

铁苋菜不同极性萃取物的抗氧化及抑菌活性研究

Study on antioxidant and antibacterial activities of extracts from different polar *Acalypha australis* L.

尹显楼¹ 詹济华² 谭洋¹ 裴刚¹ 李玲¹

YIN Xian-lou¹ ZHAN Ji-hua² TAN Yang¹ PEI Gang¹ LI Ling¹

(1. 湖南中医药大学药学院, 湖南长沙 410208; 2. 衡阳市中心医院药剂科, 湖南衡阳 421001)

(1. School of Pharmacy, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China;

2. Pharmaceutical Department of Hengyang Central Hospital, Hengyang, Hunan 421001, China)

摘要:采用 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)法、 β -胡萝卜素漂白法和清除一氧化氮自由基(NO)法来测定不同极性铁苋菜萃取物的抗氧化活性;通过微孔比浊法比较铁苋菜萃取物对 3 种革兰氏阴性细菌(大肠杆菌、铜绿假单胞菌和幽门螺杆菌)和 4 种革兰氏阳性细菌(表皮葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、藤黄微球菌和金黄色葡萄球菌)的抑菌效果。结果表明,铁苋菜不同极性萃取物均有较好的清除 DPPH、NO 自由基和抑制 β -胡萝卜素漂白的效果,浓度为 2.0 mg/mL 时,正丁醇萃取物清除 DPPH 自由基和抑制 β -胡萝卜素漂白能力最佳,DPPH 自由基清除率为 94.60%, β -胡萝卜素抑制率为 83.15%,乙酸乙酯萃取物清除 NO 自由基能力最强,清除率为 82.72%。抑菌试验结果显示,铁苋菜各萃取物均有较好抑菌效果,对革兰氏阳性菌抑菌效果优于革兰氏阴性菌,其中石油醚萃取物对大肠杆菌、表皮葡萄球菌和金黄色葡萄球菌抑制作用最佳,MIC 值分别为 0.625,0.315,1.250 mg/mL。铁苋菜萃取物具有较好的抗氧化及抑菌效果。

关键词:铁苋菜;极性;萃取物;抗氧化;抑菌活性

Abstract: 1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine (DPPH) method, β -carotene bleaching method and nitric oxide (NO) method were used to determine the antioxidant activities of different extracts from *Acalypha australis* L.; All the extracts were evaluated for their bacteriostatic effect using microporous turbidimetry method, and three gram-negative bacteria; *Escherichia coli*,

Pseudomonas aeruginosa, *Helicobacter pylori* and four gram-positive bacteria; *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* were determined in our research. The results showed all the extracts we determined had the activities of better scavenging DPPH, NO free radicals and inhibition of β -carotene bleaching. At the concentration was 2.0 mg/mL, the n-butanol extract had the strongest power to scavenge DPPH free radicals and inhibit β -carotene oxidation activity. The DPPH free radical scavenging rate was 94.60% and the β -carotene inhibition rate was 83.15%. Furthermore, the ethyl acetate extract had the strongest ability to scavenge NO radicals, and the clearance rate was 82.72%. In addition, the results of bacteriostatic experiments showed that all the extracts had good antibacterial effect, and its inhibitory effect against Gram-positive bacteria was higher than that of Gram-negative bacteria. Especially, the petroleum ether extract had the best inhibitory effect on *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*, and the minimum inhibitory concentration (MIC) values were 0.625, 0.315 and 1.250 mg/mL, respectively. In conclusion, the extracts of *Acalypha australis* L. have better anti-oxidation and antibacterial effects and this research was profitable for the further study of the separation of active compounds from *Acalypha australis* L..

Keywords: *Acalypha australis* L.; different polarity extracts; antioxidant; antibacterial activity

基金项目:湖南省教育厅项目(编号:15C1037);湖南省“十二五”重点学科中药学资助项目(编号:2014);湖南省高层次卫生人才“225”工程项目(编号:2013);2018 年度湖南省中医药科研计划项目(编号:201864)

作者简介:尹显楼,男,湖南中医药大学在读硕士研究生。

通信作者:李玲(1973—),女,湖南中医药大学副教授,硕士。

E-mail: zyll319@163.com

收稿日期:2019-02-23

铁苋菜别名海蚌含珠,为大戟科铁苋菜属草本植物,广布于中国南方各地区,其嫩叶可以食用,为当地民间野菜品种之一^[1]。据报道,铁苋菜主要化学成分有萜类、酚酸、黄酮和生物碱类^[2],具有清热解毒、止痢、止血之功效^[3],其中萜类、甾醇类活性成分^[4]主要集中于石油醚萃取物,酚酸、黄酮类活性成分^[5-6]主要存在于氯仿和乙酸乙酯萃取物,极性较大的正丁醇萃取物具有较多糖苷类活

性成分。目前对铁苋菜的研究^[7-9]主要集中在其多糖和总黄酮的抗氧化以及总黄酮抑菌活性方面,对铁苋菜酚酸类活性成分系统分离研究比较缺乏。如王春景等^[10]试验仅考察铁苋菜中甲醇、70%乙醇等极性较大溶剂提取物的抗氧化和抑菌效果,并未对其中具体的抗氧化和抑菌主要活性成分进行进一步系统分离。

本试验拟以铁苋菜为原料,采取乙醇回流提取、系统梯度萃取法得到石油醚相、氯仿相、乙酸乙酯相、正丁醇相和水相5个不同极性萃取物,测定铁苋菜各萃取物的总酚酸含量,分析铁苋菜不同极性萃取物清除DPPH自由基和NO自由基的能力与抑制 β -胡萝卜素漂白能力及抑菌活性,为铁苋菜在食品天然抗氧化剂和抑菌剂方面的研究开发提供依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与amp;仪器

1.1.1 材料与amp;试剂

铁苋菜:采于湖南临武县,无病虫害;

V_C:美国Sigma公司;

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、 β -胡萝卜素:上海梯希爱化成工业发展公司;

Gries试剂(0.1% α -萘胺和2%磷酸的水溶液、1%对氨基苯酸):天津市光复经济化工研究所;

亚油酸、吐温-80、硝普钠:国药集团化学制剂有限公司;

磷钼钨酸试液:厦门海标科技有限公司;

乙醇、石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇:分析纯,恒兴化学试剂制造有限公司。

1.1.2 试验菌种

大肠杆菌(*Escherichia coli*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*):湖南中医药大学医学基础微生物与免疫学教学中心提供。

1.1.3 主要仪器

电子分析天平:ES-320型,美国德安特公司;

真空干燥箱:DZF-6050AB型,北京中兴伟业仪器有限公司;

旋转蒸发仪:N-1300型,上海爱朗仪器有限公司;

超净工作台:SW-CJ-1F型,郑州宏朗仪器设备有限公司;

酶标仪:DNM-9602型,北京普朗新技术有限公司;

生化培养箱:SHH-150L型,重庆四达仪器有限公司;

紫外可见分光光度计:UV1800PC型,上海奥析科学仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 铁苋菜不同极性萃取物的制备 称取干燥的铁苋菜地上部分10 kg,粉碎后过40目筛,用70%乙醇回流提取3次,每次2 h,过滤合并滤液,于60℃减压旋转蒸发溶剂,得到铁苋菜固体浸膏415.40 g,用水搅散摇匀,先用石油醚萃取除去色素、油脂等弱极性物质,再用氯仿、乙酸乙酯和正丁醇等溶剂按体积1:2的比例来依次萃取,减压蒸发溶剂干燥,依次得到石油醚相73.00 g、氯仿相6.20 g、乙酸乙酯相9.20 g、正丁醇相57.25 g和水相148.60 g,各相浸膏置于4℃冰箱冷藏备用。按式(1)计算各不同萃取物浸膏的提取率,每个部位结果平行测定3次,取平均值。

$$T = \frac{W_m}{W_n} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

T——各部位浸膏的提取率,%;

W_m——各部位浸膏的重量,g;

W_n——乙醇提取物的重量,为415.40 g。

1.2.2 总酚酸含量测定 采用Folin-Ciocalteu法^[11-13]。

(1) 标准曲线的绘制:精密移取0, 0.10, 0.20, 0.30, 0.60, 0.90, 1.20, 1.50 mL的没食子酸对照品溶液(0.1 mg/mL),分别置于25 mL容量瓶中,精密加入0.50 mL磷钼钨酸试液,再精密加入14.00, 13.90, 13.80, 13.70, 13.40, 13.10, 12.80, 12.50 mL蒸馏水,摇匀,再用27%碳酸钠溶液定容至刻度线,摇匀,避光放置60 min,以相应空白试剂做空白,在760 nm处测定吸光度值,绘制标准曲线(曲线方程: $Y = 0.128X + 0.116$, $R^2 = 0.997$),如图1所示。结果表明在0.4~6.0 μ g/mL的范围内具有良好的线性关系,该方程可用于铁苋菜中总酚酸含量的测定。总酚酸含量用每克萃取物中含有的没食子酸毫克数表示。

(2) 样品总酚酸含量的测定:将样品溶液稀释一定的倍数,按照1.2.2(1)显色,得到吸光度值,并代入标准曲线方程计算总酚酸含量。

1.2.3 供试液的制备 精密称取铁苋菜石油醚、氯仿、乙酸乙酯和正丁醇萃取物和V_C各20 mg,先用70%乙醇溶

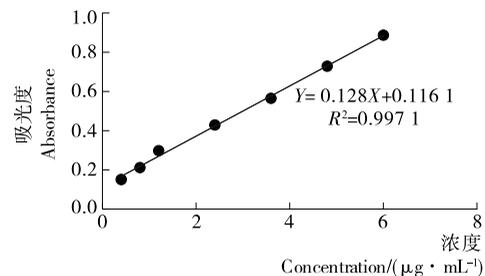


图1 铁苋菜总酚酸标准曲线图

Figure 1 Standard curve of total phenolic acids in Amaranth

液将各样品定容至 2.0 mg/mL,再用二倍稀释法配成浓度为 2.000 0,1.000 0,0.500 0,0.250 0,0.125 0,0.062 5 mg/mL 的供试液,再用 70%乙醇溶液配置成 0.004%的 DPPH 储备液,避光保存备用。

1.2.4 清除 DPPH 自由基法 参考文献[14]修改如下:将 50 μ L 供试液及 250 μ L DPPH 储备液加入到同一微孔中,摇匀,室温避光反应 30 min,用酶标仪于 517 nm 处测定吸光度 C_1 ,同时测定 250 μ L DPPH 储备液与 50 μ L 70%乙醇溶液混合后的吸光度 C_0 ,以及 50 μ L 供试液与 250 μ L 70%乙醇溶液混合后的吸光度 C_2 ,以 V_c 溶液作阳性对照,按式(2)计算清除率。

$$I = \left(1 - \frac{C_1 - C_2}{C_0}\right) \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

I ——DPPH 自由基清除率,%;

C_1 ——供试品组吸光度值;

C_2 ——空白组吸光度值;

C_0 ——对照组吸光度值。

1.2.5 β -胡萝卜素漂白法 根据文献[15],精密称取 4.0 mg β -胡萝卜素、40.0 mg 亚油酸和 400.0 mg Tween-80,混合后用 5.0 mL 氯仿溶解,于 50 $^{\circ}$ C 减压旋转蒸干氯仿,再添加 200 mL 蒸馏水超声即得乳液。分别取上述 30 μ L 供试液,对照组加入 300 μ L 乳液,空白组中 300 μ L 乳液不添加 β -胡萝卜素,以 V_c 作阳性对照,50 $^{\circ}$ C 水浴反应 60 min 后,用酶标仪测定样品在 490 nm 下 0 min 时和 60 min 时的吸光度值。按式(3)计算抑制率。

$$M = \frac{A_{60(\text{对})} - A_{60(\text{空})}}{A_{0(\text{对})} - A_{0(\text{空})}} \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

M —— β -胡萝卜素抑制率,%;

$A_{60(\text{对})}$ ——60 min 时对照组吸光度值;

$A_{60(\text{空})}$ ——60 min 时空白组吸光度值;

$A_{0(\text{对})}$ ——0 min 时对照组吸光度值;

$A_{0(\text{空})}$ ——0 min 时空白组吸光度值。

1.2.6 清除 NO 自由基法 根据文献[15],分别取上述的 80 μ L 硝普钠溶液,供试品组加入 120 μ L 供试液,空白组以不加供试液作空白,29 $^{\circ}$ C 光照 3 h,加 Gries 试剂 50 μ L,反应 0.5 h,用酶标仪测定样品在 490 nm 下的吸光度值,以 V_c 为阳性对照,每组试验重复 3 次,取平均值。按式(4)计算清除率。

$$N = \frac{A_2 - A_1}{A_c} \times 100\%, \quad (4)$$

式中:

N ——NO 自由基清除率,%;

A_1 ——供试品组吸光度值;

A_2 ——空白组吸光度值。

1.2.7 体外抑菌试验

(1) 菌株的活化和制备:将表皮葡萄球菌、铜绿假单胞菌、藤黄微球菌等 7 种菌株接种在 10 mL 营养肉汤中进行活化(布氏肉汤中接种幽门螺杆菌),于培养箱中 37 $^{\circ}$ C 恒温培养 24 h,幽门螺杆菌在微需氧条件下培养 24 h^[16]。菌落长出后,在超净工作台内挑取适量活化后的细菌接种于肉汤中,振荡混匀,幽门螺杆菌用布氏肉汤进行稀释,其他 6 种菌株则以营养肉汤稀释,调整细菌浓度为 10⁸ CFU/mL,制备得到细菌悬液。

(2) 最小抑菌浓度(MIC)的测定:参考文献[17]修改如下:试验设空白组、样品组和阳性对照组,指示菌为幽门螺杆菌样品组,以阿莫西林和甲硝唑为阳性对照,其他 6 种菌株均以阿莫西林和头孢拉定为阳性对照药。空白组加入 100 μ L 液体培养基。样品组每孔加入 100 μ L 细菌悬液和适量的各萃取物浓度为 100 mg/mL 的供试液,阳性对照组加入浓度均为 20 mg/mL 阿莫西林、头孢拉定和甲硝唑,以 2 倍稀释法对各孔进行逐步稀释,每个浓度平行 3 个复孔,使得样品终浓度为 10.000 0,5.000 0,2.500 0,1.250 0,0.625 0,0.312 5 mg/mL。阳性对照组终浓度为 2.000 0,1.000 0,0.500 0,0.250 0,0.125 0,0.062 5 mg/mL。加样完成后,用酶标仪测定在 450 nm 下的光密度值(OD)。然后将微孔板放置在温度 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。幽门螺杆菌的微孔板和蜡烛缸一同放入培养箱中培养 48 h,之后用酶标仪测定在 450 nm 下的 OD 值,按式(5)计算供试药抑菌 OD 值。

$$C = \frac{m_2 - m_1}{n_2 - n_1} \times 100\%, \quad (5)$$

式中:

C ——供试药的抑菌率,%;

m_2 ——培养后加药 OD 值;

m_1 ——培养后空白 OD 值;

n_2 ——培养前加药 OD 值;

n_1 ——培养前空白 OD 值。

供试药抑菌 OD 值越大,表明该药物抑菌效果越小。以空白孔为对照,并结合倒置显微镜观察,以不发生混浊变化,且供试药 OD 值不高于空白孔的 OD 值的最高药物稀释倍数为该药物的 MIC 值。

2 结果与分析

2.1 醇提取物及其不同极性萃取物得率、总酚酸含量

如表 1 所示,由于溶剂的极性不同对萃取物的得率、成分均有较大的影响,其中石油醚相、正丁醇相、水相的提取率较高(分别为 17.57%,13.78%,35.77%)。总酚酸含量从小到大排序为石油醚相<氯仿相<水相<正丁醇相<乙醇提取物<乙酸乙酯相,其中乙酸乙酯萃取物的总酚酸含量高达 232.36 mg/g。

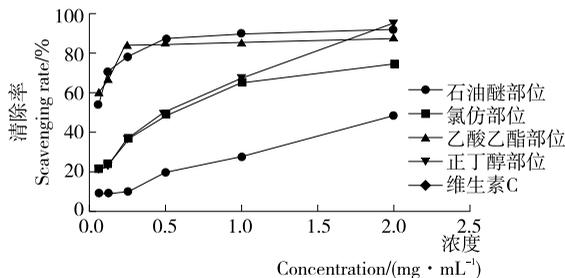
表 1 不同极性萃取物的提取率和总酚酸含量

Table 1 Extraction rate and total phenolic acid content of different polar extracts ($n=3$)

萃取物	提取率/%	总酚酸含量/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
乙醇提取物	4.15	186.73
石油醚相	17.57	16.82
氯仿相	1.49	63.85
乙酸乙酯相	2.21	232.36
正丁醇相	13.78	160.54
水相	35.77	82.22

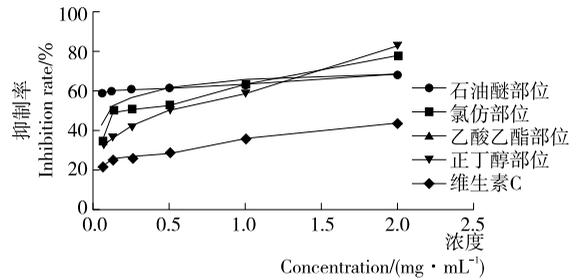
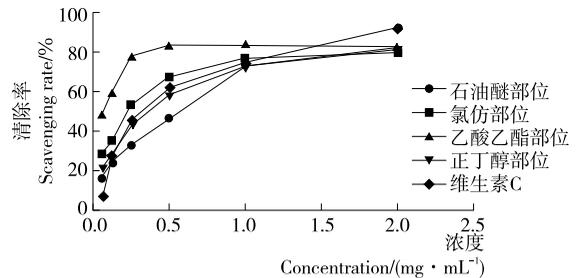
2.2 体外抗氧化试验

2.2.1 清除 DPPH 自由基能力 由图 2 可知,铁苋菜不同极性萃取物对 DPPH 自由基均具有较好的清除效果;在 0.05~2.0 mg/mL 时,各萃取物的清除率呈剂量依赖性。在浓度为 2.0 mg/mL 时,其清除率为正丁醇部位(94.60%)>乙酸乙酯部位(87.92%)>氯仿部位(74.15%)>石油醚部位(48.47%),而阳性对照药 V_C 的清除率为(95.08%),表明正丁醇萃取物的抗氧化效果最好,并且抗氧化能力与 V_C 相当。

图 2 铁苋菜不同极性萃取物和 V_C 的 DPPH 自由基清除率Figure 2 DPPH radical scavenging rate of of different polar extracts from *Acalypha australis* L. and V_C

2.2.2 抑制 β -胡萝卜素漂白反应 由图 3 可知,铁苋菜不同极性萃取物均具有较好的抑制 β -胡萝卜素漂白的效果;在 0.05~2.0 mg/mL 时,随着浓度上升,铁苋菜各萃取物对 β -胡萝卜素氧化逐渐增强。当浓度达到 2.0 mg/mL 时,对 β -胡萝卜素氧化抑制率为正丁醇部位(83.15%)>氯仿部位(78.36%)>乙酸乙酯部位(68.94%)>石油醚部位(68.74%),均比阳性对照药 V_C(44.51%)的抑制率高,其中正丁醇部位抑制 β -胡萝卜素漂白的效果最好。表明在一定的浓度范围内,铁苋菜各萃取物具有较好的抑制 β -胡萝卜素漂白反应的效果。

2.2.3 清除 NO 自由基能力 据图 4 可知,在 0.05~2.0 mg/mL 时,铁苋菜不同极性萃取物对 NO 自由基的清除率与浓度呈正相关;当浓度达到 2.0 mg/mL 时,不同

图 3 铁苋菜不同极性萃取物和 V_C 的 β -胡萝卜素漂白抑制率Figure 3 Inhibition of β -carotene oxidation by different polar extracts from *Acalypha australis* L. and V_C图 4 铁苋菜不同极性萃取物和 V_C 的 NO 自由基清除率
Figure 4 Nitric oxide radical scavenging rate of different polar extracts from *Acalypha australis* L. and V_C

极性萃取物对 NO 自由基清除率为乙酸乙酯部位(82.72%)>石油醚部位(82.49%)>正丁醇部位(81.49%)>氯仿部位(79.18%),均弱于阳性对照药 V_C(92.00%),各萃取物清除 NO 自由基能力相当。结果表明在一定的浓度范围内,铁苋菜各萃取物均具有较好的清除 NO 自由基能力。

2.3 体外抑菌试验

由表 2 可知,铁苋菜各萃取部位对所选 7 种细菌均具有不同程度的抑制效果,并且对不同细菌的 MIC 值也不同,其中对革兰氏阳性菌抑菌效果比革兰氏阴性菌效果要好。石油醚部位、氯仿部位和正丁醇部位对枯草芽孢杆菌和藤黄微球菌抑菌效果较强。特别是石油醚部位对大肠杆菌、表皮葡萄球菌和金黄色葡萄球菌抑制作用最佳, MIC 值分别为 0.625 0, 0.312 5, 1.250 0 mg/mL, 可以通过柱层析硅胶、凝胶等方法来进一步分离纯化石油醚萃取部位,筛选出明确有效的抑菌活性成分。

3 结论

经上述试验可知,铁苋菜乙醇提取物及各萃取物都含有总酚酸,各萃取物均具有较强的清除 DPPH、NO 自由基能力和抑制 β -胡萝卜素漂白的能力。正丁醇萃取物和乙酸乙酯萃取物抗氧化效果较为显著,可能与其较高

表 2 铁苋菜不同极性萃取物 MIC[†]

Table 2 MIC of different polar extracts from *Acalypha australis* L.

mg/mL

组别	革兰氏阴性菌			革兰氏阳性菌			
	大肠杆菌	铜绿假单胞菌	幽门螺杆菌	表皮葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	藤黄微球菌	金黄色葡萄球菌
石油醚部位	0.625	5.000 0	5	0.312 5	0.625 0	0.312 5	1.250 0
氯仿部位	5.000	10.000 0	>10	2.500 0	0.625 0	0.312 5	10.000 0
乙酸乙酯部位	>10.000	>10.000 0	>10	2.500 0	2.500 0	2.500 0	10.000 0
正丁醇部位	10.000	10.000 0	10	10.000 0	0.625 0	0.312 5	10.000 0
阿莫西林	0.125	2.000 0	2	0.062 5	0.062 5	0.062 5	0.500 0
头孢拉定	>2.000	0.062 5	—	0.062 5	0.062 5	0.062 5	0.062 5
甲硝唑	—	—	2	—	—	—	—

† “—”表示未进行试验。

的总酚酸含量有关^[18-19],表明各萃取物中总酚酸含量与抗氧化能力呈正相关。体外抑菌活性筛选显示,铁苋菜各萃取物均有较好的抑菌活性,尤其是石油醚部位对大肠杆菌、表皮葡萄球菌和金黄色葡萄球菌抑菌效果最为显著。经查阅文献^[20]发现,铁苋菜石油醚萃取物含有大量的三萜类和甾体类化学成分,可能是其抑菌有效活性成分。本试验系统地研究了铁苋菜不同极性萃取物的抗氧化和抑菌活性,对铁苋菜主要活性成分进行进一步富集,并对各萃取物的抗氧化和抑菌活性系列数据进行了补充,为后续能够通过柱层析等方法靶向分离抗氧化和抑菌活性化合物做前期准备。下一步将对铁苋菜乙酸乙酯萃取物和石油醚萃取物做更深入的分离纯化,以得到明确的抗氧化和抑菌活性化合物。

参考文献

[1] 梁建丽, 韦丽富, 周婷婷, 等. 铁苋菜有效成分及药理作用研究概况[J]. 亚太传统医药, 2015, 11(3): 45-47.

[2] SEEBALUCK R, GURIB-FAKIM A, MAHOMOODALLY F. Medicinal plants from the genus *Acalypha* (Euphorbiaceae): A review of their ethnopharmacology and phytochemistry[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2015, 159: 137-157.

[3] 江苏新医学院. 中药大辞典: 下册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002: 3 809-3 811.

[4] 张小琼. 裂苞铁苋菜和紫芫花的化学成分与活性研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2010: 2-4.

[5] 王晓岚, 郁开北, 彭树林. 铁苋菜地上部分的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(12): 1 415-1 417.

[6] 邓莉. 铁苋菜抗溃疡性结肠炎的药效、机制及药效物质基础研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2005: 50-52.

[7] 魏秀娟, 向发椿, 崔明筠, 等. 铁苋菜多糖体外抗氧化研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(3): 197-200.

[8] 崔明筠. 铁苋菜总黄酮的提取纯化及其抗氧化活性的研究[D]. 绵阳: 西南科技大学, 2014: 49-51.

[9] 梁曾恩妮, 蒋道松, 刘作梅, 等. 铁苋菜总黄酮提取工艺优化及其抑菌效果的初步鉴定[J]. 湖南农业科学, 2008(2):

110-112.

[10] 王春景, 胡小梅, 刘高峰, 等. 铁苋菜不同提取物的抗氧化性及抑菌活性[J]. 光谱实验室, 2012, 29(3): 1 812-1 816.

[11] SINGLETON V L, ORTHOFER R, LAMUELA-RAVENTÓS R M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent[J]. *Methods in Enzymology*, 1999, 299C(1): 152-178.

[12] 游见明, 曹新志. 福林酚法测定茶树中茶多酚的分布水平[J]. 湖北农业科学, 2013, 52(10): 2 417-2 419.

[13] 杜丹丹, 李建科. Folin-Ciocalteu 比色法测定石榴皮多酚含量条件的优化[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2011(5): 190-196.

[14] 任秋蓉, 王亚男, 王玥, 等. 密花香薷总黄酮体外抗氧化及抗肿瘤活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(1): 14-21.

[15] 詹济华, 孟英才, 谭萍, 等. 铁苋菜乙醇提取物抗流感活性及其机理的初步研究[J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(11): 1 706-1 711, 1 751.

[16] 胡丽娟, 刘蔚, 吴欢欢, 等. 加味小柴胡汤抗幽门螺杆菌的有效物质部位群研究[J]. 中国现代中药, 2016, 18(3): 307-311.

[17] 张恩户, 乔慧, 王光建, 等. 微孔比浊法测定牛黄上清片的抗菌效价[J]. 中药药理与临床, 2012, 28(3): 23-25.

[18] 黄文平, 吴柳瑾, 殷文静, 等. 铁苋菜中原儿茶酸和原儿茶醛含量的高效液相色谱法测定[J]. 时珍国医国药, 2016(7): 1 570-1 572.

[19] 魏学军, 林先燕, 李雪营, 等. 不同采收期和部位的黔产铁苋菜中没食子酸和总黄酮的含量[J]. 华西药学杂志, 2014, 29(5): 580-582.

[20] 景书灏. 铁苋菜、白三叶草的化学成分及抗菌活性研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2010: 10.