

滇重楼茎叶总皂苷提取工艺优化及其体外抗氧化活性分析

韦 蒙,许新恒,李俊龙,申世安,刘 静,丁春邦*

四川农业大学生命科学学院,雅安 625014

摘要:以滇重楼茎叶为试验材料,采用响应面法优化超声波辅助提取滇重楼茎叶总皂苷的工艺,并分析总皂苷的体外抗氧化活性。在单因素试验的基础上,利用 Box-Benhnken 设计四因素五水平响应面试验,确定最佳提取工艺条件为料液比 1:12 (g/mL)、提取温度 54 °C、超声功率 210 W、提取时间 2 h,滇重楼茎叶总皂苷实际平均得率为 2.360%,预测得率为 2.385%,相对误差为 1.04%。滇重楼茎叶总皂苷对 DPPH 自由基、羟自由基和超氧阴离子的最大清除率分别为 98%、58% 和 64%,其 IC₅₀ 分别为 2.223、6.782 mg/mL 和 4.638 mg/mL。

关键词:滇重楼茎叶;总皂苷;响应面法;超声波辅助提取;抗氧化

中图分类号:TS201.1

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.10.020

Extraction and Antioxidant Activity of Total Saponins from Stems and Leaves of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* (Franch.) Hand.-Mazz.

WEI Meng, XU Xin-heng, LI Jun-long, SHEN Shi-an, LIU Jing, DING Chun-bang*

College of Life Sciences, Sichuan Agricultural University, Sichuan Ya'an 625014, China

Abstract: Response surface methodology (RSM) was used to optimize the ultrasonic-assisted extraction process of total saponins from stems and leaves of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* (Franch.) Hand.-Mazz. Furthermore, the antioxidant activity of the total saponins was analyzed *in vitro*. Based on single-factor tests, a five-level four-factor response surface test was developed by Box-Benhnken design. The optimal extraction conditions were determined to be the solid-liquid ratio of 1:12 (g/mL), extraction temperature of 54 °C, ultrasonic power of 210 W, and extraction time of 2 h. Under these conditions, the extraction yield was 2.360%, while the predicted extraction yield was 2.385%, with relative error of 1.04%. The maximum inhibition rates of DPPH, hydroxyl radical and superoxide anion of the total saponins were 98%, 58% and 64%, respectively. The IC₅₀ values of those antioxidant activities were 2.223 mg/mL, 6.782 mg/mL and 4.638 mg/mL, respectively.

Key words: stems and leaves of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* (Franch.) Hand.-Mazz.; total saponins; response surface method; ultrasonic-assisted extraction; antioxidant

滇重楼 [*Paris polyphylla* var. *yunnanensis* (Franch.) Hand.-Mazz.] 是 2010 年版《中国药典》收载的中药材重楼的基原植物之一,为延龄草科 (Trilliaceae) 重楼属 (*Paris*) 多年生草本植物,以干燥根茎入药^[1]。中医认为重楼具有清热解毒、消肿止痛、凉肝定惊之功效,主要用于止血、免疫调节、抗肿瘤、抗炎、抗菌抑菌、镇静镇痛等,已广泛应用于临床^[2,3]。重楼的药用部位为根茎,主要活性成分为甾体皂苷、黄酮类和多糖类^[4]。

滇重楼根茎生长缓慢,从种子发芽到生长成药

用商品,一般需要 10~15 年。每年秋末 10~11 月,地上茎叶部分会枯萎倒下并被丢弃,其生物质的总产量要远高于地下部分。据文献报道,滇重楼茎叶含有与根茎相近的皂苷成分。因此,对滇重楼的地上茎叶部分进行开发利用,将大幅提高滇重楼的综合利用率,在一定程度上也可缓解重楼药材的供需矛盾,增加药农收入,推动滇重楼人工种植的发展^[5,6]。

目前植物皂苷的提取方法主要有溶剂提取法、生物酶解提取法、微波辅助提取法和超声波辅助提取法等^[7-10],其中,超声波辅助提取法是利用超声波能提高有效成分提取率的一种技术,具有低消耗、高效率、操作简便和节约时间的优点,已广泛应用于天然产物中有效成分的提取^[11,12]。因此,本实验利用

收稿日期:2015-02-09 接受日期:2015-05-26

基金项目:国家大学生创新实验计划(201410626009)

* 通讯作者 E-mail:decb@sicau.edu.cn

响应面法(response surface methodology, RSM)优化滇重楼茎叶中总皂苷的超声波辅助提取工艺,并分析所得总皂苷的抗氧化活性,为滇重楼茎叶的有效利用和开发提供理论依据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

滇重楼茎叶,2013年10月采自云南省文山州重楼种植基地,经四川农业大学丁春邦教授鉴定为滇重楼[*Paris polyphylla* var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. - Mazz.]。晾干后粉碎常温保存。

石油醚(60~90℃)、甲醇、2,2-二苯基-1-苦味基肼(DPPH)、薯蓣皂苷元标准品、丙酮、水杨酸、邻苯三酚、盐酸、硫酸亚铁等。所有试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

SHB-D(Ⅲ)型循环水式真空泵(巩义市予化仪器厂),UV-1750型紫外分光光度计(Shimadzu,日本),FA2004B型电子天平(上海精天电子仪器有限公司),UPT-T-101型超纯水器(成都超纯水科技有限公司),DZTW型调温热套、FW135型高速万能粉碎机以及DZKW-S-6型电热恒温水浴锅(北京永光明医疗仪器厂),RE-2000B型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),7D-4Z型台式低速离心机(蜀科仪器有限公司),KQ-300DV型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 滇重楼茎叶总皂苷的提取工艺流程

晾干的滇重楼茎叶经粉碎过筛,依次用石油醚和丙酮除去色素。称取样品粉末10.0g,置于锥形瓶中,超声辅助提取一定时间。提取液离心取上清液,检测总皂苷含量。提取液浓缩蒸发得到总皂苷

浸膏。所得浸膏经大孔树脂分离纯化后真空干燥,得到总皂苷样品。

1.3.2 滇重楼茎叶总皂苷含量的测定

参考王俊等的方法^[13]。取滇重楼茎叶总皂苷提取液0.5mL,挥干溶剂,加入5%的冰醋酸-香草醛溶液0.2mL,高氯酸0.8mL。摇匀后30℃条件下反应30min,加入冰醋酸5mL终止反应。410nm处测定吸光度。以薯蓣皂苷作标准品,标准曲线为 $Y=7.2901X+0.054$, $R^2=0.9954$,表明在0~0.5mg/mL范围内线性关系良好。

总皂苷得率(%) = 样品液中总皂苷浓度 × 样品液体积 / 滇重楼茎叶粉末质量 × 100%

1.3.3 单因素试验

以滇重楼茎叶中总皂苷得率为指标,研究料液比(1:5、1:10、1:15、1:20、1:25g/mL,固定提取温度55℃,超声功率210W,提取时间1.5h)、提取温度(40、45、50、55、60℃,固定料液比1:15,超声功率210W,提取时间1.5h)、提取时间(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5h,固定料液比1:15,提取温度55℃,超声功率210W)、超声功率(150、180、210、240、270W,固定料液比1:15,提取温度55℃,提取时间1.5h)对总皂苷得率的影响。试验3次重复。

1.3.4 响应面法优化试验设计

在单因素试验结果的基础上,根据Box-Behnken设计原理,选择超声功率(A)、提取温度(B)、提取时间(C)和料液比(D)4个因素为自变量,以滇重楼茎叶总皂苷得率为响应值(R),设计四因素五水平响应面试验(表1),预测滇重楼茎叶总皂苷超声辅助提取的最佳工艺。

表1 响应面分析因素及水平表

Table 1 Factors and levels of response surface experiment

水平 Level	因素 Factors			
	A 功率 Ultrasonic power (W)	B 温度 Temperature (°C)	C 提取时间 Extraction time (h)	D 料液比 Solid-liquid ratio (g/mL)
-2	150	40	0.5	1:5
-1	180	45	1.0	1:10
0	210	50	1.5	1:15
1	240	55	2.0	1:20
2	270	60	2.5	1:25

1.3.5 滇重楼茎叶总皂苷的抗氧化活性测定

1.3.5.1 DPPH 自由基清除能力的测定

参考 Liu 等^[14]的实验方法,适当改进。用乙醇配制 0.2 mmol/L 的 DPPH 溶液,用甲醇配制一系列梯度的总皂苷溶液。向具塞试管中加入 2 mL DPPH 和 2 mL 不同浓度的总皂苷溶液,混匀,黑暗条件下常温反应 30 min,517 nm 测定吸光值。试验 3 次重复。

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = [1 - A_1/A_0] \times 100\%$$

式中, A_1 为加入样品的反应液吸光值, A_0 为用甲醇代替样品的反应液吸光值。

1.3.5.2 羟自由基清除能力的测定

参考 Saeed 的实验方法^[15],适当改进。向具塞试管内按顺序加入 9 mmol/L FeSO_4 1 mL, 9 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液 2 mL, 加入总皂苷溶液 2 mL, 最后加入 8.8 mmol/L H_2O_2 2 mL 启动反应, 37 °C 下反应 0.5 h, 510 nm 测定吸光值。试验 3 次重复。

$$\text{羟自由基清除率}(\%) = [1 - A_1/A_0] \times 100\%$$

式中, A_1 为加入样品的反应液吸光值, A_0 为用甲醇代替样品的反应液吸光值。

1.3.5.3 超氧阴离子清除能力的测定

参考 Chen 等^[16]的实验方法,适当改进。向具塞试管内加 0.05 mol/L pH 8.2 Tris-HCl 缓冲液 5 mL, 在 25 °C 条件下预热 5 min, 加 1 mL 总皂苷溶液, 25 °C 反应 20 min 后, 加入 0.4 mL 3 mmol/L 的邻苯三酚, 混匀, 25 °C 反应 5 min, 用 0.5 mL 的浓盐酸终止反应, 299 nm 测定吸光值。试验 3 次重复。

$$\text{超氧阴离子清除率}(\%) = [1 - A_0/A_1] \times 100\%$$

式中, A_1 为加入样品的反应液吸光值, A_0 为用 Tris-HCl 缓冲液代替样品的反应液吸光值。

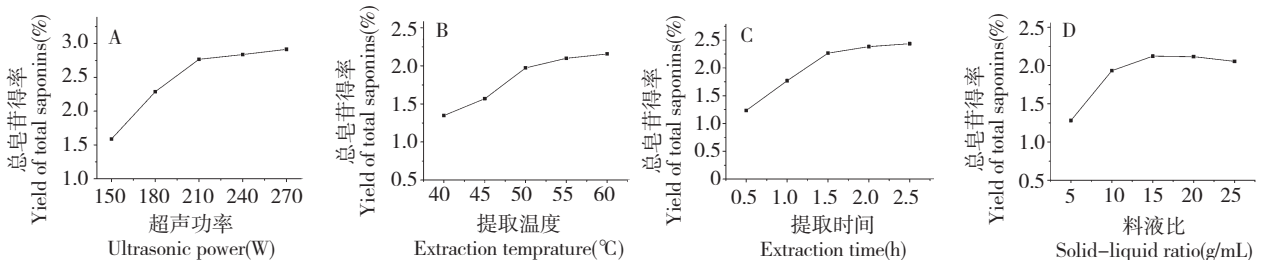


图 1 超声功率 (A)、提取温度 (B)、提取时间 (C) 和料液比 (D) 对滇重楼茎叶总皂苷得率的影响

Fig. 1 Effects of ultrasonic power (A), extraction temperature (B), extraction time (C), solid-liquid ratio (D) on the extraction yield of total saponins

2.2 响应面法优化滇重楼茎叶总皂苷的提取工艺

2.2.1 响应面试验设计及结果

利用 Design-Expert 7.0 软件对表 2 中的试验结

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果与分析

2.1.1 超声功率对滇重楼茎叶总皂苷得率的影响

如图 1A 所示,总皂苷得率随超声功率增加而增加,当功率达 240 W 时,总皂苷得率为 2.84%,表明超声功率 240 W 时,原料中总皂苷已基本萃取到溶液中。考虑到节约能源与保护设备,故选择超声功率 240 W。

2.1.2 提取温度对滇重楼茎叶总皂苷得率的影响

如图 1B 所示,总皂苷得率随提取温度的上升而快速增加,当温度到达 55 °C 后,总皂苷得率基本稳定,此时总皂苷得率为 2.13%。表明 55 °C 时,提取溶剂已很好地穿透滇重楼茎叶细胞。为减少溶剂挥发和节约能源成本,故选取最佳提取温度为 55 °C。

2.1.3 提取时间对滇重楼茎叶总皂苷得率的影响

如图 1C 所示,随提取时间的增加,总皂苷得率迅速增加,当提取时间达 2 h 时,总皂苷得率为 2.38%,之后延长时,总皂苷得率基本稳定。表明提取时间 2 h 已能将原料中总皂苷基本溶出。为缩短提取周期、节约成本,故选取最佳提取时间为 2 h。

2.1.4 料液比对滇重楼茎叶总皂苷得率的影响

由图 1D 可知,随着料液比的增加,总皂苷得率不断增加,在料液比为 1:15 (g/mL) 时,总皂苷得率达到最大值 2.12%,之后基本稳定。料液比为 1:15 (g/mL) 时,材料中的总皂苷基本溶出,继续增大溶剂量,其总皂苷得率无明显增加。考虑到节省溶剂成本,故选择最优料液比为 1:15 (g/mL)。

果进行二次多元回归拟合,得到滇重楼茎叶总皂苷得率 (R) 与超声功率 (A)、提取温度 (B)、提取时间 (C) 和料液比 (D) 之间的回归模型为:

$$R = 2.34 + 0.029A + 0.044B + 0.045C + 0.052BC - 0.071B D + 0.018CD - 0.045A^2 - 0.060B^2 - 8.908E - 0.03D - 0.042AB - 4.375E - 0.04AC + 0.017AD - 0.031C^2 - 0.042D^2$$

表2 Box-Behnken 中心组合设计方案及实验结果

Table 2 Box-Behnken experimental design and the results of these experiments

实验编号 No.	A 超声功率 Ultrasonic power (W)	B 提取温度 Temperature(°C)	C 提取时间 Extraction time (h)	D 料液比 Solid-liquid ratio (g/mL)	R 得率 Extraction yield of total saponins (%)
1	1	1	1	1	2.145
2	1	1	1	-1	2.175
3	1	1	-1	1	2.011
4	1	1	-1	-1	2.101
5	1	-1	1	1	2.224
6	1	-1	1	-1	1.975
7	1	-1	-1	1	2.259
8	1	-1	-1	-1	2.050
9	-1	1	1	1	2.249
10	-1	1	1	-1	2.385
11	-1	1	-1	1	1.995
12	-1	1	-1	-1	2.246
13	-1	-1	1	1	2.106
14	-1	-1	1	-1	1.979
15	-1	-1	-1	1	2.096
16	-1	-1	-1	-1	1.971
17	2	0	0	0	2.090
18	-2	0	0	0	2.118
19	0	2	0	0	2.074
20	0	-2	0	0	2.182
21	0	0	2	0	2.092
22	0	0	-2	0	2.297
23	0	0	0	2	2.090
24	0	0	0	-2	2.099
25	0	0	0	0	2.287
26	0	0	0	0	2.379
27	0	0	0	0	2.380
28	0	0	0	0	2.314
29	0	0	0	0	2.375
30	0	0	0	0	2.312
31	0	0	0	0	2.329

2.2.2 回归模型方差分析与显著性检验

利用 Design-Expert 7.0 软件对回归模型进行方差分析 (analysis of variance, ANOVA) (表3), 结果显示, 模型极显著 ($P < 0.01$), 失拟项不显著 ($P >$

0.05); $R^2 = 0.9143$, 说明该模型拟合度较好。因此该模型可以用于预测滇重楼茎叶总皂苷超声波辅助提取的最佳工艺。

各因素对滇重楼总皂苷得率显著性分析可以看

出,显著性最强的是提取温度和提取时间,其次是超声功率,而料液比对总皂苷得率的影响不显著。因素间交互效应中,AB、BC和BD的交互效应显著。

四个因素的二次项效应均显著。根据 F 值大小,可以得出各因素对滇重楼总皂苷得率的影响大小为提取时间 > 提取温度 > 超声功率 > 料液比。

表3 回归模型方差分析

Table 3 The variance analysis of regression model

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F Value	P 值 P-value	显著性 Significance
模型 Model	0.465	14	0.033	12.186	< 0.0001	significant
A	0.020	1	0.020	7.435	0.0149	*
B	0.046	1	0.046	16.991	0.0008	**
C	0.049	1	0.048	17.971	0.0006	**
D	0.002	1	0.001	0.698	0.4155	
AB	0.029	1	0.029	10.604	0.0050	**
AC	0.031	1	0.031	0.001	0.9737	
AD	0.005	1	0.004	1.699	0.2108	
BC	0.042	1	0.043	15.593	0.0011	**
BD	0.081	1	0.08	29.397	< 0.0001	**
CD	0.005	1	0.005	1.934	0.1834	
A ²	0.058	1	0.058	21.171	0.0003	**
B ²	0.1	1	0.1	37.965	< 0.0001	**
C ²	0.027	1	0.027	10.055	0.0059	**
D ²	0.051	1	0.051	18.735	0.0005	**
残差 Residual	0.044	16	0.003			
失拟误差 Lack of Fit	0.035	10	0.003	2.389	0.1493	not significant
纯误差 Pure Error	0.009	6	0.001			
总误差 Cor Total	0.508	30				

注: ** 为极显著 ($P < 0.01$), * 为显著 ($P < 0.05$)。

Note: ** is very significant ($P < 0.01$), * is significant ($P < 0.05$).

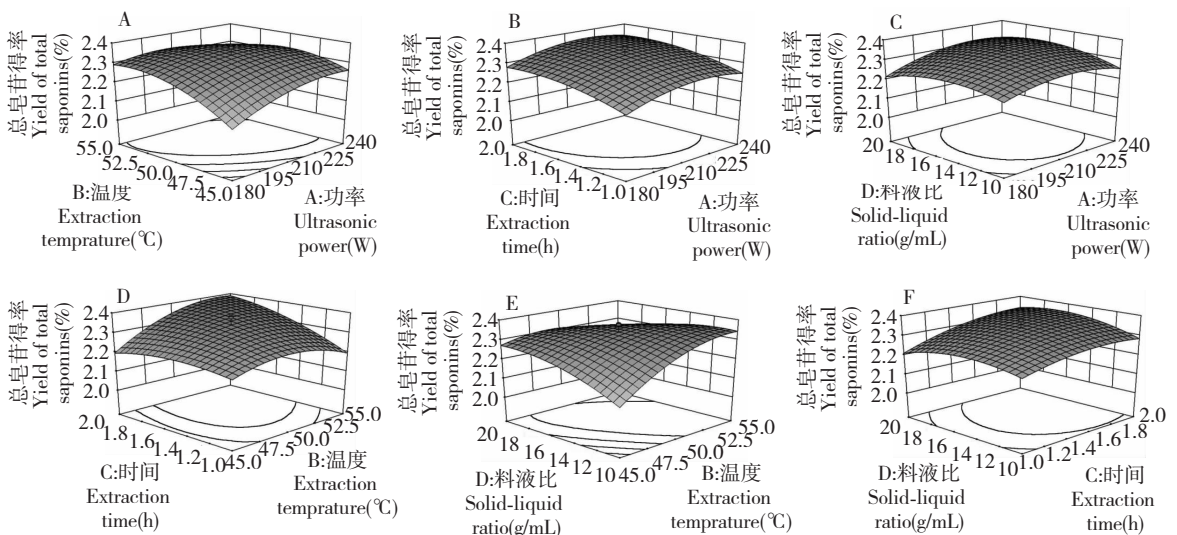


图2 各因素间交互作用对总皂苷得率影响的响应面图[$R = f(A, B)$ (A)、 $R = f(A, C)$ (B)、 $R = f(A, D)$ (C)、 $R = f(C, B)$ (D)、 $R = f(D, B)$ (E)、 $R = f(D, C)$ (F)]

Fig. 2 Response surface plots showing the effects of different variables on extraction yield of total saponins

2.2.3 响应面分析

根据回归方程,绘制总皂苷得率(R)和试验因素超声功率(A)、提取温度(B)、提取时间(C)和料液比(D)的响应面图(图2)。在其他因素条件固定不变的情况下,考察交互项之间的影响。根据图2的响应面与等高线变化规律可以看出,随着各因素值的增大,响应值R逐渐升高;当R值达到极值之后,随着各因素量的增大,响应值R逐渐减小。比较各图可知,提取温度和超声功率的抛物线最陡(图2A),提取时间和料液比的抛物线(图2F)则较为平缓,与方差分析结果一致。等高线越密,表明因素对总皂苷得率的影响越大。从图2可以看出,提取温度较提取功率对总皂苷得率的影响大(图2A);提取温度较提取时间对总皂苷得率的影响大(图2D);提取温度较料液比的影响大(图2E);提取时间较料液比的影响大(图2F),这与方差分析结果一致。

2.2.4 最佳工艺参数与验证试验

经响应面优化,超声辅助提取滇重楼茎叶总皂苷的最佳工艺参数为料液比1:12.30(g/mL)、提取温度53.72℃、超声功率215.92W、提取时间1.90h。在此工艺条件下,滇重楼茎叶总皂苷得率的预测值为2.385%。

考虑到实际可操作性,将最佳工艺参数调整为料液比1:12(g/mL)、提取温度54℃、超声功率210W、提取时间2h,在此条件下进行3次重复验证试

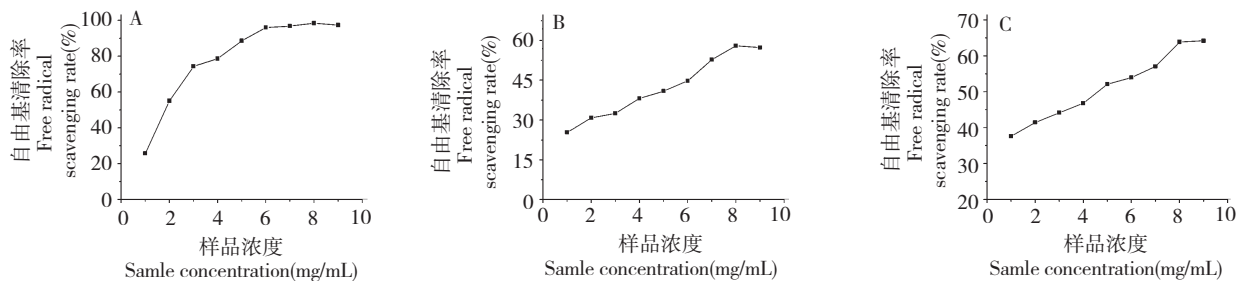


图3 总皂苷对DPPH(A)、羟自由基(B)和超氧阴离子(C)的清除能力

Fig. 3 DPPH (A), hydroxyl (B) and superoxide (B) radical scavenging activities of total saponins

3 结论

在单因素试验结果的基础上,采用响应面法优化得到超声辅助提取滇重楼茎叶总皂苷的最佳工艺条件为料液比1:12(g/mL)、提取温度54℃、超声功率210W、提取时间2h,在此条件下进行3次重复验证试验,滇重楼茎叶总皂苷平均得率为

2.360%,与预测值的相对误差为1.04%,表明该模型能用于指导超声辅助提取滇重楼茎叶总皂苷的提取工艺,具有实用价值。

2.3 滇重楼茎叶总皂苷的抗氧化活性分析

自由基拥有很高的反应活性,在生物体内能氧化细胞膜、变性蛋白质、甚至破坏DNA,进而损伤细胞和器官,甚至诱发多种慢性疾病危害健康,如动脉硬化、糖尿病和某些肿瘤等^[17]。因此,需要抗氧化剂来清除多余的活性氧自由基以防止机体遭受氧化伤害。研究表明,皂苷具有抗氧化等多种生物活性^[3]。

由图3可知,在低浓度范围内,总皂苷溶液对自由基的清除率与样品浓度有明显的量效关系,清除率随浓度增加而增加;高浓度时,清除率趋于平缓。在6mg/mL时,总皂苷对DPPH自由基清除率达98%,其IC₅₀值为2.223mg/mL。表明滇重楼茎叶总皂苷溶液具有很强的DPPH自由基清除能力(图3A)。如图3B、C所示,总皂苷对羟自由基和超氧阴离子清除活性较其对DPPH的清除活性弱。在8mg/mL时,总皂苷对羟自由基和超氧阴离子的清除活性分别是58%和64%,其IC₅₀值分别为6.782mg/mL和4.638mg/mL。表明滇重楼茎叶总皂苷溶液对羟自由基和超氧阴离子具有一定的清除能力。

2.360%,与预测值的相对误差为1.04%。说明此优化工艺参数可靠,具有实用价值。

体外抗氧化试验结果表明,滇重楼茎叶总皂苷对DPPH自由基、羟自由基和超氧阴离子均有较明显的清除效果,最大清除率分别为98%、58%和64%,其IC₅₀分别为2.223mg/mL、6.782mg/mL和4.638mg/mL。因此,滇重楼茎叶总皂苷具有较好

的抗氧化活性。

参考文献

- China Pharmacopoeia Committee(国家药典委员会). Pharmacopoeia of People's Republic of China(中华人民共和国药典). Beijing: Chinese Medical Science and Technology Press, 2010; 243-244.
- Hong Y(洪燕), Han YQ(韩燕全), Liu XG(刘向国), et al. Quality control of *Pairs* root and advancement on pharmacological study. *J Shanxi Coll Tradit Chin Med*(山西中医药大学学报), 2014, 14: 66-69.
- He HJ(何含杰), Zhang HY(章怀云), Chen LL(陈丽莉), et al. Polyphyllin pharmacological effects and clinical applications of research progress. *J Chin Med Mater*(中草药), 2014, 37: 527-530.
- Wu SS(武珊珊), Gao WY(高文远), Duan HQ(段宏泉), et al. Advances in studies on chemical constituents and pharmacological activities of *Rhizoma Paridis*. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2004, 35: 344-347.
- Zeng WM(曾卫民), Zhao TZ(赵庭周). Analysis on utilization of stem and leaves growing on the ground of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. *Chin Agric Sci Bull*(中国农学通报), 2012, 28: 266-270.
- Pu W(卜伟), Zhao J(赵君), Shen ZQ(沈志强). Comparison of hemostatic, analgesic and anti-inflammatory effects of total saponins between the aerial and underground parts of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2009, 21: 370-372.
- Lin HC(林海成), Zhu HY(祝洪艳), He ZM(何忠梅), et al. Optimization of extraction technology for total saponins from *Ziziphi spinosea* semen by orthogonal test. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2014, 21: 22-25.
- Zhao Y(赵岩), Yu T(于婷), Jin DM(金达明), et al. Enzymatic extraction of ginsenosides. *Shanghai J Tradit Chin Med*(上海中医药杂志), 2014, 48: 103-113.
- Ouyang LN(欧阳丽娜), Li LL(李兰林), Wu X(吴雪), et al. Saponins microwave extraction process orthogonal design *Panax japonicus*. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2010, 41: 1639-1642.
- Gao X(高侠), Li YX(黎云祥), Cai LY(蔡凌云), et al. Ultrasonic-assisted solvent extraction of total saponins from *Acanthopanax trifoliatum* leaves. *Food Sci*(食品科学), 2009, 30: 69-72.
- Pang TC(庞庭才), Hu SY(胡上英), Zhong QP(钟秋平), et al. Response surface optimization of ultrasound-assisted extraction of flavonoids from nutshell of *Heritiera littoralis* Dryand. *J Chin Med Mater*(中药材), 2014, 37: 2290-2294.
- Xie XJ(谢小俊), Lin LZ(林乐珍), Zheng GD(郑国栋). Extraction technology of polyphenols from *Smilax china* L. by ultrasonic method. *Food Sci Technol*(食品科技), 2014, 39: 231-234.
- Wang J(王俊), Yang KD(杨克迪), Chen J(陈钧). Determination of diosgenin by spectrophotometry. *Anal Lab*(分析实验室), 2004, 23: 73-75.
- Liu F, Liu WH, Tian SG. Artificial neural network optimization of *Althaea rosea* seeds polysaccharides and its antioxidant activity. *Int J Biol Macromole*, 2014, 70: 100-107.
- Saeed T. Optimization of polysaccharides from *Zagros oak* leaf using RSM: Antioxidant and antimicrobial activities. *Carbohydr Polym*, 2014, 106: 238-246.
- Chen JJ, Zhang T, Jiang B. Characterization and antioxidant activity of *Ginkgo biloba* exocarp polysaccharides. *Carbohydr Polym*, 2012, 87: 40-45.
- Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mole Toxicol*, 2003, 17: 24-38.
- Mukherjee PK, Mukherjee D, Maji AK, et al. The sacred lotus (*Nelumbo nucifera*) - phytochemical and therapeutic profile. *J Pharm Pharmacol*, 2009, 61: 407-422.
- Ji L, Wu J, Gao W, et al. Antioxidant capacity of different fractions of vegetables and correlation with the contents of ascorbic acid, phenolics, and flavonoids. *J Food Sci*, 2011, 76: 1257-1261.
- Mössner J. Nutrition, probiotics, antibiotics, antioxidative therapy, endoscopy in chronic pancreatitis. *Praxis*, 2006, 95: 1627-1635.

(上接第 1716 页)