

聚酰胺柱制备银杏叶黄酮提取物方法研究

丁楠^{1,2}, 郑亚纯^{1,2}, 何厚洪^{1,2}, 徐斌^{1,2}, 姚建标^{1,2}, 金朱明^{1,2}, 王如伟^{1,2*}

¹浙江康恩贝制药股份有限公司; ²浙江省中药制药技术重点实验室, 杭州 310052

摘要:为建立银杏叶提取物(GBE)中黄酮组分相似的、高含量的银杏叶黄酮提取物(GBFE)的工艺方案。筛选优化了二次聚酰胺柱层析工艺方案,得到了总黄酮含量>92%的GBFE,并开发了2''-(6''-*p*-香豆酰基-葡萄糖基-鼠李糖基)槲皮素(CGQ)为参照的紫外分光光度计法检测总黄酮含量的方法。经二次柱层析,分别使用碳酸钠、乙醇洗脱,可去除大部分非黄酮物质,同时大部分黄酮成分保留。该方法得到GBFE总黄酮转移率>60%,黄酮部分与GBE相似度高。同时通过放大实验表明该工艺稳定性好,可进一步用于放大生产。

关键词:银杏;黄酮;提取物;检测方法;工艺研究

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)Suppl-0132-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.S.019

Study of preparing flavonoid extract of *Ginkgo* leaves with polyamide chromatography

DING Nan^{1,2}, ZHENG Ya-chun^{1,2}, HE Hou-hong^{1,2},
XU Bin^{1,2}, YAO Jian-biao^{1,2}, JIN Zhu-ming¹, WANG Ru-wei^{1,2*}

¹Zhejiang CONBA Pharmaceutical Co., Ltd.;

²Zhejiang Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Pharmaceutical Technology, Hangzhou 310052, China

Abstract: In order to obtain the high purity flavonoid and seamier composition *Ginkgo* leaves flavonoids extract (GBFE) from *Ginkgo* leaves extract (GBE). The UV spectrophotometer total flavonoids test method was built with 2''-(6''-*p*-coumaroylglucosyl) quercitrin (CGQ) as standard; Though twice polyamide column tomography process, the total flavonoids of GBFE is more than 92%. During the twice polyamide column method screened, Na₂CO₃ and ethanol solutions were chosen as eluent. And most impurities were separated with flavonoids. In this process, the total flavonoids recovery ratio is more than 60%, and similarity with GBE of flavonoids part. By the pilot experiments, the process is stability and suitable for production.

Key words: *Ginkgo biloba*; flavone; extract; testing method; preparation process

银杏叶提取物(*Ginkgo biloba* extract, GBE)是广泛用于心脑血管疾病的天然植物药,主要成分为黄酮、内酯、有机酸等成分,其中黄酮为主要的活性与指标物质。黄酮类物质因其酚羟基结构表现出重金属络合以及抗氧化作用^[1]。其中有报道表明银杏中槲皮素糖苷可以降低血压,其机理不同于血管紧张素(ACE)、内皮素-1等而可能是在血管收缩过程中加快超氧化物或过氧化氢的消除^[2,3];其他临床报道表明槲皮素糖苷可以增强血管功能、抗免疫、抗感染等功能^[4-6]。银杏中的山柰酚糖苷则表现出抗

凝血作用,其机理为PI3K/Akt/PKB信号通路的调控^[7]。而银杏中的异鼠李素糖苷可通过激活Nrf2提高抗氧化酶表达^[8],其中包括低浓度血管扩张剂血红素氧化酶(HO1),可催化游离血红素对胆红素和一氧化碳的降解,也是脑卒中研究中保护的关键位点^[9]。

银杏中黄酮大部分为3位或7位糖苷,其苷元包括槲皮素、山柰酚、异鼠李素、杨梅素、木犀草素、芹菜素、丁香亭、二氢山柰酚等^[10],糖苷成分主要为D-葡萄糖、L-鼠李糖、芸香糖等单糖、二糖、三糖结构^[11]。银杏中还含有一些特有黄酮类成分,如2''-(6''-*p*-coumaroyl glucosyl) quercitrin (CGQ)、kaempferol 3-(6''-*p*-coumarylglucosyl-rhamnoside)等

收稿日期:2020-03-24 接受日期:2020-05-15

基金项目:国家重点研发计划(2017YFD0601301)

*通信作者 Tel:86-571-87774766; E-mail: wangrw@conbagroup.com

含有对香豆酰的黄酮糖苷,这类对香豆酰黄酮苷被认为是银杏中活性最强的物质^[12]。其中CGQ作为银杏叶提取物中含量最高的黄酮单体^[13]。CGQ(分子量756.7)被美国药典(USP)设定为银杏叶提取物黄酮的平均分子量,中国药典、美国药典以及欧洲药典中均使用总黄酮醇苷作为质量标准,其公式为总黄酮醇苷=(槲皮素+异鼠李素+山柰酚)(平均校正因子(2.51)或各自校正因子(槲皮素2.504、异鼠李素2.437、山柰酚2.588),即黄酮苷元折算成为CGQ含量^[14]。综上,CGQ可以作为银杏独有,且活性最强、含量最高的代表性物质。在检测方法上,如上述多国药典使用三种苷元折算,可以评价银杏中的黄酮醇苷元品质,但其他黄酮苷元(如杨梅素、二氢山柰酚等)物质未能检测到,总黄酮代表性有限。也有报道使用紫外可见分光光度计检测,通过三氯化铝显色,以芦丁为对照测定银杏相关制剂中总黄酮含量,但芦丁代表性差,也不能真实的体现黄酮含量^[15]。因此可选用CGQ作为对照,进行银杏总黄酮的检测可以更好的评价总黄酮含量。

银杏叶提取物中高纯度黄酮报道有限,其中有报道使用反相硅胶半制备柱进行制备不适合用于放大实验研究^[16]。也有报道使用改性的非极性大孔吸附树脂与聚酰胺填料联用进行高黄酮醇苷提取物的制备工艺研究,该方法黄酮转移率低(20%±7%),仅以黄酮醇苷含量作为检测指标,无法更好的体现总黄酮苷中各黄酮含量特征^[17]。

为此,本研究组为获得高含量、黄酮成分与GBE相似的银杏叶黄酮提取物,选用更具有代表性的黄酮单体作为参照开发了总黄酮含量测定法;同时使用两次聚酰胺柱层析法进行工艺优化,获得一种可工业生产化的与GBE高黄酮相似度的、高转移率的银杏叶黄酮提取物(GBFE)工艺路线。

1 实验材料与仪器

1.1 实验材料

银杏叶提取物来自浙江康恩贝制药股份有限公司,芦丁购于中国食品药品检定研究院,2''-(6''-*p*-coumaroylglucosyl) quercitrin(CGQ,含量98.04%)为自制,聚酰胺(30~60目)购自河北华众化工有限公司,其他分析试剂均为分析纯试剂。

1.2 实验仪器

电子天平(型号MSA 225S-1CE-DU,赛多利斯),电导率仪(型号DDSJ-308F,上海仪电科学仪器股份有限公司),紫外分光光度计(型号Lambda365,

帕金埃尔默),旋转蒸发器(型号R-205,BUCHI),真空干燥箱(型号DZF-6050,上海精宏),纯水机(型号A10,密理博),高效液相色谱仪(型号1260,安捷伦),超高效液相色谱仪(型号I-Class,沃特世)。

2 方法

2.1 总黄酮检测方法研究

2.1.1 紫外波长选择

各吸取CGQ(0.2 mg/mL)、芦丁(0.2 mg/mL)、银杏叶提取物(GBE)(0.5 mg/mL)0.5 mL,置10 mL量瓶中,加加醋酸-醋酸钠缓冲液(pH4.5)和0.1 mol/L三氯化铝溶液各2 mL,摇匀,加70%乙醇至刻度,摇匀。使用紫外分光光度计扫描200~800 nm光谱,确定总黄酮检测最佳波长。

2.1.2 标准曲线研究

取对照CGQ对照品2 mg(105 °C干燥5 h),精密称定,分别置10 mL量瓶中,加70%乙醇使溶解并稀释至刻度,摇匀,即得(每1 mL含CGQ 0.2 mg)。精密量取上述溶液0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL,分别置10 mL量瓶中,加醋酸-醋酸钠缓冲液(pH4.5)和0.1 mol/L三氯化铝溶液各2 mL,摇匀,加70%乙醇至刻度,摇匀;以相应的试剂为空白,照紫外-可见分光光度法(通则0401)试验,在270 nm波长处测定吸光度,以吸光度为纵坐标,浓度为横坐标,绘制标准曲线。

2.1.3 重复性与中间精密度研究

制备供试品溶液(0.5 mg/mL)6份,按标准曲线研究“置10 mL量瓶中”起依法测定吸收度,检测,计算重复性。3名人员各自不同时期制备供试品溶液(0.5 mg/mL)2份,按标准曲线研究“置10 mL量瓶中”起依法测定吸收度,检测,共6份样品计算中间精密度。

2.1.4 准确性研究

取供试品溶液(0.5 mg/mL)6份,分别精密量取供试品溶液折总黄酮0.128 mg置10 mL量瓶中,精密加入对照品0.128 mg,按标准曲线研究“置10 mL量瓶中”起依法测定吸收度,检测,计算加样回收率。

2.1.5 样品测定

取本品约25 mg,精密称定,置50 mL量瓶中,用70%乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀。精密量取0.5 mL,置10 mL量瓶中,照标准曲线制备项下的方法,自“置10 mL量瓶中”起依法测定吸收度,从标准曲线上读出供试品溶液中相当于CGQ的浓度,即得。

2.2 树脂筛选

2.2.1 静态吸附与解吸附实验

取聚酰胺(30~60目)、HPD-100、DM-2树脂30 mL,置锥形瓶中,分别加入GBE溶液,密塞,振摇,使其达到吸附平衡,静置24 h,吸取适量上清液,检测,计算饱和吸附量。

2.2.2 填料初筛

取GBE 5 g,4份,加10%乙醇制成1% GBE溶液,分别过聚酰胺、HPD-100、DM-2(柱体积260 mL,内径5.5 cm,湿法装柱),依次用水、0.5%碳酸钠溶液各6BV洗脱,收集0.5%碳酸钠洗脱液,用25%盐酸调至pH=3;分别过DM-2、HPD-100吸附柱(柱体积25 mL,内径2.8 cm,湿法装柱)、聚酰胺柱(30~60目,50 mL,内径2.8 cm,湿法装柱),先用4BV水洗脱,再用4BV 70%乙醇洗脱,收集70%乙醇洗脱液,浓缩、干燥、粉碎、检测总黄酮含量。探讨最佳填料用于研究。

2.3 聚酰胺一次过柱纯化

2.3.1 上样浓度的确定

室温下,GBE分别以5、10、15、20 mg/mL,上于聚酰胺柱上,(柱体积260 mL,内径5.5 cm,湿法装柱),流速1 BV/h,收集流出液,检测总黄酮含量,计算吸附于填料中总黄酮。确定上样浓度。

2.3.2 上样流速的确定

室温下,优选上样浓度的上样液上于聚酰胺柱,流速分别为1、2、3 BV/h。收集流出液,检测总黄酮含量,计算上样过程中损失的黄酮。确定上样流速。

2.3.3 水洗脱参数的确定

根据确定的上样参数,上样后,分别以1、2、3 BV/h洗脱4 BV,每BV收集,检测总黄酮含量,同时参考《中国药典》2015年版银杏叶提取物内酯检测色谱条件检测水洗液中总内酯的含量,计算被洗脱下的黄酮与内酯量。确定水洗流速与水洗体积。

2.3.4 洗脱溶剂参数确定

根据确定的上样、水洗参数进行上样水洗后,分别以0.1%、0.25%、0.5%碳酸钠水溶液以2 BV/h洗脱5 BV,检测总黄酮含量,再各自浓度碳酸钠洗脱液合并,调节pH至弱酸性,上于同规格聚酰胺柱,先用4 BV水洗脱,再用4 BV 70%乙醇洗脱,收集70%乙醇洗脱液,浓缩、干燥、粉碎、检测总黄酮含量。随后,按优选合适的浓度,取GBE重新上样、水洗,以确定的浓度、体积碳酸钠溶液分别以1、2、3 BV/h洗脱5 BV,每0.5 BV检测计算总黄酮含量,

并同上进行二次过柱、干燥、粉碎,测定总黄酮含量与转移率。确定洗脱溶剂浓度、流速、体积。

2.4 聚酰胺二次过柱纯化

2.4.1 上样参数的确定

黄酮物质变化较少,因此参考一次过柱方案进行上样。

2.4.2 水洗脱参数的确定

根据确定的步骤,进行一次过柱,并进行二次过柱上样后,以1、2、3 BV/h洗脱4 BV,每BV收集,检测总黄酮含量,同时通过离子计检测离子浓度,确定水洗流速与水洗体积。

2.4.3 洗脱溶剂参数确定

根据确定的步骤,进行一次过柱、二次过柱的上样与水洗后,分别以50%、70%、95%乙醇以2 BV/h洗脱6 BV,收集每BV,检测总黄酮含量,再各自浓度乙醇洗脱液合并浓缩、干燥、粉碎、检测总黄酮含量。随后,按优选合适的浓度与收集体积参数,取GBE重新过柱至乙醇洗脱,分别以1、2、3 BV/h洗脱,干燥、粉碎,测定总黄酮含量与转移率。确定洗脱溶剂浓度、流速、体积。

2.5 中试研究

根据确定的层析工艺参数进行中试放大,使用聚酰胺柱(直径20 cm,柱体积30 L)进行柱层析,重复三次,分别检测三次结果的总黄酮含量与转移率。

2.6 样品指纹图谱对比

2.6.1 色谱条件

色谱条件以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(Phenomenx Luna Omega, 100 mm × 2.1 mm, 1.6 μm);以乙腈为流动相A,以0.1%甲酸溶液为流动相B,按下表中的规定进行梯度洗脱;流速为每分钟0.4 mL;柱温为30 ℃;检测波长为360 nm。

表1 超高效液相色谱洗脱梯度

Table 1 UPLC gradient elution

时间 Time(min)	A(%)	B(%)
0~8	16→20	84→80
8~9	20→25	80→75
9~15	25→30	75→70
15~16	30→50	70→50
16~16.5	50→18.5	50→81.5

2.6.2 样品对比

取GBE与GBFE约10 mg,精密称定,置10 mL

量瓶中,加 50% 甲醇溶解并稀释至刻度,滤过,取续滤液,为供试液。精密吸取参照物溶液 1 μL 与供试品溶液 2 μL ,进行超高效液相色谱检测,记录色谱图,进行对比。

3 结果

3.1 检测方法学研究

3.1.1 紫外显色波长选择

银杏叶提取物、CGQ 与芦丁经显色后在 270 nm 处有紫外吸收峰,见图 1。结果表明,芦丁可通过添加校正因子替代 CGQ 检测 GBE 总黄酮含量。

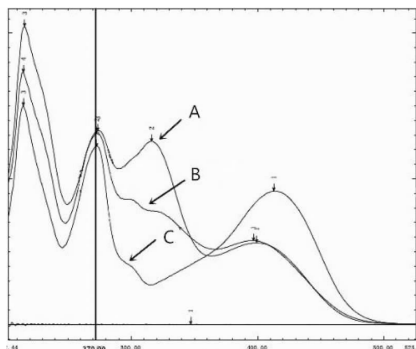


图 1 显色后紫外扫描图谱

Fig. 1 UV scanning after color reaction

注:A:CGQ;B:GBE;C:芦丁(rutin)。

3.1.2 标准曲线

照检测方法绘制标准曲线,得到对照品线性范围,回归方程为: $y = 35.691 3x + 0.004 6$ ($R^2 = 1.000 0$),CGQ 在 0.003 9 ~ 0.023 6 mg/mL 浓度范围内线性关系良好。

3.1.3 重复性与中间精密密度

经计算,重复性 RSD = 0.69%、中间精密密度 RSD = 1.0%。说明方法重复性与中间精密密度良好。

3.1.4 准确度

经计算,平均回收率为 101.6%,RSD = 0.67%,准确度良好。

3.2 树脂筛选

3.2.1 静态吸附

3 种填料饱和吸附量分别为:聚酰胺为 57.3 mg/mL、HPD-100 为 81.0 mg/mL、DM-2 为 76.1 mg/mL,设定上样量为静态最大吸附量 40% 左右,故上样量初步设定为 20、30、36 mg/mL。

3.2.2 填料筛选

结果表明 DM-2、HPD-100、聚酰胺填料柱层析得到提取物总黄酮含量分别为 71.7%、70.2%、84.1%。选用聚酰胺填料进行柱层析可以显著的提

高总黄酮含量,因此使用聚酰胺填料进行进一步优化。

3.3 聚酰胺一次过柱

3.3.1 上样浓度的确定

随着上样浓度增大,相同体积树脂上保留的总黄酮量趋于平稳并趋于下降,见图 2。上样浓度为 10mg/mL,总黄酮保留量最大,可能是由于浓度提高后上样液悬浊,影响树脂吸附特征。因此优选上样浓度为 10mg/Kg。

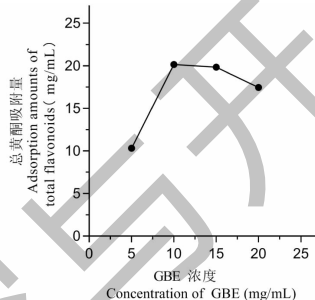


图 2 GBE 吸附等温线

Fig. 2 Static isotherm adsorption curves of GBE

3.3.2 上样流速的确定

分别 1、2、3 BV/h 流速下流出液中分别损失黄酮 1.3%、2.8%、2.8%,结果表明流速越大,黄酮损失越多,因此优先 1 BV/h 作为上样流速。

3.3.3 水洗脱参数的确定

水洗的目的为去除不含有与聚酰胺吸附的杂质化合物,如萜类内酯等化合物。因此将内酯的洗脱作为参考指标检测,结果如图 3,流速越大,黄酮被洗脱的量逐渐提高,但内酯的洗脱速度不明显,因此洗脱流速优选 1 BV/h,当水洗至 3 BV,内酯基本被洗脱下来,因此优选 3 BV。

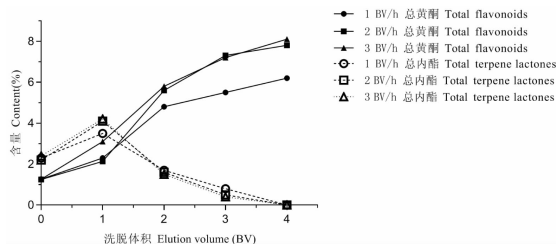


图 3 GBE 动态吸附等温线

Fig. 3 Static isotherm adsorption curves of GBE

3.3.4 洗脱溶剂的参数确定

用碳酸钠洗脱,可改变环境 pH,进而改变黄酮等化合物离子状态,将黄酮与非黄酮成分区分,由于银杏叶提取物中大部分杂质无法确定成分,因此需

要通过全部柱层析后对终产物进行总黄酮检测来评价杂质的去除作用。0.1%、0.25%、0.5% 碳酸钠洗脱后终产品总黄酮含量分别为 84.9%、80.0%、80.3%，优选 0.1% 碳酸钠溶液进行洗脱。

对 0.1% 碳酸钠分别用 2、3、4 BV/h 洗脱，检测总黄酮转移率，见图 4。洗脱结果表明，0.1% 碳酸钠洗脱流速与体积对黄酮洗脱影响不大，结合生产实际，优选 2~3 BV/h 洗脱并收集 0.5~4.5 BV。

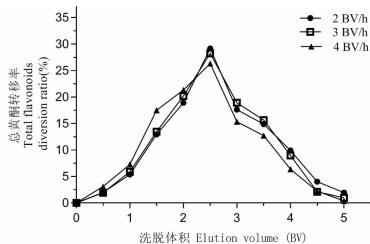


图 4 0.1% 碳酸钠洗脱曲线

Fig. 4 Elution curve of 0.1% Na_2CO_3

3.4 聚酰胺二次过柱

3.4.1 上样参数确定

由于一次过柱黄酮损失较少，因此用稀盐酸将 pH 调节至弱酸性，参考一次过柱方案流速进行上样。

3.4.2 水洗参数确定

二次过柱中由于引入了碳酸钠以及调节 pH 的盐酸，会有较多离子干扰，因此水洗除去离子。参考一次过柱水洗流速，通过离子计检测电导率，结果见图 5，相关离子在水洗第 3 BV 基本洗脱完全，因此优选水洗体积为 3 BV。

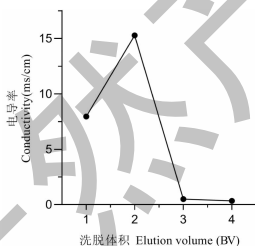


图 5 电导率曲线

Fig. 5 Curve of conductivity

3.4.3 洗脱溶剂的参数确定

使用乙醇洗脱，可改变填料的氢键吸附能力，由于黄酮与非黄酮成分对不同浓度乙醇的解吸附能力不同，同样银杏叶提取物中大部分杂质无法确定成分，因此需要通过全部柱层析后对终产物进行总黄酮检测来评价杂质的。优选 50 乙醇溶液进行洗脱。

对 50% 乙醇分别用 2、3、4 BV/h 洗脱，检测总

黄酮转移率，结果见图 6，洗脱结果表明，0.1% 碳酸钠洗脱流速与体积对黄酮洗脱影响不大，结合生产实际，优选 2~3 BV/h 洗脱并收集 0.5~4 BV。

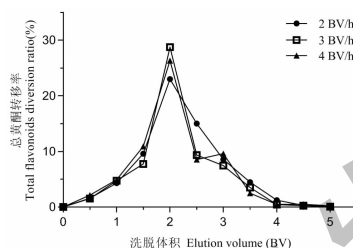


图 6 50% 乙醇洗脱曲线

Fig. 6 Elution curve of 50% EtOH

3.5 中试研究

进行 3 批中试放大研究，检测三批银杏叶黄酮提取物含量与转移率见表 2，结果表明，该方法可经过放大，其总黄酮含量 >92%，转移率 >60%，工艺稳定。

表 2 中试实验 GBFE 样品总黄酮含量与转移率

Table 2 GBFE total flavonoids contents and diversion ratio of Pilot test

样品 Sample	总黄酮含量 Total flavonoids content (%)	转移率 Diversion ratio (%)
GBFE-1	92.6	63.7
GBFE-2	95.4	66.9
GBFE-3	94.3	66.3

3.6 指纹图谱对比研究

将“3.5”中得到的银杏叶黄酮提取物通过指纹图谱检测，结果见图 7，对比银杏叶提取物与银杏黄酮提取物，表明主要黄酮物质(峰 1~12)基本均保留。

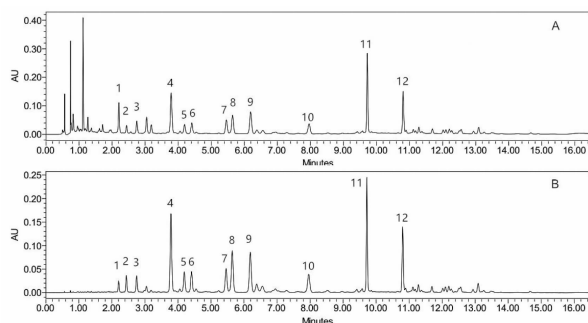


图 7 GBE 与 GBFE 超高效液相色谱色谱图

Fig. 7 GBE and GBFE in UPLC

注:A:GBE;B:GBFE。

将指纹图谱各个峰面积积分进行统计，见图 8，通过峰面积比表明，在 GBFE 精制过程中，原料 GBE

中峰 1~3 存在部分损失,为反相 UPLC 中极性较大部分损失较为明显,但整体相似度较高,大部分黄酮的占比基本保留。

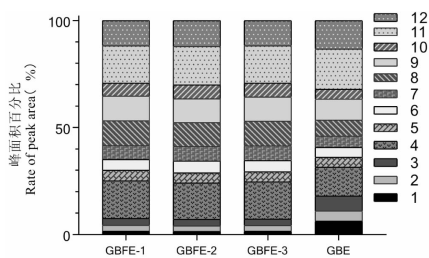


图 8 GBE 与 GBFE 中 12 个峰的峰面积百分比

Fig. 8 The rate of peak area of GBE and GBFE in 12 peaks

4 讨论

银杏叶提取物中,2''-(6''-*p*-coumaroylglucosyl) quercitrin(2''-(6''-*p*-香豆酰基-葡萄糖基-鼠李糖基)槲皮素,CGQ)作为含量最高、药效最强、银杏中特有的黄酮苷类化合物,也作为银杏中特征性黄酮,使用该物质作为进行总黄酮检测的参照,可以更好的体现银杏叶黄酮提取物中黄酮的真实含量。

相关文献报道关于银杏黄酮的精制报道,均以总黄酮醇苷等检测进行评价,在柱层析过程中接收的部位较少,总体回收率较低,同时由于没有指纹图谱等信息,只能作为银杏叶提取物源的黄酮提取。本实验室首次引入液相 UPLC 指纹图谱检测进行对比,通过液相图谱表明,银杏叶黄酮提取物中黄酮成分接近银杏叶提取物,最大程度的保持了银杏叶提取物中的黄酮特征,同时产品纯度高,可代表银杏叶提取物中黄酮类物质进行进一步研究。

聚酰胺柱层析主要依靠氢键吸附,银杏叶提取物中含有萜类、糖类成分,通过水洗既可去除,同时有机酸类成分在水中多为电离状态,水洗能够使有机酸电离并随着水洗脱出;极性柱层析一般使用有机溶剂进行洗脱,很少使用弱酸或弱碱性盐溶剂洗脱,由于黄酮含有酚羟基为弱酸性物质,弱碱环境使黄酮解离成离子状态破坏氢键吸附的特征进而与填料解吸附,相似极性的非酚酸类化合物则会吸附在层析柱中,达到纯化的作用。二次柱层析使用乙醇洗脱,又可以将提取物中氢键吸附较强的物质与黄酮分离,最终达到纯化的目的。本方案经过放大验证,工艺稳定,纯度高,转移率较高,为银杏叶总黄酮的精制建立了良好的应用前景。

参考文献

- Gohil K, Moy RK, Farzin S, et al. mRNA expression profile of a human cancer cell line in response to *Ginkgo biloba* extract; induction of antioxidant response and the Golgi system [J]. *Free Radic Res*, 2000, 33: 831-849.
- Larson A, Witman MA, Guo Y, et al. Acute, quercetin-induced reductions in blood pressure in hypertensive individuals are not secondary to lower plasma angiotensin-converting enzyme activity or endothelin-1; nitric oxide [J]. *Nutr Res*, 2012, 32: 557-564.
- Just A, Olson AJ, Whitten CL, et al. Superoxide mediates acute renal vasoconstriction produced by angiotensin II and catecholamines by a mechanism independent of nitric oxide [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 292 (1): H83-H92.
- Dower JJ, Geleijnse JM, Gijssbers L, et al. Supplementation of the pure flavonoids epicatechin and quercetin affects some biomarkers of endothelial dysfunction and inflammation in (pre)hypertensive adults: a randomized double-blind, placebo-controlled, crossover trial [J]. *J Nutr*, 2015, 145: 1459-1463.
- Javadi F, Eghtesadi S, Ahmadzadeh A, et al. The effect of quercetin on plasma oxidative status, C-reactive protein and blood pressure in women with rheumatoid arthritis [J]. *Int J Prev Med*, 2014, 5: 293-301.
- Konrad M, Nieman DC, Henson DA, et al. The acute effect of ingesting a quercetin-based supplement on exercise-induced inflammation and immune changes in runners [J]. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*, 2011, 21 (4): 338-346.
- Choi JH, Park SE, Kim SJ, et al. Kaempferol inhibits thrombosis and platelet activation [J]. *Biochimie*, 2015, 115: 177-186.
- Yang JH, Shin BY, Han JY, et al. Isorhamnetin protects against oxidative stress by activating Nrf2 and inducing the expression of its target genes [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2014, 274: 293-301.
- Shah ZA, Nada SE, Dore S. Heme oxygenase 1, beneficial role in permanent ischemic stroke and in *Ginkgo biloba* (EGb 761) neuroprotection [J]. *Neuroscience*, 2011, 180: 248-255.
- Tang YP, Lou FC, Wang JH, et al. Studies on the constituents of flavonoids from *Ginkgo biloba* leaves [J]. *Chin Pharm J (中国药学杂志)*, 2001, 36 (4): 15-17.
- Smith JV, Luo Y. Studies on molecular mechanisms of *Ginkgo biloba* extract [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 64: 465-472.