

# 蚯蚓葡萄糖氧化酶的提取纯化研究

李 娇, 原 琳, 荣永海, 荣 龙\*

北京航空航天大学生物与医学工程学院, 北京 100191

**摘要:**本研究采用闪式提取技术提取蚯蚓葡萄糖氧化酶(GOD)。利用正交设计优化实验条件,得到最优条件为:固液比 1:4.5(g/mL),闪提时间 45 s,超声时间 30 min。通过酸沉淀,羧甲基纤维素 CM-22 离子交换层析和 DEAE 离子交换层析实现了 GOD 的纯化,回收率达到了 60.8%,比活达到了 2684.2 mU/mg,纯化倍数达到 37.2 倍。

**关键词:**蚯蚓;葡萄糖氧化酶;闪式提取;正交试验;纯化

中图分类号:Q5;Q81

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.08.027

## Extraction of Glucose Oxidase from Earthworm

LI Jiao, YUAN Lin, RONG Yong-hai, RONG Long\*

*College of Biological Science and Medical Engineering, Beihang University, Beijing 100191, China*

**Abstract:** In this study, flash extraction was used to extract glucose oxidase (GOD) from earthworm. The extraction conditions were optimized by orthogonal test design and the optimal conditions were applied as follows: solid to liquid ratio of 1:4.5 (g/mL), flash extraction for 45 s and ultrasonic extraction for 30 min. GOD was purified by column chromatography on CM-22 and DEAE. The purified GOD had a specific activity of 2684.2 mU/mg with a yield of 60.8%.

**Key words:** earthworm; glucose oxidase; flash extraction; orthogonal test design; purification

蚯蚓,又称地龙,属寡毛纲环节动物门。在我国入药已有四千余年的历史,具有解热、镇痉、活络、平喘等功效,是一种常见的动物药材<sup>[1]</sup>。近年来,研究者发现蚯蚓含有多种生物活性成分,并且具有多方面的药理作用和临床疗效,引起了人们的广泛关注<sup>[2]</sup>。目前,研究主要集中在蚯蚓纤溶酶、抗肿瘤蛋白<sup>[3]</sup>、抗菌肽<sup>[4]</sup>等成分的提取和纯化方面。研究表明,蚯蚓体内还含有丰富的抗氧化酶,它们具有重要的生理功能,可以清除体内多余的自由基,能够治疗疾病,延缓衰老。

蚯蚓体内的抗氧化酶类包括过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、谷胱甘肽还原酶(GSH-R)、葡萄糖氧化酶(GOD)等,其中,我室对蚯蚓中 SOD 和 CAT 提取的相关研究已经比较成熟<sup>[5]</sup>。有氧条件下能专一性地催化 $\beta$ -D-葡萄糖生成葡萄糖酸和过氧化氢<sup>[6]</sup>,在各行业具有广泛的应用。在食品工业中,GOD 可用于去葡萄糖<sup>[7]</sup>、脱氧<sup>[8]</sup>、杀菌、测定葡萄糖含量等;在医药行业,GOD 可以用于尿糖试纸,血糖试纸和葡萄糖酸的生产等;在生物方面,GOD 是生物传

感器领域最主要的工具酶<sup>[9]</sup>。目前,GOD 的提取来源主要有黑曲霉和青霉属菌株<sup>[8]</sup>,动植物组织中 GOD 的含量极其低,未见从蚯蚓中提取纯化 GOD 的相关报道。如果从蚯蚓中提取并纯化得到 GOD,这不仅将拓宽 GOD 的来源,并且能够扩展蚯蚓的应用范围,对蚯蚓的进一步开发利用具有重要意义。

在此前的研究中,本实验室采用闪式提取法对铁皮石斛多糖<sup>[10]</sup>、罗汉果多酚<sup>[11]</sup>、柑橘柠檬苦素<sup>[12]</sup>、罗汉果甜苷<sup>[13]</sup>等生物成分进行提取,与传统提取方法相比,在提取时间,提取效率方面具有明显的优势,因此,从节能高效方面考虑,本研究采取闪式提取这一新型方法对 GOD 进行提取。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 主要材料与试剂

实验用赤子爱胜蚯蚓(*Eisenia fetida*)由天津蚓福生物科技开发有限公司提供;羧甲基纤维素 CM-22 购买自英国 Whatman 公司;二乙胺基乙基纤维素(DEAE-Cellulose)购自上海试剂二厂;GOD 活性检测用苯酚和葡萄糖购自北京化工厂,4-氨基安替比林和 Triton X-100 均购自国药集团化学试剂有限公司;蛋白检测用考马斯亮蓝 G-250 购自美国 Amresco

公司;其他试剂均从北京化工厂购买;全部试剂均为分析纯或色谱纯等级;实验过程中所使用双蒸水由实验室自己制得。

## 1.2 主要仪器与设备

ArantiTMJ-25 型低温高速离心机,美国 Beckman Coulter 公司;SP-756P 型分光光度计,上海光谱仪器有限公司;JHBE-50S 型闪式提取器,北京金鼎科技发展有限公司;蛋白分离纯化层析柱,上海锦华层析设备厂;868 型酸度计,美国 Orion 公司;双蒸水过滤器,美国 PALL 公司。

## 1.3 试验方法

### 1.3.1 蚯蚓的预处理

取 100 g 冷冻新鲜蚯蚓(已洗净),剪碎,以 1:4

表 1 单因素实验因素水平表

Table 1 Factors and levels of single factor experimental design

因素 Factor	1	2	3	4	5
pH 值 pH value	3.8	4.8	5.8	6.8	7.8
固液比 Solid/liquid ratio	1:3	1:4	1:5	1:6	1:7
闪提时间 Flash extraction time (s)	15	30	45	60	75
闪提转速 Flash extraction speed (rpm)	2200	2800	3500	4200	4900
超声时间 Ultrasonic extraction time (min)	0	15	30	45	60

### 1.3.2.2 正交试验

根据单因素实验的结果,选取对酶活影响较大

(m/v)的体积加入已预冷的 50 mmol/L pH 4.8 的醋酸缓冲液(1 mmol/L EDTA),使用闪式提取器进行提取(转速 5500 rpm,提取两次,每次 30 s,每次间隔 5 min),闪提后使用 800 W 超声提取器提取 30 min,冻存(-70 ℃)12 h。冻存液溶化后使用低温离心机离心(转速 10000 rpm,时间 50 min),离心得到的上清液为粗酶液,测定酶活及蛋白浓度。

### 1.3.2 预处理条件的正交优化

#### 1.3.2.1 单因素实验

对于蚯蚓的预处理步骤,影响酶活的主要因素有缓冲液的 pH 值、固液比、闪提时间、闪提转速及超声时间。为优选正交试验的条件及水平,先对各因素进行单因素实验。单因素实验的因素及水平见表 1。

的因素作为正交试验的考察因素,正交试验的因素水平表见表 2。

表 2 正交试验因素水平表

Table 2 Factors and levels of orthogonal test

水平 Level	A	B	C
	料液比 Solid/liquid ratio	超声时间 Ultrasonic extraction time (min)	闪提时间 Flash extraction time (s)
1	1:3.5	25	35
2	1:4	30	45
3	1:4.5	35	55

### 1.3.3 GOD 的纯化

#### 1.3.3.1 酸沉淀

用醋酸将粗提液的 pH 调至 4.5,冰箱中(-20℃)放置 15 min,离心(转速 10000 rpm,4 ℃,50 min),离心后取上清,测酶活,测蛋白浓度。

#### 1.3.3.2 CM-22

CM-22 离子交换柱填料按说明处理,装柱后用 50 mmol/L pH 4.5 的醋酸缓冲液平衡。酸沉淀后的上清液 pH 调至 4.5,上 CM-22 柱(2.5 cm × 45

cm),流速 2 mL/min,用同缓冲液洗净。CM-22 吸附柱用 0.6 mol/L pH 5.0 醋酸缓冲液进行洗脱,流速 1 mL/min,收集液即为 GOD 粗提液,测定酶活,蛋白浓度。收集液用 2.5 mmol/L pH 7.6 的磷酸缓冲液透析 4 h。

#### 1.3.3.3 DEAE-Cellulose

DEAE-Cellulose 离子交换柱填料按说明处理,装柱后用 2.5 mmol/L pH 7.6 的磷酸缓冲液平衡。透析后的酶粗提液上 DEAE-C 柱(1.6 cm × 30 cm),

用同缓冲液洗净,然后用 0.6 mol/L 的 NaCl 溶液进行洗脱,流速 1 mL/min,收集液即为 GOD 酶液,测定酶活,测定蛋白含量。

### 1.3.4 GOD 活性测定

参考文献<sup>[14,15]</sup>的方法,反应体系为 3 mL,其中包含 pH 7.0 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液,16 mmol/L 的苯酚及 4 mmol/L 的 Triton X-100,7.5 mmol/L 的 4-氨基安替吡啉,0.55 mol/L 的葡萄糖溶液以及 0.1 mg/mL 的辣根过氧化物酶,上述混合溶液震荡混匀后,加入 0.1 mL 葡萄糖氧化酶溶液,SP-756P 型分光光度计,于 37 °C、 $\lambda = 500\text{nm}$  自动记录随时间变化的吸光度值。酶活力单位定义为:在上述条件下,每毫升溶液中每分钟催化葡萄糖水解产生 1  $\mu\text{mol}$  产物的酶量。比活力定义为:每毫克酶蛋白所具有的酶活力单位数。

### 1.3.5 蛋白浓度的测定

蛋白质浓度采用考马斯亮蓝法测定,参考文献<sup>[16]</sup>,以标准牛血清蛋白为标准品绘制曲线。

### 1.3.6 热稳定性

在含 0.1 mol/L pH 7.0 的磷酸缓冲液中,将 GOD 酶液分别置于 -18、4、10、20、30、40、50、60、70、80 °C 水浴中,保温 2 h,分别测定酶活性。

### 1.3.7 pH 值稳定性

将 GOD 酶液置于 0.1 mol/L 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液 (pH 2 ~ 8)、0.1 mol/L 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液 (pH 9 ~ 10)、0.1 mol/L 的磷酸氢二钠-氢氧化钠缓冲液 (pH 11) 中,4 °C 保温 2 h 后,分别测定酶活性。

### 1.3.8 最适温度

将酶反应体系在 22 ~ 77 °C 下孵育 30 min,分别测定 GOD 的活性。

### 1.3.9 最适 pH

将 GOD 酶液置于用 0.1 mol/L 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液 (pH 2 ~ 8)、0.1 mol/L 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液 (pH 9 ~ 10)、0.1 mol/L 的磷酸氢二钠-氢氧化钠缓冲液 (pH 11) 配制成的反应体系中反应,计算反应后酶活。

## 2 实验结果

### 2.1 蚯蚓预处理的优化

#### 2.1.1 单因素实验结果及分析

##### 2.1.1.1 pH 值

如图 1 所示,当缓冲液的 pH 值由 3.8 升到 4.8

时,GOD 的比活上升,随后下降,但是变化趋势不明显,因此,正交试验时不考虑此因素。当 pH 为 4.8 时,GOD 的比活最高,因此,闪提时缓冲液的 pH 选为 4.8。

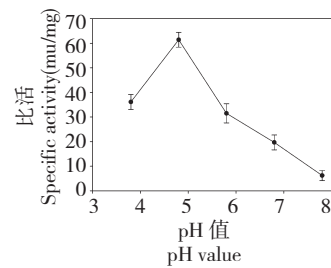


图 1 pH 值对比活的影响

Fig. 1 Effect of pH value on the specific activity of GOD

##### 2.1.1.2 固液比

图 2 表明,GOD 的比活先随液固比升高而升高,当液固比为 4:1 (mL/g) 时,酶的比活达到最高,随后下降,且趋势明显,因此,该因素被选为正交试验的考察因素。

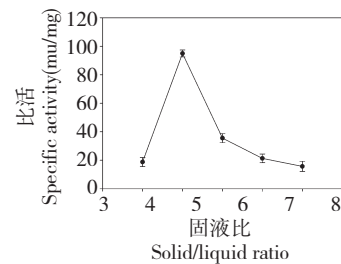


图 2 固液对比活的影响

Fig. 2 Effect of solid/liquid ratio on the specific activity of GOD

##### 2.1.1.3 闪提时间

图 3 表明,随着闪提时间的增加,GOD 的比活有升高的趋势,当闪提时间达到 45 s 后,比活开始下降,趋势明显,因此闪提时间可选为正交试验的考察因素。

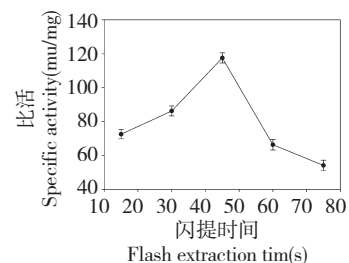


图 3 闪提时间对比活的影响

Fig. 3 Effect of flash extraction time on the specific activity of GOD

### 2.1.1.4 闪提转速

如图4所示,随着闪提转速的增加,GOD的比活略有升高,当转速达到2800 rpm后,比活开始下降,当转速由2200 rpm升高到3500 rpm的过程中,GOD的比活变化很小,因此排除此因素,在实验过程中,选取2800 rpm为实验转速。

### 2.1.1.5 超声时间

图5表明,随着超声时间的增长,GOD的比活升高,当超声时间达到30 min后,比活开始下降,且

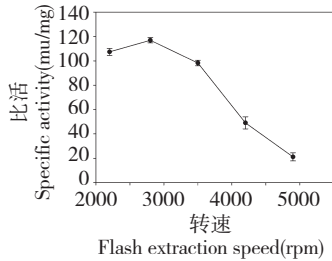


图4 闪提转速对比活的影响

Fig. 4 Effect of flash extraction speed on the specific activity of GOD

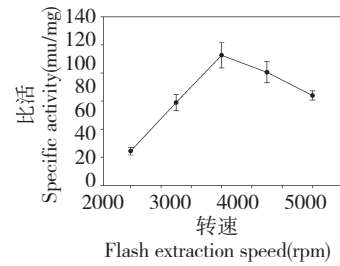


图5 超声时间对比活的影响

Fig. 5 Effect of Ultrasonic extraction time on the specific activity of GOD

整个过程变化趋势明显,因此该因素可选为正交试验的考察因素。

### 2.1.2 正交试验的结果及分析

如表3所示,影响蚯蚓GOD比活的因素主次影响顺序为A > B > C,即固液比 > 超声时间 > 闪提时间。三个因素的最佳搭配组合为A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>,即固液比1:4.5 (g/mL),超声时间30 min,闪提时间45 s,在此条件下,蚯蚓预处理部分效果最好。

表3 正交试验结果

Table 3 Results of L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) experimental design for the extraction of GOD

试验号 No.	因素 Factors	空列 Blank	结果 Results		
	A	B	C		
1	1	1	1	1	198.11
2	1	2	2	2	273.56
3	1	3	3	3	219.65
4	2	1	2	3	139.95
5	2	2	3	1	87.53
6	2	3	1	2	99.20
7	3	1	3	2	173.63
8	3	2	1	3	396.10
9	3	3	2	1	294.44
K1	691.32	511.69	693.41	580.06	
K2	326.68	757.19	707.95	546.39	
K3	864.17	613.29	480.81	755.70	
k1	230.44	170.56	231.14	193.35	
k2	108.89	252.40	235.98	182.13	
k3	288.06	204.52	160.27	251.90	
R	179.17	81.84	75.71	69.77	
主次顺序 Orders	A > B > C > 空列				
优水平 The best level	A3	B2	C2		
优组合 The best combination	A3B2C2				

正交试验的方差分析结果如表 4 所示。料液比对蚯蚓 GOD 的酶活影响比较显著,而超声时间和闪提时间两因素对 GOD 酶活的影响相对不显著,影响主次顺序为料液比 > 闪提时间 > 超声时间,这与极

差分析的结果有一定不同,不过从数据可以看出,闪提时间与超声时间对 GOD 提取的影响显著性差距不大,因此会出现分析结果的差异,以方差分析结果为准,即料液比 > 闪提时间 > 超声时间。

表 4 方差分析

Table 4 ANOVA of the GOD extraction

方差来源 Source of variance	离差平方和 Square sum of deviations	自由度 df	均方 Mean Square	F
A 料液比 Solid/liquid ratio	50193	2	25096	5.961
B 超声时间 Ultrasonic extraction time	10144	2	5072	1.205
C 闪提时间 Flash extraction time (s)	10778	2	5389	1.280
误差 Error	8421	2	4210	-

## 2.2 蚯蚓 GOD 的纯化

GOD 粗酶液经酸沉淀后,比活为 131.87 mU/mg。CM-22 的洗脱收集液液,比活为 368.13 mU/

mg。DEAE 柱的洗脱收集液,比活为 2684.21 mU/mg,纯化倍数达到了 37 倍,如表 5 所示。

表 5 蚯蚓 GOD 纯化结果

Table 5 Purification results of GOD from the earthworm

样品 Sample	总活性 Total activity (U)	比活 Specific activity (mU/mg)	纯化倍数 Purification fold	回收率 Yield (%)
粗酶液 Crude extract	20.54	72.09	1	100
调 pH 4.5 后上清 After acid precipitation	18.09	131.87	1.83	88.07
CM-22 柱 CM-22	14.17	368.13	5.11	68.99
DEAE 纤维素 DEAE-Cellulose	12.50	2684.21	37.23	60.83

GOD 的提取纯化现状如表 6 所示,GOD 主要来源于青霉与黑曲霉<sup>[15,17]</sup>,提取纯化工工艺比较成熟,纯化方法包括超滤浓缩、硫酸铵盐析、DEAE-纤维素离子交换层析、Sephadex 凝胶过滤纯化等,倍数大约

为 20~30,回收率约为 30%,本实验中 GOD 的纯化倍数达到了 37 倍,回收率达到了 61%,与已知的青霉菌与黑曲霉的纯化工工艺相比,纯化步骤简单,回收率高,纯化倍数高,达到了很好的提取效果。

表 6 GOD 的提取纯化现状

Table 6 Extraction and purification status of GOD

来源 Sources	比活 Specific activity (U/mg)	纯化倍数 Purification (fold)	回收率 Recovery (%)	分子量 Molecular weight (kDa)	最适 pH Optimum pH	最适温度 Optimum temperature (°C)
青霉	472	29.7	-	150	5.6	40
黑曲霉	1779	20.1	30.28	-	-	-
美洲棉铃虫 <sup>[18]</sup>	-	-	-	82	7.0	-

## 2.3 蚯蚓 GOD 的稳定性

### 2.3.1 GOD 的温度稳定性

如图 6 所示,蚯蚓 GOD 在 20 °C 时稳定性最好,在 4~30 °C 之间具有较好的稳定性,当温度达到 60 °C 时,GOD 几乎丧失全部活性。

### 2.3.2 GOD 的 pH 值稳定性

结果如图 7 所示,蚯蚓 GOD 在 pH4~7 之间具有良好的稳定性(相对活性在 80% 以上),与昆虫来源的 GOD 近似<sup>[17]</sup>。当 pH 8 时,相对酶活也在 60% 以上,当 pH 为 2 及 pH 大于 9 时,GOD 几乎完全失活。根据 GOD 对不同 pH 值的敏感性,在实验过程中,缓冲体系的 pH 一直保持在 pH4~7 之间。

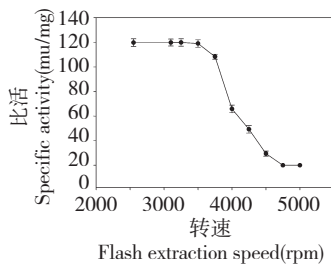


图6 蚯蚓 GOD 的热稳定性

Fig. 6 Temperature stability of GOD

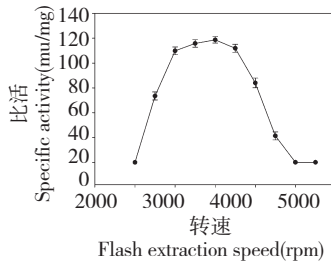


图7 蚯蚓 GOD 的 pH 值稳定性

Fig. 7 pH stability of GOD

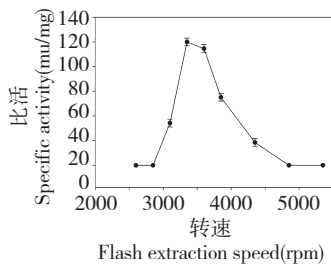


图8 蚯蚓 GOD 的最适反应温度

Fig. 8 The optimal reaction temperature of GOD

## 2.4 蚯蚓 GOD 的最适反应温度

如图8所示,GOD的最适反应温度为37℃,这与青霉菌来源的GOD<sup>[17]</sup>基本是一致的,当温度低于32℃或者高于57℃时,相对酶活性下降至40%以下。所以,我们在实验中检测GOD酶活性时温度控制在37℃。

## 2.5 蚯蚓 GOD 的最适 pH 值

如图9所示,GOD的反应活性对pH值非常敏感,它的最适反应pH值为7,当pH值大于7时,酶活迅速降低,当pH值小于6时,相对酶活降低到60%以下。所以,在检测GOD活性时,反应体系的pH一定要严格控制为7。

## 3 结论

在本研究中,我们利用闪式提取技术提取蚯蚓

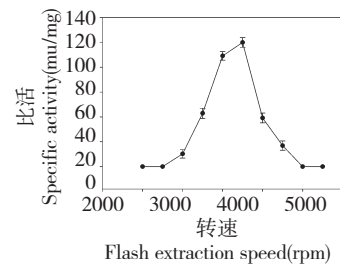


图9 蚯蚓 GOD 的最适 pH 值

Fig. 9 The optimal reaction pH value of GOD

葡萄糖氧化酶(GOD),并采用正交试验法优化了闪提及超声实验条件,得到的最优条件为:固液比1:4.5(g/mL),闪提时间45s,超声时间30min。

利用柱层析等方法对蚯蚓GOD进行纯化,最终回收率达到了60.8%,纯化倍数达到了37.2。本实验提纯的GOD最适pH为7,酶在pH4~7区间较稳定,酶活保持在80%以上,酶最适温度为37℃,温度升高时,酶迅速失活,此结果表明蚯蚓来源的GOD与真菌来源GOD在稳定性方面具有一定差异性,这对进一步的研究及工业应用具有一定的指导意义。本研究成功从蚯蚓中纯化得到GOD,不仅拓宽了GOD的生物来源,同时提高了蚯蚓的综合利用率。

## 参考文献

- 1 Sun XD(孙晓东),Fang ZH(房泽海). Pharmacological effects and clinical research progress of earthworms. *Sci Technol Innov Herald*(科技创新导报),2009,12:2-3.
- 2 Cheng G(程果),Xu S(徐晟),Xiao X(肖湘),et al. Purification technique and pharmacologic action of active ingredients in earthworms. *J Economic Animal*(经济动物学报),2011,15:114-119.
- 3 Xie JB(谢江碧),Guo ZQ(郭振泉),Weng N(翁宁),et al. Purification, identification and partial characterization of an apoptosis-related serine protease from earthworm. *Prog Biochem Biophys*(生物化学与生物物理进展),2003,30:453-459.
- 4 Yan QL,Zhen JS,Chong W,et al. Purification of a novel antibacterial short peptide in earthworm *Eisenia foetida*. *Acta Biochim Biophys Sin*,2004,36:297-302.
- 5 Liao Y(廖怡),Rong YH(荣永海),Rong L(荣龙). Combined extraction of superoxide dismutase and catalase from earthworm *Eisenia fetida*. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),2012,11:1538-1544.
- 6 Zhao XF(赵晓芳),Zhang HF(张宏福). The function of

- glucose oxidase and its application in animal husbandry. *Guangdong Feed* (广东畜牧), 2007, 16:34-35.
- 7 Xu YQ(徐雅琴), Yang YJ(杨严俊), Cao RY(曹如燕). Study on removal of glucose in egg white by glucose oxidase. *Food Ferment Ind* (食品与发酵工业), 2005, 31(2):55-58.
  - 8 Liu C(刘超), Yuan JG(袁建国), Wang YX(王元秀), et al. Progress on glucose oxidase. *Food Drug* (食品与药品), 2010, 12:285-288.
  - 9 Zhang GD(张广栋), Luo CX(罗仓学). Biosensor and its application in food industry. *Food Res Dev* (食品研究与开发), 2005, 26:133-134.
  - 10 Li J(李娇), Rong YH(荣永海), Rong L(荣龙). Flash extraction of polysaccharide from *Dendrobium officinale*. *Chin Med Mat* (中药材), 2013, 9:1524-1527.
  - 11 Liu C, Rong YH, Rong L. Flash extraction of polyphenols from fruits of *Siraitia grosvenorii*. *Food Sci*, 2010, 31(22):50-53.
  - 12 Liu J(刘静), Liu C(刘灿), Rong YH(荣永海), et al. Optimization of homogenate extraction process of limonin via statistical methods. *J South China Univ Technol, Nat Sci* (华南理工大学, 自科版), 2011, 39(9):28-33.
  - 13 Liu Z(刘兆), Rong YH(荣永海), Rong L(荣龙). Flash extraction of mogroside from fruits of *Siraitia grosvenorii*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2011, 23:561-564.
  - 14 Liao JH(廖金花), Chen Q(陈巧), Chen QX(陈清西), et al. Purification and characterization of alkaline Phosphatase from *Haliotis diversicolor*. *J Xiamen Univ, Nat Sci* (厦门大学学报, 自科版), 2005, 44:272-275.
  - 15 Zhang Q(张茜), Fu WH(傅婉辉), Kang JH(康劲翻), et al. Purification and characterization of glucose oxidase from *Penicillium amagasakiense*. *J Xiamen Univ, Nat Sci* (厦门大学学报, 自科版), 2009, 48:99-102.
  - 16 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72:248-254.
  - 17 Wang ZX(王志新), Li N(李宁), Han J(韩军), et al. Extraction and purification of glucose oxidase from *Aspergillus niger* A9. *J Chin Inst Food Sci Technol* (中国食品学报), 2007, 7:64-67.
  - 18 Hu YH(胡永红), Wang CZ(王琛柱). Glucose oxidase in insects and its function. *Chin Bull Entomol* (昆虫知识), 2009, 46:337-342.

(上接第 1447 页)

- 6 Yil T, Liy C, Pan Y, et al. Antidepressant-like effects of psoralidin isolated from the seeds of *Psoralea corylifolia* in the forced swimming test in mice. *Prog Neuro-Psychoph*, 2008, 32:510-519.
- 7 Dou H(窦昊), Gao ZC(高志成), Li W(李薇). Progress in traditional Chinese Medicine antidepressant active ingredients. *China Pharm* (中国药业), 2010, 19(21):88.
- 8 Fu CY(傅春燕), Liu YH(刘永辉), Chen DW(陈代武), et al. Study on extraction and purification techniques and free radical scavenging activity of total flavonoids from *F. oldhamii*. *J Chin Med Mater* (中药材), 2011, 34:446-449.
- 9 Chen NF(陈乃富), Chen K(陈科), Zhang L(张莉), et al. Study on purification of total flavonoids from *Rosa Laevigata* with macroporous resin column chromatography. *J Chin Med Mater* (中药材), 2007, 30:1013-1016.
- 10 Wang HY(王慧彦), Fang Y(方芸), Wang Y(王妍), et al. Macroporous resin AB-8 adsorption for purifying total flavonoids from pagoda flowers. *Food Sci* (食品科学), 2009, 20:146-149.
- 11 Wang LZ(王利珍), Zhao CL(赵嫦玲), Yan L(闫静). Study on extraction and purification process of total flavones from potato peel. *J Taiyuan Univ Technol* (太原理工大学学报), 2011, 6:598-602.
- 12 Yang XY(阳小宇), Chen ZL(陈志良), Hao ZB(郝再彬). Purification of stevioside ST and RA by macroporous resin. *Guihaia* (广西植物), 2014, 34:525-529.
- 13 Wang D(王丹), Ma P(马萍), Liu LH(刘丽宏), et al. Purification process of asperosaponin VI from *dipsacus asper* wall with macroporous resin. *Pharm Care Res* (药学服务与研究), 2013, 13:369-372.
- 14 Wang CQ(王聪庆), Chen J(陈娟). Purification of salidroside in *Rhodiola crenulata* with macroporous resin. *J Chin Med Mater* (中药材), 2011, 12:1936-1939.
- 15 Cong MM(丛毛勉), Sheng FB(盛方标), Fan LY(范鲁雁). The application of macroporous adsorption resin in the purification of the traditional Chinese medicine compound. *J Anhui Med Pharm* (安徽医药), 2009, 13:1411-1414.
- 16 Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioural despair in mice: A primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 1997, 229:327-336.
- 17 Steru L, Chermat R, Thierry B, et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychoph (Berl)*, 1985, 85:367-670.