

# 基于离子液体双水相萃取番茄中抗氧化酶研究

李梦瑶<sup>1,2</sup>, 王书雅<sup>1</sup>, 谢云峰<sup>1</sup>, 黄蔚霞<sup>1</sup>, 翟晨<sup>1\*</sup>, 刘云国<sup>2\*</sup>

(1. 中粮营养健康研究院, 营养健康与食品安全北京市重点实验室, 北京 102209; 2. 新疆大学生命科学与技术学院, 新疆乌鲁木齐 830002)

**摘要** 基于 [C<sub>4</sub>mim] Cl/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 双水相体系, 建立了萃取分离番茄中 5 种抗氧化酶 (CAT、POD、SOD、AAO、PPO) 的新方法。以番茄中抗氧化酶的活性为指标, 研究了不同种类的离子液体和用量、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 的用量、体系 pH 及萃取时间等参数对番茄中抗氧化酶活性的影响, 并与传统的缓冲溶液法提取效果进行比较。结果表明: 当 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 浓度为 0.16 g/mL, [C<sub>4</sub>mim] Cl 浓度为 0.40 g/mL, pH 为 7.5, 30 °C 200 r/min 提取 20 min 时, 提取的 5 种抗氧化酶活性比缓冲溶液法提取的酶活性高、稳定性好且萃取时间缩短了 10 min。该提取方法操作简单, 且实现多种酶的同时、快速、高活性提取, 为植物性农产品的多酶快速提取提供了一种新的思路。

**关键词** 离子液体; 双水相; 抗氧化酶; 萃取; 酶活性

中图分类号 TS201.2 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)17-0179-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.17.051



开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):

## Extraction of Antioxidant Enzymes from Tomatoes by Ionic Liquid Aqueous Two-Phase

LI Meng-yao<sup>1,2</sup>, WANG Shu-ya<sup>1</sup>, XIE Yun-feng<sup>1</sup> et al (1. Nutrition & Health Research Institute, COFCO Corporation, Beijing Key Laboratory of Nutrition & Health and Food Safety, Beijing 102209; 2. School of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi, Xinjiang 830002)

**Abstract** Based on the aqueous two-phase system formed by ionic liquid chloro-1-butyl-3-methylimidazolium [C<sub>4</sub>mim]Cl and K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, a new method for extraction of five antioxidant enzymes (CAT, POD, SOD, AAO, PPO) from tomato was established. Taking the activity of antioxidant enzymes in tomato as the index, the effects of different kinds of ionic liquids, the amount of K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, the pH and the extraction time on the activities of antioxidant enzymes in tomato were studied. The results showed that the optimal condition was: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> concentration was 0.16 g/mL, [C<sub>4</sub>mim] Cl concentration was 0.40 g/mL, pH 7.5, 30 °C 200 r/min for 20 min, time reduced by 10 min. The extraction method was simple in operation, and realized simultaneous, rapid and high-activity extraction of various enzymes, which provided a new idea for rapid extraction of multi-enzymes in plant agricultural products.

**Key words** Ionic liquid; Aqueous two-phase; Antioxidant enzyme; Extraction; Enzyme activity

番茄 (*Lycopersicon esculentum*) 属茄科茄属, 为草本植物, 其含有丰富的营养物质, 用途广泛 (生食、菜用及各种加工制品), 是我国的主栽蔬菜<sup>[1]</sup>。番茄等果蔬采摘后, 在后熟到衰老的过程中, 其机体内的活性氧和酶保护系统随着果蔬的代谢活动而发生变化<sup>[2-4]</sup>。其在贮藏运输的过程中, 由于呼吸代谢作用导致氧自由基含量、丙二醛 (MDA) 含量增加, 激发抗氧化酶 (过氧化氢酶 (CAT)、超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD)、多酚氧化酶 (PPO)、抗坏血酸氧化酶 (AAO)) 等保护系统消除活性氧自由基等有害物质, 从而可以避免造成组织损伤、细胞衰老或死亡, 同时延长果蔬的贮藏期<sup>[4]</sup>。果蔬体内抗氧化酶活性高低可以作为判定果实品质劣变程度、贮藏货架期以及成熟衰老的标志<sup>[4-6]</sup>。目前, 提取植物性农产品抗氧化酶更多依赖于传统的缓冲溶液法, 该方法耗时长、提取酶活性低、稳定性较差。

离子液体 (ionic liquid, ILs), 作为一种新型的绿色溶剂, 因具有不挥发、溶解性强等多种独特的性质, 目前在分离萃取等领域表现出良好的应用前景<sup>[7]</sup>。离子液体双水相体系是由亲水性离子液体和无机盐组成的两相<sup>[8]</sup>。离子液体双水相蒸气压极低, 与有机溶剂萃取法相比不会因挥发而引发环境污染和威胁操作者健康等问题, 体系的萃取分离条件温

和, 能使绝大部分生物分子保持活性同时具备分相快、不易乳化、离子液体可循环使用等特性, 是近年来出现的一种极有前途的新型分离技术<sup>[9-10]</sup>。目前, 离子液体及离子液体双水相体系被广泛应用于萃取分离重金属离子<sup>[11-12]</sup>、生物活性物质<sup>[13-15]</sup>、蛋白质<sup>[16-18]</sup>、酶<sup>[19-21]</sup>等。基于离子液体双水相体系, 陈静等<sup>[20]</sup>成功地萃取了胰蛋白酶, 并对其萃取机理进行研究; 曾颖等<sup>[21]</sup>萃取木瓜蛋白酶, 并证明能保持较高的酶活力。目前, 采用离子液体双水相提取法对植物源农产品中多种酶的同时、快速、高活性提取的研究较少。

笔者以亲水性离子液体氯代 1-丁基-3-甲基咪唑 [C<sub>4</sub>mim] Cl 和 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 形成的双水相体系对番茄中的抗氧化酶进行萃取研究, 以抗氧化酶的活性为指标, 考察了离子液体种类及浓度、萃取时间、无机盐用量、体系 pH、静置时间对番茄中抗氧化酶活性的影响, 并与传统提取法相比较, 提出了一种基于离子液体双水相体系, 实现多种抗氧化酶同时、快速、高效、高活性的萃取分离方法。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 过氧化氢酶 (2 000 U/mg) 购自上海士锋生物科技有限公司; 磷酸氢二钾 (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)、磷酸二氢钠 (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)、30% 过氧化氢 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、磷酸氢二钠 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 均为分析纯, 购自北京化工厂; 氯代 1-丁基-3-甲基咪唑 ([C<sub>4</sub>mim] Cl)、氯代 1-乙基-3-甲基咪唑 ([C<sub>2</sub>mim] Cl)、四氟硼酸 1-丁基-3-甲基咪唑 ([C<sub>4</sub>mim] PF<sub>4</sub>) 均为分析纯, 购自上海爱纯生物有限公司。

**1.2 仪器** Milli-Q 超纯水系统 (美国 Millipore 公司); 涡旋

**基金项目** “十三五”国家重点研发计划项目 (2016YFD0401204)。

**作者简介** 李梦瑶 (1995—), 女, 河南郑州人, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全检测技术开发。\* 通信作者, 翟晨, 工程师, 博士, 从事食品品质与安全的快速检测技术研究; 刘云国, 教授, 博士, 从事食品品质与安全研究。

**收稿日期** 2019-05-29

混匀器(德国 IKA 公司);紫外可见分光光度计(日本 Hitachi 公司);恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);PB-10 型 pH 计(德国 Sartorius 公司);离心机(德国 Eppendorf 公司);Synergy Mx 酶标仪(美国 Bio-Tek 公司)。

### 1.3 方法

**1.3.1 离子液体双水相萃取抗氧化酶。**准确称取一定量的离子液体和  $K_2HPO_4$ , 加入到 10 mL 刻度比色管中,加水溶解,溶解完全观察到体系分为上下两相(图 1),上相富集离子液体,下相富集  $K_2HPO_4$ 。用不同 pH 的缓冲溶液调节体系的酸碱度<sup>[22]</sup>,加入 0.5 g 研磨成浆的番茄泥,番茄位于两相中间(图 2),于 30 °C、200 r/min 恒温培养箱中振荡一定时间后静置,取上清液进行酶活性测定。

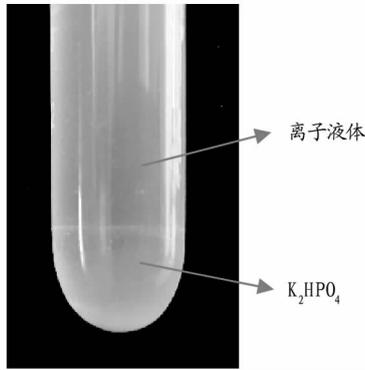


图 1 离子液体双水相示意

Fig. 1 Schematic of ionic liquid aqueous two-phase

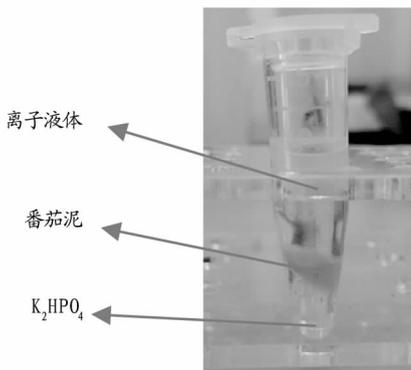


图 2 离子液体双水相提取番茄中的酶

Fig. 2 Extraction of enzymes from tomato by ionic liquid aqueous two-phase

**1.3.2 缓冲液法萃取分离抗氧化酶。**参考文献[23],基于缓冲液法对 5 种抗氧化酶进行提取:取新鲜的番茄,洗净晾干,于搅拌机中打碎 10 min,再冰浴状态下用研钵研磨至泥状。分别配制 pH 7.8 的 50 mmol/L PBS,缓冲溶液提取 CAT、SOD、POD 三种抗氧化酶和 pH 6.0 的 50 mmol/L PBS 缓冲液提取 AAO、PPO 两种抗氧化酶,取 4.5 mL 酶提取液加入 0.5 g 研磨成浆的番茄泥,在 4 °C 高速离心机中以 5 000 r/min 的转速离心 30 min,取上清液放入 4 °C 环境中待用。

**1.3.3 抗氧化酶活性测定。**过氧化氢酶(CAT)活性测定:通过测定 1 min 内  $H_2O_2$  在 240 nm 波长下消耗量,可计算得 CAT 活性<sup>[24]</sup>;抗坏血酸氧化酶(AAO)活性测定:通过测定

AsA 的氧化量,可计算得 AAO 活性;多酚氧化酶(PPO)活性测定:PPO 能够催化邻苯二酚产生醌,后者在 410 nm 有特征光吸收<sup>[23]</sup>;过氧化物酶(POD)活性测定:采用愈创木酚法测定<sup>[25]</sup>;超氧化物歧化酶(SOD)活性测定:采用核黄素(NBT)法测定<sup>[26]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 萃取参数优化

**2.1.1 离子液体种类和用量的选择。**研究以 CAT 活性为考察指标,对提取条件进行优化。将  $[C_4mim]Cl$ 、 $[C_2mim]Cl$  及  $[C_4mim]PF_4$  与  $K_2HPO_4$  制备成相同浓度的双水相体系,分别加入相同浓度的酶溶液进行提取,通过检测酶活性考察不同离子液体的提取效果。由图 3 可知, $[C_4mim]Cl$  双水相提取的酶活性最高,其次为  $[C_2mim]Cl$ , $[C_4mim]PF_4$  提取效果最差,因此选择  $[C_4mim]Cl$  作为双水相体系中的离子液体。

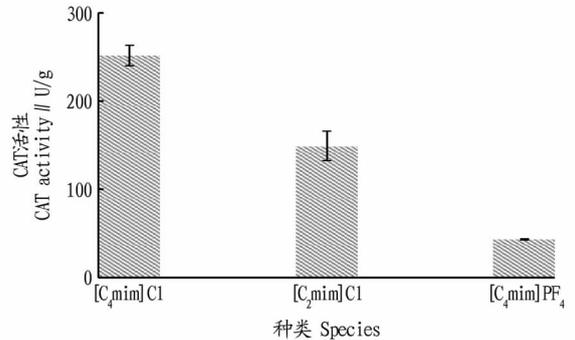


图 3 离子液体种类对酶活性的影响

Fig. 3 Effects of ionic liquid species on enzyme activity

制备浓度为 0.26~0.47 g/mL 的  $[C_4mim]Cl$  离子液体双水相体系,固定体系 pH、提取时间以及  $K_2HPO_4$  的加入量,对离子液体的用量进行考察。由图 4 可知,在较低浓度时,酶的提取效果较差,随离子液体浓度的提高,酶活性逐渐升高,当浓度达 0.40 g/mL 时,提取效果最好,之后随着离子液体浓度升高,酶活性逐渐降低,因此离子液体浓度应控制在 0.40 g/mL。

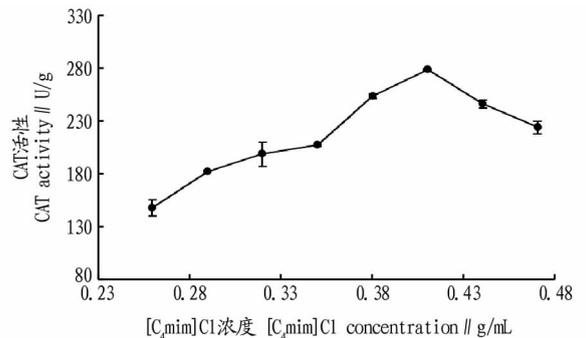


图 4  $[C_4mim]Cl$  浓度对酶活性的影响

Fig. 4 Effects of  $[C_4mim]Cl$  concentration on enzyme activity

**2.1.2  $K_2HPO_4$  加入量的选择。**随着盐量的增加,上下相体积比逐渐减小,盐浓度过高或者过低,均不能形成双水相。由此可知,无机盐是双水相体系成相的主要原因之一,控制盐浓度为 0.10~0.24 g/mL,保持 pH 不变,对 CAT 活性进行测试。由图 5 可知,随着盐浓度的增大,提取效果逐渐提高,

在 0.16 g/mL 时达到最大。随着无机盐浓度增大,盐析作用加强,酶更趋向于分配上相,但过多的盐导致酶的活性下降,因此,盐浓度最优值为 0.16 g/mL。

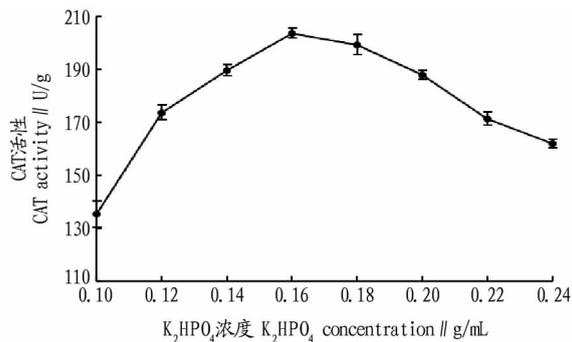


图 5  $K_2HPO_4$  浓度对酶活性的影响

Fig. 5 Effects of  $K_2HPO_4$  concentration on enzyme activity

**2.1.3 双水相体系 pH 的确定。** 配制 pH 为 6.5~9.5 的离子液体双水相体系,考察体系中不同 pH 条件对酶活性的影响。由图 6 可知,在离子液体溶液双水相体系中,当  $pH < 7.5$  和  $pH > 7.5$  时,酶活性均较低,在酸性或碱性条件下接近酶的等电点导致溶解性变差,部分析出致使酶活性下降。故试验中为保持酶的活性,双水相体系的 pH 应保持在 7.5 左右。

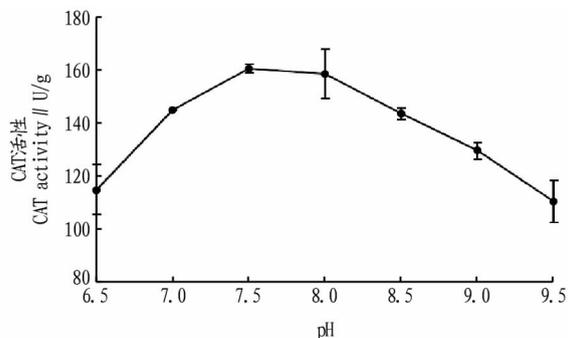


图 6 pH 对酶活性的影响

Fig. 6 Effects of pH on enzyme activity

**2.1.4 萃取和静置时间的确定。** 准确称取 0.5 g 番茄泥于制备好的离子液体双水相体系中,充分混合均匀后,置于 30 °C、200 r/min 的恒温培养箱中提取 CAT,通过考察不同萃取时间和静置时间对提取的酶活性差异,确定最佳的萃取时间和静置时间。由图 7 可知,随萃取时间增加,酶活性逐渐增加,当萃取时间达 20 min 后,酶活性逐渐稳定,因此萃取时间选择为 20 min。

在确定萃取时间的条件下,考察不同静置时间下提取的 CAT 活性的差异。由图 7 可知,酶活性随着静置时间的增加而升高,并在 15 min 时达到最高,之后由于放置时间的延长部分酶失活,导致酶活性有所下降,故选取的静置时间为 15 min。

**2.2 离子液体双水相法与缓冲溶液提取法的对比** 对传统的缓冲溶液提取法与离子液体双水相法进行对比。由表 1 可知,离子液体双水相萃取得到的 CAT、SOD、AAO、PPO 这 4 种抗氧化酶活性高于传统的缓冲溶液提取法。由于该研究以  $[C_4mim]Cl/K_2HPO_4$  形成上相富集离子液体和下相富集

无机盐的双水相体系,基于盐析作用蛋白质水溶液在高浓度的中性盐中会析出产生沉淀,得到的蛋白质一般不失活,一定条件下又可重新溶解,基于配位作用蛋白质上的氨基酸会和离子液体发生配位反应,从而大大增强了蛋白质在离子液体中的溶解度,使蛋白质富集在上相的离子液体中<sup>[9]</sup>。然而,离子液体双水相法提取的 POD 活性低于缓冲溶液提取方法,可能是由于离子液体双水相体系 pH 较高,导致了部分酶活性丧失,后期将继续对 POD 酶提取条件进行优化,但离子液体双水相法提取的 POD 其标准差小于传统方法得到的酶活性的标准差。总体来说,离子液体双水相萃取法优于传统的缓冲溶液提取方法,且得到的酶活性更加稳定,该方法受到的外界干扰更小。

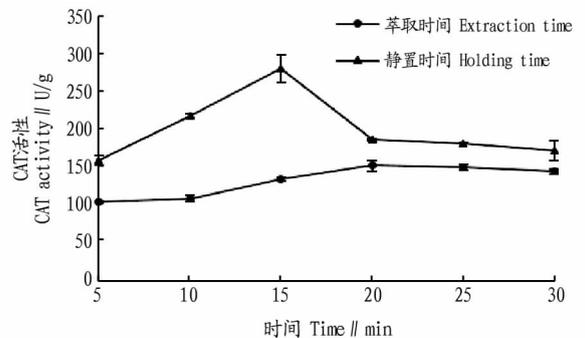


图 7 时间对酶活性的影响

Fig. 7 Effects of time on enzyme activity

表 1 离子液体双水相法与缓冲溶液提取法的对比

抗氧化酶 Antioxidant enzyme	离子液体双水相法 Ionic liquid aqueous two-phase method		缓冲溶液提取法 Buffer solution extraction method	
	均值 Mean	标准差 Standard deviation	均值 Mean	标准差 Standard deviation
CAT	144.11	9.53	104.50	21.41
SOD	137.92	7.55	64.88	4.17
AAO	9.86	1.44	3.19	2.30
PPO	11.29	0.52	7.44	1.96
POD	105.11	2.74	256.03	12.20

### 3 结论

该研究基于  $[C_4mim]Cl/K_2HPO_4$  双水相体系,建立了萃取分离番茄中 5 种抗氧化酶 (CAT、POD、SOD、AAO、PPO) 的新方法。以抗氧化酶活性为指标,对离子液体的种类及浓度、提取时间、无机盐的用量、体系 pH、萃取时间等条件进行了优化,并与传统的缓冲溶液提取法相比较。结果表明提取番茄中抗氧化酶的最佳条件是采用浓度为 0.40 g/mL  $[C_4mim]Cl$  离子液体,  $K_2HPO_4$  浓度为 0.16 g/mL, pH 为 7.5,萃取时间为 20 min,静置时间为 15 min。该研究建立的离子液体双水相提取方法成功提取了番茄中 5 种抗氧化酶,酶活性比传统提取方法高 (除 POD 外),且稳定性较好,萃取时间缩短了 10 min。该研究提出了一种基于离子液体双水相体系的快速、高效、高活性的抗氧化酶分离方法。

(下转第 185 页)

在 ISO 抽吸模式下,样品燃烧至 10、20、30、40 和 50 mm 时采集的燃烧状态,在不同燃烧长度下卷烟的燃烧状态是不一样的,分段测量更能有效地反映卷烟燃烧包灰性能。

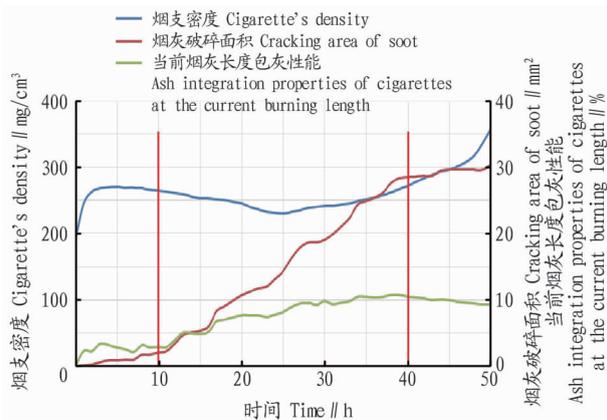


图 2 ISO 抽吸模式卷烟包灰数据和烟支密度分布对应曲线

Fig. 2 The correlation curves between the ash integration properties and cigarette's density distribution under ISO smoking model

(2)采用分段测量的方法,采集卷烟燃烧时的图像信息,得出卷烟燃烧烟灰长度从大到小依次为静燃模式、ISO 模式、HCI 模式;卷烟燃烧烟灰长度缩减率从大到小依次为 HCI 模式(19.3%)、ISO 模式(17.7%)、静燃模式(15.4%)。在不同分段下卷烟燃烧烟灰长度缩减率有所不同,进入燃烧的第 5

段(40~50 mm)时,长度缩减率达到最大,卷烟燃烧烟灰长度缩减率从大到小依次为 HCI 模式(30.8%)、ISO 模式(29.0%)、静燃模式(23.5%)。

(3)在不同抽吸模式下,卷烟样品最后包灰性能的好坏依次为静燃模式(5.27%)、ISO 模式(9.99%)、HCI 模式(10.47%)。

(4)烟支密度分布与卷烟包灰性能有较大的相关性,可以通过改变烟支的密度或者烟丝填充值来改善卷烟的包灰效果。

## 参考文献

- [1] 郑晗,詹建波,王浩,等. 卷烟包灰性能的研究现状分析[J]. 新型工业化,2018,8(11):93-97.
- [2] 王道宽,连芬燕,刘雯,等. 卷烟包灰性能的影响因素[J]. 烟草科技,2013,46(4):12-15.
- [3] 邹中亮,侯鑫. 卷烟纸定量、透气度对卷烟包灰及燃烧速度的影响[J]. 黑龙江造纸,2013(2):35-37.
- [4] 于龙国. 卷烟纸相关因素对卷烟包灰性影响分析[J]. 中华纸业,2015,36(6):37-40.
- [5] 余婷婷,詹建波,程量,等. 纵向抗张能量吸收对卷烟纸包灰性能的影响[J]. 材料导报,2017,31(S1):384-387.
- [6] 沈靖轩,孙军,肖维毅. 助剂对卷烟纸包灰效果的影响[J]. 中华纸业,2012,33(14):23-26.
- [7] 李赓,丁海燕,孙军. 改善卷烟纸包灰效果的研究[J]. 中国造纸,2012,31(8):32-35.
- [8] 宋微,李磊. 卷烟纸主要性能的影响因素和控制方法[J]. 造纸化学品,2011,23(4):25-26.
- [9] 程占刚,叶明樵,胡素霞,等. 影响卷烟包灰能力的因素研究[J]. 烟草科技,2011,44(2):9-12.
- [10] 李桂珍,王平军. 卷烟纸添加剂对卷烟包灰性能影响的研究[J]. 造纸化学品,2011,23(4):17-21.
- [11] 罗丹. 不同处理对番茄果实采后品质变化的影响[D]. 青岛:青岛农业大学,2017.
- [12] 齐景凯,曹霞,张晓雷. 粉果番茄贮藏期间主要性状变化规律研究[J]. 北方园艺,2016(1):117-120.
- [13] 尚春明,高振江,胡雪,等. 不同贮藏方式对番茄授粉效果的影响[J]. 北方农业学报,2018,46(5):113-116.
- [14] 魏云潇,叶兴乾. 果蔬采后成熟衰老酶与保护酶类系统的研究进展[J]. 食品工业科技,2009,30(12):427-431.
- [15] 张彪,张文涛,李喜宏,等. 气体二氧化氯对樱桃番茄贮藏品质的影响[J]. 食品研究与开发,2017,38(8):173-176.
- [16] 邓红军,茅林春. 采后果蔬机械损伤愈合研究进展[J]. 食品安全质量检测学报,2018,9(11):2744-2748.
- [17] 闫华,张红梅,张丽静,等. 离子液体研究进展[J]. 山东化工,2016,45(23):55-57.
- [18] 陈旭伟,毛全兴,王建华. 离子液体在蛋白质萃取分离中的应用[J]. 化学进展,2013,25(5):661-668.
- [19] 刘晓庚,高梅,陈海梅. 离子液体双水相体系及其在蛋白分离中的应用[J]. 中国粮油学报,2013,28(4):118-123.
- [20] TANG J, SONG H, FENG X T, et al. Ionic liquid-like pharmaceutical ingredients and applications of ionic liquids in medicinal chemistry: Development, status and prospects [J/OL]. Current medicinal chemistry, 2019 [2019-04-05]. <http://www.eurekaselect.com/162824/article>. DOI: 10.2174/0929867325666180605123436.
- [21] 宋飞跃,薛永波,高欣,等. 不同离子液体双水相萃取钼[J]. 应用化学,2019,36(3):335-340.
- [22] ATANASSOVA M, KURTEVA V. Synergism in the solvent extraction of europium(III) with thenoyltrifluoroacetone and CMPO in methylimidazolium ionic liquids[J]. Journal of solution chemistry, 2019, 48(1):15-30.
- [23] LIANG Q, ZHANG J S, SU X G, et al. Extraction and separation of eight ginsenosides from flower buds of *Panax ginseng* using aqueous ionic liquid-based ultrasonic-assisted extraction coupled with an aqueous biphasic system [J]. Molecules, 2019, 24(4):1-12.
- [24] NIE L R, SONG H, YOHANNES A, et al. Extraction in cholinium-based magnetic ionic liquid aqueous two-phase system for the determination of berberine hydrochloride in *Rhizoma coptidis* [J]. RSC Advances, 2018, 8(44):25201-25209.
- [25] 宋力飞,刘常青,李曼莎,等. 星点设计-响应面法优化黄芪双水相萃取工艺[J]. 中成药,2017,39(1):70-75.
- [26] 田盼盼,程超,汪兴平. 逐级盐析法结合双水相萃取纯化葛仙米藻蓝蛋白[J]. 食品科学,2015,36(24):16-22.
- [27] 曾群. 新型绿色溶剂的合成及其双水相体系在蛋白质绿色分离中的应用研究[D]. 长沙:湖南大学,2014.
- [28] 赵金花,王宇松,钟丽聪,等. N-甲基-N-乙基吗啉四氟硼酸盐离子液体的合成及其双水相萃取牛血清蛋白的研究[J]. 生命科学仪器,2013,11(Z1):58-62.
- [29] YANG H P, CHEN L, ZHOU C S. Improving the extraction of l-phenylalanine by the use of ionic liquids as adjuvants in aqueous biphasic systems [J]. Food chemistry, 2018, 245:346-352.
- [30] 陈静,王玉枝,黄松云. 季铵盐类环氧官能团离子液体-双水相萃取法萃取分离萃取胰蛋白酶[J]. 当代化工研究,2016(5):110-111.
- [31] 曾颖,余垒,朱新儒,等. 盐析法联合离子液体双水相纯化木瓜蛋白酶[J]. 食品科学,2018,39(24):261-267.
- [32] 邓凡政,郭东方. 离子液体双水相体系萃取分离牛血清白蛋白[J]. 分析化学,2006,34(10):1451-1453.
- [33] 刘祖祺,张石城. 植物抗性生理学[M]. 北京:中国农业出版社,1994:370-372.
- [34] 中国国家标准化管理委员会. 蜂花粉中过氧化氢酶的测定方法紫外分光光度法:GB/T 23195-2008[S]. 北京:中国标准出版社,2008.
- [35] MATUSCHEK E, SVANBERG U. The effect of fruit extracts with polyphenol oxidase (PPO) activity on the in vitro accessibility of iron in high-tannin sorghum [J]. Food chemistry, 2005, 90(4):765-771.
- [36] DHINDSA R S, DHINDSA P P, THROPE T A. Leaf senescence: Correlated with increased levels of membrane and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase [J]. J Exp Bot, 1981, 32(3):93-101.

(上接第 181 页)

## 参考文献