

Nghiên cứu mối liên quan nhân quả và tối ưu hóa quy trình chiết xuất cao từ dược liệu bạch hoa xà thiệt thảo và bán chi liên

Dương Hồng Tố Quyên^{1,3*}, Phạm Ngọc Thạc¹, Lê Thị Thanh Nga¹
Chu Ngọc Phượng², Trần Thanh Nhân², Chung Khang Kiệt²

¹ Bệnh viện Y học Cổ truyền Thành phố Hồ Chí Minh

² Khoa Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

³ Khoa Dược, Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch

Summary

Asperulosid is an example of a natural compound classified under the category of iridoid glycosides and was isolated from the Herba Hedyotis diffusae. Numerous studies have reported on various medicinal properties of asperulosid, namely, in the treatment of inflammatory diseases, cancer, antioxidant activity. Scutellarin is a flavon that has been found in the Herba Scutellariae barbatae and has diverse biological activities, including anticancer, lipid lowering, antioxidative and neurocognitive properties. The cause-effect relations were investigated to optimize the extraction for higher yield, especially in view of asperulosid and scutellarin. Twenty three experiments were designed by Design - Expert software for evaluate the effects of 3 independent variables (number of cycles, extraction times and solvent/material ratio) on 4 dependent variables (the extraction yield, asperulosid, scutellarin extraction yield and wages of labor). Asperulosid and scutellarin contents were determined by HPLC. The cause-effect relations between the independent and dependent variables were investigated, and the extraction was optimized optimized by Phasolpro RD 1.0 software. All three independent variables were found to affect four dependent variables. Finally, the optimized extraction was optimized as: solvent/material ratio – 19/1; number of cycles – 2; extraction times – 2.06. These findings may be practically useful for quality improvement of extracts from the Herba Hedyotis diffusae and Herba Scutellariae barbatae.

Keywords: Asperulosid, Scutellarin, HPLC, Herba Hedyotis diffusae, Herba Scutellariae barbatae.

Đặt vấn đề

Dược liệu bạch hoa xà thiệt thảo (*Herba Hedyotis diffusae*) phân bố chủ yếu ở Hà Nội, Hải Phòng, Lâm Đồng, Đồng Nai^[1]... với gần 171 hợp chất đã được phân lập gồm 32 iridoid, 26 flavonoid, 24 anthraquinon, 26 phenolic và dẫn chất, 50 tinh dầu^[3]. Trong đó, iridoid như asperulosid, diffusodid A, B, acid geniposidic, alpienosid là thành phần chính quan trọng với nhiều tác dụng dược lý như chống ung thư, chống oxy hóa, kháng viêm^[7]. Dược liệu bán chi liên (*Herba Scutellariae barbatae*) phân bố chủ yếu ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới châu Á:

Nhật Bản, Trung Quốc, Ấn Độ, Thái Lan, Lào, Việt Nam...^[2] với gần 49 hợp chất flavonoid đã được phân lập. Trong đó, scutellarin là flavonoid chính, có hàm lượng cao và thường được sử dụng để kiểm soát chất lượng dược liệu bán chi liên. Ngoài ra, scutellarin còn được nghiên cứu nhiều về tác dụng dược lý như bảo vệ gan, giảm stress oxy hóa, ức chế hoạt động của NF-kappaB và TNF- α ^[4-6]. Bài thuốc bạch hoa xà thiệt thảo – bán chi liên (2:1) có công dụng chữa viêm gan, xơ gan^[2]. Cao chiết là nguyên liệu bán thành phẩm để sản xuất các chế phẩm từ bài thuốc. Các thành phần hóa học có trong dược liệu từ bài thuốc như asperulosid, scutellarin là những chất có tác dụng sinh học. Các chất này được sử dụng làm chất chỉ điểm để kiểm nghiệm bài thuốc. Do đó, vấn đề nghiên cứu tối ưu hóa quy trình chiết xuất cao từ bài thuốc là cần thiết, nhằm mục đích thu được cao chiết có hàm lượng chất chỉ điểm cao cũng như hiệu suất

Chịu trách nhiệm: Dương Hồng Tố Quyên

Email: dsduongquyen@gmail.com

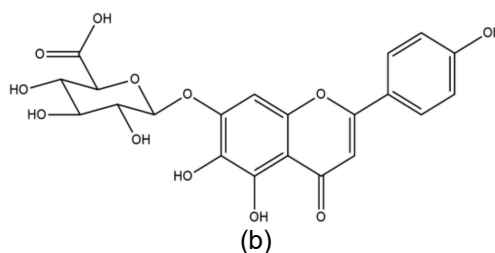
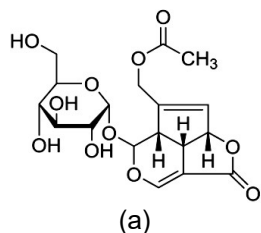
Ngày nhận: 27/4/2021

Ngày phản biện: 25/5/2021

Ngày duyệt bài: 26/7/2021

chiết tối ưu với chi phí hợp lý. Hiện nay, với sự phát triển của công nghệ thông tin thì máy tính là công cụ hiệu quả trong việc tối ưu hóa quy trình chiết xuất. Vì vậy, chúng tôi nghiên cứu

mối liên quan nhân quả và tối ưu hóa quy trình chiết xuất cao từ dược liệu bạch hoa xà thiệt thảo và bán chi liên.



Hình 1. Cấu trúc hóa học của asperulosid (a) và scutellarin (b)

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng và nguyên liệu

Dược liệu bạch hoa xà thiệt thảo (*Herba Hedyotis diffusae*) và bán chi liên (*Herba Scutellariae barbatae*) đạt tiêu chuẩn cơ sở và được cung cấp bởi Bệnh viện Y học cổ truyền TP. Hồ Chí Minh tháng 2/2021. Toàn cây được dược liệu bạch hoa xà thiệt thảo và bán chi liên được xay và rây, kích thước dược liệu được kiểm soát trong khoảng 3 - 5 mm. Chất đối chiếu asperulosid và scutellarin có độ tinh khiết lần lượt là 98,42 % và 98,30 % được mua từ Công ty Chengdu Biopurify Phytochemicals. Methanol đạt tiêu chuẩn phân tích (Hãng Merck, Đức). Acetonitril (Hãng Scharlau, Tây Ban Nha) và nước cất 2 lần đạt tiêu chuẩn dùng cho **HPLC**.

Thiết bị

Máy sắc ký lỏng Shimadzu LC-2030C 3D plus, detector PDA (Nhật), cột sắc ký C₁₈ Shim-pack GIST (250 x 4,6 mm; 5 µm) và tiền cột

HQ 105 C18 (10 x 4,6 mm; 5 µm) (Hãng Thermo Scientific, Mỹ), nhiệt độ cột 30 °C, bước sóng phát hiện 236 nm, thể tích tiêm mẫu 10 µl. Chương trình gradient pha động với tỷ lệ acetonitril trong nước acid H₃PO₄ 0,1 % lần lượt là 20 %, 12 % và 45 % ứng với thời gian là 0 - 5 phút, 5,01 - 30 phút và 30,01 - 45 phút.

Phương pháp chiết xuất cao từ dược liệu bạch hoa xà thiệt thảo và bán chi liên

Dược liệu khô bạch hoa xà thiệt thảo và bán chi liên được xay nhỏ (kích thước 3 - 5 mm) và chiết bằng phương pháp đun hồi lưu với dung môi là nước. Số lần chiết, thời gian chiết và tỷ lệ dung môi/dược liệu thay đổi theo thiết kế thí nghiệm (bảng 1) với nhiệt độ chiết là 100 °C.

Thiết kế thí nghiệm và tối ưu hóa

Gồm có 23 thí nghiệm được thiết kế bằng phần mềm Design-Expert 6.0.6 (Stat-Ease Inc., Mỹ) theo mô hình D-optimal với 3 biến độc lập và 4 biến phụ thuộc với các mức thử nghiệm được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Ý nghĩa và các mức của các biến

Biến độc lập	Mức 1	Mức 2	Mức 3	Mức 4
X ₁ : Số lần chiết	1	2	3	
X ₂ : Thời gian chiết (giờ)	2	3		
X ₃ : Tỷ lệ dung môi/dược liệu (ml/g)	10	14	20	24
Biến phụ thuộc	Điều kiện ràng buộc			
Y ₁ : Hiệu suất chiết asperulosid (%)	Tối đa			
Y ₂ : Hiệu suất chiết scutellarin (%)	Tối đa			
Y ₃ : Hiệu suất chiết cao dược liệu (%)	Tối đa			
Y ₄ : Giá thành sản xuất (VND)	Tối thiểu			

Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần và lấy kết quả trung bình của 3 lần thử nghiệm. Sử dụng phần mềm Phasolpro RD 1.0 (Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh) để nghiên cứu mối liên quan nhân quả và tối ưu hóa quy trình chiết xuất. Quy trình chiết xuất tối ưu được thực nghiệm kiểm chứng lặp lại 3 lần. Áp dụng

trắc nghiệm t (One - sample T test) để so sánh kết quả thực nghiệm với kết quả dự đoán.

Phương pháp xác định hiệu suất chiết asperulosid/scutellarin

Các dịch chiết của cùng một thí nghiệm được gộp chung, trộn đều và lọc qua màng lọc 0,22 µm trước khi xác định nồng độ

asperulosid/scutellarin (mg/ml) trong dịch chiết bằng phương pháp **HPLC**. Hiệu suất chiết asperulosid (Y_1) và scutellarin (Y_2) được xác định bằng phương trình sau:

$$Y_{1/2} = \frac{C \times V \times 100}{M \times 1000}$$

Trong đó: M (g) là khối lượng dược liệu bạch hoa xà thiệt thảo và bán chi liên (đã trừ độ ẩm) và V (ml) là tổng thể tích dịch chiết của thí nghiệm.

Phương pháp xác định hiệu suất chiết cao được liệu

Các dịch chiết của cùng một thí nghiệm được gộp chung, trộn đều và lọc thu được thể tích dịch lọc V (ml). Dịch lọc được cô trên bếp cách thủy đến cạn khô. Cặn tiếp tục được sấy ở 105 °C đến khối lượng không đổi và ghi nhận khối lượng cặn m (mg). Hiệu suất chiết cao Y_3 (%) được xác định bằng phương trình sau:

$$Y_3 = \frac{m \times 100}{M \times 1000}$$

Trong đó: M (g) là khối lượng dược liệu bạch hoa xà thiệt thảo và bán chi liên (đã trừ độ ẩm).

Phương pháp tính giá thành sản xuất

Giá thành sản xuất (Y_4) liên quan tiền điện, nước và công lao động. Thời gian chiết và cô cao đến độ ẩm nhất định (35-40 %) được khảo sát từ thực nghiệm. Từ đó, tiền điện dùng để chiết và cô cao dược liệu (Đ) được xác định bằng phương trình sau: $D = \frac{400 \times t \times 1700}{1000}$

Trong đó: t (giờ) là thời gian chiết và cô cao; 400 là công suất của bếp điện (W); 1700 là giá điện của 1 kWh (VNĐ).

Dùng môi nước được dùng để chiết cao được khảo sát từ thực nghiệm. Từ đó, tiền nước (N) được xác định bằng phương trình sau:

$$N = \frac{V' \times 12000 \times X_1}{1000 \times 1000}$$

Trong đó: V' (ml) là thể tích nước dùng trong một lần chiết cao; X_1 là số lần chiết; 12000 là tiền nước cho 1 m³ nước (VNĐ).

Ngoài ra, công lao động thực hiện quá trình chiết xuất và cô dịch chiết thành cao được khảo sát từ thực nghiệm. Từ đó, tiền công lao động (LĐ) được xác định bằng phương trình sau:

$$LD = t \times 16619$$

Trong đó: t (giờ) là thời gian chiết và cô cao; 16619 là tiền công lao động trong một giờ (VNĐ).

Vì vậy, tổng giá thành sản xuất (Y_4) = tổng tiền điện, nước và công lao động = Đ + N + LĐ (VNĐ)

Kết quả và bàn luận

Dữ liệu thực nghiệm và mô hình hóa

Dữ liệu thực nghiệm

Sử dụng phần mềm Design Expert 6.0 để thiết kế 23 thí nghiệm, sau đó làm thực nghiệm được kết quả như bảng 2. Dữ liệu này được chọn làm đầu vào cho phần mềm Phasolpro RD 1.0 để mô hình hóa, khảo sát liên quan nhân quả và tối ưu hóa quy trình chiết xuất dược liệu bạch hoa xà thiệt thảo và bán chi liên (2:1).

Bảng 2. Kết quả thực nghiệm

TN	Biến độc lập			Biến phụ thuộc			
	X_1	X_2	X_3	Y_1 (%)	Y_2 (%)	Y_3 (%)	Y_4 (VNĐ)
1	1	2	10	0,0507	0,0520	9,9309	73529
2	2	2	20	0,1139	0,1523	21,4362	322659
3	2	3	10	0,0731	0,0848	15,3910	211930
4	1	2	14	0,0677	0,0555	12,3637	102595
5	3	3	14	0,1172	0,1496	24,2679	420229
6	3	3	10	0,1032	0,1347	21,9566	333032
7	3	2	24	0,1077	0,1878	26,9865	586323
8	2	3	24	0,1055	0,1232	21,8825	415389
9	1	2	20	0,0781	0,0986	13,7330	146193
10	1	3	14	0,0595	0,0748	11,4464	119894
11	3	2	20	0,1072	0,1663	25,2157	499126
12	1	3	24	0,0680	0,0860	12,3432	192558
13	1	2	24	0,0779	0,0943	15,8468	175258
14	1	3	10	0,0241	0,0155	8,7182	90828
15	3	2	14	0,1230	0,1660	20,5948	368331
16	2	2	14	0,1073	0,1373	21,2614	235463
17	2	2	10	0,0747	0,1048	15,9494	177332
18	3	3	20	0,1117	0,1520	23,9818	551024

19	2	3	20	0,1073	0,1431	23,4170	357258
20	2	3	14	0,0734	0,1019	15,5221	270061
21	2	2	24	0,0996	0,1818	23,7247	380791
22	3	2	10	0,0930	0,1156	19,6154	281134
23	3	3	24	0,1245	0,1551	25,6170	638220

Mô hình hóa

Điều kiện

- Nhóm thử: 1 và 15.
- Thuật toán: Back Propagation Learning.
- Hàm truyền: Sigmoid.
- Hàm truyền đầu ra: Sigmoid.

Kết quả mô hình hóa: Được trình bày ở bảng

3. Kết quả cho các giá R^2 thử và R^2 luyện đều lớn hơn 75 %. Mô hình này có thể được sử dụng làm cơ sở để khảo sát liên quan nhân quả, tối ưu hóa và dự đoán các biến phụ thuộc.

Bảng 3. Kết quả mô hình hóa

Biến phụ thuộc	R^2 thử (%)	R^2 luyện (%)	R^2 sai số (%)
Y_1	88,7940	90,0011	90,12
Y_2	83,1787	90,0142	88,02
Y_3	97,9957	90,0029	93,43
Y_4	93,4031	90,8064	91,27

Phân tích liên quan nhân quả

Xu hướng và mức độ của các biến được trình bày trong bảng 4.

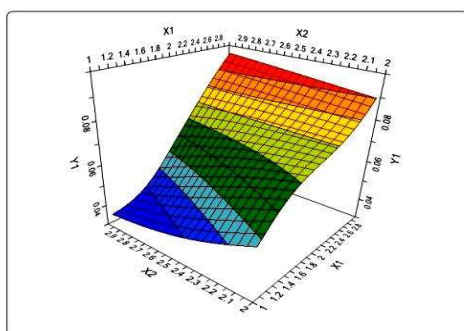
Bảng 4. Xu hướng và mức độ

Biến phụ thuộc	X_1	X_2	X_3	R^2 sai số
Y_1	+	+	+	90,12%
Y_2	+	+	+	88,02%
Y_3	+	+	+	93,43%
Y_4	+	+	+	91,27%

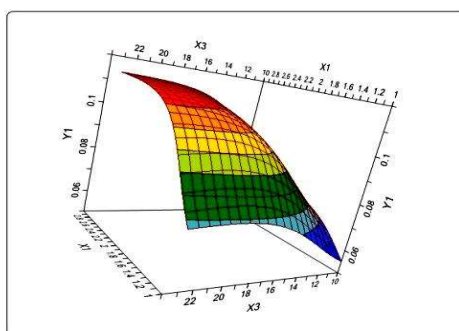
Kết quả cho thấy các biến phụ thuộc hiệu suất chiết asperulosid (Y_1), scutellarin (Y_2), hiệu suất chiết (Y_3), giá thành sản xuất (Y_4) đều có liên quan đến các giá trị đầu vào là Số lần chiết (X_1), thời gian chiết (X_2), tỷ lệ dung môi / dược liệu (X_3).

Quy luật liên quan

Quy luật nhân quả liên quan đến số lần chiết

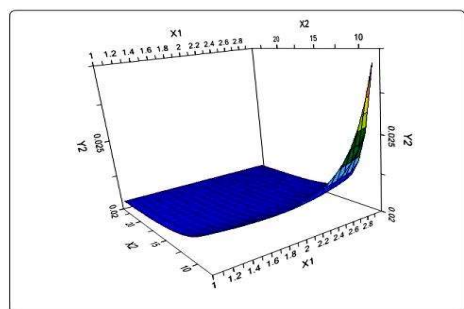


(a)

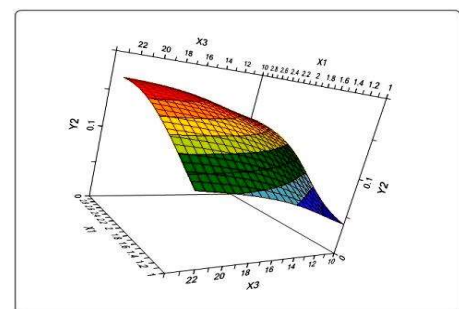


(b)

Hình 1. Ảnh hưởng của (a) số lần chiết (X_1) và thời gian chiết (X_2) và (b) số lần chiết (X_1) và tỷ lệ dung môi/dược liệu (X_3) lên hiệu suất chiết asperulosid (Y_1)



(a)



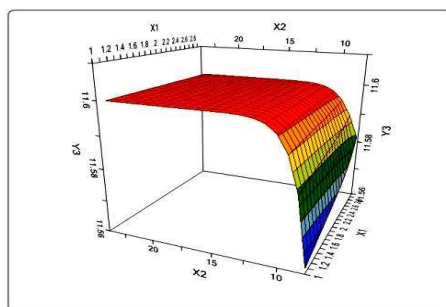
(b)

Hình 2. Ảnh hưởng của (a) số lần chiết (X_1) và thời gian chiết (X_2) và (b) số lần chiết (X_1) và tỷ lệ dung môi/dược liệu (X_3) lên hiệu suất chiết scutellarin (Y_2)

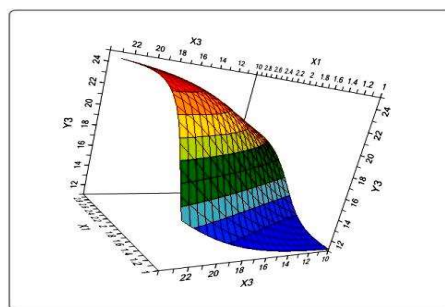
Khi số lần chiết (X_1) thấp, thời gian chiết (X_2) cao và tỉ lệ dung môi/dược liệu (X_3) cao thì hiệu suất chiết asperulosid (Y_1) trung bình ($t = 0,81$); còn nếu số lần chiết (X_1) thấp, thời gian chiết (X_2) thấp và tỉ lệ dung môi/dược liệu (X_3) cao thì hiệu suất chiết asperulosid (Y_1) trung bình ($t = 0,95$) (hình 1). Khi số lần chiết (X_1) thấp, thời gian chiết (X_2) cao và tỉ lệ dung môi/dược liệu (X_3) thấp thì hiệu suất chiết scutellarin (Y_2) thấp ($t = 0,81$); còn nếu số lần chiết (X_1) thấp, thời gian chiết (X_2) thấp và tỉ lệ dung môi/dược liệu (X_3) cao thì hiệu suất chiết scutellarin (Y_2) trung bình ($t = 0,83$) (hình 2).

Dung môi thấm vào dược liệu, hòa tan và mang chất tan trong dược liệu ra dịch chiết. Quá trình này dựa vào sự chênh lệch nồng độ chất tan trong môi trường và dược liệu. Khi tăng số lần chiết (X_1) hoặc tăng thời gian chiết (X_2) hoặc tăng tỉ lệ dung môi/dược liệu (X_3) đều làm tăng sự chênh lệch nồng độ chất tan asperulosid và scutellarin giữa dược liệu và dịch chiết nên làm tăng hiệu suất chiết asperulosid (Y_1) và scutellarin (Y_2).

Quy luật nhân quả liên quan đến hiệu suất chiết cao



(a)



(b)

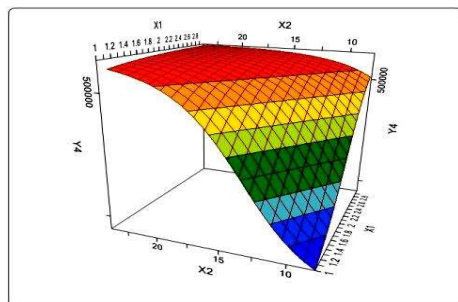
Hình 3. Ảnh hưởng của (a) số lần chiết (X_1) và thời gian chiết (X_2) và (b) số lần chiết (X_1) và tỉ lệ dung môi/dược liệu (X_3) lên hiệu suất chiết cao (Y_3)

Khi thời gian chiết (X_2) hoặc tỉ lệ dung môi/dược liệu tăng thì hiệu suất chiết cao (Y_3) tăng (hình 3 (a) và (b)).

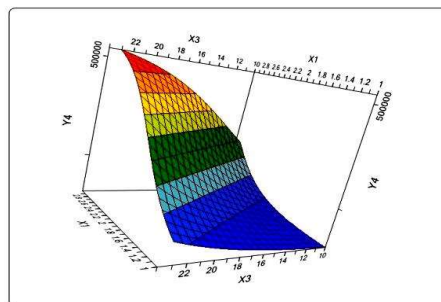
Tương tự như quy luật nhân quả liên quan đến hiệu suất chiết asperulosid và scutellarin, khi tăng số lần chiết (X_1) hoặc tăng tỉ lệ

dung môi/dược liệu (X_3) đều làm tăng sự chênh lệch nồng độ chất tan giữa dược liệu và dịch chiết từ đó làm tăng hiệu suất chiết cao (Y_3).

Quy luật nhân quả liên quan đến giá thành sản xuất



(a)



(b)

Hình 4. Ảnh hưởng của (a) số lần chiết (X_1) và thời gian chiết (X_2) và (b) số lần chiết (X_1) và tỉ lệ dung môi/dược liệu (X_3) lên giá thành sản xuất (Y_4)

Khi số lần chiết (X_1) và thời gian chiết (X_2) tăng thì giá thành sản xuất (Y_4) tăng (hình 4).

Riêng với tỷ lệ dung môi/dược liệu (X_3) tăng thì giá thành sản xuất (Y_4) tăng đáng kể. Quá trình tạo thành cao bao gồm hai giai đoạn nấu

và cô dịch chiết để cho ra cao có độ ẩm nhất định (35 - 40 %). Vì thế, khi tỷ lệ dung môi/dược liệu (X_3) tăng thì thời gian cô sẽ tăng lên rất nhiều, đặc biệt với dung môi chiết là nước. Từ đó, tạo ra sự chênh lệch lớn về giá thành sản

xuất (Y_4) khi tăng tỷ lệ dung môi/dược liệu (X_3).

Tối ưu hóa

Điều kiện tối ưu

Biến độc lập (đối với X_i):

- $1 \leq X_1 \leq 3$
- $2 \leq X_2 \leq 3$
- $10 \leq X_3 \leq 24$

Biến phụ thuộc (đối với Y_i): Hiệu suất chiết asperulosid (Y_1), scutellarin (Y_2) và hiệu suất chiết cao (Y_3) là tối đa, giá thành sản xuất (Y_4) tối thiểu.

Kết quả tối ưu

Từ các điều kiện chiết xuất tối ưu, sử dụng phần mềm Phasolpro RD 1.0 để tiến hành tối ưu hóa. Sau khi tối ưu hóa, kết quả quy trình chiết xuất có các thông số như sau:

Số lần chiết - X_1 : 2 lần. Thời gian chiết (giờ) -

X_2 : 2,06 giờ. Tỷ lệ dung môi/dược liệu (ml/g) - X_3 : 19.

Từ kết quả tối ưu trên, phần mềm Phasolpro RD 1.0 cũng dự đoán các giá trị của biến phụ thuộc:

Hiệu suất chiết asperulosid (%) - Y_1 : 0,1131%. Hiệu suất chiết scutellarin (%) - Y_2 : 0,1411%. Hiệu suất chiết cao dược liệu (%) - Y_3 : 22,6350 %. Giá thành sản xuất (VNĐ) - Y_4 : 310.078 (VNĐ).

Thực nghiệm kiểm chứng

Thực hiện lặp lại 3 lần quy trình chiết xuất tối ưu. Sử dụng phần mềm thống kê SPSS 16.0 để so sánh kết quả thực nghiệm và kết quả dự đoán. Kết quả thống kê được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. So sánh kết quả dự đoán và thực nghiệm kiểm chứng ($n = 3$)

	Y_1 (%)	Y_2 (%)	Y_3 (%)	Y_4 (VNĐ)
<i>Dự đoán</i>	0,1131	0,1411	22,6350	310078
<i>Thực nghiệm</i>	$0,1138 \pm 0,0012$	$0,1426 \pm 0,0013$	$21,8797 \pm 0,3691$	310202 ± 1211
<i>Giá trị p</i>	0,417	0,194	0,071	0,875

Trắc nghiệm t (bảng 4) cho thấy kết quả dự đoán và kết quả kiểm chứng khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Như vậy, kết quả thực nghiệm kiểm chứng điều kiện chiết xuất tối ưu phù hợp với kết quả dự đoán bởi phần mềm Phasolpro RD 1.0.

Kết luận

Từ dữ liệu thực nghiệm, nghiên cứu đã xây dựng được mối liên quan nhân quả giữa điều kiện chiết xuất dược liệu bạch hoa xà thiệt thảo – bán chi liên (số lần chiết, tỷ lệ dung môi/dược liệu và thời gian chiết) với hiệu suất chiết asperulosid và hiệu suất chiết cao. Quy trình chiết xuất được tối ưu là tiền đề quan trọng trong việc nâng cao chất lượng cao chiết bạch hoa xà thiệt thảo và bán chi liên; ứng dụng chiết xuất cao làm nguyên liệu bán thành phẩm để sản xuất chế phẩm từ bài thuốc.

Bài báo là một phần kết quả thuộc đề tài nghiên cứu cấp Sở Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh. Nhóm nghiên cứu xin chân thành cảm ơn Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh đã hỗ trợ kinh phí cho việc thực hiện đề tài.

Tài liệu tham khảo

1. Đỗ Tất Lợi (2011), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, tập 1, NXB Thời Đại, Hà Nội, tr. 97-98.
2. Võ Văn Chi (2012), *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, tập 1, NXB Y học, tr. 1102.

3. Rui Chen, Jingyu He, Xueli Tong et al. (2016), "The *Hedyotis diffusa* Willd. (Rubiaceae): A review on phytochemistry, pharmacology, quality control and pharmacokinetics", *Molecules*, 21 (6), pp. 710.

4. Hua Fan, Xiande Ma, Peng Lin et al. (2017), "Scutellarin prevents nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and hyperlipidemia via PI3K/AKT-dependent activation of nuclear factor (Erythroid-Derived 2)-like 2 (Nrf2) in rats", *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 23, pp. 5599.

5. Chengwei Niu, Yuchen Sheng, Rui Yang et al. (2015), "Scutellarin protects against the liver injury induced by diosbulbin B in mice and its mechanism", *Journal of Ethnopharmacology*, 164, pp. 301-308.

6. Zheng Huai Tan, Ling Hong Yu, Huai Lin Wei, Geng Tao Liu (2007), "The protective action of scutellarin against immunological liver injury induced by concanavalin A and its effect on pro-inflammatory cytokines in mice", *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 59 (1), pp. 115-121.

7. Xu Wang, Weiming Cheng, Xinning Yao, Xingjie Guo (2012), "Qualitative analysis of the chemical constituents in *Hedyotis diffusa* by HPLC-TOF-MS", *Natural Product Research*, 26 (2), pp. 167-172.