

# 制何首乌提取物及主要单体成分体外对酪氨酸酶活性的影响

石璐缘, 李登科, 崔宝弟, 付莹, 冯光远, 赵晨, 孙震晓\*

北京中医药大学中药学院生物制药系, 北京 100102

**摘要:** 采用蘑菇酪氨酸酶多巴速率氧化法, 体外评价制何首乌水提取物、乙醇提取物各分离组分及大黄素, 大黄素甲醚, 大黄素-8-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷, 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷等制何首乌主要单体成分对体外酪氨酸酶活性的影响。结果未在制何首乌中发现能够体外有效激活酪氨酸酶活性的成分, 制何首乌水提取物, 制何首乌乙醇提取物的50%乙醇洗脱物及95%乙醇洗脱物, 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷皆有浓度依赖的酪氨酸酶抑制活性, 其中2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷在48  $\mu$ g/mL的浓度下即可达到46.72%的抑制率, 具有美白产品研发价值。

**关键词:** 酪氨酸酶活性; 制何首乌提取物; 大黄素; 大黄素甲醚; 大黄素-8-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷; 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

## Effect of the Extracts and Main Monomer Components of Processed *Polygonum multiflorum* on Activity of Tyrosinase *in vitro*

SHI Lu-yuan, LI Deng-ke, CUI Bao-di, FU Ying, FENG Guang-yuan, ZHAO Chen, SUN Zhen-xiao\*

Department of Biopharmaceutical Sciences, School of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

**Abstract:** This paper investigated the effect of water extract, separated parts of ethanol extract from processed *Polygonum multiflorum* and the monomer components including emodin, physcion, emodin-8-*O*- $\beta$ -D-glucoside and 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-*O*- $\beta$ -D-glucoside (THSG) on the tyrosinase activity *in vitro* by measuring the oxidation rate of L-DOPA. The results showed that none of the tested substance could activate the tyrosinase activity effectively. Conversely, 50% ethanol and 95% ethanol eluted components from the ethanol extract of processed *Polygonum multiflorum*, water extract of processed *Polygonum multiflorum* and THSG inhibited the tyrosinase activity in a concentration dependent manner. THSG exhibited a significant tyrosinase inhibitory activity (reached 46.72%) at the concentration of 48  $\mu$ g/mL, which indicated that THSG has potential value in developing skin whitening product.

**Key words:** Tyrosinase activity; Extracts from processed *Polygonum multiflorum*; emodin; physcion; emodin-8-*O*- $\beta$ -D-glucoside; 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-*O*- $\beta$ -D-glucoside

何首乌始载于《开宝本草》,为蓼科植物何首乌 (*Polygonum multiflorum* Thunb.) 的干燥块根,根据炮制与否其功效大有不同,生用可解毒、消痈、润肠通便,制何首乌则具有补肝肾、益精血、乌须发等功效<sup>[1]</sup>。制何首乌作为一种传统的乌发良品广为人知,《本草纲目》赞其“养血益肝,固精益肾,健筋骨,乌髭发,为滋补良药”,且在八宝丹、神仙乌云丹等乌发古方中均有收录。然而制何首乌功善乌发的作用机制目前尚不明确。

白发的病因与发病机理复杂,现代医学研究认为,可能与遗传、衰老、疾病等导致的黑素干细胞衰老、黑素细胞减少等有关,机制包括 bcl-2 基因缺失、氧化损伤、氧化应激、微量元素缺乏等,其中,酪氨酸酶 (tyrosinase) 表达量减少或活性降低是一个重要的因素<sup>[2,3]</sup>。酪氨酸酶是体内黑素合成的主要限速酶,酪氨酸酶活性降低将使体内黑素合成的反应进行得十分缓慢<sup>[4]</sup>。目前研究表明,何首乌的主要成分有蒽醌类化合物、二苯乙烯苷类化合物、磷脂和微量元素等<sup>[5]</sup>,本实验选用制何首乌不同分离部位及其所含主要单体成分进行实验,考察制何首乌是否是通过某种分离部位或有效单体成分直接激活酪氨酸酶的催化活性从而促进黑素的合成,为进一步研

收稿日期: 2013-10-09 接受日期: 2013-11-11

基金项目: 北京中医药大学自主选题项目 (500102-0100605070; 532-0100604266)

\* 通讯作者 Tel: 86-10-84738646; E-mail: sunzxcn@hotmail.com

究制何首乌乌发机制提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和仪器

制何首乌药材购自北京同仁堂饮片有限责任公司,批号 701001037,产地为湖北,由北京中医药大学中药学院中药生药系张贵君教授鉴定;蘑菇酪氨酸酶(tyrosinase),L-多巴,均购自美国 Sigma 公司;丙二醇,乙酸乙酯试剂均为分析纯;2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷(2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- $\beta$ -D-glucoside; THSG),大黄素(Emodin),大黄素甲醚(Physcion),大黄素-8-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷(Emodin-8-O- $\beta$ -D-glucoside)为标准品,购自中国药品生物制品检定所。

酶标仪(Spectra Max190,美国分子仪器公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 制何首乌提取分离物制备方法

参考文献<sup>[6]</sup>,取制何首乌饮片 200 g,用 70% 乙醇(V/V)提取 2 次,第 1 次加 10 倍量溶剂,提取 2 h,第 2 次加 8 倍量溶剂,提取 1.5 h,合并 2 次乙醇提取液,回收溶剂至无醇味,加水分散,通过 AB-8 型大孔树脂吸附,依次用水、50% 乙醇、95% 乙醇洗脱至洗脱液无色,分别收集各洗脱液,减压回收溶剂至干,残留物减压干燥,分别得到制何首乌水洗脱物(water eluted extract of processed *Polygonum multiflorum*, PW),50% 乙醇洗脱物(50% ethanol eluted extract of processed *Polygonum multiflorum*, P50),95% 乙醇洗脱物(95% ethanol eluted extract of processed *Polygonum multiflorum*, P95)。另制何首乌饮片 200 g,水煎煮提取,第 1 次加 10 倍量水,提取 2 h,第 2 次加 8 倍量水,提取 1.5 h,合并两次水煎液,水浴蒸干,减压干燥,得制何首乌水提物(water extract of processed *Polygonum multiflorum*, PWE)。

#### 1.2.2 制何首乌提取物及受试单体溶液配制

根据提取物及受试单体成分溶解性不同溶解方式及测定体系有所不同。水溶性成分如制何首乌水提物(PWE),制何首乌水洗脱物(PW),制何首乌 50% 乙醇洗脱物(P50),2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷(THSG)用去离子水溶解至受试浓度。脂溶性成分如制何首乌 95% 乙醇洗脱物(P95),大黄素,大黄素甲醚,大黄素-8-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷需以混合溶剂( $V_{\text{丙二醇}}:V_{\text{乙酸乙酯}}=9:1$ )溶解至受试浓度。

### 1.2.3 测定方法

#### 1.2.3.1 制何首乌中各水溶性成分对酪氨酸酶活性影响测定

参考文献<sup>[7]</sup>,采用蘑菇酪氨酸酶多巴速率氧化法测定酪氨酸酶活性。取 96 孔板酶标板,反应物共 0.2 mL,37 °C 孵育 10 min 后,加 0.15% L-多巴 0.1 mL,再孵育 2 min,用酶标仪于 475 nm 处测定吸光度 A 值(A475)。每种药物浓度实验均重复至少三次。

每种药物均分为 4 组,其中

a 组为:PH6.8 磷酸盐缓冲液 0.19 mL,蘑菇酪氨酸酶 0.01 mL(200 u/mL)。

b 组为:PH6.8 磷酸盐缓冲液 0.2 mL。

c 组为:PH6.8 磷酸盐缓冲液 0.18 mL,蘑菇酪氨酸酶 0.01 mL(200 u/mL),药物 0.01 mL。

d 组为:PH6.8 磷酸盐缓冲液 0.19 mL,药物 0.01 mL。

按以下公式计算药物对酪氨酸酶的激活率。

酪氨酸酶激活率(%) = ((C-D)-(A-B))/(A-B) × 100 %

其中 ABCD 分别为 abcd 四组的吸光度值。

#### 1.2.3.2 制何首乌中脂溶性成分对酪氨酸酶活性影响测定

参考文献<sup>[8]</sup>,取 96 孔板酶标板,反应物共 0.15 mL,室温孵育 10 min 后,加 0.15% L-多巴 0.07 mL,室温孵育 15 min,用酶标仪于 490 nm 处测定吸光度 A 值(A490)。每种药物浓度实验均至少重复三次。

每种药物均分为 4 组,其中

a 组为:PH6.8 磷酸盐缓冲液 0.13 mL,蘑菇酪氨酸酶 0.01 mL(200 u/mL),混合溶剂 0.01 mL( $V_{\text{丙二醇}}:V_{\text{乙酸乙酯}}=9:1$ )。

b 组为:PH6.8 磷酸盐缓冲液 0.14 mL,混合溶剂 0.01 mL( $V_{\text{丙二醇}}:V_{\text{乙酸乙酯}}=9:1$ )。

c 组为:PH6.8 磷酸盐缓冲液 0.13 mL,蘑菇酪氨酸酶 0.01 mL(200 u/mL),药物 0.01 mL。

d 组为:PH6.8 磷酸盐缓冲液 0.14 mL,药物 0.01 mL。

按以下公式计算药物对酪氨酸酶的激活率。

酪氨酸酶激活率(%) = ((C-D)-(A-B))/(A-B) × 100 %

其中 ABCD 分别为 abcd 四组的吸光度值。

## 2 结果与讨论

### 2.1 制何首乌水溶性成分对酪氨酸酶活性的影响

按 1.2.3.1 方法进行酪氨酸酶活性影响测定,结果如表 1 所示。其中,每 1 g 制何首乌水提物

表 1 制何首乌水溶性成分对酪氨酸酶活性的激活率 ( $\bar{x} \pm s, n \geq 3$ )

Table 1 The activation rate of water-soluble extracts from processed *Polygonum multiflorum* on tyrosinase activity

受试药物 Tested substance	浓度 Concentration (mg/mL)	激活率 Activation rate (%)
制何首乌 50% 乙醇洗脱物低浓度 P50-L	0.05	-22.13 ± 11.28
制何首乌 50% 乙醇洗脱物中浓度 P50-M	0.1	-34.41 ± 2.55 **
制何首乌 50% 乙醇洗脱物高浓度 P50-H	0.5	-48.71 ± 10.21 ***
制何首乌水洗脱物低浓度 PW-L	0.06	-5.71 ± 3.59
制何首乌水洗脱物中浓度 PW-M	0.6	-6.98 ± 1.96
制何首乌水洗脱物高浓度 PW-H	6	-17.73 ± 8.71
制何首乌水提物低浓度 PWE-L	0.78	-27.76 ± 6.90 *
制何首乌水提物中浓度 PWE-M	2.34	-41.81 ± 9.41 **
制何首乌水提物高浓度 PWE-H	3.9	-51.75 ± 9.92 ***
2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷低浓度 THSG-L	0.012	-24.42 ± 6.14 *
2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷中浓度 THSG-M	0.024	-32.89 ± 2.82 **
2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷高浓度 THSG-H	0.048	-46.72 ± 5.49 ***
空白对照 Control	-	-2.48 ± 15.91

注:与空白对照组比较,\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ 。

Note: Compare with control, \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

由表 1 中可见,制何首乌各水溶性成分激活率结果均为负值,说明制何首乌各水溶性成分对酪氨酸酶无激活作用,反而不同程度浓度呈依赖性地抑制酪氨酸酶活性,其中,制何首乌 50% 乙醇洗脱物(P50),制何首乌水提物(PWE),2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷(THSG)在高浓度水平下均对酪氨酸酶产生了显著的抑制效果,如 P50 在 0.5 mg/mL 浓度下,对酪氨酸酶活性抑制率为 48.71 ± 10.21%,PWE 在 3.9 mg/mL 浓度下,对酪氨酸酶活性抑制率为 51.75 ± 9.92%,而 THSG 在 48

(PWE) 相当于 6.272 g 生药,1 g 制何首乌水洗脱物(PW)相当于 18.0 g 生药,1 g 制何首乌 50% 乙醇洗脱物(P50)相当于 21.6 g 生药。表 1 中药物浓度均为实用受试药物浓度。

μg/mL 浓度下,对酪氨酸酶活性抑制率可达 46.72 ± 5.49%,但 PW 在最高实验浓度 6 mg/mL 下对酪氨酸酶活性却无明显影响。

### 2.2 制何首乌脂溶性成分对酪氨酸酶活性影响结果

按 1.2.3.2 方法进行酪氨酸酶活性影响测定,结果如表 2 所示。其中,每 1 g 制何首乌 95% 乙醇洗脱物(P95)相当于 909.1 g 生药。表 2 中药物浓度均为实用受试药物浓度。

表 2 制何首乌脂溶性成分对酪氨酸酶活性的激活率 ( $\bar{x} \pm s, n \geq 3$ )

Table 2 The activation rate of liposoluble components from processed *Polygonum multiflorum* on tyrosinase activity

受试药物 Tested substance	浓度 Concentration (μg/mL)	激活率 Activation rate (%)
大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷低浓度 Emodin-8-O-β-D-glucoside-L	1.08	4.24 ± 3.68
大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷中浓度 Emodin-8-O-β-D-glucoside-M	10.8	3.52 ± 6.29
大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷高浓度 Emodin-8-O-β-D-glucoside-H	108	2.33 ± 5.41
大黄素甲醚低浓度 Physcion-L	0.5	0.16 ± 3.37
大黄素甲醚中浓度 Physcion-M	5	5.64 ± 3.95

大黄素甲醚高浓度 Physcion-H	50	4.84 ± 4.81
大黄素低浓度 Emodin-L	25	3.12 ± 2.19
大黄素中浓度 Emodin-M	250	3.11 ± 6.51
大黄素高浓度 Emodin-H	500	-26.93 ± 17.91 **
制何首乌 95% 乙醇洗脱物低浓度 P95-L	183	-8.32 ± 3.31
制何首乌 95% 乙醇洗脱物中浓度 P95-M	365	-14.18 ± 0.49 **
制何首乌 95% 乙醇洗脱物高浓度 P95-H	3650	-37.89 ± 9.94 ***
空白对照 Control	-	1.18 ± 7.28

注:与空白对照组比较, \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ 。

Note: Compare with control, \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .

由表 2 可见,在制何首乌脂溶性各成分中,无体外条件下有效激活酪氨酸酶活性的成分,大黄素-8-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷与大黄素甲醚对酪氨酸酶活性均无明显影响,但 0.5 mg/mL 的大黄素对酪氨酸酶有 26.93 ± 17.91% 的显著抑制作用,3.65 mg/mL 的制何首乌 95% 乙醇洗脱物对酪氨酸酶有 37.89 ± 9.94% 的极显著抑制作用,且抑制作用呈明显的浓度依赖性。

### 2.3 讨论

在人体内,黑素的合成主要先由酪氨酸羟化生成多巴,多巴氧化生成多巴醌,二羟基吲哚转化生成吲哚醌,这些反应步骤均需酪氨酸酶参与<sup>[4]</sup>。酪氨酸酶是黑素生成的主要限速酶,在黑色素生成过程中起着至关重要的作用,其化学结构为铜结合糖蛋白。有研究认为何首乌的蒽醌衍生物对酪氨酸酶活性存在显著的促进作用<sup>[9]</sup>,2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷能够有效激活黑色素瘤细胞内酪氨酸酶的活性及酪氨酸酶相关基因的表达<sup>[10]</sup>,这些皆可能为何首乌乌发的作用机制。本实验结果表明,大黄素,大黄素甲醚,大黄素-8-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷,2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷等制何首乌主要单体成分及制何首乌各分离部位在体外条件下均无酪氨酸酶激活作用,而制何首乌水提物、制何首乌乙醇提取物的 50% 乙醇洗脱物及 95% 乙醇洗脱物、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷、大黄素等皆表现出了一定的酪氨酸酶抑制活性。由结果看来,制何首乌脂溶性成分中大黄素可能起到了主要的抑制作用。何冰芳<sup>[11]</sup>等的研究也显示,大黄素对酪氨酸酶有显著的竞争性抑制作用,50% 抑制率的药物浓度为 36.6  $\mu$ g/mL,与本实验的研究结果一致。目前已报道的何首乌乌发机制研究多从酪氨酸酶活性及表达量等切入,如姜泽群<sup>[12]</sup>等人研究认为,何首乌可通过上调 B16 黑色素瘤细胞内

的酪氨酸酶表达量及酪氨酸酶活性促进黑素的生成,但根据对制何首乌各成分体外对酪氨酸酶活性影响的实验结果,并未筛到激活酪氨酸酶活性成分。虽然我们目前的体外研究数据不支持制何首乌可以通过激活酪氨酸酶活性发挥乌发作用,制何首乌及其体内代谢物作用于黑色素细胞后对酪氨酸酶活性的影响尚待进一步研究确定。制何首乌是否可能通过其他途径促进黑色素细胞中黑素的生成,或通过抗氧化损伤保护黑色素干细胞以及黑色素细胞从而保证黑素的正常合成,抑或通过其他机制产生乌发效果还有待进一步研究。

值得一提的是,酪氨酸酶的活性研究同样是美白制剂研发的重点,酪氨酸酶活性降低可减少肌肤产生的黑色素,从而达到美白的效果<sup>[13]</sup>。本实验发现,在体外条件下,2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷在 48  $\mu$ g/mL 极低浓度下即可产生 46.72 ± 5.49% 的酪氨酸酶抑制效果,达到极显著水平,可见其具有美白的潜在功效。目前常用于皮肤美白添加剂的有曲酸及其衍生物,果酸,维生素 C 等,这些美白添加剂各自都存在一定的副作用,如曲酸及其衍生物稳定性差且长期使用仍有细胞毒性,果酸中的主要成分  $\alpha$ -羟基酸则易导致晒伤甚至皮肤癌,维生素 C 皮肤吸收性差且不稳定。开发稳定、低毒的天然酪氨酸酶抑制剂美白产品具有广阔的前景。2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷为植物源的纯天然提取物,水溶性强,细胞毒性小(未发表结果),且班翊<sup>[14]</sup>等对其稳定性进行研究发现二苯乙烯苷在中性及弱碱性水溶液中 30 d 含量无明显变化,稳定性好,另外,吕丽爽等<sup>[15]</sup>采用聚酰胺柱层析系统及溶剂结晶技术,开发出了工艺简单,成本低,可工业化分离二苯乙烯苷的方法,纯度可达 99% 以上,这些都为 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷在美白领域的研发奠定了基

础,值得重视。

### 参考文献

- Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010. Vol I, 195-197.
- Fu QX(付庆霞), Wang HP(王海莘). Research situation of the etiology and pathogenesis of poliosis. *Guangming J Chin Med* (光明中医), 2009, 24:375-377.
- Ken I, Takahiro A, Nguyen TB, et al. Genotoxic stress abrogates renewal of Melanocyte stem cells by triggering their differentiation. *Cell*, 2009, 137:1088-1099.
- Prota G. Progress in the chemistry of melanin and related metabolites. *Med Res Rev*, 1988, 8:525-556.
- Zhang C(张超), Sun ZX(孙震晓). Advance in studies on the chemical constituent of *Polygonum multiflorum* and its metabolism *in vivo*. Mianyang: The biochemical and biotech drugs academic convention(全国生化与生物技术药物学术年会), 2010:130.
- Zhang RC(张瑞晨), Liu B(刘斌), Sun ZX(孙震晓), et al. Effects of extract of *Polygonum multiflorum* on cell cycle arrest and apoptosis of human liver cell line L02. *J Chin Integrative Med* (中西医结合学报), 2010, 8:554-561.
- Lou CX(楼彩霞), Pu XL(朴香兰). The reaction system for the study of *forsythia suspensa* on tyrosinase inhibitory effect. *Lishizhen Med Mater Med* (时珍国医国药), 2011, 22: 2580-2582.
- Zhou Z(周中), Wang JG(王建国), Zhou L(周蕾), et al. A testing method for evaluation of inhibitory performance of oil soluble lighteners against tyrosinase. *Chin Surfactant Detergent & Cosmetics* (日用化学工业), 2003, 33:326-328.
- Yang TC(杨同成). Preliminary Explore of the Extraction and Anti-white Hair Mechanism of Anthraquinone Derivative of *Polygonum multiflorum* Thunb. *J Fujian Normal Univ* (福建师范大学学报), 1993, 9(2): 66-69.
- Jiang ZQ, Xu JM, Long MH, et al. 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- $\beta$ -D-glucoside (THSG) induces melanogenesis in B16 cells by MAP kinase activation and tyrosinase upregulation. *Life Sci*, 2009, 85:345-350.
- He BF(何冰芳), Chen QH(陈琼华). Inhibitory effects of anthraquinone derivatives of Chinese Rhub Arb on tyrosinase. *Biochem J* (生物化学杂志), 1989, 5:154-158.
- Jiang ZQ(姜泽群), Wu Q(吴琼), Xu JM(徐继敏), et al. Promotion of melanin production by *Radix Polygoni Multiflori*: pA Study of Its Mechanism. *J Nanjing Univ Trad Chin Med* (南京中医药大学学报), 2010, 26:190-192.
- Guan XL(官兴丽), Luo LY(罗理勇), Zeng L(曾亮), Advances at the research on the skin lightening effect and mechanism of natural products. *Sci Tech Food Ind* (食品工业科技), 2011, 32:432-436.
- Ban Y(班翊), Liu QL(刘其礼), Jin Y(金悠), et al. Determination of stilbene-glucoside and investigation on its stability. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35:1235-1237.
- Lu LS(吕丽爽), Tang J(汤坚), He QT(何其悦). Preparation and antioxidation mechanism of stilbene glycoside from *Polygonum multiflorum* Thunb. Wuxi: Jiangnan University (江南大学), PhD. 2006.
- Zheng ZX(郑振汶), Zhang LJ(张玲菊), Huang CX(黄常新), et al. Antitumor effect of total saponins of *Rubus parvifolius* on malignant melanoma. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2007, 32:2055-2058.
- Dong JF(董军芳). Study on separating glycyrrhetat with the new liquid-liquid equilibrium in aqueous two-phase extraction system. Quanzhou: Huaqiao University (华侨大学), MSc. 2003.
- Wu W(吴伟), Cui GH(崔光华). Application of optimization method with central composite design in the pharmacy. *Foreign Med Sci Section on Pharm* (国外医学药学分册), 2000, 27(5):292-298.
- Fu YL(付艳丽), Gao YT(高云涛), Li JC(李竞春), et al. Ultrasound-assisted aqueous two-phase extraction of total flavonoids from *Arundina graminifolia* by central composite design and response surface method. *Chin Tradit Patent Med* (中成药), 2010, 32:2059-2063.
- Gao YT(高云涛), Jiang JC(蒋进超), Zhang BT(张宝通). Optimization of ultrasound-assisted aqueous two-phase extraction of polyphenols from *Phyllanthus urinaria* L. by central composite design and response surface methodology. *Food Ferment Ind* (食品与发酵工业), 2011, 37:189-193.
- Guo YX(郭勇学), Wang LH(王立红), Zhang DY(张大勇), et al. A new aqueous two-phase system of ethanol/ammonium sulphate for recovery of lithospermic acid B from extract of *Salvia miltiorrhiza* Bge. *CIESC J* (化工学报), 2012, 63:1773-1779.
- He HJ(贺红军). A study on techniques of separation and purification of total saponins from *Rubus parvifolius* L. Chongqing: Chongqing University of Medical Science (重庆医科大学), MSc. 2011.

(上接第 730 页)