

文章编号:1001-6880(2014)10-1638-06

# HPLC 法测定明党参组织培养物和栽培品中香豆素成分的含量

步 达,姚 晓,郑紫婷,李 祥,陈建伟\*

南京中医药大学,南京 210023

**摘要:**采用高效液相色谱法同时测定明党参组培和栽培品中 7-羟基香豆素、花椒毒酚、欧前胡素和珊瑚菜内酯 4 种香豆素成分的含量。Agilent-C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈—水溶液梯度洗脱,流速 1.0 mL/min,柱温 30 °C;检测波长为 314 nm,进样量为 10 μL。实验结果表明,栽培明党参的根皮 4 种香豆素成分 7-羟基香豆素、花椒毒酚、欧前胡素、珊瑚菜内酯的含量普遍偏高,分别为 5.8970、1.2710、0.0301、0.9236 mg/g,明党参愈伤组织诱导根中 7-羟基香豆素、花椒毒酚含量较高分别为 3.7939、0.8384 mg/g;该方法简便、快速、具有良好的重现性,可用于明党参组培和栽培品中香豆素成分的含量测定。

**关键词:**明党参;组织培养物;高效液相色谱法;香豆素;含量测定

中图分类号:R931.6

文献标识码:A

## Simultaneous Determination of Coumarins in Tissue Cultures and Cultivated *Changium smyrnioides* Wolff by HPLC

BU Da, YAO Xiao, ZHENG Zi-ting, LI Xiang, CHEN Jian-wei \*

College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

**Abstract:** In this study, the concentrations of 7-hydroxycoumarin, xanthotoxol, imperatorin and phellopterin in the tissue culture and cultivated samples of *Changium smyrnioides* were determined by HPLC. The Agilent-C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used for the chromatographic separation with a mobile phase of acetonitrile-water solution in gradient elution mode. The flow rate was 1.0 mL/min. The column oven temperature was controlled at 30 °C. The detection wavelength was set at 314 nm and the injection volume was 10 μL. The experimental results showed that the concentrations of the 4 investigated coumarins of the cultivated sample in cultivated *Changium* root cortex was generally higher, which were 5.8970, 1.2710, 0.0301 mg/g and 0.9236 mg/g, respectively. The concentrations of 7-hydroxycoumarin and xanthotoxol in callus induction of *Changium* root were 3.7939 mg/g and 0.8384 mg/g, respectively. The developed HPLC method was simple, accurate and reproducible. It was suitable for assaying the contents of coumarins in the tissue culture and the cultivated sample of *C. smyrnioides*.

**Key words:** *Changium smyrnioides* Wolff; tissue cultures; HPLC; coumarins; determination

明党参 *Changium smyrnioides* Wolff 为伞形科 (Umbelliferae) 多年生草本植物,去皮的根供药用。始载于明、清时期,为现版《中国药典》的名贵中药之一。分布于江苏、安徽、浙江、江西、湖北等省,江苏为地道药材产区。外形和疗效似人参,具润肺化痰、养阴和胃、平肝解毒之功效,为我国重点保护的珍稀濒危植物<sup>[1]</sup>。7-羟基香豆素、花椒毒酚、欧前胡素和珊瑚菜内酯均是从明党参中分离得到的香豆素类化合物,药理研究表明,这四种香豆素类化合物具

有明显的抗肿瘤作用和抗氧化作用<sup>[2]</sup>。目前国内对外对明党参根、茎叶、果实的研究已有文献报道<sup>[3-6]</sup>,但对明党参组培产物中香豆素成分的含量测定尚未见报道,本研究建立了同时测定四种香豆素成分含量的测定方法,并比较了其在组培和栽培品不同部位的含量,为其资源的合理开发与利用提供科学依据。

## 1 材料、仪器与试剂

### 1.1 材料

实验材料于 2012 年 9 月采自南京市仙林羊山,经南京中医药大学中药资源学教研室陈建伟教授鉴定为明党参 *Changium smyrnioides* Wolff。鲜根带土

收稿日期:2013-10-8 接受日期:2014-05-14

基金项目:高等学校博士学科点专项科研基金项目(200803150009);

江苏省自然科学基金项目(BK2003107);江苏高校优势学科建设工程资助项目(yssxk-2010)

\* 通讯作者 Tel:86-25-85811280;E-mail:chenjw695@126.com

移栽到南京中医药大学药苑中,在自然情况下培养。根据之前9种激素条件下对明党参叶片愈伤情况的优选,采用培养基组成为MS + 2,4-D 0.5 mg/L + KT 0.2 mg/L + NAA 1.5 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L; MS + 2,4-D 1.0 mg/L + KT 0.1 mg/L + NAA 1.5 mg/L + 6-BA 1.5 mg/L进行明党参叶片的愈伤组织诱导和根诱导,并将愈伤组织和根诱导产物取出干燥备用。

## 1.2 仪器

Agilent 1100 液相色谱仪, 自动进样器, HT-230A 柱温箱(HENGAT & D), 配 Agilent-C18 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), Agilent 公司; KQ-500DE 型医用数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); HH-S 恒温水浴锅(江苏国胜实验仪器厂); FA-1004 电子分析天平(上海天平仪器厂); LIBRORA-EL-40SM 电子分析天平(SHIMADZU); 岛津 UV-2401 紫外扫描仪。

## 1.3 试剂

对照品 7-羟基香豆素(批号:20120327)、花椒毒酚(批号:20110819)和欧前胡素(批号:20110520)由上海源叶生物科技有限公司提供,所有对照品经 HPLC 峰面积归一化法检测质量分数均在 98% 以上;珊瑚菜内酯为本实验室从明党参果实中分离所得到,经 UV、IR、MS、<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR 鉴定确定为珊瑚菜内酯,熔点 103~104 °C, 面积归一化法测得对照品纯度为 99.7%。乙腈(色谱纯,美国天地有限公司);水为双蒸水,其他试剂均为分析纯(南京化学试剂有限公司)。

# 2 方法与结果

## 2.1 对照品溶液的制备

分别精密称取对照品 7-羟基香豆素、花椒毒酚、欧前胡素和珊瑚菜内酯 13.03、13.02、12.08、15.53 mg, 分别加甲醇超声(300 W, 40 kHz)溶解并定容, 即得浓度分别为 260.6、260.4、241.6、310.6 μg/mL 的对照品储备液。分别精密移取对照品储备液 5、20、5、5 mL, 用甲醇稀释至 7-羟基香豆素、花椒毒酚、欧前胡素和珊瑚菜内酯分别为 50.12、13.02、57.29、68.33 μg/mL 的混合对照品溶液。

## 2.2 供试品溶液的制备

取干燥供试品粉末(过 3 号筛)约 1.0 g, 精密称定, 置于 50 mL 烧瓶中, 加入甲醇 50 mL, 80 °C 加热回流 1 h, 过滤, 50 °C 减压干燥, 用 20 mL 乙酸乙

酯-蒸馏水(1:1, V/V)萃取, 共萃取 3 次, 合并乙酸乙酯层, 50 °C 减压干燥, 用甲醇定容至 10 mL, 摆匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

## 2.3 色谱条件及系统适用性试验

色谱柱为 Agilent-C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈(A)-水(B)梯度洗脱程序: 0~5 min, 5% A; 5~10 min, 5%~35% A; 10~15 min, 35%~60% A; 15~40 min, 60%~85% A; 流速 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长 314 nm; 分析时间 40 min; 进样量为 10 μL。在上述条件下, 7-羟基香豆素、花椒毒酚、欧前胡素及珊瑚菜内酯理论板数均不低于 8000。对照品和供试品的色谱图, 见图 1。

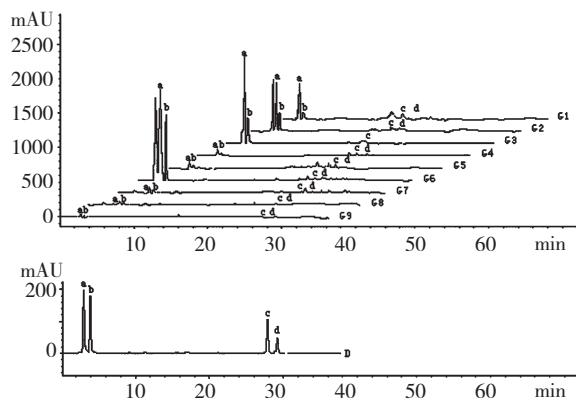


图 1 对照品及其供试品的 HPLC 色谱图

Fig. 1 Overlaid HPLC chromatograms of mixed standards (D) and samples (G1-G9)

注:D. 混合对照品;G1、G2. 愈伤组织;G3. 愈伤组织诱导的根;G4. 栽培品全根;G5. 栽培品去栓皮的根;G6. 栽培品根皮;G7. 栽培品茎叶;G8. 野生品全根;G9. 野生品去栓皮的根;a. 7-羟基香豆素;b. 花椒毒酚;c. 欧前胡素;d. 珊瑚菜内酯

Note: D. mixed reference substances; G1, G2. Changium callus; G3. callus induction of Changium root; G4. cultivated Changium root; G5. cultivated Changium root with cork removed; G6. root cortex of cultivated plant; G7. cultivation Changium stem and leaf; G8. wild Changium root; G9 wild Changium root with cork removed; a. 7-hydroxycoumarin; b. xanthotoxin; c imperatorin; d. phellopterin

## 2.4 线性关系

分别精密移取“2.1.1”项下 7-羟基香豆素对照品储备液 1.0、3.0、5.0、7.0、9.0 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度; 花椒毒酚对照品储备液 1.0、3.0、5.0、7.0、9.0 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度; 欧前胡素对照品储备液 0.2、0.6、1.0、1.4、1.8 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度; 珊瑚菜内酯对照品储备液 0.2、0.6、1.0、1.4、

1.8 mL, 置于10 mL量瓶中, 用甲醇定容至刻度。按“2.2”项下的色谱条件, 分别进样10 μL, 记录峰面積。以峰面积Y(A)为纵坐标, 浓度X(mg/mL)为

横坐标, 进行线性回归, 得到7-羟基香豆素、花椒毒酚、欧前胡素及珊瑚菜内酯线性回归方程及线性关系, 见表1。

表1 4种香豆素类成分的线性关系

Table 1 Linear relationships of 4 investigated coumarin

成分 Compounds	线性方程 Linear equation	线性相关系数 $R^2$	线性范围 Linear range (μg)
7-羟基香豆素 7-Hydroxycoumarin	$Y = 24878x + 32.360$	0.9999	26.06 ~ 234.54
花椒毒酚 Xanthotoxol	$Y = 15566x + 38.595$	0.9994	26.04 ~ 234.36
欧前胡素 Imperatorin	$Y = 23808x + 3.9400$	0.9999	4.832 ~ 43.488
珊瑚菜内酯 Phellopterin	$Y = 31209x - 1.8670$	1.0000	6.212 ~ 55.908

## 2.5 精密度试验

精密移取混合对照品溶液10 μL, 按“2.2”项下色谱条件重复进样6次, 以峰面积计算7-羟基香豆素、花椒毒酚、欧前胡素及珊瑚菜内酯RSD分别为1.50%、2.17%、2.56%、2.50%, 结果表明仪器精密度良好。

## 2.6 稳定性试验

取同一供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件测定, 分别于0、2、4、6、8、12 h进样测定, 记录色谱图, 考察峰面积的变化, 结果7-羟基香豆素、花椒毒酚、欧前胡素及珊瑚菜内酯面积的RSD分别为1.01%、2.56%、1.91%、2.29%, 表明供试品溶液在12 h内稳定性良好。

## 2.7 重复性试验

取同批次明党参愈伤组织粉末, 按“2.1.2”项

下方法制备6份供试品溶液, 以“2.2”项下色谱条件进行含量测定, 结果7-羟基香豆素、花椒毒酚、欧前胡素及珊瑚菜内酯的平均含量分别为0.5402、0.2836、0.0104、0.0143 mg/g, RSD分别为1.54%、2.86%、2.75%、2.53%, 表明本方法重复性良好。

## 2.8 加样回收率试验

精密称取已知含量明党参愈伤组织粉末约1.0 g, 共9份, 精密移取7-羟基香豆素对照品(260.6 μg/mL)1.5、2.0、2.5 mL、花椒毒酚对照品(260.4 μg/mL)0.8、1.2、1.6 mL、欧前胡素对照品(241.6 μg/mL)0.02、0.03、0.04 mL、珊瑚菜内酯对照品(310.6 μg/mL)0.03、0.04、0.05 mL的储备液, 并按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件测定, 计算回收率。结果见表2~5。

表2 7-羟基香豆素加样回收率试验结果

Table 2 Recovery results of 7-hydroxycoumarin

序号 No.	称重量 Weight (g)	供试品含量 Content of the samples (mg)	加入量 Added amount (mg)	测得量 Detected amount (mg)	回收率 Recovery (%)	平均回收率 Average recovery (%)	相对标准偏差 RSD (%)
1	1.0008	0.5406	0.3909	0.9256	98.48		
2	1.0001	0.5402	0.3909	0.9306	99.85		
3	1.0003	0.5403	0.3909	0.9195	96.99		
4	0.9983	0.5392	0.5212	1.0653	100.92		
4	0.9999	0.5401	0.5212	1.0593	99.60	99.97	2.00
6	1.0019	0.5412	0.5212	1.0621	99.93		
7	1.0005	0.5404	0.6515	1.1811	98.33		
8	1.0012	0.5408	0.6515	1.2050	101.9		
9	1.0011	0.5407	0.6515	1.2159	103.62		

表 3 花椒毒酚加样回收率试验结果

Table 3 Recovery results of xanthotoxol

序号 No.	称重量 Weight ( g )	供试品含量 Content of the samples ( mg )	加入量 Added amount ( mg )	测得量 Detected amount ( mg )	回收率 Recovery ( % )	平均回收率 Average recovery ( % )	相对标准偏差 RSD ( % )
1	1.0008	0.2838	0.2083	0.5022	104.82		
2	1.0001	0.2836	0.2083	0.4864	97.33		
3	1.0003	0.2836	0.2083	0.4979	102.82		
4	0.9983	0.2831	0.3124	0.5938	99.42		
5	0.9999	0.2835	0.3124	0.5876	97.29	99.83	2.69
6	1.0019	0.2841	0.3124	0.5924	98.64		
7	1.0005	0.2837	0.4166	0.6911	97.77		
8	1.0012	0.2839	0.4166	0.6948	98.61		
9	1.0011	0.2839	0.4166	0.7078	101.73		

表 4 欧前胡素加样回收率试验结果

Table 4 Recovery results of imperatorin

序号 No.	称重量 Weight ( g )	供试品含量 Content of the samples ( mg )	加入量 Added amount ( mg )	测得量 Detected amount ( mg )	回收率 Recovery ( % )	平均回收率 Average recovery ( % )	相对标准偏差 RSD ( % )
1	1.0008	0.01040	0.004832	0.01517	98.54		
2	1.0001	0.01040	0.004832	0.01526	100.55		
3	1.0003	0.01040	0.004832	0.01502	95.54		
4	0.9983	0.01038	0.009664	0.02034	103.03		
5	0.9999	0.01039	0.009664	0.01987	98.00	99.12	2.56
6	1.0019	0.01041	0.009664	0.01965	95.51		
7	1.0005	0.01040	0.01449	0.02478	99.16		
8	1.0012	0.01041	0.01449	0.02511	101.39		
9	1.0011	0.01041	0.01449	0.02495	100.29		

表 5 珊瑚菜内酯加样回收率试验结果

Table 5 Recovery results of phelopterin

序号 No.	称重量 Weight ( g )	供试品含量 Content of the samples ( mg )	加入量 Added amount ( mg )	测得量 Detected amount ( mg )	回收率 Recovery ( % )	平均回收率 Average recovery ( % )	相对标准偏差 RSD ( % )
1	1.0008	0.01431	0.009318	0.02375	101.29		
2	1.0001	0.01430	0.009318	0.02387	102.68		
3	1.0003	0.01430	0.009318	0.02349	98.580		
4	0.9983	0.01427	0.01553	0.03013	102.08		
5	0.9999	0.01429	0.01553	0.02979	99.75	99.99	1.94
6	1.0019	0.01432	0.01553	0.02928	96.28		
7	1.0005	0.01430	0.021742	0.03583	98.99		
8	1.0012	0.01431	0.021742	0.03609	100.14		
9	1.0011	0.01431	0.021742	0.03608	100.10		

## 2.9 供试品的含量测定

取9批供试品,按“2.2.1.2”项下方法制备供试品溶液,以“2.2”项下色谱条件测定,并计算7-羟

基香豆素、花椒毒酚、欧前胡素及珊瑚菜内酯的平均含量,结果见表6。

表6 不同供试品明党参中7-羟基香豆素、花椒毒酚、欧前胡素及珊瑚菜内酯的含量

Table 6 Determination of 7-hydroxycoumarin, xanthotoxol, imperatorin and phellopterin in different samples of *C. smyrnoides* (mg/g, n=3)

编号 No.	供试品名称 Sample name	供试品重量 Sample weight (g)	7-羟基香豆素 7-Hydroxycoumarin	花椒毒酚 Xanthotoxol	欧前胡素 Imperatorin	珊瑚菜内酯 Phellopterin
1	5号培养基愈伤组织 Callus of No. 5 culture medium	2.0013	0.4398	0.3311	0.0060	0.0109
2	7号培养基愈伤组织 Callus of No. 7 culture medium	2.0015	0.4398	0.3311	0.0060	0.0109
3	愈伤组织诱导的根 Callus induction of Changium root	0.3010	3.7939	0.8384	0.0254	未检出
4	栽培品全根 Cultivated Changium root	1.0008	0.0977	0.0084	0.3279	0.2969
5	栽培品去栓皮的根 Cultivated Changium root with cork removed	3.0023	0.0348	0.0042	0.1063	0.0888
6	栽培品根皮 Cultivated Changium root cortex	0.1001	5.8970	1.2710	0.0301	0.9236
7	栽培品茎叶 Cultivated Changium stem and leaf	2.0022	0.2351	0.0617	0.1112	0.0210
8	野生品全根 Wild Changium root	1.0013	0.0875	0.1203	0.0682	0.0659
9	野生品去栓皮全根 Wild Changium root with cork removed	3.0020	0.01515	0.0270	0.0051	0.0023

## 3 讨论

### 3.1 波长的选择

本实验参照文献<sup>[8,9]</sup>建立了多香豆素类成分同时测定的方法,如图1和表1所示,在314 nm波长处7-羟基香豆素、花椒毒酚、欧前胡素、珊瑚菜内酯具有良好的分离度和线性关系,能满足明党参药材及组织培养物中多种香豆素成分的同时测定。在实际实验中还选择了268 nm进行了监测,但综合考虑灵敏度、稳定性等因素,故使用314 nm作为定量波长。

### 3.2 供试品溶液制备方法的选择

经过超声处理及加热回流2种方法的对比实验,结果表明加热回流提取香豆素类成分的含量较高,故选取加热回流提取法。比较了乙醇、70%乙醇、50%乙醇、甲醇、70%甲醇、50%甲醇等6种提取溶剂,结果表明,采用甲醇作为提取溶剂,提取效率最高。经20、30、40、60、90 min回流时间比较表明,回流提取60 min时,即可达到平衡。

### 3.3 流动相的选择

本实验比较了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-磷酸-水、乙腈-磷酸-水、甲醇-醋酸-水、乙腈-醋酸-水系统及梯度洗脱条件下对样品中花椒毒酚、欧前胡素、珊瑚菜内酯、7-羟基香豆素分离度的影响,结果表明采用乙腈-水梯度洗脱时4种香豆素类能得到良好的分离。

### 3.4 明党参及其组织培养产物中香豆素类成分的累积规律分析

由表6可见,7-羟基香豆素、花椒毒酚、欧前胡素在9份供试品中均有累积,珊瑚菜内酯除愈伤组织根诱导产物中未检出外,其余8份均有累积,除欧前胡素外,其余三者在栽培品根皮部的含量最高,表明其成分在根中主要积累在根皮部;此外,明党参栽培品的茎叶中4种香豆素类成分均有累积,提示明党参传统工艺弃之根皮和叶具有再利用价值。除花椒毒酚外,栽培明党参中其余3种香豆素含量明显高于野生品,这为野生变家种,扩大药用资源提供了一定依据。

### 3.5 明党参不同组织培养产物中香豆素形成的分析

本实验首次对明党参组织培养两个阶段中的产物进行了高效液相色谱含量检测,从表6中可以看出,明党参愈伤组织和愈伤组织根诱导的产物中7-羟基香豆素、花椒毒酚、欧前胡素、珊瑚菜内酯均有累积,表明在明党参愈伤组织形成阶段已具有合成4种香豆素类成分的能力,且前3种成分在根诱导产物中的含量均高于愈伤组织,提示随着明党参愈伤组织再分化的进行,香豆素类成分的生物合成累积量也随之增多;但是在根诱导产物中尚未检测出珊瑚菜内酯,是否与缺少异戊烯转移酶和O-甲基转移酶有关,原因有待进一步研究。

## 参考文献

- 1 Fu LG(傅立国). China rare and endangered plants(中国珍稀濒危植物). Shanghai: Shanghai Educational Publishing House, 1989. 353.
- 2 Wang M(王萌), Chen JW, Li X. Antitumor activity of 5 kinds of furan coumarin in velamen of *Changium smyrnioides* Wolff. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2012, 18(6): 203-205.
- 3 Wang M(王萌), Chen JW(陈建伟), Li X(李祥), et al. Chemical constituents of supercritical carbon dioxide extraction from the root bark of *Changium smyrnioides* Wolff. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2012, 24: 764-767.
- 4 Chen JW(陈建伟), Li X(李祥), Wu LL(武露凌), et al. Volatile chemical composition research of China's rare plant of *Changium smyrnioides* Wolff in leaf and stem. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2000, 12(3): 48-51.
- 5 Gu YY(顾源远), Chen JW(陈建伟), Li X(李祥), et al. Supercritical extraction chemical component research of *Changium smyrnioides* Wolff in fruit. *Chin Arch Tradit Chin Med* (中华中医药学刊), 2010, 28: 75-77.
- 6 Duan ZF(段志富), Chen JW(陈建伟), Li X(李祥), et al. Comparative studies of phellopterin in different parts of *Changium smyrnioides* Wolff. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2008, 30: 1851-1853.
- 7 Chen JW(陈建伟), Zhang P(张萍), Li X(李祥). HPLC fingerprint research of *Changium smyrnioides* Wolff in fruit. 2010 National conference on traditional Chinese medicine (2010 全国中药学术研讨会论文集), 2010.
- 8 Zhang Y(张莹), Chen JW(陈建伟), Li X(李祥), et al. Cumulative distribution of furan coumarin constituents research in rare medicinal plant *Changium smyrnioides* Wolff. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2012, 24: 510-513.
- 9 Gu YY(顾源远), Chen JW(陈建伟). UV spectrophotometry determination of total content of coumarin in *Changium smyrnioides* Wolff. *Res Prac Chin Med* (现代中药研究与实践), 2010, 24(2): 58-60.

(上接第 1604 页)

- 8 Duan XJ(段小娟), Li XM(李晓明), Wang BG(王斌贵). Chemical constituents of the red alga *Symplocladia latiuscula*. *Marine Sci* (海洋科学), 2007, 31(5): 17-19.
- 9 Lei Y(雷羽), Xiong L(熊亮), Wang X(王霞). Studies on the chemical constituents of dried sea snake. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2010, 21: 1127-1128.
- 10 Wang HL(王宏磊). Isolation and elucidation of the chemical constituents from the marine sponge *Gellius Cymiformis*. Guangzhou: Jinan University(暨南大学), 2004.
- 11 George RP, Atsushi N, Gordon MC, et al. Isolation and Structures of Schleicherastatins 1-7 and Schleicheols 1 and 2 from the Teak Forest Medicinal Tree *Schleichera oleosa*1. *Journal of Natural Products*, 2000, 63: 72-78.
- 12 Lu XL(路小利). Study on chemical constituents of *Ceratophyllum Demersum*. Yangling: Northwest A&F University(西北农林科技大学), 2007.
- 13 He ZH(何志恒), Luo YG(罗应刚), Li HJ(李洪娟), et al. Chemical Study on *Porandra scandens*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2006, 18: 238-242.
- 14 Lao YB(劳彦斌), Jiang T(蒋亭), Li J(李军), et al. Chemical study on secondary metabolites from ascidian *Styela clava*(1). *Chin J Marine Drugs* (中国海洋药物), 2001, 2: 12-15.
- 15 Lin HW(林厚文), Qi HL(祁海林), Zhang C(张纯), et al. Studies on the chemical constituents of sea hare *Notarchus Eachii Freeri*. *J Chin Med Mater* (中药材), 2001, 24: 266-268.
- 16 Liang LY(梁利岩), Deng SZ(邓松之), Zhang Q(章勤), et al. Studies on the chemical constituents of the soft coral *lobophytum* sp. from south china sea( III). *Chin J Marine Drugs* (中国海洋药物), 2001, 1: 6-8.
- 17 Yang Z(杨竹). Studies on the bioactive constituents of *Ardisia gigantifolia* Staph. Shenyang: Shenyang Pharmaceutical University(沈阳药科大学), 2007