

# 福建绞股蓝皂苷的优化提取及其抗肝癌活性

陈良华<sup>1</sup>, 郑志忠<sup>1</sup>, 张树峰<sup>1,3</sup>, 谌迪<sup>1</sup>, 明艳林<sup>1</sup>, 陈清西<sup>2</sup>, 童庆宣<sup>\*1</sup>

(1. 厦门华侨亚热带植物引种园/厦门市引种检疫与植物源产物重点实验室, 福建 厦门 361002; 2. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005; 3. 华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021)

**摘要:** 绞股蓝素有“南方人参”美誉, 含有与人参皂苷相同骨架达玛烷型结构的三萜皂苷。通过不同体积分数乙醇溶液优化提取绞股蓝皂苷, 测定其抗癌活性, 为后续活性化合物的分离奠定基础。利用 HPLC 分析绞股蓝的皂苷成分并确定提取绞股蓝皂苷的乙醇体积分数, 正交实验优化提取方法, 进而 MTT 法测定提取的绞股蓝皂苷抗肝癌活性。HPLC 分析确定用体积分数 75% 乙醇溶液提取绞股蓝总皂苷(GYP), 体积分数 45% 乙醇提取极性绞股蓝皂苷(GYP<sub>1</sub>), 体积分数 90% 乙醇提取弱极性绞股蓝皂苷(GYP<sub>2</sub>); 正交实验结果表明在 70 °C 水浴中以 30 质量的体积分数 45% 乙醇加热提取 12 h 为最佳条件提取 GYP<sub>1</sub>, 在 60 °C 水浴中以 30 质量的体积分数 90% 乙醇加热提取 6 h 为最佳条件提取 GYP<sub>2</sub>; 利用 MTT 法测定 GYP、GYP<sub>1</sub> 和 GYP<sub>2</sub> 对肝癌细胞的抑制作用, GYP 和 GYP<sub>2</sub> 对肝癌细胞 SMCC7721 具有抗癌活性, 半抑制率 IC<sub>50</sub> 值分别为 (165.83±14.12) μg/mL 和 (113.97±9.26) μg/mL, GYP<sub>1</sub> 没有抗癌活性, 表明绞股蓝抗癌药效成分主要是由弱极性绞股蓝皂苷发挥功效。

**关键词:** 绞股蓝皂苷; 优化提取; 抗肝癌活性

中图分类号: R 284.2 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2012)011—1203—06

## Optimum Extraction and Anti-Hepatoma Activity of Gypenosides of *Gynostemma pentaphyllum* in Fujian Province

CHEN Liang-hua<sup>1</sup>, ZHENG Zhi-zhong<sup>1</sup>, ZHANG Shu-feng<sup>1,3</sup>, CHEN Di<sup>1</sup>,  
MING Yan-lin<sup>1</sup>, CHEN Qing-xi<sup>2</sup>, TONG Qing-xuan<sup>\*1</sup>

(1. Key Laboratory of Xiamen City for Plant Introdect / Quarantine and Plant Product, Xiamen Overseas Chinese Subtropical Plant Introduction Garden, Xiamen 361002, China; 2. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 3. College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** *Gynostemma pentaphyllum* is known as "Southern Ginseng". It contains triterpenoid saponins of the dammarane -type structure with the same skeleton of ginsenosides. In this manuscript, the saponin components of *Gynostemma pentaphyllum* were analyzed by HPLC, which choosed the concentration of ethanol extraction, and it was found that that adopted to the extract gypenosides(GYP) was from 75 % ethanol, polar gypenosides(GYP<sub>1</sub>) from 45% ethanol, and lower

收稿日期: 2011-11-03

基金项目: 厦门市科技创新资金项目(3502Z20061143)。

作者简介: 陈良华(1977—), 男, 福建福州人, 理学博士, 主要从事天然产物活性成分研究。E-mail: seafollow@126.com

\* 通信作者: 童庆宣(1956—), 男, 福建莆田人, 高级工程师, 主要从事植物资源开发与利用研究。E-mail: xmqingxuan@yahoo.com.cn

polar gypenosides (GYP<sub>2</sub>) from 90% ethanol. Furthermore, the optimum extraction parameters for GYP<sub>1</sub> and GYP<sub>2</sub> were studied by Orthogonal method and listed as follows: GYP<sub>1</sub> was extracted with thirty fold-weight 45 % ethanol in 70 °C water bath for 12 h, and GYP<sub>2</sub> was extracted with thirty fold-weight 90% ethanol in 60 °C water bath for 6 h. Anti-hepatoma activity was determined tests by MTT and the results showed that GYP and GYP<sub>2</sub> can inhibit hepatoma cell SMCC7721 with IC<sub>50</sub> value 165.83 ±14.12 μg/mL and 113.97 ±9.26 μg/mL, respectively. However, GYP<sub>1</sub> without any anticancer activity. The result showed that *Gynostemma pentaphyllum* exhibited the anti-hepatoma activity caused by lower polar saponins.

**Keywords:** Gypenosides, optimum extraction, anti-hepatoma activity

绞股蓝 (*Gynostemma pentaphyllum* Thunb Mak.)为葫芦科绞股蓝属植物,俗称七叶胆、小苦药、遍地生根、甘茶蔓等,其种类繁多,有14个种2个变种,2001年国家林业局保护司关于征集《国家重点保护野生植物名录》(第二批)文件中,把绞股蓝调整为国家重点保护药食同源植物<sup>[1]</sup>。

绞股蓝的化学成分研究始于20世纪70年代,主要药效成分为绞股蓝皂苷(Gypenoside),目前有报道称从绞股蓝中分离出的绞股蓝皂苷已达到169种之多<sup>[2]</sup>。由于绞股蓝种类多,甚至同种绞股蓝又可因种植产地、采收季节及光照条件等诸多环境因素影响,其中含有的绞股蓝皂苷数量和组成成分比例上有较大差异,对绞股蓝的研究如化学成分来说品种选择显得尤为重要。绞股蓝皂苷结构上与人参皂苷具有类似主骨架的达玛烷型结构,属于四环三萜皂苷,其中GPY、 、 、 分别与人参皂苷Rb<sub>1</sub>、Rb<sub>1</sub>、Rd、F2化学结构上完全相同,因此绞股蓝皂苷许多药理作用与人参皂苷相似,其中主要有抗肿瘤<sup>[3]</sup>、降血脂血糖<sup>[4]</sup>、保护心脏和肝脏<sup>[5]</sup>和防止衰老<sup>[6]</sup>等药理作用。目前在抗肿瘤研究方面,较多也仅限于对绞股蓝总皂苷对肿瘤细胞抑制作用和机理研究<sup>[7-8]</sup>,单体绞股蓝皂苷抗肿瘤作用研究还相对较少,仅见少许报道<sup>[9-10]</sup>。

绞股蓝在福建省有丰富资源,福建亚热带植物研究所曾对福建省绞股蓝资源进行实地调查,全省野生绞股蓝不仅分布范围广、地点多,而且生态类型多样。以绞股蓝口感品味划分有三大类型:甘甜型、腥苦型和清淡型。三大类型间还有过渡类型。各类型均有生长,其中腥苦型较多,甘甜型和清淡型较少<sup>[11]</sup>。绞股蓝资源的多样类型为筛选适于提取精品,直接冲泡等不同用法提供丰富的原始材料和广

泛的种源。作者选用福建南靖绞股蓝为材料,通过HPLC分析绞股蓝成分,并探讨绞股蓝皂苷的提取及其抗癌活性研究,为后续绞股蓝抗癌成分分离纯化和药物的研发奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

“201”七叶甜甘型绞股蓝:采自福建南靖种植区;肝癌细胞SMCC7721和Bel7402:购自中科院上海生化与细胞所;人参皂苷Rb<sub>1</sub>:购自中国药品生物制品检定所。

### 1.2 实验仪器和试剂

液相色谱仪:Agilent 1200,Agilent公司产品;酶标仪:MK3,美国Thermo公司产品;新生牛血清:购自HyClone公司;RPMI1640和DMEM培养基:购自GIBCO公司;青霉素钠、链霉素钠:购自上海Sangon公司;乙腈:购自Merck公司;3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT):购自Sigma公司;其它化学试剂均为国产分析纯试剂。

### 1.3 方法

**1.3.1 绞股蓝皂苷的提取** 采集的新鲜绞股蓝晒干并剪成3~5 cm小段,用高速粉碎机磨成粉末状。称取4份50 g绞股蓝粉末于三角瓶中,分别加入20倍量约1 L体积的水,体积分数45%,75%和95%乙醇溶剂分3次提取;每次在60 °C水浴锅中加热浸提12 h后,真空抽滤获得绞股蓝提取液,合并提取液经旋转蒸发仪浓缩去除乙醇溶剂,获得绞股蓝乙醇提取物。

**1.3.2 不同极性绞股蓝皂苷的提取和正交优化** 称取4份10 g绞股蓝粉末,分别加入水,体积分

数15%,30%,45%的乙醇溶液为溶剂提取绞股蓝皂苷,通过HPLC分析确定极性绞股蓝皂苷的乙醇浓度;另称取4份10g绞股蓝粉末经极性绞股蓝皂苷提取后,再选用体积分数70%,80%,90%,100%乙醇溶液提取,通过HPLC分析确定弱极性绞股蓝皂苷的乙醇体积分数;最后选取溶剂用量、提取温度和提取时间作为考察因素,每个因素设3个水平,采用 $L_9(3^3)$ 正交实验优化极性和弱极性绞股蓝皂苷的提取。

**1.3.3 绞股蓝皂苷 HPLC 分析** 色谱条件:色谱柱为Agilent Eclipse XDB-C18 (150 mm×4.6 mm);柱温:25℃;检测波长:203 nm;流量:1.0 mL/min;进样量为20 μL,流动相为:水(A)/乙腈(B)梯度洗脱,流动相体积比的梯度洗脱条件为0~8 min:A,80%,B,20%;8~20 min:A,65%,B,35%;20~35 min:A,30%,B,70%;35~40 min:A,30%,B,70%;40~50 min:B,100%;50~60 min:B,100%;60~70 min:A,80%,B,20%。

**1.3.4 绞股蓝皂苷质量分数测定** 按照文献[12]的方法,并作适当调整。配置质量浓度为2 mg/mL的人参皂苷Rb<sub>1</sub>为对照品,以吸光值为纵坐标,样品浓度为横坐标,绘制标准曲线。绞股蓝皂苷含量测定为:取200 μL样品液于具塞试管中,加入800 μL质量分数为5%香草醛-高氯酸溶液,60℃水浴加热15 min,取出后冷却至室温,用冰醋酸定容成终体积3 mL,在紫外分光光度计550 nm下测定吸光值,根据标准曲线计算绞股蓝皂苷含量。

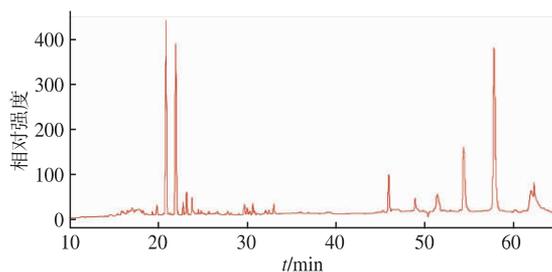
**1.3.5 MTT 法测定绞股蓝皂苷抗癌活性** 利用MTT法测定不同质量浓度(0,6.25,12.5,25,50,100,200 μg/mL)绞股蓝总皂苷(GYP)、极性绞股蓝皂苷(GYP<sub>1</sub>)和弱极性绞股蓝皂苷(GYP<sub>2</sub>)作用72 h后,分别对肝癌细胞SMCC7721和Bel7402的体外抑制作用。具体方法如下:取对数生长期细胞,质量分数为0.25%胰酶消化,用细胞培养液制成细胞数为 $5 \times 10^4$ 个/mL的单细胞悬液,接种于96孔板,每孔100 μL。培养24 h后,吸去细胞培养液,分别加入100 μL的对照组培养液和含绞股蓝皂苷的实验组培养液,每组4个重复,共培养72 h后,吸去培养液,每孔加入MTT(0.5 mg/mL)200 μL,再培养4 h,吸去上清液,加入DMSO 200 μL振荡10 min,在酶标仪上读取570 nm处吸光度( $A_{570 \text{ nm}}$ 值)。细胞抑制率= $(A_{\text{对照组}} - A_{\text{给药组}}) / A_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。

## 2 结果与讨论

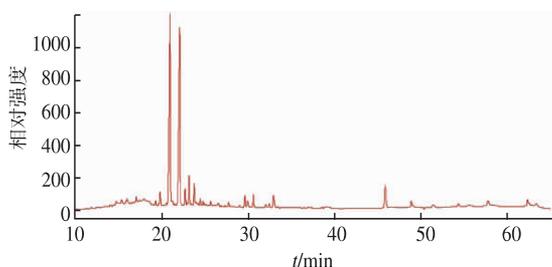
### 2.1 绞股蓝皂苷 HPLC 分析

绞股蓝中含有达玛烷型为主骨架的多种绞股蓝皂苷,侧链衔接的基团不同导致绞股蓝皂苷极性的差异。作者以福建南靖绞股蓝为材料,为分析绞股蓝含有皂苷的种类和数量,通过HPLC分析不同乙醇体积分数对绞股蓝皂苷提取的影响,结果表明:不同体积分数乙醇对提取绞股蓝皂苷有很大的影响,乙醇体积分数越高提取的绞股蓝皂苷数量越多,而比较绞股蓝HPLC图谱洗脱峰可知南靖绞股蓝含有20~30 min和45~60 min保留时间的2个组份极性差异的绞股蓝皂苷(图1a),可以选定不同的乙醇体积分数分别提取该2组份的绞股蓝皂苷以便后续的分离纯化研究。将体积分数75%乙醇提取总成分定为绞股蓝总皂苷(GYP),保留时间为20~30 min组份皂苷定为极性绞股蓝皂苷(GYP<sub>1</sub>),保留时间为45~60 min组份皂苷定为弱极性绞股蓝皂苷(GYP<sub>2</sub>)。

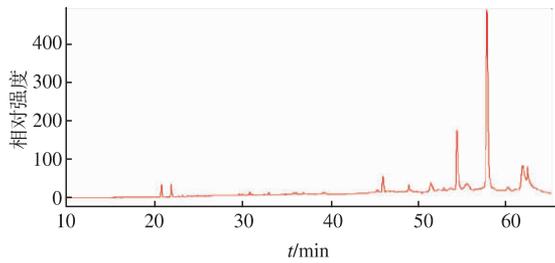
为选定乙醇体积分数分别提取GYP<sub>1</sub>和GYP<sub>2</sub>,分别选取水,体积分数15%,30%,45%乙醇溶液提取绞股蓝,进而再用体积分数70%,80%,90%,100%乙醇溶液提取,通过HPLC分析表明:体积分数45%乙醇能有效提取GYP<sub>1</sub>该部分的极性绞股蓝皂苷(图1b),体积分数90%乙醇能有效提取GYP<sub>2</sub>该部分的弱极性绞股蓝皂苷(图1c)。



(a) 体积分数75%乙醇提取物(绞股蓝总皂苷, GYP)



(b) 体积分数45%乙醇提取物(极性绞股蓝皂苷, GYP<sub>1</sub>)



(c) 体积分数90%乙醇提取物(弱极性绞股蓝皂苷, GYP<sub>2</sub>)

图1 绞股蓝皂苷 HPLC 分析

Fig.1 HPLC analysis of gypenoside

### 2.2 正交优化提取极性绞股蓝皂苷

根据上述确定体积分数为 45%乙醇溶液适宜于提取 GYP<sub>1</sub>,采用加热浸提法,选定溶剂用量、提取温度和提取时间 3 个因素,以提取液中皂苷含量为考察指标,设定正交实验考察 3 个因素对 GYP<sub>1</sub> 提取的影响,正交实验结果见表 1。由极差 R 可知,各因素对提取 GYP<sub>1</sub> 的影响程度的依次顺序为 A (溶剂用量)>B(提取温度)>C(提取时间),即溶剂用量对 GYP<sub>1</sub> 的提取影响最大,其次是提取温度,而提取时间影响最小,同时确定提取优化的最佳条件为 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>,即在 70 °C 水浴中,以 30 倍质量的体积分数 45%乙醇溶液加热提取 12 h,根据优化的条件进行验证实验,3 组并行实验测定的皂苷得率为 3.12%, 3.26%和 3.32%,平均值得率为 3.23%。

表 1 正交实验结果与分析(GYP<sub>1</sub>)

Tab.1 Design and result of orthogonal test

试验号	A 溶剂用量 (倍数)	B 提取温度/°C	C 提取时间/h	绞股蓝皂苷得率/%
1	10	50	4	1.70
2	10	60	8	1.82
3	10	70	12	2.07
4	20	50	8	2.87
5	20	60	12	2.96
6	20	70	4	3.04
7	30	50	12	3.08
8	30	60	4	3.10
9	30	70	8	3.18
K <sub>1</sub>	1.86	2.55	2.62	/
K <sub>2</sub>	2.96	2.62	2.62	/
K <sub>3</sub>	3.12	2.77	2.70	/
R	1.26	0.22	0.09	/

### 2.3 正交优化提取弱极性绞股蓝皂苷

根据上述确定体积分数为 90%乙醇溶液适宜于提取 GYP<sub>2</sub>,采用加热浸提法,选定溶剂用量、提取温度和提取时间 3 个因素,以提取液中皂苷含量为考察指标,设定正交实验考察 3 个因素对 GYP<sub>2</sub> 提取的影响,正交实验结果见表 2。由极差 R 可知,各因素对提取 GYP<sub>2</sub> 的影响程度的依次顺序为 A (溶剂用量)>B(提取温度)>C(提取时间),即溶剂用量对 GYP<sub>2</sub> 的提取影响最大,其次是提取温度,而提取时间影响最小,同时确定优化提取的最佳条件为 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub>,即在 60 °C 水浴中,以 30 倍量的体积分数 90%乙醇溶液加热提取 6 h,在正交实验 9 个组合中,该组合的提取得率为 3.21%均高于其他组,证明正交优化结果的可靠性。

表 2 正交实验结果与分析(GYP<sub>2</sub>)

Tab.2 Design and result of orthogonal test

试验号	A 溶剂用量 (倍数)	B 提取温度/°C	C 提取时间/h	绞股蓝皂苷得率/%
1	10	40	3	2.16
2	10	50	6	2.19
3	10	60	9	2.22
4	20	40	6	2.26
5	20	50	9	2.30
6	20	60	3	2.33
7	30	40	9	3.04
8	30	50	3	3.12
9	30	60	6	3.21
K <sub>1</sub>	2.19	2.49	2.53	/
K <sub>2</sub>	2.30	2.54	2.56	/
K <sub>3</sub>	3.12	2.59	2.52	/
R	0.93	0.10	0.03	/

### 2.4 绞股蓝皂苷抗肝癌活性

利用 MTT 法测定绞股蓝总皂苷(GYP)、极性绞股蓝皂苷(GYP<sub>1</sub>)和弱极性绞股蓝皂苷(GYP<sub>2</sub>)分别对肝癌细胞 SMCC7721(图 2a)和 Bel7402(图 2b)的体外抑制作用。从图 2 抑制曲线可知:皂苷对肝癌细胞作用 72 h 后,GYP 和 GYP<sub>2</sub> 对肝癌细胞 SMCC7721 有抑制作用,半抑制率 IC<sub>50</sub> 值分别为 (165.83±14.12) μg/mL 和 (113.97±9.26) μg/mL,而

GYP<sub>1</sub> 在 0~200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度范围内对肝癌细胞 SMCC 抑制没有达到 50 % 半抑制率,表明基本没有抑制作用,该结果表明 GYP 的对肝癌细胞的抗癌活性可能主要由 GYP<sub>2</sub> 起作用的,绞股蓝抗癌活性物质主要是由弱极性皂苷发挥功效;GYP、GYP<sub>1</sub> 和

GYP<sub>2</sub> 在 0~200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  质量浓度范围内对肝癌细胞 Bel7402 也基本没有抑制作用,都没有达到 50 % 半抑制率。上述结果表明,绞股蓝皂苷对肝癌细胞 SMCC 的作用较为敏感,而对肝癌细胞 Bel7402 作用不敏感。

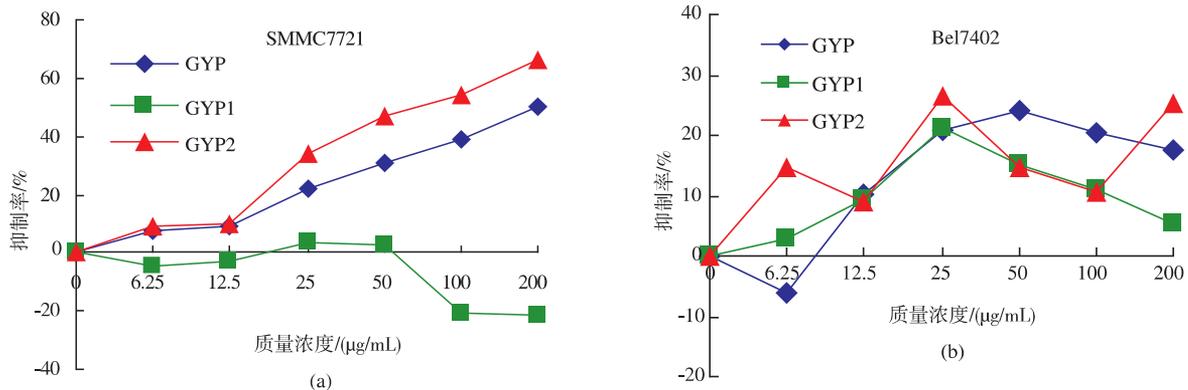


图2 绞股蓝皂苷对肝癌细胞体外抑制作用

Fig.2 Inhibition effect of gypenoside on the growth of Hepatocellular carcinoma cells in vitro

### 3 结论

为优选提取工艺,最大限度地提取有效成分,提高目标成分的纯度,减少非目标成分的溶出,为后期的分离纯化创造更好地条件,分别研究不同体积分数乙醇提取福建南靖绞股蓝中极性皂苷和弱极性皂苷,并通过正交实验优化提取过程。确定体积分数为 45%乙醇溶液提取极性绞股蓝皂苷,体积分数为 90%乙醇溶液提取弱极性绞股蓝皂苷;正交实验优化提取在 70  $^{\circ}\text{C}$  水浴中以 30 倍质量的体积分数 45%乙醇溶液加热提取 12 h 为最佳提取极性绞股蓝皂苷,在 60 $^{\circ}\text{C}$  水浴中以 30 倍量的体积分数 90%乙醇溶液加热提取 6 h 为最佳提取弱极性绞股

蓝皂苷。

皂苷的药效作用与侧链糖基有直接关系,结构中糖基侧链的不同,而显示出不同性质和药理活性。目前利用生物转化手段将高糖链的皂苷结构修饰成低糖链活性更高的皂苷或苷元,已成为皂苷研究的热点,而应用中中药生物转化技术可以为开发新药、提高药物疗效、降低药物毒副作用的研究提供新的手段<sup>[13]</sup>。比较测定了提取的极性绞股蓝皂苷和弱极性绞股蓝皂苷的抗肝癌活性,结果表明绞股蓝抗癌药效主要是由弱极性皂苷起主要作用,极性皂苷基本没有抗癌作用。优化提取的弱极性皂苷抗癌作用将为后期分离纯化绞股蓝抗癌活性物质奠定基础。

### 参考文献:

- [1] Valentina R N, Tom H H, Van H T, et al. Chemistry and pharmacology of *Gynostemma pentaphyllum* [J]. **Phytochemistry Review**, 2005, 4: 197-219.
- [2] Ji H K, Yong N H. Dammarane-type saponins from *Gynostemma pentaphyllum* [J]. **Phytochemistry**, 2011, 72: 1453-1459.
- [3] Lu Kung-wen, Tsai M L, Chen Jung-chou, et al. Gypenosides inhibited invasion and migration of human tongue cancer SCC4 cells through down-regulation of NF-kappaB and matrix metalloproteinase-9 [J]. **Anticancer Research**, 2008, 28(2): 1093-1099.
- [4] Yeo J, Kang Y J, Jeon S M, et al. Potential hypoglycemic effect of an ethanol extract of *Gynostemma pentaphyllum* in C57BL/

- KsJ-db/db mice[J]. **Journal of Medicinal Food**, 2008, 11: 709-716.
- [5] 陈几香, 张建国, 张莉, 等. 绞股蓝总皂苷保肝作用实验研究[J]. **中国药业**, 2007, 13: 7-8.  
CHEN Ji-xiang, ZHANG Jian-guo, ZHANG Li, et al. Study on liver protective effect of total saponins of *Gynostemma pentaphyllum*[J]. **China Pharmaceuticals**, 2007, 13: 7-8. (in Chinese)
- [6] 刘国辉, 姚丹丹, 卢佳怡, 等. 绞股蓝对 D-半乳糖所致亚急性衰老大鼠下丘脑的抗衰老作用及其机制研究[J]. **医学理论与实践**, 2006, 19(5): 497-499.  
LIU Guo-hui, YAO dan-dan, LU Jia-yi, et al. The effect mechanism of *Gynostemma Pentaphyllum Makino* to hippocampus in aged rats induced by D-galactose[J]. **Journal Medicine Theory & Practice**, 2006, 19(5): 497-499. (in Chinese)
- [7] Chen Jung-chou, Lu Kung-wen, Tsai M L, et al. Gypenosides induced G0/G1 arrest via Chk2 and apoptosis through endoplasmic reticulum stress and mitochondria-dependent pathways in human tongue cancer SCC-4 cells[J]. **Oral Oncology**, 2009, 45(3): 273-283.
- [8] Schild L, Chen Bing-huei, Makarov P, et al. Selective induction of apoptosis in glioma tumour cells by a *Gynostemma pentaphyllum* extract[J]. **Phytomedicine**, 2010, 17(8): 589-597.
- [9] Nguyen P H, Gauhar R, Hwang S L, et al. New dammarane-type glucosides as potential activators of AMP-activated protein kinase (AMPK) from *Gynostemma pentaphyllum*[J]. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 2011, 19(21): 6254-6260.
- [10] Tom H H, Valentina R N, Noeris K S, et al. A novel LXR- $\alpha$  activator identified from the natural product *Gynostemma pentaphyllum*[J]. **Biochemical Pharmacology**, 2005, 70(9): 1298-1308.
- [11] 陈忠仁, 张永田. 福建省绞股蓝资源植物[J]. **亚热带植物通讯**, 1992, 21(1): 51-53.  
CHEN Zhong-ren, ZHANG Yong-tian. The natural resource of *Gynostemma pentaphyllum* in Fujian province[J]. **Subtropical Plant Science**, 1992, 21(1): 51-53. (in Chinese)
- [12] 蒋伟哲, 周燕文, 李锦燊. 广西 6 种绞股蓝中总皂苷的含量比较[J]. **中国药业**, 2006, 15(3): 26-27.  
JIANG Wei-zhe, ZHOU Yan-wen, LI Jin-shen. Comparison of total saponin contents in *Gynostemma* cultivated of Guangxi[J]. **China Pharmaceuticals**, 2006, 15(3): 26-27. (in Chinese)
- [13] 刘学湘, 陈建伟. 中药有效成分生物转化的研究进展[J]. **食品与生物技术学报**, 2008, 27(2): 14-18.  
LIU Xue-xiang, CHEN Jian-wei. Research progress of chinese medicine effective component biotransformation[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2008, 27(2): 14-18. (in Chinese)