

板栗壳中原花青素含量检测方法的比较研究

A comparative research on detection methods of procyanidins from chestnut shells

韦 琴

WEI Qin

(武汉工商学院环境与生物工程学院, 湖北 武汉 430065)

(Environmental and Biological Engineering College, Wuhan Technology and
Business University, Wuhan, Hubei 430065, China)

摘要:分别用两种方法测定板栗壳原花青素的含量。用高效液相色谱法测定板栗壳纯化粉末中原花青素的平均纯度为 74.78%, RSD 值为 0.99%。用铁盐催化比色法测定板栗壳原花青素含量前, 采用单因素和正交试验优化铁盐催化比色法的显色条件, 确定提取板栗壳原花青素的最佳显色反应条件为: Fe^{3+} 浓度 0.01 g/mL, 反应时间 40 min, 反应温度 100 °C, 正丁醇—盐酸体积比(V/V) 93:7, 在该优化条件下测定板栗壳纯化粉末中原花青素的平均纯度为 74.67%, RSD 值为 1.68%。铁盐催化比色法和高效液相色谱法测定含量均准确且灵敏, 相比之下高效液相色谱法的 RSD 值更低, 拥有更好的可靠性, 且更简单快速, 适用于板栗壳原花青素纯化粉末的含量测定。

关键词:板栗壳; 原花青素; 铁盐催化比色法; 高效液相色谱法

Abstract: Determining the content of procyanidins from chestnut shells respectively with two kinds of methods. The average purity of purified product was 74.78% (RSD = 0.99%) by using HPLC. Firstly optimizing molysite catalytic chromogenic condition of colorimetry to determine the colorimetric optimization of procyanidins from chestnut shells (CSPCs) by colorimetry with ferric ions as catalysis agent, on the basis of single-factor experiments, an orthogonal experimental design was employed, with Absorbance of extract as an index, to optimize four factors. The optimum colorimetric conditions were Fe^{3+} concentration of 0.01 g/mL, reaction time of 40 min, reaction temperature of 100 °C, butanol-hydrochloric acid volume ratio (V/V) of 93:7, the average purity of purified product was 74.67%

(RSD=1.68%) by using colorimetry with ferric ions as catalysis agent. The results showed that both methods have the the advantage of good accuracy and high sensitivity, of which the HPLC method is more reliable with lower RSD. Therefore, the HPLC method can detect the content of CSPCs purified product in a swift, accurate and practical way.

Keywords: chestnut shell; procyanidins; ferric ions as catalysis agent; HPLC

原花青素是一类由不同数量的儿茶素、表儿茶素或没食子酸经 C_4-C_6 或 C_4-C_8 键缩合而成的聚多酚类物质^[1]。原花青素在自然界分布广泛, 种类繁多, 具有抗癌、预防心脑血管疾病等多种生理活性, 其抗氧化、清除自由基能力、抗弹性酶活性使其在化妆品中也有广泛的应用前景^[2]。板栗, 为落叶乔木, 一直以来板栗壳大部分采用焚烧和自然腐败的方式处理后遗弃, 在浪费资源的同时还对环境造成污染。现阶段可用来测定植物中原花青素含量的方法主要有铁盐催化比色法、Folin-Ciocalteu 法、香草醛法、香兰素检测法、紫外分光光度法、高效液相色谱法、GPC 法等^[3]。铁盐催化比色法测定原花青素含量的原理是原花青素在酸性条件下加热可发生一种氧化还原反应, 转变为花青素, 而花青素与硫酸铁铵反应可生成较深颜色的化合物, 而 Fe^{3+} 在整个反应体系中则起到一个催化的作用, 且其含量达到一定水平时, 显色反应才能够完全^[4]。本研究主要是对显色反应试验条件进行改进, 即在用铁盐催化比色法测定原花青素含量前, 先优化显色反应的条件, 使原花青素能充分参与显色反应, 以使检测结果更加准确。高效液相色谱的优点为灵敏度高, 需要的样品量少, 准确度高^[5-6]。采用高效液相色谱法和铁盐催化比色法分别对板栗壳原花青素粉末的含量进行测定, 旨在为板栗壳中原花青素含量检测提供选择依据。

基金项目:湖北省教育厅科学研究计划资助项目(编号: B2015336);
武汉工商学院校级科学研究项目(编号: A2014022)
作者简介: 韦琴(1981—), 女, 武汉工商学院讲师, 硕士。
E-mail: qinnw61@163.com
收稿日期: 2015-10-21

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

板栗:产于湖北罗田;
原花青素标准品:含量>98%,天津尖峰天然产物开发公司;
AB-8 大孔树脂:天津市海光化工有限公司;
无水乙醇、正己烷、正丁醇、浓盐酸、硫酸铁铵、氢氧化钠、异丙醇、磷酸:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;
甲醇、乙腈、乙酸:色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司;

1.2 主要仪器与设备

冷冻真空干燥机:FD-1A-50 型,北京博医康试验仪器有限公司;
高效液相色谱仪:LC-1000 型,山东鲁南瑞虹化工仪器有限公司;
C₁₈柱:Kromasil C18-5 μ 型,山东鲁南瑞虹化工仪器有限公司;
色谱工作站:N2000 型,浙江大学智达信息工程有限公司;
旋转蒸发器:RE52CS 型,上海亚荣生化仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 板栗壳预处理 新鲜板栗壳在 40℃烘箱中干燥 48 h,粉碎,过 40 目筛,用正己烷浸泡并在温室摇床(150 r/min)中脱脂 24 h,过滤,滤渣置于通风橱 24 h 以去除残留的正己烷,得脱脂板栗壳粉末保存备用。

1.3.2 板栗壳原花青素的提取和纯化 取脱脂的板栗壳粉末与 50%乙醇按 1:15(*m*:*V*)混合,在 60℃的恒温水浴锅中浸提 2 h,过滤,浓缩,即得板栗壳提取液^[7]。将板栗壳提取液用 AB-8 大孔树脂纯化:以 1 mL/min 的流速上样,吸附平衡后蒸馏水清洗杂质,再用 50%的乙醇洗脱,将洗脱液浓缩后再冷冻干燥,得板栗壳原花青素纯化粉末,于 4℃冰箱保存备用。

1.3.3 高效液相色谱法

(1) 色谱条件:色谱柱为 Kromasil-C18(4.6 mm×150 mm,5 μ m);流动相为甲醇:乙腈:水=80:15:5;流速为 1 mL/min;柱温为 25℃;进样量为 10 μ L。

(2) 波长的确定:取适量的原花青素标准品用甲醇超声溶解,以甲醇为空白对照,在波长为 256~500 nm 处扫描,测定最大吸收波长。

(3) 高效液相色谱法标准曲线的绘制:精密称取原花青素标准品 2.2 mg,置 2 mL 容量瓶用甲醇定容,过 0.45 μ m 滤膜,用微量进样器分别移取反应液 2,4,6,8,10,12,15,18 μ L 进样,测定峰面积,以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标进行拟合,得出含量与峰面积之间的关系。

(4) 专属性试验:依次吸取空白对照溶液(甲醇)、原花青素对照品溶液和板栗壳原花青素纯化液 10 μ L,按 1.3.3(1)色谱条件进行测定。

(5) 高效液相色谱法测定样品纯度:精密称量板栗壳原花青素纯化粉末 1.5 mg,置 2 mL 容量瓶用甲醇定容,过 0.45 μ m 滤膜,得板栗壳原花青素供试品溶液,按 1.3.3(1)色谱条件进行测定,将峰面积带入高效液相色谱标准曲线方程中,得到供试品溶液中原花青素的浓度,用式(1)计算板栗壳原花青素纯化粉末的纯度。

$$X=\frac{C\times D\times V}{M}\times 100\%,\tag{1}$$

式中:
X——纯化粉末中原花青素的纯度,%
C——所测样品中原花青素的浓度,mg/mL;
D——稀释倍数;
V——母液体积,mL;
M——板栗壳纯化粉末的质量,mg。

(6) 可靠性检验:精密度试验,取同一份原花青素标准品,按 1.3.3(1)色谱条件进样,重复 6 次,在最大吸收波长处测定峰面积并计算 RSD 值。

稳定性试验,取相同的原花青素纯化液,在室温分别静置 0,20,40,60,80,100 min 后,按 1.3.3(1)色谱条件进样,在最大吸收波长处测定峰面积并计算 RSD 值,以检验样品的稳定性。

加样回收率试验,精密称量 6 份板栗壳原花青素纯化粉末,加入到已知浓度的原花青素标准品中,按 1.3.3(1)色谱条件进样,在最大吸收波长处测定峰面积,计算加样回收率和 RSD 值。

1.3.4 铁盐催化比色法的反应条件优化及样品纯度测定

(1) 最大吸收波长的确定:取两支试管,分别加入 60%乙醇 1 mL(空白对照)和原花青素标准溶液 1 mL。依次加入正丁醇—盐酸溶液(95:5,*m*:*V*) 6 mL 和 2%硫酸铁铵溶液 0.2 mL,密封,混匀,于沸水浴中 40 min,立即置冰水中冷却,于 460~600 nm 波长处进行全波长扫描,测出原花青素标准品和板栗壳原花青素纯化液的最大吸收波长。

(2) 反应条件优化:取一定量的板栗壳原花青素提取液,按照 Fe³⁺(硫酸铁铵)浓度、反应时间、温度和正丁醇—盐酸体积比优化反应条件。

(3) 铁盐催化比色法标准曲线的绘制:结合参考文献[8]与《保健食品检验与评价技术规范》(2003 年版)改进的试验方法如下,将原花青素标准品配制成质量浓度为 1 mg/L 的原花青素标准液,分别吸取溶液 0.0,0.1,0.2,0.3,0.4,0.5 mL 置于 2 mL 容量瓶中,用体积分数为 60%的乙醇定容,分别取 1 mL,在 1.3.4(2)中确定的最佳显色反应条件下显色,在最大吸收波长处比色测定吸光度。

(4) 铁盐催化比色法测定样品纯度:取 3.5 mg 原花青素纯化粉末,用 60%乙醇定容至 2 mL,取 1 mL 母液于 10 mL 容量瓶中,用 60%乙醇定容。在最佳显色反应条件下测定吸光度,通过铁盐催化比色法标准曲线方程计算所测样品中原花青素的浓度(mg/mL),根据式(1)计算原花青素纯化粉末的纯度。

2 结果与分析

2.1 高效液相色谱法

2.1.1 高效液相色谱法波长的确定 以甲醇为空白对照,对原花青素标准品溶液进行波长扫描见图 1,结果显示最大吸收波长为 280 nm。

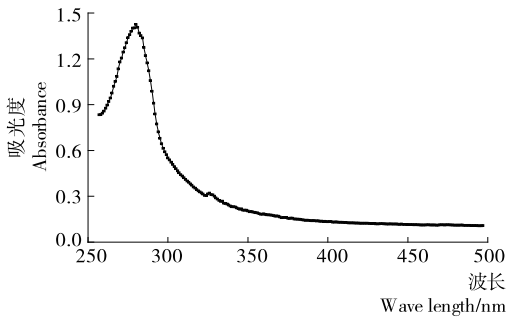


图 1 原花青素标准液波长扫描

Figure 1 The wavelength scanning of procyanidins standard

2.1.2 高效液相色谱标准曲线的测定 以原花青素标准品含量(μg)为横坐标 x ,以峰面积为纵坐标 y 进行拟合,得到峰面积与含量之间的关系为 $y = 84\,342x - 35\,097$, $R^2 = 0.999\,3$,结果表明原花青素在 $2.2 \sim 19.8\,\mu\text{g}$ 范围内线性关系良好。

2.1.3 专属性试验 图 2 显示样品溶液中原花青素出峰较好,阴性对照组在相应的保留时间上没有出现相同的色谱峰,表明阴性对照对试验无干扰。本试验在流速的选择方面,设定不同流速进行筛选,每个流速平行进样 3 次观察其出峰时间,分离度,经过分析确定流速为 $1.0\,\text{mL}/\text{min}$;在流动相的选择方面,要根据仪器的条件和试验需要达到的要求来确定流动相,在尝试以甲醇:1%乙酸($V:V=10:90$),甲醇:1%乙酸($V:V=20:80$),甲醇:1%乙酸($V:V=30:70$),甲醇:2%乙酸($V:V=20:80$),甲醇:0.1%磷酸($V:V=20:80$),甲醇:乙腈:水($V:V:V=70:20:10$)等为流动相分离板栗壳纯化液时,色谱峰有倒峰的现象;以甲醇:乙腈($V:V=80:20$)为流动相洗脱板栗壳纯化液时,有严重拖尾的现象,色谱峰不够尖锐,未达到预想的分离

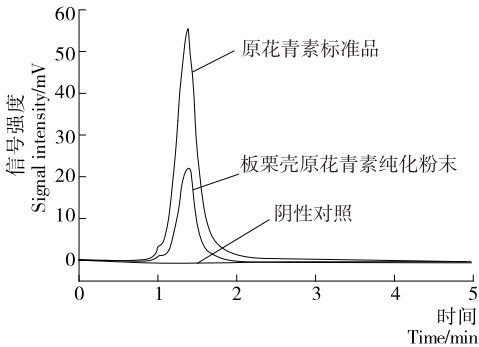


图 2 原花青素标准品、板栗壳原花青素纯化粉末、阴性对照色谱图

Figure 2 The chromatogram of procyanidins standard, purified product of CSPCs, negative control

效果。最后发现以甲醇:乙腈:水($V:V:V=80:15:5$)为流动相分离板栗壳纯化液时,所得的色谱峰尖锐,可以迅速将目标物质洗脱出来。

2.1.4 高效液相色谱法测定样品纯度 将原花青素供试品溶液所测得峰面积带入高效液相色谱标准曲线方程中,分别得到供试品溶液中原花青素的含量,计算出供试品溶液浓度后代入式(1)得到板栗壳原花青素纯化粉末的纯度分别为 75.40%,74.60%,73.80%,74.20%,75.80%,74.90%。平均值为 74.78%,RSD 值为 0.99%。

2.1.5 精密度试验 结果显示,峰面积分别为 875 277.438, 872 695.813, 836 208.813, 828 438.563, 848 168.688, 853 380.813, RSD 值为 2.22%,表明仪器的精密度较好。

2.1.6 稳定性试验 结果显示,峰面积分别为 853 247.398, 868 675.813, 876 505.836, 832 798.579, 858 148.768, 877 350.513, RSD 为 1.96%,表明样品溶液在 100 min 内稳定。

2.1.7 加样回收率试验 加样回收率试验结果见表 1。平均回收率为 97.91%,RSD 为 1.16%。

表 1 加样回收率试验结果

Table 1 Results of recovery tests

编号	样品量/ μg	加标量/ μg	测定量/ μg	回收率/ %	平均回收 率/%	RSD/ %
1	0.185	0.098	0.281	97.50	97.91	1.16
2	0.132	0.098	0.228	97.59		
3	0.144	0.098	0.241	99.41		
4	0.124	0.078	0.201	98.55		
5	0.148	0.078	0.223	96.07		
6	0.150	0.078	0.227	98.32		

2.2 铁盐催化比色法

2.2.1 铁盐催化比色法波长的确定 对显色反应后的原花青素标准品溶液进行波长扫描(见图 3)。结果显示最大吸收波长为 550 nm。

2.2.2 原花青素反应条件优化

(1) Fe^{3+} 浓度对提取液吸光度的影响:取 1 mL 板栗壳原花青素提取液,加入 6 mL 正丁醇—盐酸($95:5, m:V$)溶液和 0.2 mL 硫酸铁铵溶液, Fe^{3+} 浓度分别为 0.00, 0.01, 0.02,

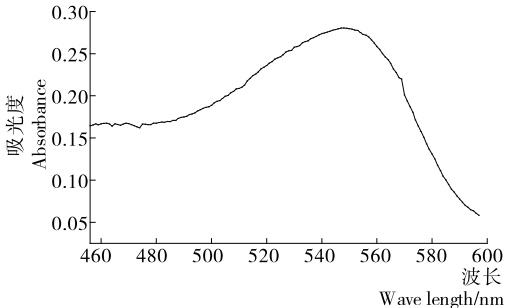


图 3 显色反应后的原花青素标准品溶液波长扫描图

Figure 3 The wavelength scanning of procyanidins standard with color reaction

0.03,0.04 g/mL,混匀,沸水浴反应 30 min,冰浴至 0℃,在 550 nm 处测定吸光度值。由图 4 可知,Fe³⁺ 浓度为 0.02 g/mL时提取液显色反应吸光度最大,说明 Fe³⁺ 在整个反应体系中起到了催化作用;而后随着 Fe³⁺ 的继续增大,吸光度下降很快,说明过量的 Fe³⁺ 对反应起一定抑制作用。

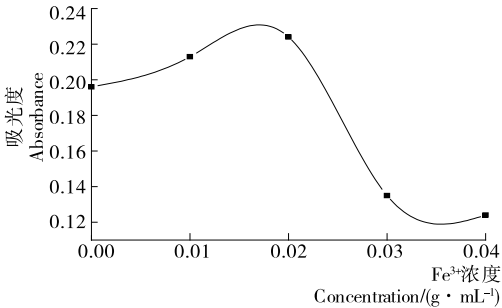


图 4 Fe³⁺ 浓度对吸光度的影响

Figure 4 Effect of Fe³⁺ concentration on absorbance

(2) 反应时间对提取液吸光度的影响:取 1 mL 板栗壳原花青素提取液,加入 6 mL 正丁醇—盐酸(95 : 5, *m* : *V*)溶液和 0.2 mL 硫酸铁铵溶液,混匀,分别在沸水浴中反应不同时间(10,20,30,40,50 min),冰浴至 0℃,在 550 nm 处测定吸光度值。由图 5 可知,反应时间为 40 min 时提取液显色反应吸光度最大,之后随着时间继续增加,吸光度下降,可能是加热时间太长,生成的复合物逐渐被分解。

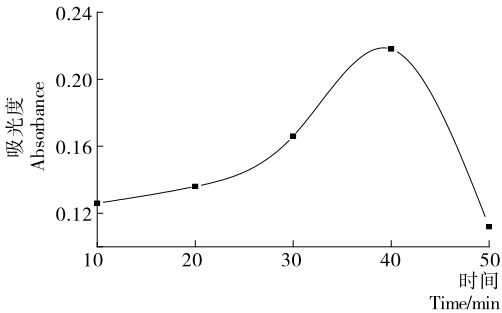


图 5 反应时间对吸光度的影响

Figure 5 Effect of reaction time on absorbance

(3) 反应温度对提取液吸光度的影响:取 1 mL 板栗壳原花青素提取液,加入 6 mL 正丁醇—盐酸(95 : 5, *m* : *V*)溶液和 0.2 mL 硫酸铁铵溶液,混匀,分别在温度为 60,70,80,90,100℃的水浴锅中,反应 40 min,冰浴至 0℃,在 550 nm 处测定吸光度值。由图 6 可知,反应温度为 100℃时提取液显色反应吸光度最大,即 100℃为最佳反应温度。但考虑到反应条件是水浴,能达到的最高温度不能超过 100℃,因此决定最佳反应温度为 90℃。

(4) 正丁醇—盐酸体积比对提取液吸光度的影响:取 1 mL板栗壳原花青素提取液,加入 0.2 mL 硫酸铁铵溶液,分别加入体积比为 96 : 4,95 : 5,94 : 6,93 : 7,92 : 8 的正丁醇—盐酸 6 mL,混匀,沸水浴反应 40 min,冰浴至 0℃,在 550 nm 处测定吸光度值。由图 7 可知,随着酸浓度的增加,吸光度先增加后有所减少,但减少并不明显;正丁醇—盐酸体积比为 93 : 7 时提取液显色反应吸光度最大,表明此时显色反应达到最佳状态。

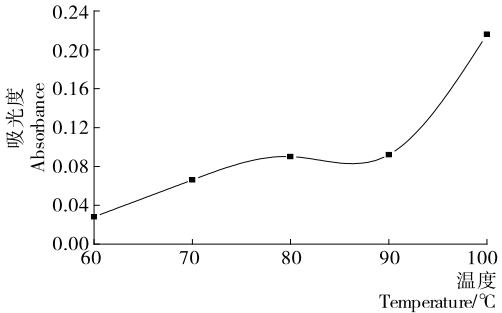


图 6 反应温度对吸光度的影响

Figure 6 Effect of reaction temperature on absorbance

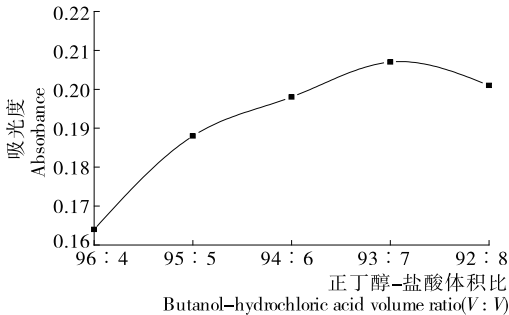


图 7 正丁醇—盐酸体积比对吸光度的影响

Figure 7 Effect of butanol-hydrochloric acid volume ratio on absorbance

(5) 最佳显色反应条件确定:根据单因素的试验结果,选择 L₉(3⁴)正交试验,试验设计因素与水平见表 2,结果见表 3。

表 2 正交试验设计方案

Table 2 Design scheme in orthogonal experiments array

水平	A Fe ³⁺ 浓度/ (g · mL ⁻¹)	B 反应时 间/min	C 反应温 度/℃	D 正丁醇—盐酸 体积比
1	0.01	30	80	94 : 6
2	0.02	40	90	93 : 7
3	0.03	50	100	92 : 8

表 3 正交试验结果

Table 3 Result analysis of orthogonal experiments

编号	A	B	C	D	吸光度 A
1	1	1	1	1	0.125
2	1	2	2	2	0.227
3	1	3	3	3	0.194
4	2	1	2	3	0.171
5	2	2	3	1	0.182
6	2	3	1	2	0.131
7	3	1	3	2	0.187
8	3	2	1	3	0.120
9	3	3	2	1	0.139
K ₁	0.182	0.161	0.125	0.149	
K ₂	0.161	0.176	0.179	0.182	
K ₃	0.149	0.155	0.188	0.162	
R	0.033	0.021	0.063	0.033	

由表 3 可知,各因素对显色反应吸光度的影响大小依次为: C>A=D>B,即反应温度对显色反应吸光度的影响最大。从极差分析结果来看,最佳显色反应条件为: A₁B₂C₃D₂,即: Fe³⁺ 浓度 0.01 g/mL,反应时间 40 min,反应温度 100 ℃,正丁醇—盐酸体积比 93:7,在此条件下,体系中原花青素水解氧化为花青素最充分,吸光度值最大。

(6) 验证性实验:取 1 mL 板栗壳原花青素提取液,加入 0.2 mL 硫酸铁铵溶液,体积比为 93:7 的正丁醇—盐酸 6 mL,混匀,100 ℃反应 40 min,冰浴至 0 ℃,在最大吸收波长 550 nm 处测定吸光度值,重复 3 次。测得吸光度值分别为 0.231,0.229,0.225。吸光度平均值为 0.228,RSD 为 0.013。

(7) 铁盐催化比色法标准曲线绘制:以吸光度值为纵坐标 y,原花青素标准品浓度(mg/mL)为横坐标 x,绘制标准曲

线,得到回归方程: $y = 1.7389x + 0.0071$, $R^2 = 0.9991$ 。结果表明,原花青素标准品在所试浓度 0.05~0.25 mg/mL 呈良好的线性关系。

(8) 铁盐催化比色法测定样品纯度:在最佳显色反应条件下,测定吸光度,通过铁盐催化比色法标准曲线方程计算得到样品原花青素的浓度,代入式(1)计算板栗壳原花青素纯化粉末的纯度分别为 76.21%,74.89%,75.88%,72.26%,75.88%,72.92%。纯度平均值为 74.67%,RSD 值为 1.68%。

2.3 两种检测方法测定样品纯度的结果比较

用两种检测方法测定样品纯度的结果见表 4。试验表明,铁盐催化比色法和高效液相色谱法测定含量均能测定原花青素的含量,相比之下高效液相色谱法的 RSD 值更低,拥有更好的可靠性,且更简单快速,适用于板栗壳原花青素含量的测定。

表 4 两种检测方法测定样品纯度的结果比较

Tble 4 The result comparison of two methods of testing the purity of samples %

方法	1	2	3	4	5	6	平均值	RSD
高效液相色谱法	75.40	74.60	73.80	74.20	75.80	74.90	74.78	0.99
铁盐催化比色法	76.21	74.89	75.88	72.26	75.88	72.92	74.67	1.68

3 结论

本研究在探讨铁盐催化比色法测定板栗壳原花青素含量之前,优化了显色反应的条件,使原花青素能充分参与显色反应,最佳显色反应条件为: Fe³⁺ 浓度 0.01 g/mL,反应时间 40 min,反应温度 100 ℃,正丁醇: 盐酸体积比 93:7。该优化条件下测定的待测物吸光度最大,为 0.228;板栗壳纯化粉末中原花青素的平均纯度为 74.67%,RSD 值为 1.68%。在波长的选择方面,研究了原花青素标准品铁盐催化比色法的最大吸收波长,为 550 nm,也尝试做了板栗壳原花青素提取液显色后的全波长扫描,测得最大吸收波长也为 550 nm,与标准品最大吸收波长一致。

用高效液相色谱法测定板栗壳纯化粉末中原花青素的平均纯度为 74.78%,RSD 值为 0.99%,在探索流动相的选择和配比试验过程中发现以甲醇: 乙腈: 水(V: V: V=80: 15: 5)为流动相分离板栗壳纯化液时,可以迅速将目标物质洗脱出来,所得的色谱峰尖锐。严子军等^[9]采用高效液相色谱法测定了松针中原花青素的含量,所用的色谱柱为 Zorbax Eclipse XDB-C₁₈,流动相为甲醇: 乙腈: 水(V: V: V=75: 20: 5),在此条件下原花青素分离良好。本研究发现以甲醇: 乙腈: 水(V: V: V=80: 15: 5)为流动相分离板栗壳原花青素时,可迅速将目标物质洗脱出来,且色谱峰尖锐,所用的流动相比比例与之稍有不同。

本研究中用到的两种方法(铁盐催化比色法和高效液相色谱法)均能测定板栗壳原花青素的含量,相比之下高效液相色谱法的 RSD 值更低,拥有更好的可靠性,且更简单快速,适用于板栗壳原花青素含量的测定。不足之处在于考察单因素温度对板栗壳原花青素显色反应的影响时,结果表明 100 ℃为反应的最佳条件,但试验用的是水浴,温度不能超过 100 ℃,故选择最佳温度为 90 ℃用于后续的正交试验。

这是本次试验的遗憾,因此以后类似的试验可尝试将水浴改为油浴,以拓展试验温度的设定范围。

参考文献

[1] 姜贵全. 落叶松树皮原花青素的分级纯化及催化降解研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2013: 2-10.
[2] 孙范传. 原花青素的研究进展[J]. 食品与机械, 2010, 26(4): 146-148.
[3] 董瑞霞, 李立祥, 王茜, 等. 植物中原花青素含量测定[J]. 茶业通报, 2008, 30(2): 67-69.
[4] 杜利君, 姚亚婷, 王静慧, 等. 改进铁盐催化比色法测定保健食品中原花青素[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(5): 50-52.
[5] 格日勒, 元伟, 刘淑娟. 原花青素 HPLC 测定方法研究进展[J]. 中国酿造, 2015, 33(6): 6-9.
[6] 郑俊霞, 肖付才, 李华. 香草醛—HPLC 结合法测定葡萄籽超微粉中的原花青素[J]. 食品科技, 2009, 34(11): 304-308.
[7] 张海晖, 李金凤, 段玉清, 等. 板栗壳原花青素提取及其稳定性研究[J]. 食品科学, 2011, 32(8): 5-9.
[8] 温志英, 曹妍. 响应面法优化花生红衣原花青素微波辅助提取工艺[J]. 中国粮油学报, 2011, 26(6): 97-101.
[9] 严子军, 韦寿莲, 汪洪武, 等. HPLC 法测定松针中原花青素的含量[J]. 肇庆学院学报, 2012, 33(5): 26-28.