

贵州野生甜藤多糖的提取与脱蛋白方法研究

常飞^{1,2*}, 王绍云¹, 陈飞¹

¹凯里学院化学与材料工程学院, 凯里 556011; ²贵州大学精细化工研究中心, 贵阳 550025

摘要:以贵州野生甜藤干粉为原料,通过单因素试验,再通过正交试验优化甜藤多糖提取工艺,并采用 Sevag 法、TCA 法、Sevag-TCA 法、HClO₄ 法进行脱蛋白方法研究。结果表明,甜藤多糖最优提取工艺为:以水为溶剂,料液比 1:50,超声功率 70 W,水浴温度 70 ℃,超声提取时间 110 min,提取 2 次;HClO₄ 法脱蛋白效果最佳,经 3 次脱蛋白处理后蛋白脱出率为 94.78%,多糖损失率为 15.14%,该法用于脱除甜藤植物多糖中的蛋白质,工艺简单,成本低,具有一定应用价值。

关键词:甜藤;多糖;提取;脱蛋白

中图分类号:O658.9

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.02.021

Extraction and Deproteinization of Polysaccharides from Guizhou wild *Paederia scandens*

CHANG Fei^{1,2*}, WANG Shao-yun¹, CHEN Fei¹

¹College of Chemistry and Materials Engineering, Kaili University, Guizhou Kaili 556011, China;

²Center for Research and Development of Fine Chemicals, Guizhou University, Guizhou Guiyang 550025, China

Abstract: A process for extraction of polysaccharides from Guizhou wild *Paederia scandens* powder was optimized through single factor test and orthogonal test. Four different methods, namely Sevag, TCA, Sevag-TCA, and HClO₄ methods, for the removal of protein were investigated. The results showed that HClO₄ method was demonstrated to be the best way for the removal of protein, and a protein emergence rate of 94.78% can be achieved after deproteinizing protein for 3 times. Moreover, 15.14% polysaccharide loss rate was detected under the optimal extraction conditions of using water as solvent, solid-liquid ratio of 1:50, and ultrasonic power of 70 W at a bath temperature of 70 ℃ within an extraction time of 110 min repeating for two times. This process was simple and low cost.

Key words: *Paederia scandens* (Lour.) Meer.; polysaccharide; extraction; deproteinization

甜藤 *Paederia Scandens* (Lour.) Merr, 又名鸡屎藤、牛皮冻、斑鸠饭、青风藤等,为茜草科甜藤属多年生草质藤本,主要分布于印度、日本、中国等地。在我国有广阔的生长区域,主要分布于长江流域及其南部地区^[1,2]。甜藤作为民间常用草药已有数千年历史,主治疗风湿疼痛,腹泻痢疾,脘腹疼痛,气虚浮肿,头昏食少,肝脾肿大,瘰疬,肠痈,无名肿毒,跌打损伤等^[3],近年研究发现鸡屎藤水提取液具有较强的抑菌作用^[4,7],用于治疗消化系统疾病疗效独特。在贵州鸡屎藤既是苗族习用药材,又是贵州侗族人民喜欢的野生蔬菜,是贵州“甜藤粑”、“侗果”等传统特色美食的主要原料。甜藤嫩茎含有丰富的营养

物质,如抗坏血酸、膳食纤维、胡萝卜素、多种矿物质和多种氨基酸^[8]。此外,甜藤中还含有一些生物活性物质如多糖(或甙类)、黄酮及其甙类、环烯醚萜类等^[9]。而大量文献证实植物多糖具有广泛的生物活性,如增强免疫力、抗肿瘤、抗细菌活性、降血脂、降血糖、抗衰老等作用,已经应用到保健品、药品、食品和化妆品等领域。植物多糖常混有较多蛋白质,蛋白质存在不仅可能影响其生理活性和多糖的结构,且可能导致药理作用下降。近年来,对甜藤植物的研究主要是对其化学成分和临床应用等方面,而对其中多糖的提取及脱蛋白方法的研究鲜见报道,因此对甜藤多糖的研究具有十分重要的意义。本实验以贵州野生甜藤为原料,对甜藤多糖的提取条件和甜藤粗多糖脱蛋白方法进行研究,以确定甜藤多糖最佳提取条件和脱蛋白方法,为贵州野生甜藤资源的开发利用提供参考。

收稿日期:2014-08-26 接受日期:2014-12-02

基金项目:贵州省教育厅 2012 年度自然科学重点项目(2012-449);凯里学院重点学科项目(2010-86)

* 通讯作者 E-mail: feifei625825@126.com

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

甜藤于2013年5月采自贵州凯里。经本院周江菊教授鉴定为茜草科鸡屎藤属多年生蔓性草质藤本植物[*Paederia scandens* (Lour.) Meer.]。将新鲜甜藤嫩茎在60℃下干燥至恒重,粉碎,过40目筛,作为甜藤多糖提取实验材料。

葡萄糖标准品(纯度为99.9%,美国Sigma公司),其他试剂均为国产分析纯。实验用水均为蒸馏水。蒽酮试剂:称取0.2g蒽酮加入到100mL浓硫酸中,搅拌使其溶解、冷却,即得蒽酮试剂,转入棕色瓶中(现配现用)。

UV-2550紫外-可见分光光度计,日本岛津公司;SG250HDT超声波清洗器,由上海冠特生产;TGL-16C高速台式离心机,上海安亭科学仪器厂;RE-52AA旋转蒸发仪,上海雅莱生化仪器设备有限公司;ZK-82A型真空干燥箱,上海市实验仪器厂;多功能粉碎机,北京科伟永兴仪器有限公司;AR2140型电子分析天平,由奥斯国际贸易有限公司生产。

1.2 实验方法

1.2.1 葡萄糖标准曲线的建立及甜藤多糖含量的测定

采用蒽酮-硫酸法^[10,11],准确称取23.3mg葡萄糖标准品于100mL容量瓶中,加蒸馏水溶解,定容并摇匀,此时浓度为0.233mg/mL葡萄糖标准液。取6只10mL具塞试管,分别精密量取葡萄糖标准液0.00、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50mL,分别补水至1.00mL,加入蒽酮试剂4mL,摇匀,同时置于沸水浴中加热10min,取出流水冷却后,常温下静置10min。以首管为空白于620nm处测定吸光度。以葡萄糖标准液质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制葡萄糖标准曲线,进行线性回归,得回归方程: $y = 8.9571x + 0.0317$, $R^2 = 0.9991$,结果葡萄糖质量浓度在0.0233~0.1165mg/mL范围内与吸光度值具有很好的线性关系。

精确吸取待测液2.00mL,加入蒽酮试剂4mL,同标准曲线之操作,测定吸光度值。利用标准曲线测定甜藤样品中多糖含量。

1.2.2 蛋白脱除率和多糖损失率的测定

1.2.2.1 蛋白脱除率的测定

吸取粗多糖溶液1.00mL于25mL量瓶中,加蒸馏水稀释定容,摇匀,得稀释液。以蒸馏水为参

比,测定稀释液在260nm和280nm处的吸光度。根据经验公式:蛋白质浓度(mg/mL) = $1.45 \times A_{280} - 0.74 \times A_{260}^{[12]}$,算得蛋白质含量,从而计算蛋白脱除率。

$$\text{蛋白脱除率} = [(m_1 - m_2) / m_1] \times 100\%$$

式中: m_1 为粗多糖溶液中蛋白质量; m_2 为除蛋白后多糖溶液中蛋白质量。

1.2.2.2 多糖损失率的测定

利用葡萄糖标准曲线测定脱蛋白前后甜藤粗多糖溶液中多糖含量,从而计算多糖的损失率。

$$\text{多糖损失率} = [(m_3 - m_4) / m_3] \times 100\%$$

式中: m_3 为粗多糖溶液中多糖质量; m_4 为脱蛋白后多糖溶液中多糖质量。

1.2.3 甜藤多糖提取工艺探究

1.2.3.1 提取工艺流程

新鲜甜藤茎→洗涤干净→干燥→粉碎→过40目筛→用水为提取溶剂→超声辅助提取→减压过滤→滤渣再重复提取1次→合并过滤→旋蒸浓缩→加入无水乙醇至乙醇体积分数80%→4℃冰箱中静止24h→以4000rpm离心10min→抽滤收集沉淀→用无水乙醇、丙酮、乙醚依次洗涤沉淀→真空干燥→粗多糖。取甜藤粗多糖约0.1g→精密称定→蒸馏水溶解→定容500mL→摇匀→得甜藤粗多糖溶液。

1.2.3.2 单因素试验

多糖的提取参阅文献^[13,14]方法改进,水是最佳的溶剂,超声辅助提取法比回流提取法简便且快速,本研究采用超声辅助提取法。影响植物多糖提取效果较为显著的因素主要是料液比、水浴温度、超声提取时间、超声功率,分别进行单因素试验探究其影响水平。

1.2.3.3 正交试验

通过单因素试验结果,设计 $L_9(3^4)$ 正交试验优化提取条件,因素水平设计见表1。

1.2.4 甜藤多糖脱蛋白方法研究

1.2.4.1 Sevag法^[15]

取甜藤粗多糖溶液50mL,加入1/5体积的Sevag试剂(氯仿:正丁醇=4:1,V/V),剧烈振摇20min,转入分液漏斗中,静止至分层去除交界处变性蛋白质和下层有机相,保留上层水相以4000rpm离心15min,得脱蛋白处理液,测定波长260nm、280nm处蛋白吸收峰,比较除蛋白效果。取4份粗多糖溶液,按前述步骤分别处理1、2、3、4次,按“1.2.2.1项、1.2.2.2项”测定不同处理次数后蛋白脱除率和

表1 正交试验的因素与水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiments

水平 Level	A 料液比 Solid: liquid ratio(m/V)	B 水浴温度 Water-batch temp. (°C)	C 超声时间 Ultrasonic time(min)	D 超声功率 Ultrasonic power(W)
1	30	50	70	70
2	40	60	90	80
3	50	70	110	90

多糖损失率。

1.2.4.2 三氯乙酸(TCA)法^[16,17]

取甜藤粗多糖溶液6份,各50 mL,分别加入等体积的各种浓度的三氯乙酸水溶液,依次为4%、6%、8%、10%、12%、14%,充分震荡至溶液不再浑浊,放置1.5 h,以4000 r/min离心15 min,弃去沉淀,上清液滴加NaOH饱和溶液,使溶液pH为7.0,测定蛋白脱除率和多糖损失率。首先考察哪种浓度的三氯乙酸溶液脱蛋白效果最好,然后再试验脱蛋白处理次数。

1.2.4.3 TCA-Sevag法^[17]

取甜藤粗多糖溶液50 mL,加入50 mL10% TCA溶液和10 mL氯仿-正丁醇(4:1)溶液,搅拌1 h,4000 rpm离心15 min,去除交界处变性蛋白质,取上清液(水相),测定蛋白脱除率和多糖损失率。按照前述方法考察TCA-Sevag法脱蛋白次数的效果。

1.2.4.4 HClO₄法

取甜藤粗多糖溶液6份,各50 mL,以1:1(V/V)分别加入不同浓度(1%、2%、3%、4%、5%、6%)高氯酸溶液,摇匀至溶液不再浑浊,静置30 min,4000 rpm离心10 min,取上清液,用NaOH饱和溶液调节溶液pH至7.0,测定蛋白脱除率和多糖损失率。考察不同浓度高氯酸溶液脱蛋白情况,确定最佳浓度后,考察高氯酸法处理1、2、3、4次后的脱蛋白效果。

2 结果与讨论

2.1 甜藤多糖提取单因素试验结果

2.1.1 料液比对甜藤多糖提取效果的影响

在超声功率80 W,水浴温度50 °C,超声60 min条件下,探索料液比对甜藤多糖提取效果的影响,结果见图1A。

由图1A可知,多糖得率随料液比的增加,刚开始增加很明显后缓慢增加,当料液比由1:40增加到

1:50时多糖得率只增加了0.006%,从节约方面考虑,故选择1:30、1:40和1:50三个水平进行正交试验。

2.1.2 超声时间对甜藤多糖提取效果的影响

在超声波功率80 W,水浴温度50 °C,料液比1:40(m/V)的条件下,探索超声提取时间对甜藤多糖提取效果的影响,结果见图1B。

由图1B可知,当超声提取时间达到110 min时多糖得率达到最高,再延长时间,多糖得率反而下降。说明有少部分多糖被降解了,可能由于超声波的空化效益和强烈的机械振动效应,超声时间过长使局部温度和压强过大,使多糖发生变性或结构不稳定的大分子多糖断裂而损失。故选择70、90 min和110 min三个水平进行正交试验。

2.1.3 水浴温度对甜藤多糖提取效果的影响

在超声功率80 W,超声提取时间60 min,料液比1:40的条件下,探索水浴温度对甜藤多糖提取效果的影响,结果见图1C。

由图1C可知,随着水浴温度的升高,多糖得率不断增加,温度由30 °C到50 °C阶段多糖得率曲线较陡,再升高温度,多糖得率只是略有升高,但温度较高时溶液的稠度增大,考虑到节约资源和过滤的难度,故选择50、60 °C和70 °C三个水平进行正交试验。

2.1.4 超声功率对甜藤总糖提取效果的影响

利用超声波产生的空化效应和强烈的机械振动可以加速植物中有效成分进入溶剂,料液比1:40(m/V),在水浴温度50 °C条件下,超声60 min,探索超声功率对甜藤多糖提取效果的影响,结果见图1D,随着超声功率的增加,多糖增加很明显,当功率达到80 W时,达到最高,但超声功率100 W时,吸光度反而下降,可能由于超声波功率过高使少量多糖降解,故选择70 W和80、90 W三个水平进行正交试验。

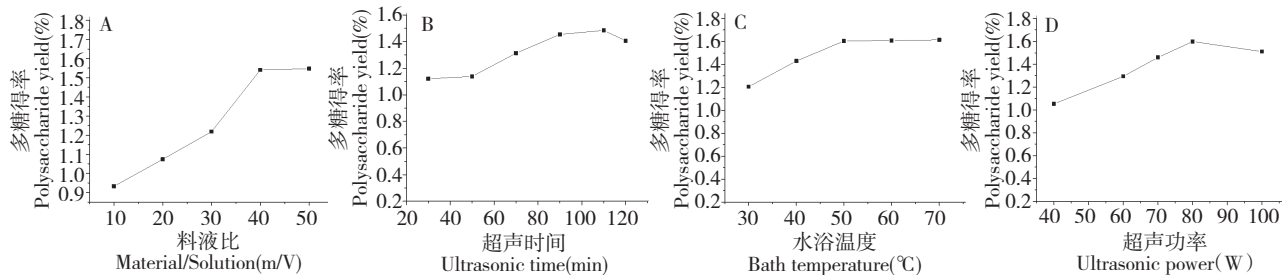


图 1 料液比 (A)、超声时间 (B)、水浴温度 (C) 和超声功率 (D) 对多糖提取效果的影响

Fig. 1 Effects of solid/liquid ratio (A), ultrasonic time (B), water bath temperature (C), ultrasonic power (D) on the extraction yield of polysaccharides

2.2 甜藤多糖提取正交试验结果

取正交试验所得的样品溶液,按照 1.2.1 项下方法测定,结果见表 2。由表 2 极差 R 分析,各因素对甜藤多糖提取效果影响大小依次排列为:料液比

(A) > 超声时间 (C) > 超声功率 (D) > 水浴温度 (B),通过正交试验直观分析得到最佳提取工艺是: A₃B₃C₃D₁。

表 2 正交试验方案及结果

Table 2 Orthogonal experimental program and results

试验号 No.	A 料液比 Solid/liquid ratio	B 水浴温度 Water bath temp.	C 超声时间 Ultrasonic time	D 超声功率 Ultrasonic power	多糖得率 Polysaccharide yield (%)
1	1	1	1	1	0.991
2	1	2	2	2	1.135
3	1	3	3	3	1.531
4	2	1	2	3	1.050
5	2	2	3	1	1.539
6	2	3	1	2	0.986
7	3	1	3	2	1.401
8	3	2	1	3	1.426
9	3	3	2	1	1.585
K ₁	1.219	1.721	1.701	2.057	
K ₂	1.787	2.050	1.885	1.761	
K ₃	2.206	2.051	2.236	2.003	
R	0.987	0.01	0.535	0.052	

为了验证结果的可信度。取甜藤样品约 5 g,精密称取 3 份,按正交试验所得的最佳条件进行实验,

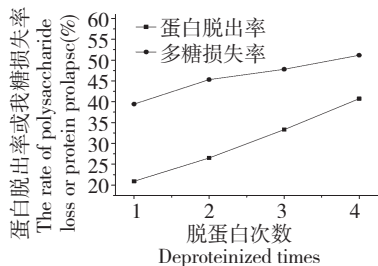


图 2 Sevag 法脱蛋白结果

Fig. 2 Deproteinization results using Sevag method

测定甜藤多糖的平均得率为 1.61% (RSD 为 0.66%),结果说明该工艺可行,即原料与溶剂按 1:50(m/V)进行混合,在超声功率 70 W、水浴温度 70 °C 下,超声提取 110 min,提取 2 次。

2.3 甜藤多糖脱蛋白方法研究结果

2.3.1 Sevag 法

从图 2 可知,Sevag 法脱蛋白率较低,处理次数增加,蛋白脱出率和多糖损失率成比例的增加,蛋白脱出率最高只能达到 40.72%,但多糖损失率已达到 51.17%,结果说明了有部分多糖与蛋白质结合

比较牢固,脱出蛋白质的同时,也有部分的多糖被带走了,所以多糖的损失率也在相应的增加。

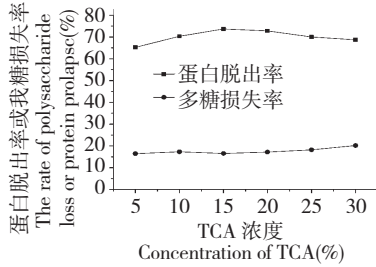


图3 不同浓度的TCA脱蛋白结果

Fig. 3 Deproteinization results with different concentrations of TCA

2.3.2 TCA法

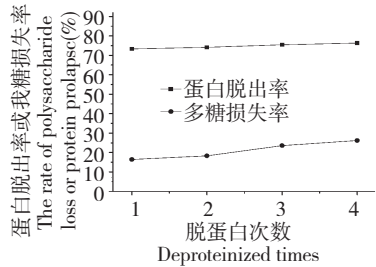


图4 不同次数TCA法脱蛋白的结果

Fig. 4 Deproteinization results with different times of TCA

由图3可知,用不同浓度三氯乙酸与等体积粗多糖溶液混合进行脱蛋白试验,结果三氯乙酸浓度为15%时,蛋白脱出率最好73.72%,多糖损失率为16.54%。以最佳的三氯乙酸浓度15%,进行多次脱蛋白处理,结果由图4可知,随着处理次数的增加,蛋白脱出率增加不多,但是多糖损失较大。

2.3.3 TCA-Sevag法

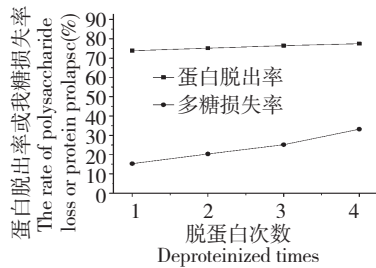


图5 TCA-Sevag法脱蛋白结果

Fig. 5 Deproteinization results using TCA-Sevag method

由图5看出,增加处理次数,多糖损失率较大幅度地增大,而蛋白质的去除效果却基本不变。

2.3.4 HClO4法

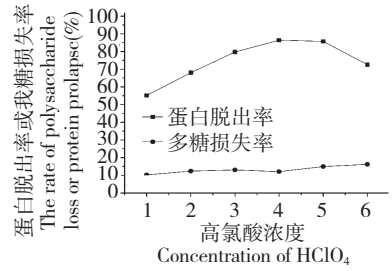


图6 不同浓度的HClO4脱蛋白结果

Fig. 6 Deproteinization results with different concentrations of HClO4

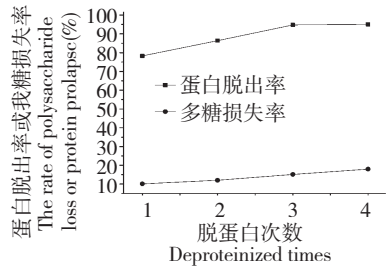


图7 不同次数HClO4法脱蛋白结果

Fig. 7 Results of different times of deproteinization using HClO4 method

由图6、图7可知,HClO4法脱除甜藤多糖中蛋白质与高氯酸浓度和脱蛋白次数有关,当加入高氯酸浓度为4%(与粗多糖溶液等体积混合后,混合液中高氯酸浓度为2%)时,脱蛋白效果最好,经3次脱蛋白处理后,蛋白脱出率达到94.78%,多糖损失率为15.14%;经4次脱蛋白处理后,蛋白脱出率达到95.02%,多糖损失率为17.95%,可见,使用高氯酸溶液脱甜藤多糖蛋白,只需3次处理就能达到满意结果。

2.3.5 四种脱蛋白方法的比较

根据以上实验研究,不同方法对甜藤多糖去除蛋白质的效果有较大差别,Sevag法去除甜藤多糖蛋白的效果最差,且多糖损失大,效率不高;三氯乙酸脱蛋白率较高,多糖损失率较Sevag法低,但是费时。TCA-Sevag法虽然处理一次就能得到较好的脱蛋白效果,但所用试剂种类多导致成本上升,操作比较繁琐,而且不容易达到纯化目的,易造成环境的污染,不可取。HClO4法是最佳的甜藤多糖脱蛋白方法,蛋白脱出率高且多糖损失率小,而且方法简单,

所用试剂种类少,易于提纯,且对环境友好,易于推广。

2.3.6 甜藤多糖脱蛋白方法的定性分析

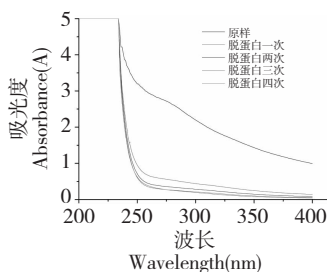


图8 脱蛋白处理前后的紫外光谱扫描图

Fig. 8 UV spectra of samples before and after deproteinization

用 HClO_4 法脱蛋白处理前后,进行定性分析,结果见图8。从图8可知,经过4次脱蛋白处理后,在260 nm和280 nm处只有少量吸收,说明大部分蛋白质已经被去掉,只有与多糖结合牢固的少量蛋白质没有被除去。

3 结论与讨论

植物中多糖提取方法有很多,本实验采用超声辅助提取甜藤多糖,经单因素试验和正交试验得出了贵州野生甜藤多糖的最佳提取工艺:以水为溶剂,料液比1:50(m/v),在超声功率60 W、水浴温度70℃下,超声提取时间110 min,提取2次,所得提取效率最高为1.61%。该法工艺简单可行,可作为甜藤多糖的提取工艺。

目前多糖含量测定方法最常用的是蒽酮-硫酸法、苯酚-硫酸法两种方法^[18-20],其两种方法的基本原理是多糖在浓硫酸作用下,水解成单糖,然后脱水生成具有呋喃环结构的糠醛衍生物,糠醛衍生物可与蒽酮、苯酚试剂发生反应生成有色的化合物,在一定范围内,颜色的深浅与糖的含量成正比,故可用于多糖的定量。本实验采用蒽酮-硫酸法来测定脱蛋白前后多糖含量,主要是考虑到该方法测定条件比较温和,易控制,线性、重复性和稳定性较高;另外,苯酚-硫酸法对苯酚的纯度要求比较严格,其纯度直接影响该实验测试结果的准确度;再者,对于本实验来讲,主要还研究了甜藤多糖的脱蛋白方法,从结果误差和重现性来讲蒽酮-硫酸法测定脱蛋白前后多糖含量更为合理准确。

在目前所查到的文献中,还未见有关 HClO_4 法用于去除植物中蛋白质,本实验参阅文献^[21]基础

上,首次采用高氯酸探究植物多糖脱蛋白效果,经过实验研究,获得满意结果。 HClO_4 法是一种有效的去除甜藤多糖蛋白质的方法,且工艺简单,成本低,具有一定的应用价值。

参考文献

- 1 Institute of botany, Chinese Academy of Sciences (中国科学院西北植物研究所). Flora of Qinling Mountains (秦岭植物志). Beijing: Science Publishing House, 1985. 12.
- 2 Fu GL(傅立国), Chen TQ(陈潭清), Lang KY(郎楷永), et al. Higher Plants of China (中国高等植物). Qingdao: Qingdao Publishing House, 2004. 633-635.
- 3 Xu JL(徐金龙), Liu L(刘雷), Zhang QY(张巧艳), et al. Review of chemical constituents, pharmacological effects and clinical practices of *Paederia scandens* (Lour.) Merr. *J Pharm Prac*(药学实践杂志), 2011, 29: 401-404.
- 4 Zhang M(张梅), Kang XH(康晓慧), Ma L(马林). Bacteriostatic effect of extracts from five medicinal plants. *Hubei Agric Sci*(湖北农业科学), 2011, 50: 728-730.
- 5 Gao KL(高克立), Wang YC(王永昌), Fan JH(樊锦慧), et al. The progress of the chemical constituents and pharmacological effects for the *Paederia scandens*. *Gansu Med J*(甘肃医药), 2011, 30: 20-22.
- 6 Chen WM(陈伟明), Liang J(梁军), Hang ZH(黄志宏), et al. Antibacterial effect of *Herba paederiae* and *Kalimeris indica* (L.) Sch.-Bip combined with antibiotics. *J Anhui Agric Sci*(安徽农业科学), 2012, 40: 2704-2705.
- 7 Hu HQ(胡海清), Han HD(韩贺东), Lin Y(林燕), et al. Chemical constituents of *Paederia pertomentosa*. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2013, 38: 2657-2660.
- 8 Zhang SX(张书霞). Analysis of nutritional components of *Paederia scandens*. *Food Res Dev*(食品研究与开发), 2006, 27: 150-151.
- 9 Ma YM(马养民), Mao Y(毛远), Fu JX(傅建熙). A preliminary study on the chemical constituents of the aerial parts of *Paederia scandens*. *Shaanxi Forest Sci Technol*(陕西林业科技), 1997: 1-4.
- 10 Wang ZZ(王宪泽). Technical Principles and Methods of Biochemical Experiments. Beijing: China Agricultural Publishing House, 2002. 52-54.
- 11 Zhao L(赵龙), Ruan MJ(阮美娟), Qin XH(秦学会), et al. Determination of polysaccharide in arrowhead by anthrone-sulfuric acid method. *Food Res Dev*(食品研究与开发), 2009, 30: 118-121.
- 12 Mei XY(梅新娅). Deproteinization and antioxidant activity of cucumber polysaccharide. *Food Sci Technol*(食品科技), 2013, 38: 176-178.

- 13 Xia HT(夏海涛), Liu YF(刘玉芬), Wang R(王蓉), *et al.*. Extraction and content determination of polysaccharides and flavonoids from wild *Pteridium aquilinum*. *Food Sci*(食品科学), 2010, 31:124-127.
- 14 Wu GQ(吴功庆), Wu HY(吴慧仪), Liu Y(刘意), *et al.*. Extraction and purification of the polysaccharide of Chicken bone herb. *Jiangsu J Agric Sci*(江苏农业学报), 2012, 40:247-248.
- 15 Hao BH(郝博慧), Yang X(杨鑫), Ma Y(马莺). Study on deproteinization in extraction of polysaccharides from *Patentillaunserina* by Sevage. *Sci Technol Food Ind*(食品工业科技), 2011, 32:254-255.
- 16 Li Q(李强), Tang W(唐微), Zheng W(郑伟), *et al.* Study on the comparison of different methods for deproteinization from crude polysaccharide of *Eucommia ulmoides* Oliver. *Sci Technol Food Ind*(食品工业科技), 2011, 32:316-317.
- 17 Tan M(谭敏), Qiu XM(邱细敏), Lu YY(陆艳艳), *et al.* Deproteinization and decoloration of *Atractylodes macrocephala* koidz polysaccharides. *Chin J New Drugs*(中国新药杂志), 2010, 19:2100-2102.
- 18 Liu XH(刘晓涵), Chen YG(陈永刚), Lin L(林励), *et al.* Comparison of methods in determination of polysaccharide in *Lycium barbarum* L. *Food Sci Technol*(食品科技), 2009, 34:270-272.
- 19 Fan CY(范传颖), Tao ZM(陶正明), Wu ZG(吴志刚). Comparison of phenol sulfuric acid method and anthrone sulfuric acid method for the determined of content of polysaccharides in *Dendrobium officinale*. *Zhejiang Agric Sci*(浙江农业科学), 2013:977-801.
- 20 Guan YC(管玉成), Li J(李静). Research on polysaccharide content determination method for *Lethariella zablbrukneri*. *Med Innov China*(中国医学创新), 2014, 11:107-109.
- 21 Wang SY(王绍云), Zhou GM(周光明), Wang L(王莉). Determination of oxytetracycline, tetracycline residues in animal liver tissues by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography. *J Southwest China Normal Univ, Nat Sci*(西南师范大学学报, 自科报), 2005, 30:1078-1081.

(上接第 288 页)

- 2 Wang H(王辉). Study on chiefly active components of natural *Ginkgo biloba*. Beijing: Beijing university of chemical technology(北京化工大学), MSc. 2007.
- 3 Braquer P. The ginkgolides: potent platelet activating factor antagonists isolated from *Ginkgo biloba* L. Chemistry, pharmacology and clinical applications. *Drug of Future*, 1987, 12:643-699.
- 4 Fan WG(樊卫国), Liu JP(刘进平), He J(何俊), *et al.* Studies on seasonal variation of flavonoids, ginkgolides and the optimum harvest time on leaves of ginkgo. *J Mount Agric Biol*(山地农业生物学报), 2000, 19:117-120.
- 5 Shao SR(邵胜荣). Study on the technique of extraction, purification, preparation and quality control of the bio-active constituents from *Ginkgo biloba*. Hangzhou: Zhejiang University(浙江大学), MSc. 2005.
- 6 Meng C(孟超), Xu H(徐弘), Cheng KD(程克棣). Preliminary study on the ginkgolide B and bilobalide contents in different tissues and callus cultures of *Ginkgo biloba*. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2005, 17:603-605.
- 7 Zhang J(张鉴), Pan J(潘见), Xie HM(谢惠明), *et al.* Determination of five kinds of ginkgolides in *Ginkgo biloba* leaves extract by reversed-phase high performance liquid chromatography. *J Anal Chem*(分析化学), 2000, 28:53-56.
- 8 Lv FS(吕伏生), Chen W(陈伟), Feng F(冯芳), *et al.* The contents of terpenelactones in the ginkgo injection. *J Chin Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2001, 32:34-36.
- 9 Qin F(秦昉), Tao GJ(陶冠军), Wang LX(王林祥). Determination of low-level ginkgolides by LC-MS. *J Wuxi Univ Light Ind*(无锡轻工大学学报), 2003, 22(4):80-82.
- 10 Ma MD(马明东), Pu SR(蒲尚饶). *Ginkgo biloba* extract (GBE) quality indicators and influencing factors. *J Sichuan Forest Sci Technol*(四川林业科技), 2000, 21:25-28.