

戴灵鹏,董新姣,马海虎,等. 2011. 镉诱导满江红(*Azolla imbricata*) 花色苷的初步鉴定、抗氧化活性及其作用机理[J]. 环境科学学报 31(5): 1092-1097

Dai L P, Dong X J, Ma H H, et al. 2011. Preliminary identification ,antioxidant activity and mechanism of anthocyanins from *Azolla imbricata* induced by cadmium[J]. Acta Scientiae Circumstantiae 31(5): 1092-1097

镉诱导满江红(*Azolla imbricata*) 花色苷的初步鉴定、抗氧化活性及其作用机理

戴灵鹏*, 董新姣, 马海虎, 盛丽梅

温州大学生命与环境科学学院, 温州 325035

收稿日期: 2010-08-09

修回日期: 2010-09-18

录用日期: 2010-09-25

摘要: 为了研究镉诱导的满江红花色素苷的分子结构, 分别用 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd、0.1% 盐酸-甲醇溶液、XAD-7 大孔树脂和葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 柱对其进行诱导、提取、纯化和分离。经紫外可见光谱特性和 HPLC 图谱分析, 初步确定此物质为木犀草定-5-葡萄糖苷。采用不同的体外实验方法评价了满江红花色素苷纯化前后的抗氧化活性。结果表明, 花色苷的总抗氧化能力、还原力、清除 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 和 $\cdot\text{OH}$ 能力随花色苷浓度的增加而增加, 且纯化后的值大于纯化前。当花色苷的浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 纯化后的花色苷的总抗氧化能力、还原力、清除 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 和 $\cdot\text{OH}$ 能力分别为纯化前的 3.16、1.36、2.71 和 1.86 倍, 证明木犀草定-5-葡萄糖苷是满江红抗氧化作用的主要物质基础。此外, 本文还对花色苷的抗氧化机理进行了探讨。总的来说, 木犀草定-5-葡萄糖苷的合成是满江红抗性机理之一, 可缓解镉的毒害。

关键词: 满江红; 花色苷; 分子结构; 抗氧化活性; 镉

文章编号: 0253-2468(2011)05-1092-06

中图分类号: X171.5

文献标识码: A

Preliminary identification ,antioxidant activity and mechanism of anthocyanins from *Azolla imbricata* induced by cadmium

DAI Lingpeng*, DONG Xinjiao, MA Haihu, SHENG Limei

School of Life and Environmental Science, Wenzhou University, Wenzhou 325035

Received 9 August 2010;

received in revised form 18 September 2010;

accepted 25 September 2010

Abstract: In order to study the molecular structure of the anthocyanins which are induced by Cd in *Azolla imbricata*, anthocyanins were induced with $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd, extracted with 0.1% HCl in methanol, purified by an Amberlite XAD-7 column and separated by Sephadex LH-20 column. The main compound was preliminarily identified as luteolinidin-5-glucoside by its ultraviolet/visible absorbance spectrum and high performance liquid (HPLC) chromatography. In vitro antioxidant properties of anthocyanins before and after purification were also evaluated by different analytical methods. The results showed that the total antioxidant capacity, reducing power, scavenging activity of superoxide anion radical ($\text{O}_2^{\cdot -}$) and hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) increased significantly with increasing concentrations of anthocyanin extracts, and the antioxidant activity of anthocyanins after purification was higher than the values of anthocyanins before purification. When the concentration of anthocyanins reached $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, the values of anthocyanins after purification were increased by 3.16, 1.36, 2.71 and 1.86 times respectively, compared to anthocyanins before purification, indicating that luteolinidin-5-glucoside was the most important substance responsible for the antioxidant properties of *A. imbricata*. In addition, the antioxidant mechanism of anthocyanins is also discussed in this paper. In conclusion, the results obtained in this work indicated that the increase in the content of anthocyanins may be involved in internal detoxification mechanisms of *A. imbricata* against Cd toxicity.

Keywords: *A. imbricata*; anthocyanins; molecular structure; antioxidant activity; Cd

1 引言(Introduction)

花色苷(Anthocyanins)是一类广泛地存在于

植物中的水溶性天然色素,自然状态下由花色苷与各种单糖通过糖苷键结合形成,由于具有吸光性而表现出红色、紫色和蓝色等颜色是构成叶片、花瓣

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30800159)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30800159)

作者简介: 戴灵鹏(1975—),男,副教授(博士),E-mail: lpdai@wzu.edu.cn; * 通讯作者(责任作者)

Biography: DAI Lingpeng (1975—), male, associate professor(Ph. D.), E-mail: lpdai@wzu.edu.cn; * Corresponding author

和果实颜色的主要色素之一(Ogata *et al.* , 2005; Takos *et al.* , 2006; Cooper-Driver , 2001) . 环境因子如光和低温可增加花色素苷含量和相关酶基因的表达(Takos *et al.* , 2006; Hasegawa *et al.* , 2001; Meng , 2004) , 但重金属对植物花色素苷的影响及花色素苷在植物对重金属抗性机理中的作用鲜见报道.

满江红(*Azolla imbricata* (Roxb.) Nakai) 通常呈绿色,但在低温、缺磷等胁迫下,由于花色素苷含量的增加而呈红色(Wagner , 1997) . 我们首次发现, 镉胁迫能使中国满江红从绿色变红色,而这种变化是由叶绿素和类胡萝卜素含量下降以及花色素苷含量增加引起的(Dai *et al.* , 2006) . 进一步的研究表明, 镉胁迫下合成的花色素苷粗提物具有较强的抗氧化能力,且具有明显的量效关系(戴灵鹏等 , 2008) . 但镉胁迫下合成的花色素苷的分子结构仍需进一步鉴定.

本研究以满江红(*A. imbricata*) 为材料,对满江红花色素苷进行诱导、提取、纯化和分离,进而对满江红花色素苷的分子结构进行初步鉴定. 为了更好地证明镉胁迫下合成的花色素苷的生理活性,采用体外实验的方法对其纯化前后的抗氧化作用进行评价,并从花色素苷的结构-效应关系探讨花色素苷的抗氧化作用机制,以期在花色素苷的抗氧化作用提供理论依据,从而有助于我们理解镉诱导花色素苷合成的抗氧化功能,为植物对重金属的抗性机理增添新的科学依据.

2 材料与方法(Materials and methods)

2.1 实验材料和培养

满江红(*A. imbricata*) 采自温州市郊的稻田. 将植物材料用自来水冲洗数次,蒸馏水冲洗 3 次,然后放入盛有稀释 2/5 倍、经修改的 Hoagland 培养液中预培养 15 d,即用氯化盐代替培养液中硝酸盐,因为满江红叶片的共生腔内生有鱼腥藻(*Anabaena azolla*) ,它通过固氮作用将分子氮转化为可被利用的氨以供满江红使用(Mostafa , 2006) . 修改的霍格兰溶液(Hoagland's solution) ,每升溶液中含(单位: $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$): KCl ,1118. 2; KH_2PO_4 ,680. 0; $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 735. 0; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 492. 0; $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0. 22; H_3BO_3 , 2. 85; $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0. 12; $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0. 08; $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 3. 62; $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5. 4; Tartaric acid , 3. 0. 培养温度约(24 ± 4) $^{\circ}\text{C}$,光照为室

内自然光加荧光灯,光照强度约 $120\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,光暗周期为 14 h:10 h. 在试验前一天,挑选生长健壮、无虫噬、大小相近的叶状体,先用蒸馏水冲洗,然后放入盛有适量蒸馏水的容器中备用.

2.2 花色素苷的诱导、提取、纯化和分离

2.2.1 花色素苷的诱导 在盛有 4000 mL 改良 Hoagland 培养液的塑料容器(体积 $5000\ \text{cm}^3$,水面面积 $800\ \text{cm}^2$) 中,加入分析纯 CdCl_2 ,配成 $0.1\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Cd^{2+} 处理浓度,共设 3 个重复. 然后在每个塑料容器中随机放入 100 g 正常生长的满江红. 培养条件与材料培养相同. 培养过程中每隔 48 h 更换培养液 1 次,以维持溶液中 Cd 和营养成分浓度的稳定. 处理 7 d 后收获用于实验.

2.2.2 花色素苷的提取、纯化和分离 参考 Zhang 等(2004) 的方法,取 100 g 经染毒处理的样品,置于三角瓶中,用 100 mL、0.1% 盐酸-甲醇溶液浸提 2 h 后过滤,收集滤液;将滤渣按同样的条件重复浸提 2 次,过滤,合并 3 次滤液,减压浓缩. 将花色素苷粗提物以 $10\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流速通过 XAD-7 大孔树脂层析柱至吸附达饱和,再以水洗吸附树脂至流出液无混浊现象,然后以 0.1% 盐酸-甲醇溶液洗脱,收集洗脱液,在 $50\ ^{\circ}\text{C}$ 下减压浓缩. 再将初步纯化后的花色素苷色素液用葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 柱进行层析分离,以水-甲醇(含 0.1% HCl) 溶液梯度洗脱,流速控制在 $1\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,分组收集洗脱液,将洗脱液真空浓缩,冷冻干燥. 满江红体内花色素苷的含量为 $0.62\ \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW) .

2.3 花色素苷主成分的鉴定

2.3.1 紫外可见光谱法 参考 Cohen 等(2002) 的测定方法,将上述干燥的纯化产物花色素苷溶解在 0.01% HCl 的甲醇中,在紫外可见分光光度计中测定 200 ~ 700 nm 的吸收曲线. 考察可见光区的最大吸收波长($\lambda_{\text{max-vis}}$) ,计算花色素苷在 440 nm 处吸光度与可见光区的最大吸收波长($\lambda_{\text{max-vis}}$) 下的吸光度值的比($A_{440\text{nm}}/A_{\text{max-vis}}$) ,以及加入 5% AlCl_3 后再测定 200 ~ 700 nm 的吸收曲线,观察是否有吸收峰的迁移($\Delta\lambda_{\text{max}}$, nm) .

2.3.2 与标准品的高效液相色谱法(HPLC) 对照分析 参考徐金瑞(2006) 的测定方法,准确称量花色素苷样品和标准品,分别用 0.01% HCl 的甲醇溶液溶解,过 $0.45\ \mu\text{m}$ 微孔膜,进行 HPLC 分析. 分析条件: 温度 $31\ ^{\circ}\text{C}$, C_{18} 柱($4.6\ \text{mm}\times 100\ \text{mm}$) 检验波长 510 nm , 30% 甲醇溶液(含 0.1% HCl) 作为流动

相 流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 进样量 $10 \mu\text{L}$.

2.4 纯化前后花色素苷的抗氧化实验

将纯化前的花色素苷粗提物和纯化分离后的花色素苷溶解在 0.01% HCl 的甲醇中,配成 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的母液,然后稀释成系列浓度用于抗氧化实验.所有实验重复 3 次,取平均值并作统计分析.

2.4.1 总抗氧化能力(TAC)的测定 测定方法按南京建成生物工程研究所 TAC 测定试剂盒说明书进行.

2.4.2 还原力的测定 参考 Oyaizu(1986)的方法.本法测定还原力主要原理是测定反应后普鲁士蓝(亚铁氰化铁, $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$)的产生量,作为还原力的高低指标.其过程是将花色素苷与赤血盐($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$)所提供的 Fe^{3+} 反应,而将 Fe^{3+} 还原为具 Fe^{2+} 黄血盐亚铁氰离子($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$),此 Fe^{2+} 黄血盐再与氯化铁所提供的 Fe^{3+} 反应形成亚铁氰化铁,则会形成所谓的普鲁士蓝.普鲁士蓝在 700 nm 时有最大吸收波长,在此吸收波长下以分光光度计测吸光值,即可知其还原力,吸光值越高表示花色素苷还原力越强.取 1 mL 不同浓度的花色素苷提取物,加入 pH 为 6.6 的磷酸缓冲溶液 1.25 mL 及 1% 铁氰化钾 1.25 mL 于 50°C 水浴中反应 20 min ,急速冷却,加入 10% 三氯醋酸 1.25 mL ,在 3000 g 下离心 10 min ,取上清液 2.5 mL ,再加入蒸馏水 2.5 mL 及 0.1% 氯化铁 0.5 mL ,混合均匀,静置 10 min 后于 700 nm 测其吸光值.还原力直接以 $A_{700 \text{ nm}}$ 表示.

2.4.3 清除超氧根阴离子($\text{O}_2^{\cdot-}$)能力的测定 参照 Beauchamp 和 Fridovich(1971)的方法.用 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 7.8)为溶剂,配制含 0.3 mL 浓度为 $3.3 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 核黄素, 0.3 mL 浓度为 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蛋氨酸, 0.3 mL 浓度为 $4.6 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化硝基四氮唑兰(NBT), 1.55 mL 、pH 为 7.8 的磷酸缓冲液及 0.1 mL 不同浓度的花色素苷提取物;在 25°C 、 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 照度下光照 30 min ,于 560 nm 处测定吸光度. $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除率 η 按式(1)计算:

$$\eta = (A_0 - A_1 / A_0) \times 100\% \quad (1)$$

式中 A_0 指未加样品的对照组吸光值, A_1 指加样品后吸光值.

2.4.4 清除羟自由基($\cdot\text{OH}$)能力的测定 参考 Halliwell 等(1987)的方法.在洁净干燥的试管中依次加入 0.4 mL ($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 KH_2PO_4 -KOH 缓

冲液(pH 7.4), 0.1 mL 不同浓度的花色素苷提取物, 0.1 mL ($1.04 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 EDTA 溶液, 0.1 mL ($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 FeCl_3 溶液, 0.1 mL ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) H_2O_2 溶液, 0.1 mL ($60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 2-脱氧-D-核糖(DR)溶液(对照不加), 0.1 mL ($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) Vc , 保证各管最终体积为 1 mL ; 于 37°C 下保温 1 h 后取出,再加入 1 mL (25%) HCl 水溶液终止反应;然后加 1 mL (1%) 硫代巴比妥酸(TBA)的溶液于沸水浴上煮沸反应 15 min ,冷却,加入 3 mL 正丁醇萃取(因有混浊产生).不加 DR 的反应混合液不发生反应,作为比色时的空白液,于 532 nm 下比色,并计算清除率 δ .

$$\delta = [A_0 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\% \quad (3)$$

式中 A_0 指空白吸光值, A_1 指样品反应后吸光度, A_2 指样品本身吸光度,因为花色素苷呈红色,会影响 A_1 的吸光值,所以需要减去.

3 结果与讨论(Results and discussion)

3.1 满江红花色素苷基本结构的鉴定

3.1.1 紫外可见图谱分析 花色素苷最大吸收波长一个在可见光区的 $500 \sim 540 \text{ nm}$ 附近,另一个在紫外 275 nm 附近,通过测定色素的最大吸收波长即可判断是否为花色素类色素.从表 1 可以看出,满江红花色素苷在紫外区和可见区各有 1 个特征峰,特征波长分别为 279 nm 和 501 nm ;添加 AlCl_3 后, $\Delta\lambda_{\text{max}}$ 为 43 nm , $A_{440 \text{ nm}} / A_{\text{visnm}}$ 为 0.21 ,这些特征与文献中报道的满江红属花色素苷(Cohen *et al.*, 2002; Ishikura, 1982)和木犀草定-5-葡萄糖苷的特征吸收相一致,由此推断其成分可能为木犀草定-5-葡萄糖苷.

表 1 满江红花色素苷的紫外可见光谱特性

Table 1 Ultraviolet/visible absorbance spectrum of anthocyanin from *A. imbricata*

色素	最大吸收峰		$\Delta\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$	$E_{440 \text{ nm}} / E_{\text{visnm}}$
	紫外区	可见区 (加入 AlCl_3)		
满江红花色素苷	279	501	+43	0.21
满江红属花色素苷	273	503	+46	0.25
木犀草定-5-葡萄糖苷	277	499	+46	0.23

3.1.2 与标准品的 HPLC 对照分析 由图 1 可知,样品的出峰情况与木犀草定-5-葡萄糖苷标准品十分相似,保留时间均为 4.38 min ,可初步推断为相同的物质.

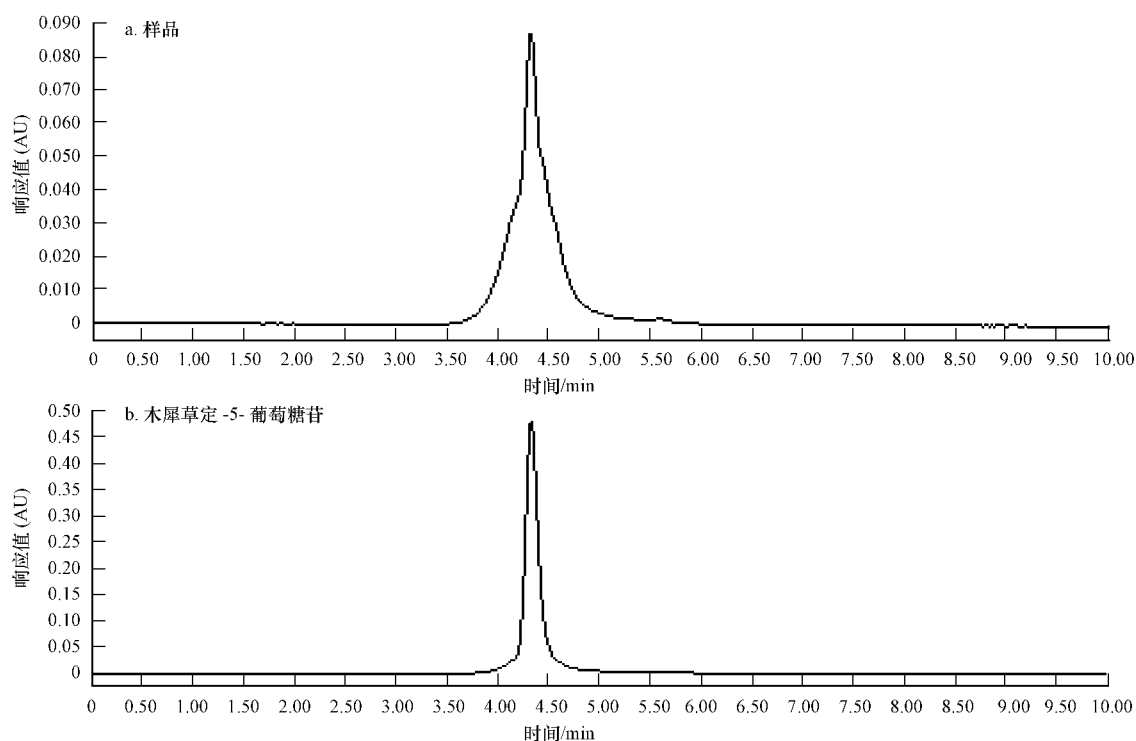


图1 样品(a)和标准品木犀草定-5-葡萄糖苷(b) HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatogram of sample (a) and standard Luteolinidin-5-glucoside (b)

通过以上分析,初步确定满江红花色素苷为木犀草定-5-葡萄糖苷(*Luteolinidin-5-glucoside*),分子式为 $C_{21}H_{21}O_{10}$,化学结构式见图2。

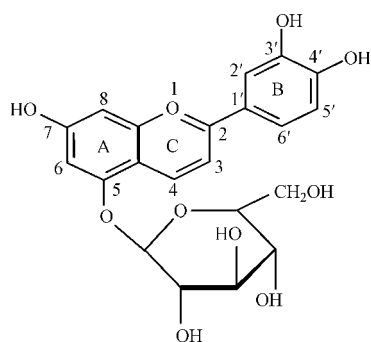


图2 木犀草定-5-葡萄糖苷的结构图

Fig. 2 Molecular formula of Luteolinidin-5-glucoside

植物花色苷的生物合成途径已较为清楚,是多种花色苷合成酶基因共同表达的结果(Holton and Cornish, 1995; Winkel-Shirley, 2001; Pang *et al.*, 2007)。花色苷属类黄酮化合物,其基本结构是2-苯基苯并吡喃,但因B环各碳位上的取代基不同而形成了不同的花色苷,且不同花色苷发生糖苷化的位点和数目的差异,及酰化程度的不同使植物中存在着不同的花色苷(Grotewold, 2006)。Shimura 和

Terada (1967) 初步报道,满江红含有矢车菊色素(cyanidin)和木犀草定(luteolinidin)两种花色苷。Ishikura (1982) 研究证实,满江红花色素苷为木犀草定-5-葡萄糖苷。本文的研究表明,镉胁迫下合成的花色苷仍为木犀草定-5-葡萄糖苷,其可能的原因是镉胁迫没有改变满江红体内花色苷的成分,仅诱导了与该花色苷相关的酶基因的表达,从而增加了其含量。

3.2 纯化前后花色苷的抗氧化比较

满江红甲醇提取物的成分复杂,既含有丰富的花色苷类物质,又含有一定量的不饱和脂肪酸、维生素、 β -胡萝卜素等,这些物质都有可能表现出一定的抗氧化和清除自由基能力。为了更好地说明花色苷具有极强的抗氧化作用,本研究比较了满江红花色素苷纯化前后的抗氧化能力。

由于受抗氧化机理、底物和反应介质等因素的影响,抗氧化物在不同实验体系中的抗氧化能力可能不同(Baderschneider *et al.*, 1999)。为了得到可靠的结果,本次试验采用了4种不同的研究抗氧化剂活性的常用评价方法。由图3可以看出,在本实验所使用的浓度范围内,随着花色苷提取物的浓度增加,其总抗氧化能力、还原力、清除 $O_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot OH$ 能力逐渐增大,且纯化后的值大于纯化前。如当花色

素苷的浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,纯化后的花色素苷的总抗氧化能力、还原力、清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot\text{OH}$ 能力分别为纯化前的 3.16、1.36、2.71 和 1.86 倍。由此可知,木犀草定-5-葡萄糖苷是满江红抗氧化作用的主要

物质基础。因此,木犀草定-5-葡萄糖苷的合成是满江红抗性机理之一,可以缓解镉诱导的氧自由基的毒害。

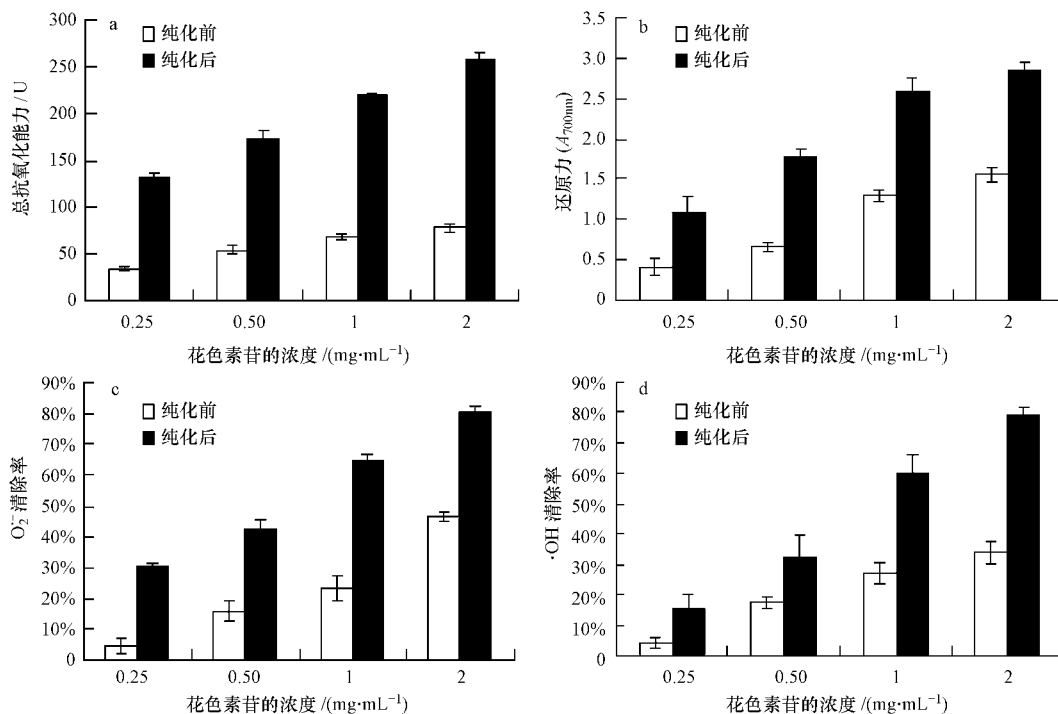


图 3 纯化前后花色素苷抗氧化能力比较

Fig. 3 Comparison of antioxidant capacity of anthocyanin before and after purification

花色素苷类物质之所以具有较强的抗氧化作用,与其独特的母核-2-苯基苯并吡喃的酚羟基结构有密切关系(Kong *et al.*, 2003). 花色素苷可直接通过脱氢反应供给脂自由基($\text{L}^{\cdot}$, $\text{LO}^{\cdot}$, $\text{LOO}^{\cdot}$)一个氢,使后者形成 LH、脂醇(LOH)和脂过氧化氢(LOOH)从而淬灭高反应活性的自由基;或者先通过电子转移,使得脂自由基转化成负离子形式,然后通过质子化反应达到淬灭自由基的目的,其中脱氢反应主要通过酚醌平衡的形式实现(徐金瑞, 2006)。

花色素苷抗氧化活性的强弱还受酚羟基的数目及取代模式、羟基成苷、羟基甲基化等因素的影响(Bae *et al.*, 2007)。羟基数目越多,可提供的用于与活性自由基结合的氢原子就越多,加上羟基中氧原子的共轭效应同时具有强烈斥电子作用,这些都有利于花色素苷形成较稳定的自由基中间体而使得抗氧化性增强(徐金瑞, 2006; Castro 和 Freeman, 2001)。此外, B 环上具有邻二酚羟基的花色素苷抗氧化活性最强,甚至可以认为这是高效花

色素苷类抗氧化剂的结构基础(Kähkönen *et al.*, 2003)。5, 7 位羟基一般有利于活性,因为它们可以络合过渡金属离子,从而有利于其抗氧化作用的发挥(Husain, 1987; Du, 2008)。

综合上述理论分析可见,木犀草定-5-葡萄糖苷既具有多酚类物质形成酚醌平衡的稳定特性,又具有邻羟基存在和羟基数目较多等特点。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,形成稳定的化合物醌,从而提高其抗氧化活性。

4 结论(Conclusions)

1) 经紫外可见光谱特性和 HPLC 图谱分析,初步确定镉胁迫下合成的满江红花色素苷为木犀草定-5-葡萄糖苷。

2) 抗氧化实验表明,镉胁迫下合成的木犀草定-5-葡萄糖苷是一种清除活性氧自由基的良好抗氧化剂。该化合物既具有多酚类物质形成酚醌平衡的稳

定特性,又具有邻位酚羟基和羟基数目较多等特点,是其具有较强抗氧化活性的主要原因。

参考文献(References):

- Baderschneider B, Luthria D, Waterhouse A L, et al. 1999. Antioxidants in white wine (cv Riesling) I. Comparison of different testing methods for antioxidant activity [J]. *Vitis*, 38: 127–131
- Bae S H, Suh H J. 2007. Antioxidant activities of five different mulberry cultivars in Korea [J]. *LWT*, 40: 955–962
- Beauchamp C, Fridovich I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels [J]. *Anal Biochem*, 44: 276–287
- Castro L, Freeman B. 2001. Reactive oxygen species in human health and disease [J]. *Nutrition*, 17: 161–165
- Cohen M F, Sakihama Y, Takagi Y C, et al. 2002. Synergistic effect of deoxyanthocyanins from symbiotic fern *Azolla* spp. on *hrmA* gene induction in the cyanobacterium *Nostoc punctiforme* [J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 15(9): 875–882
- Cooper-Driver G A. 2001. Contributions of Jeffrey Harbone and co-workers to the study of anthocyanins [J]. *Phytochemistry*, 56: 229–236
- Dai L P, Xiong Z T, Huang Y, et al. 2006. Cadmium-induced changes in pigments, total phenolics, and phenylalanine ammonia-lyase activity in fronds of *Azolla imbricata* [J]. *Environ Toxicol*, 21: 505–512
- 戴灵鹏,熊治廷,董新姣,等. 2008. 满江红花青素在镉胁迫下的抗氧化作用[J]. *环境科学学报*, 28(10): 2089–2094
- Dai L P, Xiong Z T, Dong X J, et al. 2008. Antioxidant properties of anthocyanins in *Azolla imbricata* under cadmium stress [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 28(10): 2089–2094 (in Chinese)
- Du Q, Zheng J, Xu Y. 2008. Composition of anthocyanins in mulberry and their antioxidant activity [J]. *J Food Compos Anal*, 21: 390–395
- Grotewold E. 2006. The genetics and biochemistry of floral pigments [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 57: 761–780
- Halliwell B, Gutteridge J M C, Aruoma O I. 1987. The deoxyribose method: a simple “Test-Tube” assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals [J]. *Anal Biochem*, 165: 215–219
- Hasegawa H, Fukasawa-Akada, Okuno T, et al. 2001. Anthocyanin accumulation and related gene expression in Japanese parsley (*Oenanthe stolonifera*, DC.) induced by low temperature [J]. *J Plant Physiol*, 158: 71–78
- Holton T A, Cornish E C. 1995. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis [J]. *Plant Cell*, 7: 1071–1083
- Husain S R, Cillard J, Cillard P. 1987. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids [J]. *Phyto Chem*, 26: 2489–2494
- Ishikura N. 1982. 3-Desoxyanthocyanin and other phenolics in the water fern *Azolla* [J]. *Bot Mag Tokyo*, 95: 303–308
- Kähkönen M P, Heinonen M. 2003. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons [J]. *J Agr Food Chem*, 51: 628–633
- Kong J M, Chia L S, Goh N K, et al. 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins [J]. *Phytochemistry*, 64: 923–933
- Meng X C, Xing T, Wang X J. 2004. The role of light in the regulation of anthocyanin accumulation in *Gerbera hybrida* [J]. *Plant Growth Regul*, 44: 243–250
- Mostafa E M, Hassan A M A. 2006. Effect of chilling on growth and nitrogen assimilation in *Azolla caroliniana* [J]. *Biol Plantarum*, 50(4): 641–646
- Ogata J, Kanno Y, Itoh Y, et al. 2005. Plant biochemistry: anthocyanin biosynthesis in roses [J]. *Nature*, 435: 757–758
- Oyaizu M. 1986. Studies on products of products of browning reaction: Antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine [J]. *Jpn J Nutr*, 44: 307–315
- Pang Y, Peel G J, Wright E, et al. 2007. Early steps in proanthocyanidin biosynthesis in the Model Legume *Medicago truncatula* [J]. *Plant Physiol*, 145: 601–615
- Shimura Y, Terada S. 1967. Preliminary study on the red pigment appearing in *Azolla imbricata* (Roxb.) Nakai [J]. *J Jap Bot*, 42: 266–271
- Takos A M, Jaffe F W, Jacob S R, et al. 2006. Light-induced expression of a MYB gene regulates anthocyanin biosynthesis in red apples [J]. *Plant Physiol*, 142(3): 1216–1232
- Wagner G M. 1997. *Azolla*: a review of its biology and utilization [J]. *Bot Rev*, 63: 1–26
- Winkel-Shirley B. 2001. Flavonoid biosynthesis: a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology [J]. *Plant Physiol*, 126: 485–493
- 徐金瑞. 2006. 黑大豆种皮花色苷抗动脉粥样硬化及其抗氧化机制研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学. 84–103
- Xu J R. 2006. Antiatherogenic effect and antioxidation mechanism of anthocyanins extracted from black soybean seed coat [D]. Yangling: Northwest A & F University. 84–103 (in Chinese)
- Zhang Z Q, Pang X Q, Yang C, et al. 2004. Purification and structural analysis of anthocyanins from litchi pericarp [J]. *Food Chem*, 84: 601–604