

木芙蓉叶黄酮成分抗氧化及月周期规律研究

程鹏¹, 邬洁^{2,3}, 何先元^{1,2*}, 李昕燃², 杨鸿², 黄英如²¹重庆医科大学实验管理中心; ²重庆医科大学中医药学院, 重庆 401331; ³云南中医药大学, 昆明 650504

摘要:为探讨木芙蓉叶中总黄酮含量及其月周期变化规律。本文以 Vc 为对照, 采用总抗氧化实验、DPPH 法、ABTS 法和 PTIO 法等 4 种方法测定木芙蓉叶总黄酮体外抗氧化活性, 并采用 UFLC 法测定木芙蓉叶中 4 种黄酮的含量变化规律, 同时分析与其抗氧化活性的相关性。结果表明木芙蓉叶黄酮抗氧化活性的月周期变化趋势在 4 种检测方法中有一定差异, 但其抗氧化活性均与槲皮苷含量呈正相关性。综合分析木芙蓉叶中芦丁月周期变化规律及其抗氧化活性强弱, 得出叶中芦丁成分可作为药效评价木芙蓉叶药材质量主要指标的结论。

关键词:木芙蓉叶; 黄酮; 抗氧化; 月周期; UFLC 法

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2020)4-0576-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2020.4.005

Study on the antioxidant activity and the change of monthly periodicity of flavonoids in Folium Hibiscus

CHENG Peng¹, WU Jie^{2,3}, HE Xian-yuan^{1,2*}, LI Xin-ran², YANG Hong², HUANG Ying-ru²

¹Experimental management center of Chongqing Medical University;

²College of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 401331, China;

³Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650504, China

Abstract: To investigate the content of total flavonoids and the monthly change trend in Folium Hibiscus. The antioxidant activity of total flavonoids in Folium Hibiscus was determined by total antioxidant test, DPPH method, ABTS method and PTIO method, using Vc as control. The change trends of content of four flavonoids in Folium Hibiscus were also studied by UFLC, and the correlation between the four flavonoids and antioxidant activity was analyzed. The results showed the monthly change trends of antioxidant activity of flavonoids in Folium Hibiscus were different among the four methods, but there was a positive correlation between antioxidant activity and the content of quercetin. The monthly change trends of rutin content and its antioxidant activity were comprehensively analyzed, so it can be concluded that rutin could be used as the main index to evaluate the quality of Folium Hibiscus.

Key words: Folium Hibiscus; flavonoids; antioxidant; monthly periodicity; UFLC

木芙蓉叶是 2015 年版药典新增增收载的药物, 为锦葵科植物木芙蓉 *Hibiscus mutabilis* L. 的干燥叶^[1]。夏、秋二季采收, 干燥, 防虫、低温储藏。味辛, 性平; 归肺、肝经。具有凉血, 解毒, 消肿, 止痛的功效。临床用于治疗痈疽疮肿, 缠身蛇丹, 烫伤, 目赤肿痛, 跌打损伤等病症。含量照高效液相色谱法测定, 按干燥品计算, 含无水芦丁 (C₂₇H₃₀O₁₆) 不得少于 0.070%。大多数黄酮类化合物均有较强的抗

氧化自由基的作用, 中药的一些药理活性也往往与其抗氧化自由基相关。木芙蓉叶中含有芦丁等多种黄酮类化合物^[2-5], 本实验以芦丁为主要指标, 测定一年内不同月份采收木芙蓉叶的总黄酮含量变化规律, 并检测木芙蓉叶总黄酮体外抗氧化活性, 采用超高效液相色谱法测定一年内不同月份采收的木芙蓉叶 4 种黄酮成分含量变化规律, 分析黄酮成分与抗氧化活性之间的相关性, 以探讨木芙蓉叶黄酮组分-成分-效应之间联系, 为评价木芙蓉叶药材质量和进一步开发利用木芙蓉叶提供理论依据。

收稿日期: 2019-10-29 接受日期: 2020-04-15

基金项目: 国家自然科学基金 (81674002); 重庆市科委社会民生项目 (cstc2018jcsx-msybX0288)

* 通信作者 E-mail: hxy9418@126.com

1 材料与试剂

1.1 仪器

紫外-可见分光光度计(UV-1200型,上海美普达仪器有限公司)、超声清洗仪(批号:15C4649,宁波新芝生物科技股份有限公司)、电热恒温水浴锅(批号:0803141,上海跃进器械医疗有限公司)、TD5A-WS台式低速离心机(批号:5110080098,长沙湘离心机仪器有限公司)、PH计(编号17103029,成都世纪方舟科技有限公司)、电子天平(型号:FA2004,上海舜宇恒平仪器有限公司)、电热恒温鼓风干燥箱(型号:DGG-9240B,上海森信实验仪器有限公司)、分子生物型超纯水机(型号:STS18-0321-012,重庆市安特生环保设备有限公司)、UFLC超快速高效液相色谱仪(岛津)、色谱柱 C_{18} 色谱柱(批号:V3250001,上海安普公司)、移液枪(型号:YE4A178905)。

1.2 试剂

芦丁($C_{27}H_{30}O_{16}$, HPLC $\geq 98\%$, 批号:R106912)、金丝桃苷($C_{21}H_{20}O_{12}$, HPLC $\geq 98\%$, 批号:18111901)、槲皮苷($C_{21}H_{20}O_{11}$, HPLC $\geq 98\%$, 批号:19031304)、PTIO($C_{13}H_{17}N_2O_2$, HPLC $\geq 98\%$, P838429)、DPPH($C_{18}H_{12}N_5O_6$, HPLC $\geq 98\%$, D141336)、抗坏血酸($C_6H_8O_6$, HPLC $\geq 98\%$, A103537)、ABTS($C_{18}H_{24}N_6O_6S_4$, HPLC $\geq 98\%$, 批号:A109612),以上标准品均购自重庆奥怡生物技术有限公司。槲皮素($C_{15}H_{10}O_7$, HPLC $\geq 98\%$, 批号19032803),成都普菲德生物技术有限公司,硫酸、磷酸钠、钼酸铵、过硫酸钾、无水乙醇、甲醇、乙腈、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾均为分析纯。

1.3 材料

木芙蓉叶每月15日采自重庆医科大学植物园,阴干备用,经重庆医科大学费曜副教授鉴定为锦葵科植物木芙蓉 *Hibiscus mutabilis* Linn 的叶。

2 实验方法

2.1 木芙蓉叶总黄酮测定

2.1.1 样品总黄酮提取

参考以最佳提取工艺^[2],称取木芙蓉粗粉约3g,置于250 mL的锥形瓶中,加入99 mL的46%乙醇溶液,在60℃,功率100 W条件下超声提取2次,每次34 min。滤过,合并滤液,低温保存,备用。

2.1.2 芦丁标准曲线标准曲线

精密称取芦丁5.40 mg,用50%的乙醇溶解后,定容于50 mL容量瓶中,配制为质量浓度为1.08

mg/mL的芦丁标准品溶液。分别取该溶液0、1、2、3、4、5 mL,置于10 mL容量瓶。各组依次加入0.5% $NaNO_2$ 0.3 mL,混匀,放置6 min;再加入10% $AlCl_3$ 0.3 mL,摇匀,放置6 min;最后加入1 mol/L $NaOH$ 4 mL,并以50%乙醇定容至刻度线,摇匀,放置15 min。用紫外-可见分光光度计测定吸光度(检测波长510 nm)。 $y = 0.0861x + 0.0014$ 。 $R^2 = 0.9998$ (x 为吸光度, y 为浓度单位mg/mL)。

不同月份采收木芙蓉叶的总黄酮提取液按上述方法,分别测定其总黄酮浓度,并记录C,然后将总黄酮提取液配制为300 $\mu g/mL$ 的母液,备用。

2.2 抗氧化活性测定

2.2.1 维生素C的标准液配置

精密称取 V_c 标准品16.4 mg,用50%的乙醇溶液溶解并定容于50 mL容量瓶中,作为母液备用。

2.2.2 抗氧化性活性实验

依据酸性介质中,还原剂存在的条件下,正磷酸根离子与钼酸铵形成蓝色络合物,在700 nm有较强的紫外吸收,且吸光度值大小与还原能力即抗氧化的能力成正比原理。

分别精密移取各样品母液和 V_c 标准品溶液1 mL于试管中,(依照设置的浓度梯度20、40、60、80、100、150、200、250 $\mu g/mL$ 加样),以50%乙醇溶液作空白。依次加入0.6 mol/L硫酸溶液1 mL,28 mmol/L磷酸钠溶液1.5 mL,4 mmol/L钼酸铵溶液1.5 mL,蒸馏水1 mL,摇匀后,于95℃水浴90 min,取出极速冷却后,用紫外-可见分光光度计在波长695 nm处测定吸光度并记录A。每组实验重复3次,取平均值。采用同法制备相同浓度梯度的 V_c 做对比试验,下同。

2.2.3 DPPH实验

DPPH在有机溶剂中是一种稳定的自由基,在自由基清除剂存在的条件下DPPH中氮原子上的单电子被捕获,溶液颜色变浅。在517 nm处测定吸光度,计算样品自由基清除率。

分别精密移取各月份样品母液和 V_c 标准品母液各2 mL后(依照设置的浓度梯度4、8、20、40、60、100、150 $\mu g/mL$ 加样),再加入2 mL DPPH作为实验组,每组重复实验3次。避光放置30 min,在紫外517 nm波长条件下测吸光度A,用2.0 mL的50%乙醇溶液+2.0 mL DPPH作为空白对照 A_1 ;2.0 mL无水乙醇+2.0 mL样品溶液作样品对照 A_0 。

DPPH自由基清除率 = $(1 - (A - A_0) / A_1) \times 100\%$

2.2.4 ABTS 实验

ABTS 在氧化剂存在时被氧化成绿色,抗氧化物存在时则被抑制,在 414 或 734 nm 波长处测定吸光度,可计算总抗氧化能力。吸光度大小与还原能力即抗氧化的能力成反比。

ABTS 粉末用蒸馏水溶解成浓度为 7 mmol/L 的试液,再与浓度为 140 mmol/L 的过硫酸钾按比例混合,室温,避光静置过夜,使用时用无水乙醇稀释成工作液(要求在 734 波长下吸光度在 0.68~0.72 范围,实际稀释了约 100 倍)。

参考文献方法,分别精密移取各月份样品母液和 Vc 标准品溶液 0.4 mL 后(依照设置的浓度梯度 4、8、10、20、40、80、100、150 $\mu\text{g/mL}$ 加样),再加入 3.6 mL ABTS 工作液作为实验组,每组重复实验三次。加入后振摇使混合均匀,静置 6 min,在波长 734 nm 处测吸光度,记为 A。另外设置样品对照组以 0.4 mL 样品溶液 + 3.6 mL 无水乙醇(2 组),吸光度记为 A_0 ;空白对照 3.6 mL ABTS 工作液 + 0.4 mL 50% 的乙醇溶液(3 组)吸光度记为 A_1 ,其余操作与实验组同。

$$\text{ABTS 自由基清除率} = (1 - (A - A_0) / A_1) \times 100\%$$

2.2.5 PTIO 实验

PTIO 在甲醇和水溶液中是一种稳定的自由基,在自由基清除剂存在的条件下 PTIO 上的单电子被捕获,溶液颜色变浅。在 557 nm 处测定吸光度,可以计算样品自由基清除率。

表 1 LC 时间程序

Table 1 LC time program

时间 Time(min)	0~15	15~40	40~45	45~50
水相 Water phase(%)	85	70	60	57

2.3.3 木芙蓉叶总黄酮样品成分分析

不同月份采收的供试品溶液经微孔滤膜过滤后,进样 20 μL ,参照 2.3.2 项下的分析方法进行成分分离,每个供试品溶液重复进样一次。记录不同月份采收供试品中标准品对应的峰面积值,通过标准曲线计算各成分的含量。

3 结果与分析

3.1 4~11 月木芙蓉叶总黄酮含量测定结果

分光光度法测定 4~11 月木芙蓉叶总黄酮含量变化趋势如图 1,8 月份总黄酮含量最高,4 月份次之,11 月份最低。总体趋势高-低-高-低-高-低。11 月份叶片接近枯黄脱落,总黄酮含量下降速度最快。

分别精密移取各月份样品母液和 VC 标准品溶液 1 mL 后(依照设置的浓度梯度 10、40、60、100、200、250、300 $\mu\text{g/mL}$ 加样),再加入 2 mL PTIO 作为实验组,每组重复实验 3 次。37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴并避光反应 3 h,在 557 nm 测吸光度 A。用 1.0 mL 的 50% 乙醇溶液 + 2.0 mL DPPH 作为空白对照 A_1 ;2.0 mL 无水乙醇 + 1.0 mL 样品溶液作样品对照 A_0 。

$$\text{PTIO 自由基清除率} = (1 - (A - A_0) / A_1) \times 100\%$$

2.3 UFLC 法测定木芙蓉叶黄酮成分

2.3.1 混合标准品和样品的配制

精密移取 2.1.1 项下各月份木芙蓉叶总黄酮母液 300 $\mu\text{g/mL}$ 作为供试品溶液。

综合前人研究结果,选取极性分布均匀的芦丁、金丝桃苷、槲皮苷、槲皮素等 4 个成分作为标准品,分别精密称取芦丁 8.18 mg、金丝桃苷 7.26 mg、槲皮苷 7.15 mg、槲皮素 8.09 mg,50% 乙醇为溶剂定容于 50 mL 容量瓶中,配制浓度为 163.6、145.2、143、155.6 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.3.2 标准曲线绘制

以 50% 乙醇溶液为空白对照,“2.3.1”项下的混合标准品溶液以 0.1% 的冰醋酸溶液-乙腈为流动相, C_{18} 柱为固定相,流速 1 mL/min,柱温 25 $^{\circ}\text{C}$,检测波长 370 nm,按照优化的浓度梯度(表 1)。进样 0、1、2、4、8、15、20 μL ,每个体积重复进样 2 次。记录各标准品浓度对应的平均峰面积值,计算含量。

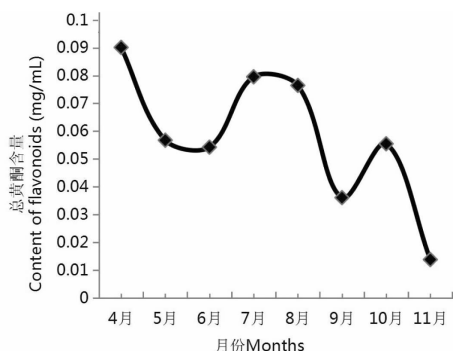


图 1 4~11 月木芙蓉叶总黄酮含量变化趋势
Fig. 1 Change trend of total flavonoids content in Foliu Hibiscus from April to November

3.2 木芙蓉叶总黄酮抗氧化结果

3.2.1 木芙蓉叶总黄酮抗氧化性活性结果

根据抗氧化力测定的基本原理,从图2可以看出,每个月木芙蓉叶总黄酮抗氧化性活性,随着浓度的增加而增加,但与对照品 Vc 相比,提高幅度不大,特别是在高浓度条件下,更是明显。

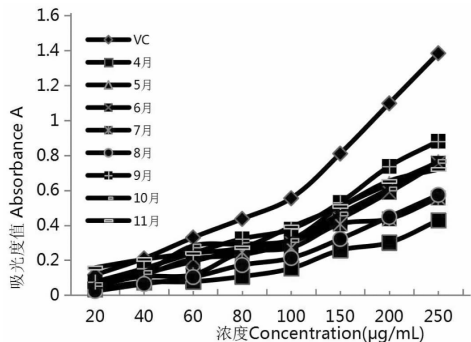


图2 不同月份不同浓度木芙蓉叶总黄酮抗氧化性变化趋势
Fig. 2 Change trend of total antioxidant activity of total flavonoids in different concentrations of Folium Hibiscus in different months

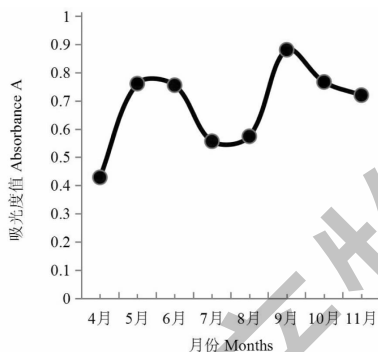


图3 4~11月木芙蓉叶总黄酮抗氧化性变化趋势
Fig. 3 Change trend of total antioxidant activity of total flavonoids in Folium Hibiscus from April to November

从图3来看,总黄酮抗氧化活性4月份最低,5和6月份上升,7、8月份下降,9月份升高,10、11月份下降,总体呈现出双“S”曲线,与植物生长大周期基本一致,可以推测,木芙蓉叶总黄酮抗氧化活性物质与生长代谢物质变化相关。

3.2.2 木芙蓉叶总黄酮对 DPPH 自由基的清除能力

以8月份木芙蓉叶总黄酮与对照品 Vc 对比研究,木芙蓉叶总黄酮对 DPPH 自由基的清除能力,从图4可以看出,其清除能力随浓度增高而增强,浓度60 µg/mL以后增速减缓。以浓度100 µg/mL,测定4~11月木芙蓉叶总黄酮对 DPPH 自由基的清除能力,结果如图5所示,4月份和10月份较强,7月份

和11月份较弱,呈现出一个弱“S”曲线。

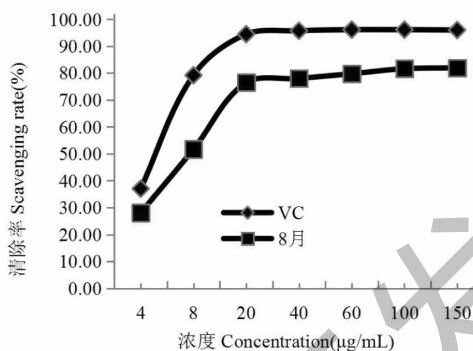


图4 木芙蓉叶总黄酮对 DPPH 自由基的清除能力
Fig. 4 Scavenging ability of total flavonoids in Folium Hibiscus on DPPH radical

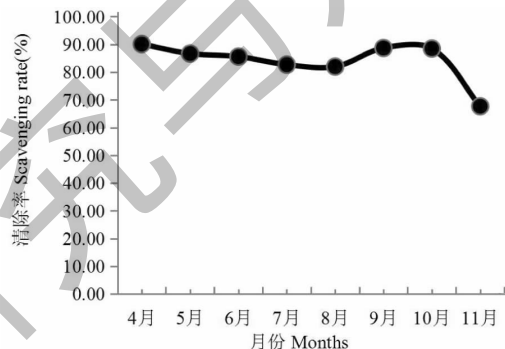


图5 4~11月木芙蓉叶总黄酮对 DPPH 自由基的清除能力
Fig. 5 Scavenging ability of total flavonoids in Folium Hibiscus on DPPH radical from April to November

3.2.3 木芙蓉叶总黄酮对 ABTS 自由基的清除能力

从图6可以看出,木芙蓉叶总黄酮对 ABTS 自由基的清除能力随浓度增大而增强,浓度在80 µg/mL以后增长缓慢,几乎接近对照品 Vc 的强度了。选取浓度150 µg/mL,测定4~11月木芙蓉叶总黄酮对 ABTS 自由基的清除能力,结果如图7,4月和9月较弱,6月和11月较强,也呈现出一个“S”曲线。

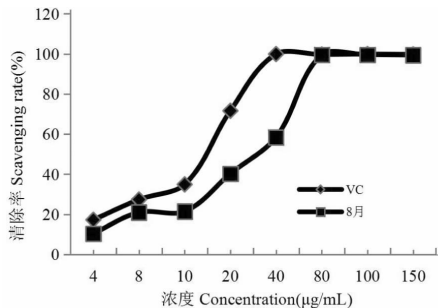


图6 木芙蓉叶总黄酮对 ABTS 自由基的清除能力
Fig. 6 Scavenging ability of total flavonoids in Folium Hibiscus on ABTS radical

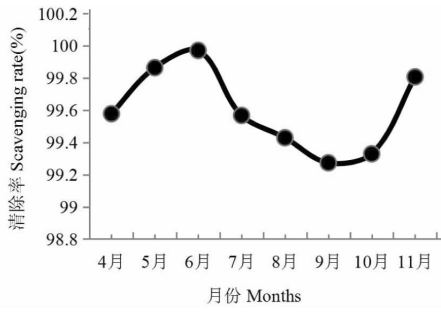


图7 4~11月木芙蓉叶总黄酮对ABTS自由基的清除能力
Fig. 7 Scavenging ability of total flavonoids in Folium Hibiscus on ABTS radical from April to November

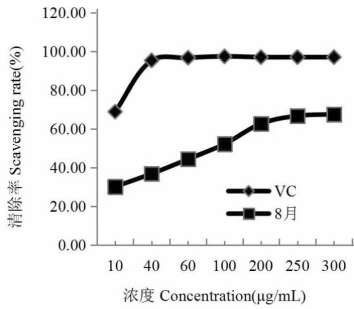


图8 木芙蓉叶总黄酮对PTIO自由基的清除能力
Fig. 8 Scavenging ability of total flavonoids in Folium Hibiscus on PTIO radical

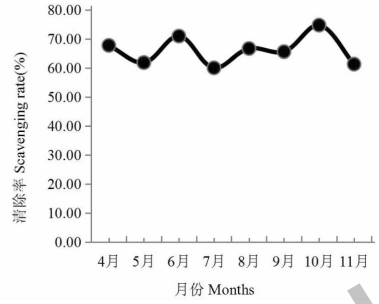


图9 4~11月木芙蓉叶总黄酮对PTIO自由基的清除能力
Fig. 9 Scavenging ability of total flavonoids in Folium Hibiscus on PTIO radical from April to November

3.2.4 木芙蓉叶总黄酮对PTIO自由基的清除能力

从图8可以看出,木芙蓉叶总黄酮对ABTS自由基的清除能力随浓度增大而缓慢增强。以浓度为300 µg/mL,测定4~11月对ABTS自由基的清除能力,结果如图9,4、6、8、10月较强,5、7、9、11月较弱,基本呈现的是强-弱交替变化的趋势。

3.3 UFLC法测定木芙蓉叶4种黄酮成分含量

3.3.1 标准曲线绘制

根据2.3.2项下记录的各标准品浓度对应的平均峰面积值结果,以峰面积作为横坐标x,标准品浓度作为纵坐标y,制作标准曲线并计算峰面积和标准品含量的相关性,结果如表2。

表2 4种黄酮成分对照品标准曲线

Table 2 Standard curve of four kinds of flavonoids

化合物 Compound	回归方程 Regression equation	相关系数 <i>r</i>	线性范围 Linear range(µg/mL)
芦丁 Rutin	$y = 1\ 214\ 685.19x + 610.151\ 170\ 1$	0.999 8	0.01 ~ 0.15
金丝桃苷 Hyperin	$y = 1\ 782\ 622.36x - 344.270\ 714\ 7$	0.999 8	0.05 ~ 0.80
槲皮苷 Quercitrin	$y = 1\ 355\ 450.171x + 164.360\ 531\ 3$	0.999 9	0.02 ~ 0.25
槲皮素 Quercetin	$y = 2\ 876\ 034.936x - 53\ 969.692\ 6$	0.999 8	0.04 ~ 0.35

3.3.2 UFLC法测定4种黄酮类物质成分4~11月

UFLC法测定木芙蓉叶4种黄酮物质,从图10可以看到,总体来看,金丝桃苷含量最高,金丝桃苷含量在木芙蓉叶生长周期内呈现出高-低-高-低变化趋势,其中7月和11月含量急剧下降。芦丁含量变化总体比较平缓,11月含量下降较快。槲皮苷含量5月最高,11月最低,总体呈现出“S”形变化趋势。槲皮素含量4~5月增长平缓,以后下降,9月增高,11月最高,呈现出与其他3个组分物质不一致的变化趋势。

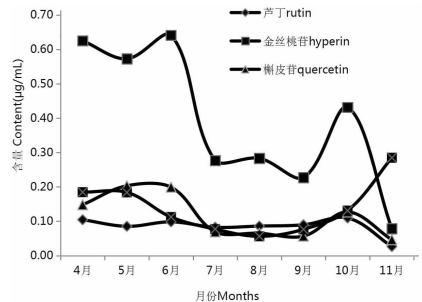


图10 4种黄酮成分含量4~11月变化趋势
Fig. 10 Change trend of the contents of four kinds of flavonoids from April to November

3.3.3 总黄酮及4种黄酮类物质与抗氧化性相关比较结果

将总黄酮及4种黄酮类物质4~11月含量变化趋势与不同检测方法的抗氧化性活性进行相关性分析,结果见表3。总黄酮、芦丁和金丝桃苷含量与总抗氧化性呈负相关。总黄酮、芦丁、金丝桃苷和槲皮苷含量与DPPH自由基清除率呈正相关,槲皮素与DPPH自由基清除率呈负相关。金丝桃苷、槲皮苷和槲皮素与ABTS自由基清除率呈正相关,芦丁与

ABTS自由基清除率呈负相关。芦丁、金丝桃苷和槲皮苷与PTIO自由基清除率呈正相关,槲皮素与PTIO自由基清除率呈负相关。总体来看,总黄酮和芦丁与4种检测抗氧化活性趋势基本一致,槲皮苷与4种检测抗氧化活性均呈现正相关,说明木芙蓉叶中槲皮苷组分抗氧化作用明显。因此,在研究黄酮类物质抗氧化性活性时,不能以一种检测方法来确定其强弱,而是要综合考虑。

表3 黄酮类物质与抗氧化性相关系数

Table 3 Correlation coefficient between flavonoids and antioxidant activity

物质 Substance	抗氧化活性 Antioxidant activity	DPPH 自由基清除率 DPPH radical scavenging rate	ABTS 自由基清除率 ABTS radical scavenging rate	PTIO 自由基清除率 PTIO radical scavenging rate
总黄酮 Total flavonoids	-0.534 26	0.743 53	-0.283 22	0.421 90
芦丁 Rutin	-0.152 81	0.960 70	-0.343 59	0.659 92
金丝桃苷 Hyperin	-0.227 71	0.707 46	0.364 63	0.461 11
槲皮苷 Quercitrin	0.006 91	0.537 54	0.567 15	0.108 74
槲皮素 Quercetin	0.050 66	-0.544 81	0.510 17	-0.241 97

4 讨论与结论

木芙蓉叶总黄酮含量8月份最高,11月份最低,黄酮成分芦丁含量10月份最高,11月份最低,金丝桃苷含量6月份最高,11月份最低、槲皮苷含量5月份最高,11月份最低、槲皮素含量4月份最高,8月份最低。总抗氧化活性9月份最强,DPPH自由基清除率10月份最强,ABTS自由基的清除能力6月份最强,PTIO自由基的清除能力10月份最强。芦丁每个月含量变化起伏不大,结合抗氧化活性强弱,木芙蓉叶中芦丁成分可以作为药效评价和木芙蓉叶药材质量的指标。同时本研究进一步说明现阶段中药药效研究主要成分的合理性,中药材采收期影响成分含量及其药效,中药的药效是多组分综合效应协同作用的结果,为中药药效研究需要提高成分分离技术,多成分检测技术提供了理论依据。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:第一部)[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 61-62.
- 2 Yu LR, Jian K, He XY, et al. Study on extraction and content variation of total flavonoids from *Hibiscus mutabilis* leaf[J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 2019, 30(1): 5-8

- 3 Yao LY, Wang GY, Wang LP. Study on extraction process of leaves of *Hibiscus mutabilis* L. [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2000, 22: 827-829.
- 4 Yao LY, Lu Y, Chen ZN. Studies on chemical constituents of *Hibiscus mutabilis* [J]. China Tradit Herb Drugs (中草药), 2003, 34(3): 201-203.
- 5 Wan DR, Mei Q, Pan S. Determination of total flavonoids content in *Hibiscus mutabilis* folium from different harvest periods [J]. J S-Cent Univ Natl; Nat Sci (中南民族大学学报: 自科版), 2013, 32(4): 46-49.
- 6 Li JM, He MZ, Ou YH, et al. Rapid identification of chemical constituents of *Hibiscus mutabilis* folium by UHPLC-Q-TOF-MS/MS [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2016, 51: 1162-1168.
- 7 Chen F, He XY, Zhou MQ, et al. Ultrasonic-assisted extraction and antioxidant effects of total flavonoids from *Schnabelia tetradonta* [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2016, 28(1): 96-101.
- 8 Wen HB, Cao YC, Wu YL, et al. Study on antioxidant activity of total flavonoids from *Rosa laevigata* Michx [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2014, 26: 1127-1131.
- 9 Feng ZR, He XY, Ou YK, et al. Optimization of extraction of total alkaloids from *Semiaquilegia adoxoides* using response surface methodology and evaluation of its antioxidant activity *in vitro* [J]. Tradit Chin Drug Res Pharmacol (中药新药与临床药理), 2018, 29: 199-204. (下转第 651 页)