

洛神花花青素提取工艺及抗氧化活性研究

冯 敏^{1,2}, 幸宏伟¹, 尤琳烽^{1,2}, 刘小娟¹

1. 重庆工商大学 环境与资源学院, 重庆 400067

2. 重庆市特色农产品加工储运工程技术研究中心, 重庆 400067

摘 要:目的 用超声波辅助法优化提取洛神花中花青素的提取工艺,并通过斑马鱼胚胎氧化应激模型进行抗氧化活性研究。方法 正交法进行提取工艺优化,斑马鱼胚胎进行氧化应激干预测试抗氧化水平。结果 洛神花花青素最佳提取工艺条件:提取温度 30 ℃、超声功率 300 W、料液比 1:40(g/mL)、超声时间 90 min,此时得率为 2.94 mg/g。体外抗氧化活性表明,5.8 mg/mL 洛神花花青素对 DPPH 自由基清除率、ABTS 自由基清除率和羟自由基清除率分别为 83.15%、63.32%和 74.4%。通过斑马鱼胚胎氧化应激模型进行抗氧化活性研究发现,洛神花花青素能够有效保护由 AAPH 诱导的斑马鱼胚胎氧化损伤,11.6 μg/mL 剂量组的洛神花花青素极显著降低斑马鱼胚胎 ROS 的产生,抑制脂质过氧化物的生成和降低胚胎细胞死亡率,其作用效果与 2.9 μg/mL VC 组相近。结论 超声辅助正交优化后的工艺能提高洛神花花青素得率,比单因素最高得率提高 37%;良好的体内外抗氧化活性为进一步开发洛神花提供理论基础。

关键词:洛神花;花青素;超声波提取;抗氧化活性

中图分类号:TS201.4 **文献标识码:**A **doi:**10.16055/j.issn.1672-058X.2023.0006.001

Study on Extraction Process Optimization and Antioxidant Activity of Anthocyanin from Roselle

FENG Min^{1,2}, XING Hongwei¹, YOU Linfeng^{1,2}, LIU Xiaojuan¹

1. School of Environment and Resources, Chongqing Technology and Business University, Chongqing 400067, China

2. Storage and Transportation Engineering Technology Research Center, Chongqing Characteristic Agricultural Products Processing, Chongqing 400067, China

Abstract: **Objective** The purpose of the study is to optimize the extraction process of anthocyanins from Roselle by ultrasonic-assisted method, and to study the antioxidant activity of zebrafish embryo oxidative stress model. **Methods** The extraction process was optimized by the orthogonal method, and the antioxidant level of zebrafish embryos was tested by oxidative stress intervention. **Results** The optimal extraction conditions were as follows. The extraction temperature was 30℃, the ultrasonic power was 300 W, the solid-liquid ratio was 1:40 (g/mL), the ultrasonic time was 90 min, and the yield of anthocyanin was 2.94 mg/g. The vitro antioxidant activity showed that the DPPH free radical scavenging rate, ABTS free radical scavenging rate, and hydroxyl free radical scavenging rate were 83.15%, 63.32%, and 74.4%, respectively, with 5.8 mg/mL of Roselle anthocyanins. The antioxidant activity by oxidative stress model of zebrafish embryo research found that Roselle's anthocyanins can effectively protect the zebrafish embryo from oxidative damage induced by AAPH. 11.6 μg/mL dose group of anthocyanin significantly reduced the zebrafish embryo production of ROS, inhibited the generation of lipid peroxide, and reduced the mortality of embryonic cells. The effect was similar to that in 2.9μg/mL VC group. **Conclusion** Ultrasonic-assisted orthogonal optimization can increase the yield of anthocyanin from

收稿日期:2022-05-17 修回日期:2022-06-02 文章编号:1672-058X(2023)06-0001-07

基金项目:重庆市自然科学基金面上项目(CSTC2018JCYJAX0804);重庆市自然科学基金项目(CSTC2015JCYJA0061)。

作者简介:冯敏(1980—),女,四川成都人,讲师,博士,从事农产品贮藏与加工研究。

引用格式:冯敏,幸宏伟,尤琳烽,等.洛神花花青素提取工艺及抗氧化活性研究[J].重庆工商大学学报(自然科学版),2023,40(6):1—7.

FENG Min, XING Hongwei, YOU Linfeng, et al. Study on extraction process optimization and antioxidant activity of anthocyanin from roselle[J]. Journal of Chongqing Technology and Business University (Natural Science Edition), 2023, 40(6): 1—7.

Roselle by 37 % compared with a single factor. Good antioxidant activity in vivo and in vitro provides a theoretical basis for the further development of Roselle.

Keywords: Roselle; anthocyanins; ultrasonic extraction; antioxidant activity

1 引言

洛神花(Roselle),学名玫瑰茄(*Hibiscus sabdariffa* Linn.),又名芙蓉茄、山茄等,是锦葵科一年生的草本植物^[1],其花萼有丰富的碳水化合物、维生素、蛋白质、矿物质等,还含有还原糖、花青素,是天然的抗氧化剂^[2]。

洛神花及提取物有很多功能作用,如洛神花多糖提取物对急性肝损伤大鼠具有良好的干预治疗作用^[3],洛神花有利尿、清除氧自由基、加快脂肪代谢^[4]、降血脂以及抗肿瘤^[5]等作用。也有将洛神花开发成具有保健功能的食品,如王建化等^[6]将菊花、洛神花复合研制果酱,何菁等^[7]用玫瑰花和洛神花制作复合保健饮料等。对洛神花花青素提取及抗氧化活性也有少量报道,如张辉青花等^[8]采用果胶酶协助微波提取,提高了花青素的得率;廖禹东等^[9]对不同产地的洛神花花青素进行了体外抗氧化研究,但未见有体内抗氧化活性的研究报道,而本文是采用超声波辅助的方法优化提取洛神花花青素的工艺,并进行体内、体外抗氧化活性研究,为其进一步开发利用提供理论支持。

2 材料与方法

2.1 实验材料

洛神花干花萼(云南大理,购于重庆南坪);斑马鱼(重庆江北三禾水族馆);无水乙醇、氯化钾、冰乙酸、醋酸钠、盐酸(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);维生素C(北京鼎国昌盛生物技术有限公司);DPPH自由基清除能力试剂盒、总抗氧化能力试剂盒、羟自由基测定试剂盒(南京建成生物工程研究所);DPPP(梯希爱上海化成工业发展有限公司)、AAPH(山东西亚化工有限公司)、AO(Gen-View科学公司)、鱼饲料(泰港科技有限公司);DCFH-DA(Sigma公司);三卡因(合肥博美生物科技有限责任公司)。

2.2 仪器与设备

SQP电子天平(赛多利科学仪器(北京)有限公司)、双频数控超声波清洗仪(KQ-500VDE,昆山市超声仪器有限公司)、pH计(梅特勒—托利多国际有限公司)、小钢磨(永康市铂欧五金制品有限公司)、高速离

心机(TD-420,四川蜀科仪器有限公司)、RE-52AA旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)、酶标仪(infiniteM200瑞士Tecan)、电热恒温干燥箱(GZX-DH 500-S-II,上海跃进医疗器械厂);尼康ECLIPSE Ci-L正置荧光显微镜(NIKON仪器(上海)有限公司)。

2.3 洛神花花青素的提取

将洛神花花萼于60℃烘干后粉碎成粉末,过80目筛,避光密封保存备用。称取1g洛神花干花萼粉,加蒸馏水后进行超声处理,离心取上清液为提取液。提取液通过真空浓缩得浓缩液,4℃保存备用。通过pH示差法^[10]算得洛神花花青素的含量和得率。简述为将2份1mL的洛神花提取液,分别用pH1.0和pH4.5缓冲溶液定容至50mL,室温下平衡40min,在520nm和700nm波长下测定提取液的吸光度,根据公式可以计算出洛神花花青素的含量:

$$C = \frac{(A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}1.0} - (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}4.5}}{\varepsilon \times L \times 1000} \times MW \times DF$$

其中: C 为花青素含量(g/mL), MW 为矢车菊素-3-葡萄糖苷(449.2g/mol)的分子量; DF 为稀释因子; ε 为摩尔吸光系数26900(L/mol·cm), L 为光长度(1cm)。

2.4 单因素实验

分别称取1g洛神花干花萼粉5份置于三角瓶中,加入蒸馏水40mL,此时料液比为1:40,将工艺参数设置为超声时间为30min、提取温度为20℃、超声功率分别为200、250、300、350、400W,在此条件下提取,并按照2.3的方法计算洛神花花青素得率。在最佳超声功率条件下,检测超声时间、提取温度、料液比对洛神花花青素得率的影响。超声时间分别为20、30、40、50、60min五个水平;提取温度分别为20、30、40、50、60℃五个水平;液料比蒸馏水用量(mL):洛神花质量(g)分别为10:1、20:1、40:1、80:1、160:1五个水平。各个水平分别做三组平行实验。

2.5 正交实验

根据单因素实验结果,运用正交表 $L_9(3^4)$ 进行正交实验,优化洛神花花青素的最佳工艺条件。

表 1 正交实验因素与水平

Table 1 Orthogonal experiment factors and levels

水 平	因 素			
	时间/min	功率/W	温度/℃	料液比/(g : mL)
1	90	250	20	1 : 20
2	120	300	30	1 : 40
3	150	350	40	1 : 80

2.6 洛神花花青素体外抗氧化性的研究

体外抗氧化实验参考王胜男^[11]的方法,并结合试剂盒的使用说明配置各工作液,分别作 DPPH 自由基 (DPPH·), ABTS 自由基 (ABTS+·) 标准曲线,并根据各个指标的公式计算。

具体如下:将 0.5 mg/mL Trolox (维生素 E 类似物) 标准应用液用甲醇分别稀释成质量浓度 5、10、15、20、25 μg/mL 标准溶液各 400 μL,依次加入 600 μL 工作液,混合均匀,在 25℃ 的条件下,避光静置三十钟,在 517 nm 波长处,用酶标仪测定各管吸光度值,绘制 DPPH 自由基标准曲线。根据公式计算:

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{空白}}}\right) \times 100$$

取 10 mM Trolox 标准液用蒸馏水稀释成:0.1 mM、0.2 mM、0.4 mM、0.8 mM、1.0 mM,按照比例加入蒸馏水、待测样本、ABTS 工作液、显色剂,室温反应 6 min,在 405 nm 的波长条件下,用酶标仪测定各管吸光度值,以不同的 Trolox 浓度为横坐标,吸光值为纵坐标,来绘制 ABTS 自由基标准曲线。按照公式计算:

$$(\text{ABTS}+\cdot)\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{空白}}}\right) \times 100$$

按照比例加入蒸馏水、0.03% H₂O₂ 标准品底物应用液、样本混合后,在 37℃ 水浴条件下,准确反应 1 min,立即加入 2mL 显色剂,混合均匀之后,室温下放置 20 min,在 550 nm 波长处用酶标仪测定各管的吸光度值。按照公式计算:

$$\text{羟自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}}\right) \times 100$$

2.7 斑马鱼 ROS 的测定

实验过程参考 Kim E A 等^[12]所报道的方法并加以调整。简述为购买处于繁殖期的成年斑马鱼,适应性

喂养后进行亲代的繁殖,温度控制在 28.5±1℃,并收集斑马鱼胚胎,挑选状态良好的胚胎进行试验。胚胎 (n=8) 放入含 1 mL 胚胎介质 (充氧过夜的浓度为 0.25 mg/mL 的海水晶溶液) 的 24 孔板的孔中,分为正常组 (NC),模型组 (Model),维生素 C 组 (VC),洛神花花青素低剂量组 (Anth. L)、中剂量组 (Anth. M)、高剂量组 (Anth. H)。胚胎受精后的 6-7 小时,除正常组和模型组外,其他组分别加入相应的维生素 C 或花青素,使维生素 C 的浓度为 2.9 μg/mL,低、中、高剂量组洛神花花青素浓度为 2.9 μg/mL、5.8 μg/mL 和 11.6 μg/mL。孵育到胚胎受精后 12 h,所有组都加入 12 mM 2,2-偶氮二(2-甲基丙基咪)二盐酸盐 (AAPH) 进行共处理,直到胚胎受精后 24 h。最后,停止使用 AAPH 诱导胚胎氧化损伤,正常组和模型组放入正常胚胎介质中,其余各组则放入含有相应组别维生素 C 或洛神花提取液的介质中。2 d 后,所有组别全部更换为正常胚胎介质,并对各组进行所有指标的测试。

斑马鱼胚胎中的 ROS 产物参考 Bass D A 等^[13]方法检测;脂质过氧化物参考 Okimoto Y^[14]的方法测定。细胞死亡程度参考 Kang M C 等^[15]的方法测定。简述为在 2 dpf 时,测 ROS 用 DCFH-DA 溶液 (20 μg/mL) 处理斑马鱼胚胎,并于黑暗中孵育 1h;测 DPPH 用 DPPH 溶液 (25 μg/mL) 处理斑马鱼胚胎,并于黑暗中孵育 1 h;测细胞死亡程度用吖啶橙溶液 (AO) (7 μg/mL) 处理斑马鱼胚胎,并于黑暗中孵育 30 min。荧光染料孵育后,用新鲜的培养介质清洗斑马鱼胚胎数次,并在观察前用三卡因 (0.2 mg/mL) 对其进行麻醉。在荧光显微镜下拍摄斑马鱼胚胎的荧光图片,根据荧光强度相对比值计算抗氧化活性。

2.8 数据处理

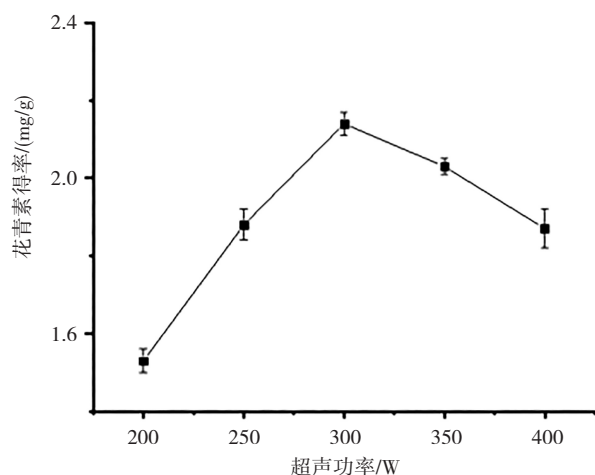
实验结果用 $\bar{x} \pm S$ 表示,数据采用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析,组间比较采用 LSD-*t* 检验, *P*<0.05 时有统计学意义。

3 结果与讨论

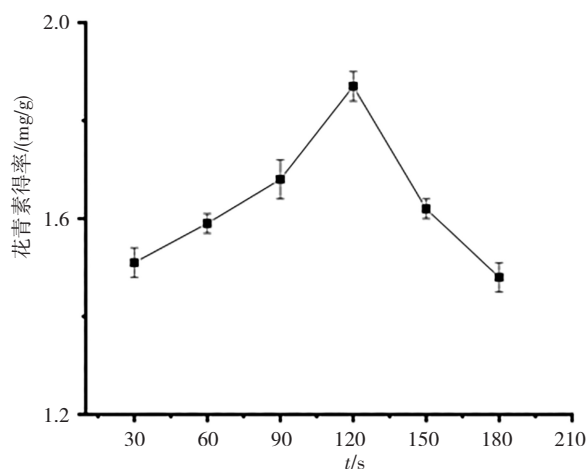
3.1 洛神花花青素提取单因素实验结果

通过单因素的变化,考察超声功率、超声时间、提取温度和提取时间对洛神花花青素得率的影响,结果如图 1 所示。在超声时间 30 min、料液比 1 : 40、提取

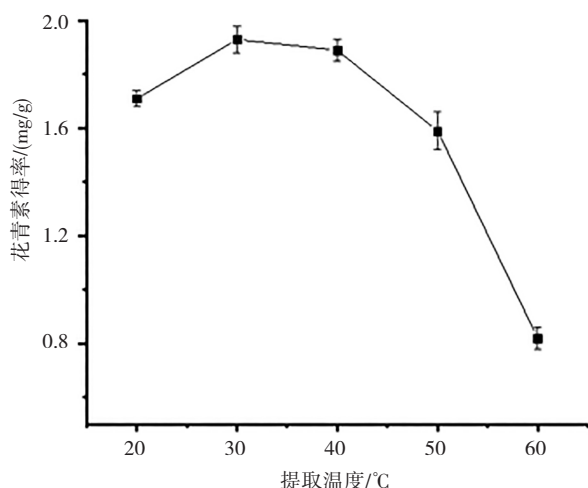
温度 20 ℃ 的条件下,超声功率对洛神花花青素得率的影响见图 1(a),花青素得率随着超声功率呈现出先升高后降低,在 300 W 时得率达到最高,为 2.14 mg/g;超声功率在 300 W 之后,超声波功率逐渐增大,提取效果反而不断下降。



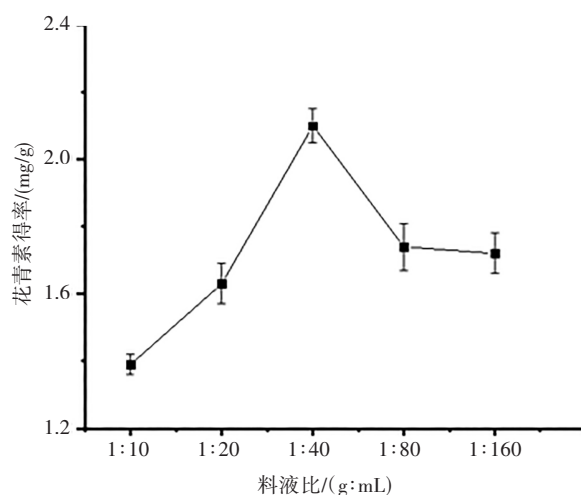
(a) 超声功率对花青素得率的影响



(b) 超声时间对花青素得率的影响



(c) 提取温度对花青素得率的影响



(d) 料液比对花青素得率的影响

图 1 不同因素提取对花青素得率的影响

Fig. 1 Effect of different factors on anthocyanin yields

在提取温度 20 ℃、料液比 1 : 40、超声波功率 200 W 的条件下,超声提取时间对洛神花花青素得率的影响见图 1(b),超声时间在 30—120 min 时,得率随着超声时间的增加而不断升高,120 min 之后花青素得率下降明显,可能由于长时间暴露于超声波振荡的环境中,使提取出的花青素容易分解,分解的速率在 120 min 分钟后高于从洛神花中提取的速率。因而超声时间过长,反而不利于对色素的提取,使花青素得率下降。

超声时间 30 min、料液比 1 : 40、超声功率 250 W 的条件下,提取温度对洛神花花青素得率的影响见图 1(c),提取温度对洛神花花青素得率有一定的影响。随着提取温度的升高,花青素得率呈现出先增大后减小的趋势,在 30 ℃ 时花青素得率最大,为 1.93 mg/g,温度继续升高,提取率降低,这可能是由于在温度较高的情况下,洛神花花青素的结构由于超声波的剪切作用的增强而被破坏,最终导致花青素提取效果不佳^[16]。

在超声时间 30 min、超声功率 250 W、提取温度 20 ℃ 的条件下,料液比对洛神花花青素得率的影响见图 1D。料液比的不断增加,得率先增大后减小。料液比在 1 : 10—1 : 40 时,洛神花花青素得率与料液比成正比,当料液比为 1 : 40 时,达到最大得率,为 2.10 mg/g,在 1 : 40 之后,料液比的大小与花青素得率成反比。

综上所述,确定最佳的超声功率为 300 W,超声提取时间为 120 min,提取温度为 30 ℃,料液比为 1 : 40,进一步展开正交优化实验。

3.2 洛神花花青素提取正交优化结果

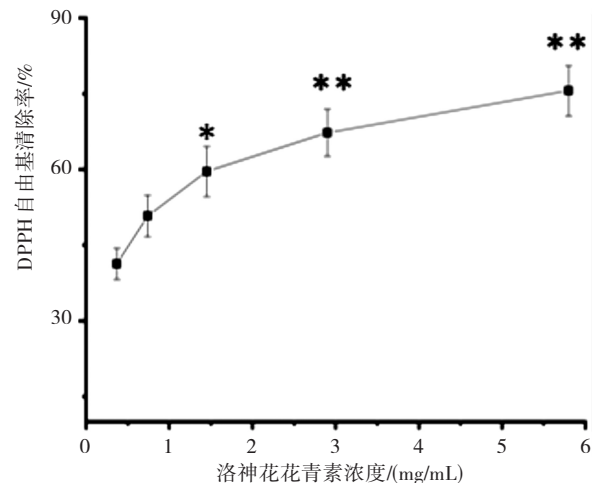
超声波辅助提取洛神花花青素正交实验结果如表 2 所示,通过正交优化后,花青素提取最佳条件为:超声时间 90 min、提取温度 30 ℃、超声功率 300 W、料液比 1 : 40;花青素得率最高,达 2.94 mg/g,比单因素实验时最高得率 2.14 mg/g 提高了 37%。四个因素对洛神花花青素得率的影响从大到小依次为超声功率、超声时间、提取温度和料液比,且超声功率对花青素得率的影响有显著性差异($P<0.05$)。

表 2 正交试验结果

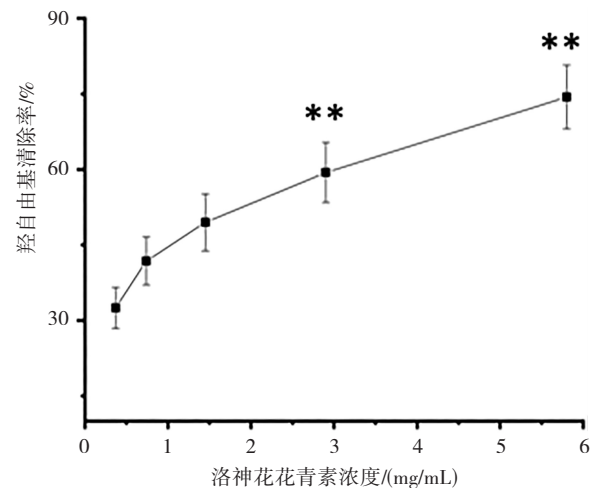
Table 2 Orthogonal test results					
试验号	时间/ min	功率/ W	温度/ ℃	料液比/ (mL · g ⁻¹)	花青素得率/ (mg · g ⁻¹)
1	1	1	1	1	2.39
2	1	2	2	2	2.94
3	1	3	3	3	2.63
4	2	1	2	3	2.25
5	2	2	3	1	2.69
6	2	3	1	2	2.57
7	3	1	3	2	2.20
8	3	2	1	3	2.45
9	3	3	2	1	2.74
K1	7.96	6.84	7.41	7.82	
K2	7.51	8.08	7.93	7.71	
K3	7.39	7.94	7.52	7.33	
R	0.19	0.41	0.17	0.16	

3.3 洛神花花青素体外抗氧化活性

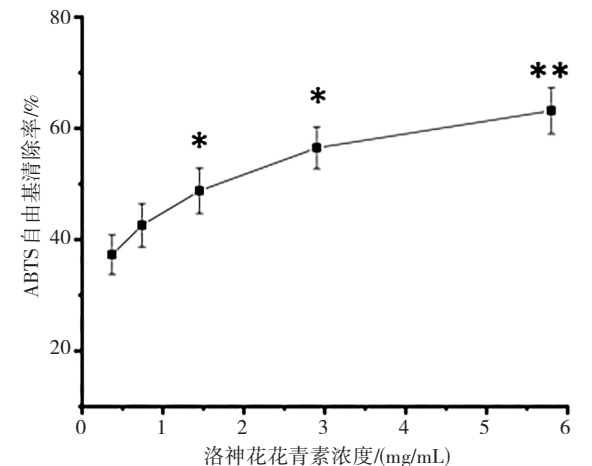
由图 2 可知,在实验浓度范围内,洛神花花青素抗氧化能力和浓度呈现一定的量效关系,即随着花青素浓度的增大,其抗氧化效果也而逐步增强。当洛神花花青素浓度达 5.8 mg/mL 时(图 2(a)),对 DPPH 自由基清除率达到 83.15%,但低于 1 mg/mL 的 VC 清除率(87.9 %);当洛神花花青素浓度从 0.37 mg/mL 等倍增加到 5.8 mg/mL 时,对羟自由基清除率从 32.5 % 增加到 74.4 % (图 2(b)),但也低于 1 mg/mL 的 VC 清除率(78.1 %);洛神花花青素对于 ABTS 自由基的清除能力较弱,当花青素浓度达 5.8 mg/mL 时,其 ABTS 自由基的清除率为 63.32 % (图 2(c)),远低于 1 mg/mL 的 VC 抗氧化能力(91.6 %)。总体来说,洛神花花青素具有抗氧化能力,但同浓度的抗氧化能力低于 VC。



(a) 洛神花花青素对 DPPH 自由基的影响



(b) 洛神花花青素对羟自由基的影响



(c) 洛神花花青素对 ABTS 自由基的影响

图 2 洛神花花青素体外抗氧化活性

Fig. 2 Antioxidant capacity of anthocyanin from Roselle

注:与洛神花花青素低浓度 0.37 mg/mL 组对比时,

* $p < 0.05$, * * $p < 0.01$.

3.4 洛神花花青素对斑马鱼胚胎氧化应激的影响

AAPH 可诱导斑马鱼胚胎产生氧化损伤,生成过量 ROS,造成大量细胞死亡^[11],通过检测斑马鱼体内 ROS 生成水平、脂质过氧化物产生率和细胞死亡率进行评价,结果如下:

从图 3 斑马鱼胚胎的荧光图可见,正常组荧光强度弱而模型组荧光强度强,在诱导剂 AAPH 刺激下,ROS 在斑马鱼中大量积累,模型组的 ROS 产物量是正常组的 197%,获得氧化应激模型,VC 和洛神花花青素的干预使 ROS 不同程度地降低。洛神花花青素低剂量组显著降低 ROS ($164.8 \pm 8.3\%$ 、 $170.1 \pm 9.2\%$) 产生,VC 组和中、高剂量洛神花花青素组显著地降低了 ROS ($121.7 \pm 10.4\%$ 、 $153.2 \pm 9.1\%$ 、 $128.1 \pm 6.8\%$) 的产生。洛神花花青素高剂量组 ($11.6 \mu\text{g}/\text{mL}$) 对抑制 ROS 的产生能力和 $2.9 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的 VC 组接近。

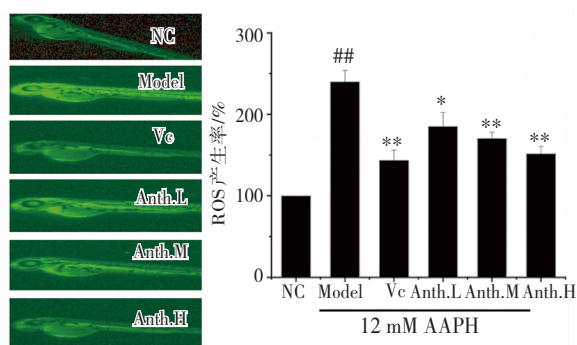


图 3 洛神花花青素对斑马鱼胚胎的 ROS 清除活性 ($\bar{x} \pm S, n=8$)

Fig. 3 Intracellular ROS scavenging activity of anthocyanin from Roselle in zebrafish embryos

注:## $p < 0.01$ vs. NC; * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. Model

活细胞膜中的过氧化物的含量与荧光强度相关^[17],通过其荧光强度检测胚胎活细胞的过氧化物的产生情况。由图 4 可见,脂质过氧化物在 AAPH 诱导的斑马鱼中大量产生,与正常组相比,模型组的脂质过氧化显著升高,约为正常组的 1.87 倍,而洛神花花青素低剂量和中剂量组与模型组对比均呈现显著的降低,降低水平分别为 15.7 % 和 19.3 %;VC 组和洛神花花青素高剂量组与模型组对比均呈现极显著降低,降低水平分别为 36.7 % 和 34.5 %。洛神花花青素干预能降低氧化应激状态的斑马鱼胚胎脂质过氧化物的产生,并具有剂量依赖性。

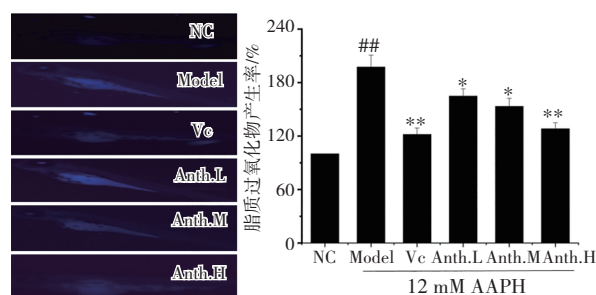


图 4 洛神花花青素对斑马鱼胚胎脂质过氧化抑制活性 ($\bar{x} \pm S, n=8$)

Fig. 4 Lipid peroxidation inhibitory activity of anthocyanin from Roselle in zebrafish embryos

注:## $p < 0.01$ vs. NC; * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. Model

通过测试由 AAPH 诱导的斑马鱼胚胎活体的细胞死亡情况进一步评估了洛神花花青素对氧化损伤的保护作用,由图 5 所示,机体的持续性氧化应激损伤将导致细胞死亡,产生较高的荧光强度,模型组细胞死亡率是正常组的 2.1 倍,而 VC 组、洛神花花青素低、中、高剂量组均不同程度地抑制细胞死亡 ($117.1 \pm 0.9\%$ 、 $154.4 \pm 4.2\%$ 、 $145.6 \pm 4.3\%$ 、 $121.2 \pm 5.8\%$),高剂量组 ($11.6 \mu\text{g}/\text{mL}$) 的洛神花花青素抵抗细胞死亡水平与 VC 组 ($2.9 \mu\text{g}/\text{mL}$) 相近。

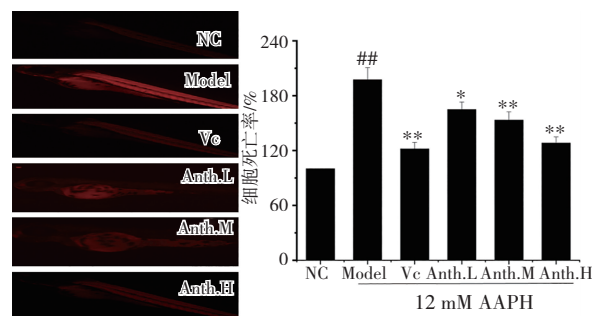


图 5 洛神花花青素保护斑马鱼胚胎抵抗细胞死亡 ($\bar{x} \pm S, n=8$)

Fig. 5 Protective effect of anthocyanin from Roselle against cell death in zebrafish embryos

注:## $p < 0.01$ vs. NC; * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. Model

4 结 论

将超声波辅助应用到洛神花花青素的提取中,利用正交优化实验得出其最佳提取工艺条件:提取温度为 30°C 、超声功率 300 W 、料液比 $1:40$ (g/mL)、超声时间 90 min ,能有效提高洛神花花青素得率,此时得率为 $2.94\text{ mg}/\text{g}$ 。体外抗氧化活性表明, $5.8\text{ mg}/\text{mL}$ 洛神花花青素对 DPPH 自由基清除率、ABTS 自由基清除率和羟自由基清除率分别为 83.15% 、 63.32% 和 74.4% 。

通过洛神花花青素对斑马鱼胚胎氧化应激的干预,洛神花花青素能够有效保护由 AAPH 诱导的氧化损伤,11.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量组的洛神花花青素极显著降低 ROS 的产生,抑制脂质过氧化物的生成和降低胚胎细胞死亡率($P<0.01$)。该研究结果可为进一步开发利用洛神花提供理论依据。

参考文献(References):

- [1] 顾关云,蒋昱. 玫瑰茄的化学成分与生物活性[J]. 现代药物床, 2010, 25(2): 109—115.
GU Guan-yun, JIANG Yu. Study on phytochemistry and bioactivities of hibiscus sabdariffa[J]. Drugs and Clinic, 2010, 25(2): 109—115.
- [2] 鞠玉栋,吴维坚. 玫瑰茄化学成分及其综合利用[J]. 中国园艺文摘, 2009(12): 178—179.
JU Yu-dong, WU Wei-jian. Chemical constituents and comprehensive utilization of roselle[J]. Chinese Horticulture Abstracts, 2009(12): 178—179.
- [3] 孙华林,田奎蓉,贺梦凡,等. 洛神花多糖对大鼠急性肝损伤干预作用[J]. 食品工业科技, 2020, 41(12): 313—317.
SUN Hua-lin, TIAN Kui-rong, HE Meng-fan, et al. Intervention of roselle flower polysaccharide on acute liver injury in rats[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(12): 313—317.
- [4] 张赛男. 玫瑰茄的药用价值与利用现状[J]. 现代化农业, 2014(12): 23—25.
ZHANG Sai-nan. Medicinal value and utilization status of roselle[J]. Modern Agriculture, 2014(12): 23—25.
- [5] 李洪祥,姜保平,肖伟,等. 玫瑰茄近十年的研究进展[J]. 中国现代中药, 2017, 19(4): 587—593, 598.
LI Hong-xiang, JIANG Bao-ping, XIAO Wei, et al. Research progress of roselle in recent ten years[J]. Chinese Modern Traditional Medicine, 2017, 19(4): 587—593, 598.
- [6] 王建化,王彩慧,郭玉峰,等. 菊花、洛神花复合果酱的研制[J]. 中国调味品, 2019, 44(4): 4—9.
WANG Jian-hua, WANG Cai-hui, GUO Yu-feng, et al. Preparation of compound jam of chrysanthemum and roselle[J]. Chinese Condiment, 2019, 44(4): 4—9.
- [7] 何菁,吴荣书. 玫瑰花洛神花复合浓缩饮料的研究及其成分测定[J]. 食品工业 2019(4): 4—10.
HE Jing, WU Rong-shu. Study on compound concentrated beverage of rose roselle and its composition determination[J]. Food Industry, 2019(4): 4—9.
- [8] 张辉青花,徐斐,袁敏. 酶法提取洛神花中花青素的工艺优化[J]. 应用化工, 2017, 46(4): 4.
ZHANG Huiqinghua, XU Fei, YUAN Min. Optimization of enzymatic extraction of anthocyanins from roselle[J]. Applied Chemical Industry, 2017, 46(4): 4—9.
- [9] 廖禹东,郭忠. 洛神中花青素含量分析及体外抗氧化实验研究[J]. 农家参谋, 2020(5): 73—74.
LIAO YU-dong, GUO Zhong. Content analysis of anthocyanins in roselle and in vitro antioxidant experiment study[J]. Agricultural General Staff, 2020(5): 73—74.
- [10] 杨萍,李哲. pH 示差法测定黑枸杞花青素技术的研究[J]. 中国食品添加剂, 2017(10): 107—111.
YANG Ping, LI Zhe. Determination of anthocyanins in *Lycium barbarum* by pH differential method Chinese[J]. Journal of Food Additives, 2017(10): 107—111.
- [11] 王胜男,付晓婷,许加超,等. 羊栖菜褐藻糖胶对 AAPH 诱导的斑马鱼氧化应激模型的保护作用[J]. 食品工业科技, 2021, 42(18): 356—365.
WANG Sheng-nan, FU Xiao-ting, XU Jia-chao, et al. Protective effects of fucoidan isolated from *Sargassum fusiforme* on AAPH-induced antioxidant response in zebrafish model[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(18): 356—365.
- [12] KIM E A, LEE S H, KO C, et al. Protective effect of fucoidan against AAPH-induced oxidative stress in zebrafish model[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 102: 185—191.
- [13] BASS D A, PARCE J W, DECHATELET L R, et al. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: A graded response to membrane stimulation[J]. The Journal of Immunology, 1983, 130(4): 1910—1917.
- [14] OKIMOTO Y, WATANABE A, NIKI E, et al. A novel fluorescent probe diphenyl-1-pyrenylphosphine to follow lipid peroxidation in cell membranes[J]. FEBS Letters, 2000, 474(2-3): 137—140.
- [15] KANG M C, CHA S H, WIJESINGHE W, ET AL. Protective effect of marine algae phlorotannins against AAPH-induced oxidative stress in zebrafish embryo[J]. Food Chemistry, 2013, 138(2): 950—955.
- [16] 涂宗财,尹月斌,姜颖,等. 超声波辅助提取玫瑰茄花青素的工艺优化[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(10): 1—5.
TU Zong-cai, YIN Yue-bin, JIANG Ying, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of anthocyanins from roselle[J]. Food Research and Development, 2011, 32(10): 1—5.
- [17] TAKAHASHI M, SHIBATA M, NIKI E. Estimation of lipid peroxidation of live cells using a fluorescent probe, diphenyl-1-pyrenylphosphine[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2001, 31(2): 164—174.