

金樱根提取物不同极性部位的体外抗氧化活性 考察及其化学成分分析

朱萱萱¹, 刘晓谦¹, 梁曜华¹, 林丽美², 白璐³, 冯伟红¹, 王智民¹, 李春^{1*}, 廖端芳^{2*}

(1. 中国中医科学院 中药研究所 中药质量控制技术国家工程实验室, 北京 100700;

2. 湖南中医药大学 药学院, 长沙 410208; 3. 湖南株洲千金药业股份有限公司, 湖南 株洲 412000)

[摘要] 目的:考察金樱根75%乙醇提取物及其不同极性萃取部位的抗氧化活性和化学组成。方法:采用有机溶剂萃取法将金樱根75%乙醇提取物分为二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇和水部位,利用1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)和2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)自由基清除试验、铁离子还原能力(FRAP)试验考察金樱根乙醇提取物及其不同极性萃取部位的体外抗氧化活性。采用紫外分光光度法测定各部位中总三萜、总酚、总鞣质和缩合鞣质的含量。运用SPSS 24.0对各部位抗氧化活性与其化学成分含量进行Pearson相关分析,筛选活性部位及主要的活性成分;采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱法(UPLC-Q-TOF-MS/MS)对该活性部位化学成分进行分析,推测主要色谱峰的结构。结果:金樱根乙醇提取物及其不同极性萃取部位均有一定的抗氧化活性,且在一定浓度范围内呈显著剂量-效应关系,但不同部位的抗氧化活性有差异;在DPPH和ABTS自由基清除试验中,阳性药维生素C(VC)和各部位抗氧化能力排序为乙酸乙酯部位>VC>正丁醇部位>乙醇提取物>水部位>二氯甲烷部位;FRAP试验中乙酸乙酯部位的活性弱于VC,其他次序不变。含量测定结果显示,乙酸乙酯部位中总三萜、总酚、总鞣质和缩合鞣质的质量分数分别为3.81%,50.33%,3.32%,39.79%,正丁醇部位中依次为0.88%,41.42%,2.25%,23.55%,乙醇提取物中依次为2.90%,41.95%,3.43%,20.14%,水部位中依次为0.26,80%,16.90%,7.57%,二氯甲烷部位中依次为21.23%,12.90%,1.59%,6.17%。相关性分析结果显示金樱根中总酚和缩合鞣质含量与抗氧化活性呈正相关,总三萜含量与抗氧化活性呈负相关,总鞣质含量与抗氧化活性相关性不明显。经液质联用分析,从乙酸乙酯部位中共鉴定出26个化合物,包括11个缩合鞣质,4个可水解鞣质,6个三萜类,3个黄酮类,1个苯甲酸衍生物和1个绿原酸类化合物。结论:乙酸乙酯部位是金樱根发挥抗氧化作用的主要活性部位,而以缩合鞣质为主的酚类物质是其主要的活性成分,可为天然抗氧化剂的开发提供实验依据。

[关键词] 金樱根; 抗氧化活性; 总酚; 缩合鞣质; 总三萜; 自由基; 维生素C

[中图分类号] R22;R28;R914;O657.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)08-0117-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202357

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20201009.1132.001.html>

[网络出版日期] 2020-10-9 14:27

Investigation on *in Vitro* Antioxidant Activity and Chemical Composition of Different Polar Parts of Extract of *Rosa cymosa* Roots

ZHU Xuan-xuan¹, LIU Xiao-qian¹, LIANG Yao-hua¹, LIN Li-mei², BAI Lu³,

FENG Wei-hong¹, WANG Zhi-min¹, LI Chun^{1*}, LIAO Duan-fang^{2*}

(1. National Engineering Laboratory for Quality Control Technology of Chinese Herbal Medicines,
Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

3. Zhuzhou Qianjin Pharmaceutical Co. Ltd., Zhuzhou 412000, China)

[收稿日期] 20200621(005)

[基金项目] 国家中药标准化项目(ZYBZH-C-HUN-21);国家重点研发计划“中医药现代化研究”重点专项(SQ2017YFC170519);北京市科技计划课题“十病十药”研发项目(Z171100001717028);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(ZXKT17039)

[第一作者] 朱萱萱,在读硕士,从事中药化学和标准研究,E-mail:18810275026@163.com

[通信作者] *李春,研究员,从事中药化学和标准研究,E-mail:cli@icmm.ac.cn;

*廖端芳,研究员,从事药理学研究,E-mail:dfliao@hntcm.edu.cn

[Abstract] **Objective:** To investigate the antioxidant activity and chemical composition of 75% ethanol extract of *Rosa cymosa* roots and its different polar parts. **Method:** The 75% ethanol extract of *R. cymosa* roots was divided into dichloromethane, ethyl acetate, *n*-butanol and water parts by organic solvent extraction. *In vitro* antioxidant activity of each fraction was determined by 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and 2, 2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) free radical scavenging assays, as well as ferric reducing antioxidant power (FRAP) test. The contents of total triterpenes, total phenols, total tannins and condensed tannins in each fraction were determined by spectrophotometry. SPSS 24.0 software was used to conduct Pearson correlation analysis between the antioxidant activity of each fraction and the content of the main components, and then the main active fraction and the main active components were determined. The chemical constituents of the active fraction was analyzed by ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS/MS), and the structures of the main chromatographic peaks were predicted. **Result:** Each fraction of *R. cymosa* roots had certain antioxidant activity, and there was a significant dose-effect relationship within a certain concentration range, but the antioxidant activity of different polar parts was different. In DPPH and ABTS free radical scavenging tests, the antioxidant activity of each fraction and vitamin C (VC, the positive drug) was ranked as ethyl acetate fraction > VC > *n*-butanol fraction > ethanol extract > water fraction > dichloromethane fraction. In FRAP test, the activity of ethyl acetate fraction was weaker than that of VC, and the other order was unchanged. The contents of total triterpenes, total phenols, total tannins and condensed tannins in ethyl acetate fraction were 3.81%, 50.33%, 3.32%, and 39.79%, in *n*-butanol fraction were 0.88%, 41.42%, 2.25% and 23.55%, in ethanol extract were 2.90%, 41.95%, 3.43% and 20.14%, in water fraction were 0, 26.80%, 16.90% and 7.57%, and in dichloromethane fraction were 21.23%, 12.90%, 1.59%, and 6.17%, respectively. Correlation analysis results showed that the contents of total phenols and condensed tannins were positively correlated with the antioxidant activity, the contents of total triterpenes were negatively correlated with the antioxidant activity, and the correlation between total tannins and antioxidant activity was not obvious. A total of 26 compounds were identified from the ethyl acetate fraction by UPLC-Q-TOF-MS/MS, including 11 condensed tannins, 4 hydrolysable tannins, 6 triterpenes, 3 flavonoids, 1 benzoic acid derivative and 1 chlorogenic acid analogue. **Conclusion:** Ethyl acetate fraction is the main antioxidant active site of *R. cymosa* roots, and phenols mainly composed of condensed tannins are the main active components. The results can provide experimental basis for the development of natural antioxidants.

[Key words] roots of *Rosa cymosa*; antioxidant activity; total phenols; condensed tannins; total triterpenes; free radicals; vitamin C

自由基是人体组织中许多生化反应的中间代谢产物,多余的自由基会导致氧化损伤,主要破坏细胞膜的稳定性,诱导细胞凋亡,还会引起细胞内蛋白质、糖类的变性等,从而引起机体的衰老和癌症等问题^[1]。抗氧化剂通过清除体内过多的自由基,以制止氧化应激反应对机体组织细胞的损害。丁基羟基茴香醚(BHA)和二丁基羟基甲苯(BHT)等合成抗氧化剂具有潜在的毒性和致癌等作用^[2],研发广谱、高效、安全的天然抗氧化剂已成为中药研究领域中的热点之一。

金樱根为蔷薇科植物金樱子 *Rosa laevigata*, 小果蔷薇 *R. cymosa* 或粉团蔷薇 *R. multiflora* var.

cathayensis 的干燥根^[3],具有清热解毒、利湿消肿、收敛止血、活血散瘀、固涩益肾的功效,用于滑精、遗尿,痢疾,泄泻,崩漏带下,子宫脱垂,痔疮等的治疗^[4]。现代研究表明金樱根主要含有三萜、鞣质、黄酮、多糖类成分,具有抗炎、抗菌、抗氧化、抗肿瘤、提高机体免疫功能等活性^[5-6]。三萜和鞣质是金樱根的主要成分。鞣质是多元酚类化合物,具有较强的还原性,被认为是良好的天然抗氧化剂^[7];三萜类物质具有清除自由基的能力,是一类重要的天然抗氧化活性物质,具有较高的研究价值^[8]。已有研究表明金樱子的根、茎、叶和果实均有不同程度的抗氧化活性^[9],但尚未见对其活性成分进行深入研究

的报道。因此,为了从中药中寻找天然抗氧化剂,本实验选择采用1,1-二苯基-2-三硝基苯酚(DPPH),2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)自由基清除试验及铁离子还原能力(FRAP)试验考察金樱根乙醇提取物及其不同极性萃取部位的抗氧化活性,筛选抗氧化活性部位;通过考察各部位中总三萜、总酚、总鞣质及缩合鞣质的含量与其抗氧化活性之间的相关性,明确金樱根抗氧化活性部位和活性成分;采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱法(UPLC-Q-TOF-MS/MS)分析该活性部位的化学成分,与上述化学成分的含量测定结果进行对照,确认金樱根的抗氧化药效物质基础,为新型抗氧化剂的开发提供实验依据。

1 材料

ACQUITY UPLC H-Class型超高效液相色谱系统和Xevo G2-S QTOF型高分辨飞行时间质谱仪(美国Waters公司),T6型号新世纪紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),XS105DU型1/10万电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司),Multiskan GO1510型酶标仪(美国Thermo Fisher公司)。

DPPH(批号W27F10E81251),ABTS(批号K18N8M48402),2,4,6-三吡啶基三嗪(TPTZ,批号M19M7E14190)和维生素C(VC,批号J21S9R70775)均购自上海源叶生物科技有限公司;96孔板(美国Thermo Fisher公司),没食子酸、熊果酸和儿茶素对照品(北京融诚鑫德科技发展有限公司,批号分别为M-017-181216, X-006-181130, E-18061201,纯度均 $\geq 98\%$),磷钼钨酸试剂(南京亿迅生物科技有限公司,批号1018A19),干酪素(北京百灵威科技有限公司,批号L460T07),香草醛(天津市福晨化学试剂厂,批号20180320),水为娃哈哈纯净水,甲醇、乙腈、甲酸均为色谱纯,其他试剂均为分析纯。金樱根药材由湖南株洲千金药业股份有限公司提供,经中国中医科学院中药研究所李春研究员鉴定为蔷薇科蔷薇属植物小果蔷薇*R. cymosa*的干燥根。

2 方法和结果

2.1 金樱根各部位样品的制备 取金樱根药材粗粉10 kg,分别加入8,8,6倍量的75%乙醇超声提取3次,每次0.5 h,过滤,合并滤液。取相当于原药材1 kg的提取液留样,减压回收溶剂,水浴上蒸干作为金樱根乙醇提取物,备用。剩余的金樱根提取液减压回收溶剂至无醇味,加水至12 L使成混悬液,分别使用同体积(12 L)的二氯甲烷、乙酸乙酯和正丁醇萃取4次,合并各萃取液,减压浓缩后水浴蒸干,

得二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇部位,质量分别为207.36,316.05,336.32 g;水部位减压浓缩后水浴干燥,得质量571.25 g。

2.2 抗氧化活性研究

2.2.1 供试品溶液的制备 取金樱根乙醇提取物、二氯甲烷部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位、水部位样品各2 mg,精密称定,置于10 mL量瓶中,分别加75%乙醇溶解并定容,摇匀,得储备液,备用;精密量取上述储备液各5,2.5,1.25,0.5,0.25 mL,分别置于10 mL量瓶中,加75%乙醇定容至刻度,摇匀,备用。经以上操作最终制得质量浓度分别为0.2,0.1,0.05,0.025,0.01,0.005 $g \cdot L^{-1}$ 的各部位样品溶液。

2.2.2 DPPH自由基清除试验^[10] DPPH用无水乙醇配制成质量浓度为0.1 $g \cdot L^{-1}$ 的溶液。在96孔板中依次加入不同质量浓度的金樱根各部位样品溶液100 μL 和DPPH溶液100 μL ,充分混匀,37 $^{\circ}C$ 下避光孵育30 min,在517 nm处测定吸光度 A ,每个质量浓度设3个复孔,重复测定3次,取平均值。对照组以75%乙醇100 μL 与各样品溶液100 μL 混合均匀后在517 nm处测定 A ,记为 A_1 。空白组以DPPH溶液100 μL 与75%乙醇100 μL 混匀后在517 nm处测定 A ,记为 A_0 。采用VC作阳性药。计算各样品对DPPH自由基的清除率,计算公式为DPPH自由基清除率 $= [1 - (A - A_1) / A_0] \times 100\%$ 。

2.2.3 ABTS自由基清除试验^[11-12] 将用纯净水配制的7 $mmol \cdot L^{-1}$ ABTS溶液5 mL和2.45 $mmol \cdot L^{-1}$ $K_2S_2O_8$ 溶液5 mL混合产生 $ABTS^+$ 自由基,黑暗中常温静置12~16 h,得ABTS工作液,备用。使用前取ABTS工作液约1 mL,加纯净水稀释至该溶液在734 nm处 $A=0.7 \pm 0.002$,现用现配。于96孔板中分别精密加入不同质量浓度的金樱根各部位样品溶液40 μL ,加入ABTS工作液160 μL ,振摇混匀后在37 $^{\circ}C$ 下反应6 min,于734 nm处测定 A ,记为 A_2 ,每个质量浓度设3个复孔,重复测定3次,取平均值;以75%乙醇代替样品溶液,测得空白 A ,记为 A_0 ;以VC为阳性药。计算各样品对ABTS自由基的清除率,公式为ABTS自由基清除率 $= (A_0 - A_2) / A_0 \times 100\%$ 。

2.2.4 FRAP试验^[13] 精密称取三水乙酸钠1.36 g,加入冰乙酸8 mL使溶解,加水定容至500 mL量瓶中,得300 $mmol \cdot L^{-1}$ 乙酸盐缓冲液;精密称取TPTZ 31.35 mg,用40 $mmol \cdot L^{-1}$ HCl定容至10 mL量瓶中,得10 $mmol \cdot L^{-1}$ TPTZ工作液;精密称取 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 54.10 mg,用水定容至10 mL量瓶中,得浓度20 $mmol \cdot L^{-1}$ $FeCl_3$ 溶液。将乙酸盐缓冲液,TPTZ工

作液以及FeCl₃溶液按10:1:1混合,避光保存,得FRAP工作液,备用(现配现用)。于96孔板中分别精密加入不同质量浓度的金樱根各部位样品溶液30 μL,加入FRAP工作液180 μL,振摇混匀,在37 °C下反应75 min,于593 nm处测定A,记为A₃,每个质量浓度设3个复孔,重复测定3次,取平均值;以75%乙醇代替样品溶液,测得空白A,记为A₀。将不同浓度的FeSO₄溶液代替样品溶液,同上操作测定A,以A为纵坐标,质量浓度为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $A=1.7617C-0.0135$ ($r=0.9996$)。以公式 $A=A_3-A_0$ 计算,代入上述标准曲线,计算FeSO₄当量。FeSO₄当量越大,表示样品的还原能力越强。以金樱根各部位质量浓度对相应部位求得的FeSO₄当量作图,见图1。

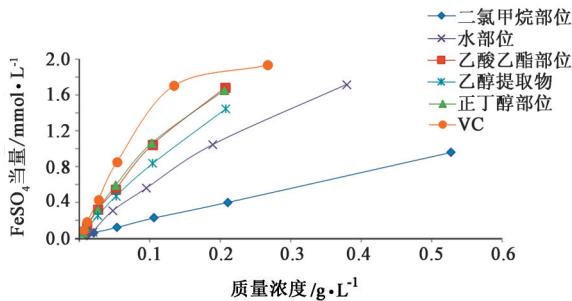


图1 金樱根各部位的铁离子还原能力考察

Fig. 1 Investigation on ferric reducing antioxidant power of different fractions of *Rosa cymosa* roots

2.2.5 数据处理 采用SPSS 24.0软件对测得数据进行处理,得到金樱根各部位样品清除DPPH自由基和ABTS自由基的半数抑制浓度(IC₅₀)。FRAP试验中各样品的铁离子还原能力用图1中相应曲线的斜率(k)表示,见表1。

表1 金樱根各部位的体外抗氧化活性测定($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 1 Determination of antioxidant activities of different fractions of *R. cymosa* roots ($\bar{x}\pm s, n=3$)

样品	IC ₅₀ /g·L ⁻¹		k
	DPPH	ABTS	
乙醇提取物	0.013±0.000 5	0.021±0.000 5	6.821 3
二氯甲烷部位	0.053±0.002 5	0.085±0.009 0	1.777 4
乙酸乙酯部位	0.009±0.000 1	0.015±0.001 0	8.019 0
正丁醇部位	0.011±0.001 0	0.019±0.000 5	7.937 2
水部位	0.026±0.002 5	0.039±0.000 5	4.459 9
VC	0.010±0.000 1	0.016±0.000 1	12.487 0

2.3 各部位中化学成分的含量测定

2.3.1 对照品溶液的制备

精密称取熊果酸对照品4.92 mg,置于10 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得总三萜含量测定的对照品溶液;精密称取没食子酸对照品2.17 mg,置于25 mL棕色量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,得总酚和总鞣质含量测定的对照品溶液;精密称取儿茶素对照品24.00 mg,置于25 mL量瓶中,加75%乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得缩合鞣质含量测定的对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液的制备 分别称取金樱根乙醇提取物、二氯甲烷部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位样品0.1, 0.01, 0.1, 0.2 g,精密称定,置于50 mL具塞锥形瓶中,加入三氯甲烷20 mL,称定质量,70 °C水浴回流1 h,放冷,加三氯甲烷补足减失的质量,滤过,得总三萜含量测定的供试品溶液;分别称取金樱根乙醇提取物、二氯甲烷部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位、水部位样品10, 24, 10, 10, 10 mg,精密称定,置于50 mL棕色量瓶中,水部位加水溶解并定容,其余部位加甲醇溶解并定容,摇匀,即得总酚和总鞣质含量测定的供试品溶液;分别称取金樱根乙醇提取物、二氯甲烷部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位、水部位样品8, 12, 6, 8, 40 mg,精密称定,置于10 mL量瓶中,加75%乙醇溶解并定容,摇匀,得缩合鞣质含量测定的供试品溶液。

2.3.3 总三萜的含量测定^[14] 采用香草醛-冰乙酸-高氯酸显色方法测定金樱根各部位的总三萜含量。精密量取各供试品溶液0.2 mL,分别置于10 mL具塞试管中,60 °C水浴挥发溶剂,精密加入5%香草醛-冰乙酸溶液0.2 mL和高氯酸0.8 mL,摇匀,60 °C水浴加热30 min,取出,立即置冰水浴中,冷却后加入冰乙酸5 mL,在546 nm处测定A并代入标准曲线计算含量。

2.3.4 总酚和总鞣质的含量测定^[3] 采用磷钼钨酸-干酪素显色方法测定金樱根中总酚和总鞣质的含量。精密量取各供试品溶液2 mL,置于25 mL棕色量瓶中,加入磷钼钨酸试液1 mL,再加水10 mL,用29%碳酸钠溶液稀释至刻度,摇匀,放置30 min,于760 nm处测定A,代入标准曲线计算总酚含量。精密量取总酚含量测定中的各供试品溶液25 mL,加至已盛有干酪素0.6 g的100 mL具塞锥形瓶中,密塞,置于温度为30 °C的水浴中保温1 h,时时振摇,取出,放冷,摇匀,滤纸滤过,弃去初滤液,精密量取续滤液2 mL,置25 mL棕色量瓶中,按总酚含量测定中方法显色并测定,代入标准曲线计算不被吸附多酚的含量。总鞣质含量的计算公式为总鞣

质含量=总酚含量-不被吸附多酚的含量。

2.3.5 缩合鞣质的含量测定^[15] 采用香草醛-浓硫酸显色方法测定。精密量取各供试品溶液 0.5 mL,加入已包有锡箔的试管中,分别加入 3% 香草醛甲醇溶液 2.5 mL 和 30% 浓硫酸甲醇溶液 2.5 mL,摇匀,避光显色 20 min,于 500 nm 处测定 A,代入标准曲线计算金樱根各部位的缩合鞣质含量。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 精密量取熊果酸对照品溶液 0.3,0.45,0.6,0.9,1.2 mL,分别置于 2 mL 量瓶中,加甲醇稀释并定容至刻度,摇匀,备用。精密量取儿茶素对照品溶液 0.5,1.0,2.0,3.0,3.5 mL,分别置 10 mL 量瓶中,加 75% 乙醇稀释并定容至刻度,摇匀,备用。精密量取上述各稀释后的对照品溶液,分别按 2.3.3 和 2.3.5 项下方法显色并测定 A。精密量取没食子酸对照品溶液 0.5,1.0,2.0,2.5,3.0 mL,分别置于 25 mL 棕色量瓶中,各加入磷钼钨酸试液 1 mL,分别加水 11.5,11,10,9.5,9 mL,按 2.3.4 项下方法处理并测定 A。以 A 为纵坐标,以对照品质量浓度(C)为横坐标,绘制标准曲线,得熊果酸、没食子酸和儿茶素回归方程分别为 $A=54.955C+0.0997$ ($r=0.9992$), $A=90.364C+0.0109$ ($r=0.9990$), $A=3.2011C-0.0322$ ($r=0.9998$),线性范围分别为 73.8~295.2,1.74~10.42,48~336 mg·L⁻¹。

2.4.2 精密度试验 精密吸取熊果酸、没食子酸和儿茶素对照品溶液适量,分别按 2.3.3,2.3.4,2.3.5 项下方法显色,测定 A,连续测定 6 次,计算 A 的 RSD 分别为 0.2%,0.1%,0.2%,表明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性试验 取金樱根各部位样品,按照 2.3.2 项下方法制备总三萜、总酚(总鞣质)和缩合鞣质含量测定的供试品溶液,分别按照 2.3.3,2.3.4 和 2.3.5 项下方法显色,各自在显色后 10,20,30,40,50,60 min 测定 A,计算 RSD。结果各部位样品在各时间点 A 的 RSD 分别为乙醇提取物 2.7%,1.7%,1.0%,二氯甲烷部位 2.5%,2.6%,0.7%,乙酸乙酯部位 2.8%,2.9%,1.0%,正丁醇部位 2.0%,2.9%,0.2%,水部位 1.5% 和 1.6%(该部位三萜含量较低无法测定)。结果表明各供试品溶液在显色后 1 h 内稳定。

2.4.4 重复性试验 分别取金樱根乙醇提取物及其他 4 个部位样品适量,精密称定,按照 2.3.2 项下方法制备供试品溶液,平行 6 份,依据 2.3.3,2.3.4,2.3.5 项下方法显色并测定 A,计算各样品中总三萜、总酚、总鞣质、缩合鞣质的含量,见表 2,结果建立的方法重复性良好。

表2 金樱根不同部位含量测定的重复性试验考察(n=6)

Table 2 Repeatability experiment for determination of different fractions of *R. cymosa* roots (n=6)

样品	平均质量分数(RSD)/%			
	总三萜	总酚	总鞣质	缩合鞣质
乙醇提取物	2.65(2.3)	41.71(1.6)	3.49(2.5)	20.87(1.6)
二氯甲烷部位	21.15(1.6)	12.24(0.3)	1.61(1.3)	6.17(0.7)
乙酸乙酯部位	3.81(0.2)	50.24(1.3)	3.34(2.5)	39.77(1.0)
正丁醇部位	0.88(1.2)	41.47(2.2)	2.28(2.6)	23.53(0.2)
水部位	-	26.77(0.5)	16.21(0.6)	7.45(2.3)

注:“-”表示含量太低,未能测出(表3,4同)。

2.4.5 加样回收试验 取已知总三萜含量的乙醇提取物、二氯甲烷部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位样品各 6 份,每份分别约 50,5,50,100 mg,精密称定,按与样品中含量约 1:1 比例分别精密加入熊果酸对照品溶液 20 mL(熊果酸质量分别为 1.49,1.86,1.07,0.87 mg,溶剂为三氯甲烷);取已知总酚含量的乙醇提取物、二氯甲烷部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位、水部位样品各 6 份,每份分别约 5,12,5,5,5 mg,精密称定,按与样品中含量约 1:1 比例分别精密加入没食子酸对照品溶液 50 mL(没食子酸质量分别为 2.11,1.47,2.81,2.61,1.45 mg,水部位溶剂为水,其余部位溶剂为甲醇);取已知缩合鞣质含量的上述不同部位样品各 6 份,每份质量分别约 4,6,3,4,20 mg,精密称定,按与样品中含量约 1:1 比例分别精密加入儿茶素对照品溶液 10 mL(儿茶素质量分别为 0.81,0.27,1.08,0.74,1.02 mg,溶剂为 75% 乙醇),按 2.3.2 项下方法制备供试品溶液,分别按 2.3.3,2.3.4,2.3.5 项下方法显色并测定 A,计算加样回收率及其 RSD,见表 3。

表3 金樱根不同部位含量测定的加样回收率考察(n=6)

Table 3 Recovery test for determination of different fractions of *R. cymosa* roots (n=6)

样品	平均加样回收率(RSD)/%		
	总三萜	总酚	缩合鞣质
乙醇提取物	102.20(2.5)	99.38(1.3)	97.17(1.5)
二氯甲烷部位	95.28(0.3)	100.71(1.0)	95.92(1.0)
乙酸乙酯部位	97.83(1.8)	99.81(0.6)	98.67(0.7)
正丁醇部位	98.93(1.7)	102.70(1.2)	102.28(2.8)
水部位	-	102.15(1.7)	97.71(1.8)

2.5 样品测定 取金樱根乙醇提取物和 4 个部位样品,按 2.3.2 项下方法制备供试品溶液,分别按 2.3.3,2.3.4,2.3.5 项下方法显色并测定,计算各成分

含量,见表4。

表4 金樱根不同部位化学成分的含量测定($\bar{x}\pm s, n=2$)

Table 4 Contents of chemical components in different fractions of *R. cymosa* roots ($\bar{x}\pm s, n=2$) %

样品	总三萜	总酚	总鞣质	缩合鞣质
乙醇提取物	2.90±0.14	41.95±0.18	3.43±0.04	20.14±0.04
二氯甲烷部位	21.23±2.99	12.90±0.62	1.59±0.03	6.17±0.05
乙酸乙酯部位	3.81±0.01	50.33±0.56	3.32±0.04	39.79±0.38
正丁醇部位	0.88±0.05	41.42±0.86	2.25±0.05	23.55±0.02
水部位	-	26.80±0.13	16.90±0.03	7.57±0.14

2.6 相关性分析 采用SPSS 24.0软件对各部位样品清除DPPH和ABTS自由基能力、铁离子还原能力与各部位化学成分含量进行相关性分析,见表5。结果发现总三萜含量与清除DPPH, ABTS自由基的IC₅₀呈强正相关,与铁离子还原能力呈强负相关($P < 0.05$);总酚含量与清除DPPH, ABTS自由基的IC₅₀呈强负相关,与铁离子还原能力呈强正相关($P < 0.01$);总鞣质含量与清除DPPH和ABTS自由基的IC₅₀,铁离子还原能力呈弱相关;缩合鞣质含量与清除DPPH, ABTS自由基的IC₅₀呈强负相关,与铁离子还原能力呈强正相关。提示金樱根中总酚含量与缩合鞣质含量越高,清除DPPH/ABTS自由基IC₅₀越低,铁离子还原能力越高,抗氧化活性越好。

表5 金樱根各部位化学成分含量与抗氧化活性的相关性分析

Table 5 Correlation analysis between antioxidant activity and chemical component content of different fractions of *R. cymosa* roots

参数	相关系数		
	清除DPPH的IC ₅₀	清除ABTS的IC ₅₀	铁离子还原能力
总三萜含量	0.985 ¹⁾	0.984 ¹⁾	-0.978 ¹⁾
总酚含量	-0.964 ²⁾	-0.955 ²⁾	0.977 ²⁾
总鞣质含量	0.015	-0.034	-0.196
缩合鞣质含量	-0.772	-0.752	0.848

注:¹⁾表示在0.05水平(双侧)上显著相关;²⁾表示在0.01水平(双侧)上显著相关。

2.7 金樱根乙酸乙酯部位化学成分的UPLC-Q-TOF-MS/MS鉴定 由各部位抗氧化活性结果可知,乙酸乙酯部位是金樱根抗氧化活性部位。因此,采用UPLC-Q-TOF-MS/MS技术对乙酸乙酯部位的化学成分进行分析。

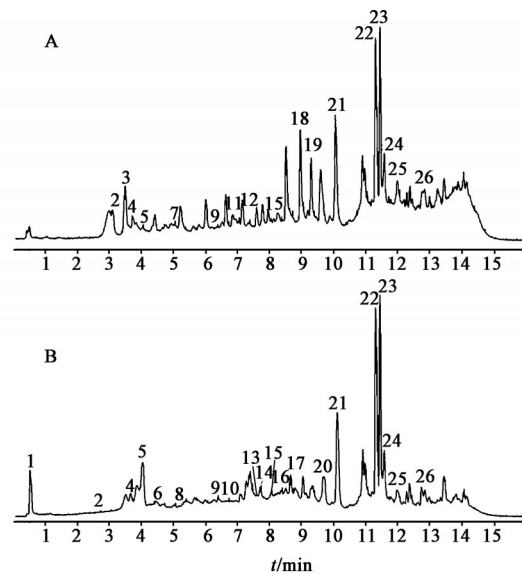
2.7.1 供试品溶液的制备 称取乙酸乙酯部位样品0.01 g,精密称定,加5 mL甲醇超声使溶解,经

0.22 μm微孔滤膜过滤,备用。

2.7.2 检测条件 色谱条件为ACQUITY UPLC BEH C₁₈色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm),流动相甲醇(A)-乙腈(B)-0.1%甲酸水溶液(C)进行梯度洗脱(流动相A的比例始终为5%;0~1 min, 0~5%B; 1~2 min, 5%~8%B; 2~4 min, 8%~10%B; 4~6 min, 10%~15%B; 6~8 min, 15%~23%B; 8~9 min, 23%B; 9~11 min, 23%~50%B; 11~15 min, 50%~70%B),流速0.3 mL·min⁻¹,进样量2 μL,柱温30 °C。

质谱条件为电喷雾离子源(ESI),正、负离子模式扫描,毛细管电压2.0 kV,锥孔电压20 V,离子源温度100 °C,脱溶剂气温度400 °C,锥孔气流速设定50 L·h⁻¹,脱溶剂气流速700 L·h⁻¹。碎片离子碰撞能量20~50 eV,母离子碰撞能量6 eV,扫描范围选择 m/z 20~2 000。

2.7.3 化学成分分析 运用MassLynx 4.1对正、负离子模式下的色谱图进行分析,将各色谱峰的紫外光谱、一级质谱和二级质谱给出的离子信息与文献值进行比较,对各色谱峰进行识别,结果从金樱根乙酸乙酯部位中共鉴定出了26个成分,包括11个缩合鞣质,4个可水解鞣质,6个三萜类,3个黄酮类,1个苯甲酸衍生物和1个绿原酸类化合物。说明该活性部位主要含缩合鞣质类成分,见图2和表6。



A. 正离子模式; B. 负离子模式

图2 金樱根乙酸乙酯部位在不同离子模式下的总离子流

Fig. 2 Total ion current chromatograms of ethyl acetate fraction of *R. cymosa* roots under different ion modes

3 讨论

本研究采用DPPH, ABTS和FRAP共3种方法对金樱根不同极性萃取部位的抗氧化活性进行了

表6 金樱根乙酸乙酯部位中化学成分的UPLC-Q-TOF-MS/MS鉴定

Table 6 Identification of chemical constituents in ethyl acetate fraction of *R. cymosa* roots by UPLC-Q-TOF-MS/MS

化合物	t_R /min	扫描 模式	准分子 离子峰	理论分子 离子峰	δ /ppm	分子式	二级碎片离子	名称	类别
1	0.48	[M-H] ⁻	865.199 1	865.198 0	1.3	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	739, 695, 575, 407	原花青素C ₂ 或其同分异构体	鞣质 ^[16]
2	3.09	[M+H] ⁺	579.149 5	579.150 3	-1.4	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	409, 301, 247	原花青素B ₃ 或其同分异构体	鞣质 ^[17]
		[M-H] ⁻	577.136 2	577.134 6	2.8		425, 407, 289, 125		
3	3.47	[M+H] ⁺	291.088 3	291.086 9	4.8	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	273, 147, 139, 123	儿茶素/表儿茶素	黄酮 ^[18]
4	3.63	[M+H] ⁺	579.293 0	579.150 3	4.5	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	409, 301, 247, 149	原花青素B ₃ 或其同分异构体	鞣质 ^[17]
		[M-H] ⁻	577.134 7	577.134 6	0.2		425, 407, 289, 125		
5	4.01	[M+H] ⁺	867.213 5	867.213 6	-0.1	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	889, 851, 577, 409	原花青素C ₂ 或其同分异构体	鞣质 ^[16]
		[M-H] ⁻	865.197 1	865.198 0	-1.0		695, 577, 407, 300		
6	4.44	[M-H] ⁻	633.074 5	633.072 8	2.7	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₈	300, 275, 169	isostroictinin	鞣质 ^[19]
7	5.03	[M+H] ⁺	563.156 5	563.155 3	2.1	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₁	411, 393, 271	非瑟酮醇-(4β-8)-儿茶素	鞣质 ^[17]
8	5.21	[M-H] ⁻	729.144 5	729.145 6	-1.5	C ₃₇ H ₃₀ O ₁₆	748, 289, 245	epigallocatechin-3-O-p-hydroxybenzoate-(4β→8)-epigallocatechin	鞣质 ^[20]
9	6.39	[M+H] ⁺	563.155 3	563.155 5	0.4	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₁	411, 393, 271	非瑟酮醇-(4α-8)-儿茶素	鞣质 ^[17]
		[M-H] ⁻	561.141 5	561.139 7	3.2		409, 391, 289, 245		
10	6.64	[M-H] ⁻	545.143 2	545.144 8	-2.9	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₀	289, 245, 161	guibourtinido-4β→8-catechin/guibourtinidol-4α→8-catechin/epiguibourtinidol-4α→8-catechin	鞣质 ^[17]
11	6.84	[M+H] ⁺	435.056 0	435.056 4	-1.8	C ₁₉ H ₁₄ O ₁₂	457, 303	4'-O-xlyopyranosyl ellagic acid	鞣质 ^[19]
12	7.38	[M+H] ⁺	301.093 2	301.092 3	3.0	C ₁₃ H ₁₆ O ₈	255, 121	对羟基苯甲酸4-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	酚酸 ^[17]
13	7.60	[M-H] ⁻	545.145 1	545.144 8	0.6	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₀	569, 247	guibourtinido-4β→8-catechin/guibourtinidol-4α→8-catechin/epiguibourtinidol-4α→8-catechin	鞣质 ^[17]
14	7.77	[M-H] ⁻	1 153.260 0	1 153.261 4	-1.2	C ₆₀ H ₅₀ O ₂₄	577, 289, 161, 125	epicatechin-(4β→6)-epicatechin-(4β→8)-epicatechin-(4β→8)-catechin	鞣质 ^[21]
15	8.26	[M+H] ⁺	449.072 8	449.072 0	1.8	C ₂₀ H ₁₆ O ₁₂	317, 301	4-rhamnopyranosyl-ellagic acid	鞣质 ^[22]
		[M-H] ⁻	447.055 5	447.056 4	-2.0		315, 299, 270		
16	8.51	[M-H] ⁻	447.057 0	447.056 4	1.3	C ₂₀ H ₁₆ O ₁₂	315, 299, 270, 242	蛇莓苷A	鞣质 ^[23]
17	8.64	[M-H] ⁻	677.149 8	677.150 6	-1.2	C ₃₄ H ₃₀ O ₁₅	723, 713, 353	3,4,5-三咖啡酸奎宁酸	绿原酸 ^[24]
18	8.96	[M+H] ⁺	815.195 0	815.197 6	-3.2	C ₄₅ H ₃₄ O ₁₅	548, 245, 125	garcinianin A/garcinianin B	鞣质 ^[25]
19	9.30	[M+H] ⁺	905.265 3	905.271 5	-6.9	C ₄₂ H ₄₈ O ₂₂	943, 927, 887, 453	3-甲基-3-丁烯-1-炔-山柰酚-3-O-[(4-乙酰氧基)鼠李糖-2-O-(3-乙酰氧基)葡萄糖]-7-O-葡萄糖苷	黄酮 ^[26]
20	9.68	[M-H] ⁻	711.213 3	711.213 6	-0.4	C ₃₂ H ₄₀ O ₁₈	549, 151	liquiritigenin-7-O-glucoside-4'-O-apiosyl-O-glucoside	黄酮 ^[27]
21	10.06	[M+H] ⁺	505.352 1	505.352 9	-1.6	C ₃₀ H ₄₈ O ₆	527, 487	1β-羟基蔷薇酸	三萜 ^[28]
		[M-H] ⁻	503.337 3	503.337 9	1.2		549, 485, 459, 439		
22	11.31	[M+Na] ⁺	673.391 9	673.392 8	-1.3	C ₃₆ H ₅₈ O ₁₀	1 301, 489, 471	阿江榄仁亭/24-deoxy-sericoside	三萜 ^[29-31]
		[M-H] ⁻	649.395 9	649.395 2	1.1		695, 685, 487, 469		
23	11.45	[M+Na] ⁺	673.393 6	673.392 8	1.2	C ₃₆ H ₅₈ O ₁₀	1 301, 489, 471	阿江榄仁亭/24-deoxy-sericoside	三萜 ^[29-30]
		[M-H] ⁻	649.396 4	649.395 2	1.8		695, 685, 487, 469		
24	11.59	[M+Na] ⁺	671.377 4	671.377 1	0.4	C ₃₆ H ₅₆ O ₁₀	487, 469, 423	quadranside VIII/2α,3β,24-trihydroxyurs-12,18-dien-28-oic acid 28-O-β-D-glucopyranoside	三萜 ^[31]
		[M-H] ⁻	647.379 9	647.379 5	0.6		693, 683, 485		
25	11.96	[M+Na] ⁺	527.336 6	527.334 9	3.2	C ₃₀ H ₄₈ O ₆	487, 469, 451	23-羟基-委陵菜酸	三萜 ^[18]
		[M-H] ⁻	503.337 8	503.337 3	1.0		549, 485, 452		
26	12.73	[M+H] ⁺	489.356 3	489.358 0	-3.5	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	471, 453	蔷薇酸	三萜 ^[28]
		[M-H] ⁻	487.343 4	487.342 3	2.3		469, 407		

评价,结果发现金樱根各部位均具有抗氧化活性,且呈一定量效关系,各部位抗氧化活性由强到弱顺序为乙酸乙酯部位>正丁醇部位>乙醇提取物>水部位>二氯甲烷部位,其中乙酸乙酯部位为金樱根抗氧化活性部位。各部位化学成分的含量测定结果显示,乙酸乙酯部位总酚和缩合鞣质含量最高;UPLC-Q-TOF-MS/MS分析结果显示乙酸乙酯部位中主要含有缩合鞣质类成分。因此,以缩合鞣质为主的酚类成分可能是金樱根抗氧化活性成分。由于鞣质类成分分离纯化有难度,因此,以往金樱根化学成分的研究主要集中在三萜类成分。但近年来随着分离分析技术的飞速发展,越来越多的鞣质类成分被分离鉴定出来,而且药效试验显示其具有抗氧化、抗肿瘤、抗病毒、抑菌等生物活性^[7]。因此,建议后续应加强金樱根中鞣质类成分的分离制备和活性评价研究。

金樱根中三萜类成分主要为五环三萜类,以乌苏烷型化合物最多,因此,总三萜的含量测定中选取熊果酸作为对照品。预试验发现,采用文献[32-33]中方法提取各部位样品,如选择乙醇超声提取或甲醇提取后用水饱和和正丁醇萃取,所得提取物与对照品经相同方法显色后最大吸收波长不一致,只有用三氯甲烷作为溶剂提取各部位样品所得提取液与对照品经相同方法显色后最大吸收才在同一位置,故选用三氯甲烷作为提取溶剂。其原因可能在于选用乙醇或者甲醇作为提取溶剂时,提取出的非三萜类成分很多,这些成分干扰了三萜类成分的显色,因此,最大吸收波长与对照品有所偏差。

总鞣质的含量测定方法有皮粉法、干酪素法和络合量法^[34],其中最常用的是磷钼钨酸-干酪素法,测定原理是在碱性溶液中,酚类化合物可以将磷钼钨酸试剂中的钨钼酸还原,生成蓝色的化合物,颜色的深浅与酚含量呈正相关,根据此原理先测出总酚含量后,再采用干酪素吸附鞣质,测定不被干酪素吸附的多酚含量,通过两者差值计算出鞣质含量。而干酪素作为鞣质吸附剂只是选择性地吸附鞣质^[35],并不能吸附所有的鞣质。因此,该法虽然称之为总鞣质测定,但实际测定的应是是没食子酸结构类似的鞣质类成分,并不包括所有的鞣质,测定结果可能偏低。在实际操作中,配制29%碳酸钠溶液时,碳酸钠固体不易溶解,可将其放在50℃水浴中加热溶解。在样品显色后放置30 min待测定时,需要将其放在30℃水浴中保温,避免待测溶液中晶体析出,影响测定结果。另外,测定时应同时

进行干酪素吸附空白试验,可提高测定结果的准确度。在进行没食子酸加样回收试验时发现测定结果偏低,有文献报道没食子酸不能完全被干酪素吸附^[36],因此无法考察总鞣质含量测定方法的准确度。

至今尚无金樱根中缩合鞣质含量测定的文献报道。因此,本文采用文献[15]中的香草醛-硫酸法测定了金樱根中缩合鞣质的含量,结果显示缩合鞣质含量高于总鞣质的含量,原因可能有以下两点:①缩合鞣质含量测定采用儿茶素作为对照品,而缩合鞣质往往是黄烷醇类的二聚体、三聚体甚至是高聚体^[37-39],因此含量偏高;②缩合鞣质的测定原理是在酸性条件下,黄烷醇类多酚中儿茶素A环上的羟基可与香草醛发生缩合反应^[40],而金樱根中含有的黄酮类化合物及含有酚羟基的其他酚酸类物质均可能发生此反应从而导致结果偏高。

【利益冲突】 本文不存在任何利益冲突。

【参考文献】

- [1] 郑荣梁,黄中洋. 自由基生物学[M]. 北京:高等教育出版社,2007.
- [2] 李兴太,纪莹. 线粒体氧化应激与天然抗氧化剂研究进展[J]. 食品科学,2015,36(7):268-277.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:四部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:232,555.
- [4] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区瑶药材质量标准:一卷[M]. 南宁:广西科学技术出版社,2014:132.
- [5] 樊小瑞,李娆娆,林丽美,等. 金樱子药材研究进展[J]. 中国药学杂志,2018,53(16):1333-1339.
- [6] 龙小琴,戴应和. 金樱子根化学成分与药理作用研究进展[J]. 亚太传统医药,2017,13(18):68-70.
- [7] 刘畅,金哲雄. 鞣质的药理活性研究进展[J]. 黑龙江医药,2015,28(1):14-17.
- [8] 谭世强,谢敬宇,郭帅,等. 三萜类物质的生理活性研究概况[J]. 中国农学通报,2012,28(36):23-27.
- [9] 林芳花,彭永宏,沈翠霞,等. 金樱子鞣质含量测定及其抗氧化提高生育力的实验研究[J]. 中国野生植物资源,2012,31(4):15-17.
- [10] 袁琪,文红梅,张前程,等. 苓桂术甘汤中多糖结构组成及其抗氧化活性考察[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(16):63-70.
- [11] 张海丰,臧皓,沈鹏,等. 草苈蓉正丁醇萃取物的抗氧化活性及物质基础初步研究[J]. 中草药,2018,49(2):383-384.
- [12] 陆国寿,蒋珍藕,黄周锋,等. 两面针果壳的化学成分分析及活性[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25

- (11):154-160.
- [13] 郝丽娟,王珊,安月伟,等. 刺芎龙葵不同萃取物抗氧化活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(10):113-116.
- [14] 陈钰妍,李斌,李顺祥,等. 金樱根总皂苷提取和纯化工艺研究[J]. 中成药, 2013, 35(5):1095-1098.
- [15] 林惠贞,刘浩文,韦玮,等. 鸡血藤药材及其不同部位缩合鞣质的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(24):70-73.
- [16] TANAKA T, NONAKA G I, NISHIOKA I. 7-O-Galloyl-(+)-catechin and 3-O-galloylprocyanidin B-3 from *Sanguisorba officinalis* [J]. Phytochemistry, 1983, 22(11):2575-2578.
- [17] 李石平. 金樱子根的化学成分研究[D]. 合肥:安徽大学, 2013.
- [18] 黄小燕,马国需,陈路,等. 小果蔷薇根的化学成分研究[J]. 中草药, 2018, 49(13):2978-2983.
- [19] YAN G, LI S, HU J, et al. Phenolic constituents from the roots of *Rosa laevigata* (Rosaceae) [J]. Biochem Syst Ecol, 2014, 52:23-26.
- [20] QA'DAN F, NAHRSTEDT A, SCHMIDT M. Isolation of two new bioactive proanthocyanidins from *Cistus salvifolius* herb extract [J]. Pharmazie, 2011, 66(6):454-457.
- [21] NAKASHIMA S, ODA C, MASUDA S, et al. Isolation and structure elucidation of tetrameric procyanidins from unripe apples (*Malus pumila* cv. Fuji) by NMR spectroscopy [J]. Phytochemistry, 2012, 83:144-152.
- [22] LI S, YE T, LIANG L, et al. Anti-cancer activity of an ethyl-acetate extract of the fruits of *Terminalia bellerica* (Gaertn.) Roxb. through an apoptotic signaling pathway *in vitro* [J]. J Tradit Chin Med Sci, 2018, 5(4):370-379.
- [23] 叶亮,杨峻山. 蛇莓中鞣花酸类及三萜类成分研究[J]. 药学学报, 1996, 31(11):844-848.
- [24] HAN B S, XIN Z Q, MA S S, et al. Comprehensive characterization and identification of antioxidants in *Folium Artemisiae Argyi* using high-resolution tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B, 2017, 1063:84-92.
- [25] JIANG G Q, DU F G, FANG G Z. Two new proanthocyanidins from the leaves of *Garcinia multiflora* [J]. Nat Prod Res, 2014, 28(7):449-453.
- [26] 李明雨,孙娥,徐凤娟,等. 基于UPLC-Q/TOF-MS分析淫羊藿炮制前后黄酮组分的变化规律[J]. 中草药, 2020, 51(11):2900-2907.
- [27] YE M, LIU S H, JIANG Z, et al. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of PHY906, a Chinese medicine formulation for cancer therapy [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2007, 21(22):3593-3607.
- [28] 代华年,马国需,邹节明,等. 中药金樱子根中三萜类化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(12):2267-2272.
- [29] 樊小瑞. 金樱根化学成分及质量评价研究[D]. 北京:中国中医科学院, 2018.
- [30] 李宇璐,代华年,马国需,等. 粉团蔷薇根中1个新三萜苷[J]. 中草药, 2017, 48(20):4208-4214.
- [31] 代华年. 金樱子根的活性成分研究[D]. 南宁:广西中医药大学, 2016.
- [32] 易运红,吴功庆,王莲婧,等. 金樱根总皂苷的超声提取工艺研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(5):270-272.
- [33] 李斌,陈钰妍,李顺祥,等. 金樱根3种不同来源和不同药用部位中总皂苷的含量测定[C]//中国要学会. 2011年中国药学会大会暨第11届中国药师周论文集:2011年卷. 烟台:出版社不详, 2011:1-4.
- [34] 朱玥,金哲雄. 鞣质类化合物的研究进展[J]. 黑龙江医药, 2015, 28(1):23-25.
- [35] 张笑颖,帕丽达·阿不力孜,朱焱,等. 干酪素法测定新疆不同产地石榴皮中鞣质的含量[J]. 食品科学, 2009, 30(8):260-262.
- [36] 王添敏,孙晓丽. 胡桃楸的根、茎枝、叶和果皮中总鞣质的含量测定[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(1):34-35.
- [37] WALLACE T C, GIUSTI M M. Evaluation of parameters that affect the 4-dimethylaminocinnamaldehyde assay for flavanols and proanthocyanidins [J]. J Food Sci, 2010, 75(7):C619-C625.
- [38] FERREIRA E C, NOGUEIRA A R. Vanillin-condensed tannin study using flow injection spectrophotometry [J]. Talanta, 2000, 51(1):1-6.
- [39] LALIČIĆ -PETRONIJEVIĆ J, KOMES D, GORJANOVIĆ S, et al. Content of total phenolics, flavan-3-ols and proanthocyanidins, oxidative stability and antioxidant capacity of chocolate during storage [J]. Food Technol Biotechnol, 2016, 54(1):13-20.
- [40] 王建平,杨云,张兰欣,等. 香草醛硫酸法测定榆黄喷雾剂中缩合鞣质含量[J]. 中国药业, 2014, 23(20):61-62.

[责任编辑 刘德文]