

高速逆流色谱分离制备青桑葚中原花青素及其抗氧化活性研究

汪玉玲,蔡为荣*,卓允允,王晴晴

安徽工程大学生物与食品工程学院,芜湖 241000

摘要:以青桑葚为原材料,经过除杂富集得到原花青素粗提物后,对粗提物采用高速逆流色谱(high-speed countercurrent chromatography,HSCCC)分离纯化;再对 HSCCC 分离所得各组分成分进行分析鉴定和抗氧化活性研究。得出青桑葚原花青素粗提物经 HSCCC 分离出 5 个组分,其中 F1 含儿茶素、原花青素 B2 和原花青素 A1;F2 中含表儿茶素没食子酸酯;F3 中含原花青素 B2;F4 中含表没食子儿茶素;F5 中为表儿茶素。分离所得 5 个组分的都具有一定的抗氧化活性,其中 F5 和 F4 对 DPPH 自由基和 ABTS⁺ 自由基的清除能力接近于同浓度 Vc,羟自由基清除能力优于同浓度 Vc。文章首次采用高速逆流色谱法对青桑葚中原花青素进行分离纯化,可为青桑葚中活性物质研究与开发提供有益技术支持。

关键词:高速逆流色谱;青桑葚;原花青素;抗氧化活性

中图分类号:TQ041+.7

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)6-0909-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.6.001

Separation of procyanidins from green mulberry by high-speed countercurrent chromatography and their antioxidant activity

WANG Yu-ling, CAI Wei-rong*, ZHUO Yun-yun, WANG Qing-qing

College of Biology and Food Engineering, Anhui Polytechnic University, Wuhu 241000, China

Abstract: Using green mulberry as raw material, after removing impurities and enriching to obtain crude procyanidin extract, the crude extract was separated and purified by high-speed countercurrent chromatography (HSCCC) and oxidative activity studies. It was concluded that the crude extract of green mulberry procyanidins was separated into five components by HSCCC. Among them, F1 contained catechin, procyanidin B2 and procyanidin A1; F2 contained epicatechin gallate; F3 contained procyanidin B2; F4 contained Epigallocatechin; epicatechin in F5. The 5 components obtained by separation all have certain antioxidant activity, among which the scavenging capacity of F5 and F4 on DPPH radical and ABTS⁺ radical is close to Vc in the same concentration, and the scavenging capacity on hydroxyl radical is better than Vc in the same concentration. This paper used HSCCC for the first time to separate and purify proanthocyanidins in green mulberry, which can provide useful technical support for the research and development of active substances in green mulberry.

Key words: high speed countercurrent chromatography; green mulberry; procyanidins; antioxidant activity

桑葚(mulberry),作为桑科植物桑树的果实^[1],营养成分丰富,具有抗癌、抗氧化、镇痛消炎、乌发美容等多种功效^[2]。青桑葚,又被称为黄桑葚,是指未成熟的桑葚,作为一种中药材,相对于成熟桑葚青桑葚更易于采摘、运输和贮存,且其成分中原花青素、儿茶素、表儿茶素类物质含量远高于成熟桑葚^[3]。国内外已有从葡萄籽、玫瑰花、玉米须、蔓越

莓、可可豆等各种植物中提取分离原花青素的研究^[4-8],Liu等^[9]使用LSA-10树脂对山楂中的原花青素进行富集纯化;Chen等^[10]采用膜分离过滤法从葡萄籽中分离低聚原花青素,使低聚原花青素含量达65%,但未得到单体分离组分;Glavnik等^[11]使用高效薄层色谱法分析了日本虎杖中的原花青素,从其粗提取物中鉴定出了原花青素的单体到十聚体以及B型原花青素,但该方法很难用于制备;Sun等^[12]采用半制备高效液相色谱法从葡萄籽中分离原花青素,但预处理复杂,且分离量低;本文选择高速逆流色谱法(high-speed countercurrent chromatog-

收稿日期:2022-01-05 接受日期:2022-03-17

基金项目:安徽省重点研发项目面上攻关(202004a06020022);安徽省教育厅重大项目(KJ2018ZD013)

*通信作者 Tel:86-015855211613;E-mail:caiweirong0781@163.com

raphy, HSCCC), 其分离量大, 可进行批量制备分离, 操作简便, 分离效率高。

原花青素 (procyanidins, PC), 作为一种多酚类化合物广泛存在于植物体中, 它主要由儿茶素、表儿茶素 (epicatechin, EC)、表没食子儿茶素 (epigallocatechin, EGC) 以及表儿茶素没食子酸酯 (epicatechin gallate, ECG) 等聚合而成, 有较强的抗氧化活性^[13,14]。本工作拟利用高速逆流色谱法从青桑葚中分离纯化原花青素类物质, 应用高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 鉴定各组分化学成分和分析其纯度; 通过考察各组分的 DPPH 自由基、ABTS⁺ 自由基以及羟自由基的清除能力, 反映其抗氧化能力强弱。这一工作拓展了桑葚深加工利用的范围, 为青桑葚原花青素工业化生产提供方向, 对桑葚作为药用资源的开发利用具有一定的参考价值。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

青桑葚购自陕西天玺尚品商贸有限公司, 40 ℃ 烘干 1 h, 至青桑葚含水量低于 10% 后粉碎, 粉碎后过 60 目筛, 低温避光储存备用。

ABTS (批号: 20200629, 国药集团化学试剂有限公司); DPPH (批号: RY393024, 安徽博美生物科技有限公司); 表没食子儿茶素 (批号: EGC060919, 安徽博美生物科技有限公司); 表儿茶素 (批号: EC060919, 安徽博美生物科技有限公司); 表儿茶素没食子酸酯 (批号: EB20191225, 安徽博美生物科技有限公司); 儿茶素 (批号: 21042621, 上海同田生物技术有限公司); 原花青素 A1 (批号: 21052539, 上海同田生物技术有限公司); 原花青素 B2 (批号: 21062924, 上海同田生物技术有限公司); 色谱纯乙腈、甲醇 (国药集团化学试剂有限公司); 其他试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器与设备

HH-4 数显恒温水浴锅 (金坛大地自动化仪器厂); 真空冷冻干燥机 (松源华兴科技发展有限公司); Multiskan FC 型酶标仪 (赛默飞世尔仪器有限公司); TBE-300B 高速逆流色谱 (上海同田生物技术有限公司); Waters 2998 液相色谱仪 (美国 Waters 公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 青桑原花青素粗提物制备

称取一定量青桑葚样品粉末置于烧杯中, 使用

60% 乙醇作为提取液, 料液比 1:20, 在 40 ℃ 水浴条件提取 90 min, 重复提取三次, 抽滤得浸提液, 再在 45 ℃ 下减压旋转蒸发至浸膏状态。浸膏用水复溶后依次用石油醚、氯仿萃取, 去除其脂类、生物碱等杂质。再用乙酸乙酯萃取, 萃取后将所得乙酸乙酯级分在 45 ℃ 条件下旋蒸除去乙酸乙酯^[15], 得到浸膏用水复溶, 真空冷冻干燥备用。

1.3.2 高速逆流色谱 (HSCCC) 溶剂系统筛选

适宜溶剂体系的筛选是 HSCCC 分离中最为复杂和关键工作, 依据 Ito 归纳认为^[16], 在不知目标组分极性的情况下, 根据本文分离物质为乙酸乙酯萃取物, 溶剂体系的筛选可以从正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水体系开始, 调整各组成溶剂的体积比。结合溶剂体系的极性和参考相关文献^[17-21] 选取了表 (1) 中各溶剂体系进行 HSCCC 分离体系筛选。同时利用高效液相法测定各个体系对目标组分的分配系数 K , 方法如下: 根据溶剂体系比例配制溶液, 剧烈震荡后静置分层, 分别取上下相各 2 mL, 准确称取 5 mg 青桑葚粗提物, 溶于上下相, 摇匀, 待两相分配达到平衡后, 将两相进行分离, 然后过 0.45 μm 滤膜, 用 HPLC 检测分析, 按式 (1) 和 (2) 计算目标组分的分配系数 K 和分离因子 (α), 通常在 HSCCC 溶剂系统中, K 值范围在 0.5 ~ 2 之间最合适。

$$K = \frac{S_{\text{上}}}{S_{\text{下}}} \quad (1)$$

$$\alpha = \frac{K_i}{K_j} \quad (2)$$

式中: $S_{\text{上}}$ 表示目标组分在上相中测得的峰面积; $S_{\text{下}}$ 表示目标组分在下相中测得的峰面积; K_i 和 K_j ($K_i \geq K_j$) 分别代表不同组分在溶剂体系中的分配系数。

1.3.3 HSCCC 分离制备

按照“1.3.2”节筛选的最佳溶剂比例组合作为 HSCCC 溶剂体系。将配好的溶剂体系静置后分层, 上相作为固定性、下相作为流动相, 超声脱气 30 min。进样前, 低温恒温槽设定温度 30 ℃, 先泵入固定相, 流速为 30 mL/min, 待固定相充满管道后, 转速为正转 850 r/min, 当转速恒定后, 以 2 mL/min 流速泵入流动相, 待检测器出口端流出一定体积流动相且紫外信号稳定, 即体系系统达到平衡, 开始进样。准确称取青桑原花青素粗提物 200 mg, 用 15 mL 流动相充分溶解, 过 0.45 μm 有机滤膜, 进样后打开色谱工作站, 检测波长为 280 nm, 根据高速逆

流实验时,设备得到的色谱流出图对出峰组分分步收集,粗提物经高速逆流色谱在 500 min 内分离得到 F1、F2、F3、F4,最后用气泵吹出固定相命名为 F5,对收集所得各个组分进行真空冷冻干燥,避光冷藏贮存备用。

1.3.4 HPLC 分析检测

分别准确称取一定量经“1.3.3”节 HSCCC 分离所得组分,用甲醇(色谱纯)配制成质量浓度为 1 mg/mL 的样品溶液,并配置一定浓度的标准品溶液,过 0.45 μm 有机滤膜,用于 HPLC 法对样品定性分析与纯度分析。采用标准品对照法和内标法对样品进行成分鉴定;依据峰面积归一法计算所得组分的纯度,按式(3)计算样品纯度^[22]。

$$W_i = \frac{f_i A_i}{\sum f_i A_i} \quad (3)$$

上式中: W_i 为待测组分 i 的峰面积比例/%; f_i 为校正因子; A_i 为待测组分 i 的峰面积。

色谱条件:Sun Fire[®] C₁₈柱(150 mm \times 4.6 mm, 5 μm);流动相 A:0.1% 甲酸-乙腈,流动相 B:0.1% 甲酸-水;梯度洗脱:0~6 min, 15% A;6~10 min, 15% \rightarrow 35% A;10~15 min, 35% \rightarrow 45% A;15~20 min, 15% A;流速 1 mL/min;检测波长 280 nm,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$;进样量 10 μL 。

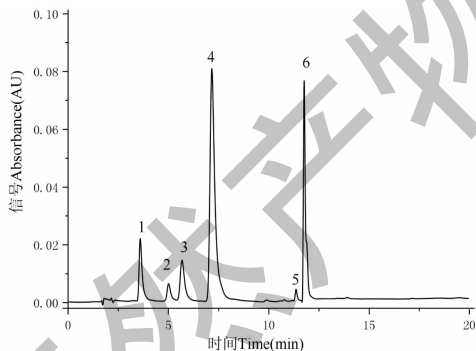


图1 标准品 HPLC 图

Fig.1 HPLC diagram of standard

注:1-EGC;2-儿茶素;3-原花青素 B2;4-EC;5-原花青素 A1;6-EGC。Note:1-EGC;2-Catechin;3-Procyanidin B2;4-EC;5-Procyanidin A1;6-EGC.

1.3.5 抗氧化能力测定

1.3.5.1 DPPH 自由基清除能力测定

参考 Li^[23] 的方法并略作修改。分别准确称取 1.0 mg 样品(青桑葚高速逆流组分 F1、F2、F3、F4、F5)用甲醇将其配制成不同质量浓度(0.10、0.20、0.30、0.40、0.50、0.60、0.70、0.80、0.90、1.00 mg/

mL)的样品溶液,在 96 孔酶标板中每孔中先后加入各组分不同浓度样品溶液 100 μL 和 0.5 mg/mL DPPH 甲醇溶液 100 μL ,室温下,暗处反应 30 min,517 nm 处测定紫外吸光度,记作实验组 A_i ;加入样品溶液和甲醇溶液各 100 μL ,记作对照组 A_j ;加入甲醇 100 μL 和 DPPH 甲醇溶液 100 μL ,记作空白组 A_0 ,每组样品设 3 组平行组;以同浓度抗坏血酸(Vc)作对比实验。按式(4)算出 DPPH 自由基的清除率。

$$\text{DPPH 自由基清除率} = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}\right) \times 100\% \quad (4)$$

1.3.5.2 ABTS⁺ 自由基清除能力测定

参考 Li^[24] 的方法并略做改动。配置 7 mmol/L 的 ABTS 溶液及 2.45 mmol/L 的过硫酸钾溶液,按 1:1 的体积比摇匀混合后常温避光放置 16~24 h,得到 ABTS 自由基阳离子储备液。然后,用甲醇稀释约 6 倍。取 ABTS 稀释液 200 μL 与 100 μL 的不同浓度的样品液混合,室温、避光条件下反应 6 min,立即测定其在 734 nm 处的吸光度,记作实验组 A_i ;加入样品 100 μL 和超纯水 200 μL ,记作对照组 A_j ;加入超纯水 100 μL 和 ABTS 工作液 200 μL ,记作空白组 A_0 ,每组样品设 3 组平行组;以同浓度抗坏血酸(Vc)作对比实验;按照公式(5)计算 ABTS 自由基的清除率。

$$\text{ABTS}^+ \text{ 自由基清除率} = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}\right) \times 100\% \quad (5)$$

1.3.5.3 羟基自由基清除能力测定

采用 Fonton 反应-水杨酸法测定羟基自由基清除能力。在 96 孔酶标板中每孔中先后加入试样和 9 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液、9 mmol/L 硫酸亚铁溶液及 9.79 mmol/L 过氧化氢溶液各 50 μL ^[25]。37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温条件下反应 30 min,510 nm 处测定吸光度值记为实验组 A_i 。加入样品 50 μL 和超纯水 150 μL ,记作对照组 A_j ;加入超纯水 50 μL 和上述三种溶剂各 50 μL ,记作空白组 A_0 ;以同浓度抗坏血酸(Vc)作对比实验;每组样品设 3 组平行组;按照公式(6)计算羟基自由基的清除率。

$$\text{羟基自由基清除率} = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}\right) \times 100\% \quad (6)$$

2 结果与分析

2.1 HSCCC 溶剂系统的确定

根据青桑葚粗提物的 HPLC 色谱图(如图 2),结合标准品出峰时间(如图 1)并选取粗提物中占比

较大物质组分作为目标组分,则选择了图2中峰1、2、3和4四个目标化合物色谱峰。

按照“1.3.2”方法测定不同溶剂体系中目标组分1、2、3、4的分配系数 K 并计算组分1与组分2和组分3与组分4相对的分离子 α ,如表1所示。根据所得目标组分在不同溶剂中的分配系数和分离子 α ,并比较具体分离效果,可知当溶剂体系对不同组分的分配系数 K 接近于1,分离子 α 接近1.5时,即选取正己烷-乙酸乙酯-水(1:20:20, V/V/V)作为分离青桑葚中原花青素的HSCCC溶剂体系有较优分离效果。

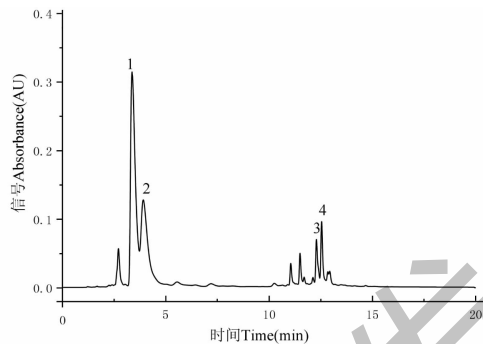


图2 青桑葚粗提物 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of crude extract of green mulberry

表1 不同溶剂体系中四个目标组分的分配系数和分离因子

Table 1 Partition coefficients and separation factors of four target components in different solvent systems

溶剂体系 Solvent system (V/V/V/V)	K_1	K_2	K_3	K_4	α_{12}	α_{34}
正己烷:乙酸乙酯:甲醇:水(0.17:12.5:1:12.5)	0.361	0.541	0.339	2.142	1.499(2/1)	6.319(4/3)
正己烷:乙酸乙酯:甲醇:水(1:5:1:5)	0.757	0.342	0.816	1.364	2.213(1/2)	1.672(4/3)
正己烷:乙酸乙酯:水(1:10:10)	1.157	0.424	0.953	1.290	2.729(2/1)	1.354(4/3)
正己烷:乙酸乙酯:水(1:20:20)	0.984	0.763	0.897	0.666	1.390(1/2)	1.347(4/3)
正己烷:乙酸乙酯:水(1:50:50)	0.580	0.674	0.777	0.775	1.162(2/1)	1.003(3/4)

2.2 HSCCC 分离制备结果

经“2.1”溶剂体系筛选优化,优化前后青桑原花青素粗提物 HSCCC 分离效果如图3,优化前溶剂体系为正己烷:乙酸乙酯:甲醇:水(0.17:12.5:1:12.5, V/V/V/V),固定相保留率为64.28%,100 min左右开始出峰,色谱分离出2个峰,分离效果较差;而经溶剂体系筛选后以正己烷-乙酸乙酯-水(1:20:20, V/V/V)作为分离青桑葚原花青素粗提物的 HSCCC 溶剂体系,体系固定相保留率为64.21%,与

优化前相差不大,出峰时间提前约20 min,分离出4个峰,如图3中优化后谱图所示。

如图3中青桑中青桑葚粗提物 HSCCC 分离效果图所示,根据分离效果计算出从200 mg青桑原花青素粗提物经 HSCCC 分离所得各组分的质量和得率分别为 F1 (28.5 mg, 14.25%)、F2 (10.43 mg, 5.22%)、F3 (6.85 mg, 3.43%)、F4 (10.65 mg, 5.33%)、F5 (13.65 mg, 6.83%)。

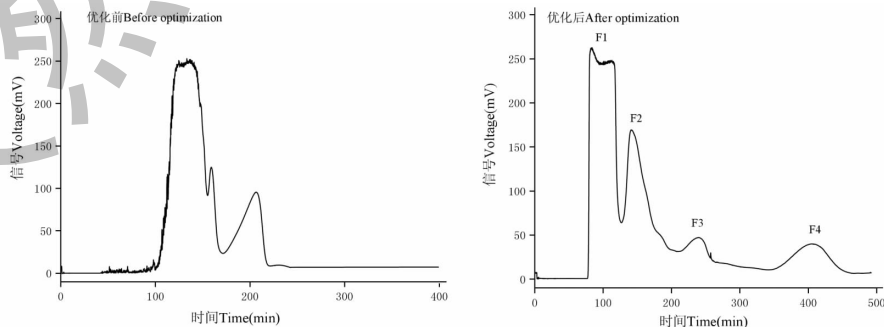


图3 HSCCC 分离青桑中原花青素粗提物溶剂优化前后色谱图

Fig. 3 Chromatogram of HSCCC separation of crude procyanidins extract from green mulberry before and after solvent optimization

2.3 HPLC 检测分析结果

采用 HPLC 对青桑葚粗提物经 HSCCC 分离所

得的五个组分(F1、F2、F3、F4、F5)进行液相色谱检测分析,其结果如图4分别为 HSCCC 分离组分 F1

~ F5 的液相色谱图。

由图可知,HSCCC 分离对青桑原花青素粗提取物中相近组分有较好分离效果,如图 2 中的组分 1 与组分 2,其中组分 1 在 F4 中被富集,而组分 2 主要位于 F2。对照表儿茶素、儿茶素、表没食子儿茶素、

表儿茶素没食子酸酯、原花青素 A1、原花青素 B2 等标品的 HPLC 图(见图 1),根据保留时间对照标品初步推测定性,采用内标法将标品与样品混合,根据出峰时间和出峰情况推测判断样品中未知峰物质是否为推测的标品物质,再按式(3)计算样品的纯度。

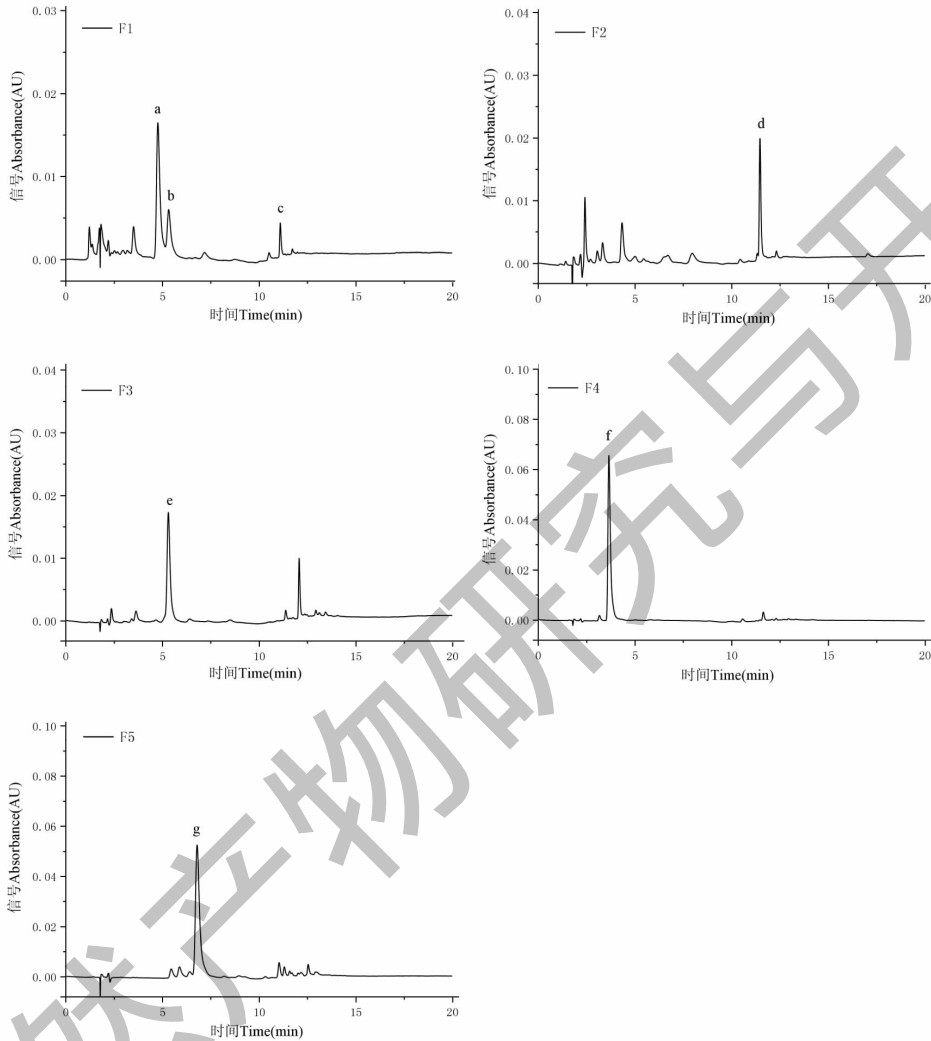


图 4 青桑葚粗提取物各组分的 HPLC 色谱图

Fig. 4 HPLC chromatogram of each component of crude extract of green mulberry

注:上图分别为 HSCCC 分离组分 F1 ~ F5 的 HPLC 色谱图。Note: The above figures are the HPLC chromatograms of HSCCC fractions F1-F5 respectively.

得出 F1 中峰 a、b 和 c 分别为儿茶素 (38.54%)、原花青素 B2 (12.96%) 和原花青素 A1 (9.58%); F2 中峰 d 为 ECG (18.54%); F3 中峰 e 为原花青素 B2 (51.10%); F4 中峰 f 为 EGC, 纯度达到 95.05%; F5 中峰 g 为 EC, 纯度达到 73.75%。相似结构与性质物质的分离是天然产物分离制备的重难点, 通过此高速逆流色谱分离, 可将原花青素粗提取物液相谱图中相近出峰物质分离在不同组分中,

为后期的单体分离奠定了基础。

2.4 抗氧化结果分析

2.4.1 DPPH 自由基清除能力分析

DPPH 是一种较为稳定的含氮自由基, 分子结构简单, 广泛用于各类天然产物的体外抗氧化活性研究。文中测定的青桑葚粗提取物经 HSCCC 所得五个组分不同质量浓度 (0.1 ~ 1 mg/mL) 对 DPPH 自由基的清除活性如图 5 所示, 随着不同组分样品浓

度的增加,其 DPPH 自由基的清除能力也逐渐增强, DPPH 自由基清除能力各个组分比较: F5 > F4 > F2 > F3 > F1 > 青桑葚粗提物,但差于同浓度 Vc,其中 F4 与 F5 的 DPPH 自由基清除率明显优于其他三个组分,且当两者浓度大于 0.3 mg/mL 时,其 DPPH 自由基清除率大于 80%,可能是由于 F4、F5 纯度较高的原因。另外 F2 较 F1 好,这与 Liu 等^[26]文中儿茶素类物质清除 DPPH 自由基的能力: ECG > EC > 儿茶素相符。

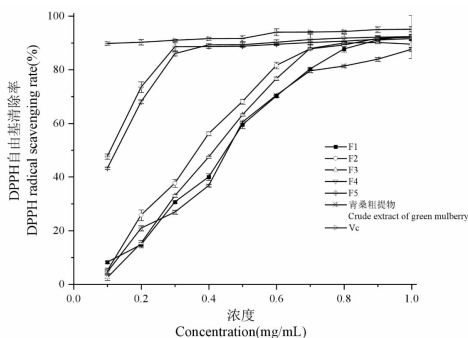


图5 不同浓度样品对 DPPH 自由基的清除率

Fig. 5 DPPH radical scavenging rate of samples with different concentrations

2.4.2 ABTS⁺ 自由基清除能力分析

ABTS⁺ 自由基溶液表现为深蓝色,在 734 nm 处有最大紫外吸收峰。随着被测物质加入 ABTS⁺ 自由基溶液后,被测物质中的部分抗氧化成分能与 ABTS⁺ 自由基发生反应而使蓝色褪去,可根据其在 734 nm 处吸光度变化测定其清除效果。由图 6 可以看出经青桑葚粗提物以及经 HSCCC 分离出的 5 个组分在 0.1 ~ 1 mg/mL 的浓度范围内,ABTS⁺ 自由基清除能力排序为: Vc > F5 > F4 > F2 > F3 > F1 > 青桑粗提物。其中 F5 和 F4 对 ABTS⁺ 自由基的清

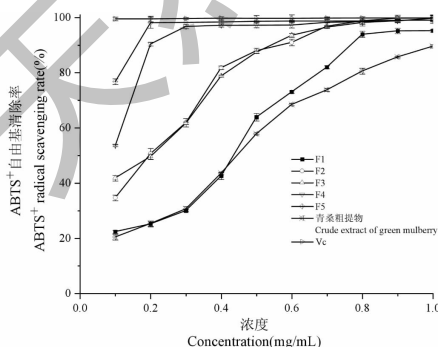


图6 不同浓度样品对 ABTS⁺ 自由基的清除率

Fig. 6 Scavenging rates of ABTS⁺ free radicals by samples with different concentrations

除率比其他组分要好,在 0.3 mg/mL 时清除率已大于 90%,但是各组分的清除效果都较同浓度 Vc 差。

2.4.3 羟基自由基清除能力分析

由图 7 知羟基自由基清除能力排序大致为: F1 > F5 > Vc > F4 > F2 > 青桑粗提物 > F3, F1、F5 和 Vc 在 0.1 ~ 1 mg/mL 不同浓度范围内,随着浓度增大,羟自由基清除率增大,且清除能力 F1 > F5 > Vc > F4; 其中 F1 组分羟自由基清除率远大于 Vc,可能是 F1 组分体系共同作用的结果; F2、F3 和青桑葚粗提物在较高浓度时,其清除率呈现负值情况,代表不但不能有效清除羟基自由基,反而能促进它的生成,这可能是由于被测物质混合物体系中含有某种物质可以产生羟基自由基,但其具体机理与原因需要进一步研究。

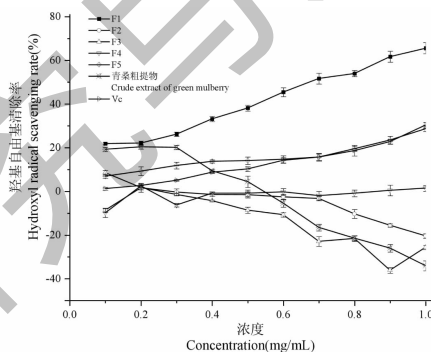


图7 不同浓度样品对羟基自由基的清除率

Fig. 7 Hydroxyl radical scavenging rate of samples with different concentration

3 结论

以青桑葚为原材料,经本实验条件下提取、脱脂除杂、萃取富集获得粗提物, HSCCC 分离纯化最佳溶剂体系为正己烷-乙酸乙酯-水 (1:20:20, V/V/V), 200 mg 青桑原花青素粗提物经 HSCCC 分离 5 个组分得率分别 F1 (28.5 mg)、F2 (10.43 mg)、F3 (6.85 mg)、F4 (10.65 mg)、F5 (13.65 mg), 各组分中含有儿茶素、原花青素 B2、原花青素 A1 等物质, 其中 F4 中含表没食子儿茶素, 纯度达到 95.05%; F5 中表儿茶素, 纯度达到 73.75%。分离所得各个组分都具有一定的抗氧化活性, 以 Vc 作为对照, DPPH 自由基清除能力: Vc > F5 > F4 > F2 > F3 > F1 > 青桑葚粗提物; ABTS⁺ 自由基清除能力: Vc > F5 > F4 > F2 > F3 > F1 > 青桑葚粗提物; 羟基自由基清除能力: F1 > F5 > Vc > F4 > F2 > 青桑葚粗提物 > F3。HSCCC 制备量大、色谱柱无填料, 本实验中粗

提物经1次分离可获得5个组分,且部分组分具有较高纯度的单体物质和较强的抗氧化活性。文章研究内容为原花青素的生产开辟了新思路,也为青桑葚中原花青素类物质的药用功效研究提供一定的理论支持。

参考文献

- Zhang XF, He Q, Zhang B, et al. Ultrasonic assisted extraction of procyanidins from mulberry with ionic liquid[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2017, 29:963-970.
- Wang JY, Mi J, Zhang S, et al. Summary of nutritional components of mulberry and development status of related products[J]. China Food(中国食品), 2021, 20:114-115.
- Xin Y, Meng S, Ma B, et al. Mulberry genes MnANR and MnLAR confer transgenic plants with resistance to *Botrytis cinerea*[J]. Plant Sci, 2020, 296:110473.
- Li RL, Zhang DJ, Zhao Q, et al. Optimization of ultrasonic assisted extraction of procyanidins from grape seeds based on response surface method[J]. Food Res Dev(食品研究与开发), 2021, 42(15):53-60.
- He XH, Yi SG, Zheng KW. Research on purification technology of cranberry pomace procyanidins[J]. China Food Addit(中国食品添加剂), 2017, 10:91-96.
- Xiong C, Wabg Y, Jin X. et al. Extraction and antitumor activity of procyanidins from corn silk[J]. Mod Food Sci Technol(现代食品科技), 2020, 36(9):195-201.
- Li L, Zhang S, Cui Y, et al. Preparative separation of cacao bean procyanidins by high-speed counter-current chromatography[J]. J Chromatogr B, 2016, 1036:10-19.
- Xie RP. Changes of phenolic acids and procyanidins in lotus seeds during postharvest preservation[D]. Nanchang: Nanchang University(南昌大学), 2013.
- Liu T, Cao Y, Zhao M. Extraction optimization, purification and antioxidant activity of procyanidins from hawthorn (*C. pinnatifida* Bge. var. *major*) fruits[J]. Food Chem, 2010, 119:1656-1662.
- Chen WL, Li LH, Zhang XY. The study on membrane separation technology in the separation and purification of oligomeric procyanidins from grape seeds[J]. Food Ind(食品工业), 2011, 32(1):68-70.
- Glavnik V, Vovk I. High performance thin-layer chromatography-mass spectrometry methods on diol stationary phase for the analyses of flavan-3-ols and proanthocyanidins in invasive japanese knotweed[J]. J Chromatogr A, 2019, 1598:196-208.
- Sun BS, Belchior GP, Ricardo-da-Silva JM, et al. Isolation and purification of dimeric and trimeric procyanidins from grape seeds[J]. Chromatogr A, 1999, 841:115-121.
- Xue HK, Tan JQ, Li Q, et al. Procyanidin B2-induced apoptosis in MCF-7 cells and its mechanism[J]. Food Sci(食品科学), 2021, 42(9):91-99.
- Xu J, Li JX, Bi Y, et al. Optimization and comparison of ultrasonic and microwave assisted extraction of procyanidins from fresh flowers and essential oil residue of Kushui rose[J]. Food Sci(食品科学), 2018, 39(12):268-275.
- Liu YQ, Meng QF, Gao WT. Study on extraction technology of procyanidins from sour cherry fruit[J]. Hubei Agr Sci(湖北农业科学), 2014, 53:1384-1387.
- Ito Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography[J]. J Chromatogr A, 2005, 1065(2):145-168.
- Zhang S, Li L, Cui Y, et al. Preparative high-speed counter-current chromatography separation of grape seed proanthocyanidins according to degree of polymerization[J]. Food Chem, 2017, 219:399-407.
- Degenhardt A, Engelhardt UH, Lakenbrink C, et al. Preparative separation of polyphenols from tea by high-speed countercurrent chromatography[J]. J Agr Food Chem, 2000, 48:3425-3430.
- Lv HH, Ouyang J, Wang X, et al. Separation and purification of four flavan-3-ols from *Iris lactea* Pall. var. *chinensis* (Fisch.) Koidz by high-speed counter-current chromatography with flow-rate gradient[J]. J Chromatogr B, 2015, 988(15):127-134.
- Cheng C, Yin L, Cao XL, et al. Preparative separation of catechin and epi-catechin by high performance counter-current chromatography[J]. Food Sci(食品科学), 2012, 33(15):140-143.
- Shibusawa Y, Yanagida A, Isozaki M, et al. Separation of apple procyanidins into different degrees of polymerization by high-speed counter-current chromatography[J]. J Chromatogr A, 2001, 915:253-257.
- Xue HK, Li PC, Zhong X, et al. Separation and purification of mulberry anthocyanins by high speed countercurrent chromatography and their antioxidant activity[J]. Food Sci(食品科学), 2020, 41(15):96-104.
- Li XC, Ouyang XJ, Cai RX, et al. 3', 8''-Dimerization enhances the antioxidant capacity of flavonoids: evidence from acacetin and isoginkgetin[J]. Molecules, 2019, 24(11):2039.