

## 柴达木枸杞多糖和还原糖含量分析

吴有锋<sup>1,2</sup>, 马世震<sup>1\*</sup>, 谭亮<sup>1</sup>, 冯海生<sup>1</sup>, 李彩霞<sup>1</sup><sup>1</sup>中国科学院西北高原生物研究所 中国科学院藏药重点实验室, 西宁 810008; <sup>2</sup>中国科学院大学, 北京 100049

**摘要:** 建立柴达木枸杞还原糖提取和含量测定的方法, 并对不同产地、采摘期柴达木枸杞多糖和还原糖含量进行分析。采用改进的苯酚-硫酸法测定多糖的含量, 采用优化的 3,5-二硝基水杨酸法(DNS法)测定还原糖的含量。结果表明: DNS法测定还原糖的最佳条件为: 检测波长 550 nm, DNS用量 3.0 mL, 显色时间 3 min。多糖含量在 2.183~3.863% 之间, 还原糖含量在 49.39~65.15% 之间。通过 SPSS 软件统计分析得出不同产地、采摘期柴达木枸杞的多糖和还原糖含量差异不显著( $P > 0.05$ )。DNS法简便快捷, 且干扰较小, 适于柴达木枸杞还原糖含量测定; 通过不同产地、采摘期枸杞多糖和还原糖含量比较分析, 为柴达木枸杞品质评价和质量控制提供依据。

**关键词:** 柴达木枸杞; 多糖和还原糖; 改进的苯酚-硫酸法; 3,5-二硝基水杨酸法(DNS法); 含量分析

中图分类号: O629

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.S.015

## Analysis of Polysaccharides and Reducing Sugars in Qaidam Chinese wolfberry

WU You-feng<sup>1,2</sup>, MA Shi-zhen<sup>1\*</sup>, TAN Liang<sup>1</sup>, FENG Hai-sheng<sup>1</sup>, LI Cai-xia<sup>1</sup><sup>1</sup>Key Laboratory of Tibetan Medicine Research, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Science, Xining 810001, China; <sup>2</sup>University of Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China

**Abstract:** The objective of this study was to establish a method for extraction and determination of reducing sugars in Qaidam Chinese wolfberry. Meanwhile, the contents of polysaccharides and reducing sugars in wolfberry samples from different habitats and different picking periods were analyzed. The developed phenol-sulfuric acid method and optimized 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method were used to analysis the contents of polysaccharides and reducing sugars, respectively. The results show that the optimum parameters of DNS method for reducing sugars are as follows: wavelength was 550 nm, the dosage of DNS solution was 3.0 mL and the color reaction time was 5 min. The contents of polysaccharides and reducing sugars was 2.183-3.863% and 49.39-65.15%, respectively. The contents of polysaccharides and reducing sugars in Qaidam Chinese wolfberry in different habitats and different picking periods didn't display significant effect ( $P > 0.05$ ). The developed method was simple, fast and little interference, and is suitable for the determination of reducing sugars. By comparing analysis of polysaccharides and reducing sugars in Qaidam Chinese wolfberry from different habitats and picking periods, this study effectively provide evidence for the quality evaluation and quality control of Qaidam Chinese wolfberry.

**Key words:** Qaidam Chinese wolfberry; polysaccharides and reducing sugars; developed phenol-sulfuric acid method; DNS method; content analysis

枸杞(*Lycium Barbarum* L.)为茄科枸杞属的落叶小灌木<sup>[1]</sup>,其成熟干燥的果实是我国传统的名贵中药材。现代医学研究表明,枸杞具有补肾养肝、润肺明目、增强免疫力<sup>[2]</sup>、抗衰老、抗肿瘤<sup>[3]</sup>、抗氧化<sup>[4]</sup>、抗疲劳及协同防癌等多方面的药理作用<sup>[1]</sup>。柴达木枸杞又名柴杞,主要出产于柴达木盆地。粒

大饱满,肉质肥厚,色泽鲜艳,品质优良,相关研究表明柴达木枸杞多糖、类胡萝卜素、氨基酸等营养成分比其它地区高<sup>[5]</sup>。枸杞多糖是中药材枸杞子的主要药效成分,具有抗氧化<sup>[6]</sup>、抗衰老、抗肿瘤<sup>[7]</sup>、抗辐射、增强免疫、保护视网膜、保护生殖系统、治疗骨质疏松等作用<sup>[8-10]</sup>。2015版《中华人民共和国药典》采用苯酚-硫酸法测定枸杞中多糖的含量,但前处理的过程比较繁琐,提取过程中采用乙醚作为提取溶剂。鉴于此本文对该方法的前处理过程进行改进;关于枸杞子中还原糖含量测定及其方法学鲜见

收稿日期: 2016-09-13 接受日期: 2016-11-01

基金项目: 中国科学院藏药现代化重点实验室项目(Y4496110Z1)

\* 通信作者 E-mail: szma@nwipb.cas.cn

报道,但测定条件并非最佳。本研究利用改进的苯酚-硫酸法测定柴达木枸杞多糖,建立枸杞还原糖提取和测定方法,即优化的3,5-二硝基水杨酸比色法(DNS法),同时对不同产地、采摘期柴达木枸杞多糖、还原糖含量进行分析,为柴达木枸杞品质评价和开发利用提供一定理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

柴达木枸杞:2015年8月~10月于都兰县、诺木洪、格尔木等6个地区进行样品采集,样品具体信

息见表1。样品经中国科学院西北高原生物研究所马世震研究员鉴定确认为正品,样品预处理:将收集的枸杞子经干燥处理( $<50\text{ }^{\circ}\text{C}$ )、粉碎后装入密封袋中密封,置干燥器中备用。葡萄糖对照品(批号:110833-201205)中国药品生物制品检定所;3,5-二硝基水杨酸上海远帆助剂厂;石油醚(沸点: $60\sim 90\text{ }^{\circ}\text{C}$ )、无水乙醇、苯酚、硫酸、氢氧化钠、酒石酸钾钠、无水硫酸钠均为分析纯天津市百世化工有限公司;超纯水、sevag试剂(三氯甲烷:正丁醇 = 4:1,  $v/v$ )实验室自制。

表1 不同产地和采摘期枸杞样品信息

Table 1 Sample information of Qaidam Chinese wolfberry from different habitats and different picking periods

样品编号 No.	采集地点 Sample site	采集时间 Time	海拔/m Altitude	经度 Longitude	纬度 Latitude
1	都兰县夏日哈镇沙珠玉村	2015.8	3056	98°02'45.5"	36°27'37.6"
2		2015.9			
3		2015.1			
4	都兰县宗加镇哈西瓦村	2015.8	2776	96°14'51.7"	36°23'51.8"
5		2015.9			
6		2015.1			
7	诺木洪一大队	2015.8	2831	96°27'29.1"	36°23'27.5"
8		2015.9			
9		2015.1			
10	格尔木市园艺场	2015.8	2800	94°55'50.7"	36°24'26.7"
11		2.015.9			
12		2015.1			
13	德令哈市怀头他拉镇东滩村	2015.8	2836	96°46'36.8"	37°19'28.0"
14		2015.9			
15		2015.1			
16	乌兰县赛什克乡兴乐村	2015.8	2977	98°38'56"	36°94'54"
17		2015.9			
18		2015.1			

Varian Cary300Bio型紫外-可见分光光度仪美国Varian公司;AG135型精密电子天平瑞士Mettler Toledo公司;优普UPE-II-40L型超纯水机上海优普实业有限公司;SL-500A型高速多功能粉碎机浙江省永康市松青五金厂;HH-S4型电热恒温水浴锅北京科伟永兴仪器有限公司;TGL-16C离心机上海安亭科学仪器厂。

## 2 实验方法

### 2.1 供试品溶液制备

#### 2.1.1 多糖待测液的提取

称取柴达木枸杞子粉末0.500g,精密称定,置于150mL锥形瓶中,加75%的乙醇超声提取1h,过滤,并用75%的乙醇洗涤滤渣2~3次,将滤渣转

移至锥形瓶中加水 100 mL,置于加热板上加热煮沸 1 h。冷却至室温,将内容物转移至 250 mL 容量瓶中,加蒸馏水洗涤锥形瓶 2~3 次并一起移入该容量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀。精密移取 2.0 mL 该溶液置于 5 mL 塑料离心管中,并加 Sevag 试剂,激烈震荡使其充分混合,在 9000 rpm 转速下离心 5 min,弃去中间变性蛋白层和下层有机层,水相继续重复上述操作直至水相与有机相中间无变性蛋白出现为止<sup>[11]</sup>。精密移取上清液 0.4 mL 置于 25 mL 具塞试管中,加超纯水补至 2.0 mL 后摇匀。依次加入 5% 的苯酚溶液 1 mL 混匀后,缓慢加入 5 mL 浓硫酸,摇匀后冷却到室温进行显色反应,采用紫外-可见分光光度计在 490 nm 处进行样品测定<sup>[12]</sup>。

### 2.1.2 还原糖待测液的提取

称取柴达木枸杞子粉末 1.000 g,精密称定,置于 150 mL 锥形瓶中,加蒸馏水 30 mL 置于加热板上加热煮沸 1 h。冷却至室温,定容至 100 mL,精密移取 1.0 mL 置于 7 mL 离心管中,并加入无水乙醇 5 mL,混匀,置于 4 °C 冰箱中冷藏过夜。次日离心后上清液作为待测液备用。

## 2.2 DNS 试剂配制

称取 5.0 g 3,5-二硝基水杨酸溶于少量水(已煮沸 10 min 后冷却至室温的蒸馏水)中,加入 10.0 g 氢氧化钠,100 g 酒石酸钾钠,1.0 g 苯酚和 25.0 g 无水硫酸钠,搅拌至完全溶解,转入 500 mL 棕色容量瓶中,加水定容。室温保存 7 天后使用。

## 2.3 标准溶液的配制

分别精密称取葡萄糖标准品 9.52 mg 和 100.2 mg,置于 100 mL 容量瓶中,加适量的蒸馏水溶解,稀释至刻度,摇匀,即得质量浓度分别为 0.0952 mg/mL 和 1.002 mg/mL 的葡萄糖标准溶液。

## 2.4 标准曲线绘制

### 2.4.1 多糖测定标准曲线

准确移取 0.0952 mg/mL 葡萄糖标准溶液 0.1、0.3、0.5、0.7、1.0 mL 置于 25 mL 具塞试管中,加超纯水补至 2.0 mL,摇匀。依次加入 5% 的苯酚溶液 1 mL 混匀后,缓慢加入 5 mL 浓硫酸,摇匀后冷却到室温进行显色反应,以相应的试剂为空白,采用紫外-可见分光光度计在 490 nm 处进行样品测定。以葡萄糖标准溶液的浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线。

### 2.4.2 还原糖测定标准曲线

准确移取 1.002 mg/mL 葡萄糖标准溶液 0.2、

0.4、0.6、0.8、1.0 mL 置于 25 mL 具塞试管中,加蒸馏水补至 2.0 mL,摇匀。加入 DNS 试剂 3.0 mL,混合均匀后沸水浴加热 3 min,迅速流水冷却,加水至刻度,摇匀。以水为参比,以葡萄糖标准溶液的浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线。

## 2.5 还原糖测定条件优化考察

### 2.5.1 检测波长的确定

准确移取葡萄糖标准溶液和蒸馏水各 1.0 mL,加入 25 mL 具塞试管中,混匀,加入 DNS 试剂 3.0 mL,混合均匀后沸水浴加热 3 min,迅速流水冷却,加水至刻度,摇匀。再将葡萄糖显色液 + 蒸馏水(空白),DNS 试剂 + 蒸馏水(空白)分别在波长 450~600 nm 范围内进行扫描。

### 2.5.2 显色剂用量确定

准确移取葡萄糖标准溶液和蒸馏水各 1.0 mL,加入编号为 1~6 的 25 mL 具塞试管中,分别加入 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL DNS 试剂,混合均匀后置于沸水浴加热 3 min,迅速流水冷却,定容,在 550 nm 波长下测定吸光值。

### 2.5.3 显示时间确定

准确移取葡萄糖标准溶液和蒸馏水各 1.0 mL,加入编号为 1~5 的 25 mL 具塞试管中,加入 DNS 试剂 3.0 mL,混合均匀后分别置于沸水浴加热 1、3、5、7、10 min,迅速流水冷却,定容,在 550 nm 波长下测定吸光值。

## 3 结果与分析

### 3.1 检测波长选择

3,5-二硝基水杨酸比色法(DNS 法)测定还原糖,即 3,5-二硝基水杨酸在中性或偏碱性条件下与多糖水解的还原糖共热后被还原成棕红色的氨基化合物——3-氨基-5-硝基水杨酸。在一定范围内,还原糖的量和反应液的颜色呈正比<sup>[13]</sup>。由图 1 可以看出,葡萄糖显色液最大吸收波长为 495 nm,然而 DNS 试剂在波长  $\leq 540$  nm 时,都有一定的吸光值,而在 550 nm 以后,吸光值为 0,一般情况下应该选择吸光值最大时为检测波长,但为使 DNS 显色剂本身不干扰到检测,选择 550 nm 作为检测波长。

### 3.2 显色剂用量确定

从图 2 可以看出,在一定范围内,随着显色剂用量的增加,吸光度值增大,当 DNS 用量在大于 3 mL 时吸光度值趋于稳定,波动较小。因此,为了减小 DNS 试剂用量对吸光值测定的影响而又要保证显

色充分完全, DNS 试剂的用量至少为 3.0 mL, 故确

定 DNS 试剂的用量为 3.0 mL。

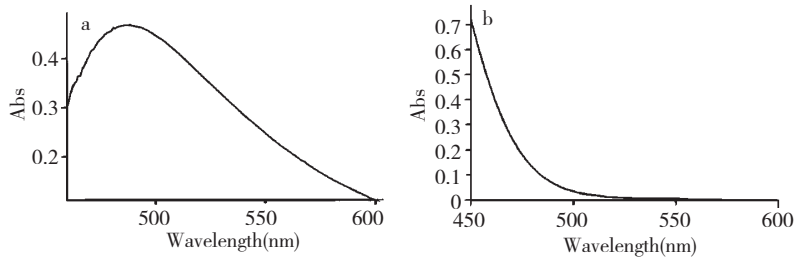


图 1 葡萄糖显色液 (a) 和 DNS 显色试剂 (b) 的吸收曲线

Fig. 1 Absorption curve of glucose standard solution(a) and the colour reagent DNS(b)

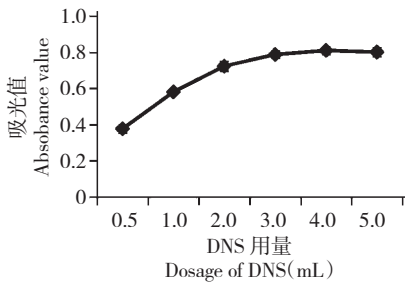


图 2 不同显色剂用量的吸光度值 ( $n = 3$ )

Fig. The absorption determination with different addition of DNS solution ( $n = 3$ )

### 3.3 显色时间确定

从图 3 可以看出,在一定范围内,随着沸水浴时间的增长,吸光度逐渐增大。当沸水浴加热时间增加到 3 min 后,吸光值变化趋于稳定,说明显色反应完全,故选择 3 min 作为最佳显色反应时间。

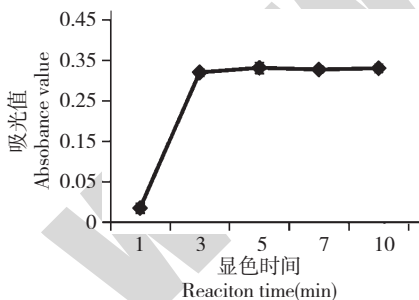


图 3 不同显色时间的吸光度值 ( $n = 3$ )

Fig. 3 The absorption determination with different colour reaction time ( $n = 3$ )

### 3.4 标准曲线绘制

多糖和还原糖测定, 回归方程为  $y = 14.403x + 0.024$  ( $R^2 = 0.9995$ ) 和  $y = 1.8222x - 0.0654$  ( $R^2 = 0.9998$ ), 线性关系良好。

### 3.5 还原糖方法学验证试验

#### 3.5.1 精密度试验

取同一样品,按“2.1.2”和“2.4.2”下的方法进行连续测定 6 次,以吸光度值为指标计算  $RSD$ ,考察其精密度。结果其  $RSD$  为 1.13%, 试验表明该方法的精密度良好。

#### 3.5.2 稳定性试验

取同一样品,按“2.1.2”和“2.4.2”下的方法操作,在 0、15、30、45、60 min 测定其吸光度值,以吸光度值为指标计算  $RSD$ ,考察其稳定性。结果其  $RSD$  为 2.34%, 试验表明供试样品显色后 1 h 内稳定。

#### 3.5.3 重复性试验

取同一样品 6 份,按“2.1.2”和“2.4.2”下的方法测定吸光度值,以吸光度值为指标计算  $RSD$ ,考察其重复性。结果其  $RSD$  为 1.07%, 试验表明该方法重复性良好。

3.5.4 加样回收率试验取同一样品供试液 6 份,各精密加入 1.002 mg/mL 的葡萄糖标准液 0.5 mL 按“2.4.2”下的方法测定吸光度值并计算回收率。结果表明回收率在 98.2 ~ 103.7% 之间,结果符合要求。

### 3.6 样品测定

取不同产地、不同采摘期的枸杞子粉末,按照“2.1”项下的方法进行多糖、还原糖的提取,并按“2.4”项下的方法进行含量测定结果见表 2。

从表 2 可以得出,不同产地的枸杞多糖含量差异不显著 ( $P > 0.05$ )。6 个产地中,产于德令哈的枸杞多糖的平均含量高于其它产地,为 3.273%,其次是产于格尔木园艺场的枸杞,其含量为 2.818%,较低的是产于乌兰县的枸杞,其含量为 2.469%。不同采摘期的枸杞多糖含量差异不显著 ( $P > 0.05$ )。8 月采于都兰县宗加镇的枸杞多糖含量高于同采摘期其它产地,其含量为 3.863%,9 月采于德令哈的枸杞多糖含量高于同采摘期其它产地,其含量为

表2 柴达木枸杞多糖、还原糖含量测定( $n = 3$ )Table 2 The determination of Qaidam wolfberry polysaccharides and reducing sugar( $n = 3$ )

样品编号 Sample number	多糖含量(%) Polysaccharides	RSD(%)	还原糖含量(%) Reducing sugar	RSD(%)
1	3.430	0.53	58.44	0.09
2	2.491	1.46	58.51	0.84
3	2.218	0.58	50.35	0.06
4	3.863	0.06	59.90	2.04
5	2.133	0.37	57.32	0.27
6	2.246	1.26	55.67	1.36
7	2.636	1.11	57.88	1.32
8	2.873	0.09	57.38	0.12
9	2.413	0.79	54.39	0.43
10	3.266	1.57	56.80	2.38
11	2.669	0.06	65.15	1.54
12	2.520	1.86	57.53	0.62
13	3.079	1.32	57.45	0.72
14	3.290	0.59	55.33	0.28
15	3.451	0.13	54.09	1.44
16	2.730	2.05	57.74	0.65
17	2.266	0.09	52.75	1.20
18	2.412	1.11	49.39	1.10

3.290%, 10月采于德令哈的枸杞多糖含量高于同采摘期其它产地,其含量为3.451%。不同产地的枸杞还原糖含量差异不显著( $P > 0.05$ )。6个产地中,产于格尔木园艺场的枸杞还原糖平均含量高于其它产地,为59.83%,其次是产于都兰县宗加镇的枸杞,其含量为57.63%,较低的是产于都兰县的枸杞,其含量为53.29%。不同采摘期的枸杞还原糖含量差异不显著( $P > 0.05$ )。除采摘于都兰县夏日哈镇和格尔木的枸杞9月份还原糖含量高于其它两月外,其余产地采于8月份的枸杞中所含还原糖含量高于其它两月。8月采于都兰县宗加镇的枸杞还原糖含量高于同采摘期其它产地,其含量为59.90%,9月采于格尔木的枸杞还原糖含量高于同采摘期其它产地,其含量为65.15%,10月采于格尔木的枸杞还原糖含量高于同采摘期其它产地,其含量为57.53%。

#### 4 结论

3,5-硝基水杨酸法测定还原糖时,测定过程中的诸多因素,如测定波长、显示剂用量和显色时间等

均对测定结果的准确性有直接影响。本文对枸杞中还原糖测定条件及相应的方法进行研究,得出测定的最佳条件:检测波长为550 nm, DNS 用量为3 mL, 显色反应时间为3 min。

苯酚-硫酸法测定多糖含量,药典中所用方法的前处理方法过程比较繁琐,并且多次进行过滤、转移操作,影响结果的准确性,并且使用有毒试剂乙醚,容易造成环境污染。本文改进的方法前处理过程简便。除多糖以外的杂质如脂肪、游离糖、蛋白质等,会使得苯酚-硫酸显色更深,测定结果偏高,本文采用 sevag 试剂除去蛋白质,同时将脂类物质除去,减少其对实验结果的干扰。

本文采用苯酚-硫酸法和 DNS 法分别测定了柴达木枸杞中的多糖和还原糖,并对不同产地、采摘期柴达木枸杞中多糖和还原糖含量进行分析。不同产地、采摘期枸杞中多糖和还原糖含量差异不显著( $P > 0.05$ )。所有供试样品多糖含量在2.183 ~ 3.863%之间,还原糖含量在49.386 ~ 65.149%之间。多糖含量较高的是产于德令哈的枸杞,其含量为3.273%;还原糖含量较高的是产于格尔木园艺

场的枸杞,其含量为 59.826%。

## 参考文献

- 1 Amagase H, Farnsworth NR. A review of botanical characteristics, phytochemistry, clinical relevance in efficacy and safety of *Lycium barbarum* fruit (Goji). *Food Res Int*, 2011, 44: 1702-1717.
  - 2 Wang J, Hu Y, Wang D, et al. Sulfated modification can enhance the immune-enhancing activity of *Lycium barbarum* polysaccharides. *Cellular Immunol*, 2010, 263: 219-223.
  - 3 Mao F, Xiao B, Jiang Z, et al. Anticancer effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on colon cancer cells involves G0/G1 phase arrest. *Med Oncol*, 2011, 28: 121-126.
  - 4 Wang C, Chang S, Inbaraj BS, et al. Isolation of carotenoids, flavonoids and polysaccharides from *Lycium barbarum* L. and evaluation of antioxidant activity. *Food Chem*, 2010, 120: 184-192.
  - 5 Ye Y(叶英), Suo YR(索有瑞), Han LJ(韩丽娟), et al. Analysis of the research status and prospects of *Lycium barbarum* from Qaidam Basin. *Food Ind* (食品工业), 2014, 35: 210-213.
  - 6 Lin C, Wang C, Chang S, et al. Antioxidative activity of polysaccharide fractions isolated from *Lycium barbarum* Linnaeus. *Int J Biol Macromol*, 2009, 45: 146-151.
  - 7 Ke M, Zhang XJ, Han ZH, et al. Extraction, purification of *Lycium barbarum* polysaccharides and bioactivity of purified fraction. *Carbohydr Polym*, 2011, 86: 136-141.
  - 8 Guo M(郭敏), Wu LTY(乌兰托雅), Li G(李刚). Research progress of pharmacological effects of polysaccharide in *Lycium barbarum*. *West China J Pharm Sci* (华西药学杂志), 2013, 28: 633-635.
  - 9 Deng ZH(邓自辉), Niu Y(牛阳), Wang R(王荣), et al. Research Status of pharmacological effects of polysaccharide in *Lycium barbarum*. *Chin J Clin Rational Drug Use* (临床合理用药杂志), 2011, 4: 164-165.
  - 10 Jin M, Huang Q, Zhao K, et al. Biological activities and potential health benefit effects of polysaccharides isolated from *Lycium barbarum* L. *Int J BiolMacromol*, 2013, 54: 16-23.
  - 11 Tan L(谭亮), Ji T(冀恬), Geng DD(耿丹丹), et al. Accelerated solvent extraction and determination of polysaccharides in 16 alpine plants from Qinghai. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26: 1992-1999.
  - 12 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2015.
  - 13 Zhao K(赵凯), Xu PJ(许鹏举), Gu GY(谷广辉). Study on determination of reducing sugar content using 3,5-dinitrosalicylic acid method. *Food Sci* (食品科学), 2008, 29: 534-536.
- ~~~~~
- (上接第 224 页)
- 24 Guo DS(郭大山). Method of making *Areca* shampoo (槟榔洗发液洗头膏的制作方法). CN92110223. 2, 1993-04-07.
  - 25 Chinese Pharmacopoeia Commission (中华人民共和国药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China I (中国药典一部). Beijing: Chemical Industry Press, 2015. 425-1749.
  - 26 Yang JS(杨建省), et al. Research of *Amomum villosum*, *Betel Nuts*, *Hawthorn* and other three chinese herbal medicines to promote the role of gastric peristalsis. *Feed Review* (饲料博览), 2013, 2: 5-10.
  - 27 Zhou XY(周晓燕). Lag *Qingchang Decoction* in the treatment of chronic ulcerative colitis of 60 cases. *J Changchun Univ Tradit Chin Med* (长春中医药大学学报), 2011, 27: 434.
  - 28 Li CG(黎成贵), et al. Clinical Observation of Muxiangbinglang Decoction Combined with infrared liver disease Therapeutic instrument on hepatitis cirrhosis. *Hubei J Tradit Chin Med* (湖北中医杂志), 2015, 4: 14-16.
  - 29 Zhang W(张巍). To observe the clinical curative effect of chronic *Rosa areca Decoction* in the treatment of intractable diarrhea. *Asia-Pacific Tradit Med* (亚太传统医药), 2014, 10: 99-100.
  - 30 He QX(何启香), et al. Determination of cinnamic aldehyde content in Qiweibinblang powder by HPLC. *China Pharm* (中国药业), 2014, 23(18): 48-49.
  - 31 Tong HY(佟海英), et al. The experimental study on antidepressant effects of Betel-13 ingredients pill in mice. *J Med Pharm Chin Minor* (中国民族医药), 2011, 2: 49-52.
  - 32 Liu SK(刘少康), et al. Areca four tablets combined with quadruple therapy for remedial treatment for the eradication of *Helicobacter pylori*. *Xinjiang J Tradit Chin Med* (新疆中医药), 2015, 33(1): 14-17.
  - 33 He RF(何荣芬). Simultaneous determination of bile areca vitamin B1 capsule chenodeoxycholic acid in ELSD HPLC, Hyodeoxycholic Acid Content. *China Pharm* (中国药业), 2015, 24(15): 30-32.
  - 34 Zhang HJ(张慧娟). Areca new clinical use. *J Liaoning Coll Tradit Chin Med* (辽宁中医学院学报), 2004, 6: 320-321.