

# 二氢杨梅素的分离纯化及其细胞内抗氧化和体外结合胆酸盐能力的研究

马玲, 杨继国, 廖文镇, 尹雪茹, 邱晓斌, 谭凯元, 宁正祥  
(华南理工大学轻工与食品学院, 广州 510640)

**摘要:** 本研究通过水提重结晶法从藤茶中分离纯化得到二氢杨梅素样品, 利用电子扫描电镜观察其结晶形态, 并采用细胞内抗氧化能力评价法 (cellular antioxidant activity assay, CAA) 对二氢杨梅素的细胞内抗氧化能力 (CAA) 进行研究, 同时在体外模拟人体胃肠消化环境, 测定了二氢杨梅素体外结合胆酸盐的能力。结果表明: 利用多次重结晶法对二氢杨梅素进行分离纯化, 可得到高纯度的二氢杨梅素样品, 得率为 43%。细胞内抗氧化试验中二氢杨梅素的  $EC_{50}$  值为  $6.17 \pm 0.08 \mu\text{mol/L}$ , CAA 值为  $74.90 \pm 0.90 \mu\text{mol QE}/100 \mu\text{mol}$ , 表明其具有很强的细胞内抗氧化能力。二氢杨梅素对胆酸钠 (SC), 甘氨酸胆酸钠 (SGC), 牛磺胆酸钠 (STC) 都有较强的结合作用, 结合量分别为  $1.24 \pm 0.02$ ,  $0.97 \pm 0.06$ ,  $1.06 \pm 0.002 \mu\text{mol/mL}$ , 由结果可知, 二氢杨梅素对游离胆酸钠的结合能力最强。

**关键词:** 二氢杨梅素; 重结晶; 细胞内抗氧化; 体外结合胆酸盐

文章篇号: 1673-9078(2015)5-157-162

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.5.025

## Separation, Purification, Cellular Antioxidant Activity, and *In Vitro* Bile Salt-Binding Ability of Dihydromyricetin

MA Ling, YANG Ji-guo, LIAO Wen-zhen, YIN Xue-ru, QIU Xiao-bin, TAN Kai-yuan, NING Zheng-xiang  
(College of Light Industry and Food sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** Dihydromyricetin (DMY) was separated and purified from *Ampelopsis* using water extraction and recrystallization. The crystal morphology was analyzed by scanning electron microscopy and the cellular antioxidant activity (CAA) was determined by CAA assay. Meanwhile, *in vitro* bile salt-binding ability of DMY was determined by *in vitro* simulation of the human gastrointestinal environment. The results showed that separation and purification techniques with multiple recrystallizations produced high-purity DMY, and the yield was 43%. An  $EC_{50}$  of  $6.17 \pm 0.08 \mu\text{mol/L}$  and CAA of  $74.90 \pm 0.90 \mu\text{mol QE}/100 \mu\text{mol}$  were obtained, which indicated that DMY exhibited strong CAA. DMY also exhibited relatively strong binding to sodium cholate, sodium glycocholate, and sodium taurocholate, with binding capacity of  $1.24 \pm 0.02$ ,  $0.97 \pm 0.06$ , and  $1.06 \pm 0.002 \mu\text{mol/m}^1$ , respectively, with strongest binding capacity for free sodium cholate.

**Key words:** dihydromyricetin; recrystallization; cellular antioxidant activity; *in vitro* bile salt-binding

藤茶是一种葡萄科蛇葡萄属植物, 主要生长在中国长江以南山区各地, 具有调节免疫、降血压、降血脂、保肝护肝、消炎、抗氧化、抗肿瘤等功效<sup>[1]</sup>。研究表明, 藤茶中的主要活性成分为二氢杨梅素 (3, 5, 7, 3', 4', 5'-六羟基-2, 3-双氢黄酮, DMY)<sup>[2]</sup>, 二氢杨梅素是一种具有特殊结构的黄酮类化合物, 它的化学结构如图 1 所示, 在其 A 环的 5、7 位, B 环的 3'、4'、5' 位, C 环的 3 位共有 6 个羟基取代基团。

收稿日期: 2014-06-12

基金项目: 十二五科技支撑计划子课题 (2012BAD33B11); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目 (2014ZZ0063)

作者简介: 马玲 (1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品科学

通讯作者: 杨继国 (1977-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向为食品生物学

近年来, 研究者们对二氢杨梅素的研究主要集中在其显著的抗氧化活性上。目前对黄酮类化合物的研究主要采用体外化学方法, 如 DPPH 自由基清除法、氧自由基吸收能力 (ORAC) 法等<sup>[3]</sup>。这些方法因具有成本低、省时高效、操作简单、灵敏度高等优点而广泛应用于各种活性物质抗氧化能力的评价。然而, 它们生物相关性差, 不能够很好的反应物质在体内抗氧化反应的过程<sup>[4]</sup>。同时, 很多在体外评价具有很强抗氧化的物质, 在体内可能具有很强的细胞毒性, 从而限制了其在临床上的应用。细胞内抗氧化能力评价法<sup>[5]</sup> (cellular antioxidant activity assay, CAA) 是一种基于细胞水平对活性物质的抗氧化能力进行筛选的新方法。CAA 法模拟了细胞内的环境, 考虑到物质在生理条件下的生物利用度、稳定性、组织滞留及物质间相

相互作用等影响,因而能比体外化学法更准确的反映物质的抗氧化能力<sup>[6]</sup>。

高脂血症是指血脂(胆固醇、甘油三酯和磷脂)水平过高,可直接引起动脉粥样硬化、冠心病等危害人体健康的疾病。其中,胆固醇主要通过合成胆汁酸(盐)而被分解<sup>[7]</sup>,进入肠道内的各种胆酸盐约有95%被重吸收回肝脏再次利用。若使胆酸盐排出体外,阻断胆酸盐的肠肝循环,促使肝脏中胆固醇不断转化为胆酸盐,即可降低体内胆固醇含量,达到降血脂的目的。利用这一原理,实验选择具有代表性的胆酸钠(SC)、甘氨酸胆酸钠(SGC)和牛磺胆酸钠(STC)作为结合对象评价二氢杨梅素的降血脂作用。

本文在细胞层面上对二氢杨梅素的功能进行了评价分析,并通过体外实验,以降血脂药物的主要成分考来烯胺作为对照,研究了二氢杨梅素对胆酸钠(SC)、甘氨酸胆酸钠(SGC)和牛磺胆酸钠(STC)的结合作用。

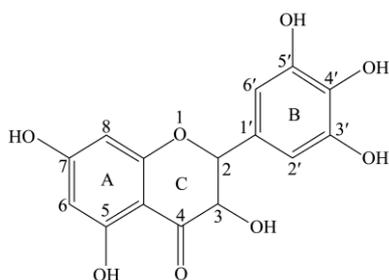


图1 二氢杨梅素的化学结构

Fig.1 Chemical structure of DMY

## 1 材料与方法

### 1.1 原料和试剂

藤茶样品由华南理工大学食品生物化学实验室提供;人肝癌 HepG2 细胞,中山大学实验动物中心细胞室;DMEM 培养基、PBS、0.25%胰酶-EDTA 消化液、胎牛血清、2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)、ABAP(2,2'-偶氮二异丁基脒二盐酸盐)、hydrocortisone、青霉素、链霉素,牛磺胆酸钠(STC)、考来烯胺(消胆胺),美国 Sigma 公司;WME 培养基、Hank 平衡盐溶液(HBSS),美国 Gibco 生物科技公司;胆酸钠(SC)、甘氨酸胆酸钠(SGC),日本 TCI 公司;胰酶(蛋白酶 4080 U/g、脂肪酶 33600 U/g、淀粉酶 91000 U/g),四川贝奥生物制药有限公司;胃蛋白酶(1/15000),广州市齐云生物技术有限公司;甲醇、乙腈等其它化学试剂均为国产分析纯。

### 1.2 主要仪器

电子扫描电镜 Hitachi TM3000, 日本 Hitachi 公司; CO<sub>2</sub> 培养箱, Multiskan MK3 酶标仪, 美国 Thermo Fisher 公司; 18-N 冷冻干燥机, 广州德菲科学仪器有限公司; Agilent 1260, 高效液相色谱系统, 美国 Agilent 公司; UV-1800 紫外-可见分光光度计, 日本岛津公司。

## 1.3 试验方法

### 1.3.1 二氢杨梅素的制备

参照高建华<sup>[8]</sup>的二氢杨梅素纯品制备方法,具体操作如下:称取藤茶 30 g,捣碎成粉,置于烧杯中,加入 600 mL 水充分浸泡后,加热使其煮沸 60 min,200 目纱布过滤,将滤液烘干即得粗藤茶黄酮化合物。称取粗黄酮 1.5 g 置于烧杯中,加入 130 mL 水和适量活性炭,加热搅拌煮沸 5~10 min 后趁热过滤。滤液静置 1~2 h 冷却后,于 4 °C 的冰箱静置过夜使其析出结晶,次日过滤,弃滤液、留滤渣,真空干燥。重复上述“热水提,冷水沉”步骤,5 次重结晶纯化得黄白色立方体结晶。取结晶样品于电子扫描电镜下摄像,观察其结晶形态。

### 1.3.2 二氢杨梅素提取物 HPLC 法<sup>[9]</sup>的初步扫描

分别称取适量二氢杨梅素标准品及样品结晶溶于甲醇中,配置成浓度为 0.5 mg/mL 的溶液,用 0.45 μm 滤膜过滤后进行 HPLC 测定。流动相为乙腈-水-醋酸(体积比为 1:9:0.1),等梯度洗脱;色谱柱为 Symmetry C<sub>18</sub> 反相色谱柱;流速为 1 mL/min,进样体积为 10 μL,柱温为 25 °C,检测波长为 293 nm。

### 1.3.3 细胞抗氧化(CAA)法测定抗氧化能力

参照 Liu 等<sup>[5]</sup>的方法,并加以适当修改。将 HepG2 细胞接种于 96 孔板,每孔加入 100 μL CM 培养液(10%胎牛血清+1%青霉素-链霉素+89% DMEM),使细胞密度达到 6×10<sup>4</sup> 个,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h 后除去培养液,用 PBS 清洗一次。然后加入 100 μL 样品处理液(用含 25 μmol/L 的 DCFH-DA 的抗氧化培养基(2 mL 谷氨酸+10 mM HEPES+DMEM)制备),空白孔和对照孔分别加入含 DCFH-DA 的抗氧化培养基,继续培养 1 h 后取出 96 孔板,用 100 μL PBS 清洗后,空白孔加入 100 μL 氧化培养基(10 mM HEPES+HBSS),其余孔加入 100 μL HBSS(含 600 μmol/L AAPH),各试验组均设置三个复孔。采用荧光酶标仪于 37 °C 下对 96 孔板进行扫描,测定条件为激发波长 538 nm,发射波长 485 nm,每 5 min 测定一次,持续 1 h。

扣去空白和初始荧光值后,每个样品浓度对应时间-荧光值曲线下的面积即为 CAA 值,计算公式为:

$$CAA(\text{unit}) = 100 - \left( \int SA / \int CA \right) \times 100$$

式中,  $\int SA$  表示不同浓度二氢杨梅素时间-荧光值曲线下的积分面积,  $\int CA$  表示时间-对照荧光值曲线下的积分面积。

二氢杨梅素的 CAA 值以每 100 mg 干物质相当于槲皮素 (QE) 的微摩尔当量表示, 由半数有效浓度 ( $EC_{50}$ ) 值转化成。二氢杨梅素的半数有效浓度 ( $EC_{50}$ ) 根据  $\log(f_a/f_u)$  对  $\log(\text{dose})$  的中效原理来计算, 其中  $f_a$  为样品作用效应 (CAA unit),  $f_u$  为 (1- CAA unit)。

### 1.3.4 二氢杨梅素对胆酸盐结合能力的测定

分别取 1 mL 二氢杨梅素, 置于 10 mL 具塞试管中, 加入 1 mL 人工胃液<sup>[10]</sup> (取 16.4 mL 稀盐酸 (234 mL 浓盐酸液, 加水稀释至 1 L), 加 800 mL 蒸馏水和 10 g 胃蛋白酶, 用水定容 1000 mL。), 在 37 °C 振荡消化 1 h。将 0.1 mol/L 氢氧化钠调节 pH 值为 6.8 后加入 4 mL 人工肠液 (取磷酸二氢钾 6.8 g, 加 500 mL 蒸馏水溶解, 0.1 mol/mL 氢氧化钠调节 pH 至 6.8, 加入 10 g 胰酶后, 加水稀释至 1000 mL。), 37 °C 消化 1 h。向每个样品中加入 4 mL 胆酸盐溶液 (牛磺胆酸钠、甘氨酸胆酸钠、胆酸钠浓度均为 1 mmol/L, 用 pH6.3 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液配制), 在 37 °C 下恒温振荡 1 h, 4000 r/min 离心 10 min 后, 测定上清液中的胆酸盐含量<sup>[11]</sup>。

胆酸盐含量的测定: 分别取分析样液 2.5 mL 于具塞试管中, 加入 7.5 mL 质量分数为 60% 的硫酸, 在 70 °C 水浴 20 min 后取出, 冰浴 5 min, 在波长 387 nm 处测定吸光度。根据标准曲线求得样液中胆酸盐的浓度<sup>[12]</sup>。

### 1.3.5 统计分析

试验 3 次重复, 结果以平均值  $\pm$  标准差 (mean  $\pm$  SD) 表示,  $EC_{50}$  计算采用 CalcuSyn1 2.1 计算, 作图采用 Origin8.6, 回归分析和 F 检验采用 SPSS 19.0 统计分析软件, 单因素方差分析采用 One-Way ANOVA, 显著性分析采用 LSD 检验, 显著性水平为  $P < 0.05$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 二氢杨梅素结晶形态观察

二氢杨梅素在沸水中的溶解度为 1.6 g/100 g, 在冷水中为 0.05 g/100 g, 两者相差约 32 倍。根据二氢杨梅素这一特点, 本试验利用热水溶解粗黄酮并使其达到饱和, 然后冷却使二氢杨梅素因溶解度降低过饱和而从溶液中析出结晶, 5 次重结晶, 可得到较纯的黄酮, 且得率较高。本研究采用水提重结晶的方法有效的去除了粗水提液的杂质, 从藤茶叶中制得高纯度

的二氢杨梅素, 5 次重结晶得率为 43%, 得到了黄白色立方形的二氢杨梅素结晶 (如图 2 所示)。另外, 对比其他提取黄酮的方法, 采用水加热重结晶提纯法避免了使用有机试剂如丙酮等, 更安全、经济, 同时对仪器的要求降低, 操作更加简便。

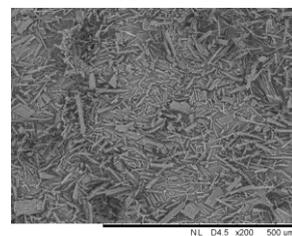


图 2 二氢杨梅素结晶形态

Fig.2 Crystal morphology of DMY

### 2.2 二氢杨梅素的 HPLC 分析结果

本文采用 1.3.1 的方法制得二氢杨梅素样品, 对其进行 HPLC 分析, 并与二氢杨梅素标准品进行比较, 结果如图 3 所示。洗脱过程中, 在保留时间为 9.48 min 处都检测到单一洗脱峰, 说明所制备的黄酮为二氢杨梅素, 且纯度很高。

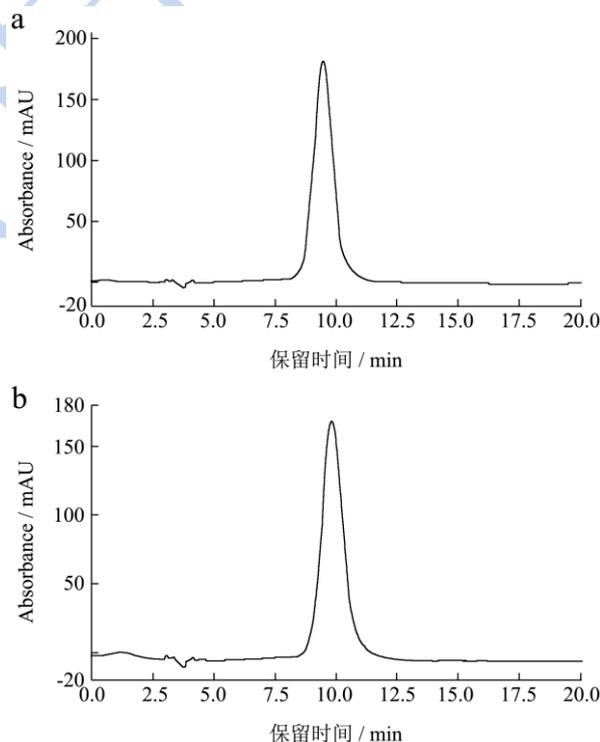


图 3 二氢杨梅素标准品 (a) 及样品 (b) 的 HPLC 色谱图  
Fig.3 HPLC chromatograms of DMY standard (a) and sample (b)

### 2.3 二氢杨梅素的细胞内抗氧化能力 (CAA)

本文采用 1.3.3 所述方法对二氢杨梅素的细胞内抗氧化能力进行评价, 其  $EC_{50}$  值及细胞内抗氧化能力 CAA 值见表 1。本实验中槲皮素  $EC_{50}$  值为 4.63

μmol/L, CAA 值为 100 μmol QE/100 μmol; 二氢杨梅素的 EC<sub>50</sub> 值从 6.09 到 6.29 μmol/L, 均值为 6.17 μmol/L; CAA 值从 73.60 到 75.93 μmol QE/100 μmol, 均值为 74.90 μmol QE/100 μmol。刘等<sup>[5]</sup>用 CAA 法测得黄酮类物质山奈酚的 CAA 值为 81.10±2.70 μmol of QE/100 μmol, 杨梅素的为 33.10±1.00 μmol QE/100 μmol, 其中山奈酚的细胞内抗氧化能力仅次于标准品槲皮素, 槲皮素广泛存在于水果等植物体内, 具有比其他物质都高的细胞内抗氧化能力, 因而成为细胞内抗氧化评价法的标准品<sup>[5]</sup>, 可以看出二氢杨梅素也具有较弱的细胞内抗氧化能力。

表 1 几种黄酮的 EC<sub>50</sub> 值及 CAA 值

Table 1 EC <sub>50</sub> and CAA values of several flavonoids		
	半数有效浓度 EC <sub>50</sub> /(μmol/L)	CAA Cellular antioxidant activity values/(μmol QE /100 μmol samples)
槲皮素	4.63±0.27	100.00±5.65
二氢杨梅素	6.17±0.08	74.90±0.90
山奈酚 <sup>[5]*</sup>	6.31±0.21	81.10±2.70
杨梅素 <sup>[5]*</sup>	15.40±0.50	33.10±1.00

注: \*数据引自文献 5。

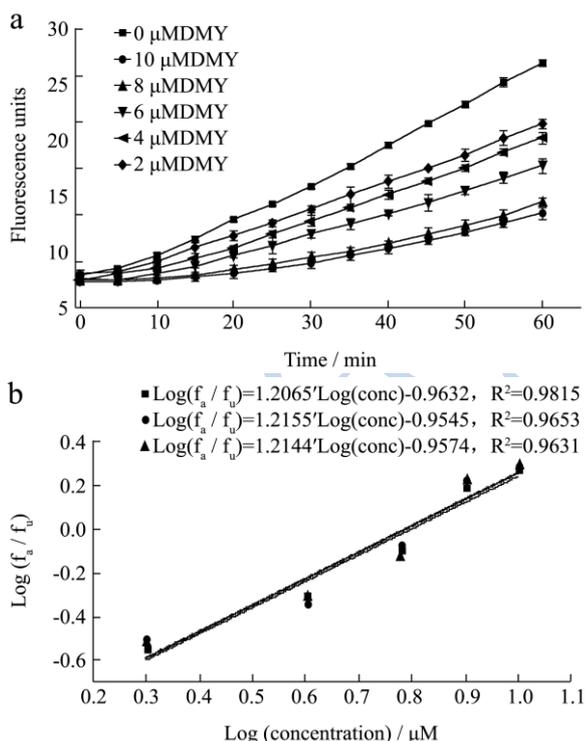


图 4 HepG2 细胞中 AAPH 产生的过氧化氢自由基氧化 DCFH 的动力学曲线 (a) 和中效原理图 (b)

Fig.4 Kinetic curves (A) and median effect plots (B) showing the inhibitory effect of DMY on peroxyl radical-induced DCFH oxidation in HepG2 cells

CAA 法原理<sup>[13]</sup>为: 用抗氧化活性物质及指示剂 2', 7'-二氯荧光黄双乙酸盐 (DCFH-DA) 共同处理细

胞, 抗氧化活性物质和 DCFH-DA 可扩散到细胞内, 其中 DCFH-DA 被细胞内的酯酶水解为非荧光的还原型二氯荧光素(DCFH), 然后向体系内加入 2, 2'-偶氮二异丁基脒二盐酸盐(ABAP), ABAP 可产生过氧化氢引发自由基链式反应形成活性氧(ROS), ROS 极易将 DCFH 氧化为荧光的氧化型二氯荧光素(DCF), DCF 荧光强度与细胞内活性氧水平呈正比, 可通过荧光分光光度法检测。而抗氧化活性物质可与 ROS 结合, 抑制 DCFH 氧化为 DCF, 使细胞的荧光性减弱。因此可以通过比较实验组与空白组细胞荧光性减弱程度来评价物质的抗氧化活性。HepG2 细胞中 ABAP 产生的过氧化氢自由基氧化 DCFH 的动力学曲线见图 4a。未加入二氢杨梅素时, DCFH 很快被氧化成 DCF, 后者含量(荧光值)随时间快速增加。二氢杨梅素的加入抑制了 DCF 的生成, 在试验中表现为荧光值的降低。二氢杨梅素加入后, 自由基对 DCFH 的氧化作用被抑制, DCF 含量随时间增长的速度下降, 并且随着二氢杨梅素浓度的增大抑制作用也越明显。

研究表明, 黄酮类抗氧化剂的活性与其结构中酚羟基的数量及位置有关<sup>[14-16]</sup>, 酚羟基作为活泼的氢供体, 可提供氢质子直接清除自由基, 母核上酚羟基数越多, 提供氢质子的能力越强, 清除自由基能力也越强<sup>[14]</sup>。张红雨<sup>[17]</sup>对若干黄酮类抗氧化剂进行量子化学计算结果表明, 黄酮类化合物邻二酚羟基清除自由基的活性强于间二酚羟基, 因为前者半醌式自由基可与邻位酚羟基形成分子内氢键, 结构更稳定, 同时前者半醌式自由基通过共振形成邻苯醌, 使其未成对电子密度更多的分布在邻位氧上, 内能降低; 刘等<sup>[5]</sup>对黄酮类化合物的研究发现 C 环 4 位上具有碳氧双键的黄酮如槲皮素、山奈酚、杨梅素等抗氧化活性都较高; 同时 Xin 等<sup>[18]</sup>研究表明二氢杨梅素 C 环 3 位上的酚羟基在清除自由基方面发挥积极效应; 而位于 A 环 7 位上的酚羟基不利于自由基的清除<sup>[19]</sup>; 林淑英<sup>[9]</sup>的研究显示, 二氢杨梅素抗氧化活性中心是 B 环中的邻三羟基结构, 它们通过酚羟基与自由基反应生成较稳定的半醌式结构, 从而终止自由基链式反应, 起到抗氧化的作用, 这与 Xin<sup>[18]</sup>的研究结果一致。因此, 二氢杨梅素特殊的 6 个羟基取代基结构使其表现出较强的细胞内抗氧化活性。然而, 杨梅素与二氢杨梅素在酚羟基的数量与位置方面完全一致, 其细胞内抗氧化活性却相差甚大, CAA 值分别 33.1 和 74.9。这是因为 CAA 法用于评价物质在细胞内的抗氧化活性, 只有能穿透细胞膜进入细胞内的物质才适用此法, 这也体现了 CAA 法在生物相关性方面的优越性。37 °C 下易溶于水的二氢杨梅素在水中的溶解度远大于微溶于水的杨

梅素, 穿透细胞的能力更强, 因此显示出较强的细胞内抗氧化能力。其他造成上述结果可能的结构原因还有待进一步研究。

#### 2.4 二氢杨梅素对胆酸钠的结合能力

本文如上 1.3.4 所述将二氢杨梅素配制成 1.0 mg/mL 的溶液, 分别对胆酸钠、甘氨酸胆酸钠、牛磺胆酸钠进行结合, 结果见表 2。胆酸盐是一类具有甾核结构的两性大分子, 在人体肝脏中由胆固醇衍生而来, 是胆汁的主要成分, 对脂溶性维生素的代谢及脂肪和

胆固醇的消化吸收起重要作用。本文选择具有代表性的胆酸钠、甘氨酸胆酸钠和牛磺胆酸钠作为结合对象, 其中牛磺胆酸钠和甘氨酸胆酸钠属于结合型胆酸钠。由表 2 可知, 二氢杨梅素对胆酸钠、甘氨酸胆酸钠、牛磺胆酸钠均具有较强的结合作用, 结合量分别为  $1.24 \pm 0.02$ 、 $0.97 \pm 0.06$ 、 $1.06 \pm 0.002$   $\mu\text{mol/mL}$ 。其中, 二氢杨梅素对游离胆酸钠的结合能力最强, 相当于 98.52% 的考来烯胺结合率, 远远高于结合型胆酸钠。由此可知二氢杨梅素具有良好的降血脂能力, 可用于高脂血症的预防与治疗。

表 2 二氢杨梅素对胆酸盐的吸附能力

Table 2 Bile salt adsorption ability of DMY

样品	结合量/ $(\mu\text{mol/mL})$					
	胆酸钠	相对于考来烯胺的结合率/%	甘氨酸胆酸钠	相对于考来烯胺的结合率/%	牛磺胆酸钠	相对于考来烯胺的结合率/%
二氢杨梅素	$1.24 \pm 0.02$	98.52	$0.97 \pm 0.06$	76.46	$1.06 \pm 0.002$	83.47

本研究利用 CAA 法在细胞层面上对二氢杨梅素的抗氧化活性进行分析, 为确定二氢杨梅素的抗氧化和抗癌作用机理提供了理论基础。同时, 通过测定二氢杨梅素体外结合胆酸盐的能力, 证实了其具有良好的降血脂功能, 有应用于治疗高脂血症的前景。

### 3 结论

“热水提, 冷水沉”的多次重结晶法可有效去除藤茶粗黄酮中的杂质, 制得高纯度的二氢杨梅素, 得率为 43%。细胞内抗氧化评价法表明二氢杨梅素具有较强的细胞内抗氧化能力, 其 CAA 值为  $74.9 \pm 0.899$  QE/100  $\mu\text{mol}$ 。另外, 实验以胆酸钠、甘氨酸胆酸钠和牛磺胆酸钠作为结合对象, 证实了二氢杨梅素结合胆酸盐的能力, 表明其具有一定降血脂功效。

### 参考文献

- [1] 覃骊兰. 藤茶的化学成分及药理作用研究进展[J]. 上海中医药杂志, 2008, 42(6): 94-96  
QIN Li-lan. Research advance in chemical components and pharmacological actions of rattan tea [J]. SH J TCM, 2008, 42(6): 94-96
- [2] Du Q, Cai W, Xia M, et al. Purification of (+)-dihydromyricetin from leaves extract of *Ampelopsis grossedentata* using high-speed countercurrent chromatograph with scale-up triple columns [J]. J. Chromatograph A, 2002, 973: 217-220
- [3] 刘微微, 任虹, 曹雪丽, 等. 天然产物抗氧化活性体外评价方法研究进展[J]. 食品科学, 2010, 31(17): 415-419  
LIU Wei-wei, REN Hong., CAO Xue-li, et al. Progress in

- evaluation techniques for antioxidant activity of natural products in vitro [J]. Journal of Food Science, 2010, 31(17): 415-419
- [4] Liu R H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action [J]. J. Nutr., 2004, 134(12): 3479S-3485S
- [5] Wolfe K L, Liu R H. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(22): 8896-8907
- [6] Song W, Derito C M, Liu M K, et al. Cellular antioxidant activity of common vegetables [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(11): 6621-6629
- [7] Marlett J A. Dietary fiber and cardiovascular disease [M]. In: Handbook of dietary fiber. Edited by Cho SS, Dreher ML. New York: Marcel Dekker, Inc, 2001
- [8] GAO Jian-hua, LUO Yao-jing, NING Zheng-xiang. Study on purification and crystal shape of dihydromyricetin in *ampelopsis grossedentata* [J]. Nat. Prod. Res. Dev., 2006, 18: 81-84
- [9] 林淑英. 显齿蛇葡萄中二氢杨梅素的提取纯化及抗氧化活性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2004: 6  
LIN Shu-ying. Study on extraction, purification and antioxidant activity of dihydromyricetin in *ampelopsis grossedentata* [D]. GuangZhou: South China University of Technology, 2004
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(第二部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 177-178  
National pharmacopoeia committee. The pharmacopoeia of

- the People's Republic of China (part ii) [M]. Beijing: China medical science and technology press,2010: 177-178
- [11] Kahlon T S, Smith G E. *In vitro* binding of bile acids by blueberries (*Vaccinium* spp.), plums (*Prunus* spp.), prunes (*Prunus* spp.), strawberries (*Fragaria Xananassa*), cherries (*Malpighia punicifolia*), cranberries (*Vaccinium macrocarpon*) and apples (*Malus sylvestris*) [J]. Food Chemistry, 2007, 100: 1182-1187
- [12] 辛勋,陆红云.紫外分光光度法测定速效伤风胶囊中的胆酸含量[J].中国药业,2000,9(1):36-37  
XIN xun, LU Hong-yun. Uv spectrophotometry for determination of cholic acid content in instant cold capsule [J]. China pharmaceuticals, 2000, 9(1): 36-37
- [13] 曾维才,石碧.天然产物抗氧化活性的常见评价方法[J].化工进展,2013,32(6):1205-1213  
ZENG Wei-cai, SHI Bi. Common methods of antioxidant activity evaluation for natural products: A review [J]. Chemical Industry And Engineering Progresses, 2013, 32(6): 1205-1213
- [14] Bell A. In: Conn, E.E., ed. The biochemistry of plants [M]. New York: Academic Press, 1981, 7: 1-19
- [15] Chen Z Y, Chen P T, Ho K Y, et al. Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups [J]. Chem. Phys. Lipids, 1996, 79(2): 157-163
- [16] Rice-Evans C, Mitleer N J, Bolwell G P, et al. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids Free radical [J]. Research, 1995, 22: 375-383
- [17] 张红雨.黄酮类抗氧化剂结构-活性关系的理论解释[J].中国科学(B 辑),1999,29(1):91-96  
ZHANG Hong-yu. Interpretation of the structure-activity relationship of flavonoid antioxidants [J]. Science in China (Series B),1999, 29(1): 91-96
- [18] Xin M L, Ma Y J, Xu K,et al. Structure-activity relationship for dihydromyricetin as a new natural antioxidant in polymer [J]. J. Appl. Polym. Sci., 2012, 128: 1436-1442
- [19] Magnani L, Gaydou E M., Hubaud J C. Spectrophotometric measurement of antioxidant properties of flavones and flavonols against superoxide anion [J]. Anal. Chim. Acta., 2000, 411: 209-216