

石榴皮中鞣花酸的抗衰老性能及机理研究

邢晓平¹, 杨笑笑^{1,2}, 卢 婕², 曹玉华²

(1. 盐城工学院 化学与生物工程学院, 江苏 盐城 224051; 2. 江南大学 化学与材料工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 利用光谱法研究了石榴皮中鞣花酸的抗衰老性能和机理。首先, 通过分光光度法考察了鞣花酸对DPPH·、·OH和·O₂⁻等3种自由基的清除率和弹性蛋白酶抑制率, 结果证明了鞣花酸抗衰老能力强。其次, 以弹性蛋白酶为研究对象, 利用光谱法探讨了鞣花酸对弹性蛋白酶的作用机理。结果表明, 鞣花酸与弹性蛋白酶发生作用并形成络合物, 当鞣花酸的质量浓度为4.57 mg/mL时, 鞣花酸对弹性蛋白酶的抑制率高达88.26%。当鞣花酸浓度低于4.0×10⁻⁵ mol/L时, 其荧光猝灭机理主要是静态猝灭, 鞣花酸浓度较高时动态猝灭所占比例增加。因此, 鞣花酸可以作为天然自由基清除剂与弹性蛋白酶抑制剂应用于抗衰老化妆品中。

关键词: 鞣花酸; 抗衰老; 光谱法

中图分类号: S665.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2015)04—0436—07

Studies on the Anti-Aging Effect of Ellagic Acid from Pomegranate and Its Mechanism of Action

XING Xiaoping¹, YANG Xiaoxiao^{1,2}, LU Jie², CAO Yuhua²

(1. School of Chemical and Biotechnology, Yancheng Institute of Technology, Yancheng 224051, China; 2. School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The anti-aging effects and mechanisms of ellagic acid from pomegranate have been studied. Firstly, free radical scavenging activity of ellagic acid was determined according to the elimination of DPPH·, ·OH and ·O₂⁻ radicals by spectrophotometry as well as the elastase inhibition activity. Secondly, the mechanism of interaction between ellagic acid and elastase was investigated with fluorescence spectra. An 88.26% inhibition rate could be reached when the ellagic acid-elastase complex was formed if the concentration of ellagic acid was 4.57 mg mL⁻¹. The fluorescence quenching of elastase when interacted with ellagic acid was regarded as a static quenching when the concentration of ellagic acid was lower than 4.0×10⁻⁵ mol L⁻¹. The dynamic quenching increased when raised the ellagic acid concentration. Ellagic acid, a natural free radical scavenger and inhibitor, has great potential in the cosmetics industry as an anti-aging ingredient.

Keywords: ellagic acid, anti-aging, spectroscopy

收稿日期: 2014-05-21

作者简介: 邢晓平(1975—), 女, 江苏滨海人, 理学博士, 副教授, 主要从事天然产物研究。E-mail: xingxiaoping@ycit.cn

石榴(*Punica granatum* L)是石榴科石榴属植物落叶灌木或小乔木,在陕西临潼、山东枣庄、安徽怀远、四川会理、云南蒙自、新疆叶城等地均有广泛的种植。石榴皮是石榴的干燥果皮,含有丰富的鞣质类化合物,包括鞣花酸、安石榴苷、安石榴林,石榴亭A、石榴亭B等^[1]。鞣花酸(Ellagic acid, EA)是石榴皮鞣质类化合物中最具代表性的单体,现有的药理研究显示鞣花酸具有抗肿瘤、抗氧化、抗突变和抗致癌等活性^[2-5],还具有凝血、降压、镇静等作用^[6]。

氧化是皮肤衰老的最大威胁之一,D.Harman率先提出了自由基衰老学说,他认为机体衰老是由于细胞正常代谢过程中产生的自由基的有害作用造成的。一般情况下,机体内的自由基的产生与消失是动态平衡的,但是年龄增大、饮食不健康、劳累过度、精神压力大等因素都能让肌肤自由基泛滥,过剩的自由基会在皮肤细胞组织中累积并与细胞膜内含量丰富的脂类物质发生氧化作用,造成生物细胞膜的损伤,从而产生面色黯淡无光泽、缺水干燥等氧化现象。因此,过剩的自由基是造成皮肤衰老的重要因素。

弹性蛋白酶(Elastase)是一种分解不溶性弹性蛋白为特征的蛋白水解酶,主要通过动物胰脏和微生物发酵获得^[7]。除了DPPH·、·OH和·O₂⁻等自由基外,对人体皮肤等产生重要影响的生物活性酶。弹性蛋白酶会使皮肤真皮中支撑皮肤结构的弹性蛋白被过度的降解,从而使皮肤产生皱纹、松弛无弹性等衰老症状。鞣花酸作为天然弹性蛋白酶抑制剂,可以有效地抑制弹性蛋白酶的活性,从而起到增强皮肤弹性,减少皱纹及色素沉着,延缓皮肤衰老等作用。

作者通过分光光度法研究了鞣花酸对DPPH·、·OH和·O₂⁻等3种自由基的清除作用,并以弹性蛋白酶为研究对象,利用荧光光谱探讨了鞣花酸对弹性蛋白酶的抑制作用及机理,为鞣花酸在抗衰老化妆品中的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

石榴产地云南蒙自,购自无锡市家乐福超市;二苯代苦味酰基自由基:分析纯,SIGMA-ALDRICH公司产品;刚果红-弹性蛋白:SIGMA-ALDRICH公司产品;猪胰弹性蛋白酶:上海迈坤化工有限公司产

品;磷酸二氢钠、十二水合磷酸氢二钠、邻二氮菲、硫酸亚铁、双氧水、三羟甲基氨基甲烷、盐酸、邻苯三酚、维生素C、硼酸、十水合四硼酸钠:分析纯,国药集团化学试剂有限公司产品。

HH-S2数显恒温水浴锅:金坛市医疗仪器厂产品;TU-1901紫外分光光度计:北京普析通用仪器有限公司产品;Cary Eclipse荧光光度计:澳大利亚瓦里安有限公司产品;SHZ-82水浴恒温振荡器:金坛市医疗仪器厂产品。

1.2 实验方法

1.2.1 石榴皮中鞣花酸的提取 参考本课题组的前期报道^[8],鞣花酸按照以下方法进行提取。将市售的新鲜石榴,手工剥皮去籽,用清水洗净,将石榴皮置于40℃恒温鼓风干燥箱中烘干,烘干后用粉碎机将其粉碎,所得石榴皮粉末置于干燥皿中备用。准确称取石榴皮粉末10g置于烧杯中,按料液质量体积比1g:15mL加入pH3.0的体积分数60%的乙醇溶液,超声提取3次,每次40min,减压过滤,合并所有滤液,浓缩,真空干燥得石榴皮粗提物。将制得的粗提物悬浮于水中,用50mL石油醚萃取5次除去脂溶性物质后,下层水相再以50mL乙酸乙酯萃取5次,合并上层萃取液并减压浓缩、真空干燥,得乙酸乙酯萃取物。称取0.2g乙酸乙酯萃取物置于圆底烧瓶中,加入1.0mol/L H₂SO₄溶液50mL,充分混匀,于100℃磁力加热搅拌器中水解6h,将所得反应液过滤,滤饼经超纯水水洗至滤液为中性,真空干燥得水解后的水不溶物即鞣花酸,保存于4℃冰箱中备用。

1.2.2 鞣花酸对DPPH自由基的清除作用 用甲醇分别配制浓度为2.0、4.0、6.0、8.0、10.0μg/mL的石榴皮粗提物溶液及鞣花酸溶液。以甲醇配制浓度为0.04mg/mL DPPH溶液。移取1mL样品溶液及3mL DPPH溶液于具塞试管中,充分混匀后,室温下避光静置30min后于517nm下测定吸光度值A₁。以1mL甲醇代替样品溶液作空白测定吸光度A₀,以3mL甲醇代替DPPH溶液测定样品溶液的吸光度A₂,以维生素C为对照品。按照下式计算DPPH自由基的清除率:

$$\text{DPPH 自由基的清除率} = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\% \quad (1)$$

1.2.3 鞣花酸对羟基自由基的清除作用 用甲醇配制浓度为0.05~0.5mg/mL的石榴皮粗提物及鞣花酸

溶液。按照表1,于试管中依次加入磷酸缓冲液(PBS)、邻二氮菲、FeSO₄、样品溶液、蒸馏水和H₂O₂。将上述试管同时置于恒温水浴槽中并在37℃下保温60 min,于510 nm处测定各组吸光度值,平行测定3次,取平均值。以维生素C为对照品,按照下式计算羟基自由基的清除率:

$$\text{羟基自由基的清除率} = \frac{(A_{\text{样品}} - (A_{\text{损伤}} - A_{\text{空白}}))}{(A_{\text{未损伤}} - A_{\text{损伤}})} \times 100\% \quad (2)$$

表1 反应液组成与体积

Table1 Compositions and volumes of reaction solution

反应液	空白管/ mL	未损伤 管/mL	损伤管/ mL	样品管/ mL
PBS(pH 7.4 0.2 mol/L)	2.0	2.0	2.0	2.0
邻二氮菲 (1.0 mmol/L)	—	1.5	1.5	1.5
FeSO ₄ (1.5 mmol/L)	—	1.0	1.0	1.0
样液	—	—	—	1.0
蒸馏水	6.0	3.5	2.5	1.5
H ₂ O ₂ (体积分数0.1%)	—	—	1.0	1.0

1.2.4 鞣花酸对超氧自由基的清除作用 分别移取50 mmol/L Tris-HCl缓冲液(pH 8.2)4.5 mL、4.2 mL蒸馏水于10 mL刻度管中,混匀后置于25℃水浴中预热20 min,取出后立即加入25℃下预热的3 mmol/L邻苯三酚0.3 mL,充分混匀,快速倒入比色皿中,319 nm处每隔0.5 min测一次吸光度,共反应5 min。以时间为横坐标,吸光度为纵坐标作图,所得直线的斜率为 ν_0 。加入邻苯三酚前,先加入一定体积的0.5 mg/mL石榴皮粗提物或鞣花酸甲醇溶液,同时蒸馏水的用量相应减少,在319 nm处进行时间扫描,作图计算所得直线的斜率为 ν_1 。以维生素C为对照品,超氧自由基的清除率计算公式如下:

$$\text{超氧自由基的清除率} = \frac{(\nu_0 - \nu_1)}{\nu_0} \times 100\% \quad (3)$$

1.2.5 鞣花酸对弹性蛋白酶抑制率的测定 采用分光光度法测定鞣花酸对弹性蛋白酶的抑制率。以刚果红-弹性蛋白为底物,弹性蛋白被酶分解后,刚果红会脱落,测定溶液中刚果红的含量以表征酶活性。以pH 8.8硼酸盐缓冲溶液分别配制不同浓度的鞣花酸、石榴皮粗提物、安石榴苷溶液。根据文献所述方法^[9],按照表2,于具塞三角烧瓶中依次加入刚果红-弹性蛋白及硼酸缓冲溶液,置于37℃水浴中预热10 min,然后加入不同浓度的样品溶液及0.2 mg/mL弹性蛋白酶溶液。将上述反应体系置于

37℃恒温水浴振荡器中振摇20 min,立即加入5.0 mL pH 6.0磷酸缓冲溶液混合终止反应,于5 000 r/min下离心15 min。准确吸取上清液2.0 mL,加入pH 8.8硼酸缓冲液和pH 6.0磷酸缓冲液等量混合液2.0 mL,充分摇匀并于495 nm测定其吸光度,抑制率计算公式如下:

$$\text{抑制率} = \left(1 - \frac{(A_1 - A_2)}{(B_1 - B_2)}\right) \times 100\% \quad (4)$$

表2 反应液组成与体积

Table 2 Compositions and volumes of reaction solution

反应液	刚果红-弹性蛋白/mg	pH 8.8硼酸缓冲液/mL	样品溶液/mL	弹性蛋白酶液/mL
A ₁	20.0	3.0	2.0	2.0
A ₂	20.0	5.0	2.0	—
B ₁	20.0	5.0	—	2.0
B ₂	20.0	7.0	—	—

1.2.6 鞣花酸对弹性蛋白酶作用机理 溶液配制:配制0.05 mol/L pH 8.8 Tris-HCl缓冲液,用此缓冲液配制1.0×10⁻⁵ mol/L弹性蛋白酶,并且保存于4℃冰箱中备用。用Tris-HCl缓冲液配制浓度为5.0×10⁻⁴ mol/L鞣花酸,临用时稀释成不同浓度的样品溶液。

荧光光谱法:分别向具塞三角烧瓶中依次加入2 mL弹性蛋白酶溶液,2 mL不同浓度的鞣花酸,在恒温水浴中振荡20 min,并且以Tris-HCl缓冲溶液为参比,设定荧光激发狭缝为2.5 nm,发射狭缝为10.0 nm,固定激发波长为278 nm,在288~500 nm自动扫描记录荧光发射光谱;固定激发波长与发射波长之差分别为15 nm和60 nm,在200~400 nm自动扫描记录同步荧光光谱。

2 结果与分析

2.1 鞣花酸对DPPH自由基的清除作用

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基(DPPH, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)是一种很稳定的自由基,这是由于苯环的共振稳定作用和空间障碍作用使处在中央的氮原子上孤对的电子不能成对。DPPH在醇溶液中呈深紫色,当有自由基清除剂存在时,DPPH中氮上的孤对电子被配对而使得溶液颜色变浅,在最大吸收波长517 nm处的吸光度变小,因此吸光度值越小表明清除剂的抗氧化能力越强^[10]。鞣花酸对DPPH自由基的清除作用结果见图1。

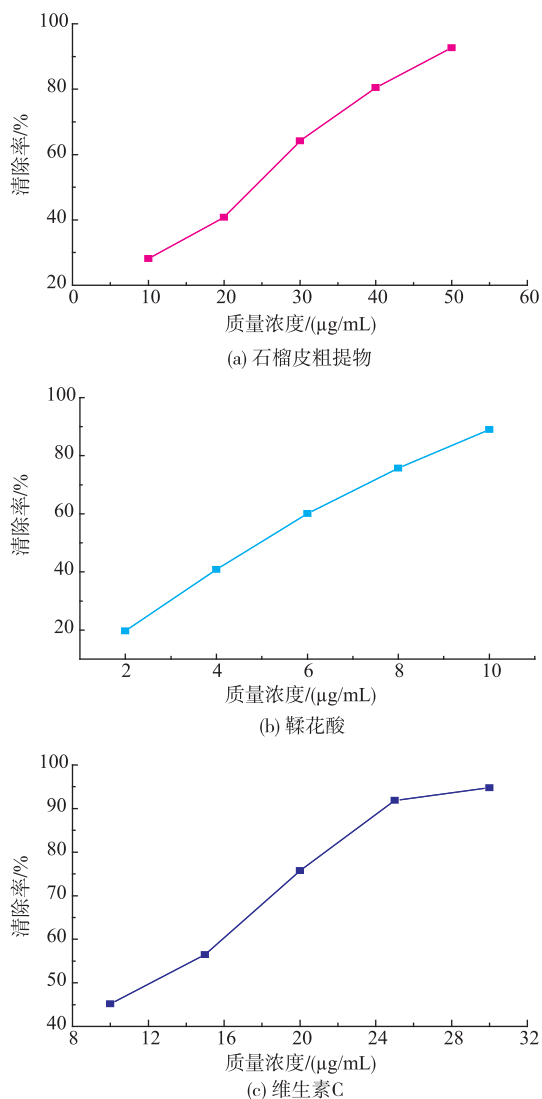


图1 DPPH 自由基的清除作用

Fig. 1 Elimination effect of DPPH radical

由图1可知,石榴皮粗提物、鞣花酸及维生素C对DPPH自由基均有清除作用,清除率随样品质量浓度的增加而增大。半数清除率(EC_{50})指清除率为50%时所需样品的浓度,根据计算所得的 EC_{50} 值可以判断样品的抗氧化能力强弱。石榴皮粗提物、鞣花酸和维生素C的 EC_{50} 值分别为24.15、4.92和13.49 $\mu\text{g/mL}$,可见鞣花酸的清除能力最强,维生素C的 EC_{50} 值是鞣花酸的2.7倍。结果表明三者对DPPH自由基的清除能力顺序为:鞣花酸>维生素C>石榴皮粗提物。

2.2 鞣花酸对羟基自由基的清除作用

羟基自由基是一种重要的活性氧,也是毒性最大的自由基,且反应性强、寿命极短,对人体造成极大的危害。采用 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}$ 体系,通过Fenton反应生

成 $\cdot\text{OH}$ 后,邻二氮菲- Fe^{2+} 被 $\cdot\text{OH}$ 氧化为邻二氮菲- Fe^{3+} ,其在510 nm处最大吸收峰消失,根据吸光度的变化反映样品对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用^[11]。鞣花酸对 $\cdot\text{OH}$ 的清除结果见图2。

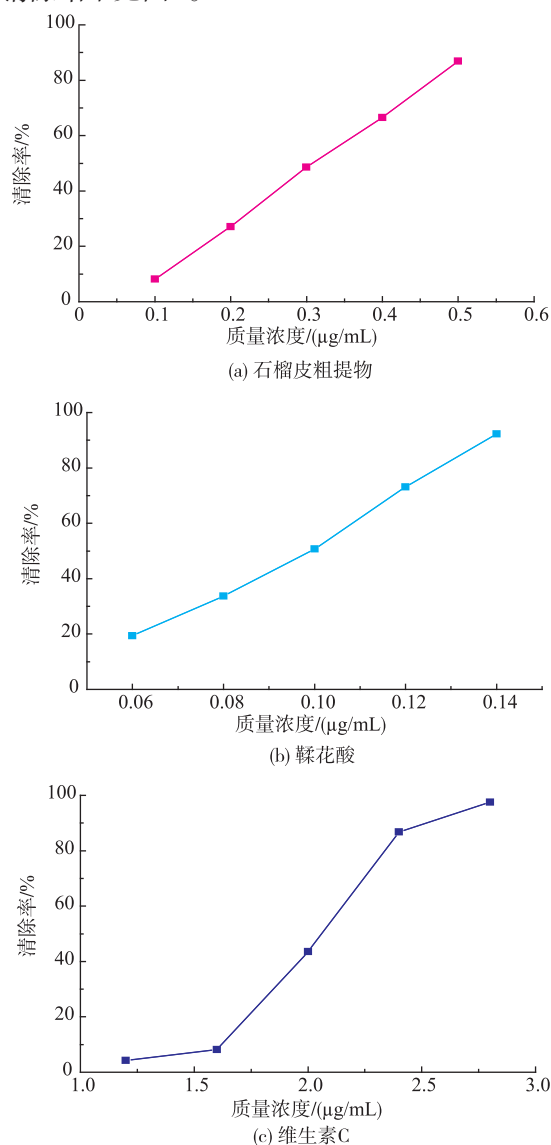


图2 羟基自由基的清除作用

Fig. 2 Elimination effect of hydroxyl radical

从图中可以看出,石榴皮粗提物、鞣花酸及维生素C对 $\cdot\text{OH}$ 均有良好的清除作用,且随着质量浓度的增加,对 $\cdot\text{OH}$ 清除作用也逐渐增强。当鞣花酸质量浓度为0.14 mg/mL时,清除率高达92.26%,而在此浓度范围内,维生素C对 $\cdot\text{OH}$ 没有清除作用。石榴皮粗提物、鞣花酸和维生素C的 EC_{50} 值分别为0.31、0.09和2.05 mg/mL,可见石榴皮粗提物、鞣花酸的清除率明显高于维生素C,三者对 $\cdot\text{OH}$ 清除能力的强弱顺序为:鞣花酸>石榴皮粗提物>维生素C。

2.3 鞣花酸对超氧自由基的清除作用

邻苯三酚在碱性条件下能够迅速发生自氧化,释放出 $\cdot\text{O}_2^-$,生成有色的中间产物。当有清除剂存在时,可阻止中间产物的累积,使邻苯三酚自氧化速率降低,根据吸光度的变化反映样品对 $\cdot\text{O}_2^-$ 的清除作用。鞣花酸对 $\cdot\text{O}_2^-$ 的清除结果见图3。

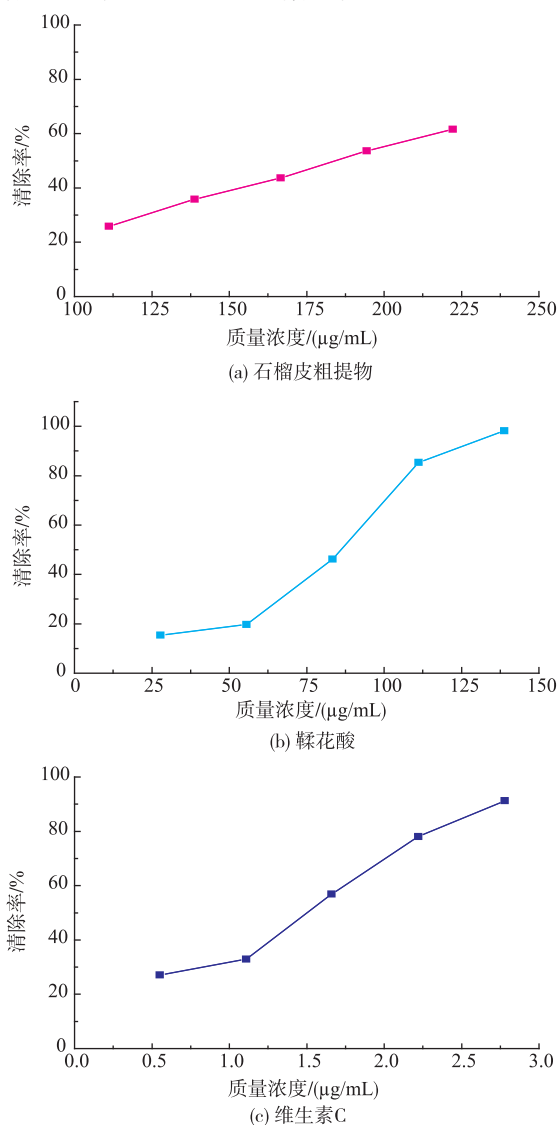


图3 超氧自由基的清除作用

Fig. 3 Elimination effect of super oxygen radical

实验结果表明,三者对 $\cdot\text{O}_2^-$ 均有清除作用,并且清除率与样品的用量存在一定的量效关系。石榴皮粗提物、鞣花酸和维生素C的 EC_{50} 值分别为184.01、85.91和1.54 $\mu\text{g/mL}$,三者对 $\cdot\text{O}_2^-$ 的清除能力的强弱顺序为:维生素C>鞣花酸>石榴皮粗提物。在一定的浓度范围内,与维生素C相比,鞣花酸对 $\cdot\text{O}_2^-$ 的清除能力不明显。

从上述3种自由基体系的测定结果可以看出鞣花酸具有强自由基清除能力,其作用机理推测如下:鞣花酸属于酚酸类化合物,具有邻苯二酚型酚羟基,而酚羟基是氢或质子的给予体,酚羟基发生脱氢反应后会与另一个酚羟基形成氢键,新生成的邻苯醌结构使苯氧自由基更稳定,这种结构不再具有夺取氢原子所需的能量,因而活性很弱,活性强的自由基(如羟基自由基、超氧自由基等)被活性弱的苯氧自由基所取代,终止了自由基链式反应,起到清除自由基的作用^[12-13]。

2.4 鞣花酸对弹性蛋白酶的抑制作用

按照1.2.5项下所述方法测定鞣花酸对弹性蛋白酶抑制作用,并与石榴皮粗提物及粗提物纯化得到的安石榴苷作比较,实验结果如图4所示。

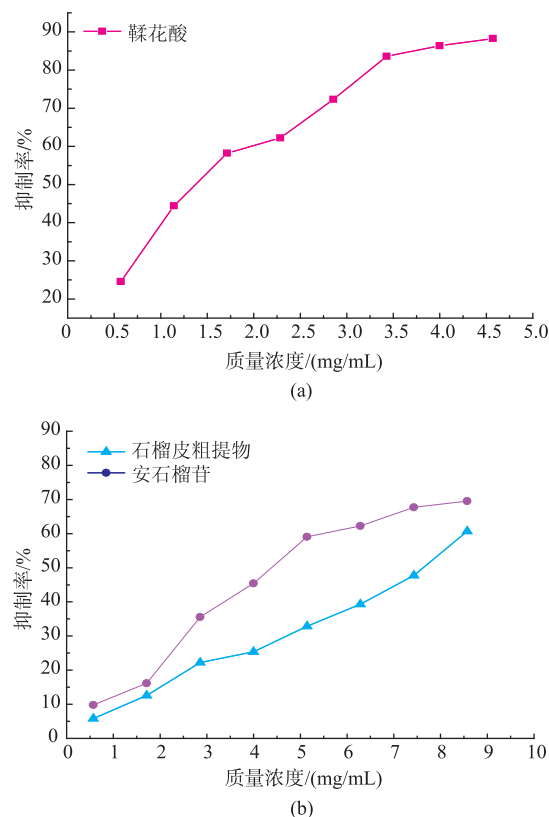


图4 不同石榴活性物对弹性蛋白酶的抑制作用

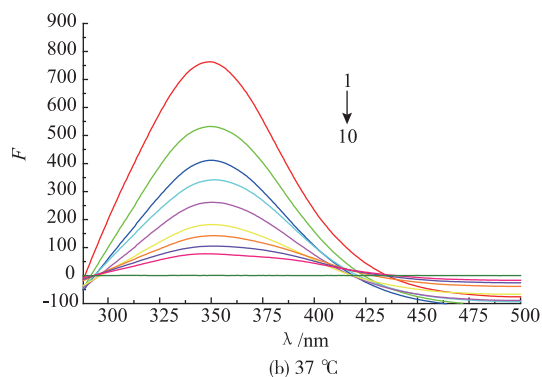
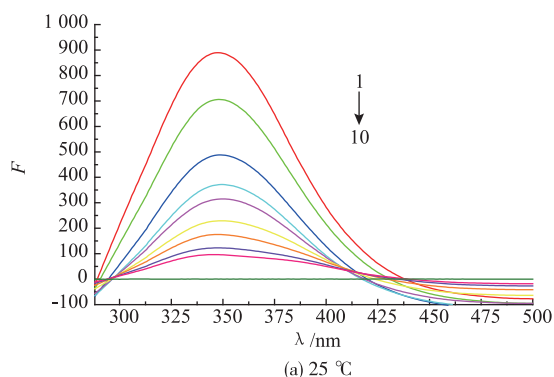
Fig. 4 Inhibition of actives in pomegranate on elastase

由图4可以看出,鞣花酸、石榴皮粗提物和安石榴苷对弹性蛋白酶活性均有一定的抑制作用,且随着浓度的增加均逐渐增强。当鞣花酸的质量浓度为4.57 mg/mL时,抑制率高达88.26%。鞣花酸、石榴皮粗提物、安石榴苷对弹性蛋白酶的 IC_{50} 值分别为1.44、7.33和4.27 mg/mL,说明弹性蛋白酶抑制作

用强弱顺序为鞣花酸>安石榴苷>石榴皮粗提物。

2.5 鞣花酸对弹性蛋白酶的荧光猝灭光谱

蛋白质中因含有酪氨酸、色氨酸及苯丙氨酸等残基而具有内源性荧光。图5为鞣花酸对弹性蛋白酶的荧光猝灭光谱。当激发波长为278 nm时,弹性蛋白酶荧光发射波长在348 nm处。鞣花酸在288~500 nm范围内均无荧光发射峰,表明鞣花酸对弹性蛋白酶的荧光强度无影响。弹性蛋白酶的荧光强度随着鞣花酸浓度的增加有规律地降低,出现典型的荧光猝灭现象。



1~9为 $c_{\text{elastase}}=1.0\times 10^{-5}$ mol/L, $c_{\text{EA}}=0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0$, and 6.0×10^{-5} mol/L; 10为 $c_{\text{elastase}}=0.0\times 10^{-5}$ mol/L, $c_{\text{EA}}=6.0\times 10^{-5}$ mol/L

图5 不同温度下鞣花酸对弹性蛋白酶荧光光谱的影响

Fig. 5 Influence of EA on fluorescence spectra of elastase at different temperatures

2.6 鞣花酸对弹性蛋白酶的荧光猝灭机理

荧光猝灭分为静态猝灭和动态猝灭。动态猝灭是指荧光分子的激发态分子与猝灭剂分子之间相互作用,其作用过程可以用Stern-Volmer方程表示。

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[C_Q] = 1 + k_q\tau_0[C_Q] \quad (5)$$

式中, F_0 为无鞣花酸存在时弹性蛋白酶的荧光强度, F 为有鞣花酸存在时弹性蛋白酶的荧光强度,

$[C_Q]$ 为鞣花酸的浓度, K_{SV} 为动态猝灭常数, k_q 为双分子猝灭过程速率常数, τ_0 为无鞣花酸时弹性蛋白酶的平均寿命。

由实验数据作出弹性蛋白酶的Stern-Volmer曲线,从图6中可以看出,当鞣花酸浓度低于 4.0×10^{-5} mol/L时曲线线性良好,而浓度较大时曲线向上弯曲,相关系数下降。当鞣花酸的浓度低于 4.0×10^{-5} mol/L时,对鞣花酸的Stern-Volmer曲线进行线性回归,得到回归方程为: $y=1.072\ 1x+0.733\ 0$ ($r=0.999\ 3$)。根据公式5计算得到鞣花酸对弹性蛋白酶的荧光猝灭的速率常数 k_q 为 1.07×10^{13} L/(mol·s),由于鞣花酸对弹性蛋白酶的荧光猝灭速率常数大于生物分子在水溶液中的最大扩散系数(2×10^{10} L/(mol·s))3个数量级,表明在低浓度时鞣花酸对弹性蛋白酶荧光猝灭机理主要为静态猝灭,鞣花酸与弹性蛋白酶之间形成了复合物。当鞣花酸的浓度增大时,动态猝灭所占比例逐渐增加,Stern-Volmer曲线偏向Y轴,此时的猝灭机理为动态猝灭和静态猝灭同时存在的混合猝灭。

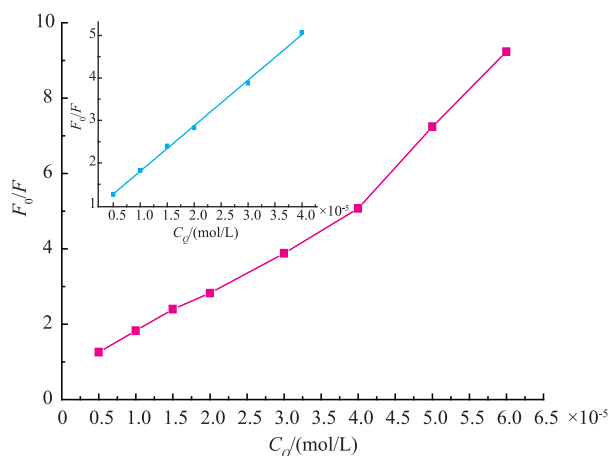


图6 鞣花酸与弹性蛋白酶作用的Stern-Volmer曲线

Fig. 6 Stern-Volmer curve of the interaction between EA and elastase

3 结 语

通过分光光度法测定鞣花酸对DPPH·、·OH、·O₂等3种自由基的清除率,结果表明鞣花酸对·O₂的清除能力弱于对照品维生素C,但鞣花酸对DPPH·、·OH的清除能力均强于维生素C。同时,通过鞣花酸对弹性蛋白酶的抑制率的测定,结果显示鞣花酸能有效抑制弹性蛋白酶活性,当鞣花酸浓度为4.57 mg/mL时,鞣花酸对弹性蛋白酶的抑制率高

达88.26%。此外,采用荧光光谱法研究鞣花酸与弹性蛋白酶的作用机理,结果表明鞣花酸与弹性蛋白酶形成络合物导致弹性蛋白酶的荧光猝灭。当鞣花酸浓度低于 4.0×10^{-5} mol/L时,鞣花酸与弹性蛋白酶间的相互作用为静态猝灭过程,鞣花酸浓度高于

4.0×10^{-5} mol/L时,动态猝灭所占比例增加。本实验表明鞣花酸能有效地清除多种自由基和抑制弹性蛋白酶的活性,从而起到延缓皮肤衰老和增强皮肤弹性等作用,为鞣花酸在抗衰老等功效性化妆品的应用方面提供参考。

参考文献:

- [1] 任彦飞,曲玮,梁敬钰. 石榴的化学成分及抗前列腺癌的研究进展[J]. 海峡药学,2011,23(9):7-11.
REN Yanfei, QU Wei, LIANG Jingyu. Progress on chemical constituents and anti-prostate cancer of punica granatum[J]. **Strait Pharmaceutical Journal**, 2011, 23(9):7-11. (in Chinese)
- [2] Seeram N P, Adams L S, Henning S M, et al. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice[J]. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 2005, 16(6):360-367.
- [3] Seeram N P, Lee R, Heber D. Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (Punica granatum L.) juice[J]. **Clinica Chimica Acta**, 2004, 348(1):63-68.
- [4] 梁俊,李建科,赵伟,等. 石榴皮多酚体外抗脂质过氧化作用研究[J]. 食品与生物技术学报,2012,31(2):159-165.
LIANG Jun, LI Jianke, ZHAO Wei, et al. Effect of pomegranate peel polyphenols on lipid peroxidation in vitro[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2012, 31(2):159-165. (in Chinese)
- [5] Lei F, Xing D M, Xiang L, et al. Pharmacokinetic study of ellagic acid in rat after oral administration of pomegranate leaf extract[J]. **Journal of Chromatography B**, 2003, 796(1):189-194.
- [6] 丁运生,孙小虎,李有桂,等. 鞣花酸及其衍生物研究进展[J]. 合肥工业大学学报:自然科学版,2009,31(11):1809-1812.
DING Yunsheng, SUN Xiaohu, LI Yougui, et al. Recent progress of ellagic acid and its derivatives[J]. **Journal of Hefei University of Technology**, 2009, 31(11):1809-1812. (in Chinese)
- [7] 刘小杰,陈启和. 弹性蛋白酶的研究进展[J]. 中国食品添加剂,2004,4:29-32.
LIU Xiaojie, CHEN Qihe. Advancement of studying on elastase[J]. **China Food Additives**, 2004, 4:29-32. (in Chinese)
- [8] 杨笑笑,邢晓平,纪白慧,等. 水解法制备石榴皮鞣花酸工艺研究[J]. 食品工业科技,2013,34(12):284-288.
YANG Xiaoxiao, XING Xiaoping, JI Baihui, et al. Study on preparation of ellagic acid by hydrolysis from pomegranate peel[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2013, 34(12):284-288. (in Chinese)
- [9] 李小晶,孙培冬,钱璟茹,等. 虎杖提取物对弹性蛋白酶的抑制作用研究[J]. 天然产物研究与开发,2012,24(3):378-380.
LI Xiaojing, SUN Peidong, QIAN Jingru, et al. Elastase inhibitory activity of extracts from polygonum cuspidatum[J]. **Natural Product Research and Development**, 2012, 24(3):378-380. (in Chinese)
- [10] 陈奕,谢明勇,弓晓峰. 黑灵芝提取物清除DPPH自由基的作用[J]. 天然产物研究与开发,2006,18:917-921.
CHEN Yi, XIE Mingyong, GONG Xiaofeng. DPPH radical scavenging effect of ganoderma atrum[J]. **Natural Product Research and Development**, 2006, 18:917-921. (in Chinese)
- [11] 柳红,张静. 不同南瓜多糖体外清除羟基自由基作用的研究[J]. 武汉植物学研究,2007,25(4):356-359.
LIU Hong, ZHANG Jing. Study on the scavenging effect of different pumpkin polysaccharide on hydroxide free radicals in vitro[J]. **Journal of Wuhan Botanical Research**, 2007, 25(4):356-359. (in Chinese)
- [12] 王晓莹. 天然抗氧化剂抗氧化活性的测定及应用[D]. 西安:西北大学,2007.
- [13] 李庆,姚开. 新型天然抗氧化剂-鞣花酸[J]. 四川食品与发酵,2001,37(4):10-14.
LI Qing, YAO Kai. New antioxidant naturally existing-ellagic acid[J]. **Sichuan Food and Fermentation**, 2001, 37(4):10-14. (in Chinese)