

板栗花黄酮的抗氧化作用及其对Hela细胞活力的影响

陈亚蓝¹, 王雪青^{1*}, 李月娇¹, 宋文军¹, 王素英¹, 赵国强², 付庆伟²

(1.天津市食品与生物技术重点实验室, 天津商业大学生物技术与食品科学学院, 天津 300134;

2.唐山迁西县板栗产业研究发展中心, 河北唐山 064300)

摘要:采用水杨酸法、邻苯三酚自氧化法和三价铁离子法分别测定板栗花黄酮清除羟自由基($\cdot\text{OH}$)和超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)的能力及其总还原力, 以研究板栗花黄酮的抗氧化作用; 采用MTT法测定纯化板栗花黄酮对Hela细胞活性的影响。结果表明: 板栗花黄酮具有较强的还原力并能有效清除 $\cdot\text{OH}$, 其总还原力和 $\cdot\text{OH}$ 清除率显著高于 V_c 对照组($p < 0.05$), 可达0.605和94.97%; 纯化后板栗花黄酮的总还原力和清除 $\cdot\text{OH}$ 能力较纯化前明显增强。但板栗花黄酮对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除率明显低于 V_c 对照组。同时纯化后板栗花黄酮能显著抑制Hela的细胞活力, 在实验浓度范围内, 抑制率最高至81%, 呈剂量-效应性。因此, 板栗花黄酮具有较强的抗氧化活性和抑制Hela细胞活力的作用, 本文为板栗花的综合利用与开发提供了一定的数据支持。

关键词:板栗花, 黄酮, 抗氧化活性, Hela, 细胞活力

Effect of the flavonoids from chestnut flower on antioxidant activity and cellular viability of Hela line

CHEN Ya-lan¹, WANG Xue-qing^{1*}, LI Yue-jiao¹, SONG Wen-jun¹, WANG Su-ying¹,

ZHAO Guo-qiang², FU Qing-wei²

(1.Tianjin Key Laboratory of Food Biotechnology, College of Biotechnology and Food Science, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China;

2.Qianxi Chestnut Industry Research and Development Center, Tangshan 064300, China)

Abstract: Antioxidant activity of the flavonoids from chestnut flower was studied by determining free radicals scavenging abilities including superoxide anion free radicals ($\text{O}_2^{\cdot-}$) and hydroxyl free radicals ($\cdot\text{OH}$), and total inducing power using the salicylic acid assay, pyrogallol autoxidation assay and ferric reducing antioxidant assay, respectively. And the influence of flavonoids-purified on the Hela cellular viability was also investigated by MTT assays. The results showed that the scavenging $\cdot\text{OH}$ ability and total reducing power of flavonoids from chestnut flower were obviously stronger than those of the V_c control, and the flavonoids-purified sample exhibited the better scavenging $\cdot\text{OH}$ ability and total reducing power compared to the flavonoids-cruded sample. The highest scavenging ability on $\cdot\text{OH}$ and the strongest total reducing power were 0.605 and 94.97%, respectively. However, the scavenging ability of before or after flavonoids-purified samples on $\text{O}_2^{\cdot-}$ was less effective than that of V_c control. Furthermore, MTT data suggested that the purified flavonoids sample exhibited the powerful cytotoxic activity on Hela cells which appeared to be concentration dependent, and the highest inhibitory cellular viability was 81% within the experimental concentration. Therefore, the flavonoids from chestnut flower had the stronger antioxidant activity and inhibit the growth of Hela cells, and those findings provided the data to support for the comprehensively utilizing and developing chestnut flower.

Key words: chestnut flower; flavonoids; antioxidant activity; Hela; cellular viability

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)14-0165-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.14.026

收稿日期: 2014-09-26

作者简介: 陈亚蓝(1991-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 天然活性物质的研究与开发。

* 通讯作者: 王雪青(1964-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 天然活性物质的研究与开发。

基金项目: 天津市高等学校创新团队建设规划资助项目(TD12-5049); 天津市高校科技发展基金资助项目(20120603); 唐山迁西县板栗产业研究发展中心资助项目(G11034)。

板栗花,壳斗科栗属植物板栗的雄花序,性甘、平、无毒。据《本草纲目》记载,板栗花可治疗喉炎肿痛、瘰病和赤白痢疾。现代研究显示板栗花含有黄酮、雌二醇、多糖等多种活性物质^[1],特别是黄酮类物质含量高达9.08g/100g,为报道花中含量之首^[2]。板栗属于雌雄同株果树,雌雄花比例在1:2400~1:4000之间^[3],因此会产生大量的雄花,特别是近年来随着板栗种植面积不断增加,每年有大量板栗花产生,对其进行研究与开发具有重要的社会意义与经济效益。

黄酮类化合物是植物中广泛存在的以2-苯基色原酮为母核的一类化合物,由于母核上的羟基、甲氧基、烃氧基、异戊烯氧基等取代基不同,表现的活性也不同^[4]。据报道黄酮类化合物,如银杏黄酮,葛根黄酮等,具有很好的清除自由基、抗氧化作用,对于与机体的氧化损伤密切相关的人类一些慢性疾病,如高血压、心脏病和癌症等,黄酮类化合物在抗炎症、防癌等方面具很好的应用^[4-7]。黄酮类化合物是植物的一大类次生代谢产物,其种类多,结构各异,表现在生物利用率、抗氧化性及对人体的影响也有差异,因此从天然植物中筛选高活性的黄酮类化合物,是目前食品与营养等领域的研究热点之一。一些天然产物,如白藜芦醇及其衍生物等^[7-8],均具有清除自由基的抗氧化作用,从而保护DNA、蛋白质等机体生物大分子免受氧化损害,起到预防和治疗动脉粥样硬化、心脑血管疾病和抑制肿瘤细胞生长的作用^[7-9]。关于板栗花黄酮的抗氧化活性近几年有研究报道^[10],但其对肿瘤细胞的作用目前尚未见相关研究。因此,本实验从板栗花中提取黄酮,研究其体外抗氧化活性及对Hela细胞的影响,为板栗花黄酮的开发应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

板栗花 河北省唐山迁西鲜板栗花,自然风干后粉碎;Hela细胞 天津商业大学实验室提供;96孔板、MTT试剂、DMEM/HIGH GLUCOSE培养基、胎牛血清(FBS)、0.25%胰蛋白酶 购于life公司;芦丁标准品 上海永叶生物科技有限公司,98%;二甲基亚砜(DMSO)、无水乙醇、磷酸氢二钾、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、盐酸、抗坏血酸、邻苯三酚、过氧化氢、硫酸亚铁、水杨酸、邻苯三酚、铁氰化钾 天津市光复科技发展有限公司,均为分析纯。

T6新世纪紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限公司;3-18K高速离心机 美国SIGMA公司;FHC-1200A超净工作台 北京国仪合信商贸有限公司;240i细胞培养箱 美国Thermo公司;SPECTRAMAX-M5酶联免疫检测仪 美国MD公司;Ti-u倒置荧光显微镜 日本尼康公司。

1.2 实验方法

1.2.1 板栗花黄酮含量的测定 以芦丁作为标准品,参照文献方法^[11]并加以改进。具体操作如下,采用亚硝酸铝比色法测定,精密称取芦丁对照品并用95%乙醇溶液溶解,精确配制成0.016、0.032、0.048、0.064、0.08mg/mL,分别精确吸取1mL置于50mL容量

瓶中,加5% NaNO₂溶液2mL,放置6min,加10% Al(NO₃)₃溶液2mL,放置6min,加4% NaOH溶液20mL,加水至刻度,摇匀,放置15min,于510nm处测吸光值,绘制标准曲线。纯化前后的板栗花黄酮含量,分别将提取物在510nm处测其吸光值。

1.2.2 粗提板栗花黄酮 准确称取一定质量经粉碎、过筛(80目)、干燥(100℃)的板栗花粉末置于1000mL的圆底烧瓶中,加入10倍量的石油醚进行脱脂,待脱脂完全后过滤,弃去石油醚溶液,用70%的乙醇按固液比1:30,回流提取两次,合并两次提取液,真空过滤,滤液经旋转蒸发浓缩,得到的粗提液经冷冻干燥得粉末,并测定其黄酮含量。

1.2.3 纯化板栗花黄酮 以板栗花黄酮粗提液为原料,用D-101大孔树脂分离纯化。上样液质量浓度2mg/mL、上样速率为2mL/min,过柱完后用5倍树脂体积量(5BV)的蒸馏水以2mL/min的速度洗柱至出水无色,再用70%的乙醇以2mL/min的洗脱速度洗脱至无色透明,收集70%的乙醇洗脱液,减压浓缩,干燥,称重,测定总黄酮含量。

1.2.4 板栗花黄酮对羟基自由基清除率的测定 参照高丽威报道的方法进行^[12]。在10mL具塞试管中加入样液2mL,1mL 6mmol/L的FeSO₄,1mL 6mmol/L的H₂O₂,混匀后静置10min,随后加入6mmol/L水杨酸1mL,摇匀放置30min于510nm处测吸光值,并设空白对照计算清除率。其清除率公式如下:

$$\text{羟基自由基清除率}(\%) = \frac{A_0 - (A_x - A_t)}{A_0} \times 100$$

式中:A₀表示空白对照的吸光度;A_x表示样液的吸光度;A_t表示等体积蒸馏水代替水杨酸时吸光度值。

1.2.5 板栗花黄酮对超氧阴离子清除率的测定 超氧阴离子清除率的测定采用邻苯三酚自氧化法^[13-14]。具体操作如下:取4.5mL pH8.0的0.05mol/L磷酸盐缓冲液置于25℃水浴中加热20min,随后加入1mL样液和25mmol/L邻苯三酚溶液0.4mL,混匀后于25℃水浴中反应5min,最后加入80mmol/L的HCl溶液1mL摇匀,静置3min以终止反应,在420nm处测定吸光度值。超氧阴离子清除率计算公式如下:

$$\text{超氧阴离子清除率}(\%) = \frac{A_3 - (A_1 - A_2)}{A_3} \times 100$$

式中:A₁表示样液的吸光值;A₂表示等体积蒸馏水替代邻苯三酚溶液的吸光值;A₃表示空白对照组的吸光值。

1.2.6 板栗花黄酮总还原力的测定 参照文献方法^[15]并加以改进。具体操作如下:取10mL具塞试管,加入2mL样液,pH6.6的磷酸盐缓冲液2.5mL,1%铁氰化钾溶液2.5mL,混匀置于50℃恒温水浴锅中水浴20min,加入10%(v/v)的三氯乙酸溶液2.5mL,取5mL混匀液和0.1% FeCl₃溶液1mL定容50mL,在700nm处平行三次测吸光值。计算还原能力的公式如下:

$$\text{还原力}(A) = A_t - A_0$$

式中:A_t表示样液吸光值;A₀表示空白对照组的吸光值。

1.2.7 板栗花黄酮对Hela细胞活力的影响 采用MTT

法测细胞活力^[15]。Hela细胞以DMEM/HIGH GLUCOSE培养基(含10% FBS及1%双抗)培养,置于37℃,5% CO₂的恒温培养箱中,每2~3d传代一次,取生长对数期细胞进行实验。将培养48h的对数期细胞制成单细胞悬液,按 1×10^5 个/200 μ L接种于96孔板,培养24h后,分为不添加纯化板栗花黄酮的对照组和加入纯化板栗花黄酮,使其终浓度分别为0.0001、0.001、0.01、0.1、1mg/mL五个实验组,每组设5个复孔,同时,设无细胞的培养基为空白组,用于测定时调零。药物作用24h后加入MTT溶液(终浓度为5mg/mL),孵育4h,终止培养,小心吸弃孔内培养上清液,PBS洗涤3次。每孔加入150 μ L DMSO,振荡使结晶物充分溶解,在酶联免疫检测仪上以波长490nm测各孔吸光度(OD值),计算细胞生长抑制率。公式如下:

$$\text{细胞生长抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{OD}_1}{\text{OD}_2}\right) \times 100$$

式中:OD₁表示实验组吸光度值;OD₂表对照组吸收光度值。

1.2.8 数据处理与分析 数据采用均值 $\pm$ 偏差($\bar{x} \pm s$)表示,相关性和显著性分析SPSS 16.0完成。

2 结果与分析

2.1 标准曲线的确定及纯化前后板栗花黄酮的纯度

芦丁标准曲线如图1所示,得线性回归方程: $y = 10.169x + 0.0158$,其中 $R^2 = 0.9971$ 。根据曲线得到粗提板栗花黄酮与纯化后板栗花黄酮纯度分别为14.36%, 33.1%。

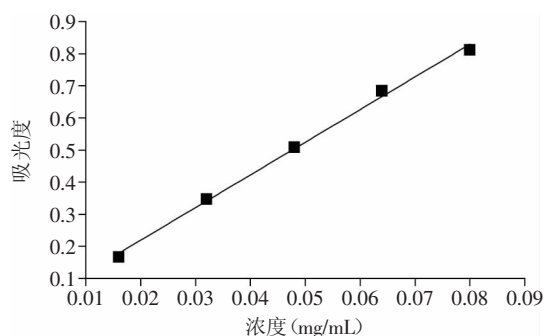


图1 芦丁标准曲线

Fig.1 Standard curve of rutin

2.2 板栗花黄酮纯化前后对羟基自由基清除能力

图2是纯化前后的板栗花黄酮对 $\cdot\text{OH}$ 清除能力的影响。从图2可知,在实验浓度范围内,随着黄酮浓度的增加,清除 $\cdot\text{OH}$ 的能力逐渐增大,与浓度呈正相关。在0.15~0.4mg/mL范围内,纯化后板栗花黄酮的 $\cdot\text{OH}$ 清除能力明显高于总黄酮浓度相同的粗提板栗花黄酮($p < 0.05$)。当黄酮浓度为0.05mg/mL时,粗提板栗花黄酮和纯化板栗花黄酮的 $\cdot\text{OH}$ 清除能力均达到50%以上,在浓度为0.1~0.4mg/mL范围内纯化后的板栗花黄酮的 $\cdot\text{OH}$ 清除能力与同浓度的V_C溶液相比有显著性差异($p < 0.05$),且纯化后板栗花黄酮在浓度为0.4mg/mL时其清除能力高达94.97%,明显高于V_C对照组,说明板栗花黄酮有较好的 $\cdot\text{OH}$ 清除能力。

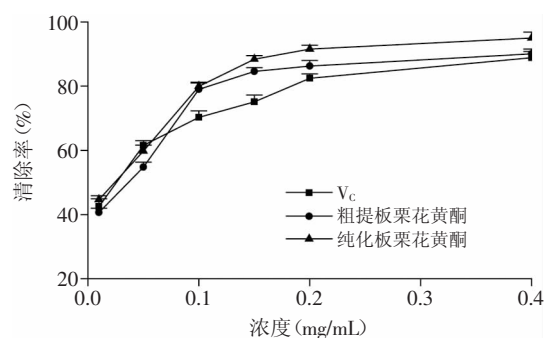


图2 板栗花黄酮对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力

Fig.2 Scavenging $\cdot\text{OH}$ activity of the flavonoids from chestnut flower

2.3 板栗花黄酮纯化前后对超氧阴离子自由基的清除能力

O₂ $\cdot^-$ 是机体内寿命最长的自由基,其作为自由基链式反应的引发剂,一旦自由基链式反应启动,会给机体造成进一步的危害。由图3可知,纯化前后板栗花黄酮对超O₂ $\cdot^-$ 的清除能力随溶液浓度增加而增强,在0.05~1mg/mL范围内,V_C的清除能力明显强于纯化前后板栗花黄酮($p < 0.05$)。在相同浓度时,纯化前后板栗花黄酮对O₂ $\cdot^-$ 的清除能力无显著性差异($p > 0.05$)。

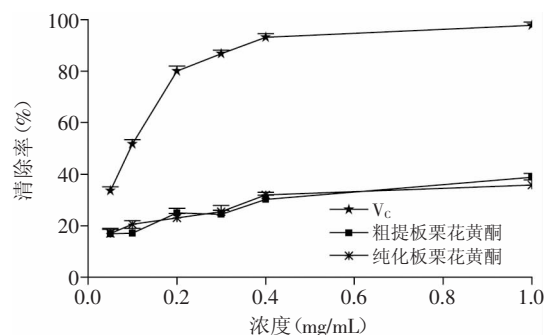


图3 板栗花黄酮对超氧阴离子自由基的清除能力

Fig.3 Scavenging O₂ $\cdot^-$ activity of the flavonoids from chestnut flower

2.4 板栗花黄酮纯化前后总还原力

板栗花黄酮的总还原力见图4。由图4可知,纯化前后板栗花黄酮的总还原力明显强于V_C($p < 0.05$),且随板栗花黄酮浓度的增加而增加,表现出良好的剂量-效应关系,是较好的电子供应者。当板栗花黄酮

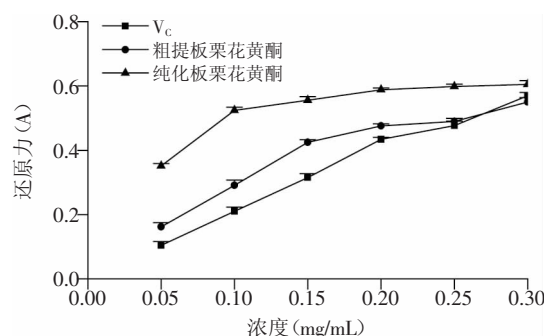


图4 板栗花黄酮总还原能力

Fig.4 Total reducing power of the flavonoids from chestnut flower

浓度在0.05~0.3mg/mL范围内时,同浓度的纯化前后的板栗花黄酮总还原力明显高于 V_c 的总还原力,差异显著($p<0.05$),且纯化板栗花黄酮总还原力强于粗提板栗花黄酮($p<0.05$),最高可达0.605。在黄酮含量为0.1mg/mL时纯化后板栗花黄酮总还原力高出板栗花黄酮粗提液80.07%,说明纯化后板栗花黄酮还原力效果升高显著($p<0.05$)。

2.5 板栗花黄酮对Hela细胞活性的影响

纯化板栗花黄酮对Hela细胞活性影响见表1,从表1可知,随着黄酮浓度的增加,细胞的抑制率也随之增大,表现出与黄酮的浓度呈正相关。当黄酮浓度由0.01~1mg/mL,抑制率由40%增加到81%,呈剂量依赖性作用方式,其对Hela细胞的 IC_{50} 为100.38 μ g/mL。

表1 板栗花黄酮对Hela细胞活力的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Effect of the flavonoids-purified from chestnut flower on Hela cellular viability ($\bar{x}\pm s$)

实验组	浓度(mg/mL)	OD值	抑制率(%)
空白组	0	0	—
对照组	0	0.39 $\pm$ 0.005	—
实验组1	0.0001	0.32 $\pm$ 0.013	18 $\pm$ 0.027
实验组2	0.001	0.29 $\pm$ 0.013	27 $\pm$ 0.037
实验组3	0.01	0.23 $\pm$ 0.003*	40 $\pm$ 0.135
实验组4	0.1	0.19 $\pm$ 0.008*	53 $\pm$ 0.017
实验组5	1	0.07 $\pm$ 0.008*	81 $\pm$ 0.019

注: *与对照组比较, $p<0.05$ 。

3 讨论

本研究中板栗花黄酮同样显示出有很强的还原能力,纯化后的板栗花黄酮还原力大于纯化前,而且二者均大于 V_c 对照,且呈剂量依赖性的特点(图4),与文献[16]报道结果相近。在清除羟基自由基能力方面,纯化后板栗花黄酮的羟基自由基清除能力高于纯化前,而二者明显高于 V_c 对照组,特别是纯化后的板栗花黄酮在0.4mg/mL浓度时羟基自由基清除率高达94.97%,显示出超强的清除羟基自由基的能力,该结果优于文献[17]的报道。这可能是因为提取和纯化工艺不同导致的结果,通过对黄酮类物质的分离与纯化,改变了黄酮的图谱,从而显示出了清除能力差异。黄酮类化合物通过本身含有的多酚羟基与羟自由基反应,形成稳定的半醌式自由基结构,从而中断自由基的链式反应,以发挥清除自由基的抗氧化作用,而且不同的黄酮类化合物,由于酚羟基活性基团数量与位点不同,导致不同来源的黄酮化合物清除自由基能力的差异[18]。而在超氧阴离子自由基的清除过程中,纯化前后板栗花黄酮都明显弱于抗坏血酸的作用效果,反映出黄酮类物质不能与超氧阴离子有效的结合,这与文献[19]中芒萁黄酮的体外抗氧化趋势一致。

许多研究报道,黄酮类物质具有抑制肿瘤细胞增生的能力。如甘草黄酮对Hela细胞的增殖具有显著的抑制及诱导细胞凋亡的效果,200 μ g/mL剂量的甘草黄酮抑制肿瘤细胞增殖的效果最佳[20];大蓟黄

酮能诱导人子宫癌Hela细胞的凋亡,其对Hela细胞的 IC_{50} 为85.12 μ g/mL[21]。本实验证实纯化后的板栗花黄酮能显著抑制Hela细胞毒活性,其对Hela细胞的 IC_{50} 为100.38 μ g/mL,说明板栗花黄酮同其他植物黄酮一样,具有较好的抗肿瘤效果。

黄酮类物质的抗肿瘤作用机制与其抗氧化、清除自由基的作用密切相关。而黄酮类化合物清除自由基作用强弱受其结构影响,如C2,C3位双键,酚羟基取代模式及数目和羟基甲氧基取代以及B环上存在邻二酚羟基等,从而影响其抗癌效果[22]。现有研究表明,黄酮类化合物对肿瘤细胞有细胞毒作用,而对正常细胞无毒性和致突作用,反而有抗氧化和正向的免疫调节作用[23]。松树皮中提取的黄酮类化合物能诱导MCF27细胞凋亡,但对正常细胞无作用[24];圣草酚对Vero细胞毒性很小却能有效地抑制皮肤癌细胞A375、喉癌细胞HEp2、乳腺癌细胞MCF27、肝癌细胞HepG2和宫颈癌细胞Hela的增殖[25]。因此,黄酮类化合物这种选择性毒性对于研究和开发板栗花黄酮有重要作用。

4 结论

板栗花资源丰富,板栗花黄酮具有强的还原能力和清除 $\cdot OH$ 能力,可显著抑制Hela细胞的生长,并呈剂量依赖性的特点。因此,板栗花黄酮具有抗氧化和抑制肿瘤细胞增生的功效,本研究结果为板栗花的综合利用与开发提供了很好的应用前景。然而关于板栗花黄酮的精细结构解析,构效关系以及其抗肿瘤作用机制有待进一步探究。

参考文献

- [1] 李英华,胡福良. 我国花粉化学成分的研究进展[J]. 养蜂科技,2005(4):7-16.
- [2] 俞秀玲. 花粉的活性成分[J]. 食品工业科技,2007,28(4):236-238.
- [3] 王家玉. 板栗增雌花减雄花的技术措施[J]. 林业科技开发,1995(1):48-49.
- [4] 裴凌鹏,惠伯棣,金宗廉. 黄酮类化合物的生理活性及其制备技术研究进展[J]. 食品科学,2004,25(2):203-207.
- [5] 郎娜,罗红霞. 黄菜花中黄酮类物质抗氧化性的研究[J]. 食品研究与开发,2007,28(3):74-76.
- [6] 焦士蓉,黄承钰. 柑橘属类黄酮生物活性的研究进展[J]. 西华大学学报:自然科学版,2008,27(1):32-35.
- [7] 陈波,俞惠新,谭成,等. 白藜芦醇及其衍生物抗氧化抗肿瘤活性研究[J]. 食品与机械,2007,23(4):52-55.
- [8] 王卫东,赵志鸿,张小俊,等. 陈皮提取物中黄酮类化合物及抗氧化的研究[J]. 食品工业科技,2007,28(9):98-103.
- [9] Lin J K, Tsai S H. Chemoprevention of cancer and cardiovascular disease by resveratrol[J]. Proceeding of the National Science Council, Republic of China. Part B, Life Sciences, 1999, 23(3):99-106.
- [10] 吴雪辉,张喜梅,李延群,等. 板栗花粗提物的抗氧化活性研究[J]. 现代食品科技,2008,24(1):14-19.
- [11] 王晓波,李金芳,王梅,等. 山竹壳总黄酮抗氧化及抑制亚

(下转第179页)

表2 绍兴无白点腐乳与有白点腐乳坯料中氨基酸态氮、TCA-NSI、游离氨基酸、DH与游离酪氨酸分析

Table 2 The analysis of amino nitrogen, TCA-NSI, free amino acid, DH and free Tyrosine in Shaoxing sufu phetze without and with white particles

指标	无白点	有白点	T值/显著性水平
氨基酸态氮(g/100g)	2.00±0.03	2.07±0.01	-2.214/0.233
TCA-NSI(%)	28.10±1.04	36.59±0.76	-6.572/0.028
游离氨基酸(g/100g)	12.96±1.74	14.51±0.22	-0.889/0.534
DH(%)	15.54±0.24	17.99±0.11	-6.347/0.037
游离酪氨酸(g/100g)	0.10±0.02	0.43±0.005	-16.250/0.028

3 结论

作为传统大豆发酵制品,大豆蛋白中的酪氨酸在腐乳发酵过程中伴随着蛋白质的水解而游离出来。在绍兴腐乳发酵过程中氨基酸态氮、TCA-NSI、游离氨基酸、DH和游离酪氨酸都随着发酵的进行而增加。通过对腐乳发酵过程中氨基酸态氮、TCA-NSI、游离氨基酸、DH与游离酪氨酸的相关性分析以及对成熟无白点腐乳和有白点腐乳中此类含氮物质的分析发现,酪氨酸的产生与蛋白质的水解度相关性最高且有白点腐乳和无白点腐乳中此类含氮物质具有显著差异性。本研究通过跟踪绍兴腐乳发酵过程中蛋白质的水解和酪氨酸含量的变化以及对成熟腐乳的含氮物质分析,研究酪氨酸形成及其对成熟腐乳白点形成的影响,为进一步控制腐乳白点提供理论参考。

参考文献

- [1] 王瑞芝. 中国腐乳酿造[M]. 北京:中国轻工业出版社,2009:1,157,242,429-431.
[2] 彭湘屏,卢红梅. 腐乳研究新进展[J]. 中国调味品,2010,35

(2):31-34,45.

- [3] 江景泉,张惟广. 腐乳的白点问题研究进展[J]. 四川食品与发酵,2008,44(1):24-27.
[4] 陈宇. 绍兴咸亨腐乳的生产与营养保健功能[J]. 江苏调味品,2003,20(5):17-20.
[5] 鲍松林,丁霄霖. 腐乳白点的成分鉴定[J]. 无锡轻工业学院学报,1993,12(4):270-275.
[6] 何熙. 腐乳白点问题及电场磁场催熟腐乳的研究[D]. 广州:华南理工大学,2001.
[7] 江景泉. 毛霉驯化及微波对腐乳白点抑制效果的研究[D]. 重庆:西南大学,2009.
[8] 曾小波,朱新贵,林志省. 高盐稀态法酿造酱油过程中L-酪氨酸的析出规律[J]. 食品与发酵工业,2011,37(9):90-93.
[9] 何冰芳,王淑如,陈琼华. 霉豆腐发酵前后蛋白质氨基酸组成的变化[J]. 氨基酸杂志,1986(2):10-11.
[10] Govindaraj K. Studies on the preparation and characterization of protein hydrolysates from groundnut and soybean isolates[D]. Mysore:University of Mysore,2003.
[11] Allen KR, Degg TJ, Rushworth PA, Smith M, et al. Measurement of phenylalanine and tyrosine in plasma by high-performance liquid chromatography using the inherent fluorescence of aromatic amino acids[J]. Ann Clin Biochem,1999,36(2):207-211.
[12] 莫蓓红,赵建,苗君荏,等. 一种植物乳杆菌对干酪模型成熟中微生物及蛋白质水解的影响[J]. 食品工业科技,2012,33(7):100-104.
[13] 余勃,陆兆新. 微生物发酵法产大豆多肽液水解度的测定[J]. 食品科学,2005,26(4):104-107.
[14] 张锐昌,王琦,张应龙,等. Tricine-SDS-PAGE测定小麦蛋白酶解物分子量分布[J]. 食品研究与开发,2012,33(12):168-171.
[15] Mirosljub B Barać, Slađana P Stanojević, Snežana T Jovanović, et al. Soy protein modification-A review[J]. Acta Periodica Technologica,2004,2004(35):3-16.

(上接第168页)

- 硝化作用研究[J]. 食品研究与开发,2013,34(6):9-13.
[12] 高丽威. 紫心甘薯黄酮类化合物的提取纯化及抗氧化活性研究[D]. 杭州:浙江大学,2010.
[13] 汪璇. 黄粉虫黄酮提取、分离及抗氧化性研究[D]. 杨陵:西北农林科技大学,2013.
[14] 张燕平,张虹. 羊栖菜提取物体外自由基清除能力的研究[J]. 郑州工程学院学报,2003,24(1):50-54.
[15] Stockert J C, Blazquez-Castro A, Canete M, et al. MTT assay for cell viability; intracellular localization of the formazan product in lipid droplets[J]. Acta Histochemica,2012,114(8):785-796.
[16] 张利燕,常虹,赵丽芹,等. 提取方式对板栗雄花序总黄酮抗氧化活性的影响研究[J]. 食品工业科技,2013,34(4):97-100.
[17] 吴雪辉,张喜梅,李廷群,等. 板栗花粗提物的抗氧化活性研究[J]. 现代食品科技,2008,24(1):14-19.
[18] Chen J W, Zhu Z Q. Structure-activity relationship of natural flavonoids in hydroxyl radical-scavenging effects[J]. Acta Pharmacologica Sinica,2002,23(7):667-672.

- [19] 曾伟. 芒萁黄酮的纯化分离及抗氧化活性研究[D]. 广州:广东工业大学,2013.
[20] 马森,周旭莉,户元林,等. 乌拉甘草有效成分对人体4种肿瘤细胞增殖与凋亡的影响[J]. 时珍国医国药,2009,20(5):9-11.
[21] 刘素君,郭红,潘明,等. 大蓟总黄酮诱导肿瘤细胞凋亡作用的研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(2):294-295.
[22] Joyeux M, Lobatein A, Autom R. Comparative antilipoper-oxidant, antinecrotic and scavenging properties of terpanes and bioflavones from Ginkgo and flavonoids[J]. Planta Medica,1994,61(2):66-69.
[23] Huang H Y, Zha X L. Development in research of antitumor effect of flavones compounds[J]. Chinese Journal of New Drugs and Clinical Remedies,2002,21(7):428-433.
[24] Huynh H T, Teel R W. Selective induction of apoptosis in human mammary cancer cells by pycnogenol[J]. Anticancer Research,2000,20(4):2417-2420.
[25] 杨志峰,朱英,李珊珊. 植物黄酮的抗肿瘤作用及构效关系的研究进展[J]. 四川中医,2011,29(9):35-38.