

大鲵皮肤粘液多糖的提取及单糖组成分析

陈德经^{1*},徐伟良²,苏文²,季晓晖³

¹陕西理工学院陕西省资源生物重点实验室;

²陕西理工学院生物科学与工程学院;³陕西理工学院化学与环境科学学院,汉中 723001

摘要:本文对大鲵皮肤粘液多糖的提取和单糖组分进行了研究。采用水提取、碱提取、酸提取及酶提取法从大鲵皮肤粘液提取粗多糖,通过1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)柱前衍生高效液相色谱法分析大鲵粘液多糖的单糖组分。结果表明:碱提取、酸提取、水提取、碱性蛋白酶及酸性蛋白酶提取物的总糖含量分别为4.23%、1.54%、1.81%、3.71%、2.19%;碱提取物的单糖组分为甘露糖(Man)、葡萄糖醛酸(GlcUA)、半乳糖醛酸(GalUA)、氨基葡萄糖(GlcN)、葡萄糖(Glc)、半乳糖(Gal);酸提取物的单糖组分为Man、GlcUA;水提取物的单糖组分为Man、GlcUA、Gal;碱性蛋白酶提取物的单糖组分为Man、GlcUA、GlcN;酸性蛋白酶提取物的单糖组分为Man、GlcUA、Glc,表明不同提取工艺得到的粘液多糖的单糖组成存在差异。本文为大鲵皮肤粘液多糖的开发利用提供了依据。

关键词:大鲵;粘液;多糖;提取;柱前衍生;HPLC

中图分类号:R96;S917.4

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.10.003

Extraction and Monosaccharide Composition of *Andrias davidianus* skin mucus polysaccharide

CHEN De-jing^{1*}, XU Wei-liang², SU Wen², JI Xiao-hui³

¹Provincial Bio-resource key Laboratory, Shaanxi University of Technology; ²The

School of Biological Science & Engineering, Shaanxi University of Technology; ³Chemistry and

Environmental Science, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723001, China

Abstract: In this study, the extraction and monosaccharide composition of polysaccharides from skin mucous of *Andrias davidianus* were studied. Using water extraction, alkali extraction, acid extraction and enzyme extraction, crude polysaccharides were extracted from skin mucous of *A. davidianus*. The components of polysaccharides were determined by 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) pre-column derivatization-HPLC method. Results showed that carbohydrate content of alkali extract, acid extract, water extract, alkaline protease extract and acid protease extract was 4.23%, 4.23%, 1.81%, 3.71%, 2.19% respectively. The monosaccharide composition of alkali extract was mannose (Man), glucuronic acid (GlcUA), galacturonic acid (GalUA), glucosamine (GlcN), glucose (Glc) and galactose (Gal); the monosaccharide composition of acid extract was Man, GlcUA; water extract was Man, GlcUA and Glc; the monosaccharide composition of alkaline protease extract was Man, GlcUA and GlcN; acid protease extract was Man, GlcUA and Glc. This study provided basis for the development and utilization of *A. davidianus* skin mucus polysaccharides.

Key words: *Andrias davidianus*; mucus; polysaccharide; extract; pre-column derivatization; HPLC

多糖(Polysaccharides)又称多聚糖,是自然界中含量最丰富的一种生物聚合物^[1],而从动物中提取的天然多糖因具有良好的抗氧化、免疫调节和抗肿瘤等作用受到国内外学者的关注,使得对动物多糖

的研究日益增多和深入^[2,3]。

大鲵(*Andrias davidianus* Blanchard)属大型两栖纲、有尾目、隐鳃鲵科,是国家二级保护动物,有活化石之称^[4]。大鲵皮肤腺体主要有粘液腺(mucus gland)和颗粒腺(granular gland)两种,粘液腺体细胞可释放粘糖蛋白,与水结合后成为黏液,覆盖在上皮游离面,形成了一道天然的防护屏障^[5,6]。有学者从大鲵体表黏液获得了大鲵低聚糖肽,并证明了

收稿日期:2014-12-22 接受日期:2015-09-02

基金项目:陕西省中小企业科技创新项目(2014CXZJ36);陕西理工学院研究生创新基金(SLGYCX1311)

*通讯作者 E-mail:cdjsg@126.com

该糖肽具有抗氧化、抗疲劳及对小鼠急性肝损伤有一定的保护作用^[7-9]。大鲵皮肤颗粒腺能够分泌具有特殊性气味的白色粘稠状粘液,其成分是含有丰富的功能复杂多样的生物活性分子,具有广谱抗菌、抗肿瘤等作用^[10,11]。

本论文采用水提法、酶解法、碱提法及酸提法对大鲵皮肤粘液中的多糖进行提取,并采用柱前衍生高效液相色谱法对大鲵皮肤粘液多糖的单糖组分进行分析,为大鲵皮肤粘液多糖开发利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

成熟大鲵,陕西汉源生物科技有限公司提供;衍生化试剂:1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)购自上海涛宇国际贸易有限公司;葡萄糖(Glc)、甘露糖(Man)、半乳糖(Gal)、葡萄糖醛酸(GlcUA)、半乳糖醛酸(GalUA)、N-乙酰氨基葡萄糖(GlcN)均为中检所产品;D-氨基半乳糖(GalN),购自大连美仑生物技术有限公司;碱性蛋白酶、酸性蛋白酶,购自宁夏和氏璧生物技术有限公司;三氟乙酸($\geq 99\%$),乙腈(色谱纯),其它试剂均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备

Agilent1200 高效液相色谱(包括 G1311A 四元泵, G1315B DAD 检测器, G1316A 柱温箱); XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm, 美国 Agilent 公司); 722G 可见分光光度计(上海仪电分析仪器有限公司); LC-800 低速离心机(科大创新股份有限公司); KQ-100DA 型数控超声清洗器(苏州江东精密仪器有限公司); 601 超级水浴(江苏-瑞华仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鲵皮肤粘液的采集

采用机械刺激法。用软毛刷轻轻拍打或按摩大鲵背部、尾部等皮肤分泌腺较多部位,对其进行温和刺激,使大鲵分泌产生白色粘液,并刮取粘液装入收集瓶中。将采集的大鲵粘液真空冷冻干燥成冻干粉,于-20℃下保存待用。

1.2.2 大鲵皮肤粘液多糖的提取及分离

1.2.2.1 碱提法

多糖在碱性溶液中稳定,而蛋白聚糖中的糖肽键对碱具有不稳定性,因此可通过该法使多糖与结

合态蛋白的糖肽键断裂,从而提高多糖得率。准确称量 5 g 大鲵皮肤粘液冻干粉,以 0.4 mol/L 氢氧化钠溶液在料液比为 1:25 g/mL,温度为 45℃下,提取 2 h^[12];将提取液以 4000 rpm,离心 15 min,上清液加入无水乙醇醇沉至终浓度为 76%,调 pH 至 7.0 左右,于 4℃冰箱中静置 8 h;离心去除上清液,沉淀用无水乙醇洗涤三次后进行真空干燥。

1.2.2.2 酸提法

基于醛酸性多糖对酸具有不稳定性,酸提取有助于多糖与结合态蛋白的醛酸键断裂,从而提高多糖得率及纯度。准确称量 5 g 大鲵皮肤粘液冻干粉,以料液比 1:25 g/mL,浓度为 0.3 mol/L 盐酸,在 45℃,提取 2 h^[13,14]。将提取液以碱提法同样步骤进行离心、醇沉、干燥。

1.2.2.3 水提法

多糖是极性大分子化合物,大多数多糖易溶于热水,用水提取较温和,适用于透明质酸等不含硫酸基多糖的提取。准确称量 5 g 大鲵皮肤粘液冻干粉,在料液比 1:25 g/mL,提取温度 45℃条件下,提取 2 h^[15]。将提取液以碱提法同样步骤进行离心、醇沉。

1.2.2.4 酶解法

选用来源广泛且专一性低的碱性蛋白酶和酸性蛋白酶为试验用酶,蛋白酶易使糖蛋白和蛋白聚糖中游离的蛋白质水解,降低它们对原料的结合力,有利于多糖的浸出。准确称量 5 g 大鲵皮肤粘液冻干粉 2 份,在料液比 1:25 g/mL,酶解温度 45℃,酶添加量均为 2.5% 的条件下,分别加入 pH 值为 9.0 的碱性蛋白酶和 pH 值 3.0 的酸性蛋白酶,对样品进行酶解 2h^[16]。将提取液以碱提法同样步骤进行离心、醇沉。

1.2.3 Sevage 法脱蛋白

将氯仿与正丁醇按体积比 4:1 混合制成 Sevage 除蛋白液,按不同提取方法所得大鲵粘液多糖溶液按体积的 1/4 加入除蛋白液,混合后,剧烈振荡 10 min,静置;离心去除变性蛋白,重复数次,至无变性蛋白质析出为止。再经 MW 3500 Da 透析袋透析去除小分子杂质,浓缩,真空冷冻干燥,得大鲵粘液粗多糖,并利用公式(1)计算得率。

$$\text{粗多糖得率}\% = \frac{\text{粗多糖质量}}{\text{粘液干粉质量}} \times 100\% \quad (1)$$

1.2.4 大鲵皮肤粘液多糖含量的测定——硫酸蒽酮法^[17]

1.2.4.1 标准曲线的制作

准确称取 0.1 g 葡萄糖,用双蒸水定容至 100 mL,分别取出 0.5、1、2、3、4、5 mL 分别加入到 50 的容量瓶中,并用双蒸水定容至 50 mL,配成浓度分别为 10、20、40、60、80、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,以双蒸水做对照空白,各取 1 mL 于试管中,再加入 4 mL 蒽酮试剂(2 g/L),迅速浸入冰水中冷却,待几只试管均匀加完后,一起浸入 100 $^{\circ}\text{C}$ 沸水中。自温度重新升至 100 $^{\circ}\text{C}$ 起计时,准确保温 10 min 后取出,用流动水冷却。在分光光度计上,进行光谱扫描,检测在波长 620 nm 有最大吸收峰,并选择 620 nm 检测波长,进行比色,并绘制标准曲线。

1.2.4.2 样品的测定

称取 0.1 g 大鲵脱蛋白多糖干燥粉,用去离子水定容至 10 mL 容量瓶中,超声震荡 30 min,以 4000 rpm,离心 10 min,取 1 mL 上清液定容至 10 mL 容量瓶中待用。如上述条件一致,取 1 mL 粗多糖样品进行比色,依据标准曲线计算粗多糖浓度,并以公式(2)计算多糖含量。

$$\text{多糖含量}(\%) = (\text{样品浓度} \times \text{稀释倍数} \times \text{样品体积}) / \text{多糖试样称重量} \times 100\% \quad (2)$$

1.2.5 HPLC 测定大鲵皮肤粘液多糖的单糖组成成分^[18,19]

1.2.5.1 大鲵皮肤粘液多糖的水解及样品制备

吸取 100 μL 质量浓度为 4~5 g/L 的精制多糖样品溶液于 5 mL 的具塞刻度试管中,加入 100 μL 的 4 mol/L TFA,充 N_2 封管,110 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中水解 2 h;冷却后打开盖,加 100 μL 甲醇后用 N_2 吹干,如此

重复加甲醇并用 N_2 吹 3 次,去除 TFA。

加入 50 μL 0.3 mol/L NaOH 溶液充分溶解残渣,再加 50 μL 0.5 mol/L 的 PMP(0.4355 g/5mL) 甲醇溶液,漩涡混匀,同样在 70 $^{\circ}\text{C}$ 的烘箱中反应 100 min,取出放置 10 min 冷却至室温;加 50 μL 0.3 mol/L 的 HCL 中和;加水至 1 mL,再加等体积的氯仿,振摇,静置,弃去氯仿相,如此萃取 3 次。将水相用 0.45 μm 微孔膜过滤后供 HPLC 进样分析。

1.2.5.2 混合单糖标样的衍生

分别取 100 μL 的混合单糖标准液(各单糖质量浓度均为 0.36 g/L)与 100 μL 的 0.6 mol/L NaOH 溶液,置于 1 mL 的具塞试管中混合均匀;再取 50 μL 的混合液于 5 mL 的具塞试管中,加 50 μL 0.5 mol/L 的 PMP 甲醇溶液,漩涡混匀;在 70 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中反应 100 min;冷却后按“1.2.5.1”同法中和、萃取,并用微孔膜过滤。

1.2.5.3 色谱条件

色谱柱:ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ (250mm \times 4.6 mm, 5 μm);流动相:0.05 mol/L 磷酸盐(pH 6.9)缓冲液-乙腈(83:17, V/V);柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;检测波长:250 nm;流速:1 mL/min;进样体积:10 μL 。

2 结果与讨论

2.1 大鲵皮肤粘液多糖得率及含量

不同提取方法所得多糖得率与脱蛋白后所测多糖含量结果如表 1 所示。

表 1 大鲵皮肤粘液多糖的得率及总糖含量

Table 1 The polysaccharides yield and total sugar content in skin mucus of *A. davidianus*

多糖的得率及总糖含量 Yield and total sugar content of polysaccharides	碱提取 Alkaline extraction	酸提取 Acid extraction	水提取 Water extraction	碱酶提取 Alkali enzyme extraction	酸酶提取 Acid enzyme extraction
多糖得率 Polysaccharide yield (%)	3.85	1.40	1.76	3.09	2.94
总糖含量 Total sugar content (%)	4.23	1.81	1.54	3.71	2.19

由 1 表可知,碱提取多糖的得率最高,为 3.85%;碱酶提取多糖得率次之,为 3.09%;水提取和酸提取多糖的得率较低,分别为 1.76%、1.40%。碱提取、酸提取、水提取、碱酶提取和酸酶提取多糖中总糖含量分别为 4.23%、1.54%、1.81%、3.71%、2.19%。

2.2 大鲵皮肤粘液多糖的单糖组成测定

2.2.1 色谱分离条件的优化

选择磷酸盐缓冲液-乙腈为流动相对 PMP-单糖衍生物进行色谱分离,据文献报道有梯度洗脱和等度洗脱两种方式^[20-22]。先采用梯度洗脱模式:以溶剂 A-15% (V/V) 乙腈 + 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH=6.0),溶剂 B-40% (V/V) 乙腈 + 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH=6.0)作为流动相;时间梯度为 0 min \rightarrow 9 min \rightarrow 25 min,相应浓度体梯度为 0% \rightarrow

10% → 55% B, 进行色谱分离。再采用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 6.7) - 乙腈为流动相, 进行等度洗脱分离。结果显示: 梯度洗脱分离的 7 种单糖峰形效果并不理想, 2 种糖醛酸和 2 种氨基单糖不能很好的分离。而利用等度洗脱, 通过对分离条件选择的系列试验 (包括缓冲液 pH 值, 乙腈体积分数及缓冲液浓度的选择), 能够对 7 种单糖得到较好的分离, 且重现性好, 如图 1。并最终确定最佳色谱条件

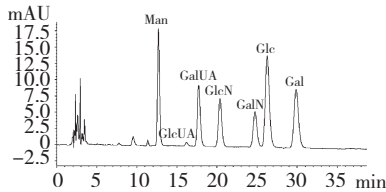


图 1 混合单糖的 PMP 衍生化产物的色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograph of PMP-labeled standard monosaccharides

为: 流动相: A-0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 6.9) + B-乙腈, 体积比为 A: B = 83: 17 (V/V)。

2.2.2 衍生化产物稳定性的考察

为了考察 7 种单糖标样衍生化产物的稳定性, 实验中从反应结束后开始计时, 分别于 6、8、10、12、16、20、24、32 h 进行色谱分析。实验结果表明, 在反应结束后 12 h 内各种单糖衍生物的峰面积基本保持不变, 20 h 以后, 各峰面积有不同程度的减少, 32 h 后单糖峰面积减少近 30% 左右。因此, 检测需要在反应结束后 20 h 内完成, 以得到准确的实验结果。

2.2.3 标准曲线及检出限

将 7 种单糖配制成一系列不同浓度的混合标样, 分别进行衍生化, 并在相同条件下进样检测, 以单糖浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 结果表明各单糖在 0.1 ~ 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 范围内呈良好的线性关系, 结果见表 2。

表 2 7 种单糖的线性回归方程、相关系数及线性范围

Table 2 Regression equations, correlation coefficients and linear ranges of seven monosaccharides

单糖 Sugar	保留时间 Retention time (min)	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient R^2	线性范围 Linear range c/($\mu\text{mol/L}$)	检出限 Detection limit n/(nmol/L)
Man	12.671	$y = 1190.1x + 5.3736$	0.9996	0.10 ~ 1.98	1.78
GlcUA	16.159	$y = 272.79x - 15.001$	0.9982	0.10 ~ 1.85	11.1
GalUA	17.693	$y = 160.4x + 6.8397$	0.9991	0.10 ~ 1.69	3.50
GlcN	20.347	$y = 643.22x - 26.602$	0.9971	0.10 ~ 1.63	7.14
GalN	24.718	$y = 542.34x - 27.234$	0.9984	0.10 ~ 1.67	6.85
Glc	26.243	$y = 907.4x + 8.9796$	0.9993	0.10 ~ 1.98	1.75
Gal	29.848	$y = 472.83x - 21.783$	0.9989	0.10 ~ 1.98	10.5

表 3 不同提取方法所得多糖的单糖组分及摩尔比

Table 3 monosaccharide composition and molar ratio under different extraction methods

单糖的组分及摩尔比 Monosaccharide components and mole ratio	单糖组分 monosaccharide components	各组分摩尔比 Molar ratio of components
碱提取 Alkaline extraction	Man, GlcUA, GalUA, GlcN, Glc, Gal	1.71: 4.12: 1.09: 1.55: 1.01: 2.09
酸提取 Acid-extraction	Man, GlcUA	0.101: 2.31
水提取 Water extraction	Man, GlcUA, Glc	0.01: 1.68: 0.11
碱酶提取 Alkali enzyme extraction	Man, GlcUA, GlcN	0.102: 8.79: 6.02
酸酶提取 Acid enzyme extraction	Man, GlcUA, Glc	0.11: 2.64: 1.23

2.2.4 不同提取方法所得多糖的单糖组成分析结果

经 PMP 柱前衍生测得不同提取方法所得多糖

的单糖组成及摩尔比如下, 碱提取, Man: GlcUA: GalUA: GlcN: Glc: Gal = 1.71: 4.12: 1.09: 1.55: 1.01: 2.09, 如图 2-a; 酸提取, Man: GlcUA = 0.101: 2.31,

如图 2-b;水提取,Man:GlcUA:Glc = 0.01:1.68:0.11,如图 2-c;碱酶提取,Man:GlcUA:GlcN = 0.102:8.79:6.02,如图 2-d;酸酶提取,Man:GlcUA:Glc = 0.11:2.64:1.23,如图 2-e。通过上述测定结果显示,碱提取多糖中含有 6 种单糖组分,而酸提取多糖中仅含有 2 种单糖组分,这是由于在碱性条件下,多

糖稳定,易使多糖与结合态蛋白的糖肽键断裂,利于多糖的浸出,而在酸性条件下容易引起多糖中糖苷键的断裂,使多糖结构破坏。水提法和酶解法条件较温和,适用于酸性粘多糖的提取,所得多糖主要由 Man、GlcUA 和 Glc 3 种单糖组成^[23,24]。

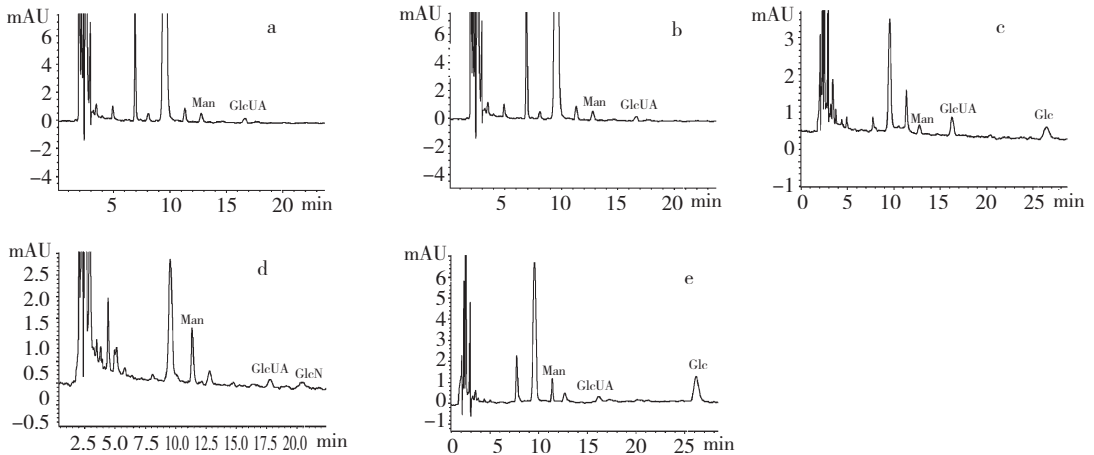


图 2 不同提取方法所得多糖的-PMP 衍生化产物的色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of PMP derivative products from different polysaccharide extracts

注:a-碱提取;b-酸提取;c-水提取;d-碱酶提取;e-酸酶提取

Note:a- Alkaline extraction;b: Acid extraction;c: Water extraction;d: Alkali enzyme extraction;e: Acid enzyme extraction

3 结论

本文研究了不同提取方法提取大鲵粘液多糖,其中碱提取大鲵粘液多糖的得率和含量均较高,适用于大鲵多糖的提取分离。建立的 PMP 柱前衍生化高效液相色谱分析单糖的方法准确可靠,灵敏度较高,能够较好地测定大鲵皮肤粘液多糖的单糖组分。PMP 柱前衍生测得结果表明,不同提取方法所得大鲵粘液多糖的单糖组成成分及含量尽管各不相同,但主要由甘露糖、葡萄糖醛酸、葡萄糖 3 种单糖成分组成。该方法对动物多糖样品的组成分析具有一定指导意义,亦为大鲵皮肤粘液多糖的开发利用提供了依据。

参考文献

- Liu CH, Lin QX, Gao Y, et al. Characterization and antitumor activity of a polysaccharide from *Strongylocentrotus nudus* eggs. *Carbohydr Polymers*, 2007, 67: 313-318.
- Liu XJ (刘兴杰), Liu CL (刘传琳), Ren H (任虹), et al. Comparison of alkaline extraction of glycosaminoglycans from four marine invertebrates. *J Yantai Univ* (烟台大学学报), 2001, 14: 264-268.

- Wang SB, Cheng YN, Wang FS, et al. Inhibition activity of sulfated polysaccharide of *Sepiella maindroni* ink on matrix metalloproteinase (MMP)-2. *Biomed Pharm*, 2008, 62: 297-302.
- Hou JH (侯进慧), Zhu BC (朱必才), Tong YW (童玉玮), et al. Research advances of Chinese giant salamander. *Sichuan J Zool* (四川动物), 2004, 23: 262-266.
- Liu JY (刘炯宇), Jiang JP (江建平), Xie F (谢锋), et al. Structure and antimicrobial peptides of amphibian skin. *Chin J Zool* (动物学杂志), 2004, 39: 112-116.
- Huang ZH (黄智慧), Ma AJ (马爱军), Wang M (汪岷). Research progression in secretion of fish skin mucous and its function. *Marine Sci* (海洋科学), 2009, 33: 90-94.
- Qu M (曲敏). Preparation, properties, bioactivities and applications of giant salamander glycopeptides. Shenyang: Shenyang Agricultural University (沈阳农业大学), PhD. 2012.
- Li W (李伟), Yu XY (于新莹), Tong CQ (佟长青), et al. Study on the enzymatic hydrolysates of skin mucous from *Andrias davidianus* and its anti-fatigue effect. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2011, 32: 146-148.
- Qu M (曲敏), Tian LR (田冉冉), Tong CQ (佟长青), et al. Hepatoprotective effects of giant salamander glycopeptides against carbon tetrachloride (CCl₄)-induced hepatic in-

- jury in mice. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2013, 34:350-352.
- 10 Guo WT(郭文韬). Study on genetic diversity and skin adjunct's characteristics of Chinese giant salamander. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology(华中科技大学), PhD. 2013.
- 11 Wang LF(王利锋), Li XY(李学英), Wang DZ(王大忠). Characterization and bioactivity of antimicrobial peptides from the skin secretions of the *Andrias davidianus*. *Chin J Biochem Pharm*(中国生化药物杂志), 2011, 32:269-272.
- 12 Xiang D(向东), Lai F(赖凤), Ying LP(英梁平). Alkaline extraction of pumpkin polysaccharide. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2004, 25:120-122.
- 13 Zhang ZC(张志才), Liu GQ(刘高强), Zhang KC(章克昌), et al. Study on extraction of the polysaccharides from mycelium of *Tremella aurantialba* by NaOH hydrolysis and ultrafiltration. *Food Sci*(食品科学), 2005, 26:145-148.
- 14 Ju XR(鞠兴荣), Shui D(税丹), He R(何荣), et al. Study on the optimization of the extraction technology of polysaccharides from rapeseed meal by acid using response surface method. *J Chin Cereals Oils Assoc* (中国粮油学报), 2012, 27(3):90-93.
- 15 Yin HG(殷涌光), Han YZ(韩玉珠), Ding HW(丁宏伟). Review on advancement of animal polysaccharides. *Food Sci* (食品科学), 2006, 27:256-263.
- 16 Zhao XU(赵小旭). Extraction, purification, structural analysis and antioxidant activity of polysaccharide from *Rana Dybowskii* skin. Heilongjiang: Northeast Forestry University(东北林业大学), PhD. 2012.
- 17 Zhang J, Li JY, Li JP, et al. Determination of polysaccharide in rhizoma of *Panax japonicus* by anthrone sulfuric acid method and phenol sulfuric method. *Central South Pharm*(中南药学), 2012, 10:412-423.
- 18 Dai J(戴军), Zhu S(朱松), Tang J(汤坚), et al. Analysis of monosaccharide compositions in polysaccharides from D1Salina by pre-column derivatization high performance liquid chromatography. *J Instru Anal* (分析测试学报), 2007, 26:206-210.
- 19 Zhang JJ, Zhang QB, Wang J, et al. Analysis of the monosaccharide composition of fucoidan by precolumn derivation HPLC. *Chin J Oceanol Limnol*, 2009, 27:578-582.
- 20 Yang XB(杨兴斌), Zhao Y(赵燕), Zhou SY(周四元), et al. Analysis of monosaccharide composition in *Angelica* polysaccharides by pre-column derivatization high performance liquid chromatography. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2005, 33:1287-1290.
- 21 Wang ZW(王泽文), Leng KL(冷凯良), Sun WH(孙伟红), et al. Analysis of monosaccharides and uronic acids in fucoidon from seaweed by pre-column derivatization high performance liquid chromatography. *J Anal Sci* (分析科学学报), 2011, 27:26-30.
- 22 Li HL, Long CN, Zhou J. Rapid analysis of mono-saccharides and oligo-saccharides in hydrolysates of lignocellulosic biomass by HPLC. *Biotechnol Lett*, 2013, 35:1405-1409.
- 23 Xu CL(徐翠莲), Du LR(杜林洳), Fan SF(樊素芳), et al. Progress of polysaccharides extraction, purification and identification methods. *Henan Sci* (河南科学), 2009, 27:1524-1529.
- 24 Zhao JF(赵纪峰), Wang HJ(王海军), Su J(苏晶), et al. Traditional Chinese medicine polysaccharide extraction and separation technology was studied. *Chongqing Chin Med Res* (重庆中草药研究), 2007, 1:29-32.

(上接第 1696 页)

- 11 Wu XA, Zhao YM, Yu NJ, et al. A novel analgesic pyrazine derivative from the leaves of *Croton tiglium* L. *J Asian Nat Prod Res*, 2007, 9:437-441.
- 12 Huang ZY(黄志云), Tang JS(唐金山), Gao H(高昊), et al. Studies on the cytotoxic constituents from marine actinomycete *Micromonospora* sp. (M2DG17). *Chin J Marine Drugs* (中国海洋药物杂志), 2011, 30:29-33.
- 13 Xie LR(谢磊睿), Li DY(李丹毅), Wang PL(王培乐), et al. A new 3,4-seco-lanostane triterpenoid from a marine-derived fungus *Ascotricha* sp. ZJ-M-5. *Acta Pharm Sin* (药科学学报), 2013, 48:89-93.
- 14 Du SS(杜树山), Lei N(雷宁), Xu YC(徐艳春), et al. Study on flavonoids of *Arisaema erubescens*. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2005, 40:1457-1459.
- 15 Oh HM, Kwon BM, Baek NI, et al. Inhibitory activity of 6-O-angeloylprenolin from *Centipeda minima* on farnesyl protein transferase. *Arch Pharm Res*, 2006, 29:64-66.
- 16 Das B, Takhi M, Srinivas KVNS, et al. A lignan from needles of himalayan *Taxus baccata*. *Phytochemistry*, 1994, 36:1031-1033.