

7-脱氧水仙环素的分离纯化及其体外抗肿瘤活性研究

万林, 许喜林, 杨林江, 姜建国

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 本研究对石蒜属植物石蒜的活性部位正丁醇部位进行分级纯化得到一个化合物, 对该化合物进行质谱及核磁共振波谱分析, 鉴定该化合物为 7-脱氧水仙环素。研究 7-脱氧水仙环素对人体正常细胞(LO2 细胞和 HFF-1 细胞)的细胞毒性及对人宫颈癌细胞(Hela 细胞)和人结肠癌细胞(HT-29 细胞)的细胞存活率的影响。结果显示人包皮成纤维细胞(HFF-1 细胞)对 7-脱氧水仙环素的耐受性要大于人正常肝细胞(LO2 细胞)。选择使 LO2 细胞存活率高于 80%的 7-脱氧水仙环素浓度作用于肿瘤细胞 HT-29 和 Hela。结果显示 7-脱氧水仙环素对 HT-29 和 Hela 的半数致死浓度(IC₅₀)分别为 17.04 μM 和 6.39 μM, 低于 5-氟尿嘧啶的 22.45 μM 和 37.05 μM, 且低于 7-脱氧水仙环素对 LO2 细胞的半数致死浓度(IC₅₀) 40.11 μM, 说明 7-脱氧水仙环素在对正常细胞无明显影响的情况下能显著抑制肿瘤细胞的增值。

关键词: 石蒜; 活性物质; 体外抗肿瘤

文章编号: 1673-9078(2019)04-16-21

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.4.003

Isolation and Purification of 7-deoxynarciclasine and Its Antitumor Activity *in Vitro*

WAN Lin, XU Xi-lin, YANG Lin-jiang, JIANG Jian-guo

(College of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: In this study, a compound was obtained from the *n*-butanol fraction of the active part of *Lycoris radiate* Herb. The compound was identified as 7-deoxynarciclasine by mass spectrometry and Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy. To study the cytotoxicity of 7-deoxynarciclasine against normal human cells (LO2 cells and HFF-1 cells), and its effect on the cell viability of human cervical cancer cells (Hela cells) and human colon cancer cells (HT-29 cells) were examined. The results showed that human foreskin fibroblasts (HFF-1 cells) were more tolerant to 7-deoxynarciclasine than normal human hepatocytes (LO2 cells). The concentration of 7-deoxycycline, which led to a LO2 cell survival rate higher than 80%, was applied to HT-29 and Hela cells. As a result, the median lethal concentration (IC₅₀) of 7-deoxynarciclasine to HT-29 or Hela cells was 17.04 μM and 6.39 μM respectively. These values were lower than those of 5-fluorouracil against HT-29 (22.45 μM) or Hela cells (37.05 μM), and that against LO2 (40.11 μM). These findings indicate that 7-deoxynarciclasine may significantly inhibit the proliferation of tumor cells without affecting significantly the normal cells.

Key words: *Lycoris radiate* Herb; active ingredients; antitumor activity *in vitro*

石蒜属(*Lycoris*)植物是一类既有极高观赏价值又具有良好的药用价值的球根类花卉植物, 主要分布于中国、日本以及东南亚的其他国家和地区^[1]。石蒜属植物石蒜(*Lycoris radiate* Herb.), 别名彼岸花、老鸦蒜《救荒本草》、乌蒜《本草纲目》和曼珠沙华; 多年生草本, 鳞茎呈椭圆形, 生于阴湿山地或丛林下, 也有栽培, 产于华东、中南及西南地区^[2]。石蒜是一

收稿日期: 2018-06-14

基金项目: 广州市科技计划项目(201604020150)

作者简介: 万林(1994-), 女, 硕士, 研究方向: 天然产物

通讯作者: 姜建国(1964-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 天然产物

种传统中药资源, 在我国资源丰富, 具有多种药理作用。它的活性成分包括: 生物碱、黄酮、苯乙酮衍生物、查耳酮、色原酮、苯醌衍生物等^[3-5]。目前国内外对石蒜属植物化学成分的研究主要有生物碱类、黄酮类、糖类、凝集素及微量元素等^[6,7]。尤其对石蒜属生物碱成分进行了广泛的药理活性研究。发现石蒜属生物碱具有心血管系统作用、抗癌抗肿瘤、抗乙酰胆碱酯酶(AChE)、抗菌、抗病毒和抗疟疾等多方面药理作用^[8]。

石蒜属植物作为药物治疗癌症, 有着悠久的历史。石蒜属植物的生物碱种类丰富, 其中石蒜碱型、文殊

兰碱型、水鬼蕉碱型和水仙碱型生物碱具有良好的抗肿瘤活性^[9]。石蒜碱对多种肿瘤细胞株,如小鼠黑色素瘤细胞(B16F1)、人早幼粒白血病细胞(HL-60)、转移性黑色素瘤细胞(C8161)、人乳腺癌细胞(MCF-7)等均显示良好的抗肿瘤活性,其作用机制与抑制肿瘤细胞增殖、细胞凋亡诱导作用有关。石蒜碱可能是触发线粒体的凋亡途径从而导致细胞凋亡^[10-13]。研究表明水鬼蕉碱型生物碱主要是通过抑制肿瘤细胞生长、触发线粒体凋亡途径而发挥抗肿瘤作用的^[14]。且水鬼蕉碱在安全剂量范围内对其他非癌细胞,如人成纤维细胞,无细胞毒性^[15]。Zupkq 等研究发现漳州水仙碱能够显著抑制人肿瘤细胞,如 MCF-7、人宫颈癌细胞(HeLa)和表皮癌细胞(A431),并且其对小鼠淋巴瘤细胞系 L5178 抑制作用明显强于其他类型的石蒜科生物碱^[16]。虽然石蒜活性物质能够起到预防或者治疗某些疾病的效果,但仍然存在关于摄取必然造成潜在健康危险的摄取量和状况的不确定性。本实验从石蒜中提取活性成分并研究其对正常细胞(LO2 细胞和 HFF-1 细胞)的毒性作用,及其在毒性安全范围内的对肿瘤细胞(HT-29 细胞和 Hela 细胞)增值的抑制效果,以确定其使用剂量及药理作用。

1 材料与方法

1.1 材料

石蒜(*Lycoris radiate* Herb.)产自湖北,购买于广州清平药材市场,材料经专家鉴定。人正常肝细胞系(LO2 细胞)、人包皮成纤维细胞系(HFF-1 细胞)、Hela 细胞和人结肠癌细胞系(HT-29 细胞),均为实验室留存。细胞培养板,美国 Costar 公司;细胞培养瓶、无菌离心管和细胞冻存管,美国 Corning 公司;无菌微孔滤膜,美国 Whatman 公司;程序降温盒,美国 Sigma 公司。

1.2 试剂

无水乙醇,广州化学试剂厂;二甲基亚砜,广东光华化学厂有限公司;噻唑蓝(MTT),美国 Sigma 公司;胎牛血清(FBS),美国 Gibco 公司;DMEM 培养基,美国 Gibco 公司;胰蛋白酶,美国 Gibco 公司;PBS 磷酸缓冲液(7.4),美国 Gibco 公司。

1.3 主要仪器设备

HH-2 型数显恒温水浴锅,江苏金坛市宏华仪器厂;FA1104N 电子分析天平,上海精密科技仪器有限公司;移液枪,美国 Sigma 公司;Varioskan Flash 多

功能酶标仪,美国 Thermo 公司;TCS-SP2 倒置显微镜,德国 Leica 公司;3543 型 CO₂ 恒温培养箱,美国 Thermo 公司;VD-650 垂直流超净工作台,苏州净化设备有限公司;InnovaU725 -80 °C 超低温冰箱,New Brunswick Scientific;Biorack 750 液氮罐,英国 STATEBOURNE;YXQ-LS-50S11 立式压力蒸汽灭菌锅,上海博讯实业有限公司;101-1-BS 电热恒温鼓风干燥箱,上海跃进医疗器械厂;KQ5200DE 数控超声清洗器,昆山市超声仪器厂;DRX-600 核磁共振波谱仪,德国 Bruker 公司。

1.4 实验方法

1.4.1 化合物的分离提取^[17]

干燥的石蒜 2.5 kg 经过粉碎过筛后用 75%乙醇加热回流提取 3 次,用旋转蒸发器浓缩得到浸膏,并依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇对该提取物进行分级萃取,最终得到石油醚萃取物(2.5 g)、乙酸乙酯萃取物(25 g)、正丁醇萃取物(30 g)。正丁醇萃取物(30 g)经过硅胶柱层析,用氯仿-甲醇比分别为 100:0、100:5、100:8、100:10、100:15、100:20、80:20、50:40 和 50:50 的浓度梯度洗脱并经 TCL 点板合并具有相同主斑点的馏分,得到 13 个馏分。接下来将馏分 1(100 mg)经过葡聚糖凝胶柱层析甲醇洗脱,进一步用 ODS 柱分离,用甲醇-水(40:60)洗脱得到化合物 A(16.22 mg)。

1.4.2 核磁共振波谱的测定

核磁共振(Nuclear Magnetic Resonance, NMR)波谱法是鉴定化合物结构的主要方法。样品用氘代试剂(氘代二甲基亚砜)溶解,转移至核磁管中,以四甲基硅烷(Tetramethylsilane, TMS)作为内标物,利用 DRX-600 核磁共振仪测定样品的氢谱(¹H-NMR)、碳谱(¹³C-NMR)。

1.4.3 细胞存活率的测定

MTT 法又称 MTT 比色法,是一种灵敏、快速和便捷的检测细胞存活率和活细胞计数的方法^[18]。将生长于对数期的细胞以每孔 8×10^3 个的细胞密度接种于 96 孔板中(100 μ L/孔),置于 CO₂ 细胞培养箱中培养至细胞贴壁。细胞贴壁之后,实验组加入不同浓度的样品,对照和调零组加入 DMEM 完全培养基,每组设 4 个复孔。将细胞放回 CO₂ 培养箱中培养。24 h 之后,放置于倒置显微镜下观察细胞形态并拍照,之后弃去细胞培养液,加入 200 μ L 的含有 10% MTT(5 mg/mL)的 DMEM 基础培养基,37 °C 培养箱中继续培养 4 h 后弃去含 MTT 的培养液,然后每孔加入 150 μ L DMSO,震荡 6~8 min,使生成的甲臜充分溶解。

密, 细胞贴壁良好, 充满整个视野; 细胞形态饱满, 形状规则, 细胞呈现长条形。7-脱氧水仙环素对 HFF-1 细胞形态的影响如图 4, 样品作用 HFF-1 细胞 24 h 后, 与正常细胞相比, 细胞间间隙增大, 说明细胞数量减少; 少部分细胞形态发生改变, 细胞由长条形或梭形变为圆形, 说明细胞贴壁性变差, 细胞的增殖受到抑制。但整体细胞轮廓清晰, 并没有发现细胞破碎的迹象, 而且培养液清晰透明, 并没有在培养液中发现细胞碎片或浮渣。7-脱氧水仙环素在彼此浓度范围内对 HFF-1 细胞的增殖抑制作用不强。总的来说, HFF-1 细胞比 LO2 细胞在样品同等浓度下的耐药性更强。

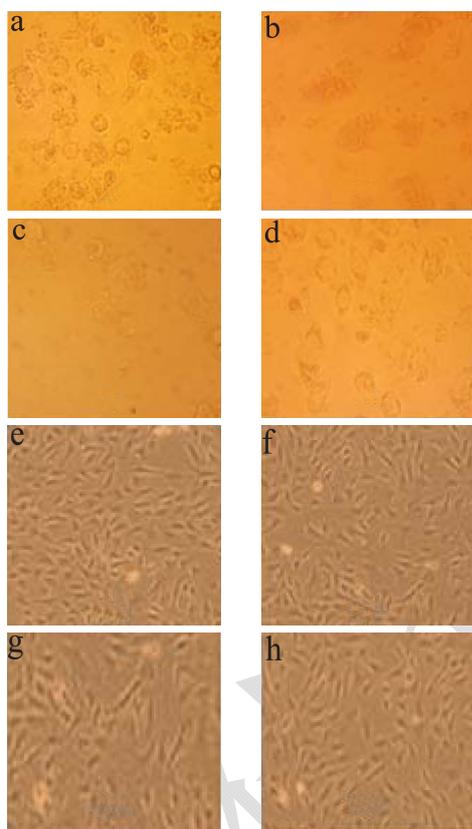


图 4 7-脱氧水仙环素对 LO2 和 HFF-1 细胞形态的影响

Fig.4 The inhibition effect of 7-deoxyarniclasine on LO2 cell and HFF-1 cell morphology

注: a-d: LO2 细胞; e-h: HFF-1 细胞。a、e: control;

b、f: 42.96 μM; c、g: 21.48 μM; d、h: 2.69 μM。

2.2.2 7-脱氧水仙环素对人正常细胞存活率的影响

实验中所设 7-脱氧水仙环素样品浓度分别为 171.82、85.91、42.96、21.48、10.74、5.37、2.69 和 1.35 μM。如图 5 可知: 样品作用 LO2 细胞 24 h 后, 肝细胞的细胞存活率随着样品浓度的增大而减小, 呈明显的线性分布。当样品浓度为 2.69 μM 时, 样品几乎不显示对 LO2 细胞的毒性; 在实验设置的高浓度 (85.91 μM 和 171.82 μM) 范围, LO2 细胞存活率仅

为 34.25%和 22.35%。7-脱氧水仙环素对 LO2 细胞的半数致死浓度 (IC₅₀) 为 40.11 μM。在设置浓度范围内, 样品对 HFF-1 细胞的存活率没有明显的浓度依赖性, HFF-1 细胞的存活率在 70%~85%之间。在中浓度 (5.37~85.91 μM) 时, HFF-1 细胞存活率均高于 LO2 细胞; 在实验最高浓度 171.82 μM 时, HFF-1 细胞存活率最低, 为 70.65%, 为同浓度下 LO2 细胞存活率的 3 倍; 7-脱氧水仙环素对 HFF-1 的细胞抑制率最高为 29.35% (浓度为 171.82 μM 条件下), 说明 HFF-1 细胞的 IC₅₀ 值大于 171.82 μM。综上所述, 说明 HFF-1 细胞耐 7-脱氧水仙环素的毒性作用强于 LO2 细胞。

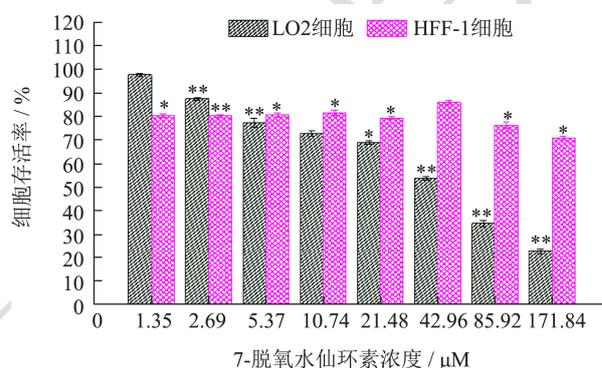


图 5 7-脱氧水仙环素对 LO2 和 HFF-1 细胞存活率的影响

Fig.5 The toxicity influence of 7-deoxyarniclasine to LO2 cell and HFF-A cell survival rate

注: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 。

2.3 7-脱氧水仙环素的对肿瘤细胞存活率的影响

根据 7-脱氧水仙环素对正常细胞 LO2 和 HFF-1 细胞的毒性作用结果, 作用于肿瘤细胞的安全浓度应是使 LO2 细胞存活率在 80%以上的浓度, 故该实验设置的安全浓度范围为 0.085~2.69 μM。选用目前广泛认可的治疗癌症相关的药品 5-氟尿嘧啶为抗肿瘤细胞作用实验的阳性对样品。如图 6 所示: 当 7-脱氧水仙环素在实验设置的安全浓度作用于 HT-29 细胞和 HeLa 细胞 24 h 后, 7-脱氧水仙环素对 HT-29 细胞和 HeLa 细胞的最高抑制率分别为 31.70%和 35.96%, 其对肿瘤细胞的抑制率随着样品浓度的增大而有一定程度的增大。当样品浓度为 2.69 μM 时, 对两种肿瘤细胞生长的抑制效果较为明显, 7-脱氧水仙环素对 HT-29 细胞和 HeLa 细胞的抑制率分别为 31.70%和 29.32%; 而当样品浓度进一步降低为 1.35 μM 时, 7-脱氧水仙环素对 HT-29 细胞和 HeLa 细胞的抑制率分别为 23.18%和 35.96%; 在低浓度 (0.17 μM) 时, 7-脱氧水仙环素对 HT-29 细胞和 HeLa 细胞的抑制率分

别为 9.77% 和 4.82%。7-脱氧水仙环素对 HT-29 细胞和 HeLa 细胞的 IC₅₀ 分别为 17.04 μM 和 6.39 μM，均低于 5-氟尿嘧啶的 22.45 μM 和 37.05 μM（表 2），这表明 7-脱氧水仙环素对 HT-29 细胞和 HeLa 细胞这两种肿瘤细胞的生长有明显的抑制作用。7-脱氧水仙环素对肿瘤细胞的抑制作用可能与 C 环羟基的数目有关系^[20]。

表 2 7-脱氧水仙环素和 5-氟尿嘧啶对 HT-29 细胞和 HeLa 细胞的 IC₅₀ 值

Table 2 The IC₅₀ values of 7- deoxynarciclasine and 5-fluorouracil on HT-29 cells and HeLa cells

活性物质	IC ₅₀ /μM	
	HT-29 细胞	HeLa 细胞
7-脱氧水仙环素	17.04±1.79	6.39±0.72
5-氟尿嘧啶	22.45±3.54	37.05±3.15

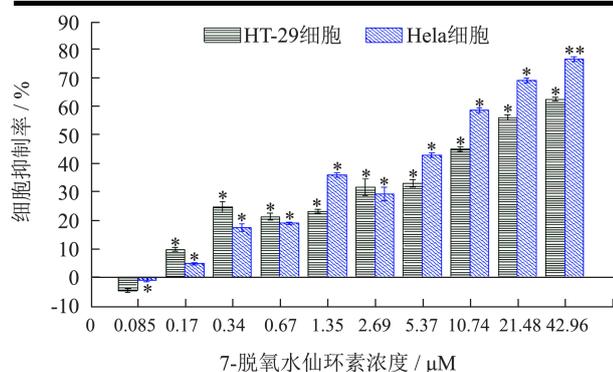


图 6 7-脱氧水仙环素对癌细胞存活率的影响

Fig.6 The toxicity influence of 7-deoxynarciclasine to cancer cells survival rate

注: *p<0.05; **p<0.01。

3 结论

实验通过对石蒜 75%乙醇提取物的正丁醇萃取物进行不断的柱层析纯化得到一个单体化合物 7-脱氧水仙环素，并对其对人正常细胞的毒性和抗肿瘤细胞活性进行进一步的研究。研究发现，在实验浓度范围（1.35~171.82 μM）内，7-脱氧水仙环素作用于正常细胞 24 h 后，LO2 细胞的存活率呈明显的线性关系而 HFF-1 细胞的细胞存活率没有明显的剂量关系，在中高剂量（5.37~171.82 μM）HFF-1 细胞的存活率均高于 LO2 细胞，且在最高浓度时 HFF-1 细胞的存活率甚至达到 LO2 细胞存活率的 3 倍。HFF-1 细胞在 7-脱氧水仙环素的最高实验浓度 171.82 μM 时的存活率最低，为 70%（抑制率为 30%）左右，说明 7-脱氧水仙环素对 HFF-1 细胞的半数致死浓度（IC₅₀）要大于 171.82 μM，而 7-脱氧水仙环素对 LO2 细胞的 IC₅₀ 值为 40.11 μM，低于 HFF-1 的 IC₅₀。表明 7-脱氧水仙环

素对人体正常肝细胞（LO2 细胞）有较强的细胞毒性，而人体成纤维细胞（HFF-1 细胞）对其毒性不敏感，有较强的耐药性。作用的安全浓度应是使 LO2 细胞的存活率达 80% 以上的浓度，本实验中选择的 7-脱氧水仙环素作用的安全浓度为 0.085~2.69 μM。7-脱氧水仙环素对 HT-29 细胞和 HeLa 细胞的 IC₅₀ 分别为 17.04 μM 和 6.39 μM，5-氟尿嘧啶（阳性对照）对 HT-29 细胞和 HeLa 细胞的 IC₅₀ 值分别为 22.45 μM 和 37.05 μM。7-脱氧水仙环素对 HT-29 细胞和 HeLa 细胞的 IC₅₀ 均低于 5-氟尿嘧啶，且远低于 LO2 细胞，说明 7-脱氧水仙环素在对正常细胞无明显影响的情况下能显著抑制肿瘤细胞的增殖。

参考文献

- [1] 余本祺.石蒜属种间和石蒜居群间染色体核型和过氧化物酶(POD)的研究[D].芜湖:安徽师范大学,2006
YU Ben-qi. Studies on karyotype and isozyme peroxidase of different species of *Lycoris* Herb. and different populations of *Lycoris radiata* Herb [D]. Wuhu: Anhui Normal University, 2006
- [2] 柯丽霞,孙叶根,郑艳,等.石蒜属三种植物的核型研究[J].安徽师范大学学报(自然科学版),1998,21(4):343-347
KEI Li-xia, SUN Ye-gen, ZHENG Yan, et al. Study on karyotype of three species of *Lycoris* Herb [J]. Journal of Anhui Normal University (Natural Science), 1998, 21(4): 343-347
- [3] 王仁师.关于石蒜属(*Lycoris*)的生态地理[J].西南林学院学报,1990,10:41-48
WANG Ren-shi. Study on the ecology of *Lycoris* [J]. Journal of Southwest Forestry College, 1990, 10: 41-48
- [4] 季春峰.石蒜属资源开发与利用[J].中国野生植物资源,2002,21(6):14
JI Chun-feng. The Development and Utilization of *Lycoris* [J]. Chinese Wild Plant Resources, 2002, 21(6): 14
- [5] 秦昆明,李笑,徐昭,等.石蒜碱及其衍生物的药理作用研究概况[J].北京联合大学学报.2009,23:6-10
QIN Kun-ming, LI Xiao, XU Zhao, et al. A survey of the studies on pharmacological effects of lycorine and its derivatives [J]. Journal of Beijing Union University (Natural Sciences), 2009, 23: 6-10
- [6] Ronsted N, Savolainen V, Molgaard P, et al. Phylogenetic selection of *Narcissus* species for drug discovery [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2008, 36: 417-422
- [7] 杨郁,黄胜雄,赵毅民.黄花石蒜中的黄酮类成分[J].天然产物研究与开发,2005,17(5):539-541

- YANG Yu, HUANG Sheng-xiong, ZHAO Yi-min. Flavonoids from *Lycoris aurea* [J]. Natural Product Research and Development, 2005, 17(5): 539-541
- [8] Feng Tao, Wang Yuan-yuan, Su Jia, et al. Amaryllidaceae alkaloids from *Lycoris radiata* [J]. Helvetica Chimica Acta, 2011, 94(1): 178-183
- [9] Kornienko A, Evidente A. Chemistry, biology, and medicinal potential of narciclasine and its congeners [J]. Chemical Review, 2008, 108(6): 1982-2014
- [10] LIU Jing, HU Ji-liang, SHI Bi-wei, et al. Up-regulation of p21 and TNF- α is mediated in lycorine-induced death of HL-60 cells [J]. Cancer Cell International, 2010, 10(1): 25-34
- [11] Liu Rui-fang, Cao Zhi-fei, Tu Jian, et al. Lycorine hydrochloride inhibits metastatic melanoma cell- dominant vasculogenic mimicry [J]. Pigment Cell & Melanoma Research, 2012, 25(5): 630-638
- [12] Van G, Andolfi A, Lallemand B, et al. Amaryllidaceae alkaloids belonging to different structural subgroups display activity against apoptosis-resistant cancer cells [J]. Journal of Natural Products, 2010, 73(7): 1223-1227
- [13] Szlavik L, Gyuris A, Minarovits J, et al. Alkaloids from *Leucojum vernum* and antiretroviral activity of *Amaryllidaceae* alkaloids [J]. Planta Medica, 2004, 70(9): 871-873
- [14] Pettit G R, Ducki S, Eastham S A, et al. Antineoplastic agents. 454. synthesis of the strong cancer cell growth inhibitors trans-dihydronarciclasine and 7-deoxytrans-dihydronarciclasine [J]. Journal of Natural Products, 2009, 72(7): 1279 -1282
- [15] Griffin C, Karnik A, McNulty J, et al. Pancratistatin selectively targets cancer cell mitochondria and reduces growth of human colon tumor xenografts [J]. Molecular Cancer Therapeutics, 2011, 10(1): 57-68
- [16] Zupkq I, Rethy B, Hohmann J, et al. Antitumor activity of alkaloids derived from amaryllidaceae species [J]. In Vivo, 2009, 23(1): 41-48
- [17] ZHANG Tian-tian, WANG Ming, JIANG Jian-guo, et al. Flavonoid glycosides from *Rubus chingii*, Hu fruits display anti-inflammatory activity through suppressing MAPKs activation in macrophages [J]. Journal of Functional Foods, 2015, 18: 235-243
- [18] 吴窈画,谈书华,范超超,等.MTT 法检测细菌细胞数的主要影响因素分析[J].微生物学杂志,2011,31(3):61-72
- WU Yao-hua, TAN Shu-hua, FAN Chao-chao, et al. Analysis of influencing factors on the bacterial cell counting with the MTT method [J]. Journal of Microbiology, 2011, 31(3): 61-72
- [19] Pettit G R, Eastham S A, Melody N, et al. Isolation and structural modification of 7-deoxynarciclasine and 7-deoxy-trans-dihydronarciclasine [J]. Journal of Natural Products, 2006, 69(1): 7-13
- [20] 付卡利.中国水仙化学成分与生物活性研究[D].上海:第二军医大学,2013
- FU Ka-li. Studies on chemical constituents and bioactivities of *Narcissus tazetta* vat. *Chinensi* [D]. Shanghai: The Second Military Medical University, 2013

(上接第 165 页)

- [29] 霍超,宋曙辉,徐桂花,等.朝鲜蓟叶提取物的抑菌作用研究 [J].食品科技,2009,34(9):217-219
- HUO Chao, SONG Shu-hui, XU Gui-hua, et al. Study on antimicrobial effects of artichoke leaves extract [J]. Food Science and Technology, 2009, 34(9): 217-219
- [30] 李芬芳,马艳弘,赵密珍,等.草莓多酚的提取工艺优化及其抑菌活性研究[J].江苏农业科学,2017,45(3):155-158
- LI Fen-fang, MA Yan-hong, ZHAO Mi-zhen, et al. Optimization of extraction process of strawberry polyphenols and its antimicrobial activity evaluation [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2017, 45(3): 155-158
- [31] Zhu X, Zhang H, Lo R. Phenolic compounds from the leaf extract of artichoke (*Cynara scolymus* L.) and their antimicrobial activities [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(24): 7272-7278
- [32] 王建超.枇杷叶多酚提取、纯化及其抗氧化、抑菌活性研究[D].福州:福建农林大学,2015
- WANG Jian-chao. Study on extraction and purification process, antioxidant and antibacterial activity of polyphenols from loquat leaves [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2015