

矢车菊甙-辣根过氧化物酶-过氧化氢新体系及其在酶联免疫传感分析中的应用

龚福春*, 李定中, 杨荣, 魏建科, 曹忠, 谭淑珍, 谭亚非

长沙理工大学化学与生物工程学院, 长沙 410004

* 通讯作者, E-mail: gfc139@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-11-08; 接受日期: 2008-12-09

摘要 以一种天然色素矢车菊素-3-葡萄糖苷(Cyanidin-3-glucose, CAG)为辣根过氧化物酶(HRP)底物建立了矢车菊甙-辣根过氧化物酶-过氧化氢新体系。CAG在540 nm处有一个吸收峰(A_{P1})，在HRP催化下被H₂O₂氧化， A_{P1} 降低；同时，其氧化产物在482 nm处产生一个新吸收峰(A_{P2})，并且反应体系中两峰值的比值 $R(A_{P2}/A_{P1})$ 与HRP量在一定浓度范围内呈线性相关。根据此原理，以猪口蹄疫病毒蛋白(*food and mouth disease virus antigen*, FMDVAg)为分析模型，建立了检测猪口蹄疫病毒的酶联免疫传感分析新方法。该方法利用伴刀豆蛋白(Concanavalin, ConA)对糖蛋白的识别特性固定HRP-猪口蹄疫病毒抗体连接物(HRP-FMDVAb)，由ConA介导和磁性分离实现了免疫反应特异性组分和非特异成分，以及反应免疫磁性珠与没反应免疫磁性珠的分离。运用制备的传感体系测定猪口蹄疫病毒的线性范围为 $1.5 \times 10^{-8} \sim 2.7 \times 10^{-6}$ g/mL，抗原检出限为 3.1×10^{-9} g/mL，相对标准偏差为3.7%($n=11$)。底物CAG及其产物的水溶性好，对人体无毒副作用，在临幊上可代替传统HRP底物进行免疫检测。

关键词
矢车菊甙
HRP 底物
酶联免疫传感
猪口蹄疫病毒

免疫分析是临幊诊断、食品和药物分析以及环境化学等领域中最常用的分析方法之一。酶联免疫分析将酶的催化放大作用和抗原抗体反应的专一性相结合，具有很高的选择性和灵敏度，特别适合于低浓度的样品和含有大量蛋白质、氨基酸、糖类等干扰物的临幊样品检测^[1,2]。辣根过氧化物酶(HRP)是广泛应用于酶联免疫分析(ELISA)中的一种标记酶^[3]，鉴于其优良特性，已建立了各种光学酶联免疫分析^[4,5]和电化学酶联免疫分析等体系^[6,7]。酶免疫检测方法的特征在很大程度上取决于所用的酶-底物系统。传统HRP底物主要有邻苯二胺(OPD)、3,3',5,5'-四甲替联苯胺(TMB)、5-氨基水杨酸(5-AS)、联大茴香胺(OD)、

邻联苯甲胺(OT)、3,3'-二氨基联苯胺(DAB)和2,2'-连胺基-2(3-乙基-并噻唑啉磺酸-6)铵盐(ABTS)等，这些底物存在如下不足：(1) OPD、TMB、5-AS、OD、OT及DAB的水溶性差，其水溶液在空气中不稳定，需新鲜配制^[8]；(2) 多数酶催化产物水溶差，不便于比色定量测定，例如组化法常用的HRP底物3,3'-二氨基联苯胺盐酸盐(DAB)，其反应物由于形成的氧化型中间体迅速聚合，形成不溶性的棕色吩嗪衍生物^[9]，只能用于染色定性测定；(3) 有的底物对人体健康有害，例如OPD可以使人体致癌^[10]等。因此，寻找更敏感、稳定、安全无毒的HRP新底物对发展酶联免疫分析方法具有重要意义。

本课题组前期工作开发了几种性能优异的新底物, 如白藜芦醇、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖甙和 4-羟基苯乙烯基吡啶, 并分别将其应用于酶联免疫反应体系测定不同的抗原抗体。本文建立了矢车菊素-3-葡萄糖苷(CAG)-辣根过氧化物酶-过氧化氢新体系。对新体系的紫外-可见光谱特性进行了研究, 发现 CAG 及其氧化产物分别在 540 nm 和 482 nm 处有一个紫外吸收峰, 并且两峰值的比值 R 与 HRP 在一定浓度范围内呈线性相关。以猪口蹄疫病毒抗原蛋白(*Foot and mouth disease virus*, FMDVAg)为分析模型, CAG 为 HRP 底物, 建立了检测猪口蹄疫病毒的酶联免疫传感分析新方法。该方法利用伴刀豆蛋白(Concanavalina, ConA)对糖蛋白的识别特性和磁性分离同时实现了对 HRP-猪口蹄疫病毒抗体(HRP-FMDVAb)固定, 以及免疫反应特异性组分和非特异成分、反应免疫磁性珠与没反应免疫磁性珠分离。该 CAG 及其氧化产物均有很好的水溶性, 储备液在室温下稳定。该体系可用于酶联免疫光度分析, 具有操作简便、灵敏度较高、试剂稳定等优点。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

样品的紫外-可见光谱测定在Shimadzu UV-1601 PC型紫外-可见分光光度计上进行。矢车菊素-3-葡萄糖苷(CAG)、 β -D-甲基葡萄糖苷和伴刀豆蛋白从 Sigma 公司获得; 邻苯二胺(OPD)、3,3',5,5'-四甲替联苯胺(TMB)、5-氨基水杨酸(5-AS)和 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)购于中国医药集团上海化学试剂公司; 甲基三甲氧基硅烷(MTEOS)从武汉大学试剂厂购买; 聚乙烯亚胺(polyethyleneimine, PEI, $M_n \sim 400$)购自东京化成株式会社; 猪口蹄疫病毒抗原(FMDVAg)和猪口蹄疫病毒抗体(FMDVAb)为中国农业部青岛动物检疫研究所龚振华副研究员赠品; Fe_3O_4 磁性纳米粒子(25 nm)由长沙理工大学物理与电子学院提供。辣根过氧化物酶标记猪口蹄疫病毒抗体(HRP-FMDVAb)按文献方法^[11]合成。为本实验所用其他试剂均为国产试剂。

1 mmol/L 矢车菊甙和 0.01 mol/L H_2O_2 储备液: 称取 4.85 mg 矢车菊素-3-葡萄糖苷溶于 100 mL pH 6.8 的 B-R 缓冲液, 即得底物储备液; 将 0.28 mL 30%

H_2O_2 用 pH 6.8 的 B-R 缓冲液定容至 250 mL 制得 0.01 mol/L H_2O_2 储备液。

1.2 矢车菊甙-辣根过氧化物酶-过氧化氢反应体系测试

于 10 mL 的试管中加入 1 mL 矢车菊甙储备溶液, 用 pH 6.8 的 B-R 缓冲液稀释至刻度, 在 35°C 下分别加入 0.2 mL 浓度为 2.00×10^{-3} mol/L H_2O_2 和 2.00×10^{-3} mol/L $\text{H}_2\text{O}_2 + 1.00 \times 10^{-6}$ mol/L HRP-FMDVAb, 反应 1 min 后, 用 2 mol/L H_2SO_4 终止反应。在紫外-可见分光度仪上记录矢车菊甙溶液的紫外可见吸收变化值。以邻苯二胺(OPD)、3,3',5,5'-四甲替联苯胺(TMB)、5-氨基水杨酸(5-AS)和 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)作为对照, 进行相同实验。

1.3 抗体在PEI- Fe_3O_4 磁性微珠上的固定

PEI- Fe_3O_4 聚合物磁性微珠的制备参照文献[12]进行: 取 60 mL 质量分数为 2% 的 PEI 溶液于三颈烧瓶中, 在 N_2 保护及快速搅拌下加入 15 mg Fe_3O_4 纳米粒子及 100 μL 1.5 N FeCl_2 , 搅拌混合, 加入 2.5 mL 质量分数为 30% 的 H_2O_2 , 同时进行紫外光照射, 反应 30 min。反应完成后, 磁性分离, 用三蒸水清洗, 即得 PEI 修饰的 Fe_3O_4 磁性微珠, 颗粒大小为 65 nm 左右(图 1), 保存备用。

取 PEI- Fe_3O_4 磁性微珠 50 mg 于烧瓶中, 加入三蒸水 15 mL 分散, 然后加入 3 mL 质量分数为 2% 的戊二醛和 2 mL 质量分数为 0.5% 的猪口蹄疫病毒抗体(FMDVAb), 在 28°C 恒温水浴条件下搅拌反应 45 min。反应毕, 磁性分离, 用三蒸水清洗后, 将 FMDVAb 修饰磁性纳米颗粒(FMDVAb-P)悬浮于 20 mL pH 6.8 的 B-R 缓冲液中, 保存备用。

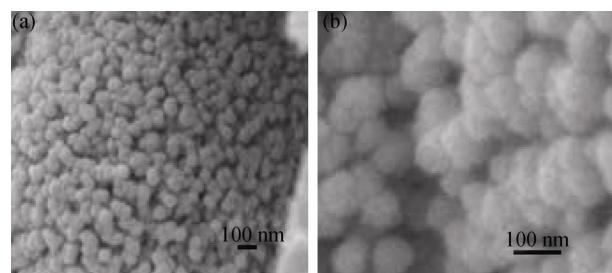


图 1 PEI- Fe_3O_4 磁性微珠的扫描电子显微镜图

(a) 低倍; (b) 高倍

1.4 猪口蹄疫病毒抗原传感体系的制备

按参考文献[13]利用溶胶-凝胶技术,以四甲氧基硅(TMOS)和 γ -氨丙基甲基二甲氧基硅烷(APMDMOS)为前驱体制备一种氨基化硅胶基质。并以戊二醛为交联剂,利用该氨基化硅胶为载体对ConA进行交联固定化。具体步骤:一种含有6.5 mL甲基三甲氧基硅烷、1.5 mL γ -氨丙基甲基二甲氧基硅烷、5.5 mL水和2 mL 0.05 mol/L HCl的混合溶液经超声振荡器超声分散15 min后,室温放置水解36 h,获得约7.1 g硅溶-胶凝(sol-gel)泥。取5.0 g sol-gel泥填充于一根内径为6 mm的PVC管内,制得一种含氨基的硅胶支持棒,在进一步胶化或老化后(28°C, 24 h)可用于ConA的固定。

将上述硅胶棒开口一端的表面沾水,在Al₂O₃砂纸上打磨光亮后,用pH 6.8的B-R缓冲液冲洗。取50 μL 5%的戊二醛滴加在更新的表面,室温放置20 min,用蒸馏水洗掉未反应的戊二醛,然后将处理的硅胶棒在浓度为 1.5×10^{-4} mol/L的伴刀豆蛋白溶液中培育20 min,冲洗后,从而将伴刀豆蛋白固定在硅胶棒上。最后,将伴刀豆蛋白修饰的硅胶棒在 5.5×10^{-6}

mol/L HRP标记的猪口蹄疫病毒抗体(HRP-FMDVAb)的溶液中37°C培育45 min,用pH 6.8的B-R缓冲液冲洗后,即获得猪口蹄疫病毒抗原传感体(CoA-HRP-FMDVAb)。

1.5 酶联免疫传感分析程序

酶联免疫传感测定程序如图2所示。首先将猪口蹄疫病毒抗原传感体在含待测FMDVAg和FMDVAb修饰磁性纳米颗粒(FMDVAb-P)的混合溶液中37°C培育30 min后,用pH 6.8的B-R缓冲液冲洗,除去非特异性吸附的FMDVAg和FMDVAb-P。接着,将免疫反应后的硅胶棒在5%的 β -D-甲基葡萄糖苷溶液浸泡15 min,再用磁铁吸引脱附的HRP-FMDVAb-FMDVAg-FMDVAb-P,用pH 6.8的B-R缓冲液冲洗,保存备用。最后,进行酶反应和测定:将磁铁吸附的HRP-FMDVAb-FMDVAg-FMDVAb-P固定于位于光路上的流通反应池上,将包含 6×10^{-4} mol/L矢车菊甙底物溶液泵入流通反应池,测定540和482 nm两处的吸光度,接着加入 1.0×10^{-4} mol/L H₂O₂并记录变化了的吸光度,计算两峰处吸光值的比值R。

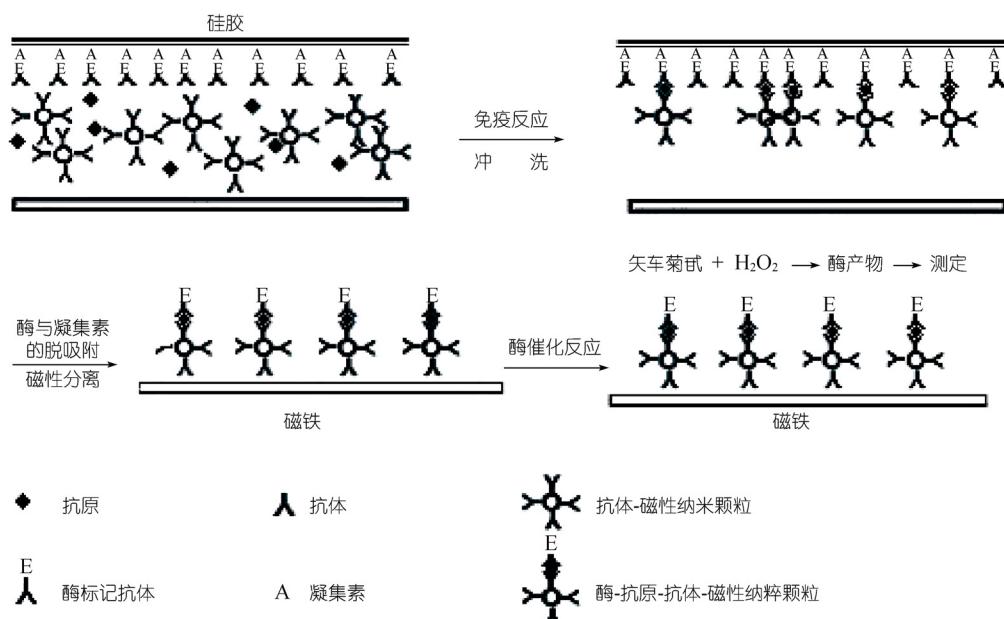


图2 免疫分析程序

2 结果与讨论

2.1 矢车菊甙-辣根过氧化物酶-过氧化氢反应体系的特性

对矢车菊甙对 H_2O_2 和HRP-FMDVAb + H_2O_2 响应性能进行了研究。表 1 是矢车菊甙(CAG)、邻苯二胺(OPD)、3,3',5,5'-四甲替联苯胺(TMB)、5-氨基水杨酸(5-AS)和3,3'-二氨基联苯胺(DAB)对HRP-FMDVAb+ H_2O_2 及单独 H_2O_2 反应的紫外吸光度数据, 从表中可知, CAG对单独 H_2O_2 的响应比OPD、TMB和DAB小, 与5-AS相当; 但对HRP-FMDVAb+ H_2O_2 的响应值则与TMB和DAB相当, 比5-AS的值要大。矢车菊甙溶液对单独 H_2O_2 响应小, 可以较好地降低背景信号, 增加灵敏性; 对HRP-FMDVAb响应大, 说明酶对催化CAG氧化反应速率大, 灵敏高。

表 1 加入 H_2O_2 和HRP-FMDVAb+ H_2O_2 后底物矢车菊甙(CAG)、邻苯二胺(OPD)、3,3',5,5'-四甲替联苯胺(TMB)、5-氨基水杨酸(5-AS)和3,3'-二氨基联苯胺(DAB)的紫外吸收值变化率(ΔA)

HRP底物 ^{a)}	加 H_2O_2 ^{b)} (ΔA)	加HRP/ H_2O_2 ^{b)} (ΔA)
矢车菊甙	0.03	0.42
邻苯二胺	0.12	0.43
3,3',5,5'-四甲替联苯胺	0.11	0.39
5-氨基水杨酸	0.04	0.16
3,3'-二氨基联苯胺	0.12	0.44

a) 底物浓度均为 6×10^{-4} mol/L; b) H_2O_2 和HRP-FMDVAb的浓度分别为 3.5×10^{-3} 和 1.2×10^{-7} mol/L, 反应时间为2 min, 用2 mol/L H_2SO_4 终止反应

对底物矢车菊甙最佳反应浓度及体系的 K_m 进行了研究。底物矢车菊甙最佳反应浓度: 加3 mL pH 6.8的B-R缓冲液于10 mL的试管中, 再加50 μL 2.5×10^{-7} mol/L HRP和50 μL 1.00×10^{-4} mol/L H_2O_2 , 最后加不同浓度的底物, 定容到10 mL, 反应2 min, 用2 mol/L H_2SO_4 终止反应, 测定吸光值。由结果可知, 矢车菊甙浓度较低时, 底物浓度与可见吸收强度呈线性关系, 当浓度大于 6×10^{-4} mol/L时紫外吸收强度值出现平台, 浓度达到 6.5×10^{-4} mol/L时吸光值最大。

利用初速度法测定了CAG-HRP- H_2O_2 体系的 K_m 值。反应条件同上, 取反应初速, 作 $v-C_{\text{CAG}}$ 图。由图上任取几个点, 求其倒数, 用双倒数法作图, 得一直线。

该体系线性拟合方程为 $1/v = 5.7 \times 10^{-13} \times 1/C_{\text{CAG}} + 3.5 \times 10^{-3}$; 变异系数 $r = 0.994$, $V_{\text{max}} = 2.5 \times 10^2$ mol·s $^{-1}$; 米氏常数 $K_m = 1.3 \times 10^{-4}$ mol/L。由同样方法求得3,3',5,5'-四甲替联苯胺(TMB)的 V_{max} 为 1.2×10^2 mol·s $^{-1}$ 。这说明CAG-HRP- H_2O_2 体系比TMB-HRP- H_2O_2 体系的反应速率大。

2.2 矢车菊甙及其产物的紫外-可见光谱特性及免疫分析原理

对以CAG为HRP底物反应体系的紫外-可见光谱进行了研究。图3是矢车菊甙及其HRP催化产物的可见光谱, 由图可知, 底物在540 nm处有个吸收峰($A_{\text{P}1}$), HRP催化 H_2O_2 氧化矢车菊甙, 生成的反应产物在482 nm处有一个新的最大吸收峰($A_{\text{P}2}$), 并且随着HRP浓度增加, 吸收值($A_{\text{P}1}$)减少, 同时产物的吸收值($A_{\text{P}2}$)增加。两吸收值之比值($A_{\text{P}2}/A_{\text{P}1}$) R 与HRP的量在一定范围内呈线性相关。本酶联免疫分析方法通过测定 R 值来定量HRP, 进而间接定量测定猪口蹄疫病毒抗原(FMDVAg)浓度。

由于本方法采用两峰的比值来定量FMDVAg克服了传统直接测定酶产物吸收的方法易受背景信号干扰大的问题, 提高了分析的灵敏度。

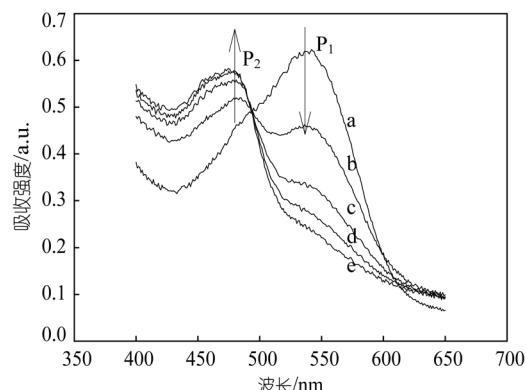


图3 CAG及其HRP催化产物的可见光谱

a. 6×10^{-4} mol/L CAG + 3.5×10^{-4} mol/L H_2O_2 , 以及a 加入不同浓度的HRP-FMDVAb: b. 1; c. 2; d. 4; e. 6×10^{-8} mol/L

2.3 测定条件的选择

用底物CAG溶液在540 nm处的可见吸收强度表示HRP-FMDVAb对CAG的催化活性。根据吸收峰高

低选择了 HRP-FMDVAb 催化反应缓冲液及其 pH。对 B-R、HCl-Tris、Na₂CO₃-NaHCO₃、NaOH-H₃BO₃-KCl 等几种缓冲液进行了比较, 结果表明: 在 B-R 缓冲液中, 响应较稳定。在 pH 6.8 时, CAG 的吸收峰型好, 响应值最大。

对 CAG 和 H₂O₂ 的浓度对酶联免疫反应的影响进行了测试。结果显示, CAG 的浓度达到 6×10^{-4} mol/L 时, 可以得到最大的吸收响应值; H₂O₂ 浓度为 3.5×10^{-4} mol/L 时, 峰高变化最大, 超过此浓度后, 随着 H₂O₂ 浓度的增加, 峰高增加值变小, 这一现象体现了 H₂O₂ 既是 HRP 的底物又是其抑制剂的双重性。

鉴于免疫组分一般在动物体温下活力较好的特性, 所以, 传感体在免疫反应液的培育温度选择为 37℃。考察了 HRP-FMDVAb 催化 CAG 与 H₂O₂ 反应的最适温度。实验结果表明: 反应温度在 30~40℃ 范围内, 吸收响应较大。本实验选择 37℃ 作为酶催化反应温度。

2.4 线性范围、检测限及 FMDVAg 的测定

按实验部分所述方法, 以 CAG 为 HRP-FMDVAb 底物, 在所选择的最优条件下, 测得 R 响应值与猪口蹄疫病毒蛋白抗原浓度在 $1.5 \times 10^{-8} \sim 2.7 \times 10^{-6}$ g/mL 范围内呈线性关系, 其回归方程为: $R = 0.031 + 42.8C$ (g/mL), $r^2 = 0.9983$ 。对浓度为 3.0×10^{-7} g/mL 的猪口蹄疫病毒蛋白抗原连续进行 11 次平行测定, 得相对

标准偏差为 3.7%, 抗原检出限为 3.1×10^{-9} g/mL。结果表明: 本体系的灵敏度稍优于诊断试剂盒所用 TMB 底物 (5.4×10^{-9} g/mL), 而且所用底物矢车菊素-3-葡萄糖苷比 TMB 更稳定, 无需避光保存。

2.5 样品回收测试

按照上述实验方法, 对猪口蹄疫病毒抗原蛋白进行了回收率实验, 所得结果见表 2。由表中数据可以看出本方法稳定性和灵敏性均较好。

2.6 机理讨论

从花色苷的结构看, 由于共轭效应, 氧上的不成对电子并不固定于氧原子, 而是靠近苯环, 从而削弱氢氧键, 使羟基上氢原子活性提高, 易于脱去而成为氢供体, 在植物体内是一种天然的抗氧化剂^[14,15]。矢车菊素-3-葡萄糖苷是一种多酚类物质, 具有邻位的羟基且数目较多, 一方面有多次提供氢原子的能力, 另一方面其邻位羟基苯衍生物生成的苯氧基自由基可在分子内部生成氢键而得到稳定, 还可以通过电子转移, 形成稳定的化合物, 从而提高其活性。在矢车菊素-3-葡萄糖苷作为供氢体参与反应。由实验结果和相关工作可推测, 矢车菊素-3-葡萄糖苷在 HRP 催化下被 H₂O₂ 氧化的机理如图 4:

表 2 样品回收数据

样品	起始浓度/mg·L ⁻¹	加入量/mg·L ⁻¹	回收量/mg·L ⁻¹	回收率(<i>n</i> =4) %
标准	10.00	1.50	1.48	98.7
FMDVAg		2.20	2.15	97.7
血清	0	1.70	1.67	98.2
		4.00	4.05	101.3

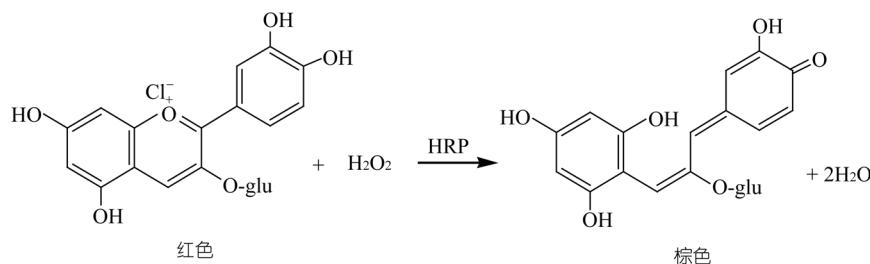


图 4 HRP 催化矢车菊素-3-葡萄糖苷氧化反应机理

3 结论

矢车菊素-3-葡萄糖苷及其产物水溶性好, 在空气中稳定, 对光温度不敏感, 而对辣根过氧化物酶敏感, 且无毒副作用, 是一种优良的 HRP 底物。将该新 HRP 底物运用于酶联免疫传感体系测定 FMDVAg, 结果表明: 基于新底物的酶联免疫分析方法灵敏较

高、检测下限低、稳定性好。以伴刀豆蛋白为介体能较好固定 HRP-FMDVAb 连接物, 将伴刀豆蛋白对糖蛋白的吸附-解脱特性与磁性纳米粒子的磁性结合可以较好地解决酶联免疫传感体系免疫反应复合物-磁性纳米颗粒与没反应磁性纳米颗粒的分离问题, 为提高灵敏度开辟了一条有效途径。

致谢 本工作得到湖南省科技计划项目(批准号: 2008SK3052)和湖南省教育厅科研项目(批准号: 08B004, 07A006)资助。

参考文献

- 1 Meyer J, Karst U. Enzyme-linked immunosorbent assays based on peroxidase labels and enzyme-amplified lanthanide luminescence detection. *Analyst*, 2001, 126(24): 175—178 [[DOI](#)]
- 2 Jörg M, Uwe K, Enzyme-linked immunosorbent assay based on peroxidase labels and enzyme-amplified lanthanide luminescence detection. *Analyst*, 2000, 126(1): 175—178
- 3 Mohanty J G, Jaffe J S, Schulman E S, Raible D G. A highly sensitive fluorescent microassay of H_2O_2 release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazinederivative. *J Immunol Meth*, 1997, 202(6): 133—41 [[DOI](#)]
- 4 Gong F C, Tang L F, Shen G L, Yu R Q. Fluorometric enzyme immunoassay system based on a renewable immunoreaction platform for the detection of *Schistosoma japonicum* antibody. *Talanta*, 2004, 62(4): 735—740 [[DOI](#)]
- 5 Plowman T E, Reichert W M, Peters C R, Wang H K, Christensen D A, Herron J N. Femtomolar sensitivity using a channel-etched thin film waveguide fluoroimmunosensor. *Biosens Bioelectron*, 1996, 11(1-2): 149—160 [[DOI](#)]
- 6 李建国, 刘颖, 鞠焜先. 季胺-辣根过氧化物酶-过氧化氢显色新体系及其在酶活性检测中的应用. 化学学报, 2007, 65(15): 1499—1503
- 7 Limoges B, Degrand C, Brossier P. Homogeneous electrochemical immunoassay using a persulfonated ionomer-modified electrode as a detector for a cationic labeled hapten. *Anal Chem*, 1993, 65: 1054—1060 [[DOI](#)]
- 8 孙伟, 焦奎, 张书圣. 伏安酶联免疫分析中一类新的 HRP 底物体系的初步研究. 青岛化工学院学报(自然科学版), 2000, 21(4): 377—280
- 9 Ghindilis A L, Krishnan R, Atanasov P, Wilkins E. Flow-through amperometric immunosensor: Fast ‘sandwich’ scheme immunoassay. *Biosens Bioelectron*, 1997, 12(5): 415—423 [[DOI](#)]
- 10 Alexander P W, Maltra C. Enzyme-linked immunoassay of human immunoglobulin G with the fluoride ion selective electrode. *Anal Chem*, 1982, 54: 68—71 [[DOI](#)]
- 11 Gong F C, Zhou Z J, Shen G L, Yu R Q. *Schistosoma japonicum* antibody assay by immunoassaying with fluorescence detection using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as substrate. *Talanta*, 2002, 58(4): 611—618 [[DOI](#)]
- 12 刘洪玲, 李军. 肿瘤靶向 PEI 包覆磁性纳米凝胶的光化学制备及表征. 高等学校化学学报, 2008, 29(8): 1703—1706
- 13 钱军民, 李旭祥, 锁爱莉. 氨基化硅胶固定化葡萄糖氧化酶的研究. 生物化学与生物物理进展, 2002, 29(3): 13—17
- 14 初玉侠, 张惠祥, 金春光. 牵牛花色素的提取及其性质的研究. 食品科学, 1991, 5: 7—12
- 15 Florian C S, Angela S S, Reinhold C, Balz F, Ronald E W. Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(21): 6172—6181 [[DOI](#)]