

• 药剂与工艺 •

黑曲霉菌对獐牙菜苦苷的生物转化工艺优化

刘莹¹, 张箐², 田成旺³, 韩冬¹, 张铁军^{3*}

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津尖峰天然产物研究与开发有限公司, 天津 300402

3. 天津药物研究院, 天津 300193

摘要: 目的 以獐牙菜苦苷为底物, 用黑曲霉菌对獐牙菜苦苷进行生物转化, 并对转化条件进行优化。方法 以獐牙菜新素生成率和獐牙菜苦苷转化率为指标, 考察不同培养时间、不同碳源、不同氮源、不同种类金属离子、磷酸盐、生长因子(酵母膏)、接种量、底物加入量、不同初始 pH 值、不同温度条件, 优化獐牙菜苦苷在黑曲霉培养液中的转化条件。结果 优化后的培养条件为: 葡萄糖 10 g/L, 蛋白胨 5 g/L, 酵母膏 5 g/L, KH_2PO_4 5 g/L, MgSO_4 1 g/L, CaCl_2 1 g/L, 初始 pH 6.0, 接种量 0.5%, 底物加入量 1 mg/mL, 28 °C, 培养 5 d。结论 黑曲霉转化獐牙菜苦苷生成獐牙菜新素的生成率稳定在 8% 左右。

关键词: 獐牙菜苦苷; 獐牙菜新素; 黑曲霉; 培养条件; 生物转化

中图分类号: R284.2; R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)02-0257-05

Biotransformation optimization of swertiamarin by *Aspergillus niger*LIU Ying¹, ZHANG Zheng², TIAN Cheng-wang³, HAN Dong¹, ZHANG Tie-jun³

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Tianjin Jianfeng Natural Products R&D Co., Ltd., Tianjin 300402, China

3. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective With swertiamarin as the substrate, biotransformation conditions of swertiamarin were optimized by *Aspergillus niger*. **Methods** With productivity ratio of EHPO {(Z)-5-ethylidene-8-hydroxy-3,4,5,6,7,8-hexahydro-1H-pyrano [3,4-c] pyridine-1-one} and transformation ratio of swertiamarin as indexes, training time, carbon resource, nitrogen resource, metal ions, phosphate, growth factor (yeast extract paste), inoculum size, substrate concentration, initial pH value, and tempuraure were evaluated to optimize the biotransformation of swertiamarin. **Results** It confirmed the optimization cultivating condition that glucose concentration was 10 g/L, peptone concentration was 5 g/L, yeast extract paste was 5 g/L, KH_2PO_4 concentration was 5 g/L, MgSO_4 and CaCl_2 concentration was 1 g/L, initial pH value was 6.0, inoculum size was 0.5%, substrate concentration was 1 mg/mL, cultivation temperature was 28 °C, and cultivating time was 5 d. **Conclusion** The biotransformation ratio for EHPO into swertiamarin biotransformed by *A. niger* could steadily be about 8%.

Key words: swertiamarin; EHPO {(Z)-5-ethylidene-8-hydroxy-3,4,5,6,7,8-hexahydro-1H-pyrano [3,4-c] pyridine-1-one}; *Aspergillus niger* v. Tiegh.; cultivating condition; biotransformation

獐牙菜苦苷是一种裂环稀醚萜类化合物, 是川西獐牙菜(藏茵陈) *Swertia mussotii* Franch. 的主要活性成分之一^[1], 具有显著的抗肝炎作用^[2], 极有希望开发成治疗肝炎的创新药物。在前期研究中, 测定了藏茵陈中獐牙菜苦苷和龙胆苦苷^[3], 并建立

了从川西獐牙菜制备高纯度獐牙菜苦苷的方法^[4]。然而, 大多数苷类成分口服后需要经肠内细菌转化为苷元或苷元进一步转化成其他活性成分而发挥疗效, 是真正的药理活性成分。獐牙菜苦苷的分子上有一个单糖侧链, 口服后在小肠内被肠内菌细胞内

收稿日期: 2010-09-17

基金项目: 天津市自然科学基金(08JCZDJC24700, 10JCZDJC21400)

作者简介: 刘莹(1986—), 天津中医药大学中药学硕士研究生, 主要从事天然药物化学研究。

*通讯作者 张铁军 Tel: (022)23006848 E-mail: tiezheng4@sina.com

β -葡萄糖苷酶水解后生成苷元^[5-6], 生成的苷元继而代谢成其他的活性成分, 生成的活性成分经小肠上皮细胞吸收进血液, 通过人体循环系统到达相应的靶位点而起到治疗疾病的作用。本实验室通过微生物转化的方法, 采用黑曲霉(产 β -葡萄糖苷酶)对獐牙菜苦苷进行结构修饰, 转化成具有抗肝炎病毒活性的新产物獐牙菜新素^[7-11], 本实验对其转化条件进行优化。

1 试剂与仪器

黑曲霉菌株 *Aspergillus niger* v. Tiegh 购自中国科学院微生物研究所。斜面培养基: PDA 培养基; 转化培养基: 葡萄糖 10 g, 蛋白胨 5 g, 酵母膏 5 g, KH_2PO_4 5 g, MgSO_4 1 g, MnSO_4 1 g, NaCl 1 g, pH 6.0 水 1 000 mL。酵母粉、蛋白胨(Oxoid 公司), 葡萄糖(Solarbio 公司), 蔗糖(天津市光复试剂厂), 淀粉、玉米粉、黄豆粉(市售), 甲醇、乙腈(色谱纯, 天津市康科德科技有限公司), 纯净水(娃哈哈有限公司)。獐牙菜苦苷对照品(批号 110785-200203, 中国药品生物制品检验所), 獐牙菜新素对照品(自制, 质量分数在 98% 以上), 獐牙菜苦苷样品(自制, 质量分数在 90% 以上), 其他试剂均为分析纯, 购自天津市天河化学试剂厂。

SPX—150BS—11 生化培养箱(上海新苗医疗器械制造有限公司), YXQ—LS—50SII 立式压力蒸汽灭菌器(上海博迅实业有限公司医疗设备厂), SYC—C 立式摇床(上海联环生物工程设备有限公司), LXJ—II B 离心机(Anke 公司), AB204—N 电子天平(Mettler Toledo 公司), 高效液相色谱仪(兰博公司): Series III 泵, Model 201 紫外检测器, AXW—8 柱温箱。

2 方法与结果

2.1 转化方法

采用一步发酵法转化獐牙菜苦苷。獐牙菜苦苷溶于纯净水中制备成质量浓度为 25 mg/mL 的储备溶液, 贮藏于冰箱中备用。取活化后生物斜面菌种一支, 用 15 mL 无菌水冲洗斜面上的孢子, 振荡 5 min, 得孢子悬浮液。取 250 μL 孢子悬浮液无菌接入 50 mL 新鲜无菌液体培养基中(250 mL 三角瓶装 50 mL 培养基), 28 $^{\circ}\text{C}$ 、175 r/min 条件下培养 3 d, 无菌加入獐牙菜苦苷储备液 1 mL。相同条件下继续培养 5 d。培养结束后, 收集培养液, 上清液过 0.45 μm 微孔滤膜, 进样分析, 计算獐牙菜苦苷转化率和獐牙菜新素生成率。

獐牙菜苦苷转化率 = (初始加入培养液中獐牙菜苦苷的质量 - 转化后培养液中獐牙菜苦苷的质量) / 初始加入培养液中獐牙菜苦苷的质量

獐牙菜新素生成率 = 转化后培养液中獐牙菜新素的质量 / 初始加入培养液中獐牙菜苦苷的质量

2.2 检测方法^[12]

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil C_{18} (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.04% 磷酸水 (10 : 90); 体积流量 1 mL/min; 温度 35 $^{\circ}\text{C}$; 獐牙菜苦苷检测波长 237 nm; 代谢产物獐牙菜新素检测波长 275 nm; 检测样品经 0.45 μm 滤膜过滤后进样, 进样体积 20 μL , 采用外标法计算獐牙菜苦苷和獐牙菜新素。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取獐牙菜苦苷和獐牙菜新素对照品适量, 分置 25 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 分别得质量浓度为 55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的獐牙菜苦苷对照品溶液和 70.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的獐牙菜新素对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取发酵液, 离心, 上清液经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 生物转化工艺优化

2.3.1 培养时间的确定 培养基组成为葡萄糖 10 g/L, 酵母粉 5 g/L, 蛋白胨 5 g/L, KH_2PO_4 5 g/L, MgSO_4 1 g/L, NaCl 1 g/L。按“2.1”项下方法进行转化, 并于底物加入后每隔 24 h 取样, 测定獐牙菜苦苷和獐牙菜新素, 獐牙菜苦苷的消耗和獐牙菜新素的生成在加入底物后第 5 天均达到最大值, 所以选择 5 d 作为黑曲霉转化獐牙菜苦苷的最佳时间。

2.3.2 不同碳源对转化率的影响 选取葡萄糖、蔗糖、淀粉、玉米粉 4 种碳源。按“2.1”项方法进行转化, 这 4 种碳源在培养基中的质量浓度为 10 g/L, 培养基中的其他成分不变, 其他培养条件不变。从獐牙菜苦苷接种到培养基中开始培养 5 d 后收集培养液, 测定转化率, 结果见表 1。可以看出葡萄糖作为碳源, 獐牙菜苦苷的转化率和獐牙菜新素的生成率均较高, 原因可能为葡萄糖易于菌体吸收, 可使化合物的转化率提高。

2.3.3 不同氮源对转化率的影响 选取蛋白胨、黄豆粉、 NH_4NO_3 、 KNO_3 4 种氮源, 按“2.1”项方法进行转化, 这 4 种氮源在培养基的质量浓度为 5 g/L, 培养基中的其他成分不变, 其他培养条件不变。从獐牙菜苦苷接种到培养基中开始培养 5 d 后收集培养液, 测定转化率, 结果见表 2。可以看出 4 种

不同氮源对獐牙菜苦苷的转化率均较高,但蛋白胨作为氮源时獐牙菜新素生成率较高,可能由于蛋白胨作为迟效氮源有利于代谢产物和酶的生成,所以选用蛋白胨作为氮源。

表 1 不同碳源对转化率的影响
Table 1 Effect of various carbon resource on biotransformation ratios

碳源	獐牙菜苦苷转化率/%	獐牙菜新素生成率/%
葡萄糖	91.9	6.45
蔗糖	82.9	2.38
淀粉	83.6	5.85
玉米粉	83.2	5.90

表 2 不同氮源对转化率的影响
Table 2 Effect of various nitrogen resources on biotransformation ratios

氮源	獐牙菜苦苷转化率/%	獐牙菜新素生成率/%
蛋白胨	91.9	6.45
黄豆粉	89.8	5.08
NH ₄ NO ₃	91.8	3.50
KNO ₃	94.8	5.75

2.3.4 不同种类金属离子对转化率的影响 研究 Mg²⁺、Mn²⁺、Ca²⁺、Na⁺ 4 种金属离子对獐牙菜苦苷转化率的影响。按“2.1”项方法进行转化,分别配制含有这 4 种无机盐 1 g/L 的培养基,培养基中其他成分不变,并设不含无机盐的培养基作为对照,其他培养条件不变。从獐牙菜苦苷接种到培养基中开始培养 5 d 后,收集培养液,测定转化率,结果见表 3。可以看出, Mg²⁺、Ca²⁺有提高獐牙菜苦苷转化率的作用, Na⁺对獐牙菜苦苷转化率的影响不大, Mn²⁺对獐牙菜苦苷转化有阻碍作用。同时 Mg²⁺、Ca²⁺对獐牙菜新素的生成率有较高的促进作用。故选择 Mg²⁺、Ca²⁺作为转化的无机盐离子。

2.3.5 磷酸盐对转化率的影响 磷是微生物菌体生长繁殖所必需的成分,也是合成代谢产物所必需的,主要功能是作为核酸、磷酸和辅酶的组成成分。所以实验也研究磷酸盐对转化率的影响。按“2.1”项方法进行转化,以不含磷酸盐的培养基作为对照,其他培养条件不变。从獐牙菜苦苷接种到培养基中开始培养 5 d 后,收集培养液,测定转化率,结果见表 4。

在发酵过程中,由于菌株的自身代谢,常常会引起整个培养基的 pH 值发生较大的变化,这不仅

表 3 Mg²⁺、Mn²⁺、Ca²⁺、Na⁺对转化率的影响
Table 3 Effect of Mg²⁺, Mn²⁺, Ca²⁺, and Na⁺ on biotransformation ratios

金属离子	獐牙菜苦苷转化率/%	獐牙菜新素生成率/%
Mg ²⁺	92.8	10.0
Mn ²⁺	83.5	2.25
Ca ²⁺	92.0	6.95
Na ⁺	89.2	2.10
阴性	88.8	2.50

表 4 KH₂PO₄对转化率的影响
Table 4 Effect of KH₂PO₄ on biotransformation ratios

组别	獐牙菜苦苷转化率/%	獐牙菜新素生成率/%
KH ₂ PO ₄	91.9	6.45
阴性对照	85.0	3.55

会导致菌株自身生长受到抑制,也会导致酶的生产大幅波动,进而引起转化率的降低,所以加入磷酸盐起到缓冲盐的作用,对环境中的 pH 值起着重要的调节作用。同时磷和钾作为微生物生长的必需微量元素,同时加入会产生一定的协同作用,不仅有利于微生物对养分的吸收,而且会显著提高真菌菌丝的生长速率。由表 4 可以看出,磷酸盐对转化有促进作用。

2.3.6 生长因子(酵母膏)对转化率的影响 生长因子通常是指那些微生物生长所必需而且需求量很小,但微生物自身不能合成或合成量不足以满足机体生长需要的有机化合物。选择酵母膏作为生长因子,考察其对转化率的影响。按“2.1”项方法进行转化,以不含酵母膏的培养基作为对照,其他培养条件不变。从獐牙菜苦苷接种到培养基中开始培养 5 d 后,收集培养液,测定转化率,结果见表 5。可以看出,酵母膏对转化率的影响较小。但通过实验观察,加入酵母膏的菌体生长较好,菌球小而密,不加入酵母膏的菌球大而少。

2.3.7 接种量对转化率的影响 按“2.1”项方法进行转化,配制相同的培养基,分别接种 0.25%、0.5%、1%、2%、5%,其他培养条件不变。从獐牙菜苦苷接种到培养基中开始培养 5 d 后,收集培养液,测定转化率,结果见表 6。可以看出,当接种量为 0.5% 时獐牙菜苦苷的转化率和獐牙菜新素的生成率均最好,原因可能是菌量太少对底物的转化不完全,而菌量多对氮源和碳源的利用量大,造成对代谢产物的进一步代谢。

表 5 生长因子(酵母膏)对转化率的影响

Table 5 Effect of growth factor (yeast extract paste) on biotransformation ratios

组别	獐牙菜苦苷转化率/%	獐牙菜新素生成率/%
酵母膏	91.9	6.45
阴性对照	87.9	5.62

表 6 接种量对转化率的影响

Table 6 Effect of inoculum size on biotransformation ratios

接种量/%	獐牙菜苦苷转化率/%	獐牙菜新素生成率/%
0.25	65.8	0.89
0.50	91.9	6.45
1.00	89.0	1.38
2.00	78.8	0.18
5.00	70.8	0.08

2.3.8 底物加入量对转化率的影响 按“2.1”项方法进行转化,配制相同的培养基,相同的接种量,底物加入量分别为 0.1、0.2、0.4、1.0、2.0、3.0 mg/mL,其他转化条件不变。从獐牙菜苦苷接种到培养基中开始培养 5 d 后,收集培养液,测定转化率,结果见表 7。可以看出,獐牙菜苦苷质量浓度对培养液中獐牙菜苦苷的转化率和獐牙菜新素的生成率有一定程度的影响。獐牙菜苦苷在 0.1~1 mg/mL 时,培养液中的獐牙菜苦苷转化率和獐牙菜新素的生成率随着质量浓度的增加而有所增加。当獐牙菜苦苷质量浓度为 1 mg/mL 时,獐牙菜苦苷转化率和獐牙菜新素的生成率达到最大。当獐牙菜苦苷质量浓度进一步增加时,培养液中的獐牙菜苦苷转化率和獐牙菜新素的生成率反而降低。表明獐牙菜苦苷作为底物加入,在质量浓度低的时候会被黑曲霉所利用,同时生成转化产物,但是随着质量浓度的进一步增加,獐牙菜苦苷对黑曲霉细胞产生出一定程度的毒性,培养液中的獐牙菜苦苷转化率和獐牙菜新素的生成率呈现出下降的趋势。所以选择底物加入量为 1 mg/mL。

2.3.9 不同初始 pH 值对转化率的影响 发酵培养基的 pH 值,对微生物生长具有非常明显的影响,也是影响发酵过程中各种酶活的重要因素。按“2.1”项方法进行转化,分别配制相同培养基,灭菌前调节 pH 值分别为 6.0、5.0、4.0、3.0,其他转化条件不变。从獐牙菜苦苷接种到培养基中开始培养 5 d 后,收集培养液,测定转化率,结果见表 8。在獐牙菜苦苷转化的过程中,随着黑曲霉的生长,其发

表 7 底物加入量对转化率的影响

Table 7 Effect of substrate concentration on biotransformation ratios

底物加入量/ (mg·mL ⁻¹)	獐牙菜苦苷 转化率/%	獐牙菜新素 生成率/%
0.1	87.3	4.60
0.2	91.5	4.00
0.4	91.9	6.45
1.0	95.2	8.42
2.0	89.6	2.35
3.0	90.1	2.54

酵液的 pH 值呈现下降趋势,这是由于在黑曲霉发酵过程中,随着葡萄糖、蛋白胨等物质的消耗,黑曲霉会代谢出含有较多 H⁺的物质,会使整个培养液的 pH 值下降,而在这个过程中,菌株所产生的酶的活性随着 pH 值的变化而变化。一般来说,黑曲霉所产生的的大多数的酶的最适 pH 值为 4.5 左右,而此时的酶的活力达到最高。由实验结果可以看出,獐牙菜苦苷转化率和獐牙菜新素的生成率在总体上随着 pH 值的减小而减小,因为酶本身是一种蛋白,随着周围环境 pH 值的降低,其结构发生变化,进而影响到活性的变化。当发酵液中的 pH 值下降时,大多数的酶的活性都会呈现下降趋势,使转化率降低。因此在 pH 值为 6 时转化率最高。

表 8 不同初始 pH 值对转化率的影响

Table 8 Effect of various initial pH values on biotransformation ratios

pH 值	獐牙菜苦苷转化率/%	獐牙菜新素生成率/%
6.0	91.9	6.45
5.0	87.6	5.23
4.0	75.4	3.97
3.0	68.9	3.23

2.3.10 不同温度对转化率的影响 在较适于黑曲霉菌生长的温度范围内,选取 28、30、32 °C 进行培养温度的考察。按“2.1”项方法进行转化,培养基以及其他转化条件不变。从獐牙菜苦苷接种到培养基中开始培养 5 d 后,收集培养液,测定转化率。结果见表 9。从产物的产量上看,培养温度在 28~32 °C 时,温度影响不十分明显。温度的影响包括有利和不利的两个方面。有利方面是随着温度的上升,细胞新陈代谢速率加快,生长比较迅速,有利于化合物的生成,不利的方面是随着温度的再

升高,组成细胞的蛋白质、核酸等对高温敏感的大分子会遭受不可逆的破坏以及副反应物较多。故采用相对较低的温度(28℃)进行反应,以减少副反应物的生成。

表 9 不同温度对转化率的影响
Table 9 Effect of various temperatures on biotransformation ratios

温度/℃	獐牙菜苦苷转化率/%	獐牙菜新素生成率/%
28	91.9	6.45
30	89.7	6.70
32	90.2	6.09

2.3.11 獐牙菜苦苷生物转化优化条件的验证 选取优化的使獐牙菜新素的生成率最高的因素,即葡萄糖 10 g/L、蛋白胨 5 g/L、酵母膏 5 g/L、KH₂PO₄ 5 g/L、MgSO₄ 1 g/L、CaCl₂ 1 g/L,接种量 0.5%,底物加入量 1 mg/mL,28℃,pH 6,进行獐牙菜苦苷生物转化,结果见表 10。

表 10 验证试验结果
Table 10 Results of verification test

组别	獐牙菜苦苷转化率/%	獐牙菜新素生成率/%
1	95.35	8.77
2	93.49	8.69
3	90.89	7.98
平均	93.34	8.48

3 讨论

本实验以获得较高的獐牙菜新素生成率为目的,对黑曲霉转化獐牙菜苦苷的工艺进行优化,选取了碳源、氮源、金属离子、磷酸盐、生长因子等因素进行培养基的优化,从实验数据上来看选用的碳源为葡萄糖,原因可能是葡萄糖作为单糖更易于菌体吸收,选用的氮源为蛋白胨,可能因为蛋白胨作为迟效氮源有利于代谢产物和酶的生成,选用 Mg²⁺、Ca²⁺金属离子参与到转化中,对生成率有提高的作用,同时还选择了磷酸盐和生长离子共同完成转化,优化后的培养基为:葡萄糖 10 g/L、蛋白胨 5 g/L、酵母膏 5 g/L、KH₂PO₄ 5 g/L、MgSO₄ 1 g/L、CaCl₂ 1 g/L;又对转化时间、初始 pH 值、转化温度、接种量和底物加入量等转化条件进行考察,通过对

实验数据的分析确定了转化时间为 5 d;初始 pH 值选择 6.0,使菌体在代谢过程中产生的酸性不至于使菌体失活;接种量选择了 0.5%,既可以满足转化的最大需要,又不至于使代谢产物进一步代谢分解;底物加入量选择 1 mg/mL 既可以使生成率达到最大,又不至于对菌体产生毒性;所以确定转化条件为:初始 pH 6.0,接种量 0.5%,底物加入量 1 mg/mL,28℃,培养 5 d。对优化后的转化条件进行 3 批验证,结果表明黑曲霉转化獐牙菜苦苷生成獐牙菜新素的生成率稳定在 8%左右。

参考文献

- [1] Takashi K, Yutaka T. The structure of swertiamarin [J]. *Tetrahedron Lett*, 1961, 2(5): 176-182.
- [2] Johji Y, Makoto K, Hisashi M, et al. Anticholinergic action of *Swertia japonica* and an active constituent [J]. *J Ethnopharmacol*, 1991, 33(1): 31-35.
- [3] 田成旺,张铁军. HPLC 测定藏茵陈中獐牙菜苦苷和龙胆苦苷 [J]. *中草药*, 2006, 37(3): 442-443.
- [4] 韩冬,田成旺,张铁军,等. 高纯度獐牙菜苦苷的制备方法 [J]. *现代药物与临床*, 2010, 25(3): 191-193.
- [5] Adell E S, Shu Y Z, Hattori K M, et al. Metabolism of swertiamarin from *Swertia japonica* by human intestinal bacterial [J]. *Planta Med*, 1989(55): 147-150.
- [6] 孙艳,李雪驼,殷素兰. 肠道内微生态环境对中草药体内代谢的影响 [J]. *中草药*, 2001, 32(4): 375-377.
- [7] Chang J, Zhao X M, Liu C X, et al. Simultaneous determination of swertiamarin and its metabolites (5Z)-5-ethylidene-8-hydroxy-3,4,5,6,7,8-hexahydro-1H-pyrano [3,4-c] pyridin-1-one and erythrocentaurin in broth of *Aspergillus niger* by HPLC [J]. *Biomed Chromatogr*, 2008, 22(2): 191-195.
- [8] Chang J, Zhang T J, Liu C X, et al. Structure elucidation of metabolites of swertiamarin produced by *Aspergillus niger* [J]. *J Mol Struct*, 2008, 878(1/3): 22-25.
- [9] 唐铖,张艳军,张铁军,等. 獐牙菜苦苷生物转化产物在 Caco-2 细胞模型中的转运机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2009, 34(17): 134-136.
- [10] 唐铖,申秀萍,张铁军,等. 獐牙菜新素的制备及保肝作用研究 [J]. *中草药*, 2009, 40(11): 1788-1790.
- [11] 张铁军,常军,刘昌孝. 一种具有抗肝炎病毒活性的生物碱类新化合物 [P]. 中国: 200710056731.8. 2008-08-13.
- [12] 唐铖. 藏茵陈活性成分的结构修饰及生物活性研究 [D]. 天津: 天津中医药大学. 2009.