

荧光法测定桑叶中槲皮素含量的优化

徐艳阳, 李科静, 贾洪雷

(吉林大学生物与农业工程学院, 吉林长春 130022)

摘要: 为了探究桑叶中槲皮素含量的测定方法, 应用荧光分光光度法进行了实验研究, 分析了相应的实验操作参数。以槲皮素标准品为对照, 分别研究了乙醇体积分数、静置时间、静置温度、质量浓度5%硝酸铝溶液的加入量和pH值对槲皮素荧光强度的影响。在单因素试验的基础上, 利用三因素三水平响应面实验设计对各影响因素的显著性及其交互作用进行了优化分析。研究表明, 最佳测定条件为: 乙醇体积分数为100%、静置时间为60 min、静置温度为13 ℃。在此条件下测得桑叶中槲皮素的含量为(41.92±0.11) mg/g, 相对标准偏差为0.34%。建立槲皮素标准曲线的回归方程为 $y=240.14x+7.0952$, 相关系数 R^2 为0.9950, 线性范围在 $0\sim 1.5\times 10^{-2}$ mg/mL之间良好, 适合桑叶中槲皮素含量的测定。

关键词: 桑叶; 槲皮素; 荧光; 分光光度法; 回归分析

文章编号: 1673-9078(2013)11-2706-2711

Method Optimization of Determining Quercetin Content in Mulberry Leaf by Fluorescence Spectrophotometry

XU Yan-yang, LI Ke-jing, JIA Hong-lei

(College of Biological and Agricultural Engineering, Jilin University, Changchun 130022, China)

Abstract: To explore a new method for determining quercetin content in mulberry leaf, fluorescence spectrometry was used and corresponding operational parameters were discussed. The effects of ethanol volume fraction, static time, static temperature, addition of 5% $Al(NO_3)_3$ solution and pH value on fluorescence intensity of quercetin were studied with quercetin standard as reference. On the basis of single-factor experiments, significance analysis and interaction effects of various factors were optimized by response surface methodology. The results indicated that optimal detection conditions of quercetin content in mulberry leaf were ethanol concentration 100%, static time 40 min and static temperature 13 ℃. Quercetin content in mulberry leaf was measured of (41.92±0.11) mg/g and the relative standard deviation was 0.34% under above conditions. Established linear regression equation of quercetin standard curve was $y=240.14x+7.0952$, and the correlation coefficient was $R^2=0.9950$ with a linear range of $0\sim 1.5\times 10^{-2}$ mg/mL. This method was suitable for detection of quercetin content in mulberry leaf.

Key words: mulberry leaf; quercetin; fluorescence; spectrophotometry; regression analysis

桑叶 (Mulberry leaf) 异名为铁扇子, 是桑科桑属植物桑的叶, 性寒, 味甘苦, 具有疏风清热、清肝明目、凉血止血的作用, 为常用的药食同源植物之一, 在我国各地均有栽培^[1]。桑叶中主要的活性成份包括多糖、生物碱、甙体、三萜类、香豆精和黄酮类化合物, 其中黄酮类化合物包括芦丁、槲皮素、异皮昔、桑黄酮等。槲皮素是一种多羟基黄酮类化合物, 又名栎精、槲皮黄素, 可作为药品。现代医学研究证明槲皮素具有较好的祛痰、平喘、降低血压、抑制血清脂质、增

收稿日期: 2013-04-15

基金项目: 吉林大学开放性创新实验项目 (4560EP01); 吉林大学基本科研业务费项目 (450060487500); 吉林省科技发展计划项目 (20120717)

作者简介: 徐艳阳 (1972-), 女, 博士, 副教授, 主要从事食品营养与安全研究

加血粘稠和动脉粥样硬化形成的作用。因此, 对槲皮素的研究是食品与药品行业研究的热点之一^[2]。

荧光分光光度法是近年来国内外发展较快的一种新型检测方法。与其它传统的检测方法相比, 荧光分光光度法具有快速、灵敏、易操作、方便、精确的优点。目前国外学者研究了荧光分光光度法检测大米中的汞、葡萄中的酚以及环黄酮的含量等^[3-8]。国内学者以芦丁为标准品, 用荧光分光光度法检测了桑叶、枸杞、瑞香狼毒和金线莲中总黄酮的含量等^[9-13]。但用荧光分光光度法测定桑叶中槲皮素含量的研究尚未见报道。因此本文根据槲皮素类化合物能与铝离子在一定条件下能形成稳定的荧光络合物, 以槲皮素为标准品, 应用荧光分光光度法进行检测, 在单因素试验的基础上, 对桑叶中槲皮素的含量的测定条件进行了

响应面法优化研究,确定了用荧光分光光度法测定桑叶中槲皮素含量的较佳条件,为深入开发利用桑叶植物资源,探索提槲皮素的取工艺等提供科学的检测方法和理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料、试剂与amp;仪器

1.1.1 材料

桑叶购于长春市同仁堂药店,烘干、粉碎过60目筛,备用。

1.1.2 试剂

槲皮素标准品(HPLC≥98%),上海源叶生物科技有限公司;无水乙醇,天津市永大化学试剂有限公司;硝酸铝、冰乙酸、醋酸钠,北京化工厂;所用试剂均为分析纯。

1.1.3 主要仪器

KQ-250DB型超声波清洗器,江苏省昆山市超声仪器有限公司;AL104型电子分析天平,梅特勒-托利多仪器有限公司;FW177型中草药粉碎机,天津市泰斯特仪器有限公司;LD4-2A型低速离心机,北京市雷勃尔离心机有限公司;PH070A型干燥箱,上海一恒科技有限公司;930A荧光分光光度计,上海三科仪器有限公司;HH数显恒温水浴锅,江苏金坛市金城国胜实验仪器厂。

1.2 试验方法

1.2.1 桑叶样品溶液的制备

精密称取5.00g已粉碎好的桑叶,置于250mL锥形瓶中,用150mL体积分数为60%乙醇浸泡5h,然后超声破碎提取,条件为:超声温度60℃、超声时间40min、料液比1:30、超声功率60W。超声破碎后,离心,取上清液,用60%乙醇定容至250mL,待测。

1.2.2 槲皮素标准溶液的配制

精密称取槲皮素标准品0.0015g,用体积分数为70%乙醇溶解,定容至100mL,摇匀,配成 1.5×10^{-2} mg/mL槲皮素标准溶液,待用。

1.2.3 槲皮素最大激发波长和最大发射波长的确定

根据文献^[4]用荧光法测定槲皮素荧光强度的最大激发波长和发射波长分别为436nm和486nm。

1.2.4 槲皮素标准曲线的制作

准确量取槲皮素标准溶液0mL、0.2mL、0.4mL、

0.6mL、0.8mL、1.0mL置于25mL容量瓶中,加入质量分数为5%Al(NO₃)₃溶液1.0mL,再加入pH值为2.65醋酸-醋酸钠缓冲溶液(HAC-NaAC)2.0mL,然后用体积分数为70%乙醇定容,摇匀,13℃静置30min,待测。

1.2.5 桑叶中槲皮素含量的计算

桑叶中槲皮素含量的计算公式如下:

$$Y = \frac{C \times V \times N}{M} \quad (1)$$

注:Y为桑叶中槲皮素的含量(mg/g);C为样液中槲皮素的浓度(mg/mL);V为样液的体积(mL);N为稀释倍数;M为称取桑叶的质量(g)。

1.2.6 单因素试验设计

1.2.6.1 乙醇体积分数对槲皮素荧光强度的影响

准确量取5%Al(NO₃)₃溶液1.0mL,加入槲皮素标准溶液1.0mL、pH值为3.36HAC-NaAC缓冲溶液2.0mL,分别用50%、60%、70%、80%、90%、100%乙醇定容至25mL,摇匀,13℃静置60min,在激发波长436nm、发射波长486nm处,测其荧光强度。

1.2.6.2 静置时间对槲皮素荧光强度的影响

准确量取5%Al(NO₃)₃溶液1.0mL,加入槲皮素标准溶液1.0mL、pH值为3.36HAC-NaAC缓冲溶液2.0mL,用无水乙醇定容至25mL,静置温度为13℃,分别静置20min、40min、60min、80min、100min后,测其荧光强度。

1.2.6.3 静置温度对槲皮素荧光强度的影响

准确量取5%Al(NO₃)₃溶液1.0mL,加入槲皮素标准溶液1.0mL、pH值为3.36HAC-NaAC缓冲溶液2.0mL,用无水乙醇定容至25mL,分别在13℃、23℃、33℃、43℃、53℃条件下,静置40min后,测其荧光强度。

1.2.6.4 Al(NO₃)₃加入量对槲皮素荧光强度的影响

分别量取5%Al(NO₃)₃溶液0.6mL、0.8mL、1.0mL、1.2mL、1.4mL于25mL容量瓶中,加入槲皮素标准品1.0mL,pH值为3.36HAC-NaAC缓冲溶液2.0mL,用无水乙醇定容至25mL,13℃静置40min后,测其荧光强度。

1.2.6.5 pH值对槲皮素荧光强度的影响

准确量取5%Al(NO₃)₃溶液0.8mL,加入槲皮素标准溶液1.0mL,分别加入pH值为2.65、3.36、4.37、5.19、6.01HAC-NaAC缓冲溶液2.0mL,用无水乙醇定容至25mL,静置温度为13℃,静置40min后,测其荧光强度。

1.2.7 响应面试验设计与数据处理

响应面优化设计见表1。每次试验重复三次,采用Design-Expert 8.05软件对试验数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 槲皮素标准曲线制作

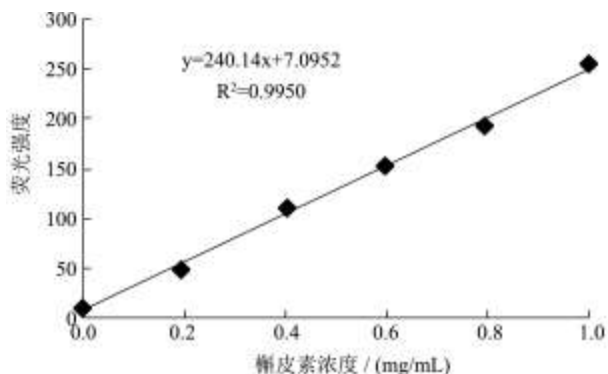


图1 槲皮素标准曲线

Fig.1 Standard curve of quercetin standard

由图1可知，槲皮素标准曲线的回归方程为： $y=240.14x+7.0952$ ($R^2=0.9950$)，其中y表示荧光强度，x表示槲皮素的浓度，由相关系数 R^2 可知，槲皮素浓度在 $0.0\sim 1.5\times 10^2$ mg/mL范围内线性关系良好。

2.2 单因素试验结果

2.2.1 乙醇体积分数对槲皮素荧光强度的影响

在 $Al(NO_3)_3$ 加入量、pH 值、静置温度和静置时间相同的条件下，考查乙醇体积分数对槲皮素荧光强度的影响，结果见图 2。

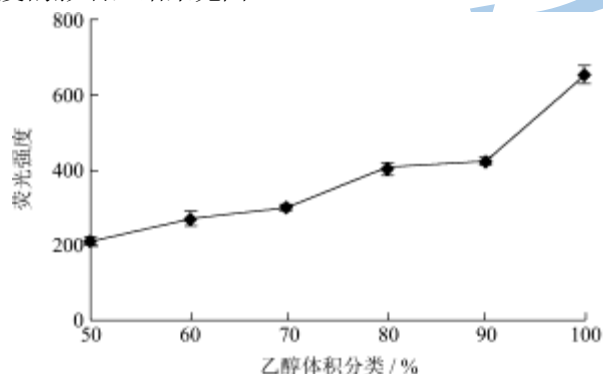


图2 乙醇体积分数对槲皮素荧光强度的影响

Fig.2 Effects of ethanol volume fraction on fluorescence intensity of quercetin

由图 2 可知，随着乙醇体积分数升高，槲皮素的荧光强度逐渐升高，当乙醇体积分数为 100%时，槲皮素的荧光强度达到最高，原因可能是乙醇体积分数越高，荧光络合物的溶出越多。因此，确定乙醇体积分数 100%为较佳测定条件。

2.2.2 静置时间对槲皮素荧光强度的影响

在 $Al(NO_3)_3$ 加入量、pH 值、静置温度及乙醇体积分数相同的条件下，考查静置时间对槲皮素荧光强度的影响，结果见图 3。

由图 3 可知，静置时间从 20~40 min 内，槲皮素

的荧光强度呈上升趋势，在 40 min 时达到最高，超过 40 min 后呈下降趋势，原因可能是静置时间在 40 min 之前，槲皮素中的荧光物质和铝化合物没有充分反应，在 40 min 之后形成的荧光络合物不稳定发生分解，导致测量结果降低，因此，静置时间选取 40 min 较佳。

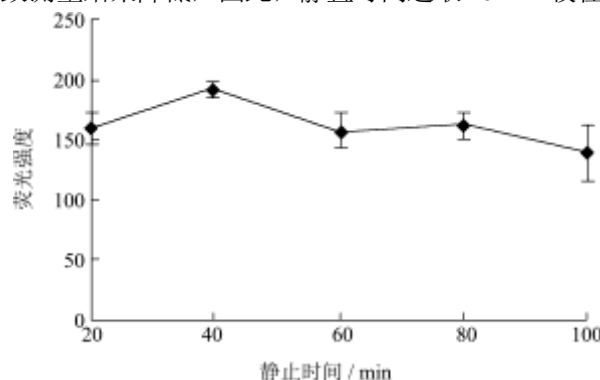


图3 静置时间对槲皮素荧光强度的影响

Fig.3 Effects of static time on fluorescence intensity of quercetin

2.2.3 静置温度对槲皮素荧光强度的影响

在 $Al(NO_3)_3$ 加入量、pH 值、乙醇体积分数相同的条件下，静置时间为 40 min，考查静置温度对槲皮素荧光强度的影响，结果见图 4。

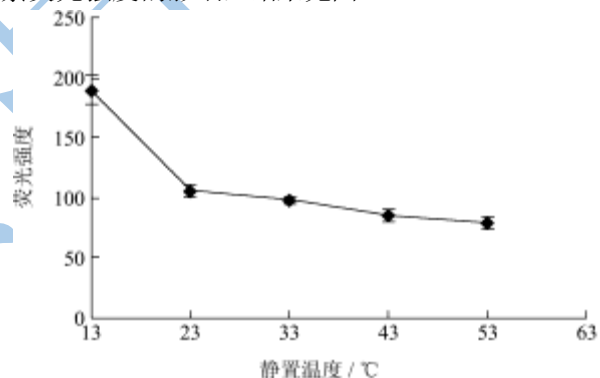


图4 静置温度对槲皮素荧光强度的影响

Fig.4 Effects of static temperature on fluorescence intensity of quercetin

由图 4 可知，静置温度在 13 °C 时，槲皮素的荧光强度最高，随着静置温度的升高，槲皮素的荧光强度呈下降趋势，原因可能是温度越高，对槲皮素成分破坏越大，从而测定结果偏低，所以，静置温度选取 13 °C 较佳。

2.2.4 $Al(NO_3)_3$ 加入量对槲皮素荧光强度的影响

在 pH 值、乙醇体积分数相同的条件下，静置温度为 13 °C，静置时间为 40 min，考查 5% $Al(NO_3)_3$ 加入量对槲皮素荧光强度的影响，结果见图 5。

由图 5 可知， $Al(NO_3)_3$ 加入量对槲皮素荧光强度的影响不显著。经方差分析，槲皮素的荧光强度无显著性差异 ($P<0.05$)。从经济和减少试剂用量角度考

虑,确定 5% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 加入量 0.8 mL 为较佳测定条件。

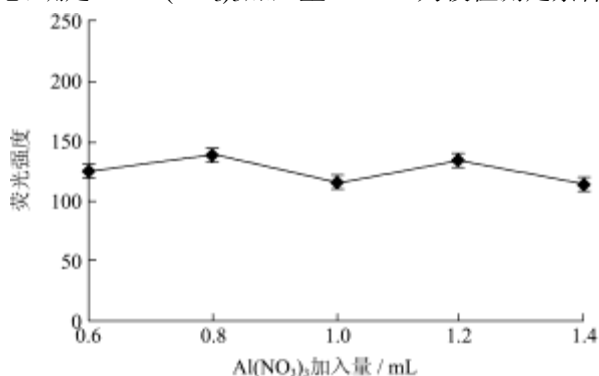


图 5 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 加入量对槲皮素荧光强度的影响

Fig.5 Effects of 5% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ solution on fluorescence intensity of quercetin

2.2.5 pH 值对槲皮素荧光强度的影响

在 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 加入量和 pH 值相同条件下,乙醇体积分数为 100%,静置温度为 13 °C,静置时间为 40 min,考查 pH 值对槲皮素荧光强度的影响,结果见图 6。

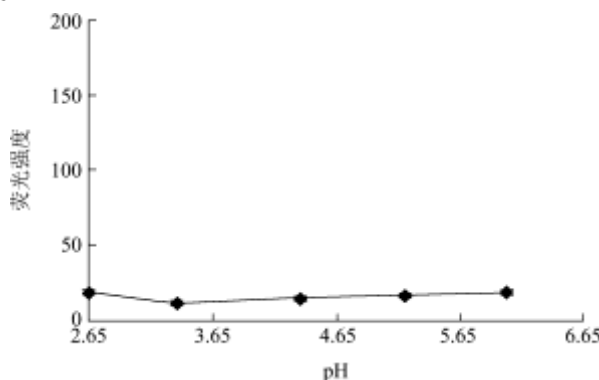


图 6 pH 值对槲皮素荧光强度的影响

Fig.6 Effects of pH on fluorescence intensity of quercetin

由图 6 可知,pH 值对槲皮素荧光强度的影响不显著。经方差分析表明槲皮素的荧光强度无显著性差异 ($P < 0.05$),所以,pH 值对槲皮素荧光强度的影响较小。从节约试剂的角度考虑,确定 2.65 为较佳测定 pH 值。

2.3 响应面法优化与分析

2.3.1 回归模型的建立及显著性检验

在单因素试验的基础上,确定主要的影响因素是乙醇体积分数、静置温度、静置时间,用 Design-Expert 8.05 软件对各因素及水平进行设计,试验结果见表 1 和 2。

应用 Design-Expert 8.05 软件对试验数据进行多元回归拟合,得到槲皮素的荧光强度与乙醇体积分数、静置温度、静置时间的二次回归模型为:

$$Y = 447.80 + 142.0X_1 - 42.94X_2 - 22.56X_3 - 27.13X_1X_2 - 9.50X_2X_3 + 8.35X_1X_1 + 31.72X_2X_2 + 23.48X_3X_3$$

式中, X_1 为乙醇体积分数; X_2 为静置温度; X_3 为静置时间。

表 1 响应面优化试验结果

Table 1 Experimental results of RSM

试验号	X_1 (乙醇体积分数/%)	X_2 (静置温度/°C)	X_3 (静置时间/min)	荧光强度
1	80	23	60	265.0
2	80	33	40	325.5
3	90	23	40	453.0
4	80	23	20	395.5
5	80	13	40	381.0
6	100	23	60	619.0
7	90	13	20	532.0
8	90	23	40	449.0
9	90	33	60	455.0
10	90	23	40	462.0
11	90	23	40	424.0
12	90	33	20	489.0
13	100	33	40	540.5
14	100	13	40	704.5
15	100	23	20	639.0
16	90	13	60	536.0
17	90	23	40	451.0

由表 2 方差分析可以看出,模型的 $R^2=0.9788$,表明该模型有非常高的显著性 ($P < 0.001$)。失拟性 $P=0.0647 > 0.05$,表明该模型不失拟;调整确定系数为 $R_{Adj}^2=0.9516$,表明模型拟合程度良好,可以用于荧光法测定槲皮素含量的测定条件研究。

2.3.2 响应面分析

根据回归方程来绘制交互作用较为明显的响应面立体分析图和等高线图,结果见图 7、8 和 9。

由图 7 中等高线图可以看出乙醇体积分数和静置时间的交互作用并不显著,沿乙醇体积分数轴向等高线密集,说明乙醇体积分数对响应面峰值的影响比静置温度大。由图 7 中响应面图可以看出,随着乙醇体积分数的增加,槲皮素的荧光强度逐渐增大,二者呈正相关,且曲面较陡,说明乙醇体积分数对槲皮素荧光强度的影响较显著;静置温度对槲皮素荧光强度影响的曲面相对较缓和,说明静置温度的影响较不显著。由图 8 中等高线图可知,乙醇体积分数和静置时间对槲皮素荧光强度的交互影响并不显著,从图 8 中响应面图可知,乙醇体积分数对槲皮素荧光强度影响的曲面较陡,说明影响较显著;静置时间的曲面较缓和,说明相对于乙醇体积分数较不显著。由图 9 中等高线图可知,静置时间和静置温度的交互作用不显著,等

高线沿静置温度的密集度大于静置时间, 说明静置温度对槲皮素荧光强度的影响大于静置时间。

表2 二次回归模型的方差分析

Table 2 ANOVA for quadratic regression model

变异来源	平方和	自由度	均方	F 比	P 值	显著性
模型	1.939×10 ⁵	9	21549.95	35.94	<0.0001	***
X ₁	1.613×10 ⁵	1	1.613×10 ⁵	269.05	<0.0001	***
X ₂	14749.03	1	14749.03	24.60	0.0016	***
X ₃	4072.53	1	4072.53	6.79	0.0351	**
X ₁ X ₂	2943.06	1	2943.06	4.91	0.0623	*
X ₁ X ₃	3052.56	1	3052.56	5.09	0.0586	*
X ₂ X ₃	361.00	1	361.00	0.60	0.4632	*
X ₁ ²	293.57	1	293.57	0.49	0.5067	*
X ₂ ²	4237.79	1	4237.79	7.07	0.0325	**
X ₃ ²	2320.32	1	2320.32	3.87	0.0899	*
残差	4196.99	7	599.57			
失拟项	3390.19	3	1130.06	5.60	0.0647	*
净误差	806.80	4	201.70			
总离差	1.981×10 ⁵	16				
R ²	0.9788					
R _{Adj} ²	0.9516					

注: *差异不显著 (P>0.05), **差异显著 (P<0.05), ***差异极显著 (P<0.01)。

通过响应面分析得出, 影响槲皮素荧光强度的因素大小顺序为: 乙醇体积分数>静置温度>静置时间。当乙醇体积分数为 100%, 静置温度为 13 °C, 静置时间为 60 min 时, 槲皮素的荧光强度的理论值达到 738。

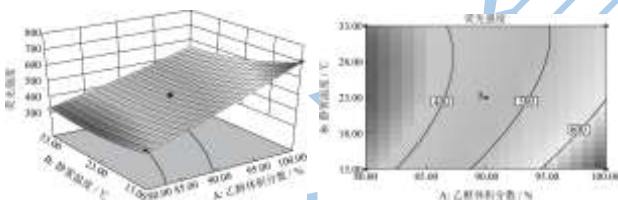


图7 乙醇体积分数与静置温度对槲皮素荧光强度影响的响应面和等高线图

Fig.7 Response surface and contour plots for interactive effects of ethanol concentration and static temperature on fluorescence intensity of quercetin

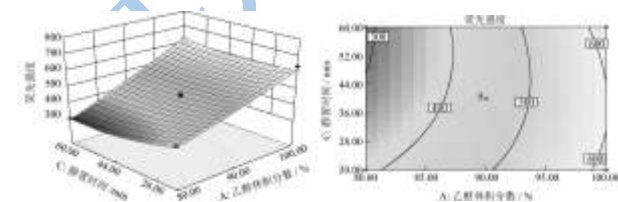


图8 乙醇体积分数与静置时间交互作用对槲皮素荧光强度影响的响应面和等高线图

Fig.8 Response surface and contour plots for interactive effects of ethanol concentration and static time on fluorescence intensity of quercetin

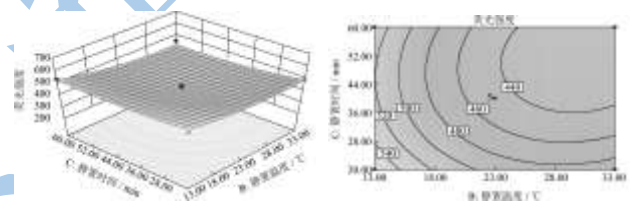


图9 静置温度和静置时间交互作用对槲皮素荧光强度影响的响应面和等高线图

Fig.9 Response surface and contour plots for interactive effects of static temperature and time on fluorescence intensity of quercetin

2.3.3 验证试验

根据2.3.2的最优测定参数: 乙醇体积分数为 100%、静置温度为13 °C、静置时间60 min, 实际测得槲皮素的荧光强度为718, 与理论值738相比, 相对误差为2.71%。表明采用响应面优化的测定条件是可靠的。

2.4 桑叶中槲皮素含量的测定及精密度

(RSD) 试验

按上述最佳测定条件测定桑叶中的槲皮素含量 (n=6) 及精密度, 试验结果见表3。

用该方法测得桑叶中槲皮素的含量为 41.92±0.11 mg/g, RSD 为 0.34%, 说明用荧光法测定桑叶中槲皮

素的含量准确可行。

表 3 桑叶中槲皮素的含量及精密度

Table 3 Content and precision of quercetin in mulberry leaf

项目名称	桑叶中槲皮素含量/(mg/g)						平均值/(mg/g)	RSD/%
试验号	1	2	3	4	5	6	41.92±0.11	0.34
	41.69	41.95	41.90	41.85	42.00	41.90		

3 结论

3.1 采用响应面法优化槲皮素含量的测定条件,得到乙醇体积分数、静置时间、静置温度三因素的二次回归模为: $Y=447.80+142.0X_1-42.94X_2-22.56X_3-27.13X_1X_2-9.50X_2X_3+8.35X_1X_1+31.72X_2X_2+23.48X_3X_3$, 其中 X_1 为乙醇体积分数; X_2 为静置温度; X_3 为静置时间。影响因素的显著性为: 乙醇体积分数>静置温度>静置时间。

3.2 获得测定槲皮素含量最佳条件为: 乙醇体积分数为100%、静置温度为13℃、静置时间为60 min, 在此条件下, 测得桑叶中槲皮素的含量为41.92±0.11 mg/g, 相对标准偏差为0.34%。

3.3 利用荧光分光光度法测定桑叶中槲皮素的含量, 操作简便, 样品使用量较少, 测定成本较低, 且精密度较高, 用此方法可测定桑叶中槲皮素的含量。

参考文献

[1] 孟磊,孙莲,张丽静,等.新疆桑叶中总黄酮含量的测定[J].中国民族民间医药杂志,2002,3:176-177
Meng L, Sun L, Zhang L J, et al. Study on the determination of total flavone content in mulberry leaf of XIN JIANG [J]. Chinese Journal of Ethnopharmacology, 2002, 3: 176-177

[2] 廖兴林,杨定乾.桑叶药理活性及功能成分的研究进展[J].内蒙古中医药,2008,2:47
Liao X L, Yang D Q. A Review on Pharmacological Activity and Bioactive Compounds of Mulberry Leaves [J]. Nei Mongol Journal of Traditional Chinese Medicine, 2008, 2: 47

[3] Douglas G da Silva, Lindomar A, et al. Determination of mercury in rice by MSFIA and cold vapour atomic fluorescence spectrometry [J]. Food Chemistry, 2013, 137: 159-163

[4] Tomečková V, Guzy J, Kušnir J, et al. Comparison of the effects of selected chalcones, dihydrochalcones and some cyclic flavonoids on mitochondrial outer membrane determined by fluorescence spectroscopy [J]. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2006, 69:143-150

[5] Xiao D L, Yuan D H, He H, et al. Microwave assisted one-step green synthesis of fluorescent carbon nanoparticles from ionic

liquids and their application as novel fluorescence probe for quercetin determination [J]. Journal of Luminescence, 2013, 140: 120-125

[6] Mondal S, Ghosh S. Role of curcumin on the determination of the critical micellar concentration by absorbance, fluorescence and fluorescence anisotropy techniques [J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2012, 115: 9-12

[7] Amanda C, Gutierrez Marcelo H. Time resolved fluorescence spectroscopy of quercetin and morin complexes with Al^{3+} [J]. Spectrochimica Acta Part A, 2002, 58: 83-89

[8] Vinãs P, López-Erroz C, Marín-Hernández J J, et al. Determination of phenols in wines by liquid chromatography with photodiode array and fluorescence detection [J]. Journal of Chromatography A, 2000, 871: 85-93

[9] 王艳.荧光分析法测定桑叶中总黄酮含量的研究[J].中国酿造,2008,11:90-91
Wang Y. Study on the determination of total flavonoids content in mulberry leaf by fluorescence method [J]. China Brewing, 2008, 11: 90-91

[10] 冯俊霞,陆敏,戚秀菊,等.荧光法测定枸杞子中总黄酮含量[J].中国酿造,2012,4:168-170
Feng J X, Lu M, Qi X J, et al. Determination of total flavonoids in *Lycium barbarum* L. by spectrofluorimetry [J]. China Brewing, 2012, 4: 168-170

[11] Selin S, RÜYZ S. Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2013, 20: 595-602

[12] ZHI Ying, XIAO Xiang Han, Li Jian, et al. Ultrasound- assisted extraction of polysaccharides from mulberry Leaves [J]. Food Chemistry, 2011, 127: 1273-1279

[13] 罗喜荣,黄静,杨军,等.荧光分光光度法测定瑞香狼毒中总黄酮的含量[J].安徽农业学报,2012,40(17): 9260-9261
Luo X R, Huang J, Yang J, et al. Determination of Total Flavanoids in radix stelleriae chamaejasmes by Spectrofluorimetry [J]. Journal of Anhui Agri, 2012, 40(17): 9260- 9261

[14] 罗明可,吴水华,柯伙钊,等.荧光光度法测定福建组培金线莲中总黄酮含量[J].药品鉴定,2012,2(2):21

Luo M K, Wu S H., Ke H Z, et al. Determination of total flavanoid in tissue cultured anoectochilus roxburghii (wall)

lindl from Fujian by spectrofluorimetry [J]. China Medicine And Pharmacy, 2012, 2(2):21

现代食品科技