

竹柏叶总黄酮不同提取方法比较

王欢, 郭婕*, 周云雷

吉首大学 林产化工工程湖南省重点实验室, 张家界 427000

摘要: 本研究采用正交试验设计分别优选回流提取和超声波提取竹柏叶总黄酮的最佳工艺条件。在单因素试验的基础上, 以总黄酮得率为参考指标, 选取液料比、乙醇体积分数、温度和时间 4 个影响因子, 进行正交试验, 分别确立回流提取和超声波提取最佳提取工艺条件。结果表明, 回流提取优化工艺条件为: 液料比 30:1 (mL: g), 乙醇体积分数为 70%, 回流时间 1.0 h, 回流温度 80 °C; 超声波提取优化工艺为: 液料比 25:1 (mL: g), 乙醇体积分数为 70%, 超声时间 30 min, 超声水浴温度 60 °C。两种提取方法的最终提取效果比较, 回流提取的总黄酮得率为 15.522%, 超声波提取总黄酮得率为 13.637%, 回流提取法总黄酮得率高于超声波提取法。本实验结果为后续竹柏叶总黄酮的开发利用提供了参考。

关键词: 竹柏叶; 总黄酮; 回流提取; 超声波提取

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.3.016

Optimization of Two Extraction Processes for Flavonoids from *Podocarpus nagi* Leaves

WANG Huan, GUO Jie*, ZHOU Yun-lei

Key laboratory of Hunan Forest Product and Chemical Industry Engineering, Jishou University, Zhangjiajie 427000, China

Abstract: In this study, the reflux extraction and ultrasonic extraction processes of total flavonoids from *Podocarpus nagi* leaves were optimized using orthogonal experiments. Based on single factor experiments, the effects of liquid to solid ratio, ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the yield of total flavonoids were investigated, and orthogonal experiments were applied to further optimize extraction conditions. The results showed that the optimal conditions of reflux extraction were confirmed as follows: liquid to solid ratio of 30:1 (mL: g), 70% EtOH as extraction solvent, refluxing for 1.0 h at 80 °C, and the extraction yield of flavonoids was 15.522%. The optimal conditions of ultrasonic extraction were determined as follows: liquid to solid ratio of 25:1 (mL: g), ultrasonication for 30 min at 60 °C with 70% EtOH, and the extraction yield of flavonoids was 13.637%. The extraction yield of total flavonoids with reflux extraction method was higher, while ultrasonic extraction was considerable time-saving. This result can provide the basis for the utilization of flavonoids in *P. nagi*.

Key words: *Podocarpus nagi* leave; flavonoids; reflux extraction; ultrasonic extraction

竹柏 (*Podocarpus nagi*) 为罗汉松科 (Podocarpaceae) 罗汉松属植物, 是古老的裸子植物, 起源约一亿五千万年前的中生代白垩纪, 被人们称为“活化石”^[1]。竹柏为常绿乔木, 主产于长江以南及台湾地区, 是常见的行道树种之一, 也有着悠久的药用历史^[2]。现代药理研究表明, 竹柏具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤及抗病毒等药理作用^[3-5]。

竹柏中含有双黄酮类、去甲基二萜双内酯类、挥发油等多种类型的化合物。双黄酮是由两分子黄酮或其衍生物聚合而成的二聚物, 其组成单元可以是不同类型的黄酮单体化合物。天然双黄酮类化合物存在于蕨类植物和裸子植物中, 尤其在松柏纲、银杏纲和凤尾纲等植物中含量较多。随着国内外研究的不断深入, 双黄酮类化合物的抗肿瘤, 以及治疗心血管疾等方面的药理学作用越来越引起重视^[6-10]。

近年来, 探索植物中总黄酮提取方法的研究屡见报道^[11-13], 但有关竹柏中总黄酮的提取工艺却很少有研究报道。本研究以竹柏叶为原料, 总黄酮得率为指标, 考察了液料比、溶剂体积分数、提取时间、

收稿日期: 2015-06-24 接受日期: 2015-09-09

基金项目: 湖南省自然科学基金(14JJ6036); 张家界市科技发展专项(2014YB16); 吉首大学 2012 年人才引进专项(jssxrcyjkyxm2012); 吉首大学 2015 年校级科研课题(15JDY017)

* 通讯作者 Tel: 86-015074448905; E-mail: xyxydyd@hotmail.com

提取温度等因素,设计正交试验,对竹柏叶总黄酮的回流提取和超声波提取工艺进行了优化,以期为后续竹柏叶中总黄酮的纯化工艺和竹柏资源的开发利用提供理论依据。

1 材料与仪器

1.1 实验仪器

U-3900 型紫外可见分光光度计(日本 HITA-CHI);XO-5200DT 型超声波清洗仪(南京先欧仪器制造有限公司);数显恒温水浴锅(江苏金坛市金城国胜实验仪器厂);ZX-9146MBE 型数显鼓风干燥箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);AEL-40SM 型十万分之一电子天平、AEG-220 型万分之一天平(日本 SHIMADZU)。

1.2 实验材料

原料(竹柏叶、茎、根和种子)采集时间为 2014 年 12 月,采自张家界国家森林公园,经吉首大学谷伏安副教授鉴定为竹柏,经 50 °C 烘干,粉碎后备用。芦丁对照品(批号:Y10A6S1,UV ≥ 98%,上海源叶生物科技有限公司);所用试剂乙醇、甲醇及氢氧化钠、亚硝酸钠、硝酸铝等均为分析纯,水为蒸馏水。

2 实验方法

2.1 竹柏叶总黄酮含量的测定

2.1.1 供试品溶液的制备

精确称取已粉碎、干燥至恒重的竹柏叶样品 0.5 g,按不同提取条件进行提取,过滤,将所得滤液用 95% 乙醇定容至 50 mL 容量瓶中,摇匀,待测。

2.1.2 对照品溶液的制备

精确称取 105 °C 干燥至恒重的芦丁对照品 32.32 mg,用适量的体积分数为 80% 乙醇溶解,定容至 50 mL 容量瓶中,配制成 0.6464 mg/mL 芦丁对照品溶液,备用。

2.1.3 标准曲线的绘制

分别量取 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL 芦丁对照品溶液于 10 mL 容量瓶中,加入 2.0 mL 无水甲醇,摇匀,各加入 5% 亚硝酸钠溶液 0.4 mL,摇匀,静置 6 min,再分别加入 10% 硝酸铝溶液 0.4 mL,摇匀,静置 6 min,再分别加入 1 mol/mL 氢氧化钠溶液 4 mL,摇匀,静置 15 min,蒸馏水定容至刻度,摇匀,置比色皿中,在 506 nm 波长下测定吸光度,以芦丁对照品溶液质量浓度(C , mg/mL)为横坐标,吸光度(A)为纵坐标,得到线性回归方程: $A =$

$11.536C + 0.0080$, $R^2 = 0.9996$,结果显示,芦丁对照品溶液在 0.01 ~ 0.08 mg/mL 浓度范围内与吸光度呈良好的线性关系。

2.1.4 总黄酮得率的测定

精确吸取“2.1.1”项下的供试品溶液 0.4 mL 于 10 mL 容量瓶中,按“2.1.3”项下方法测定吸光度,代入回归方程,求出提取液中总黄酮浓度。并按下式计算总黄酮得率。

$$y = \frac{C_1 V}{m} \times 100\%$$

其中 C_1 —竹柏叶粉末提取液中总黄酮浓度(g); V —提取液体积(mL); m —竹柏叶粉末质量(g); y —竹柏叶总黄酮得率(%)。

2.1.5 精密性与重复性试验

精确吸取同一对照品溶液,配制显色后,于 506 nm 处测定吸光度($n = 5$),计算得到相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 0.93%,结果表明精密性与重复性良好。

2.1.6 加标回收率试验

精确称取芦丁对照品 5.50 mg 加入到 0.5 g 竹柏叶粉末中,按照“2.1.1”项下的方法进行样品制备,按“2.1.3”项下方法测定所得待测液吸光度值,计算回收率,共测试三组,测得回流提取平均回收率为 120.36%,RSD 为 2.93%,超声波提取平均回收率为 117.25%,RSD 为 1.47%,两种提取方法回收率较好。

2.2 单因素试验

2.2.1 回流提取单因素试验

每组试验精确称取竹柏叶粉末 0.5 g,分别对液料比 10:1、15:1、20:1、25:1 和 30:1 (mL:g)、乙醇体积分数 50%、60%、70%、80% 和 90%,回流时间 0.5、1.0、1.5、2.0 h 和 2.5 h,回流温度 70、75、80、85 °C 和 90 °C,进行回流提取单因素试验,每组试验重复 3 次,结果取其平均值,考察各因素变化对回流提取竹柏叶总黄酮得率的影响。

2.2.2 超声波提取单因素试验

每组试验精确称取竹柏叶粉末 0.5 g,分别对液料比 10:1、15:1、20:1、25:1 和 30:1 (mL:g)、乙醇体积分数 50%、60%、70%、80% 和 90%,回流时间 10、20、30、40 min 和 50 min,回流温度 20、30、40、50 °C 和 60 °C,进行超声波提取单因素试验,每组试验重复 3 次,结果取其平均值,考察各因素变化对超声波提取竹柏叶总黄酮得率的影响。

2.3 正交试验

2.3.1 回流提取正交试验

在单因素试验的基础上,选择竹柏叶总黄酮得率为参考指标,以液料比、乙醇体积分数、提取时间

和提取温度作为考察因素,按照 $L_9(3^4)$ 正交试验表设计安排回流提取试验,因素水平见表 1。

表 1 回流提取因素水平表

Table 1 Factors and levels of parameters for reflux extraction

水平 Level	因素 Factor			
	A 液料比 Liquid-solid ratio (mL/g)	B 乙醇浓度 Ethanol concentration (%)	C 提取时间 Time (h)	D 提取温度 Temperature (°C)
1	20:1	70	1.0	70
2	25:1	80	1.5	75
3	30:1	90	2.0	80

2.3.2 超声波提取正交试验

在单因素试验的基础上,选择竹柏叶总黄酮得率为参考指标,以液料比、乙醇体积分数、提取时间

和提取温度作为考察因素,按照 $L_9(3^4)$ 正交试验表设计安排超声波提取试验,因素水平见表 2。

表 2 超声波提取因素水平表

Table 2 Factors and levels of parameters for ultrasonic extraction

水平 Level	因素 Factor			
	A 液料比 Liquid-solid ratio (mL/g)	B 乙醇浓度 Ethanol concentration (%)	C 提取时间 Time (min)	D 提取温度 Temperature (°C)
1	20:1	50	20	40
2	25:1	60	30	50
3	30:1	70	40	60

2.4 验证性试验

根据正交试验得到的最佳工艺条件,分别对回

流提取和超声波提取方法进行提取验证性试验,每组重复三次。

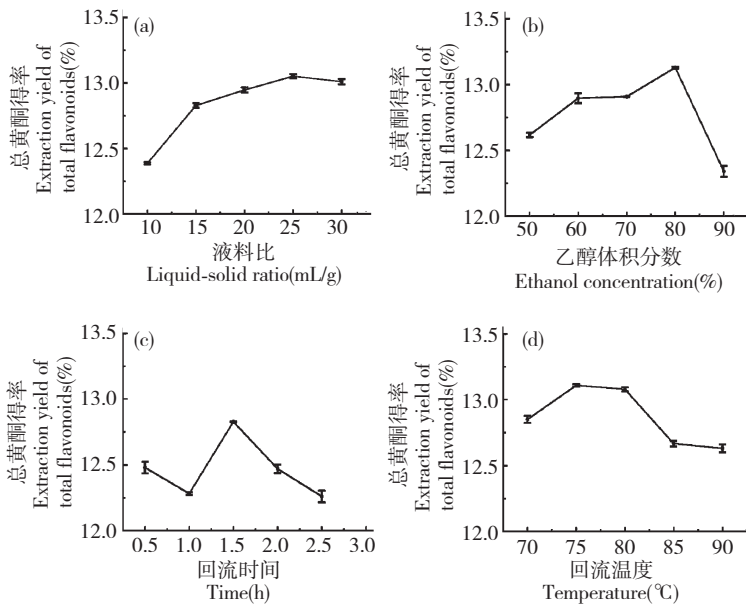


图 1 液料比 (a)、乙醇体积分数 (b)、回流时间 (c)、回流温度 (d) 对回流提取总黄酮得率的影响

Fig. 1 Effects of liquid-solid ratio (a), ethanol concentration (b), extraction time (c) and extraction temperature (d) on the extraction yield of total flavonoids by reflux extraction

3 结果与讨论

3.1 回流提取

3.1.1 回流提取单因素试验结果分析

以竹柏叶总黄酮得率为参考指标,分别对液料比、乙醇体积分数、回流时间、回流温度进行回流提取单因素试验,每组试验重复3次,结果取其平均值,考察各因素变化对回流提取竹柏叶总黄酮得率的影响,结果如图1。

由图1(a)可知,随着液料比的逐渐增加,总黄酮得率随溶剂量的加大而逐渐增大,当液料比增加到25:1(mL:g)时,总黄酮得率达到最大值为13.052%,继续加大投料量时,总黄酮得率变化的幅度趋于平缓。分析原因可能是在液料比增加到25:1(mL:g)时总黄酮已最大限度溶出,并且溶剂量的增大导致溶剂的回收量增加,影响后续处理,因此选择最适宜的液料比20:1、25:1、30:1(mL:g)三个水平进行正交试验。

由图1(b)可知,随着乙醇体积分数的增大,总黄酮得率呈现先增加后有所下降的趋势。当乙醇体积分数为80%时,总黄酮得率为13.130%,达到最大,之后随着乙醇浓度的增加,总黄酮得率反而降

低,可能是由于乙醇浓度的增加,引起溶剂极性下降,导致黄酮类化合物的溶解度下降的缘故。因此选择最适宜乙醇体积分数为70%、80%、90%三个水平进行正交试验设计。

由图1(c)可知,当回流时间增加到1.5h时,总黄酮得率达到最大值为12.829%,延长回流时间时,总黄酮提取率有下降的趋势。这是因为延长提取时间可能会导致黄酮结构变化,因此选择最适宜的回流时间为1.0、1.5、2.0h三个水平进行正交试验设计。

由图1(d)可知,随着回流温度的逐渐升高,总黄酮得率逐渐增大,当温度增加到75℃时,总黄酮得率达到最大值为13.110%,温度继续升高时,总黄酮得率降低,分析原因可能是在温度继续升高时导致黄酮结构破坏,因此选择最适宜的回流温度为70、75、80℃三个水平进行正交试验设计。

3.1.2 回流提取正交试验结果分析

在单因素试验的基础上,选择竹柏叶总黄酮得率为参考指标,以液料比、乙醇体积分数、提取时间和提取温度作为考察因素,按照 $L_9(3^4)$ 正交试验表设计安排回流提取试验,正交试验设计结果见表3,方差分析及显著性检验结果见表4。

表3 回流提取正交试验结果表

Table 3 Orthogonal experiment $L_9(3^4)$ for reflux extraction

试验号 No.	A (mL/g)	B (%)	C (h)	D (℃)	总黄酮得率 Yield (%)
1	25	70	1.5	80	14.698
2	25	80	2.0	70	13.165
3	30	80	1.0	80	14.218
4	30	70	2.0	75	14.342
5	20	70	1.0	70	14.515
6	20	80	1.5	75	13.357
7	30	90	1.5	70	12.746
9	25	90	1.0	75	12.781
10	20	90	2.0	80	12.492
K_1	13.459	14.522	13.845	13.479	
K_2	13.531	13.580	13.586	13.512	
K_3	13.789	12.677	13.349	13.789	
极差 R	0.110	0.615	0.165	0.103	
优组合 Optimal design	A_3	B_1	C_1	D_3	

表 4 回流提取方差分析表

Table 4 Variance analysis of orthogonal experimental for reflux extraction

方差来源 Source	偏差平方和 SS	自由度 df	F	P
液料比 Liquid-material ratio	0.360	2	0.444	$P > 0.10$
溶剂体积分数 Ethanol volume fraction	10.208	2	12.579	** $P < 0.01$
时间 Time	0.738	2	0.910	$P > 0.10$
温度 Temperature	0.348	2	0.428	$P > 0.10$
$F_{0.1(2,9)} = 3.01, F_{0.01(2,9)} = 8.02, F_{0.05(2,9)} = 4.26$				

注: * 影响显著; ** 影响高度显著。

Note: * indicated significant difference; ** indicated extremely significant difference.

综合表 3 正交试验结果、表中各因素极差 R 值及表 4 方差分析结果可知:在实验设计的范围内,各因素对回流提取工艺的影响程度依次为:B(乙醇体积分数) > C(时间) > A(液料比) > D(温度),其中 B 指标影响高度显著 ($P < 0.01$), A、C、D 指标均无显著性差异 ($P > 0.10$), 得到最佳工艺条件: $A_3B_1C_1D_3$, 即液料比 30:1 (mL:g), 乙醇体积分数为 70%, 回流时间 1.0 h, 回流温度 80 °C。

3.2 超声波提取

3.2.1 超声波提取单因素试验结果分析

以竹柏叶总黄酮得率为参考指标, 分别对液料比、乙醇体积分数、超声时间、超声水浴温度进行超声波提取单因素试验, 每组试验重复 3 次, 结果取其平均值, 考察各因素变化对超声波提取竹柏叶总黄酮得率的影响, 结果如图 2。

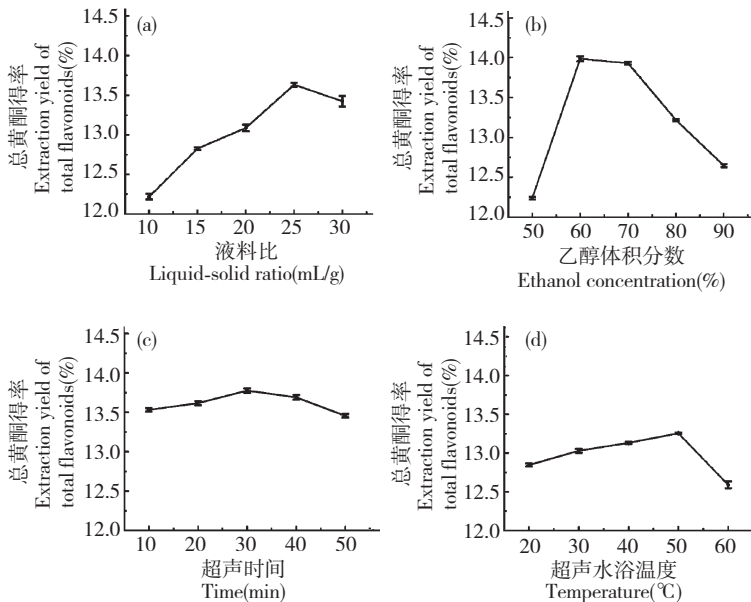


图 2 液料比 (a)、乙醇体积分数 (b)、超声时间 (c)、超声水浴温度 (d) 对超声波提取总黄酮得率的影响

Fig. 2 Effects of liquid-solid ratio (a), ethanol concentration (b), extraction time (c) and extraction temperature (d) on the extraction yield of total flavonoids by ultrasonic extraction

由图 2(a) 可知, 随着液料比的逐渐增加, 总黄酮得率逐渐增大, 当液料比增加到 25:1 (mL:g) 时, 总黄酮得率达到最大值为 13.632%, 继续加大投料量时, 总黄酮得率增加不明显, 再增加液料比会造成乙醇的浪费也会带出更多杂质, 因此选择最适宜的液料比 20:1、25:1、30:1 (mL:g) 三个水平进行正交

试验设计。

由图 2(b) 可知, 随着乙醇体积分数的增大, 总黄酮得率逐渐升高, 当乙醇体积分数为 60% 时, 总黄酮得率达到最大为 13.986%, 继续增加乙醇浓度, 总黄酮得率降低, 这是因为提取溶剂的极性逐渐小于黄酮的极性, 同时易溶于高浓度乙醇的杂质与

黄酮竞争,不利于黄酮从细胞扩散到提取溶剂中,因此选择最适宜乙醇体积分数为 50%、60%、70% 三个水平进行正交试验设计。

由图 2(c)可知,随着超声时间的逐渐增加,总黄酮得率逐渐增大,当回流时间增加到 30 min 时达到最大值 13.776%,继续延长超声时间时,总黄酮得率降低,可能是超声时间过长导致黄酮结构的破坏,因此选择最适宜的超声时间为 20、30、40 min 三个水平进行正交试验设计。

由图 2(d)可知,随着超声水浴温度的逐渐升

高,总黄酮得率逐渐增大,当温度增加到 50 ℃ 时总黄酮得率达到最大值 13.255%,温度继续升高时,总黄酮得率降低,因此选择最适宜的超声水浴温度为 40、50、60 ℃ 三个水平进行正交试验设计。

3.2.2 超声波提取正交试验结果分析

在单因素试验的基础上,选择竹柏叶总黄酮得率为参考指标,以液料比、乙醇体积分数、提取时间和提取温度作为考察因素,按照 $L_9(3^4)$ 正交试验表设计安排超声波提取试验,正交试验设计结果见表 5,方差分析及显著性检验结果见表 6。

表 5 超声波提取正交试验结果表

Table 5 Result of $L_9(3^4)$ orthogonal experiment for ultrasonic extraction

试验号 No.	A (mL/g)	B (%)	C (min)	D (℃)	总黄酮得率 Yield (%)
1	25	50	30	60	14.126
2	25	60	40	40	12.941
3	30	60	20	60	14.209
4	30	50	40	60	13.183
5	20	50	20	40	12.948
6	20	60	30	50	13.648
7	30	70	30	40	13.446
9	25	70	20	50	13.889
10	20	70	40	60	13.763
K_1	13.453	13.419	13.682	13.112	
K_2	13.652	13.599	13.740	13.573	
K_3	13.613	13.699	13.296	14.033	
极差 R	0.054	0.093	0.148	0.307	
最优组合 Optimal design	A ₂	B ₃	C ₂	D ₃	

表 6 超声波提取方差分析表

Table 6 Variance analysis of orthogonal experimental for ultrasonic extraction

方差来源 Source	偏差平方和 SS	自由度 df	F	P
液料比 Liquid-material ratio	0.133	2	0.679	$P > 0.10$
溶剂体积分数 Ethanol volume fraction	0.242	2	1.235	$P > 0.10$
时间 Time	0.698	2	3.558	* $P < 0.10$
温度 Temperature	2.546	2	12.970	** $P < 0.01$
$F_{0.1(2,9)} = 3.01, F_{0.01(2,9)} = 8.02, F_{0.05(2,9)} = 4.26$				

注: * 影响显著; ** 影响高度显著。

Note: * indicated significant difference; ** indicated extremely significant difference.

综合表 5 正交试验结果及各因素极差 R 值和表 6 方差分析结果可知:在实验设计的范围内,各因素对超声波提取工艺的影响程度依次为:D(温度) > C(时间) > B(乙醇体积分数) > A(液料比),其中 D 指标对总黄酮得率影响高度显著($P < 0.01$),C

指标影响显著($P < 0.10$),A、B 指标无显著性意义($P > 0.10$),得到最佳工艺条件:A₂B₃C₂D₃,即液料比 25:1 (mL:g),乙醇体积分数为 70%,超声时间 30 min,超声水浴温度 60 ℃。

3.3 最佳提取工艺的确定及验证性试验结果分析

为了确定正交试验得到的最佳工艺条件的合理

性,分别对回流提取和超声波提取工艺进行验证试验,结果见表7。

表7 不同提取方法对竹柏总黄酮得率的影响($n=3$)

Table 7 The extraction yield of flavonoids by reflux extraction and ultrasonic extraction ($n=3$)

提取方法 Methods	试验号 No.			总黄酮得率 Yield (%)	RSD
	1	2	3		
回流提取 Reflux extraction	15.581	15.515	15.469	15.522	0.37%
超声波提取 Ultrasonic extraction	13.671	13.685	13.555	13.637	0.52%

由表7可知,以回流提取最佳工艺条件进行提取,得到竹柏叶总黄酮得率为15.522%,RSD 0.37%;与回流提取工艺相比,超声波提取最佳工艺得到的竹柏叶总黄酮得率略低为13.637%,RSD 0.53%。采用SPSS17.0软件对两种方法的均值进行完全随机设计的单因素方差分析,以 $\alpha=0.05$ 为标准得到:两种提取方法的平行组之间均无显著性差异;对于竹柏叶总黄酮得率,两种提取方法之间差异性显著。由此可知,两种方法对竹柏叶总黄酮提取效果重现性良好,表明正交试验优化所得的工艺条件准确可靠,且回流提取法总黄酮得率均值(15.522%)明显优于超声波提取法总黄酮得率均值(13.637%),因此选取回流提取法为佳。

3.4 竹柏各部位总黄酮含量的比较

根据正交试验优化得出的回流提取最佳工艺条件,分别对竹柏根、茎、叶和种子进行总黄酮的提取,测得各部位总黄酮得率为:叶15.522% > 茎10.443% > 根8.541% > 种子0.152%。

4 结论

本研究通过探索了液料比、乙醇体积分数、提取时间、提取温度对竹柏叶总黄酮得率的影响,经单因素和正交试验优化得到回流提取和超声波提取竹柏叶总黄酮的最佳工艺条件,回流提取的最佳提取工艺为:液料比30:1(mL:g),乙醇体积分数为70%,回流时间1.0h,回流温度80℃,总黄酮得率为15.522%;超声波提取的最佳工艺条件为:液料比25:1(mL:g),乙醇体积分数为70%,超声时间30min,超声水浴温度60℃,总黄酮得率为13.637%。实验结果表明,最优条件下的工艺简单实用,总黄酮得率高,是竹柏叶中获得总黄酮的有效方法,可为总黄酮的分离纯化及扩大化生产提供参考依据。

本研究选取的两种方法相比较,虽然超声波提取减少了提取所用的时间,降低了体系的温度,具有

操作简单、安全、能耗低等特点,但是回流提取法提取总黄酮的得率高于超声波提取法,因而选取回流提取法提取竹柏叶总黄酮较好。

本研究用优化后的回流提取工艺提取测定了竹柏不同部位的总黄酮得率,总黄酮的含量为叶>茎>根>种子,各部位的总黄酮含量有着显著的差异,该结果为今后竹柏资源的综合开发利用提供参考。

参考文献

- Xu HC (徐怀春), Xie CJ (解成骏). The application of Nageia. *J Wenshan Teachers Coll* (文山师范高等专科学校学报), 2007, 20: 104-107.
- Sun TX (孙同兴), Wang XY (王雪英). The identification and geographic distribution of Nageia and its pharmaceutical effect. *Subtropical Plant Sci* (亚热带植物科学), 2005, 34 (2): 53-55.
- Hayashi YJ, Matsumoto T. Reaction and interconversion of norditerpenoid dialactones, biologically active principles isolated from *Podocarpus* plants. *J Organ Chem*, 1982, 47: 3421-3428.
- Abdillahi HS, Stafford GI, Finnie JF, et al. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Podocarpus sensu latissimo* (s. l.). *South Afr J Botany*, 2010, 76(1): 1-24.
- Gu SH (顾世海), Xu LZ (徐丽珍), Chen Z (陈真), et al. Research progress on the chemical compounds in *Podocarpus* plants. *Int J Tradit Chin Med* (国外医学中医中药分册), 1994, 16(2): 8-11.
- Xu YM (徐亚明), Fang SD (方圣鼎). The chemical constituents from *Podocarpus nagi* (II). *Acta Botan Sin* (植物学报), 1991, 33: 406-408.
- Xu YM (徐亚明), Fang SD (方圣鼎). Studies on the chemical constituents of *Podocarpaceae* (I) the cytotoxic constituents from *Podocarpus nagi*. *Acta Chim Sin* (化学学报), 1989, 47: 1080-1086.