提取条件对蜂花粉粗多糖抗氧化能力的影响

渠宏雁[1,2]，李学鹏[3]，陈永泉*[1,2]

（1. 江南大学 无锡医学院，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 食品学院，江苏 无锡 214122；3. 渤海大学 食品科学与工程学院，辽宁 锦州 121013）

摘要：为探究不同提取方式对蜂花粉粗多糖抗氧化活性的影响，采用热水浸提法提取蜂花粉粗多糖，研究了温度及乙醇体积分数对3种花粉中蜂花粉粗多糖提取率的影响；并根据邻苯三酚自氧化原理和芬顿原理检测了蜂花粉粗多糖对超氧阴离子和羟自由基的清除效果；最后，以经丙烯醛处理的大黄鱼肉为模型，通过测定蛋白质羰基质量摩尔浓度研究了蜂花粉粗多糖对大黄鱼肌原纤维蛋白质氧化的影响。结果表明：80 ℃提取的茶花花粉粗多糖对超氧阴离子的抗氧化活性最显著，乙醇体积分数对3种花粉粗多糖对超氧阴离子的清除效果差别显著，而对羟自由基的清除效果不显著。80 ℃、乙醇体积分数为95%时所提取的3种蜂花粉粗多糖均能使丙烯醛处理的大黄鱼肉肌原纤维蛋白中羰基质量摩尔浓度显著下降而总巯基质量摩尔浓度上升，且以野菊花粉粗多糖作用效果最佳。因此，蜂花粉粗多糖的抗氧化活性受提取温度和乙醇体积分数的影响，且蜂花粉粗多糖能够抑制蛋白质氧化，其中以野菊花粉粗多糖抗氧化效果最佳。

关键词：蜂花粉；粗多糖；蛋白质氧化；大黄鱼

中图分类号：TS 202　**文章编号：**1673-1689(2022)02-0022-07　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2022.02.003

Effect of Extraction Conditions on Antioxidant Activity of Bee Pollen Polysaccharides

QU Hongyan[1,2]，*LI Xuepeng*[3]，*CHEN Yongquan*[*1,2]

（1. Wuxi School of Medicine, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. School of Food Science and Technology, Bohai University, Jinzhou 121013, China）

Abstract: Hot water extraction was used to extract bee pollen crude polysaccharides to investigate the effect of different extraction methods on the antioxidant activities of bee pollen polysaccharides. The effect of temperature and ethanol volume fraction on the extraction rate of bee pollen polysaccharide from three kinds of pollenwere studied. The scavenging effect of bee pollen crude polysaccharides towards superoxide and hydroxyl radical was detected under pyrogallol autoxidation and fenton oxidation, respectively. At last, the effect of pollen polysaccharides on myofibrillar protein oxidation was explored by measuring the content of protein carbonyl group (molar

收稿日期：2020-01-12

基金项目：国家自然科学基金项目(31771539)；国家重点研发计划项目(2017YFD0400202)。

* **通信作者：**陈永泉(1961—)，男，博士，教授，博士研究生导师，主要从事功能脂肪酸等活性成分对防治和延缓前列腺癌发生机制方面的研究。E-mail：yqchen@jiangnan.edu.cn

concentration) in the flesh of acrolein-treated large yellow croaker (*Pseudosciaenacrocea*). The results indicated that the antioxidant effect of camellia crude polysaccharides extracted at 80℃ was most significant against superoxide radicals. The scavenging effect of ethanol volume fraction on superoxide free radicals of three kinds of pollen polysaccharides was significant, but the scavenging effect onhydroxyl radicals was insignificant. Pollen polysaccharides extracted at 80 ℃ and 95% ethanol concentration significantly reduced the carbonyl content and increased total sulfhydryl content in the large yellow croaker myofibrillar protein treated with acrolein. The effect of crude polysaccharides from wild chrysanthemum pollen was the best. It was concluded that the antioxidant activity of bee pollen was affected by extraction temperature and ethanol volume fraction, and bee pollen polysaccharides couldinhibit protein oxidation, among which wild chrysanthemum pollen polysaccharides showed the best antioxidant effect.

Keywords: bee pollen, crude polysaccharide, protein oxidation, large yellow croaker (*Pseudosciaenacrocea*)

人类对蜂产品的利用历史悠久,蜂王浆、蜂胶和蜂花粉等蜂产品不仅可以食用,还能用作肌肉减少症、急性肺损伤、癌症等多种疾病的辅助治疗[1-5]。蜂花粉多糖是蜂花粉的主要成分之一,目前已发现多糖提取物具有抗肿瘤、抗感染、降血糖血脂、控制细胞分裂和分化、调节细胞生化氧化和凋亡等多种重要的生理作用[6-9]。

长期以来,氧化对食品品质的影响备受关注,但主要都集中在氧化对脂质的影响,而蛋白质氧化对食品品质的影响长期被忽略。蛋白质氧化和脂类氧化均是由自由基链式反应引起的[10]。包括羟自由基(·OH)、超氧阴离子($\cdot O_2^-$)、烷过氧自由基(ROO·)、过氧化氢(H_2O_2)等的活性氧(Reactive oxygen species,ROS)是引起食品蛋白质和脂质氧化的前体物质或促进因子[10-11]。同时,ROS 诱导的脂质过氧化反应中产生的自由基也可导致蛋白质氧化,形成羰基衍生物和共价交联物,进而导致蛋白质溶解度下降、羰基形成、巯基含量减少等变化,从而引起蛋白质变性或降解并进一步影响食品品质[10]。

众所周知,脂质氧化引起了食品酸败,并造成多不饱和脂肪酸和维生素损失,然而,肉及肉制品在贮藏过程中发生的软化现象和其他质构变化却是由蛋白质氧化变性和肌原纤维蛋白水解造成的。作者主要研究提取温度和沉淀所用乙醇体积分数对 3 种蜂花粉粗多糖提取率和对自由基清除效果的影响,并对优化提取所得蜂花粉粗多糖对大黄鱼蛋白质氧化的影响进行了研究,以期为蜂花粉多糖的提取应用及食品抗氧化相关产品开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

玫瑰蜂花粉、野菊蜂花粉和茶花蜂花粉:购自慈蜂堂;冰鲜大黄鱼:购自大润发超市,并全程置于冰上,尽快到实验室转移至-80 ℃冻藏备用;无水乙醇、浓硫酸、苯酚、邻苯三酚、邻二氮菲、过氧化氢、磷酸盐缓冲液(pH 7.4)、盐酸、硫酸亚铁、三羟甲基氨基甲烷(Tris):除盐酸为优级纯外其余均为分析纯,均购自阿拉丁。

1.2 仪器与设备

FA-2004 型电子分析天平:上海恒平科学仪器有限公司;数显恒温水浴锅:鄄城威瑞科教仪器有限公司;SCF-06A 型脂肪提取器:上海新嘉电子有限公司;722N 型可见分光光度计:上海精密科学仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 蜂花粉粗多糖提取的前处理 蜂花粉粗多糖的提取参考张国锋等[12]的方法并略有改进。分别称取玫瑰花粉、野菊花粉和茶花花粉 100.0 mg 各 3 份,适当研磨破碎,分别装入带不同标记的圆底烧瓶中,并分别加入 150 mL 蒸馏水。

1.3.2 蜂花粉粗多糖的提取 将脂肪提取器温度分别调至 50、60、70、80、90、100 ℃进行浸提浓缩,随后冷却过滤即可得到不同温度浸提的蜂花粉多糖粗提物溶液待用。

1.3.3 蜂花粉粗多糖的沉淀 用体积分数95%的乙醇溶液按4:1的体积对蜂花粉多糖粗提物溶液进行沉淀,得到不同温度下提取出的蜂花粉粗多糖沉淀。

1.3.4 蜂花粉粗多糖的定量测定 采用苯酚-硫酸法[13],将各温度下提取的蜂花粉粗多糖沉淀溶解,分别于50 mL容量瓶中定容,离心去除沉淀后备用。吸取2 mL样品置于加塞试管中,向其中加入1.0 mL质量分数6%苯酚溶液,再向其中加入5.0 mL浓硫酸,静置10 min,摇匀,室温放置20 min,于490 nm处测定吸光度值,并以葡萄糖为标准品计算出相应的蜂花粉粗多糖的提取量,见公式(1),多糖提取率见公式(2)。

$$x=14.648y-0.037\ 2 \tag{1}$$

式中:x为吸光度值;y为蜂花粉粗多糖质量浓度,mg/mL。

$$E_r=\frac{c\times V}{W}\times 100\% \tag{2}$$

式中:E_r为粗多糖提取率,%;V为粗多糖沉淀定容后的溶液体积,mL;c为葡萄糖质量浓度,mg/mL;W为称取的花粉质量,mg。

1.3.5 蜂花粉粗多糖对超氧阴离子的抗氧化活性的测定 据邻苯三酚自氧化原理[14],量取2.8 mL pH 8.2的Tris-HCl(50 mmol/L)置于试管中,向其中加入100 μL蒸馏水得粗多糖溶液,室温静置10 min,加入预热的邻苯三酚(60 mmol/L)100 μL,摇匀,于420 nm处测定吸光度值,并计算出相应的清除率,见公式(3)。

$$\mathrm{CL}=\left(1-\frac{A_x-A_{x0}}{A_0}\right)\times 100\% \tag{3}$$

式中:CL为清除率,%;A_0为空白对照的吸光度值;A_x为加入蜂花粉粗多糖的吸光度值;A_{x0}为不加入蜂花粉粗多糖的吸光度值。

1.3.6 蜂花粉粗多糖对羟自由基的抗氧化活性的测定 据芬顿(Fenton)反应原理[15],量取0.75 mol/L邻二氮菲1 mL于试管中,加入2 mL 0.2 mol/L磷酸盐缓冲液(pH 7.4)和1 mL蒸馏水,混匀。再向其中加入1 mL 0.75 mmol/L的$FeSO_4$溶液,混匀。然后分别加入1 mL 10 mmol/L H_2O_2溶液、1 mL蒸馏水和1 mL粗多糖溶液,37 ℃水浴60 min后于536 nm处测定吸光度值,并计算出相应的清除率,见公式(4)。

$$\mathrm{CL}=\left(1-\frac{A_1-A_3}{A_2-A_3}\right)\times 100\% \tag{4}$$

式中:CL为清除率,%;A_1为加入蜂花粉粗多糖提取液的吸光度值;A_2为加入H_2O_2的吸光度值;A_3为空白对照的吸光度值。

1.3.7 乙醇体积分数对蜂花粉粗多糖抗氧化活性的影响 将蜂花粉粗多糖溶液分别用体积分数为50%、60%、70%、80%、90%、100%的乙醇溶液进行沉淀,其他步骤同上。

1.3.8 大黄鱼肌肉丙烯醛处理及肌原纤维蛋白的制备 取大黄鱼背部近头肌肉切块,用无菌水洗净、沥干(冰上操作),浸泡于5 mmol/L丙烯醛溶液中,25 ℃避光恒温水浴24 h,取出后用超纯水反复冲洗,置于干燥洁净的纱布上吸去多余水分并随后提取肌原纤维蛋白。

肌原纤维蛋白(盐溶性蛋白)分离提取参照Pazos等[16]的方法并略有改动。将大黄鱼肉块组织粉碎后加入5倍体积的10 mmol/L Tris-HCl(pH 7.2)缓冲液中,采用组织匀浆机13 000 r/min匀浆5 min,4 500 g离心20 min,倒掉上部清液,将沉淀加入5倍体积的10 mmol/L Tris-HCl(含0.6 mol/L NaCl和200 mmol/L PMSF(蛋白酶抑制剂),pH 7.2)13 000 r/min高速匀浆,5 000 g离心20 min,取上清液,采用Bradford法检测蛋白质质量浓度。

1.3.9 乙醇体积分数对蜂花粉粗多糖抗氧化活性的影响 取1 mL、5 mg/mL的蛋白质样液和1 mL、10 mmol/L的2,4-二硝基苯肼(DNPH)溶液(含2 mol/L HCl)置于离心管中,室温条件下避光静置1 h(每隔15 min振荡一次),加入等体积20% TCA,10 000 r/min离心5 min,弃上清液,用2 mL乙酸乙酯和乙醇(体积比1:1)混合溶液洗涤沉淀后置于5 mL、6 mol/L盐酸胍溶液中,37 ℃孵育15 min,10 000 g离心3 min,取上部清液测定370 nm处吸光度值。对照组不经DNPH处理,其余操作相同,见公式(5)。

$$c_{ar}=\frac{A\times V_1\times 10^6}{\varepsilon\times b\times V_2\times c_p} \tag{5}$$

式中:c_{ar}为蛋白质羰基浓度,nmol/L;A为吸光度值;V_1为盐酸胍的体积,L;ε为吸光系数,22 000 L/(mol·cm);b为光程,1 cm;V_2为蛋白质取样的体积,mL;c_p为取样蛋白质的质量浓度,mg/mL。

2 结果与讨论

2.1 提取温度对蜂花粉粗多糖抗氧化活性的影响

2.1.1 蜂花粉粗多糖的定量测定 热水提取法是提取植物多糖最常用的方法,具有简单、方便、可操作性强、成本低廉的特点[17-18]。而苯酚-硫酸法则是常用的多糖测定方法之一,与蒽酮-硫酸法相比,具有不易受色氨酸和蛋白质影响的特点[12]。由图 1 可知,茶花花粉粗多糖在 50~60 ℃之间提取率显著增加,并在 80 ℃达峰值,随后逐渐减少;野菊花粉粗多糖的提取率随温度升高而增大,并于 100 ℃时达到最大;与前两种花粉相比,玫瑰花粉粗多糖的提取率受温度影响较小, 在 50~90 ℃曲线一直较平稳,100 ℃时达最大。由于粗多糖是活性物质,温度过高易破坏其结构,影响其生物活性,故实际情况下 3 种花粉的提取温度均以 80 ℃为宜。

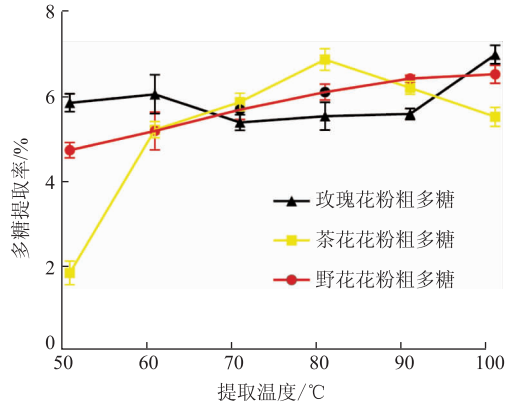


图 1 温度对蜂花粉粗多糖提取率的影响

Fig. 1 Effect of extraction temperature on the yield of pollen polysaccharides

2.1.2 蜂花粉粗多糖抗氧化活性的测定 超氧阴离子和羟自由基不仅是生命活动中具有代表性的自由基,也是食品中常见的 ROS,因此作者通过测定蜂花粉粗多糖对这 2 种自由基的清除效果来表征蜂花粉粗多糖的抗氧化活性。由图 2~3 可知,3 种花粉粗多糖对超氧阴离子及羟自由基的抗氧化活性均呈现先升高后下降的趋势。在 50~70 ℃ 3 种粗多糖对超氧阴离子的抗氧化活性曲线均呈现上升状态,并于 70 ℃时达峰值,随后呈缓慢下降趋势;其中野菊花粉粗多糖对超氧阴离子的抗氧化活性最强。而 3 种蜂花粉粗多糖对羟自由基的抗氧化活性则与此略有不同,茶花花粉粗多糖和玫瑰花粉粗多糖对羟自由基的清除率也在 70 ℃达峰值, 但野菊花粉粗多糖则在 80 ℃时达峰值。从图 3 中还可以看出,70 ℃时提取的玫瑰花粉粗多糖对羟自由基的清除率最高。此外,3 种蜂花粉粗多糖对超氧阴离子的清除效果都优于其对羟自由基的清除效果。羟自由基是目前已知活性氧寿命短但活性最强的自由基,对于芬顿反应,羟自由基是酸性条件下的主要反应物种[19]。而超氧阴离子则是生物线粒体内膜上分子氧首先接受一个电子被还原得到的,是诱导自由基链式反应的起点,并可参与生理和病理信号转导的调控[20]。另外,虽然热水提取法所得粗多糖为混合物,乙醇沉淀和定容后离心并不能去除全部杂质,也无法排除单糖的干扰。参考张翠香等[21]的研究结果,热水浸提法所得蜂花粉多糖纯度可达 85%以上,因此认为该法所提蜂花粉粗多糖在清除自由基的实验中起主要作用的活性成分为多糖。另外,本

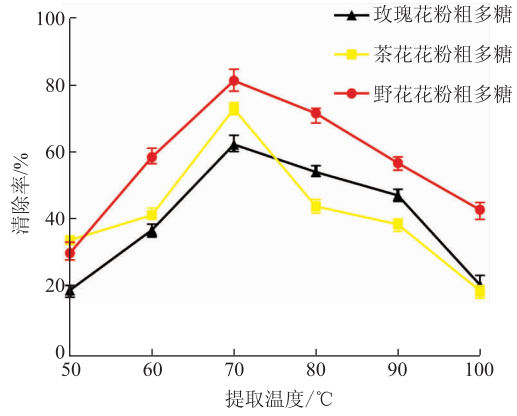


图 2 不同温度下提取的蜂花粉粗多糖对超氧阴离子的清除效果

Fig. 2 Pollen polysaccharides against superoxide anion free radicals

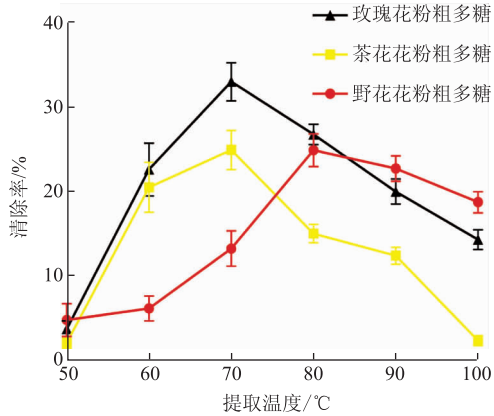


图 3 不同温度下提取的蜂花粉粗多糖对羟自由基的清除效果

Fig. 3 Pollen polysaccharides against hydroxyl free radicals

研究主要目的是探索蜂花粉粗提物对食品抗氧化特别是鱼肉蛋白质氧化的影响，故无须进一步提纯。因此,研究蜂花粉粗多糖对超氧阴离子和羟自由基的清除作用可表征其抗氧化能力,有利于今后蜂花粉粗多糖的实际应用。

2.2 乙醇体积分数对蜂花粉粗多糖的影响

2.2.1 沉淀剂中乙醇体积分数对粗多糖提取率的影响 由图 4 可知,乙醇体积分数为 50%~60%时,3 种花粉粗多糖的提取率都未发生明显变化；乙醇体积分数为 60%~70%时，茶花花粉粗多糖和玫瑰花粉粗多糖的提取率显著升高,而野菊花花粉粗多糖提取率的增幅与其相比则较小；乙醇体积分数 70%~100%时，茶花花粉粗多糖和野菊花花粉粗多糖增长趋势逐渐趋于平缓,而玫瑰花粉粗多糖则在乙醇体积分数为 90%~100%时再次显著增加。由此可知,随着乙醇体积分数的升高,3 种花粉粗多糖的提取率均逐渐增多，即所使用乙醇体积分数越高,沉淀效果越显著;但不同的花粉变化趋势并不完全一致,这可能是由于蜂花粉多糖成分复杂,不同来源的蜂花粉粗多糖所含各类活性物质的比例存在差异导致的。王昀等[22]、王建波等[23]和王博等[24]分别测定了红花花粉、菊花花粉和玉米花粉的单糖和多糖成分,不同的蜂花粉来源的多糖主要成分和摩尔比均不同。本试验中所选择的 3 种蜂花粉多糖成分可能也存在此类差异,亟待后续研究进一步求证。

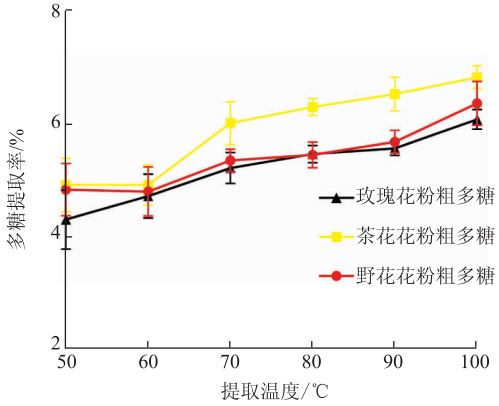


图 4 乙醇体积分数对蜂花粉粗多糖的提取率的影响

Fig. 4 Effect of ethanol concentrations on extraction rate of bee pollen polysaccharide

2.2.2 乙醇体积分数对蜂花粉粗多糖抗氧化活性的影响 由图 5~6 可知，随着乙醇体积分数的升高,3 种花粉粗多糖对超氧阴离子自由基及羟自由基的清除率均逐渐增大，当乙醇体积分数为 100%时清除率最大,但实际操作中通常选择乙醇体积分数为 90%或 95%以起到除去蜂花粉粗多糖中水溶性杂质的作用。从整体可以看出,对超氧阴离子自由基的清除率最高的是茶花花粉粗多糖;3 种花粉粗多糖对羟自由基的清除效果差别不显著。众所周知,乙醇极易挥发不易残留,且低剂量的乙醇能被人体迅速代谢,因此,选择乙醇作为沉淀剂安全无害。

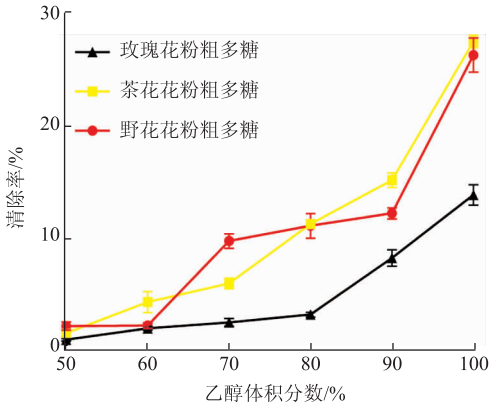


图 5 蜂花粉粗多糖对超氧阴离子自由基的清除效果

Fig. 5 Inhibition effect of pollen polysaccharides against superoxide anion free radicals

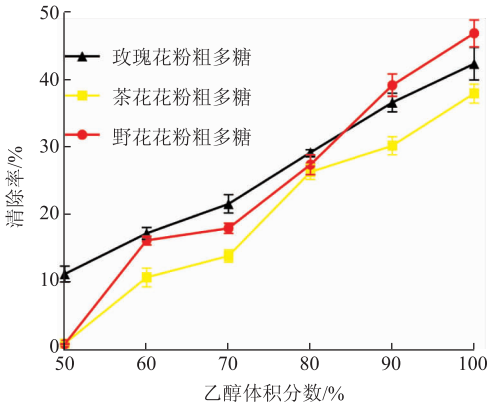


图 6 蜂花粉粗多糖对羟自由基的清除效果

Fig. 6 Inhibition effect of pollen polysaccharides against hydroxyl free radicals

2.3 蜂花粗多糖对大黄鱼蛋白质氧化的影响

如前所述,提取温度 80 ℃左右、乙醇体积分数为 90%~95%时，所得蜂花粉对体外模拟的单一种类自由基均有明显的清除效果,其中对超氧阴离子的清除效果为最佳。为验证蜂花粉粗多糖是否在复杂的食品体系内仍有较好的抗氧化效果,作者以经

过丙烯醛处理的大黄鱼肌肉为研究对象,通过测定羰基和总巯基的质量摩尔浓度来评估蜂花粉粗多糖对大黄鱼蛋白质氧化的影响。如图 7~8 所示,经脂质过氧化物丙烯醛处理的大黄鱼肌肉羰基值显著升高,总巯基值则显著降低,表明 3 种蜂花粉粗多糖均能抑制丙烯醛诱导的蛋白质氧化,其中又以野菊花粉粗多糖的抗氧化效果最佳。羰基质量摩尔浓度是蛋白质氧化最重要的指标,丙烯醛的不饱和双键可与蛋白质肽链中的亲核基团发生迈克尔加成反应,其羰基可与蛋白质氨基反应形成希夫碱,使得蛋白质发生共价交联[25]。半胱氨酸(Cys)是最易被氧化的氨基酸,羰基值的变化并不能表征半胱氨酸的氧化情况,其特异性巯基向二硫键转换则通常被认为是蛋白质氧化的早期步骤[26-27]。

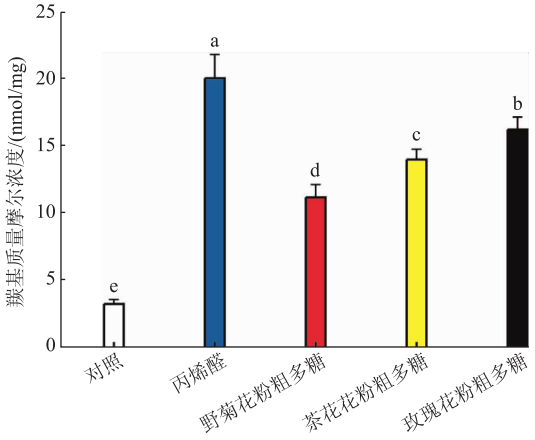


图 7 蜂花粉粗多糖对经丙烯醛处理的大黄鱼蛋白质羰基质量摩尔浓度的影响

Fig. 7 Effect of pollen polysaccharides on the carbonyl content of myofibrillar proteins of *Pseudosciaena crocea* treated with acrolein

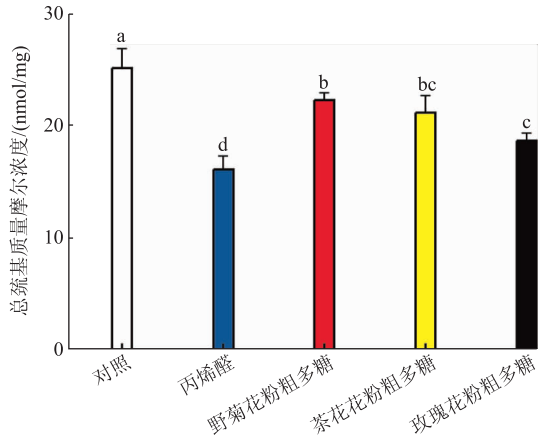


图 8 蜂花粉粗多糖对经丙烯醛处理的大黄鱼蛋白质总巯基质量摩尔浓度的影响

Fig. 8 Effect of pollen polysaccharides on the sulfhydryl group content of myofibrillar proteins of *Pseudosciaena crocea* treated with acrolein

3 结 语

较高的提取温度以及乙醇体积分数均有利于蜂花粉粗多糖的提取,但温度过高(超过 80 ℃)其抗氧化活性反而呈下降趋势,而所用沉淀剂乙醇体积分数过高时,不利于去除蜂花粉中的水溶性杂质,因此,提取温度为 80 ℃,沉淀剂乙醇体积分数为 90%~95%时,蜂花粉粗多糖的提取率和对自由基的清除率均达到最优水平。不仅如此,该优化条件提取所得蜂花粉粗多糖还能够使得经丙烯醛处理的大黄鱼肌原纤维蛋白羰基值降低而总巯基值升高,表明蜂花粉粗多糖能有效抑制大黄鱼肌肉蛋白质氧化。

参考文献:

[1] ALI A M,KUNUGI H. Apitherapy for age-related skeletal muscle dysfunction (*Sarcopenia*):A review on the effects of royal jelly,propolis,and bee pollen[J]. **Foods**,2020,9(10):1362-1400.

[2] LI Q,SUN M,WAN Z,et al. Bee pollen extracts modulate serum metabolism in lipopolysaccharide-induced acute lung injury mice with anti-inflammatory effects[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2019,67(28):7855-7868.

[3] WAN OMAR W A,AZHAR N A,HARIF FADZILAH N,et al. Bee pollen extract of Malaysian stingless bee enhances the effect of cisplatin on breast cancer cell lines[J]. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**,2016,6(3):265-269.

[4] KOMOSINSKA-VASSEV K,OLCZYK P,KAZMIERCZAK J,et al. Bee pollen:Chemical composition and therapeutic application[J]. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**,2015(2015):297-303.

[5] THAKUR M,NANDA V. Composition and functionality of bee pollen:a review[J]. **Trends in Food Science & Technology**,2020,98:82-106.

[6] CHEN F,HUANG G. Antioxidant activity of polysaccharides from different sources of ginseng[J]. **International Journal of**

Biological Macromolecules,2019,125:906-908.

[7] FRIEDMAN M. Mushroom polysaccharides:Chemistry and antiobesity,antidiabetes,anticancer,and antibiotic properties in cells,rodents,and humans[J]. **Foods**,2016,5(4):80.

[8] ZOU Y,DU F,HU Q,et al. The structural characterization of a polysaccharide exhibiting antitumor effect from *Pholiota adiposa mycelia*[J]. **Scientific Reports**,2019,9(1):1724-1734.

[9] LIN S,LI H Y,WANG Z Y,et al. Analysis of methanolic extracts and crude polysaccharides from the leaves of *Chuanminshen violaceum* and their antioxidant activities[J]. **Antioxidants**,2019,8(8):266-281.

[10] ZHAO B,ZHOU H,ZHANG S,et al. Changes of protein oxidation,lipid oxidation and lipolysis in Chinese dry sausage with different sodium chloride curing salt content[J]. **Food Science and Human Wellness**,2020,9(4):328-337.

[11] SIES H,JONES D P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents[J]. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**,2020,21(7):363-383.

[12] 张国锋,刁其玉,屠焰. 荷花蜂花粉多糖提取条件的研究[J]. 饲料工业,2009,30(20):4-7.

[13] 董群,郑丽伊,方积年. 改良的苯酚 - 硫酸法测定多糖和寡糖含量的研究[J]. 中国药学杂志,1996,31(9):550-553.

[14] 韩少华,朱婧博,王妍妍. 邻苯三酚自氧化法测定抗氧化活性的方法研究[J]. 中国酿造,2009(6):155-157.

[15] 徐向荣,王文华. 化学发光法测定 Fenton 反应中的羟自由基及其应用[J]. 环境科学,1998,19(2):51-54.

[16] PAZOS M,DA ROCHA A P,ROEPSTORFF P,et al. Fish proteins as targets of ferrous-catalyzed oxidation:Identification of protein carbonyls by fluorescent labeling on two-dimensional gels and MALDI-TOF/TOF mass spectrometry[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2011,59(14):7962-7977.

[17] 徐锁玉. 植物多糖提取工艺的研究进展[J]. 食品安全导刊,2018,30(117):144-145.

[18] 李瑶佳. 植物多糖提取方法研究进展[J]. 现代农业科技,2019(1):222-223.

[19] WANG J,WANG S. Reactive species in advanced oxidation processes:formation,identification and reaction mechanism[J]. **Chemical Engineering Journal**,2020,401:126-158.

[20] YAN J,JIANG J,HE L,et al. Mitochondrial superoxide/hydrogen peroxide:an emerging therapeutic target for metabolic diseases[J]. **Free Radical Biology and Medicine**,2020,152:33-42.

[21] 张翠香,罗永会,徐春萍,等. 蜂花粉多糖和黄酮的联合提取及含量测定[J]. 食品研究与开发,2017,38(10):59-62.

[22] 王昀,李月,唐春兰,等. 蜂花粉粉末 PBPC-II 结构分析及抗氧化活性[J]. 食品工业,2019,40(5):325-330.

[23] 王建波,林鲁霞,窦江丽,等. 玉米花粉多元中单糖组分分析[J]. 山东师大学报,2004,19(3):69-71.

[24] 王博,张梦珊,张中玉,等. 菊花蜂花粉微米的分离纯化及抗肿瘤活性研究[J]. 食品工业科技,2016,37(5):358-360.

[25] MISHRA N. Biological potent heteroaryl ketone schiff base and thorium(IV) complexes of 2-benzoaminothiazole[J]. **Archives of Molecular Medicine and Genetics**,2018,1(2):51-55.

[26] STACEY M M,CUDDIHY S L,HAMPTON M B,et al. Protein thiol oxidation and formation of S-glutathionylated cyclophilin A in cells exposed to chloramines and hypochlorous acid[J]. **Archives of Biochemistry and Biophysics**,2012,527(1):45-54.

[27] LI S,LI Z,LI X,et al. Effect of AAPH oxidation on digestion characteristics of seed watermelon (*Citrullus lanatus* var) kernels protein isolates[J]. **Food Science and Human Wellness**,2020,9(4):402-410.