

文章编号:1001-6880(2018)6-1002-08

# 超声辅助提取野生与人工栽培黑果枸杞花色苷含量研究

宋亮,李建颖\*,王佳

天津商业大学生物技术与食品科学学院 天津市食品生物技术重点实验室

国家级食品与药品实验教学示范中心,天津 300134

**摘要:**黑果枸杞含有的花色苷类成分对人类健康有着重要意义。为探究野生与人工种植黑果枸杞花色苷含量差异,本实验利用超声辅助回流提取,通过单因素实验和 Box-Behnken 实验设计优化提取条件,得到最佳提取条件为:提取时间 25.62 min、提取温度 48.67 °C、乙醇浓度 84.35%、料液比 1:20 g·mL<sup>-1</sup>。在此条件下测得野生、人工种植黑果枸杞花色苷平均含量分别为 6.141 mg/g、16.014 mg/g。本实验结果为黑果枸杞种植及利用提供了重要依据。

**关键词:**黑果枸杞;花色苷;品质鉴定;工艺优化

中图分类号:R282.6;Q946-3

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.6.015

## Anthocyanins of Wild and Cultivated *Lycium ruthenicum* Murr. by Ultrasonic-assisted Extraction Process

SONG Liang, LI Jian-yin\*, WANG Jia

National Food and Drug Experimental Teaching Demonstration Center, Tianjin Key Laboratory of Food Biotechnology, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China

**Abstract:** The anthocyanins in *Lycium ruthenicum* Murr. had important significance to human health. The purpose of this experiment is to explore the difference between the content of anthocyanins in wild and cultivated *Lycium ruthenicum* Murr. Through single factor and Box-Behnken experimental design to determine anthocyanins ultrasonic assisted reflux extraction experiment's optimum parameters, the extraction time is 25.62 min, the extraction temperature is 48.67 °C, the ethanol concentration is 84.35%, solid-liquid ratio is 1:20 g/mL. Through this method, the average content of anthocyanins extracted from wild *Lycium ruthenicum* Murr. is 6.141 g/mL, and the average content of anthocyanins extracted from cultivated *Lycium ruthenicum* Murr. is 16.014 g/mL. The experiment provides an important basis for the selection of *Lycium ruthenicum* Murr planting conditions and people consumption.

**Key words:** *Lycium ruthenicum* Murr.; anthocyanins; quality identification; process optimization

黑果枸杞,即 *Lycium ruthenicum* Murr.,是一种茄科枸杞属多棘刺灌木<sup>[1-2]</sup>。黑果枸杞主要生长在我国西北部,分布于山西北部、甘肃、宁夏、青海和新疆等省份,是我国西北荒漠地区特有的一种纯天然药食两用珍品。花色苷(Anthocyanins)不仅赋予了植物鲜艳的色彩,且是对人类生理健康有着重要意义的一种水溶性色素,主要作用有清除体内自由基<sup>[3,4]</sup>、抑制肿瘤生长、抗癌症<sup>[5-9]</sup>、抗炎<sup>[10]</sup>、抑制脂质过氧化和血小板凝集<sup>[11-13]</sup>、滋补肝脏<sup>[14]</sup>、预防糖尿病<sup>[15]</sup>、控制体重、保护视力<sup>[16]</sup>等。闫亚美<sup>[17]</sup>等研

究了黑果枸杞花色苷组成及体外抗氧化活性,谭亮<sup>[18]</sup>等研究了黑果枸杞中花色苷的提取与结构鉴定,李凤英<sup>[19]</sup>等研究了原花青素具有抗氧化、抑制肿瘤等功能,闫亚美<sup>[20]</sup>等研究了黑果枸杞花色苷含量测定方法,赵子丹<sup>[21]</sup>等对黑果枸杞花色苷研究进展进行了分析。目前,花色苷的提取方法有水提取、有机溶剂提取、超临界流体萃取、超声波提取和酶解辅助提取等方法,根据不同的提取目的选择最适提取方法。本试验根据刘飞<sup>[22]</sup>等在超声波辅助提取黑果腺肋花楸花色苷上的相关研究,使用超声波提取法与有机溶剂提取法结合提取黑果枸杞花色苷。

对黑果枸杞中花色苷的有关研究,特别在当今野生黑果枸杞产量非常稀少,人工培植黑果枸杞成为市场主流的情形下,研究两者花色苷含量异同成

收稿日期:2017-11-27 接受日期:2018-03-13

基金项目:天津市科学技术普及项目(13KPXM01SY008);天津市大学生创业实践计划项目(201610069044)

\*通信作者 E-mail:ljying@tjcu.edu.cn

为关键任务。通过该试验,对人类利用天然植物提取天然色素取代合成色素,开发绿色资源,更好地保证人类健康有重要的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

试验原料来自于市售甘肃省武威市民勤县黑果枸杞,摘除叶柄后经干燥粉碎过筛后获得黑果枸杞粉末,放入保鲜袋中冷藏备用。95%乙醇(天津市凯通化学试剂有限公司)、盐酸(天津市风船化学试剂科技有限公司)、醋酸钠(天津市德恩化学试剂有限公司)、氯化钾(天津光复科技发展有限公司)、锦葵色素-3-葡萄糖苷标准品(上海华蓝化学科技有限公司)。

### 1.2 仪器与设备

LWF6-BI 低温粉碎机(福建莆田电宏强有限公司);AUY220 电子分析天平(日本岛津公司);RV10DIGITAL 旋转蒸发仪(德国 IKA 公司);XO-SM50 超声波微波协同反应系统(南京先欧仪器制造有限公司);UV-2600 紫外可见分光光度计(日本岛津公司);SHB-III 循环水式多用真空泵(郑州长城科技工贸有限公司);电热恒温水浴锅(上海精密科学仪器有限公司);超声波清洗器(北京市永光明医疗仪器有限公司);电热鼓风干燥箱(中仪国科科技有限公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 工艺流程

前处理:黑果枸杞摘除叶柄后,置于 35 ℃电热鼓风干燥箱中 60 min 烘干,将干燥的黑果枸杞放入低温粉碎机中粉碎,再倒入 250 μm 的标准筛中过筛,放入冰箱贮存用。

盐酸-氯化钾缓冲液(pH 1.0)缓冲液的配制:称取 2.9820 g KCl(AR 级)用蒸馏水溶解定容至 200 mL 容量瓶,即得到 0.2000 mol · L<sup>-1</sup> 的 KCl 溶液。量取 8.30 mL 的浓盐酸(12 mol · L<sup>-1</sup>),加蒸馏水定容至 500 mL 容量瓶中,即得到 0.2000 mol · L<sup>-1</sup> 的 HCl 溶液。将配制好的 HCl 溶液和 KCl 溶液以体积比 67:25 进行混合。使用 pH 计测定和调试,得到 pH 1.0 的缓冲溶液。

醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 4.5)的配制:取醋酸钠 18 g,加冰醋酸 9.8 mL,再加水稀释定容至 1000 mL 容量瓶中。使用 pH 计测定和调试,得到 pH4.5 的缓冲溶液。

#### 1.3.2 pH 示差法计算花色苷含量

选用锦葵色素-3-葡萄糖苷标准品作为本次实验的计量标准,以表示样品花色苷的含量。

将得到的提取液分别用 pH1.0 和 pH4.5 缓冲液稀释 10 倍,混合均匀后,放入恒温水浴中平衡 30 min,作为实验组。采用 1% 酸性乙醇代替提取液,同样条件下处理,平衡 30 min,作为空白组。待平衡结束后,分别在 530 nm 和 700 nm 波长下测量经稀释后样品的吸光度,并按下式进行计算:

$$\Delta A = (A_{530} - A_{700})_{\text{pH}1.0} - (A_{530} - A_{700})_{\text{pH}4.5}$$

样品的花色苷含量按下式进行计算:

$$\text{花色苷含量 (mg} \cdot \text{L}^{-1}\text{)} = \frac{\Delta A \times M_w \times DF}{\varepsilon \times 1}$$

式中:  $\Delta A$ —上述稀释后样品的吸光度;

$M_w$ —锦葵色素-3-葡萄糖苷的相对分子质量(493200 mg · mol<sup>-1</sup>);

DF—稀释因子(样品总的稀释倍数);

$\varepsilon$ —摩尔消光系数(28000 L · mol<sup>-1</sup> · cm<sup>-1</sup>);

l—光程厘米数(通常情况下为 1 cm)。

#### 1.3.3 单因素分析

本实验采用超声辅助回流提取,选择提取时间(min)、提取温度(℃)、乙醇浓度(%)和料液比(g/mL)四个因素为影响实验的主要单因素,研究花色苷含量。

##### 1.3.3.1 提取温度对黑果枸杞提取效果的影响

采用超声辅助回流提取,根据料液比 1:20 (g/mL),乙醇浓度 85%,提取时间 25 min。考虑到黑果枸杞花色苷的提取温度不宜高于 70 ℃,因此单因素实验温度的梯度分别设置为 30、40、50、60、70 ℃。

##### 1.3.3.2 提取时间对黑果枸杞提取效果的影响

采用超声辅助回流提取,根据料液比 1:20 (g/mL),乙醇浓度 85%,提取温度 50 ℃。设置试验时间梯度为 15、20、25、30、35 min。

##### 1.3.3.3 乙醇浓度对黑果枸杞提取效果的影响

采用超声辅助回流提取,根据料液比 1:20 (g/mL),提取温度 50 ℃,提取时间 25 min。设置试验乙醇浓度为 75%、80%、85%、90%、95%。

##### 1.3.3.4 料液比对黑果枸杞提取效果的影响

采用超声辅助回流提取,提取温度 50 ℃,提取时间 25 min,乙醇浓度 85%。设置料液比梯度范围为 1:1、1:10、1:20、1:30、1:40 (g/mL)。

#### 1.3.4 响应面分析

在单因素实验的基础上,根据 Box-Benhnken 的

中心组合试验设计原理,综合单因素影响实验结果,选取超声提取温度、超声提取时间、液料比以及乙醇

浓度四个因素,采用四因素三水平的响应面分析方法进行试验设计。

表 1 响应面的因素水平表

Table 1 Factors and levels of response surface methodology

因素 Factor 水平 Level	液料比 A Solid-liquid ratio (g/mL)	提取温度 B Extraction temperature (℃)	提取时间 C Extraction time (min)	乙醇浓度 D Ethanol concentration (%)
-1	10: 1	45	20	80
0	20: 1	50	25	85
1	30: 1	55	30	90

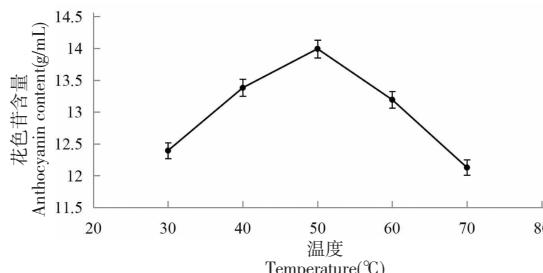


图 1 不同超声提取温度对花色苷提取效果影响

Fig. 1 Effect of different ultrasonic temperature on extraction of anthocyanin from *Lycium ruthenicum murr.*

## 2 结果与分析

### 2.1 提取温度对黑果枸杞花色苷提取效果的影响

由图 1 可见,随着温度的不断升高黑果枸杞提取物中花色苷的含量也在逐渐上升。一般来说,温度升高,分子的运动随之加快,物质溶解和扩散的速度也逐渐加快,此外,较高的温度也能使细胞膜结构发生变化,物质更容易透过细胞膜,花色苷更快地被释放进入溶剂中,从而使其在溶剂中的含量逐渐上升。但温度到达 50 ℃以后,黑果枸杞的提取效果明显下降。初步考虑,可能是温度过高产生的强氧化作用使部分花色苷结构遭到破坏,从而引起提取效

果的下降。因此应该选取 40、50、60 ℃ 三个水平进一步进行响应面优化试验,探究提取温度对黑果枸杞提取效果的影响程度。

### 2.2 不同的提取时间对黑果枸杞花色苷提取效果的影响

由图 2 可见,随着超声时间的延长,提取出的黑果枸杞花色苷的含量逐渐增加。一般情况,超声处理时间越长,越有利于黑果枸杞中原花青素的溶出。但当时间超过 25 min 后,黑果枸杞中花色苷的含量呈明显下降趋势,这可能是由于超声时间过长会导致花色苷分解或者物质结构发生变化,使原花青素不易从该结构中渗出,从而使得提取率降低。因此,应该选取 20、25、30 min 三个水平进一步进行响应面优化试验,探究超声提取时间对黑果枸杞提取效果的影响程度。

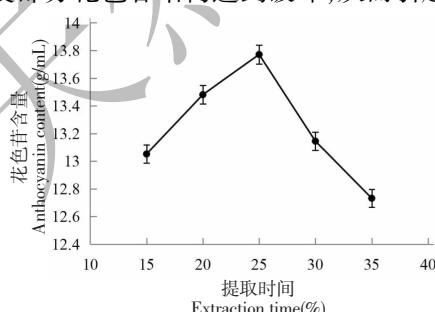


图 2 不同超声提取时间对花色苷提取效果的影响

Fig. 2 Effect of different ultrasonic time on extraction of anthocyanin from *Lycium ruthenicum murr.*

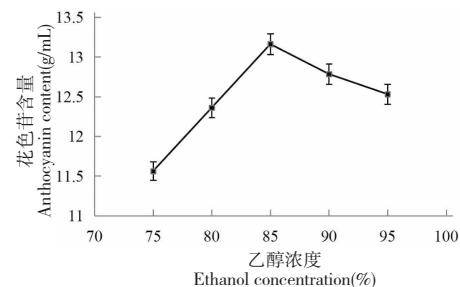


图 3 不同的乙醇浓度对花色苷提取效果的影响

Fig. 3 Effect of different ethanol concentration on extraction of anthocyanin from *Lycium ruthenicum murr.*

### 2.3 乙醇浓度对黑果枸杞中花色苷提取效果的影响

由图 3 可知,随着乙醇水溶液中乙醇含量的逐渐增高,黑果枸杞提取液中花色苷的含量也快速上升。但当乙醇浓度超 80% 时,黑果枸杞花色苷的提取率开始逐渐下降。因此,应该选取 70%、80%、

90%三个水平进一步进行响应面优化试验,探究乙醇浓度对黑果枸杞提取效果的影响程度。

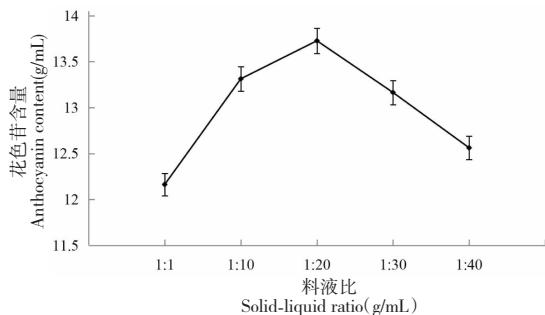


图4 不同的液料比对花色苷提取效果的影响

Fig. 4 Effect of different solid-liquid ratio on extraction of anthocyanin from *Lycium ruthenicum* murr.

## 2.4 不同的料液比对黑果枸杞中花色苷提取效果的影响

如图4可见,料液比对于黑果枸杞花色苷的提取效果影响较大。随着料液比的逐渐增加,黑果枸杞中花色苷传质动力越大,则提取出的花色苷越易溶解,损失越少。因此选取1:10、1:20、1:30三个因素水平,以此进行响应面优化试验,探究料液比对黑果枸杞中花色苷提取效果的影响程度。

## 2.5 响应面试验结果

综合单因素的实验结果,按照Box-Behnken的中心组合试验设计原理,以人工型黑果枸杞中花色苷含量Y为响应值,使用Design-Expert 8.0软件设计四因素三水平的响应面试验,实验结果见表2所示。

表2 响应面试验结果

Table 2 Results in response surface

次序 Run	Factor 1 A: 液料比 (g/mL)	Factor 2 B: 提取温度 (℃)	Factor 3 C: 提取时间 (min)	Factor 4 D: 乙醇浓度 (%)	Response 花色苷含量 (mg/g)
1	-1	0	-1	0	14.276
2	0	0	0	0	15.972
3	-1	1	0	0	14.547
4	0	-1	1	0	14.987
5	0	0	0	0	16.274
6	1	0	0	1	15.164
7	0	0	0	0	15.976
8	0	1	0	1	14.984
9	-1	0	0	-1	14.448
10	1	0	-1	0	14.561
11	0	-1	-1	0	13.373
12	1	1	0	0	14.526
13	0	0	-1	1	13.612
14	0	-1	0	1	12.974
15	0	0	1	1	14.162
16	1	0	0	-1	15.768
17	0	-1	0	-1	15.201
18	0	0	-1	-1	14.457
19	-1	0	1	0	15.316
20	0	0	1	-1	14.803
21	-1	0	0	1	14.437
22	0	0	0	0	15.972
23	-1	-1	0	0	14.512
24	1	-1	0	0	14.896
25	0	1	1	0	13.014
26	0	0	0	-1	14.012
27	0	0	0	0	15.975
28	1	1	1	0	14.427
29	0	-1	-1	0	14.875

## 2.6 方差分析

本实验采用 Design-Expert 8.0 软件, 对 29 个不

同实验点的响应值进行方差分析, 分析结果如表 3 所示。

表 3 回归模型的方差分析

Table 3 Analysis of variance in regression model

方差来源 Source of variance	平方和 Sum of square	自由度 Degree of freedom	均方 Mean Squared	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
Model	19.97	14	1.43	12.48	< 0.0001	**
A	0.27	1	0.27	2.35	0.1474	
B	1.875E-005	1	1.875E-005	1.641E-004	0.9900	
C	0.20	1	0.20	1.76	0.2054	
D	0.93	1	0.93	8.16	0.0127	*
AB	0.041	1	0.041	0.36	0.5587	
AC	0.34	1	0.34	3.02	0.1044	
AD	0.091	1	0.091	0.80	0.3875	
BC	3.02	1	3.02	26.42	0.0002	*
BD	2.56	1	2.56	22.39	0.0003	*
CD	0.010	1	0.010	0.091	0.7673	
A2	0.99	1	0.99	8.64	0.0108	*
B2	6.66	1	6.66	58.32	< 0.0001	**
C2	6.73	1	6.73	58.86	< 0.0001	**
D2	3.62	1	3.62	31.69	< 0.0001	**
残差 Rersidual	1.60	14	0.11			
失拟项 Missing item	1.49	10	0.15	5.35	0.0601	
纯误差 Pure error	0.11	4	0.028			
R <sup>2</sup>	0.9458		校正 Correction R <sup>2</sup>	0.9037		

注: \*\* 表示在 1% 水平显著; \* 表示在 5% 水平显著。

Note: \*\* indicates significant at 1% level; \* indicates significant at 5% level.

经软件回归拟合后, 得到黑果枸杞花色苷提取率对各实验因子的二次多项回归方程如下:

$$Y = 16.09 + 0.15A + 1.25E-003B + 0.13C - 0.28D - 0.10AB - 0.29AC - 0.15AD - 0.87BC + 0.80BD + 0.051CD - 0.39A^2 - 1.01B^2 - 1.02C^2 - 0.75D^2$$

各因素对响应值变化程度的影响可根据此方程得出, 方程中各项系数的绝对值的大小决定影响程度的大小, 系数为正数则为正相关, 系数为负数则为

负相关。该方程中的二次项系数全都为负值, 因此可判断出抛物面图形开口为向下, 图形具有极大值点, 具备优化条件。

由方差分析表 3 可知, 整个回归模型极显著 ( $P < 0.0001$ ), 说明模型是有意义的;  $R^2 = 0.9258$ , 校正  $R^2 = 0.9137$  说明该模型拟合程度良好, 能反应响应值的变化; 由表 3 可知失拟项不显著 ( $P > 0.05$ ), 说明该模型能够较好的与实际情况相拟合, 使用该方

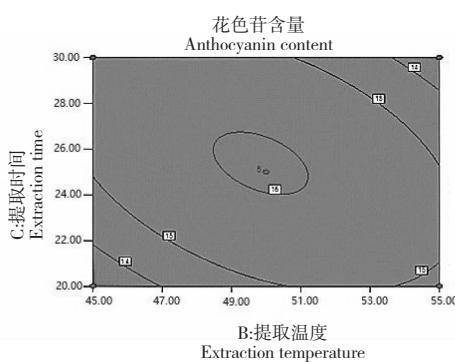
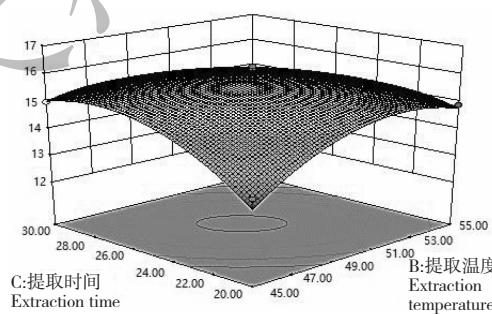


图 5 提取温度与提取时间对花色苷含量的交互作用

Fig. 5 Effect of interaction between temperature and time on the anthocyanin content

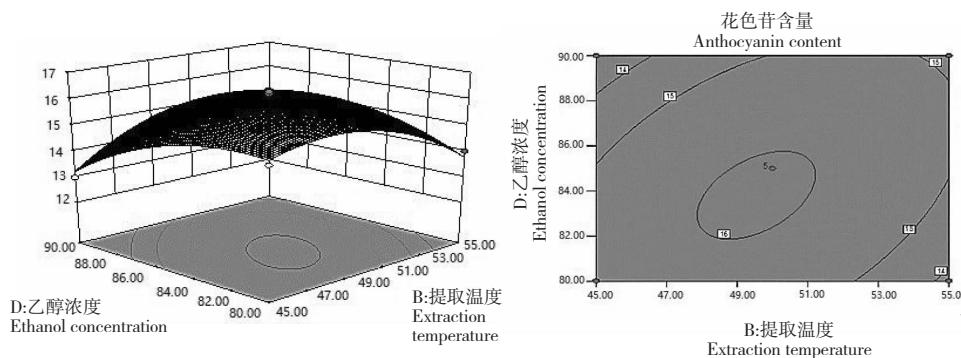


图 6 提取温度与乙醇浓度对花色苷含量的交互作用

Fig. 6 Effect of interaction between temperature and ethanol concentration on the anthocyanin content

程中的数据点替代真实的实验数据点进行分析是切实可行的。一次项 D 显著, A、B、C 不显著, BC、BD 交互项影响显著, 其他交互项影响不显著, 二次项 A<sup>2</sup> 显著, B<sup>2</sup>、C<sup>2</sup>、D<sup>2</sup> 影响极显著。

## 2.7 交互作用分析

为进一步研究因素间的交互作用, 通过 Design-Expert 绘制响应曲面图进行直观分析, 结果见下图。

由图 5 可知, 在一定范围内, 提取出的花色苷含量随提取温度及提取时间的增大都呈现出先增加后降低的趋势, 这一点与单因素实验时整体趋势相符; 通过方差分析可知, 提取温度与提取时间交互项对提取的花色苷含量影响显著 ( $P < 0.05$ ), 具体表现为其等高线呈现出椭圆形。由图 5 可知, 在一定范围内, 随着提取温度的增大, 提取的花色苷含量平缓增加, 到达一定值后, 随着提取温度的增大而逐渐降低; 随着提取时间的增加, 提取的花色苷含量先增加后降低, 整体趋势与单因素实验基本相符; 由方差分

析结果可知, 提取温度与提取时间交互项对提取的花色苷含量影响显著 ( $P < 0.05$ ), 具体表现为等高线呈现出椭圆形。

应用 Design-Expert V8.0 对优化后的回归方程求解, 在试验范围内提取花色苷的最佳工艺条件为: 液料比 20:1 g/mL, 提取温度 48.67 °C, 提取时间 25.62 min, 乙醇浓度 84.35%, 此条件下提取的人工型黑果枸杞中花色苷含量理论上可达 16.0572 mg/g。考虑到实际实验条件的精度, 将其校正为液料比 20:1 g/mL, 提取温度 49 °C, 提取时间 25.6 min, 乙醇浓度 84%。

## 2.8 验证试验

通过软件优化得出了最优提取条件: 液料比为 20:1 g/mL, 温度为 49 °C, 为时间 25.6 min, 乙醇浓度为 84%。在此条件下进行三组平行试验, 试验结果如表 4、表 5。在优化后的工艺条件下, 人工种植的黑果枸杞中提取出的花色苷平均含量约 16.014

表 4 人工型黑果枸杞花色苷含量表

Table 4 Anthocyanin content of planted *Lycium ruthenicum* murr.

实验次数 Times	料液比 Solid-liquid ratio (g/mL)	提取温度 Extraction temperature (°C)	提取时间 Extraction time (min)	乙醇浓度 Ethanol concentration (%)	$Y_1$ (mg/g)
1	20:1	49	25.6	84	15.981
2	20:1	49	25.6	84	16.074
3	20:1	49	25.6	84	15.987

表 5 野生型黑果枸杞花色苷含量表

Table 5 Anthocyanin content of wild *Lycium ruthenicum* murr.

实验次数 Times	料液比 Solid-liquid ratio (g/mL)	提取温度 Extraction temperature (°C)	提取时间 Extraction time (min)	乙醇浓度 Ethanol concentration (%)	$Y_2$ (mg/g)
1	20:1	49	25.6	84	6.093
2	20:1	49	25.6	84	6.178
3	20:1	49	25.6	84	6.152

mg/g,而野生型的黑果枸杞中提取出的花色苷平均含量则约为 6.141 mg/g。

### 3 结论与讨论

本实验主要通过超声辅助回流提取的方法对人工与野生的黑果枸杞中的花色苷类物质进行提取,利用响应面分析法对黑果枸杞花色苷的提取工艺进行优化。在优化后的工艺条件下,人工种植的黑果枸杞中提取出的花色苷平均含量约为 16.014 mg/g,而野生型的黑果枸杞中提取出的花色苷平均含量则约为 6.141 mg/g。

相同的物种在相同的生命周期中,其维持生长并结果所需的营养元素应近似,但本试验根据不同生长环境提供的黑果枸杞果实的某一种特定色素含量差异,发现摄取沉积的营养成分有很大差别。这可能由植株间的形态差异导致,此差异性与植株产地的降水条件、土壤条件、光照时间、气温、湿度、人类对植株生长的干预具有高度相关性。

可以得出不同生长环境对植物机体营养物质沉积会有一定影响。综上所述,在相同的提取条件下,黑果枸杞人工种植品种中花色苷含量远比野生型黑果枸杞花色苷含量高。该试验为黑果枸杞品种区分、花色苷质量评价、种植条件选择、消费者市场甄别提供了坚实理论与应用基础。

### 参考文献

- Jiao XL(矫晓丽), Chi XF(迟晓峰), Dong Q(董琦), et al. Analysis of the nutritional components of *Lycium ruthenicum* [J]. *Amino Acids & Bio Res* (氨基酸和生物资源), 2011, 33(03):60-62.
- Tsuda T, Watanabe M, Ohshima K, et al. Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O-β-D-glucoside and cyanidin [J]. *J Agr Food Chem*, 1994, 42:2407-2410.
- Li LR(李莉蓉), Zhang MW(张名位), Liu LW(刘邻渭), et al. Comparing antioxidant stability of anthocyanin extracts in seed coats of three black cereal and oil crops [J]. *Sci Agric Sin*(中国农业科学), 2007, 40:2045-2052.
- Koide T, Hashimoto Y, Kamei H, et al. Antitumor effect of anthocyanin fractions extracted from red soybeans and red beans *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cancer Biother Radio*, 1997, 12:277-280.
- Kamei H, Hashimoto Y, Koide T, et al. Anti-tumor effect of methanol extracts from red and white wines [J]. *Cancer Biother Radio*, 1998, 13:447-452.
- Hagiwara A, Miyashita K, Nakanishi T, et al. Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidaz[4,5-b]pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine [J]. *Cancer Lett*, 2001, 171: 17-25.
- Harris GK, Gupta A, Nines RG, et al. Effects of lyophilized black raspberries on azoxymethane-induced colon cancer and 8-hydroxy-2-deoxyguanosine levels in the Fischer 344 rat [J]. *Nutr Cancer*, 2001, 40:125-133.
- Malik M, Zhao C, Schoene N, et al. Anthocyanin-rich extract from Aronia melanocarpa E induces a cell cycle block in colon cancer but not normal colonic cells [J]. *Nutr Cancer*, 2003, 46:186-196.
- Singletary K W, Stansbury M J, Giusti M van Breemen R B, et al. Inhibition of rat mammary tumorigenesis by concord grape juice constituents [J]. *J Agr Food Chem*, 2003, 51: 7280-7286.
- Wang J, Sporns P. Analysis of anthocyanins in red wine and fruit juice using MALDI-MS [J]. *J Agr Food Chem*, 1999, 47: 2009-2015.
- Kay CD, Holub BJ. The effect of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) consumption on postprandial serum antioxidant status in human subjects [J]. *Brit J Nutr*, 2002, 88:389-398.
- Tsuda T, Horio F, Kitoh J, et al. Protective effects of dietary cyanidin 3-O-b-D-glucoside on liver ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1999, 368:361-366.
- Kong JM, Chia LS, Goh NK, et al, Brouillard R. Analysis and biological activities of anthocyanins [J]. *Phytochemistry*, 2003, 64:923-933.
- Tsuda T, Horio F, Uchida K, et al. Dietary cyanidin 3-O-dglucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice [J]. *J Nutr*, 2003, 133: 2125-2130.
- Nakaishi H, Matsumoto H, Tominaga S, et al. Effects of black currant anthocyanoside intake on dark adaptation and VDT work-induced transient refractive alternation in healthy humans [J]. *Altern Med Rev*, 2000, 5:553-562.
- Kramer JH, Canter PH. Anthocyanosides of *Vaccinium myrtillus* (bilberry) for night vision-a systematic review of placebo-controlled trials [J]. *Surv Ophthalmol*, 2004, 49 (1): 38-50.
- Yan YM(闫亚美), Dai YM(代彦满), Ran LW(冉林武), et al. Composition and *in vitro* antioxidant activity of anthocyanins extracted from *Lycium ruthenicum* Murr., different fruits and vegetables [J]. *Sci and Tech of Food Ind*(食品工业科技), 2014, 35:133-136.