

生物活性追踪法对丁香抗低密度脂蛋白氧化修饰的研究

江慎华^{1,2}, 肖敏¹, 江春霞¹, 刘仁绿¹, 郑烈江¹, 朱晓婷¹, 张良慧¹, 马海乐²

(1. 九江学院生命科学学院, 江西九江 332000) (2. 江苏大学食品与生物工程学院, 江苏镇江 212013)

摘要: 丁香为桃金娘科植物丁香的干燥花蕾。实验室前期经筛选发现, 丁香在国家公布的 87 种药食两用物品原料中抗氧化活性最强。为了在此基础上进一步探索丁香抗低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 氧化修饰作用, 本文采用生物活性追踪及硫酸铜诱导法, 对丁香抗 LDL 氧化修饰作用进行了研究。结果表明, 反应体系中硫酸铜和 LDL 浓度分别采用 3 mmol/L 和 4 mg/mL 合适。丁香粗提物及其乙酸乙酯相、正丁醇相与水相三个极性部位对 LDL 氧化均具有相应的抑制能力。在不同极性部位中乙酸乙酯相抑制率最高 (85.29±0.02)%, 为有效部位。该有效部位对 LDL 抑制呈现良好的量效关系, 且对已被氧化修饰的 LDL 也存在抑制能力。薄层色谱分析发现有效部位主要由 8 种成分组成。实验证明丁香具有很强的 LDL 氧化修饰抑制能力, 为后续研发抗动脉粥样硬化功能食品打下了基础。

关键词: 丁香; 生物活性追踪法; 低密度脂蛋白; 氧化修饰

文章编号: 1673-9078(2013)9-2063-2067

Oxidation Modification of Clove Anti-low-density-lipoprotein by Bio-assay Guided Method

JIANG Shen-hua^{1,2}, XIAO Min¹, JIANG Chun-xia¹, LIU Ren-lv¹, ZHENG Lie-jiang¹, ZHU Xiao-ting¹, ZHANG Liang-hui¹, MA Hai-le²

(1. College of Life Science, Jiu jiang University, Jiu jiang 332000, China)

(2. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: Clove, the dried buds of *Eugenia caryophyllata* Thunb., showed the strongest antioxidant activity among 87 kinds of medicinal and edible plants in our previous researches. In this research, the anti-Low-Density-Lipoprotein (LDL) oxidation modification of clove was studied by determining the yield of Malondialdehyde and using bio-assay guided method and copper sulfate induction. The results showed that the appropriate concentrations of copper sulfate and LDL were 3 mmol/L and 4 mg/mL, respectively. The crude extract and different fractions of clove possessed strong anti-LDL oxidation activity. The inhibition efficiency of ethyl acetate fraction was higher (85.29±0.02)% than that extracted by ethyl acetate n-butyl alcohol and water. The inhibition rate of ethyl acetate fraction on LDL oxidation modification presented a good dose-effect relationship. There are eight kinds of ingredients in effective fraction through TLC analysis.

Key words: clove; bio-assay guided method; low density lipoprotein; oxidative modification

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是临床常见的多发病, 是引发心脑血管疾病的主要病因^[1]。由 AS 引起的心脑血管疾病已超过肿瘤成为我国发病率和死亡率均居第一位的疾病, 且其发病率呈逐年上升趋势

收稿日期: 2013-05-01

基金项目: 中国博士后科学基金资助项目 (20100481099); 江西省自然科学基金 (20132BAB204030); 江西省科技支撑计划 (20123BBF60150); 江西省教育厅科技项目 (GJJ12620); 江苏省农产品物理加工重点实验室开放课题资助项目 (JAPP2010-5)

作者简介: 江慎华 (1973-), 男, 博士 (后), 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 食品营养学与功能性食品

^[2]。一般认为, AS 的发病机制主要与氧化应激、炎症反应、高糖等密切相关^[1]。其中, LDL 氧化修饰是引起 AS 的一个重要起始致病因素^[1]。

丁香, 为桃金娘科植物丁香 (*Eugenia caryophyllata* Thunb.) 的干燥花蕾, 具有抑菌、抗突变和抑制脂肪氧化酶活性, 增强男子性功能等功能^[3], 被国家列入第一批既是食品又是药品名单。本实验室前期对国家公布的 87 种药食两用物品原料筛选后发现, 丁香抗氧化活性名列第一^[4], 并对其抗氧化活性进行了相应的研究^[3,5]。国内外很多学者对丁香抗氧化及抑制脂质过氧化功能展开了相应的研究。Politeo^[6]和江慎华等^[3]

发现丁香具有很强的抗氧化活性,沈勇根^[7]等进一步发现丁香对脂质过氧化具有较好的抑制能力。

LDL 是肝脏和外周组织之间甘油三酯和胆固醇的主要载体,呈扁平椭圆型三维结构,主要由载脂蛋白和脂质组成^[8]。LDL 所含的脂类及载脂蛋白易被正常生理代谢过程中产生的活性氧氧化修饰成 ox-LDL^[9]。尽管前期实验室通过筛选发现丁香抗氧化活性很强^[4],但是,丁香对含有较多脂类和蛋白成分的 LDL 氧化是否也具有抑制作用而使得其具有抗 AS 的潜力呢?目前尚不清楚。于是,本文在前人研究结果及实验室前期工作基础上,采用生物活性追踪法对丁香抑制 LDL 氧化修饰活性进行研究,为后续研发丁香抑制 LDL 氧化修饰及抗 AS 功能食品打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂及仪器

1.1.1 材料

丁香,产自云南,购于江西九江黄庆仁棧华氏大药房。材料买回后粉碎、过 40 目筛后置冰箱中备用。LDL,自健康人血浆中分离得到。

1.1.2 试剂

肝素钠,购自上海蓝季科技发展有限公司。硫代巴比妥酸(TBA),购自国药集团化学试剂有限公司。其余试剂均为国产分析纯。

1.1.3 仪器

DFY-C 高速粉碎机,温岭林大机械公司;LJL10 冷冻干燥机,巩义市予华仪器有限公司;UNIC 7200 可见分光光度计,尤尼柯(上海)公司;PB-10 pH 计,Sartorius 仪器设备有限公司;TLC SCANNER 3 薄层扫描仪,瑞士 CAMAG 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 硫代巴比妥酸反应物测定方法

采用 Zhang 等^[10]方法,略加改进。取透析好的 LDL 溶液(蛋白浓度为 4 mg/mL)400 μ L,加 3 mmol/L CuSO₄ 50 μ L,加 50 μ L 不同浓度样液,37 $^{\circ}$ C 水浴孵育 24 h 后,加 25 μ L EDTA-Na₂ (1%) 终止氧化,加入 15% 三氯乙酸(沉淀蛋白质)和 0.67% TBA (显色)各 1 mL,充分混匀、沸水浴 35 min 后快速冷却至室温,3000 r/min 离心 10 min,取上清液于 532 nm 测 OD 值。抑制率计算公式如下:

$$TBARS \text{抑制率}/\% = \frac{A_{促氧} - A_{实验}}{A_{促氧}} \times 100$$

其中, $A_{促氧}$ 代表促氧化组样品吸光度值。促氧化

组:以甲醇代替样液执行以上相同操作获得的样液; $A_{实验}$ 代表实验组在 532 nm 处吸光度值。实验组:以不同浓度样液执行以上相同操作获得的样液。

采用 1,1,3,3-四甲氧基丙烷(TCI 公司)为标准品配制成 0、0.004176、0.00008352、0.01044、0.02088、0.04176、0.0522 nmol/mL 浓液,采用以上步骤绘制标准曲线,获得标准曲线回归方程为 $y(OD_{532}) = 26.042x$ (nmol/mL) - 0.0064; $R^2 = 0.9964$,采用该方程计算出图 1 和图 5 中 MDA 浓度。

1.2.2 生物活性追踪法对丁香各极性部位的制备

采用 Jiang 等^[11]方法,略作修改。称取 200 g 丁香原料粉碎过 40 目筛后,采用料液比 1:10 (g/mL)、提取温度 60 $^{\circ}$ C、水浴振荡提取 3 次,提取液合并、浓缩。取 1/10 体积浓缩液冻干获得丁香粗提物。剩余部分加入适量蒸馏水超声辅助溶解至悬浊液,采用石油醚去除丁香精油,然后分别采用极性逐渐增大的有机溶剂乙酸乙酯和正丁醇依次萃取,最后剩余水相。4 种不同样品分别浓缩、真空干燥除去有机溶剂后冷冻干燥,获得干粉,用甲醇配制成适当浓度置冰箱中备用。

1.2.3 低密度脂蛋白提取

采用文献^[12]所述的肝素钠沉淀法,略加修改。取 100 mL 血浆,加入 1000 mL 沉淀剂搅匀后调 pH 至 5.11,室温静置 10 min 使 LDL 充分沉淀后 3000 r/min 离心 10 min 后获得沉淀,加适量沉淀剂洗涤沉淀两次。所得沉淀用 6 mL pH 7.4 高盐 PBS 溶解,4 $^{\circ}$ C 透析 24 h 后采用 Lowly's 法测定蛋白含量,调整 LDL 蛋白浓度调至 4.0 mg/mL 后置冰箱中备用(2 周内用完)。

pH 7.4 高盐 PBS 配制方法:NaCl: 282 mmol/L, Na₂HPO₄: 8.1 mmol/L, KH₂PO₄: 1.5 mmol/L, KCl: 2.7 mmol/L, MgCl₂: 1.0 mmol/L, 最后调 pH 7.4。

沉淀剂配制方法:采用 5 mol/L 盐酸将 0.064 mol/L 柠檬酸钠 pH 调至 5.04,按 50 U/mL 标准加入肝素钠混匀。

洗涤剂配制方法:5 mol/L 盐酸将 0.064 mol/L 柠檬酸钠调至 pH 5.11。

1.2.4 TBARS 评价体系中 LDL 及硫酸铜适宜添加量的确定

黄琳娟等^[13]发现,在评价对 LDL 氧化修饰抑制作用的 TBARS 反应体系中,不同硫酸铜添加量对实验结果有影响。因此,本实验首先对该评价体系中 Cu²⁺ 及 LDL 添加量进行了优化。采用 1.2.1 方法,固定 LDL 及硫酸铜添加量均为 50 μ L。设置 LDL 浓度为 0.5、

1.0、2.0 及 4.0 mg/mL。设定硫酸铜浓度为 0.10、0.25、0.50、1.00、2.00、3.00、6.00、8.00 及 12.00 mmol/L，根据 OD_{532 nm} 吸光度值确定后续实验 TBARS 评价体系中 LDL 及硫酸铜的采用量。

1.2.5 丁香粗提物抑制 LDL 氧化修饰的影响

对 1.2.2 中制备所得的丁香粗提物设定浓度为 0.3、0.4 及 0.5 mg/mL 的样液，测定各样品 TBARS 值，研究丁香粗提物抑制 LDL 氧化修饰作用。

1.2.6 丁香抑制 LDL 氧化修饰有效部位的确定

将 1.2.2 中制备得到的乙酸乙酯相、正丁醇相和水相配制成浓度为 2.4 mg/mL 的样液，测定各样品 TBARS 值，确定丁香抑制 LDL 氧化修饰有效部位。

1.2.7 丁香有效部位抑制 LDL 氧化修饰的研究

将丁香有效部位配制成浓度为 1.0、1.2 及 2.4 mg/mL 的样液，通过测定各样品 TBARS 值来确定其有效部位抑制 LDL 氧化修饰活性及量效关系。

1.2.8 丁香有效部位延缓 LDL 氧化修饰的研究

采用聂乾忠等^[4]方法，略加修改。分别设置丁香乙酸乙酯相 1.0、1.2 与 2.4 mg/mL、阳性对照 BHT (1.0 mg/mL)、促氧化组及正常氧化组六组样液。向以上样液中分别加入 1 mL 硫酸铜溶液(3 mmol/L)及 8 mL LDL，37 °C 孵育 2 h 后加入 1 mL 各样液，此后每隔 3 h 测定 TBARS 值来检测丁香有效部位延缓 LDL 氧化修饰作用。

1.2.9 采用薄层扫描法对丁香乙酸乙酯相组成成分的初步分析

采用沈勇根等^[7]方法，略加修改。将样品用甲醇超声溶解、过滤，配置成 30 mg/mL 备用。展开剂为氯仿:丙酮:甲酸 (8:3:0.2, V/V/V)。将展开好的薄层板采用薄层扫描仪进行双波长扫描，测定波长为 300 nm，参比波长为 600 nm，扫描完成后再采用碘蒸气显色，将扫描和碘蒸气显色结果进行比较和分析。

1.3 数据统计

采用 DPS 软件进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 TBARS 评价体系中 LDL 及硫酸铜添加量的确定

的确定

当血浆 pH 为 5.11 时，LDL 与肝素钠生成沉淀，通过离心获得高纯度 LDL^[12]。pH 值对 LDL 提取很重要，偏高或偏低都会影响其纯度。本研究发现血浆与 LDL 沉淀剂按体积比 1:10 混合后其 pH 为 5.15，采用

1 mol/L HCl 通过充分搅拌调其 pH 为 5.11。

为了确定氧化过程中 LDL 与硫酸铜的适宜添加量，本实验采用 1.2.1 方法对这两者浓度测定的实验结果如图 1 所示。

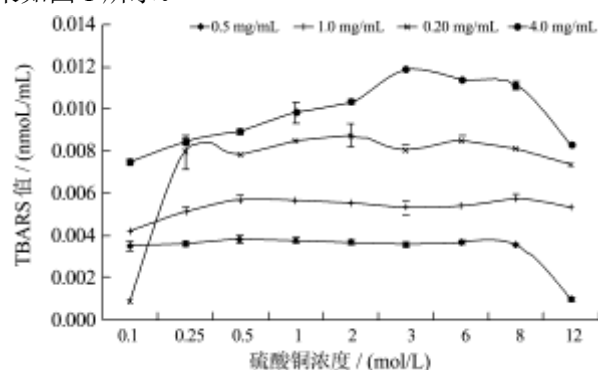


图1 硫酸铜与LDL浓度关系

Fig.1 The concentration relationship between copper sulfate and LDL

从图 1 可见，在固定 LDL 浓度情况下，当硫酸铜浓度在 0.1~3 mmol/L 范围内时，TBARS 值随着其浓度增加而逐渐增加。当硫酸铜浓度在 3~12 mmol/L 范围内时，OD_{532nm} 吸光度值缓慢下降。同样，当固定硫酸铜浓度时，随着 LDL 浓度的增加，其吸光度值逐渐增加。由此可见，TBARS 评价体系中硫酸铜浓度采用 3 mmol/L、LDL 浓度采用 4.0 mg/mL 比较合适。以下实验硫酸铜和 LDL 均采用此浓度进行测定。

2.2 丁香粗提物抑制 LDL 氧化修饰活性

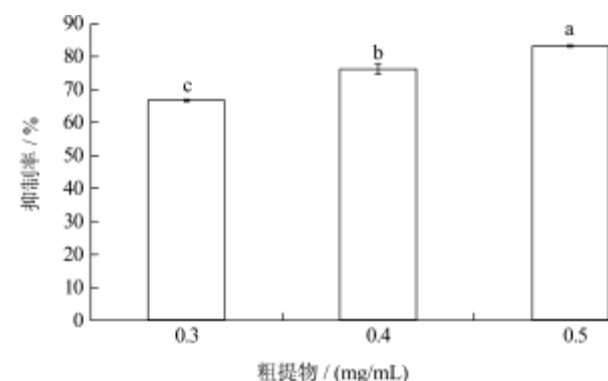


图2 丁香粗提物抑制 LDL 氧化修饰结果

Fig.2 The anti-LDL oxidation modification results of Clove crude extract

注：P<0.001。

丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 是脂质过氧化最常见的产物，测定其产生量可衡量脂质过氧化程度^[10]，其含量越高说明 LDL 氧化程度越高。

丁香粗提物抑制 LDL 氧化修饰结果如图 2 所示。由该图可知，丁香粗提物具有很强的抑制能力。当浓度为 0.3、0.4 与 0.5 mg/mL 时，其抑制率达

(66.47±0.28)%、(75.60±1.40)%与(83.13±0.28)%，并具有显著性差异(P<0.001)，呈现出良好的量效关系。沈勇根等^[7]也发现丁香提取物具有很强的抗氧化能力。

2.3 生物活性追踪法对丁香抑制LDL氧化修饰

有效部位的确定

生物活性追踪法是采用极性逐渐增大的有机溶剂对原料依次萃取获得不同极性部位，即将原料化学成分根据极性大小进行划分，再以药理活性为“眼睛”而“顺藤摸瓜”，追踪得到有效部位^[7,10-11]。

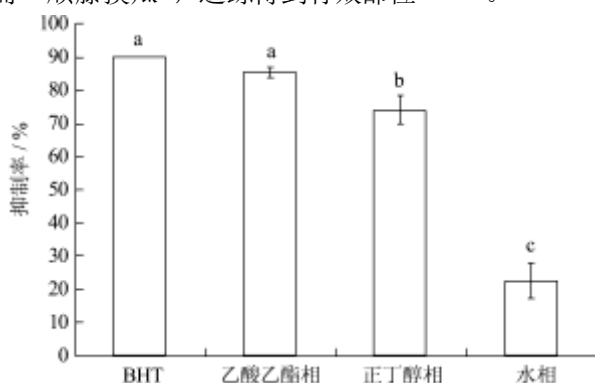


图3 丁香不同极性部位抑制LDL氧化修饰结果

Fig.3 The anti-LDL oxidation modification results of clove different polar parts

注: P<0.05。

将 1.2.2 中制备得到的各极性部位进行 TBARS 试验，根据抑制率大小确定有效部位。从图 3 可见，在丁香三个极性部位中，乙酸乙酯相抑制率最高，为(85.29±0.02)%。水相最低，为(22.27±0.05)%，并且呈现出显著性差异(P<0.05)，说明乙酸乙酯相为有效部位。尽管乙酸乙酯相抑制率比同浓度阳性对照 BHT 稍低，但没有显著性差异(P>0.05)。乙酸乙酯相为混合物，而 BHT 却为分析纯，由此可见丁香有效部位具有很强的抑制 LDL 氧化修饰能力。江慎华等^[11]通过生物活性追踪后也发现乙酸乙酯相为香椿老叶抗氧化活性的有效部位。

2.4 丁香有效部位抑制LDL氧化修饰

将乙酸乙酯相配制成三个浓度梯度液抑制 LDL 氧化修饰所得结果如图 4 所示。从该图可知，当浓度为 1.0、1.2 mg/mL 时，抑制率分别达(57.85±0.01)%、(74.55±0.01)%，有显著性差异(P<0.05)。在 1.0~2.4 mg/mL 浓度范围内，随着浓度的增加，抑制率呈上升趋势。

2.5 丁香有效部位延缓LDL氧化修饰作用

脂质过氧化一般分为三个阶段，即启动、扩增和自由基相互作用或其它自由基清除剂反应后的终止阶段，整个氧化过程中 MDA 含量一般是先上升后下降。在 2.4 及 2.5 实验中，丁香有效部位与 LDL 同时加入试管进行孵育，此时的 LDL 没有被氧化，结果证明有效部位与 LDL 同时加入对其能起有效抑制作用。但是，丁香有效部位对已被氧化修饰的 LDL 是否有抑制能力尚不清楚。为进一步验证其延缓氧化修饰能力，本实验按 1.2.8 方法设计实验获得的结果如图 5 所示。

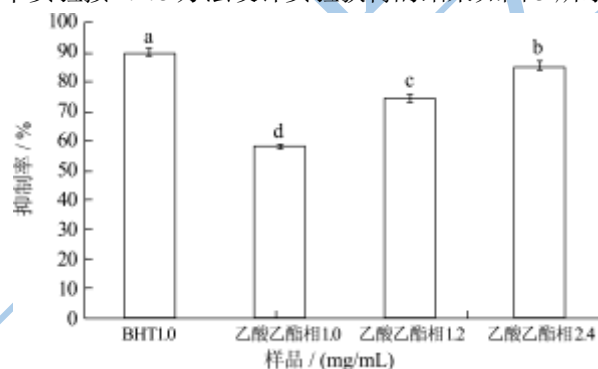


图4 不同浓度乙酸乙酯相抑制LDL氧化修饰结果

Fig.4 The anti-LDL oxidation modification results of different concentrations of ethyl acetate fraction

注: P<0.05。

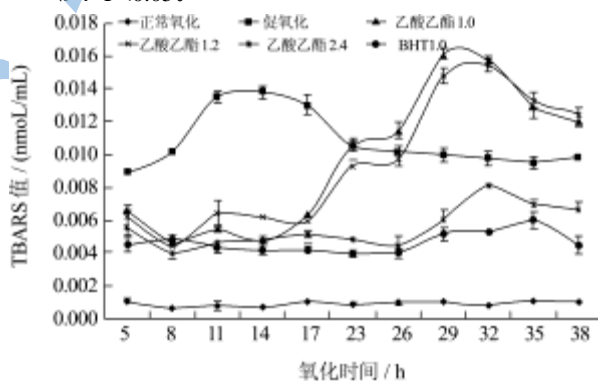


图5 有效部位延缓LDL氧化修饰结果

Fig.5 The results of effective parts delay LDL oxidation modification

注: 1.0、1.2、2.4均表示浓度，单位mg/mL。

LDL 氧化 2 h 后其吸光度值已达 0.118，说明此时 LDL 氧化已被启动。从此时开始添加丁香有效部位样液后，从图可看出 LDL 氧化速度被延缓，且氧化延缓时间与程度与样液浓度有关。在 1.0~2.4 mg/mL 浓度范围内，乙酸乙酯相对 LDL 氧化延缓的时间和程度均与浓度呈一定的正相关。没有添加任何提取液的促氧化样液在 14 h 时 OD₅₃₂ 就达到最高峰。当乙酸乙酯相

样液浓度为 1.0 mg/mL 时, 在 29 h 达到最高峰 (OD₅₃₂:0.412), 相比促氧化组延缓了 15 h。当样液浓度为 1.2 mg/mL 时, 在 32 h 才达最高峰 (OD₅₃₂:0.394), 相比促氧化组延缓了 18 h。当样液浓度为 2.4 mg/mL 时, 在 35 h 达最高峰 (OD₅₃₂:0.203), 延缓了 21 h。由此可见, LDL 氧化修饰延缓时间与程度均受到丁香有效部位的抑制作用, 且有一定的量效关系。

2.6 丁香乙酸乙酯相成分抗氧化活性物质基础的初步分析

采用薄层色谱 (thin layer chromatography, TLC) 可以对中草药组成成分进行有效分析。本文采用 1.2.9 的薄层色谱条件点 4 个相同样点, 并用碘蒸气显色后获得的丁香有效部位 TLC 色谱图如图 6a 所示, 对该薄层色谱板其中一个样点采用薄层扫描仪进行双波长扫描的结果如图 6b 所示 (X 轴表示各样点 R_f 值, Y 轴表示响应值)。由图 6 可见, 丁香有效部位主要含有 8 种成分, 这 8 种成分对紫外具有不同程度的吸收特性。

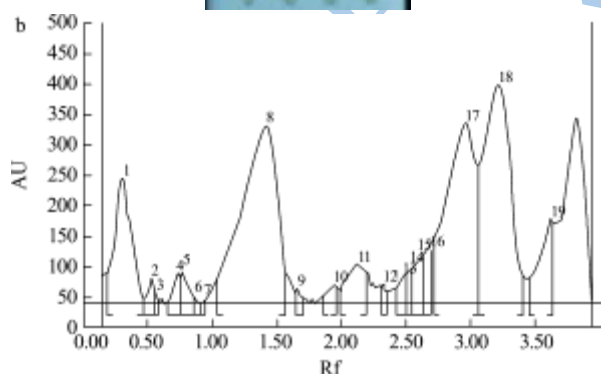


图6 丁香有效部位组成成分薄层色谱分析

Fig.6 The TLC analysis of effective parts composition of Clove

3 结论

3.1 TBARS 评价体系中, LDL 及硫酸铜适宜添加量分别为 50 μL、4 mg/mL 和 50 μL、3 mmol/L。

[6] Politeo O, Jukic M, Milos M. Comparison of chemical composition and antioxidant activity of glycosidically bound

3.2 丁香粗提物对 LDL 氧化修饰具有很强的抑制能力, 在 0.3~0.5 mg/mL 范围其抑制能力呈现出良好的量效关系。

3.3 通过生物活性追踪发现乙酸乙酯相为丁香抑制 LDL 氧化修饰有效部位, 丁香抑制 LDL 氧化修饰活性物质主要存在于该极性部位。

3.4 丁香有效部位在 1.0~2.4 mg/mL 范围内对 LDL 氧化修饰具有很强的抑制能力, 且呈现出良好的量效关系。

3.5 浓度为 1.0、1.2 与 2.4 mg/mL 丁香有效部位能将 LDL 氧化修饰过程中 MDA 峰值出现时间分别延长 15、18 与 21 h。

3.6 丁香有效部位主要由 8 种成分组成。丁香具有很强的抑制 LDL 氧化修饰能力, 有望为今后研发抗 LDL 氧化及抗 AS 功能食品奠定基础。

参考文献

- [1] Libby P, Ridker P M, Hansson G K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis [J]. Nature, 2011, 473(7347):317-325
- [2] 孙聪,孔飞,陈光亮.中药防治动脉粥样硬化的实验研究进展[J].中西医结合心脑血管病杂志,2008,6(11):1326-1327
Sun C, Kong F, Chen G L. The experimental progress of prevention and cure on arteriosclerosis of traditional Chinese medicine [J]. Chinese Journal of Integrative Medicine on Cardio-/Cerebrovascular Disease, 2008, 6(11): 1326-1327
- [3] 江慎华,王书源,马海乐,等.丁香活性物质提取工艺优化与抗氧化活性研究[J].农业机械学报,2010,41(1):132-138
Jiang S H, Wang S Y, Ma H L, et al. Extracting Technology and Antioxidant Activity of Bioactive Components from Clove [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2010,41(1):132-138
- [4] Jiang S, Li H, Ma H, et al. Antioxidant activities of selected Chinese medicinal and edible plants [J]. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 2011, 62(5): 441-444
- [5] 江慎华,蔡志鹏,廖亮,等.丁香抗氧化活性物质提取及人工胃肠液对其活性的影响[J].农业机械学报,2012,43(007): 149-155
Jiang S H, Cai Z P, Liao L, et al. Extraction of Antioxidants from Clove and Effect of Artificial Gastrointestinal Juice Immersion on Its Antioxidant Properties [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2012, 43(007): 149-155
and free volatiles from clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb.) [J]. Journal of food biochemistry,2010,34(1):129-141

- [7] 沈勇根,蔡志鹏,江慎华,等.丁香非挥发性成分抗氧化活性[J].农业机械学报,2012,43(10):131-137
Shen Y G, Cai Z P, Jiang S H, et al. Antioxidant Activity of Non-volatiles from Clove [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2012,43(10):131-137
- [8] Ren G, Rudenko G, Ludtke S J, et al. Model of human low-density lipoprotein and bound receptor based on cryoEM [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010, 107(3): 1059-1064
- [9] Mitra S, Deshmukh A, Sachdeva R, et al. Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis implications in antioxidant therapy [J]. The American journal of the medical sciences, 2011, 342(2): 135-142
- [10] Zhang Z, Chang Q, Zhu M, et al. Characterization of antioxidants present in hawthorn fruits [J]. The Journal of nutritional biochemistry, 2001, 12(3): 144-152
- [11] Jiang S H, Wang C L, Chen Z Q, et al. Antioxidant properties of the extract and subfractions from old leaves of *Toona sinensis* Roem (Meliaceae) [J]. Journal of Food Biochemistry, 2009, 33(3): 425-441
- [12] Wieland H, Seidel D. A simple specific method for precipitation of low density lipoproteins [J]. Journal of Lipid Research, 1983, 24(7): 904-909
- [13] 黄琳娟,田庚元,王仲孚,等.枸杞子糖缀合物及其糖链对LDL氧化修饰的抑制作用[J].药学学报,2001,36(2):108-111
Huang L J, Tian G Y, Wang Z F, et al. Studies on the Glycoconjugates and Glycans From *Lycium Barbarum* L in Inhibiting Low Density Lipoprotein (Ldl) Peroxidation [J]. Pharmaceutica Sinica, 2001, 36(2): 108-111
- [14] 聂乾忠,夏延斌,曾晓楠.三种天然抗氧化剂对冷鲜兔肉保鲜效果研究[J].食品与机械,2012,28(5):155-158
Nie Q Z, Xia YB, Zeng X N. Study on anti-oxidative effects of 3 natural anti-oxidants on chilled rabbit meat [J]. Food & Machinery, 2012, 28(5): 155-158