

文章编号: 1003-9015(2011)06-0948-07

树莓叶片黄酮成分分离纯化研究

杨 昱¹, 徐雅琴¹, 于泽源²

(1. 东北农业大学 理学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 东北农业大学 园艺学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘 要: 为纯化树莓叶片黄酮成分, 比较了 7 种树脂静态吸附和解吸过程, 筛选出合适的大孔树脂初步纯化树莓叶片总黄酮, 优化了吸附和解吸条件。结果表明: AB-8 大孔树脂对树莓叶片总黄酮有较好的吸附和解吸性能, 其最佳工艺为上样液 pH = 6.0、流速 2.0 mL·min⁻¹, 洗脱剂乙醇最适宜浓度为 70%, 流速 1.5 mL·min⁻¹, 经 AB-8 大孔树脂分离纯化后, 总黄酮含量从 3.46% 增加到 45.62%, 提高了 13.18 倍。样品经硅胶和 Sephadex LH-20 凝胶色谱进一步分离纯化后得到 2 个黄酮苷元单体, 通过 HPLC、核磁共振分析, 确定为槲皮素和山奈酚, 纯度分别为 98.6%, 98.9%, 在树莓叶片中含量分别为 179.33 μg·g⁻¹、60.77 μg·g⁻¹ (苷元含量)。

关键词: 树莓叶; 槲皮素; 山奈酚; 分离; 纯化

中图分类号: TQ914.3; TQ028.15

文献标识码: A

Separation and Purification of Flavonoids in Raspberry Leaves

YANG Yu, XU Ya-qin, YU Ze-yuan

(1. College of Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

2. Department of Horticulture Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: In order to purify the flavonoids extracted from *Raspberry* leaves, the static adsorption and desorption behaviors of seven kinds of macroporous resins used for the separation of flavonoids were studied respectively. Among them, the most suitable kind of macroporous resin was screened for the preliminary purification of the flavonoids extracted from the *Raspberry* leaves, and its adsorption and desorption conditions were optimized too. The results show that the AB-8 macroporous resin offers the best adsorption and desorption behaviors for total flavonoids in the extractive of the *Raspberry* leaves. Using AB-8, the optimum purification conditions are as follows: sample pH is 6, sample flow rate is 2.0 mL·min⁻¹, the elution used is alcohol with concentration 70% and the eluting rate is 1.5 mL·min⁻¹. After the AB-8 resin treatment, the total flavonoids content in the product increases 13.18-fold from 3.46% to 45.62%; and then the silica gel separation and Sephadex LH-20 gel chromatography were used to further purify the flavonoids obtained. Two flavonoid aglycones monomers, quercetin and kaempferol, were obtained and the purities of them are 98.6% and 98.9%, respectively, with HPLC and NMR analyses, and their contents in the *Raspberry* leaves are 179.33 μg·g⁻¹ and 60.77 μg·g⁻¹ (aglycone content), respectively.

Key words: *Raspberry* leaves; quercetin; kaempferol; separation; purification

1 引 言

树莓, 又称覆盆子, 属蔷薇科(*Rasaceae*)悬钩子属(*Rubus.L*), 是一种多年生小灌木类落叶果树, 在我国北方地区分布广泛, 资源丰富。树莓具有丰富的营养和独特的保健功能, 其营养价值远高于苹果、柑橘、葡萄等水果, 是近年世界发展最为迅速、集营养与保健于一身的第三代新兴水果^[1]。目前对树莓的

收稿日期: 2010-03-22; 修订日期: 2010-07-05。

基金项目: 东北农业大学创新专项(190205); 东北农业大学博士启动基金; 工艺性行业科研专项基金项目(nyhyzx07-28, 2006-G25)。

作者简介: 杨昱(1977-), 黑龙江哈尔滨人, 东北农业大学讲师, 东北农业大学在职博士生。通讯联系人: 徐雅琴, E-mail: xu-yaqin@163.com

研究和开发主要集中于树莓引种栽培和果实的加工利用^[2,3], 其叶片的价值尚未引起人们的足够重视, 在树莓叶片中, 起主要药用的是黄酮类物质^[4]。黄酮类化合物是植物界分布较广的一大类多酚类物质, 常以游离或糖苷形式存在于植物体内, 是一类具有显著生理药理活性和开发前景的植物成分^[5,6], 其中山奈酚(kaempferol)和槲皮素(querletin)具有明显的抗癌^[7]、抗氧化^[8], 抗心肌肥厚功能^[9], 并能促进骨髓中成骨细胞的形成^[10]。作者曾对树莓叶片中黄酮类物质的提取方法及抗氧化性能进行了研究^[11,12], 但有关树莓叶片黄酮成分分离纯化方面的研究未见报道。因此本文以黑龙江省特产小浆果树莓叶片为原料, 研究了树莓叶片黄酮成分分离纯化工艺, 以期树莓叶片黄酮类制品的开发提供理论支持。

2 实验部分

2.1 实验材料与仪器

树莓叶片: 澳洲红树莓叶片采于东北农业大学园艺站, 洗净沥干后自然晒干, 粉碎后备用。

试验试剂: 芦丁、山奈酚、槲皮素(中国药品生物制品鉴定所); 其他试剂均为国产分析纯。

AB-8、X-5、D-140、D-4006、S-8、NKA-9 和 D-130 大孔树脂(南开大学化工厂); 硅胶(200~300 目)和硅胶 GF254(青岛海洋化工厂); Sephadex LH-20(北京金欧亚科技发展有限公司)。

T6 新悦型可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司); AL104 电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司); FDU-1100 冷冻干燥机(东京理化器械株式会社); X-4 数字显示显微熔点测定仪(北京泰克仪器有限公司); RSZ-100 自动部分收集器(上海金达生化仪器有限公司); 高效液相色谱仪(Agilent 公司); 超导核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司)。

2.2 树莓叶片总黄酮粗提液的制备

树莓叶片→粉碎→乙醚脱脂→酶解→乙醇浸提^[13]→减压过滤(45 μm滤膜)→滤液离心(6000 r·min⁻¹, 10 min)→上清液减压浓缩→去离子水溶解→粗产品。

2.3 分析方法

2.3.1 树莓叶片总黄酮含量的测定方法

采用 NaNO₂-Al(NO₃)₃ 比色法测定^[13], 以芦丁为标准品, 分别在 506 nm(测定波长)和 572 nm(参比波长)测定吸光度, 求出 ΔA。以 ΔA 对标准溶液浓度 C(mg·mL⁻¹)进行回归分析得方程: ΔA = 0.6221C - 0.0002, R² = 0.9996。根据此方程计算样品溶液总黄酮含量。

2.3.2 山奈酚和槲皮素含量的测定方法

分别精密吸取山奈酚(0.26 mg·mL⁻¹)和槲皮素(0.52 mg·mL⁻¹)的混合标准溶液 5、10、15、20、25 μL 注入高效液相色谱仪中, 以进样体积(μL)为横坐标, 峰面积为纵坐标, 分别建立回归方程: $y = 73.982x - 12.493$, R² = 0.9987(山奈酚); $y = 244.58x - 37.815$, R² = 0.9992(槲皮素)。测定样品溶液峰面积, 代入回归方程计算样品溶液中山奈酚和槲皮素含量。

2.4 大孔树脂的筛选

2.4.1 静态吸附-解吸研究

准确称取经预处理^[14]的 7 种树脂(相当于干树脂 0.5 g), 置于 100 mL 具塞三角瓶中, 精密加入黄酮粗提液 20.00 mL(1.5834 mg·mL⁻¹), 置于摇床中, 25℃, 60 r·min⁻¹振荡吸附 24 h, 测定滤液中剩余总黄酮浓度, 按式(1)计算吸附量。试验重复 3 次, 以下试验重复次数相同。再向已吸附饱和的 7 种树脂中分别精密加入 20.00 mL 70% 乙醇溶液, 于吸附相同条件下振荡解吸 24 h, 测定解吸液中总黄酮浓度, 按式(2)计算解吸率。根据吸附量和解吸率对几种大孔树脂进行初步筛选。

$$Q = (C_0 - C_e) V_0 / m \quad (1)$$

$$D(\%) = C_d \times 100 / (C_0 - C_e) \quad (2)$$

式中: Q 为吸附量, mg·g⁻¹; C₀ 为吸附前样液中总黄酮质量浓度, mg·mL⁻¹; C_e 为吸附后剩余液中总黄酮质量浓度, mg·mL⁻¹; V₀ 为加入的样液体积, mL; m 为干树脂质量, g; D 为解吸率; C_d 为解吸液中总黄酮质量浓度, mg·mL⁻¹。

2.4.2 静态吸附-解吸动力学研究

25℃, 准确称取已初步确定的 4 种大孔树脂(相当于干树脂 0.5 g)装入具塞三角瓶中, 加入 20.00 mL(1.5834 mg·mL⁻¹)黄酮粗提液, 在 10 h 内, 取 0.2 mL·h⁻¹ 测定总黄酮含量, 绘制静态吸附动力学曲线。树脂吸附饱和后, 用 20.00 mL 70% 的乙醇静态解吸, 与上述方法相同, 绘制静态解吸动力学曲线。根据静态吸附和解吸动力学曲线, 确定初步纯化树莓叶片总黄酮的大孔树脂。

2.5 AB-8大孔树脂吸附条件的优化

2.5.1 上样液 pH 的确定

准确称取经预处理的 AB-8 树脂(相当于干树脂 0.5 g), 置于 100 mL 具塞三角瓶中, 25℃, 加入不同 pH 的黄酮粗提液 20.00 mL(1.5834 mg·mL⁻¹), 置于摇床中, 60 r·min⁻¹ 振荡 10 h, 测定滤液中剩余总黄酮浓度, 计算吸附量, 确定上样液最佳 pH。

2.5.2 上样液流速的确定

预处理好的 AB-8 树脂(相当于干树脂 14 g)湿法装玻璃柱(Φ20 mm×300 mm)。床体积(BV)和长度分别是 40 mL 和 13 cm。25℃, 将 pH 为 6, 浓度为 1.5834 mg·mL⁻¹ 的上样液以不同的流速上柱, 分部收集流出液(每管收集 20 mL), 测定流出液中总黄酮浓度, 计算漏出率(流出液与上样液中总黄酮质量浓度的比值), 以漏出率对上样液体积作图, 确定最佳上样液流速。

2.6 AB-8大孔树脂解吸条件的优化

2.6.1 洗脱剂乙醇浓度的确定

25℃, pH=6、浓度为 1.5834 mg·mL⁻¹ 上样液, 控制流速为 2.0 mL·min⁻¹, 待吸附达泄漏点时(流出液总黄酮质量浓度达上样液总黄酮质量浓度的 1/10), 先用去离子水洗至流出液无色, 再分别用 100 mL 不同浓度的乙醇溶液进行洗脱, 洗脱流速控制为 1.0 mL·min⁻¹, 测定洗脱液中总黄酮含量, 计算解吸率, 确定最佳洗脱剂浓度。

2.6.2 洗脱剂流速的确定

25℃, pH=6、浓度为 1.5834 mg·mL⁻¹ 上样液, 控制流速为 2.0 mL·min⁻¹, 待吸附达泄漏点时, 先用去离子水洗至流出液无色, 再用 70% 的乙醇溶液以不同流速进行洗脱, 分部收集流出液(每管收集 5 mL), 测定流出液中总黄酮含量, 确定最佳洗脱剂流速。

2.7 硅胶柱色谱进一步分离纯化树莓叶片黄酮成分的研究

在确定的最佳吸附-解吸条件下, 采用大孔树脂初步纯化树莓叶片总黄酮粗提液, 得样品 A。25℃, 将样品 A 干法装入已预处理好的硅胶柱(Φ20 mm×800 mm), 床体积(BV)和长度分别是 188 mL 和 60 cm, 用氯仿:甲醇(100:0~80:20)梯度洗脱, 流速为 0.5 mL·min⁻¹, 每 50 mL 收集一份, 收集 20 份, 纸色谱法(4:1:5 的正丁醇-冰醋酸-水溶液为展开剂, 1% AlCl₃ 乙醇溶液为显色剂)检测, 合并相同组分, 减压浓缩, 冻干, 得到固体物质 B。将固体物质 B 用甲醇溶解后加入盐酸(1:1), 在 70℃ 水浴条件下水解 2 h 后, 得到黄酮苷元 C。对 C 进行 HPLC 分析并测定主要组分含量。

2.8 Sephadex LH-20凝胶柱色谱分离黄酮苷元单体的研究

25℃, 将样品 C 加入到已用 20% 甲醇水溶液平衡好的 Sephadex LH-20 凝胶柱(Φ15 mm×400 mm), 床体积(BV)和长度分别是 53 mL 和 30 cm, 用 50%~90% 甲醇溶液进行梯度洗脱, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 自动分部收集洗脱液, 每 5 mL 收集一份, 收集 30 份。硅胶薄层色谱(9:1 的氯仿-甲醇作展开剂, 碘蒸气显色)检测, 合并相同组分, 减压浓缩, 冻干, 得到化合物 1 和 2 两个组分。

2.9 黄酮苷元单体的纯度和结构测定

对化合物 1 和 2 分别进行熔点测定, HPLC 分析, 采用归一法定量, 检验纯度; NMR 分析确定结构。

2.10 HPLC 分析条件

色谱柱为 Agilent-1100 C₁₈ 柱; 流动相为甲醇:0.4% 磷酸 = 55:45(v/v); 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 柱温为 20℃; 检测波长为 256 nm。

3 结果与讨论

3.1 树脂的筛选

3.1.1 不同大孔树脂静态吸附

与解吸性能比较

7 种大孔树脂静态吸附与解

吸试验结果见表 1。

被分离物质的极性(功能基)

是影响吸附性能的主要因素^[15]。

从表 1 可见, 极性或非极性的树

脂 S-8、AB-8 和 D-130 对树莓叶片黄酮吸附量较大, 这是因为树莓叶片黄酮类物质含有酚羟基, 呈现弱极性, 易与具有一定极性的树脂形成氢键而牢固结合, 吸附量较大, 但在某些情况下, 吸附作用力强的树脂洗脱较困难, 因此吸附量最大的 S-8 树脂解吸率最小。此外树脂的比表面积、孔径等空间结构也影响其吸附性能, 比表面积增加, 表面张力随之增大, 吸附量提高^[15]。AB-8 与 NKA-9 虽然都为极性树脂, 但由于 NKA-9 比表面积较小, 导致对黄酮吸附量也较少。X-5、D-140 树脂由于比表面较大, 虽为非极性树脂, 但仍有一定的吸附量。根据试验结果初步选择 AB-8, X-5, D-130, D-140 树脂考察其动力学吸附与解吸性能。

3.1.2 不同大孔树脂静态吸附与解吸动力学性能比较

由图 1、图 2 可以看出, AB-8 树脂在整个吸附和解吸过程中吸附量和解吸率始终最高, 树脂吸附 5 h 后基本达到吸附平衡, 解吸 3 h 基本解吸完全。在静态吸附和解吸起始阶段, AB-8 树脂对树莓叶片总黄酮吸附量和解吸率上升得都比较快, 说明 AB-8 树脂达到吸附和解吸平衡所需要的时间短。因此, 确定 AB-8 树脂为分离纯化树莓叶片总黄酮的最佳树脂。

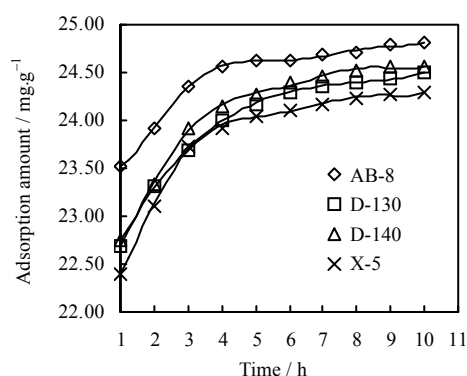


图 1 静态吸附动力学曲线

Fig.1 Kinetic curves of the static adsorption

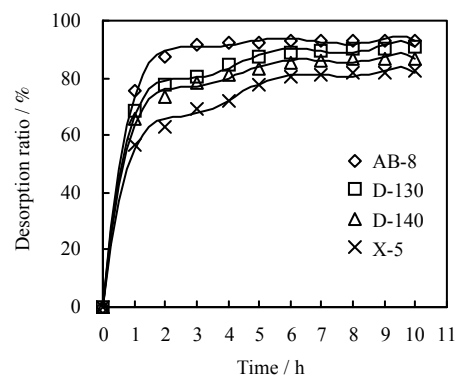


图 2 静态解吸动力学曲线

Fig.2 Kinetic curves of the static

3.2 AB-8 树脂初步纯化树莓叶片总黄酮工艺条件的优化

3.2.1 上样液 pH 对树脂吸附性能的影响

黄酮上样液 pH(3~9)对树脂吸附性能的影响见图 3。由图 3 可见, 最适宜吸附的 pH 为 6.0。这是由于 pH 对物质吸附的影响主要取决于化合物的酸碱度, 黄酮类物质含有酚羟基, 具有弱酸性, 在酸性条件下以分子状态存在, 主要以分子间力与树脂吸附, 溶液为碱性时酚羟基离子化, 与树脂间的分子间力下降。因此上样液 pH 选 6.0 为宜。

3.2.2 上样液流速对树脂吸附性能的影响

上样液流速对树脂吸附性能的影响见图 4。由图 4 所示,

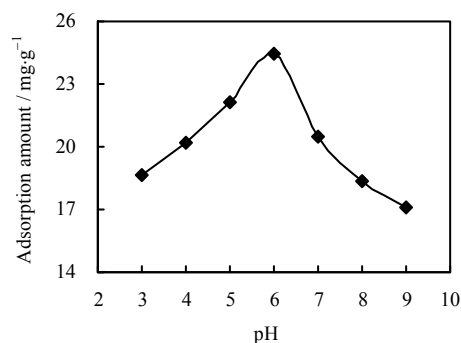


图 3 上样液 pH 对树脂吸附性能的影响

Fig.3 Effect of sample solution pH on the adsorption property of resin

流速为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 时泄漏点出现较晚, 在 130 mL 附近, 当流速大于 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 时, 泄漏点均提前。这是因为流速慢时, 黄酮与树脂的接触时间延长, 有利于其从液相扩散到树脂相, 有利于吸附; 流速过快, 被吸附物质来不及扩散到树脂表面就会发生泄漏。因此流速慢有利于吸附, 但流速过慢会影响生产效率, 生产周期延长。综合考虑, 选择流速为 $2.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 为宜。

3.2.3 洗脱剂浓度的确定

不同浓度(10%~90%)的乙醇对树莓叶片总黄酮粗提液洗脱效果的影响见图 5。由图 5 可知, 随乙醇浓度的增加, 解吸率逐步提高, 乙醇体积分数为 70% 时解吸率最高, 达 96.5%, 再提高浓度解吸率变化不大。根据“相似相溶”原理, 不同浓度的乙醇对化合物的溶解力不同, 70% 乙醇的解吸率较高可能是由于其极性和树莓叶片总黄酮的极性更加接近。因此, 选择 70% 乙醇为洗脱剂。

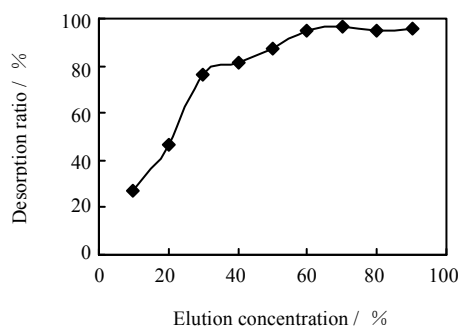


图 5 乙醇浓度对树脂解吸性能的影响
Fig.5 Effect of ethanol concentration on the desorption property of resin

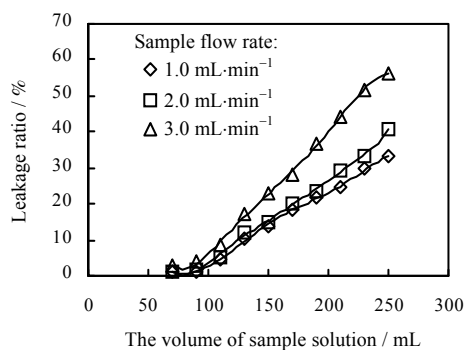


图 4 上样液流速对树脂吸附性能的影响
Fig.4 Effect of sample flow rate on the adsorption property of resin

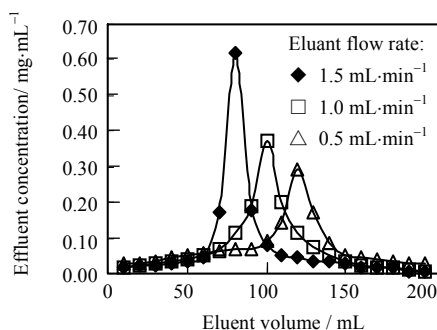


图 6 洗脱剂流速对树脂解吸性能的影响
Fig.6 Effect of eluant flow rate on the desorption property of resin

3.2.4 洗脱剂流速对大孔树脂解吸性能的影响

洗脱剂流速对树脂解吸性能的影响见图 6。由图 6 可见, 用 70% 乙醇以 $1.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度进行洗脱时, 洗脱峰集中, 无拖尾, 洗脱效果好, 160 mL 洗脱剂就可将树莓叶片总黄酮基本洗脱下来。故洗脱剂流速为 $1.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 为宜。

在确定的 AB-8 大孔树脂最佳吸附-解吸条件下, 收集解吸液, 减压浓缩, 冻干, 得到的固形物中总黄酮含量由树莓叶片粗提物中的 3.46% 提高至 45.62%。

3.3 硅胶柱色谱分离纯化结果

标准品混合样和样品 C 的 HPLC 分析如图 7 所示。

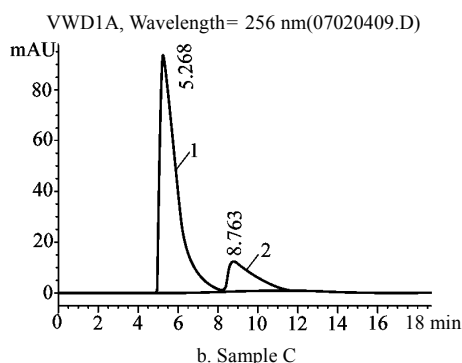
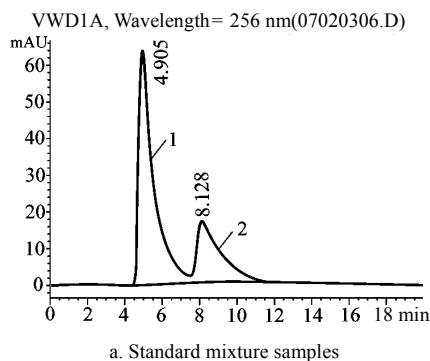


图 7 标准品和水解样品 C 的高效液相色谱图
Fig.7 HPLC chromatograms of standard mixture samples and sample C

由图 7 可知, 树莓叶片黄酮粗提物经大孔树脂和硅胶分离纯化, 样品水解后主要得到槲皮素和山奈酚两个苷元, 根据 2.3.2 节可计算出槲皮素和山奈酚的含量分别为 $179.33 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 、 $60.77 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

3.4 黄酮苷元单体的纯度检测和 NMR 分析结果

3.4.1 化合物 1 和 2 的纯度检测

化合物 1 为黄色针状晶体, mp: $319.2\sim 320.7^{\circ}\text{C}$; 化合物 2 为亮黄色粉末, mp: $279.4\sim 280.6^{\circ}\text{C}$ 。化合物 1 和 2 经 HPLC 分析(检测波长分别为 255 nm, 266 nm, 其它色谱条件同 2.10 节), 结果表明化合物 1 为槲皮素, 纯度 98.6%, 化合物 2 为山奈酚, 纯度 98.9%。

3.4.2 化合物 1 和 2 的 ^1H -NMR 谱图分析

化合物 1 的谱图分析结果如下: ^1H -NMR(300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 6.21 (s, 1H, H^1), 6.43 (s, 1H, H^2), 6.91 (d, 1H, $J=8.5 \text{ Hz}$, H^3), 7.56 (d, 1H, $J=8.5 \text{ Hz}$, H^4), 7.70 (s, 1H, H^5), 9.26 (s, 1H, -OH), 9.31 (s, 1H, -OH), 9.55 (s, 1H, -OH), 10.75 (s, 1H, -OH), 12.50 (s, 1H, -OH)。分析结果表明化合物 1 各化学位移与槲皮素标准品基本吻合。

化合物 2 的谱图分析结果如下: ^1H -NMR(300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 6.21 (s, 1H, H^1), 6.44 (s, 1H, H^2), 6.93 (d, 2H, $J=8.7 \text{ Hz}$, H^3 、 H^4), 8.04 (d, 1H, $J=8.7 \text{ Hz}$, H^5 、 H^6), 9.31 (s, 1H, -OH), 10.05 (s, 1H, -OH), 10.73 (s, 1H, -OH), 12.47 (s, 1H, -OH)。分析结果表明化合物 2 各化学位移与山奈酚标准品基本吻合。

4 结 论

AB-8 大孔树脂是分离纯化树莓叶片总黄酮的理想树脂, 其最佳纯化条件为: 上样液 pH 6, 流速 $2.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 洗脱剂选择 70% 乙醇溶液, 洗脱剂流速 $1.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 在此条件下, 总黄酮含量由 3.46% 提高到 45.62%。

树莓叶片黄酮粗提液经 AB-8 大孔树脂、硅胶和 Sephadex LH-20 凝胶色谱分离纯化后, 得到的黄酮苷元主要是槲皮素, 纯度 98.6%, 山奈酚, 纯度 98.9%, 在叶片中含量分别为 $179.33 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (槲皮素)、 $60.77 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (山奈酚)。

参考文献:

- [1] XU Yu-xiu(徐玉秀), WANG You-sheng(王友升), WANG Gui-xi(王贵禧). Utilization of *Rubus corchorifolius* and its development in China(树莓的利用研究及其在我国的发展前景) [J]. *Nonwood Forest Research*(经济林研究), 2003, 21(1): 64-66.
- [2] Desen Zheng, Geza Hrazdina. Molecular and biochemical characterization of benzalacetone synthase and chalcone synthase genes and their proteins from raspberry (*Rubus idaeus* L.) [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2008, 470(2): 139-145.
- [3] DAI Han-ping(代汉萍), SUN Xi-cheng(孙喜成), WANG Fei(王菲), et al. Summer and autumn results of raspberry varieties Qiufu(夏秋两季结果树莓品种秋福) [J]. *China Fruits*(中国果树), 2006(3): 19-20.
- [4] ZHANG Qi(张琦), LIU Xue(刘学), MENG Xian-jun(孟宪军), et al. Efficacy components of Raspberry leaves and foreground of its development and utilizing(树莓叶的主要功效成分及开发利用前景) [J]. *China Condiment*(中国调味品), 2008(2): 26-29.
- [5] LIU Ping(刘萍), ZHENG Ya-an(郑亚安), WANG Yi-si(王怡斯), et al. Bioconversion of flavonoid glycosides in the leaves of *Hippophae rhamnoides* into aglycones(沙棘叶黄酮糖苷生物转化黄酮苷元研究) [J]. *J Chem Eng of Chinese Univ*(高校化学工程学报), 2006, 20(6): 996-1000.
- [6] Takuya Katsube, Yoko Tsurunaga, Mari Sugiyama, et al. Effect of air-drying temperature on antioxidant capacity and stability of polyphenolic compounds in mulberry (*Morus alba* L.) leaves [J]. *Food Chemistry*, 2009, 113(4): 964-969.
- [7] Wei Li, Bingna Du, Tianyi Wang, et al. Kaempferol induces apoptosis in human HCT116 colon cancer cells via the Ataxia-Telangiectasia Mutated-p53 pathway with the involvement of p53 Upregulated Modulator of Apoptosis [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2009, 177(2): 121-127.
- [8] Lesław Juszczak, Robert Socha, Jacek Rożnowski, et al. Antioxidant activity and phenolic composition of herbhoneys [J]. *Food Chemistry*, 2009, 113(2): 568-574.
- [9] QIN Tai-chun(秦泰春), GU Zhen-lun(顾振纶), LIU Shi-zeng(刘世增). Effects of quercetin on cardiac hypertrophy induced by pressure overload in rat(槲皮素对压力超负荷所致大鼠心肌肥厚的影响) [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*(中草药),

- 1999, 30(4): 275-277.
- [10] Ritu Trivedi, Avinash Kumar, Varsha Gupta, *et al.* Effects of Egb 761 on bone mineral density, bone microstructure, and osteoblast function: Possible roles of quercetin and kaempferol [J]. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 2009, 302(1): 86-91.
- [11] CHEN Xiao-hui(陈晓慧), XU Ya-qin(徐雅琴). Study on the extraction of total flavonoids from Raspberry leaves by enzymatic treatment(酶法提取树莓叶片黄酮类化合物的研究) [J]. **Food Research and Development(食品研究与开发)**, 2007, 2(28): 35-38.
- [12] XU Ya-qin(徐雅琴), YU Ze-yuan(于泽源), REN Hua-feng(任华锋). Extraction and antioxidation of flavonoids in leaves from red Raspberry (红树莓叶片中黄酮类物质提取及抗氧化性的研究) [J]. **China Oils and Fats(中国油脂)**, 2003, 28(5): 69-71.
- [13] XIANG Shao-bao(项昭保), REN Shao-guang(任绍光), SHI Yi-song(石秩松), *et al.* Absorptiophotometric determination of total flavones in stems and leaves of Buckwheat(吸光光度法测定荞麦茎中总黄酮) [J]. **Physical Testing and Chemical Analysis Part B(Chemical Analysis)(理化检验-化学分册)**, 2002, 38(9): 436-437.
- [14] DONG Juan-e(董娟娥), LIANG Zong-suo(梁宗锁), ZhANG Kang-jian(张康健), *et al.* Isolation of total glycosides and flavonoids from *Eucommia ulmoides* leaf by macroporous resin(大孔吸附树脂一次性分离杜仲叶中杜仲总苷和杜仲黄酮的研究) [J]. **Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering(农业工程学报)**, 2006, 22(7): 154-158.
- [15] LIU Xiao-ping(刘小平), LI Xiang-nan(李湘南), XU Hai-xing(徐海星). **Separation Engineering of Chinese Herb Medicine(中药分离工程)** [M]. Beijing(北京): Chemical Industry Press(化学工业出版社), 2005: 95-100.