

桦木汁对斑马鱼胚胎的体外抗氧化作用 及体内酶学检测

邢琦¹ 陈海燕^{2,3,4} 华李羽² 王超² 李轲² 刘纪盈²

(1. 德州华商冷藏物流有限公司, 山东 德州 253000; 2. 长春科技学院生命科学院, 吉林 长春 130600;

3. 长春中医药大学药学院, 吉林 长春 130000; 4. 吉林农业大学食品科学与工程学院, 吉林 长春 130118)

摘要: [目的] 研究长白山天然桦木汁的抗氧化活性。[方法] 通过 DPPH 自由基清除率、ABTS 阳离子自由基清除率、羟自由基清除率、铁离子还原能力 (FRAP) 4 种化学法测定其抗氧化活性水平, 并利用模式生物—斑马鱼胚胎检测其动态酶学指标。[结果] 桦木汁的抗氧化效果随汁液浓度的增加呈正相关, 氧化活性因子显著。当桦木汁用量为 1.0 mL/mL 时, 其抗氧化效果最佳, 且对 DPPH 自由基清除率、ABTS 阳离子自由基清除率、羟自由基清除率、铁离子还原能力分别为 34.56%, 18.27%, 48.77%, 90.07 $\mu\text{mol/L}$, 斑马鱼胚胎 SOD、CAT、GSH-Px 活性以及 MDA 含量相较于空白对照组均有显著提升。[结论] 天然桦木汁具有良好的抗氧化作用。

关键词: 桦木汁; 斑马鱼胚胎; 抗氧化性; 自由基清除率; 活性测定

Antioxidant effects and enzymatic analysis of birch sap on zebrafish embryos

XING Qi¹ CHEN Haiyan^{2,3,4} HUA Liyu² WANG Chao² LI Ke² LIU Jiying²

(1. Dezhou Huashang Refrigerated Logistics Co., Ltd., Dezhou, Shandong 253000, China; 2. School of Life Sciences, Changchun University of Science and Technology, Changchun, Jilin 130600, China; 3. School of Pharmacy, Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun, Jilin 130000, China; 4. School of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118, China)

Abstract: [Objective] This study aimed to evaluate the antioxidant activity of natural birch juice from Changbai Mountain. [Methods] Antioxidant activity was measured through four chemical assays: DPPH radical scavenging rate, ABTS cation scavenging rate, hydroxyl radical scavenging rate, ferric ion reducing ability (FRAP). Additionally, antioxidant enzyme activities and oxidative stress markers were assessed using zebrafish embryo as a model organism. [Results] The antioxidant activity of birch juice increased with concentration, showing a significant positive correlation. At 1.0 mL/mL concentration, birch juice exhibited optimal effects, achieving 34.56% DPPH scavenging, 18.27% ABTS scavenging, 48.77% hydroxyl radical scavenging, and 90.07 $\mu\text{mol/L}$ ferrous ion reduction. In zebrafish embryos, the activities of SOD, CAT, and GSH-Px were significantly elevated, along with increased MDA content, compared to the control group. [Conclusion] Natural birch juice demonstrates substantial antioxidant properties, highlighting its potential for development into natural antioxidant foods, as well as anti-aging and skin-whitening products.

Keywords: birch juice; zebrafish embryos; antioxidant properties; free radical scavenging rate; activity determination

桦木汁 (birch juice) 是从白桦树上采集的天然汁液, 维生素 C、维生素 B 群以及钙、铁、锰和锌等多种矿物质^[1-2], 因具有独特的口感和食药价值而备受关注。桦木汁中富含白桦脂酸、白桦脂醇、多酚类化合物、黄酮类化合物、维 生素 C、维生素 B 群以及钙、铁、锰和锌等多种矿物质^[1-2], 这些成分对人体的健康和正常功能发挥着重要作用。Wu 等研究^[3]表明, 白桦脂酸通过调控小鼠 JAK2/STAT3 信号

基金项目: 吉林省教育厅科学技术研究项目 (编号: JJKH20241707CY)

通信作者: 陈海燕 (1960—), 女, 长春科技学院教授, 博士。E-mail: 100361@cstu.edu.cn

收稿日期: 2024-05-12 改回日期: 2024-08-27

通路可减轻 t-2 毒素诱导的小鼠睾丸氧化损伤;Chen 等^[4]以秀丽隐杆线虫为模型证明了白桦脂酸能够通过胰岛素 IGF-1 信号通路影响线虫的寿命和氧化应激能力。自由基是一类不稳定的分子,容易引起细胞损伤,并可能导致各种疾病发生,而桦木汁中含有的多酚类化合物是一种强大的抗氧化剂,可以中和自由基,减少氧化应激对身体的损害^[5]。Häsler Gunnarsdottir 等^[6]研究发现,桦木汁中的黄酮类化合物具有抗炎、抗菌和抗氧化等作用,有助于舒缓炎症反应、增强免疫系统功能并中和自由基,从而减缓衰老过程。目前,桦木汁已被广泛应用于食品酿造领域和传统中草药组方中,其在营养学和医美领域具有重要的应用潜力^[7-8]。

斑马鱼(zebrafish)为一种原产于热带和亚热带地区的小型淡水鱼,具有单次产卵量高、胚胎透明、孵化周期短等特点,是目前研究褪黑、抗氧化、神经毒素等方面的重要模式生物^[9-10]。Ulhaq 等^[11]研究了全氟己烷磺酸(FPHxS)诱导的氧化应激以及对斑马鱼胚胎的发育毒性, Ren 等^[12]发现白藜芦醇作为抗氧化剂而不是 AHR 拮抗剂,可防止斑马鱼胚胎中 PM2.5 诱导的心脏缺陷。通过对斑马鱼及其胚胎进行研究,可以深入了解机体发育过程、疾病产生机制和基因功能缺陷治疗等重要科学问题,为人类健康领域做出持续的贡献^[13]。

Bilek 等^[14]采用 Folin-Ciocalteu 法测定了桦木汁中的总酚类物质含量(TPC)以表示桦木汁的抗氧化能力。Norocel 等^[15]通过 TPC 和 DPPH 自由基清除试验得出经巴氏灭菌(60℃, 20 min)后的桦木汁具有更稳定的抗氧化活性。研究拟进一步通过 DPPH 自由基清除能力、ABTS 阳离子自由基清除能力、羟自由基清除能力、铁离子还原能力综合评估桦木汁的抗氧化性,并以斑马鱼胚胎为模型,测定经桦木汁处理后斑马鱼胚胎的 SOD、MDA、CAT 和 GSH-Px 4 项酶学指标,评估桦木汁对斑马鱼胚胎的抗氧化能力,为桦木汁的抗氧化能力探究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

斑马鱼:体长 3 cm 左右,南京一树梨花生物科技有限公司;

天然桦木汁:延边易达白桦产业有限公司;

DPPH 溶液:上海浦予工业科技有限公司;

ABTS 溶液:湖北瑞伯信化工有限公司;

PBS 磷酸盐缓冲液、2,4,6-三吡啶基三嗪(TPTZ)溶液:上海跃腾生物技术有限公司;

醋酸盐缓冲液:厦门海标科技有限公司;

过氧化氢酶(CAT)检测试剂盒、丙二醛(MDA)检测试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)检测试剂盒、超氧

化物歧化酶(SOD)检测试剂盒:南京建成生物技术有限公司;

全波长酶标仪:Multiskan Sky 型,美国 Thermo 公司;

紫外分光光度计:UV-3600i Plus 型,岛津仪器(苏州)有限公司;

6 孔板聚苯乙烯(GPPS):苏州华启诚生物科技有限公司;

超净台:DS-CD-1 型,苏州净化设备有限公司;

电子分析天平:FA22014N 型,上海菁华科技仪器有限公司;

数显恒温磁力搅拌器:DHG-9023A 型,上海精宏设备有限公司;

微量高速冷冻离心机:H1850R 型,上海向帆仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 斑马鱼驯养及胚胎收集

(1) 斑马鱼驯养:实验室条件下适应性驯养 7 d 及以上,水温为(26±1)℃,水域 pH 为 7.5±0.1;养殖区光照 14 h/d,每 2 d 更换 50% 提前处理干净的自来水,并用虹吸管清除水缸内多余的饵料和粪便^[16]。

(2) 胚胎收集:驯养第 8 天,取 15 雌 10 雄的斑马鱼置于同一水缸,控制温度(26±1)℃,水域 pH 为 7.5±0.1,于黑暗环境下,24 h 后取卵^[17]。

(3) 桦木汁对斑马鱼胚胎的急性毒理试验:分别设置 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL/mL 的桦木汁处理组,以清水作为空白对照组,统一培养于恒温培养箱,温度保持(26±1)℃。每隔 24 h 记录一次斑马鱼胚胎的死亡量、孵化量,计算各组死亡率及孵化率,并清除死亡胚胎、孵化的幼鱼及更换各组的新鲜溶液,试验时间截至所有处理组的胚胎均完全死亡或孵化^[17-18]。

1.2.2 抗氧化试验

(1) DPPH 自由基清除试验:参照文献[19]并修改。取桦木汁处理组与 DPPH 溶液、无水乙醇反应测吸光度,按式(1)计算 DPPH 自由基清除率。

$$Y = \left(1 - \frac{A_2 - A_1}{A_0}\right) \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

Y——自由基清除率,%;

A₀——空白对照组吸光度;

A₁——样品对照组吸光度;

A₂——样品组吸光度。

(2) ABTS 阳离子自由基清除试验:参照文献[20]并修改。将 7.4 mol/L ABTS 和 3.8 mmol/L 过硫酸钾等体积混合,置于暗处 12 h。PBS 缓冲液稀释 25~40 倍,直至混

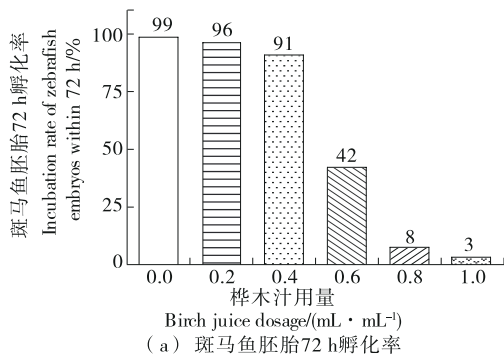
合液在 734 nm 下的吸光度为 0.70 ± 0.02 , 制成 ABTS 阳离子工作液。取桦木汁处理组和 ABTS 阳离子工作液反应测吸光度, 按式(1)计算 ABTS 阳离子自由基清除率。

(3) 羟自由基清除试验: 参照文献[21]并修改。取桦木汁处理组与硫酸亚铁溶液、水杨酸溶液、双氧水反应测吸光度, 并按式(1)计算羟自由基清除率。

(4) 铁离子还原能力(FRAP): 将 300 mmol/L 醋酸盐缓冲液(pH 3.5)、10 mmol/L TPTZ 溶液、20 mmol/L 氯化铁溶液按体积比 10:1:1 混匀, 制成 FRAP 工作液。取 180 μm FRAP 工作液分别与 20 μm 桦木汁处理组溶液、20 μm 硫酸亚铁溶液、20 μm 去离子水混合, 作为样品组、阳性对照组、空白对照组, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 min, 使用酶标仪测定 595 nm 处吸光度值^[22]。

1.2.3 斑马鱼胚胎酶学水平试验

(1) 酶液的制备: 分别取 0.2 g 经桦木汁处理组溶液处理 72 h 的胚胎于离心管中, 称重, 按 $m_{\text{斑马鱼}}:V_{\text{缓冲液}}$ 为 1:12.5 (g/mL) 加入 PBS 缓冲液, 于冰盒内研磨, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 000 r/min 离心 10 min, 取上清液即为酶液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存



备用^[23]。

(2) SOD、CAT、GSH-Px 活性及 MDA 含量测定: 采用 BCA 法测定蛋白质浓度, 根据不同试剂盒分别测定 SOD、CAT、GSH-Px 活性及 MDA 含量。

1.2.4 数据分析 采用 Prism 8.0 软件绘图及统计学分析, 与对照组相比, *为 $P < 0.05$, **为 $P < 0.01$, ***为 $P < 0.001$, 所有试验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 桦木汁对斑马鱼胚胎的急毒性试验

由图 1 可知, 当桦木汁用量 $< 0.4 \text{ mL/mL}$ 时, 斑马鱼胚胎的 72 h 内孵化率差异不显著, 但随着桦木汁用量的递增, 胚胎孵化率显著下降, 当桦木汁用量 $\geq 0.8 \text{ mL/mL}$ 时, 斑马鱼胚胎孵化率接近零。这可能是高浓度的桦木汁 pH 值过低, 与斑马鱼胚胎孵化条件不适宜^[24-25], 即 72 h 内孵化成功的胚胎, 仍会由于 pH 值过低而凋亡, 其具体机制仍需进一步试验(酸性缓冲液暴露试验^[26]、单因素试验等)验证。

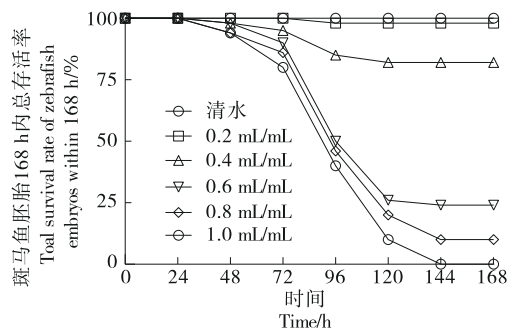


图 1 斑马鱼的胚胎孵化率、总存活率随时间变化关系

Figure 1 The relationship between the hatching rate and overall survival rate of zebrafish embryos over time

2.2 桦木汁的抗氧化活性

DPPH 自由基是一种稳定的自由基, 其分子结构中有一个不成对的电子, 使其能够与一个电子或氢离子反应, 从而稳定下来^[27]。由图 2(a)可知, 0.8~1.0 mL/mL 的桦木汁可以提供 3.59%~34.56% 的 DPPH 自由基清除率, 且随着桦木汁用量的上升而增加, 但桦木汁对 DPPH 自由基的清除效果与对照组仍有一定的差距。

由图 2(b)可知, 桦木汁处理组与对照组在 ABTS 阳离子自由基清除效果上均随样品浓度的增高而增高。与对照组相比, 桦木汁对 ABTS 阳离子自由基的清除效果有限, 当桦木汁用量为 1.0 mL/mL 时, 其 ABTS 阳离子自由基清除率也仅为 18.27%。

羟自由基是一种高活性氧, 具有极强的氧化能力, 会对蛋白质、脂质、DNA 等生物大分子造成损害^[28]。由

图 2(c)可知, 桦木汁对羟自由基的清除率随样品浓度的增加而上升, 当桦木汁用量为 1.0 mL/mL 时, 羟自由基清除率为 48.77%; 当桦木汁用量为 0.8 mL/mL 时, 羟自由基清除率高于 0.2 mg/mL 的维生素 C。

利用酸性条件下亚铁离子与 TPTZ 生成的蓝紫色复合物测定抗氧化剂活性, 可以抑制一些内源性干扰^[29]。由图 2(d)可知, 不同浓度桦木汁对铁离子的还原能力随样品浓度的增加而增加, 当桦木汁用量为 1.0 mL/mL 时, 铁离子还原能力达到最高 (90.07 $\mu\text{mol/L}$)。

氧化应激是导致机体产生诸多应激型疾病的重要因素, 如动脉粥样硬化、慢性阻塞性肺病、阿尔茨海默病、肿瘤等疾病^[30], 天然产物来源的抗氧化作用不仅可中和生物细胞中的自由基, 且可有效降低细胞内部的氧化应激损伤。综上, 当桦木汁用量为 1.0 mL/mL 时, DPPH 自由

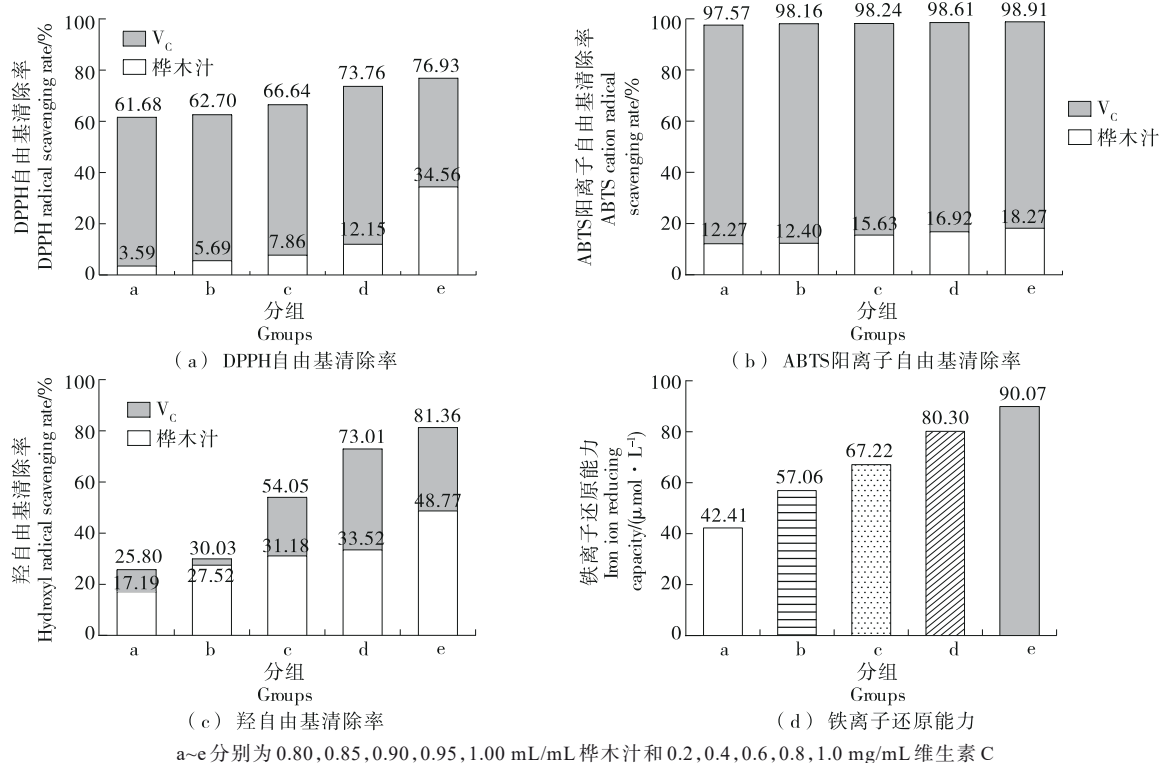


图2 桦木汁试验组的抗氧化指标

Figure 2 Four in chemical antioxidant indices of birch juice at different concentrations

基清除率、ABCTS阳离子自由基清除率、羟自由基清除率和铁离子还原能力分别为34.56%、18.27%、48.77%、90.07 μmol/L,此时抗氧化效果最佳。

2.3 桦木汁对斑马鱼胚胎SOD、CAT、GSH-Px活性及MDA含量的影响

SOD主要通过促进分解机体细胞中过氧化氢和脂质过氧化物来减轻氧化应激造成的细胞损伤。由图3(a)可知,斑马鱼胚胎SOD活力与桦木汁用量呈正相关,当桦木汁用量为1.0 mL/mL时,SOD活性为空白对照组的1.51倍。

CAT可以催化过氧化氢分解为水和氧气,减少由过氧化氢造成的细胞氧化损伤。由图3(b)可知,当桦木汁用量为0.8 mL/mL时,斑马鱼胚胎的CAT活性为空白对照组的1.63倍。随着桦木汁用量的进一步增加,CAT活性呈梯度上升趋势。当桦木汁用量为1.0 mL/mL时,CAT活性为空白对照组的1.90倍。

GSH-Px可以将有害的过氧化氢和有机过氧化物转化为无害的水和醇,从而防止细胞受到氧化损伤。由图3(c)可知,桦木汁处理斑马鱼胚胎后,其体内的GSH-Px活性显著上升,当桦木汁用量为1.0 mL/mL时,GSH-Px活性达到最高点,为空白对照组的1.49倍。

MDA是脂质氧化的最终产物,会引起蛋白质、核酸

等生命大分子的交联聚合,产生细胞毒性。由图3(d)可知,随着桦木汁用量的增加,斑马鱼胚胎体内的MDA含量不断下降,当桦木汁用量为1.0 mL/mL时,MDA含量仅为空白对照组的0.51倍。

抗氧化应激的方式可以分为外源性和内源性,Borodušis等^[31]研究表明,高浓度的桦木汁可作为皮肤护理产品中的再生成分,与低浓度的细胞修复生物复合物(CRB)组合后可显著提高细胞的抗氧化能力,刺激细胞增殖,在逆转表皮老化中具有巨大的潜力。说明桦木汁能够与天然植物提取物复合使用,提高机体的抗氧化能力。内源性抗氧化应激方式又可以分为酶促抗氧化剂和非酶促抗氧化剂,SOD、CAT、GSH-Px均属于内源性酶促抗氧化剂^[32],MDA含量则是衡量机体抗氧化潜力的关键指标,可以揭示机体脂质过氧化的速度和程度,同时也能间接反映组织过氧化造成的损害程度。采用不同浓度的桦木汁处理斑马鱼胚胎后,斑马鱼胚胎的SOD、CAT、GSH-Px活性均有显著提高,且效果随着桦木汁用量的增加而增加,MDA含量则随桦木汁用量的增加而降低。当桦木汁用量为1.0 mL/mL时效果达到最好,此时斑马鱼胚胎的SOD、CAT、GSH-Px活性分别为空白对照组的1.51,1.90,1.49倍,MDA含量仅为空白对照组的0.51倍,说明天然桦木汁能提高斑马鱼胚胎内源性酶促抗氧化剂活

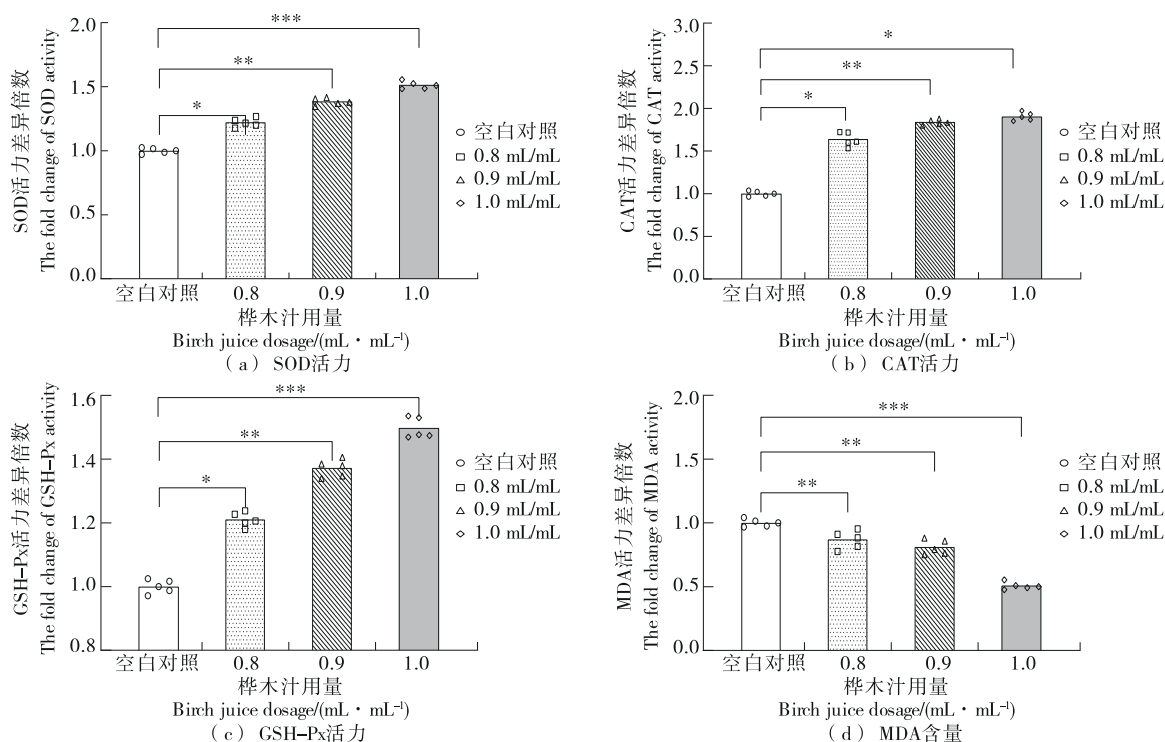


图3 斑马鱼胚胎体内的SOD、CAT、GSH-Px活性及MDA含量

Figure 3 The Activity of SOD, CAT and GSH-P, as well as the content of MDA in zebrafish embryos

性,并有效延缓和减弱斑马鱼胚胎内的脂质过氧化,具有较好的抗氧化潜力。

3 结论

天然桦木汁具有较好的抗氧化能力,并能通过提高斑马鱼胚胎内的内源性酶促抗氧化剂活性,延缓斑马鱼胚胎内的脂质氧化速率,其效果与桦木汁浓度呈正相关。后续可进一步研究桦木汁与斑马鱼胚胎内氧化相关基因 *Nrf2b*、*sod1* 和 *sod2* 之间的关系。

参考文献

- [1] GE Z W, WANG D, ZHAO W T, et al. Structural and functional characterization of exopolysaccharide from *Leuconostoc citreum* BH10 discovered in birch sap[J]. Carbohydrate Research, 2024, 535: 108994.
- [2] SANCHO A I, BIRK T, GREGERSEN J M, et al. Microbial safety and protein composition of birch sap[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2022, 107: 104347.
- [3] WU J, YANG C L, LIU J, et al. Betulinic acid attenuates T-2-toxin-induced testis oxidative damage through regulation of the JAK2/STAT3 signaling pathway in mice[J]. Biomolecules, 2019, 9(12): 787.
- [4] CHEN H Y, LI R J, ZHAO F, et al. Betulinic acid increases lifespan and stress resistance via insulin/IGF-1 signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*[J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 960239.
- [5] OSTAPIUK A, KURACH Ł, STRZEMSKI M, et al. Evaluation of antioxidative mechanisms in vitro and triterpenes composition of extracts from silver birch (*Betula pendula* Roth) and black birch (*Betula obscura* Kotula) barks by FT-IR and HPLC-PDA[J]. Molecules, 2021, 26(15): 4 633.
- [6] HÄSLER GUNNARSDOTTIR S, SOMMERAUER L, SCHNABEL T, et al. Antioxidative and antimicrobial evaluation of bark extracts from common european trees in light of dermal applications[J]. Antibiotics, 2023, 12(1): 130.
- [7] KŪKA M, ČAKSTE I, GERŠEBEKA E. Determination of bioactive compounds and mineral substances in Latvian birch and maple saps[J]. Proceedings of the Latvian Academy of Sciences Section B Natural Exact and Applied Sciences, 2013, 67(4/5): 437-441.
- [8] SMILJANIC S, MESSARAA C, LAFON-KOLB V, et al. *Betula alba* bark extract and *Empetrum nigrum* fruit juice, a natural alternative to niacinamide for skin barrier benefits[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(20): 12507.
- [9] ARTEAGA C, BOIX N, TEIXIDO E, et al. The zebrafish embryo as a model to test protective effects of food antioxidant compounds[J]. Molecules, 2021, 26(19): 5 786.
- [10] MAHMOOD I, AZFARALARIFF A, MOHAMAD A, et al. Mutated Shiitake extracts inhibit melanin-producing neural crest-derived cells in zebrafish embryo[J]. Comp Biochem

- Physiol C: Toxicol Pharmacol, 2021, 245: 109033.
- [11] ULHAQ Z S, TSE W K F. Perfluorohexanesulfonic acid (PFHxS) induces oxidative stress and causes developmental toxicities in zebrafish embryos[J]. J Hazard Mater, 2023, 457: 131722.
- [12] REN F, HUANG Y J, TAO Y Z, et al. Resveratrol protects against PM_{2.5}-induced heart defects in zebrafish embryos as an antioxidant rather than as an AHR antagonist[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2020, 398: 115029.
- [13] DANG K D, HO C N Q, VAN H D, et al. Hexavalent chromium inhibited zebrafish embryo development by altering apoptosis- and antioxidant-related genes[J]. Curr Issues Mol Biol, 2023, 45(8): 6 916-6 926.
- [14] BILEK M, SIEMBIDA A, GOSTKOWSKI M, et al. Antioxidative capacity of birch saps[J]. Biotechnology and Food Science, 2017, 81(1): 3-10.
- [15] NOROCEL L, PĂDUREȚ S. Evaluation of birch sap (*Betula pendula*) quality during storage[J]. Scientific Study & Research Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry, 2020, 21(2): 217-226.
- [16] KWAN W S, ROY V A L, YU K N. Review on toxic effects of di(2-ethylhexyl) phthalate on zebrafish embryos[J]. Toxics, 2021, 9(8): 193.
- [17] WANG Y P, ZHOU M, WANG J, et al. Developmental cardiotoxicity and hepatotoxicity of flurbiprofen axetil to zebrafish embryo[J]. Assay Drug Dev Technol, 2022, 20(3): 125-135.
- [18] LIU Z H, SHANGGUAN Y Y, ZHU P L, et al. Developmental toxicity of glyphosate on embryo-larval zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2022, 236: 113493.
- [19] 辛玥, 宋萧萧, 王玉箫, 等. 豇豆不同部位多糖结构特征及抗氧化性能比较[J]. 食品科学, 2022, 43(16): 61-67.
- XIN Y, SONG X X, WANG Y X, et al. Structural characteristics and antioxidant properties of polysaccharides from different parts of cowpea[J]. Food Science, 2022, 43(16): 61-67.
- [20] 倪策, 曹天红, 陈敏, 等. 核桃粕源抗氧化活性肽的酶解制备及活性分析[J]. 食品与机械, 2024, 40(5): 51-61.
- NI C, CAO T H, CHEN M, et al. Enzymatic hydrolysis preparation and activity analysis of antioxidant peptides derived from walnut dregs[J]. Food & Machinery, 2024, 40(5): 51-61.
- [21] 吕新河, 朱云龙. 泥鳅蛋白多肽的抗氧化活性[J]. 食品与生物技术学报, 2022, 41(1): 22-27.
- LU X H, ZHU Y L. Study on antioxidant activity of loach protein polypeptide[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2022, 41(1): 22-27.
- [22] ZLATIĆ G, ARAPOVIĆ A, MARTINOVIĆ I, et al. Antioxidant capacity of herzogovinan wildflowers evaluated by UV-VIS and cyclic voltammetry analysis[J]. Molecules, 2022, 27(17): 5 466.
- [23] 刘昱. 双氟磺草胺对斑马鱼成鱼及胚胎的毒性效应研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2022: 11-25.
- LIU Y. Toxic effects of difluorosulfonate on adult and embryonic zebrafish[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2022: 11-25.
- [24] BITTNER L, TEIXIDÓ E, KEDDI I, et al. pH-dependent uptake and sublethal effects of antihistamines in zebrafish (*Danio rerio*) embryos[J]. Environ Toxicol Chem, 2019, 38(5): 1 012-1 022.
- [25] WANG M X, WANG H Y, CHEN G L, et al. Spiromesifen conferred abnormal development in zebrafish embryos by inducing embryonic cytotoxicity via causing oxidative stress [J]. Aquat Toxicol, 2022, 252: 106324.
- [26] FU J, BAE S. The pH-dependent toxicity of triclosan on developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos using metabolomics[J]. Aquat Toxicol, 2020, 226: 105560.
- [27] BALIYAN S, MUKHERJEE R, PRIYADARSHINI A, et al. Determination of antioxidants by DPPH radical scavenging activity and quantitative phytochemical analysis of *Ficus religiosa*[J]. Molecules, 2022, 27(4): 1 326.
- [28] GULCIN İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview[J]. Arch Toxicol, 2020, 94(3): 651-715.
- [29] GÜLCİN İ. Fe³⁺-Fe²⁺ transformation method: an important antioxidant assay[J]. Methods Mol Biol, 2015, 1 208: 233-246.
- [30] FORMAN H J, ZHANG H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy[J]. Nat Rev Drug Discov, 2021, 20(9): 689-709.
- [31] BORODUŠKIS M, KAKTIŅA E, BLĀKE I, et al. Chemical characterization and in vitro evaluation of birch sap and a complex of plant extracts for potential use in cosmetic anti-ageing products[J]. Environmental & Experimental Biology, 2017, 15(1): 29-36.
- [32] YOUNG I S, WOODSIDE J V. Antioxidants in health and disease[J]. J Clin Pathol, 2001, 54(3): 176-186.