、空白组(只加底物和样品不加酶)和阳性对照组(别嘌呤醇)。抑制率(%)用下列公式计算:抑制率(%) = $(\Delta A_{\text{酶}} - \Delta A_{\text{样品}}) / (\Delta A_{\text{酶}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times 100$ 。其中 ΔA 指一定时间内吸光度的差值。

3 结果与讨论

3.1 单因素试验

3.1.1 提取次数对提取率的影响

称取样品 10 g,设定乙醇浓度 60%,料液比 1:20,提取时间 2 h,考察提取次数(1、2、3、4 次)对总黄酮提取率的影响。由于朱新鹏^[10]等研究表明,拐枣总黄酮在温度大于 80 $^{\circ}\text{C}$ 时,稳定性较差,因此,本研究固定提取温度为 80 $^{\circ}\text{C}$ 。实验结果表明(图 1A),提取次数越多提取率越大,但提取 2 次后提取率增加不明显。考虑到时间和经济成本,选取提取次数为 2 次。

3.1.2 料液比对提取率的影响

称取样品 10 g,固定乙醇浓度 60%,提取温度

80 $^{\circ}\text{C}$,回流提取两次,每次提取 2 h,考察料液比分别为 1:10、1:15、1:20、1:25、1:30 时对提取率的影响。结果如图 1B 所示,随着提取溶剂量的增加,黄酮提取率呈现先快速增长而后下降的趋势。增加提取溶剂用量,可以使物料与溶剂充分接触,同时可以使更多的物质溶解于溶液中,从而有助于提升总黄酮的提取率。但本试验结果表明,当料液比超过 1:15 g/mL 时,总黄酮提取率趋于平缓,超过 1:20 g/mL 时反而有所下降,这可能是由于溶剂过多,在热回流作用下,拐枣中非黄酮类成分大量溶出,影响了总黄酮的得率。考虑到溶剂成本,选择 1:15 g/mL 为适宜料液比。

3.1.3 乙醇浓度对提取率的影响

取样品 10 g,分别以 40%、50%、60%、70%、80% 的乙醇溶液为提取溶剂,料液比 1:20,回流提取两次,每次 2 h,提取温度为 80 $^{\circ}\text{C}$,考察乙醇浓度对拐枣总黄酮提取率的影响。结果如图 1C 所示,提取率随乙醇浓度递增呈先增加后减少的变化趋势,在乙醇浓度为 50% 左右时,总黄酮的提取率较好。这可能的原因是:黄酮类化合物在植物中通常以苷的形式存在,我们推测拐枣中黄酮苷类物质较多,因此,50% 左右的乙醇提取效果较好,随着乙醇浓度增大,一些醇溶性杂质成分溶出量增加,反而导致黄酮类化合物的提取率下降。

3.1.4 提取时间对提取率的影响

取样品 10 g,设定乙醇浓度 60%,回流提取两

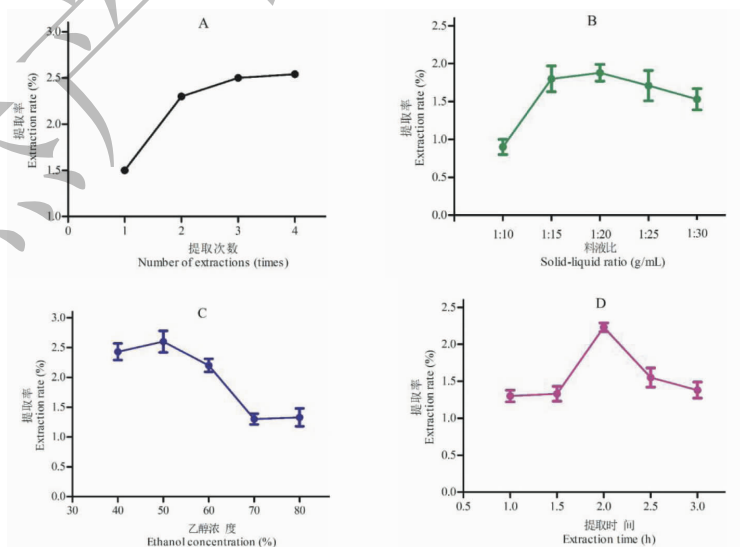


图 1 提取次数(A)、料液比(B)、乙醇浓度(C)及提取时间(D)对总黄酮提取率的影响

Fig. 1 Effects of number of extractions (A), solid-to-liquid ratio (B), ethanol concentration (C) and extraction time (D) on the yield of total flavonoids

次,提取温度 80 ℃,每次分别回流提取 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h,考察提取时间对总黄酮提取率的影响。图 1D 显示提取时间在 1~1.5 h 之间,提取时间对拐枣总黄酮提取率的总体影响不大,提取时间超过 2 h 后提取率反而减少了。这可能是提取时间增长,一方面某些黄酮类化合物可能发生结构变化,另一方面可能因为随着提取时间的增长,植物细胞中的粘液等杂质溶出使提取液粘度增大,影响提取率。

3.2 响应面设计试验结果及分析

在单因素试验基础上,固定提取次数和提取温度,以料液比(A)、乙醇浓度(B)、提取时间(C)为自变量,以总黄酮提取率为响应值,设计 17 次试验,其中析因部分试验 12 次,中心点重复试验 5 次,结果见表 2。试验以随机次序进行,利用 Design Expert 8 软件对数据进行多元回归拟合,得到总黄酮提取率 Y 的函数: $Y=2.52 + 0.016A - 0.13B + 0.30C + 0.027AB - 0.050AC + 0.087BC - 0.33A^2 - 0.20B^2 - 0.51C^2$ 。

为了检验回归方程的有效性,进一步确定各因素对拐枣总黄酮提取率的影响程度,我们对回归模型进行了方差分析(表 3)。由表 3 可知,模型的 $F=105.00$ 、 $P < 0.0001$,差异极显著;失拟项的 P 值

为 $0.2065 > 0.05$,差异不显著,说明方程对实验有较好的拟合性,实验误差较小。决定系数 $R^2 = 0.9926$ 和校正决定系数 $R_{Adj}^2 = 0.9832$ 也表明模型拟合程度较好,响应值的变化有 98.32% 来源于所选因素,即来源于料液比、提取时间和乙醇浓度,说明该模型拟合度好,回归方程能很好的解释响应值的变异,该实验方法可靠^[11]。变异系数(C.V.)为 2.69% 说明模型的重现性较好,该模型可用于优化拐枣总黄酮提取的工艺条件。

模型中一次项 B 和 C ,二次项 A^2 、 B^2 和 C^2 的 P 值均小于 0.01,交互项 BC 的 P 值小于 0.05,说明提取时间、乙醇浓度、提取时间的交互项以及 3 个因素的二次项都具有显著影响;而其他交互项和料液比的显著性较差,表明实验因素对响应值不是简单的线性关系,而是一种非线性关系^[11]。

响应曲面坡度越陡峭,表明响应值对于操作条件的改变越敏感,反之曲面坡度越平缓,操作条件的改变对响应值的影响也就越小。图 2 直观的反映了各因素对响应值的影响程度,乙醇浓度对拐枣总黄酮提取率的影响最为显著,表现为曲线较陡,其次为提取时间和料液比,表现为曲线较平缓。

表 2 响应面设计试验设计及结果

Table 2 Response surface design arrangement and experimental results

试验编号 No.	A 料液比 Ratio of liquid to solid (mL/g)	B 提取时间 Extraction time (h)	C 乙醇浓度 Ethanol concentration (%)	Y 提取率 Extraction rate (%)
1	20	1.5	50	2.13
2	15	1.5	40	1.71
3	15	2	50	2.58
4	15	2	50	2.49
5	20	2	60	1.98
6	15	2	50	2.52
7	15	1.5	60	2.11
8	15	2.5	40	1.34
9	15	2	50	2.47
10	10	2	40	1.28
11	15	2.5	60	2.09
12	10	2.5	50	1.79
13	10	2	60	2.02
14	20	2	40	1.44
15	20	2.5	50	1.85
16	10	1.5	50	2.18
17	15	2	50	2.54

表 3 回归方程的方差分析

Table 3 Analysis of variance for the fitted regression model

方差来源 Variance source	平方和 SS	自由度 DF	均方和 MS	F 值 F-value	P 值 P-value	显著性 Significance
模型 Model	2.81	9	0.31	105.00	< 0.000 1	**
A	0.002 1	1	0.002 1	0.71	0.427 3	
B	0.14	1	0.14	47.21	0.000 2	**
C	0.74	1	0.74	248.11	< 0.000 1	**
AB	0.003	1	0.003	1.02	0.346 9	
AC	0.010	1	0.010	3.36	0.109 4	
BC	0.031	1	0.031	10.29	0.014 9	*
A ²	0.47	1	0.47	156.47	< 0.000 1	**
B ²	0.17	1	0.17	56.61	0.000 1	**
C ²	1.08	1	1.08	364.52	< 0.000 1	**
残差 Residual	0.021	7	0.003			
失拟项 Lack of fit	0.013	3	0.004 5	2.42	0.206 5	
纯误差 Pure error	0.007 4	4	0.001 8			
总和 Cor total	2.83	16				
$R^2 = 0.992 6$		$R^2_{Adj} = 0.983 2$				

注: ** $P < 0.01$ 为极显著; * $P < 0.05$ 为显著。

Note: ** $P < 0.01$, indicates extremely significant difference; * $P < 0.05$, indicates significant difference.

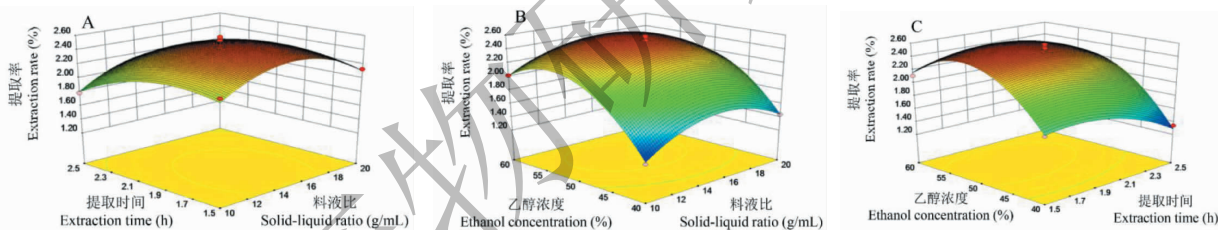


图 2 各提取因素之间的交互影响

Fig. 2 Response surface plots showing the mutual effects of different factors on the yield of flavones

3.3 最佳工艺条件及验证试验

用 Design Expert 8 软件对二次多项式回归方程进行计算,得到最佳的提取条件为:料液比为 14.96 mL/g、提取时间 1.86 h、乙醇浓度 52.76%,预测提取率为 2.58%。但考虑到实际操作和生产的局限性,将提取工艺调整为:料液比为 15.0 mL/g、提取时间 1.85 h、乙醇浓度 53.0%。根据此条件并在浸泡 0.5 h,提取温度 80 °C,提取 2 次条件下进行了 3 次平行验证实验,得到拐枣总黄酮的平均提取率为 2.56%,相对标准偏差为 1.74%,表明试验重复性良好。验证结果与模型的预测值接近,表明此响应面法得到的回归模型具有较好的可靠性。

3.4 拐枣总黄酮的进一步富集纯化

上述工艺优化所得的物质其实是含有拐枣总黄

酮的提取物,优化的目的只是使总黄酮尽可能的提取出来,但其在提取物中的含量比较低;因此,我们需要进一步富集纯化,得到含量较高的拐枣总黄酮,以进行后续研究。

经过 2.5 项下方法富集纯化后,拐枣提取物总黄酮纯度达到 63.15%。

3.5 体外抑制黄嘌呤氧化酶活性测试

黄嘌呤氧化酶是一种可催化次黄嘌呤和黄嘌呤生成尿酸的蛋白酶^[12]。正常人体中 XO 活性被调控在正常水平,但体内代谢紊乱,就可能导致 XO 活性过高,会使体内尿酸生成增加,进而导致高尿酸血症(hyperuricemia, HUA)^[13,14]。HUA 不仅与痛风密切相关,而且是代谢性疾病(糖尿病、代谢综合征、高脂血症等)、心血管疾病、慢性肾病、脑卒中等的

独立危险因素^[15]。临床上通过抑制黄嘌呤氧化酶活性,从而减少尿酸生成是治疗 HUA 的重要途径之一。但临床上使用的黄嘌呤氧化酶抑制剂(xanthine oxidase inhibitors, XOI)主要有两个,即别嘌呤醇(allopurinol)和非布司他(febuxostat),它们虽然可明显降低血尿酸水平,但也有存在较多副作用和局限性。目前,由于中药具有多成分,多靶点,低毒、有效等特点,因此从中药中寻找天然 XOI 具有特殊的优势。

我们前期对拐枣的 50% 乙醇提取物进行了活性筛选,首次发现拐枣 50% 乙醇提取物具有明显的抗 XO 活性,其 IC_{50} 为 $82.46 \pm 5.39 \mu\text{g/mL}$ 。本研究在此基础上,主要考察拐枣总黄酮在体外对 XO 的抑制作用。活性试验采用前期构建的活性测试方法^[9],测试了拐枣总黄酮在 6.25、12.5、25.0、50.0、100.0 $\mu\text{g/mL}$ 浓度时对 XO 的抑制作用(图 3),结果表明拐枣总黄酮在 25 $\mu\text{g/mL}$ 时即对 XO 有明显抑制,抑制率为 $(75.36 \pm 3.97)\%$;经 GraphPad Prism 5 软件计算其 IC_{50} 为 $18.63 \pm 1.67 \mu\text{g/mL}$,阳性对照别嘌呤醇的 IC_{50} 为 $7.24 \pm 0.33 \mu\text{g/mL}$ 。活性研究表明,黄酮类成分可能是拐枣 50% 乙醇提取物中具有抗 XO 活性的物质。

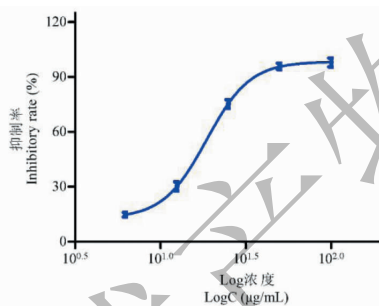


图 3 拐枣总黄酮抑制黄嘌呤氧化酶的量效关系曲线

Fig. 3 The dose-effect relationship curve for total flavonoids of *Hovenia acerba* inhibiting XO

4 结论

本研究利用响应面法设计优化拐枣总黄酮的提取工艺,得到最佳工艺条件为:料液比为 15.0 mL/g、提取时间 1.85 h、乙醇浓度 53.0%,在此条件下预测提取率为 2.58%,实际提取率为 2.56%,理论值与实际值相符,表明试验可靠。本模型可用于拐枣黄酮的提取制备,可为拐枣黄酮的工业化、规模化开发利用提供参考。

体外抗 XO 活性结果表明,拐枣总黄酮具有显著的抗 XO 活性,其 IC_{50} 为 $18.63 \pm 1.67 \mu\text{g/mL}$,活

性研究结果提示,拐枣黄酮可能是拐枣 50% 乙醇提取物中具有抗 XO 活性的物质。本研究可为从拐枣中寻找和发现天然抗 XO 活性分子提供参考,同时可为拐枣的开发利用提供思路。

参考文献

- Li HB, Wu SH, Wang LX, et al. The research of fresh *Hovenia dulcis* juice's protective effect on alcoholic liver disease in mice[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med(中药药理与临床), 2018, 34: 108-113.
- Zhang B, Li LT, Zhang M, et al. Optimization of extraction technology of *Hovenia acerba* sticks polysaccharides and its antioxidant activity[J]. China Brew(中国酿造), 2016, 35: 155-160.
- Ren QL, Lin B, Zhou Y, et al. Therapeutic effect of *Hovenia acerba* extract on renal calculi in rats[J]. China J Mod Med(中国现代医学杂志), 2017, 27: 24-27.
- Zhang XQ, Xu FF, Wang L, et al. Two pairs of new diastereoisomeric flavonolignans from the seeds of *Hovenia acerba* [J]. Phytochem Lett, 2012, 5: 292-296.
- Xu FF, Zhang XQ, Zhang J, et al. Two methyl-migrated 16, 17-seco-dammarane triterpenoid saponins from the seeds of *Hovenia acerba* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2012, 14: 135-140.
- Zhang J, Li HP, Gong XJ, et al. Research advances in chemical constituents of the genus *Hovenia* and their pharmacological activities [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2006, 18: 674-680, 666.
- Wen W, Zhang H, Zeng R. Optimization of extracting conditions of Zhijuzi by alcohol [J]. Herald Med(医药导报), 2008, 27: 77-79.
- Tian ZY, Chai Z, Xu YF, et al. Optimizing the ultrasonic extracting method of total flavonoids from *Hovenia dulcis* Thunb by orthogonal design [J]. J Henan Univ: Med Ed(河南大学学报:医学版), 2015, 34: 247-251.
- Xu HB, Zhou R, Xie P, et al. Xanthine oxidase inhibitory activity of some Chinese medicinal plants [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2017, 28: 547-548.
- Zhu XP, Yu MM, Feng J, et al. Study on stability of total flavonoids from *Hovenia dulcis* Thunb [J]. Food Fer Sci&Tech(食品与发酵科技), 2017, 53: 68-71.
- Wang ZC, Jiang YR, Liu XW, et al. Optimization of extraction of total flavonoids from *zingiber officinale* Roscoe stem and leaves using response surface methodology and evaluation of its antioxidant activity [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2015, 27: 1582-1588.