

聚山梨酯 80 辅助酶法制备柚皮素的研究

崔莉^{1,2}, 张振海¹, 孙娥¹, 钱浅¹, 贾晓斌^{1,2*}

1. 江苏省中医药研究院 中药新型给药系统重点实验室, 江苏 南京 210028

2. 南京中医药大学, 江苏 南京 210046

摘要:目的 研究在柚皮苷酶解液中加入聚山梨酯 80 后辅助酶解制备柚皮素。方法 将聚山梨酯 80 加入柚皮苷酶解液中, 以转化率为指标, 通过单因素考察聚山梨酯 80 的质量浓度、pH 值、温度、酶与底物的质量比、底物质量浓度及反应时间对转化率的影响, 并通过正交试验优化其制备工艺; 采用 ¹H-NMR、¹³C-NMR 鉴定水解产物。结果 柚皮苷在最佳酶解条件下(聚山梨酯 80 质量浓度 5 g/L、pH 4.0、温度 37 ℃、酶与底物的质量比 0.6、底物质量浓度 30 mg/mL 和反应时间 12 h)的转化率为(97.4±1.2)%, 远大于未加聚山梨酯 80 时柚皮苷的转化效率(56.7±1.4)%; 反应产物相对分子质量为 272.25, 核磁共振谱证实产物为柚皮素。结论 在柚皮苷酶解液中加入聚山梨酯 80 后酶解制备柚皮素, 可以缩短反应时间、提高底物质量浓度、减少酶用量, 从而显著提高转化效率。该工艺简单稳定, 适合工业化生产。

关键词: 柚皮素; 转化效率; 聚山梨酯 80; 柚皮苷; 酶解; 正交试验

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)12-2412-05

Preparation of naringenin using polysorbate assisted with enzyme method

CUI Li^{1,2}, ZHANG Zhen-hai¹, SUN E¹, QIAN Qian¹, JIA Xiao-bin^{1,2}

1. Key Laboratory of New Drug Delivery System of Chinese Materia Medica, Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

2. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

Key words: naringenin; conversion efficiency; polysorbate; naringin; enzymolysis; orthogonal test

柚皮素为芸香科柑橘属植物中的一种多羟基黄酮类单体成分。药理研究表明, 柚皮素具有抗癌、抗炎、抗氧化、抗溃疡、抗血栓和扩张血管作用^[1-9]。但是柚皮素在植物中质量分数很低, 一般以柚皮苷的形式存在于自然界中^[10], 可以通过水解糖苷键制备柚皮素。但是, 柚皮苷溶解度小, 在酶解过程中通常存在酶解时间过长的问题^[11]。为增加柚皮苷的溶解度, 提高反应速率和转化率, 可以在酶解液中加入聚山梨酯 80。聚山梨酯 80 具有双亲分子结构, 能降低固-液相界面张力, 增加难溶性药物的溶解度^[12-13], 使用质量浓度范围为 1%~12%^[14-16]。聚山梨酯 80 能够广泛应用的原因在于其低质量浓度时的有效性、成本低、毒性小^[17-18]。蜗牛酶是从蜗牛的嗦囊和消化道中制备的一种混合酶^[19-22]。本实验

在柚皮苷的反应液中加入聚山梨酯 80, 增加柚皮苷的溶解度, 并采用蜗牛酶将其水解制备柚皮素, 通过单因素试验和正交试验优化反应条件, 为柚皮素的工业化生产提供参考。

1 仪器与材料

高效液相色谱仪(Waters, 600 型泵, 717 自动进样器, Empower 数据处理系统); 数显气浴恒温振荡器(金坛市双捷实验仪器厂); 瑞士 Bruker (AV 300) 核磁共振仪, 溶剂为氘代 DMSO。

柚皮苷(批号 XC101226, 质量分数≥98%)、柚皮素(批号 XC101122, 质量分数≥98%)对照品购自西安小草植物科技有限责任公司, 蜗牛酶(北京拜尔迪生物科技有限公司)。甲醇、乙腈为色谱纯, 水为高纯水, 其余试剂均为分析纯。

收稿日期: 2012-03-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30572372, 30973944); 江苏省医药高技术计划项目(BG2007614)

作者简介: 崔莉(1986—), 在读硕士, 主要从事中药炮制机制和制剂新剂型研究。Tel/Fax: (025)85637809 E-mail: cuili2008516@126.com

*通讯作者 贾晓斌 Tel/Fax: (025)85637809 E-mail: xiaobin_jia_nj@126.com

网络出版时间: 2012-11-27 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20121127.0951.005.html>

2 方法与结果

2.1 柚皮苷溶解度的测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Phenomenex® C₁₈ 柱 (150 mm×4.60 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1%甲酸水 (38:62), 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 30 °C, 检测波长 285 nm。

2.1.2 对照品溶液的配制 取柚皮苷对照品 10 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加适量无水乙醇溶解并定容至刻度, 即得 1.003 mg/mL 柚皮苷对照品储备液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取蒸馏水 3 份各 1 mL, 置 5 mL 具塞离心管中, 分别加入过量的柚皮苷, 其中第 1 份不加聚山梨酯 80, 第 2 份加入 1 g/L 聚山梨酯 80, 第 3 份加入 5 g/L 聚山梨酯 80, 充分混匀, 放入数显气浴恒温振荡器, 调节转速 (100±5) r/min, 温度 25 °C, 平衡 72 h, 使其充分溶解。

2.1.4 溶解度计算 柚皮苷的溶解度采用外标一点法进行测定。取“2.1.3”项所得混悬液经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液 500 μL 放入 1 mL 量瓶中, 并加甲醇定容, 摇匀后离心, 取上清液注入高效液相色谱仪检测。每个样品重复 3 次, 取其平均值。计算得柚皮苷的溶解度为 1.9 μg/mL, 加 1 g/L 聚山梨酯 80 后柚皮苷溶解度为 22.8 μg/mL, 加 5 g/L 聚山梨酯 80 后柚皮苷溶解度为 40.3 μg/mL。

2.2 柚皮素转化率的测定

2.2.1 对照品溶液的制备 取柚皮素对照品 10 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加适量无水乙醇溶解, 加无水乙醇至刻度, 超声除去气泡, 再用无水乙醇补足至刻度即得 1.058 mg/mL 柚皮素对照品储备液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取一定量的柚皮苷、蜗牛酶和聚山梨酯 80, 加入一定 pH 值的缓冲溶液定容至一定体积, 放入数显气浴恒温振荡器, 调节转速 (130±5) r/min, 在一定温度下反应一段时间, 即得供试品的混悬溶液。

2.2.3 线性关系考察 精密移取柚皮素对照品储备液, 加无水乙醇稀释成 169.26、84.64、42.32、21.16、10.58 μg/mL 对照品溶液, 进样测定。以质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 进行线性回归, 得回归方程 $Y=253.57X-23.28$, $r=0.9997$, 表明柚皮素在 10.58~169.26 μg/mL 与峰面积线性关系良好。

2.2.4 精密度试验 精密吸取柚皮素对照品溶液

20 μL, 重复进样 6 次, 分别测定柚皮素的峰面积值, RSD 为 1.25%。

2.2.5 稳定性试验 分别在 0、2、4、6、8、12、24 h 时测定柚皮素对照品溶液的峰面积, RSD 为 1.23%, 说明对照品溶液在 24 h 内稳定。

分别在 0、2、4、6、8、12、24 h 时测定柚皮素供试品溶液的峰面积, RSD 为 1.46%, 说明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.6 重复性试验 按“2.2.2”项下平行制备 5 份供试品溶液, 并按“2.1.1”方法分别进样 20 μL, 测定, 计算柚皮素质量分数的 RSD 为 1.05%。

2.2.7 回收率试验 精密量取已知含量的柚皮素转化液样品 0.1 mL, 精密加入对照品储备溶液 0.5 mL, 用甲醇定容至 10 mL, 测定, 计算平均回收率为 98.75%, RSD 为 1.31%。

2.2.8 柚皮素转化率的测定 精密量取 0.1 mL 转化后的混悬液, 加无水乙醇定容至 10 mL, 摇匀后用 0.45 μm 的微孔滤膜滤过, 高效液相色谱仪检测, 计算转化率。

$$\text{转化率} = CVM_2 / (mM_1)$$

C 为柚皮素的质量浓度, V 为体积, m 为加入的柚皮苷质量, M₁ 为柚皮素的相对分子质量, M₂ 为柚皮苷的相对分子质量

2.3 蜗牛酶酶解柚皮苷的单因素考察

将聚山梨酯 80 的质量浓度、反应液 pH 值、反应温度、酶与底物的质量比、底物质量浓度和反应时间分别固定在 1 g/L、4.5、37 °C、1:1、10 mg/mL、24 h, 以柚皮素的转化率为衡量指标, 只改变其中 1 个条件进行试验, 考察制备过程中各单因素水平的影响。

2.3.1 聚山梨酯 80 质量浓度对柚皮素转化率的影响 按“2.2.2”项下方法酶解柚皮苷。在其他条件不变的情况下, 聚山梨酯 80 的质量浓度分别为 1、2、3、4、5 g/L, 结果柚皮素转化率分别为 31.2%、44.7%、56.8%、61.1%、70.9%。柚皮素的转化率随着聚山梨酯 80 质量浓度的增加而增大, 在考察的范围内, 选择聚山梨酯 80 的质量浓度为 5 g/L。

2.3.2 反应液 pH 值对柚皮素转化率的影响 按“2.2.2”项下方法酶解柚皮苷。在其他条件不变的情况下, 反应液 pH 值分别为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5, 结果柚皮素转化率分别为 20.1%、32.5%、38.3%、52.9%、40.4%、22.8%。柚皮素的转化率随反应液 pH 值的升高而增加, 当 pH 值达到 5.5 时, 转化率达到最大值, 随着 pH 值的继续增加转化率

出现降低。

2.3.3 反应温度对柚皮素转化率的影响 按“2.2.2”项下方法酶解柚皮苷。在其他条件不变的情况下,反应温度分别为 25、37、50、60、70 ℃,结果柚皮素转化率分别为 18.9%、99.6%、62.4%、37.9%、8.5%。柚皮素的转化率随反应温度的升高而增加,当温度达到 37 ℃时,转化率达到最大值,随着温度的继续增加转化率降低。

2.3.4 酶与底物的质量比对柚皮素转化率的影响 按“2.2.2”项下方法酶解柚皮苷。在其他条件不变的情况下,酶与底物的质量比分别为 1:10、1:5、2:5、3:5、4:5、1:1,结果柚皮素转化率分别为 32.3%、77.4%、86.1%、99.3%、98.5%、99.1%。柚皮素的转化率随酶与底物质量比的增大而增加。当酶与底物的质量比为 3:5 时,转化率不再增加,基本保持不变。

2.3.5 底物质量浓度对柚皮素转化率的影响 按“2.2.2”项下方法酶解柚皮苷。在其他条件不变的情况下,底物质量浓度分别为 5、10、20、30、40 mg/mL,结果柚皮素转化率分别为 36.7%、62.3%、78.1%、99.2%、82.4%。柚皮素的转化率随底物质量浓度的增大而增加,当底物质量浓度达到 30 mg/mL 时,转化率达到最大值,随着底物质量浓度的继续增大转化率出现降低。

2.3.6 反应时间对柚皮素转化率的影响 按“2.2.2”项下方法酶解柚皮苷。在其他条件不变的情况下,反应时间分别为 2、4、8、12、24 h,结果柚皮素转化率分别为 20.8%、34.5%、61.7%、79.6%、99.8%。柚皮素的转化率随反应时间的延长而增加。当反应时间为 24 h 时,转化率接近 100%。

2.4 蜗牛酶酶解柚皮苷的正交试验

柚皮苷酶解制备柚皮素时,在单因素考察的基础上,确定了反应液 pH 值、反应温度、底物质量浓度及反应时间对柚皮素的转化率较大,所以以柚皮素的转化率为指标,选取反应液 pH 值(A)、反应温度(B)、底物质量浓度(C)、反应时间(D)为因素,确立了 3 个水平,试验设计与结果见表 1,方差分析见表 2。

从表 1 直观分析可知,影响柚皮素转化率的 4 个因素的主次顺序为 A>B>D>C,即反应液 pH 值>反应温度>反应时间>底物质量浓度,最佳组合为 A₁B₂C₂D₂。从表 2 的方差分析可知,相对于底物质量浓度(因素 C),反应液 pH 值(因素 A)和

表 1 L₉(3⁴) 正交试验设计与结果

试验号	A	B / ℃	C / (mg·mL ⁻¹)	D / h	转化率 / %
1	4.0 (1)	25 (1)	20 (1)	8 (1)	76.8
2	4.0 (1)	37 (2)	30 (2)	12 (2)	97.4
3	4.0 (1)	50 (3)	40 (3)	24 (3)	88.2
4	5.5 (2)	25 (1)	30 (2)	24 (3)	70.3
5	5.5 (2)	37 (2)	40 (3)	8 (1)	83.9
6	5.5 (2)	50 (3)	20 (1)	12 (2)	68.5
7	6.5 (3)	25 (1)	40 (3)	12 (2)	55.4
8	6.5 (3)	37 (2)	20 (1)	24 (3)	72.7
9	6.5 (3)	50 (3)	30 (2)	8 (1)	55.9
K ₁	262.40	202.5	218.0	216.6	
K ₂	222.7	254.0	223.6	221.3	
K ₃	184.0	212.6	227.5	231.2	
R	78.4	51.5	9.5	14.6	

表 2 方差分析

方差来源	偏差平方和	自由度	F 比	显著性
A	1 024.482	2	67.391	P<0.05
B	496.469	2	32.658	P<0.05
D	37.029	2	2.436	
C (误差)	15.202	2		

$$F_{0.05}(2, 2)=19.00 \quad F_{0.01}(2, 2)=99.00$$

反应温度(因素 B)对柚皮素转化率的影响具有显著性(P<0.05),反应时间(因素 D)的影响不具有显著性。确定最佳制备工艺条件为反应液 pH 值 4.0,反应温度 37 ℃,底物质量浓度 30 mg/mL,反应时间 12 h。

2.5 验证试验

采用正交试验确定的最佳工艺条件制备 3 批样品,测得转化率分别为 98.8%、96.6%、96.8%,平均转化率为(97.4±1.2)%。由此可见该工艺稳定性、重复性良好。

在酶解供试品的最佳条件下,酶解未加聚山梨酯 80 时的柚皮苷,测得转化率分别为 55.1%、57.1%、57.9%,平均转化率为(56.7±1.4)%。

2.6 柚皮素的纯化和结构鉴定

以 30 mg 柚皮苷为底物进行酶解反应,然后将酶解产物溶于乙醇中,重结晶精制 3 次,干燥,得淡黄色针晶 12.6 g。适量晶体用甲醇溶解,在“2.1.1”项条件下测定,外标法计算,质量分数>98%。¹H-

NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.18 (1H, s, 5-OH), 9.07 (1H, s, 7-OH), 7.37 (2H, dd, J = 8.7, 3 Hz, 2', 6'-H), 6.85 (2H, dd, J = 8.7, 3 Hz, 3', 5'-H), 5.94 (2H, s, 6, 8-H), 5.45 (1H, dd, J = 12.6, 3 Hz, 2-H), 3.22 (1H, dd, J = 17.5, 12.6 Hz, 3a-H), 2.73 (1H, dd, J = 17.5, 3 Hz, 3b-H); ^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 79.8 (d, 2-C), 42.9 (t, 3-C), 196.7 (s, 4-C), 163.8 (s, 5-C), 102.7 (s, 5a-C), 96.3 (d, 6-C), 167.3 (s, 7-C), 95.6 (d, 8-C), 164.8 (s, 8a-C), 129.9 (s, 1'-C), 129.1 (d, 2', 6'-C), 115.7 (d, 3', 5'-C), 158.2 (s, 4'-C)。以上数据与文献报道柚皮素一致^[23]。由此可知, 柚皮素的得率为 89.7%。

3 讨论

常温下, 柚皮苷在水中的溶解度为 1.9 $\mu\text{g/mL}$, 是难溶于水的化合物。在其水溶液中加入 1 g/L 聚山梨酯 80 后, 溶解度为 22.8 $\mu\text{g/mL}$, 提高 12 倍; 加入 5 g/L 聚山梨酯 80 后, 溶解度为 40.3 $\mu\text{g/mL}$, 提高 21.2 倍。聚山梨酯 80 对柚皮苷增溶作用明显, 为聚山梨酯 80 提高酶解速率提供了基础条件。

柚皮苷属于氧苷类, 是柚皮素 7 位酚羟基与糖缩合而形成的 β -D-葡萄糖苷。柚皮苷水解方法一般包括酸法水解、酶法水解等。酶水解法作为一种绿色安全的方法, 能够很好地保持产物的结构, 更加适合工业化生产。贾东升等^[24]利用纤维素酶酶解淫羊藿苷, 制备宝藿苷 I 的平均转化率为 (94.38 $\pm$ 1.02) %, 最佳反应时间为 48 h, 底物浓度为 10 mg/mL。贾东升等^[25]利用蜗牛酶酶解淫羊藿苷制备淫羊藿苷元, 平均转化率 (92.46 $\pm$ 1.17) %, 最佳反应时间为 48 h, 底物浓度为 10 mg/mL。本课题组研究表明由于柚皮苷难溶于水, 酶解反应时间很长, 大量占用设备和场地资源, 不利于规模化制备。

本研究在柚皮苷酶解液中加入聚山梨酯 80, 增大柚皮苷的溶解度, 从而提高酶解制备柚皮素的效率。通过单因素实验考察了聚山梨酯 80 的质量浓度、pH 值、温度、酶与底物的质量比、底物质量浓度及反应时间对柚皮苷酶解制备柚皮素的影响, 确定了进一步实验的范围, 并通过正交试验优化其制备工艺。依据分析结果可知, 在柚皮苷酶解液中加入聚山梨酯 80 反应的最适条件为聚山梨酯 80 质量浓度 5 g/L、pH 4.0、温度 37 $^{\circ}\text{C}$ 、酶与底物的质量比 0.6、底物质量浓度 30 mg/mL 和反应时间 12 h, 柚皮素在此最佳条件下的转化率为 (97.4 $\pm$ 1.2) %。而本课题组前期经过单因素考察和正交试验设计得

知柚皮苷的最佳工艺条件为 pH 4.5、温度 37 $^{\circ}\text{C}$ 、酶与底物比为 2 : 1、底物质量浓度为 5 mg/mL 和反应时间 36 h。在最佳条件下, 柚皮苷的转化率为 (96.36 $\pm$ 2.3) %。由此可见, 难溶性药物由于在酶解体系中溶解度较小, 严重影响反应速率, 在其反应液中加入聚山梨酯 80 后, 可提高溶解度、减少酶用量、缩短反应时间, 适于工业化生产。

参考文献

- [1] Ribeiro I A C, Ribeiro M H L. Kinetic modelling of naringin hydrolysis using a bitter sweet alfa-rhamno-pyranosidase immobilized in k-carrageenan [J]. *J Mol Catal*, 2008, 51(1/2): 10-18.
- [2] Ribeiro I A, Rocha J, Sepodes B, *et al.* Effect of naringin enzymatic hydrolysis towards naringenin on the anti-inflammatory activity of both compounds [J]. *J Mol Catal*, 2008, 52/53: 13-18.
- [3] Chen Y C, Shen S C, Lin H Y. Rutinoside at C7 attenuates the apoptosis-inducing activity of flavonoids [J]. *Biochem Pharm*, 2003, 66(7): 1139-1150.
- [4] So F V, Guthrie N, Chambers A F, *et al.* Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices [J]. *Nutr Cancer*, 1996, 26(2): 167-181.
- [5] van Acker F A, Schouten O, Haenen G R, *et al.* Flavonoids can replace alpha-tocopherol as an antioxidant [J]. *FEBS Lett*, 2000, 473(2): 145-148.
- [6] Ruh M F, Zacharewski T, Connor K, *et al.* Naringenin: a weakly estrogenic bioflavonoid that exhibits anti-estrogenic activity [J]. *Biochem Pharmacol*, 1995, 50(9): 1485-1493.
- [7] Lee S H, Park Y B, Bae K H, *et al.* Cholesterol-lowering activity of naringenin via inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase in rats [J]. *Ann Nutr Metab*, 1999, 43(3): 173-180.
- [8] 冯育林, 徐丽珍, 杨世林, 等. 蜀葵花的化学成分研究 (I) [J]. *中草药*, 2005, 36(11): 1610-1612.
- [9] Puri M, Kaur A, Singh R S, *et al.* One-step purification and immobilization of His-tagged rhamnosidase for naringin hydrolysis [J]. *Process Biochem*, 2010, 45(4): 451-456.
- [10] Ping C H, Dorothy J S, Peter F C, *et al.* Content of CYP3A4 inhibitors, naringin, naringenin and bergapten in grapefruit and grapefruit juice products [J]. *Pharm Acta Helv*, 2000, 74(4): 379-385.
- [11] 欧阳辉, 田启建, 余 喆, 等. 酶法辅助提取绞股蓝中总黄酮工艺优化 [J]. *中草药*, 2011, 42(5): 886-889.

- [12] Sun C, Liu H Z. Application of non-ionic surfactant in the microwave-assisted extraction of alkaloids from *Rhizoma Coptidis* [J]. *Anal Chim Acta*, 2008, 612(2): 160-164.
- [13] Kawakami K, Miyoshi K, Ida Y. Solubilization behavior of poorly soluble drugs with combined use of Gelucire 44/14 and cosolvent [J]. *J Pharm Sci*, 2004, 93(6): 1471-1479.
- [14] Tripathi Y B, Chaturvedi P. Assessment of endocrine response of *Inula racemosa* in relation to glucose homeostasis in rats [J]. *Indian J Exp Biol*, 1995, 33(9): 686-689.
- [15] French E D, Dillon K, Wu X F. Cannabinoids excite dopa-mine neurons in the ventral tegmentum and substantia nigra [J]. *Neuroreport*, 1997, 8(3): 649-652.
- [16] Rodriguez de Fonseca F, Navarro M, Gomez R, et al. An anorexic lipid mediator regulated by feeding [J]. *Nature*, 2001, 414(8): 209-212.
- [17] 王庆利, 彭 健. 吐温 80 的安全性研究进展 [J]. 毒理学杂志, 2006, 20(4): 262-264.
- [18] Wang W, Wang J Y, Wang D Q. Dual effects of Tween 80 on protein stability [J]. *Int J Pharm*, 2008, 347(1/2): 31-38.
- [19] Got R, Marnay A, Font J. Beta-galactosidase of *Helix pomatia* [J]. *Nature*, 1964, 204(4959): 686-687.
- [20] Marshall J J. Purification of a β -1, 4-glucan hydrolase (cellulase) from the snail, *Helix pomatina* [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 1973, 44(4): 981-988.
- [21] Marshall J J, Grand R J A. Characterization of a β -1, 4-bglucan hydrolase from the snail, *Helix pomatina* [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 1976, 53(2): 231-237.
- [22] Strasidine G A, Whitaker D R. On the origin of the cellulase and chitinase of *Helix pomatia* [J]. *Can J Biochem Physiol*, 1963, 41(7): 1621-1626.
- [23] 莫顺燕, 杨永春, 石建功. 桑黄化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2003, 28(4): 339-341.
- [24] 贾东升, 贾晓斌, 赵江丽, 等. 纤维素酶转化淫羊藿苷制备宝藿苷 I 的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(6): 888-892.
- [25] 贾东升, 贾晓斌, 薛 璟, 等. 蜗牛酶转化淫羊藿苷制备淫羊藿苷元的研究 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(7): 857-860.