

文章编号:1001-6880(2018)6-1073-05

# 雪松松针中莽草酸的纯化方法研究

杜瑞琴<sup>1</sup>,刘东彦<sup>2\*</sup>,张莉霞<sup>3</sup>,石晓峰<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>甘肃省肿瘤医院; <sup>2</sup>甘肃省医学科学研究院,兰州 730050; <sup>3</sup>甘肃中医药大学,兰州 730030

**摘要:**为建立莽草酸的纯化方法,以莽草酸的含量为指标,对雪松松针水提液的醇沉、大孔吸附树脂单用或与不同柱层析合用的纯化方法进行了探索。最终确定的莽草酸的纯化工艺流程为:提取-醇沉-柱层析-重结晶,其中醇沉法可以将莽草酸的含量由 12.69% 提升到 20.08%,大孔吸附树脂柱层析法单用可以将莽草酸的含量由 20.08% 提升到 35.73%,回收率均超过 95%;大孔吸附树脂柱结合硅胶柱层析法可得到纯度为 80.05% 的莽草酸近白色固体,回收率达 60.04%,再经二氯甲烷和甲醇重结晶得到纯度为 96.54% 的莽草酸白色粉末,表明该纯化方法简单可行,重复性好,易于实施工业化生产。

**关键词:**雪松松针;莽草酸;纯化;醇沉法;柱层析法

中图分类号:R284.2;Q946-3

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.6.025

## Purification Method of Shikimic Acid from Pine Leaves of *Cedrus deodara*

DU Rui-qin<sup>1</sup>, LIU Dong-yan<sup>2\*</sup>, ZHANG Li-xia<sup>3</sup>, SHI Xiao-feng<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>Gansu Provincial Cancer Hospital; <sup>2</sup>Gansu Academy of Medical Science, Lanzhou 730050, China;<sup>3</sup>Gansu University of TCM, Lanzhou 730030, China

**Abstract:** In order to establish purification method of shikimic acid in water extract from pine leaves of *Cedrus deodara*. The alcohol precipitation, macroporous adsorption resin column chromatography and macroporous adsorption resin column chromatography binding different column chromatography method were explored with the content of shikimic acid as indexes. The purification process flow of shikimic acid was given as follows: water extraction-alcohol precipitation-column chromatography-recrystallization. Among which the purity of shikimic acid can be increased from 14.87% to 20.08% by alcohol precipitation method and increased from 20.08% to 35.73% by macroporous adsorption resin column chromatography method which the recovery of shikimic acid was higher than 95%, nearly white solid shikimic acid with the purity of 80.05% can be obtained by macroporous adsorption resin column chromatography binding silica gel column chromatography method and the recovery of shikimic acid was up to 60.04%, shikimic acid white power with the purity of 96.54% was obtained by recrystallization with dichloromethane and methanol. The results showed the purification method is simple, rapid, repeated well and suitable for industrial production of shikimic acid from pine leaves of *C. deodara*.

**Key words:** pine leaves of *Cedrus deodara*; shikimic acid; purification; ethanol precipitation; column chromatography

莽草酸(Shikimic acid)是广泛存在于高等植物和微生物中莽草酸途径的中间产物,具有抗肿瘤和对心脑血管系统的作用,在生物合成中也扮演着重要的角色,如苯丙素类化合物、芳香氨基酸、黄酮类化合物等都是通过莽草酸途径产生的<sup>[1]</sup>。莽草酸是抗禽流感药物磷酸奥司米韦(商品名达菲)以及二恶霉素、乙二醛酶抑制剂等抗肿瘤药物的重要合

成原料,其天然来源途径繁多,以木兰科植物八角茴香中的含量最高<sup>[2]</sup>;近年来利用代谢合成法生产莽草酸也逐渐受到重视<sup>[3]</sup>。作为一种具有多种生物活性的天然产物和化学合成的重要原料,莽草酸具有广阔的应用价值和开发前景。

雪松 *Cedrus deodara* ( Roxb. ) Loud. 是松科 Pinaceae 雪松属 *Cedrus Trew* 树种的泛称,包括雪松 *C. deodara* ( Roxb. ) G. Don、黎巴嫩雪松 *C. libani* A. Rich.、短叶雪松 *C. brevifolia* ( Hook. f. ) A. Henry 和北非雪松 *C. atlantica* ( Endl. ) G. Manetti ex Carrière。其针叶作为可供药用的 13 种松树之一,药用

收稿日期:2017-09-06 接受日期:2017-11-28

基金项目:兰州市 2016 年第二批科技计划(2016-2-65);兰州市人才创新创业项目(2014-RC-62);甘肃省科技支撑计划(1204FKCA152)

\*通信作者 Tel:86-931-2302684;E-mail:liudongyanliu@163.com

历史悠久,具有抗肿瘤、抗氧化、改善记忆、抗菌及抗病毒、毒杀蚊虫等多种功效<sup>[4]</sup>。我们前期通过对7种松柏科植物的枝、叶和雪松不同部位中莽草酸的含量测定,发现雪松松针可作为莽草酸的优质生产原料,其莽草酸的含量高达3.93%<sup>[5,6]</sup>;通过对不同采集月份雪松松针中莽草酸的含量测定,发现4~6月为雪松松针最佳采集期<sup>[6]</sup>;建立了采用水提、萃取、柱层析、重结晶等步骤分离纯化莽草酸的方法<sup>[7]</sup>,但是该方法以实验室简单研究为主,其纯化工艺不利于工业产业化。为此,本实验以莽草酸的含量为指标,重点对醇沉法和大孔吸附树脂单用或与不同柱层析合用的纯化法进行比对研究,获得一种简便可行,廉价且适于生产莽草酸的纯化方法。

## 1 仪器与材料

Agilent 1100高效液相色谱仪,配置四元梯度泵,可变波长扫描紫外检测器,Agilent 1100化学工作站,标准手动进样器(美国安捷伦公司);UV-1800型紫外分光光度计(日本岛津公司);AE260万分之一分析天平(瑞士Mettle公司);YC-10型多功能提取罐(上海雅程仪器设备有限公司);RE-5299旋转蒸发仪(巩义市亚荣仪器有限公司);HH-4型数显恒温水浴锅(北京科伟永兴仪器有限公司);SK3310LHC超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司);雪松松针于2015年6月采自甘肃省陇南市徽县境内,原植物标本(GSAMS-VS-20150629)经甘肃省医学科学研究院何福江研究员鉴定为雪松属植物雪松 *Cedrus deodara* ( Roxb. ) Loud. ,标本保存于该院药物研究所。

莽草酸对照品(昆明科翔生物科技有限公司,纯度>98%);薄层层析硅胶板 GF<sub>254</sub>(青岛海洋化工厂);柱层析硅胶(100~200目)和XAD-7HP大孔吸附树脂(北京慧德易有限公司)。甲醇为色谱纯(山东禹王实业有限公司化工分公司);水为娃哈哈纯净水;其余试剂均为分析纯。

## 2 实验方法

### 2.1 莽草酸的定性定量分析方法

#### 2.1.1 TLC法

精密吸取浓度为50 μg/mL的莽草酸对照品溶液和供莽草酸含量测定的样品溶液各20 μL,点于同一硅胶 GF<sub>254</sub>薄层板上,以二氯甲烷:甲醇:乙酸(9:1:0.1)为展开剂;10%硫酸乙醇溶液为显色剂,60~70 °C热风烘烤至斑点清晰,检视,目标物莽草酸显紫红色斑点。

#### 2.1.2 UV法<sup>[8]</sup>

##### 2.1.2.1 标准曲线的绘制

取干燥至恒重的莽草酸对照品约4 mg,精密称定,置于10 mL容量瓶,加水溶解并定容,配制成浓度为0.4 μg/mL的对照品溶液。依次精密量取以上莽草酸对照品溶液0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 mL置25 mL容量瓶中,用水定容,摇匀,用水做空白,于217 nm测定吸光度。以吸光度(A)为纵坐标,以浓度(C, μg/mL)为横坐标,绘制标准曲线。得线性回归方程A = 0.0543C + 0.0084 (R<sup>2</sup> = 0.999),结果表明莽草酸在3.2~12.8 μg/mL浓度范围内与吸光度呈良好线性关系。

##### 2.1.2.2 样品测定

精密吸取供莽草酸含量测定的样品溶液0.2 mL,置25 mL容量瓶中,按上述方法操作测定吸光度(A),计算样品中莽草酸的浓度。

#### 2.1.3 HPLC法<sup>[9]</sup>

##### 2.1.3.1 色谱条件

色谱柱: Agilent TC-C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 (m);流动相:甲醇-0.1%磷酸水溶液(10:90),检测波长:217 nm;流速:1.0 mL/min;进样量:20 μL;柱温:30 °C。该条件下供试品中莽草酸分离度好,莽草酸的出峰时间4.2 min,该峰与其相邻色谱峰的分离度>1.5,理论塔板数以莽草酸峰计不小于4000(见图1)。

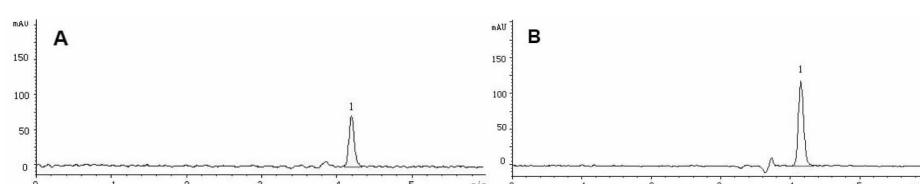


图1 莽草酸对照品(A)和供试品(B)的高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of shikimic acid reference (A) and sample (B)

### 2.1.3.2 标准曲线的绘制

取干燥至恒重的莽草酸对照品约 0.5 mg, 精密称定, 置于 10 mL 容量瓶, 加流动相溶解并定容, 配制成浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的对照品溶液。依次精密量取以上莽草酸对照品溶液 0.05、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1 mL 置 1 mL 容量瓶中, 用流动相定容, 摆匀, 得到浓度为 2.5、5、10、20、30、40、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的系列浓度的莽草酸对照品溶液。依上述色谱条件分别进样 20  $\mu\text{L}$  进行测定, 以峰面积 (Y) 为纵坐标, 浓度 (X,  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 为横坐标, 绘制标准曲线。得线性回归方程  $Y = 47.204X - 11.905 (R^2 = 0.9992)$ , 结果表明莽草酸在 2.5 ~ 50.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度范围内与峰面积呈良好线性关系。

### 2.1.3.3 样品测定

精密吸取供莽草酸含量测定的样品溶液 20  $\mu\text{L}$ , 注入 HPLC 色谱仪, 记录色谱图, 测定莽草酸的峰面积, 计算莽草酸的浓度和含量。

## 2.2 样品的制备

称取新鲜雪松松针 300 g, 首次加入 13 倍量水, 第二次加 10 倍量水, 回流提取, 每次 2 h, 合并水提液, 浓缩, 定容至 1000 mL 容量瓶中, 按“2.1.3.3”项下方法测得莽草酸的含量为 12.69%, 备用。

## 2.3 雪松松针中莽草酸的纯化方法

### 2.3.1 醇沉法

取“2.2”项下的莽草酸水提液, 分别用 70%、85% 乙醇醇沉两次, 按“2.1.3.3”项下方法测定第一次醇沉液和第二次醇沉液中莽草酸的浓度, 取部分醇沉液, 分别减压蒸干, 计算莽草酸的含量和回收率。

### 2.3.2 大孔吸附树脂柱纯化法

精密量取“2.3.1”项下莽草酸含量为 20.08% 醇沉液 20 mL, 上样于已预处理好的 30 g XAD-7HP 大孔吸附树脂柱, 控制流速 1 mL/min, 按 10 mL/瓶

收集, 待上样液流完后, 加水洗脱, 共收集 24 个流份, 按“2.1.2.2”项下方法测定各流份中莽草酸的浓度。

### 2.3.3 大孔吸附树脂结合硅胶柱层析法或大孔吸附树脂结合聚酰胺柱层析法

取经“2.3.2”项下大孔吸附树脂纯化后浸膏各 1.0 g, 分散于少量甲醇中, 分别用 5 g 硅胶和 5 g 聚酰胺拌样, 装入两根型号完全相同的层析柱中, 用“2.1.1”项下二氯甲烷: 甲醇: 乙酸 (9:1:0.1) 作为洗脱体系, 以 2 mL/min 流速淋洗, 按 20 mL/瓶收集, 各收集 11 个流份, 按“2.1.2.2”项下方法测定各流份中莽草酸浓度。

## 2.4 验证试验

精密吸取“2.2”项下的莽草酸水提液, 依次用 70%、85% 乙醇醇沉两次, 减压回收乙醇, 浸膏分散于水中, 定容至 100 mL 容量瓶中, 上样于已预处理好的 150 g XAD-7HP 大孔吸附树脂柱, 待上样液流完后, 加水洗脱, 收集水洗液, 减压蒸干得浸膏 4.05 g。将浸膏分散于少量甲醇中, 用 20 g 硅胶拌样装入层析柱, 采用二氯甲烷: 甲醇: 乙酸 (15:1:0.4) 作为洗脱体系, 以 5 BV/h 流速淋洗, 按 1 BV/瓶收集, 共收集 20 个流份, 按“2.1.3.3”项下方法测定各流份中莽草酸浓度, 每个流份各取 2 mL, 减压蒸干, 计算各流份中莽草酸的含量。

## 3 结果与分析

### 3.1 醇沉法纯化结果

雪松松针水提液经 70%、85% 乙醇醇沉两次, 如表 1 所示, 醇沉法对雪松松针中莽草酸的纯化效果明显, 莽草酸的含量由 12.69% 提升到 20.08%, 回收率在 99% 以上, 因此选醇沉法对雪松松针中莽草酸进行初步纯化。

表 1 莽草酸水提液醇沉纯化结果 (%)

Table 1 Ethanol precipitation results of shikimic acid water extraction liquid (%)

|                          | 第一次醇沉<br>One step precipitation | 第二次醇沉<br>Two step precipitation |
|--------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 含量 Shikimic acid content | 16.68                           | 20.08                           |
| 回收率 Recovery rate        | 99.81                           | 99.62                           |

### 3.2 大孔吸附树脂柱纯化法纯化结果

由图 2 可知, 大孔吸附树脂柱对莽草酸的洗脱规律明显, 呈抛物线趋势, 收集 12 个流份莽草酸基

本完全洗脱。合并流份 Fr2-12, 减压蒸干, 按“2.1.3.3”项下方法测定其莽草酸的浓度, 经计算莽草酸的含量为 35.73%, 回收率为 95.68%。可见大孔吸

附树脂柱纯化法对莽草酸的纯化效果明显,可作为莽草酸的进一步纯化方法。

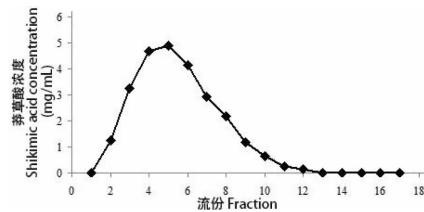


图2 大孔吸附树脂柱层析洗脱曲线

Fig. 2 Elution curve of macroporous resin column chromatography

### 3.3 大孔吸附树脂结合硅胶柱层析法或大孔吸附树脂结合聚酰胺柱层析法纯化结果

由图3、图4可知,大孔吸附树脂结合硅胶柱层析比大孔吸附结合聚酰胺柱层析对莽草酸的洗脱规律明显,呈抛物线趋势。分别合并经紫外测定莽草酸浓度大于1 mg/mL的流份,减压蒸干,按“2.1.3.3”项下方法测定其莽草酸的浓度,计算莽草酸的含量和回收率。结果显示大孔吸附结合硅胶柱层析纯化后莽草酸的纯度为70.24%,回收率为82.46%,而大孔吸附树脂结合聚酰胺柱层析纯化后莽草酸的纯度为51.70%,回收率为50.55%。因此选择大孔吸附树脂结合硅胶柱层析法对莽草酸进行纯化。

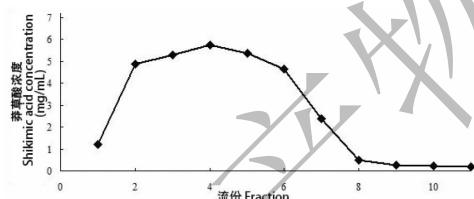


图3 大孔吸附树脂结合硅胶柱层析洗脱曲线

Fig. 3 Elution curve of macroporous resin binding silica gel column chromatography

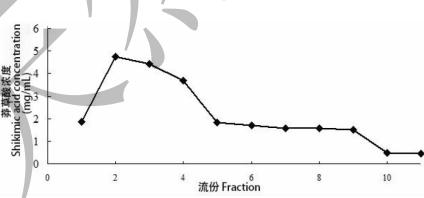


图4 大孔吸附树脂结合聚酰胺柱层析洗脱曲线

Fig. 4 Elution curve of macroporous resin binding polyamide column chromatography

### 3.4 验证试验结果

雪松松针水提液经70%、85%乙醇醇沉两次,回收乙醇,得到莽草酸含量为20.08%。再经XAD-

7HP大孔吸附树脂柱纯化得到莽草酸含量为35.73%的浸膏4.05 g。再经硅胶柱层析按优化的洗脱系统洗脱,结果如图5所示,合并莽草酸含量大于65%的流份,减压蒸干,得近白色莽草酸固体0.98 g,测得莽草酸纯度为80.05%,回收率为60.04%,经二氯甲烷-甲醇(4:1)重结晶,得到纯度为96.54%的莽草酸白色粉末。

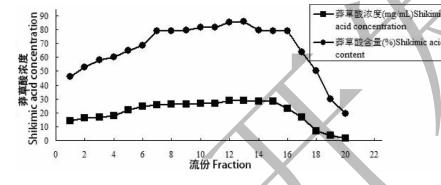


图5 验证试验结果

Fig. 5 Result of verification test

## 4 讨论与结论

松针是松科松属植物的针叶,又名松叶、松毛等,为松科植物的主要副产物之一,一年四季均可采收,天然蓄积量大,是一种再生速度快、可持续利用的天然资源。其主要化学成分为黄酮类、有机酸类、苯丙素类、三萜类、甾体类、多糖及针叶胶等<sup>[9]</sup>,本工艺通过水回流提取雪松松针,收集挥发油,提取液浓缩,乙醇醇沉,得到粗多糖;乙醇液减压回收,经大孔吸附树脂结合硅胶柱既可纯化得到莽草酸和总黄酮,实现了雪松松针的高值化利用。

有关松针中莽草酸的报道大多是莽草酸含量测定、提取工艺及药理活性等相关研究<sup>[10,11]</sup>,其纯化制备方面的报道甚少,林於等采用水提醇沉、大孔吸附树脂脱色、离子交换树脂分离等方法从马尾松中分离和纯化出莽草酸<sup>[12]</sup>;Ruohong Sui通过PS-DVB离子交换树脂柱层析和重结晶等方法从松针水提液中分离得到莽草酸<sup>[13]</sup>;但对离子交换树脂存在成本高、选择性强、酸碱洗脱等问题<sup>[14]</sup>并未考虑。参考文献中莽草酸的纯化方法,我们对结晶法<sup>[15]</sup>、硅胶柱层析法<sup>[16]</sup>和聚酰胺柱层析法等进行了多次莽草酸纯化试验,但其纯化效果均不理想。

本实验建立的雪松松针中莽草酸的纯化方法为水提—醇沉—大孔吸附树脂柱层析—硅胶柱层析—重结晶,其中水提醇沉和大孔吸附树脂纯化步骤对目标物莽草酸损失很少,溶剂仅为水和工业乙醇,而回收乙醇和再生大孔吸附树脂可多次使用,具有价格低廉、操作简单、重复性好的优点;同时硅胶柱层

析纯化步骤通过优化,采用最优淋洗系统二氯甲烷:甲醇:乙酸(15:1:0.4),其莽草酸洗脱快速,整个硅胶柱层析纯化过程用时约4 h,且得到的莽草酸纯度高,回收率高。由此认为本实验所建立的方法为利用雪松松针工业化生产莽草酸奠定了基础。

## 参考文献

- Zhang JM(张军民), Shi XF(石晓峰). The progress in research on natural product shikimic acid [J]. *Chin J Info TCM* (中国中医药信息杂志), 2011, 18:109-112.
- Huang XM(黄雪梅), Qin XL(覃小玲), Jiang WZ(蒋伟哲). Determination of shikimic acid in fructus anisistellati [J]. *Chin Hosp Pharm J*(中国医院药学杂志), 2008, 28: 130-132.
- Zhang JM(张军民), Fu SW(傅思武), Shi XF(石晓峰). The application of microbial metabolic synthesis in shikimic acid and its derivatives [J]. *Chin J Microecol* (中国微生态学杂志), 2013, 25(1):91-93.
- Liu DY(刘东彦), Shi XF(石晓峰). Advances in research of the botanical pine needles [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2012, 35:1701-1705.
- Lei YP(雷艳萍), Shi XF(石晓峰), Bai CH(白朝晖), et al. Analysis on the content of shikimic acid in different parts of *Cedrus deodara* [J]. *J China Pharm* (中国药房), 2015, 26:803-805.
- Wang DD(王东东), Shi XF(石晓峰), Li C(李冲), et al. Content determination of shikimic acid in 7 kinds of coniferous plants [J]. *J China Pharm* (中国药房), 2011, 22:616-618.
- Liu DY(刘东彦), Shi XF(石晓峰), Li C(李冲), et al. Separation of shikimic acid from pine needles of *Cedrus deodara* and its purity determination [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学杂志), 2011, 28:637-640.
- Su BC(粟本超), Xiao WJ(肖万娟). Content determination of shikimic acid in pine needles of *Cedrus deodara* [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学杂志), 2011, 28:831-834.
- Shen W(沈薇), Shi XF(石晓峰), Wang DD(王东东), et al. Optimization of the extracting process of shikimic acid from pine needles of *Cedrus deodara* by orthogonal experiment [J]. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药学杂志), 2011, 28:831-834.
- Cheng LX(程兰香), Zhou WM(周文美), Zhao CL(赵辰路), et al. Determination of shikimic acid in leaves of *Pinus massoniana* by HPLC [J]. *J Guizhou Univ; Nat Sci*(贵州大学学报:自然科学版), 2013, 30(4):50-53.
- Zhu XS(朱雪松), Li P(李鹏), Ye FJ(叶芳健), et al. Extraction technology optimization and content determination of shikimic acid in wudang pine needle tea [J]. *Anhui Med Pharm J*(安徽医药), 2017, 21(1):49-53.
- Lin Y(林於), Ma LJ(马廉举), Liu X(刘新), et al. Isolation of shikimic acid from *Pinus massoniana* lamb [J]. *Chin J Pharm* (中国医药工业杂志), 2009, 40:581-584.
- Sui RH. Separation of shikimic acid from pine needles [J]. *Chem Eng Technol*, 2008, 31:469-473.
- Zhang Y(张迎), Liu JH(刘军海), Liu YF(刘燕飞), et al. Research progress on extraction, purification and functionality of shikimic acid from *Illicium verum* [J]. *Cereals Oils* (粮食与油脂), 2012, 25(2):45-49.
- Shu X(舒馨), Liu XM(刘雄民), Zhao FM(赵凤妹). Comparative study on different purification methods of shikimic acid from *Illicium verum* Hook. f. [J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2014, 26:1523-1526.
- He XH(何新华), Liu L(刘玲), Liu XG(刘兴国), et al. Research on the extraction and purification of shikimic acid from *Illicium verum* Hook. f. [J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2008, 20:914-917.
- Fu YX(傅亚欣). Research on extraction, purification and cell immune activity of polysaccharides from the base of *flammulina velutipes* stipe[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University(南京农业大学), 2012.
- Ma WC(马伟超). A Study of bi-directional immunomodulatory activity of *trametesversicolor* intra-and exo-mycelial polysaccharide extracts on Raw264. 7 cells [D]. Shanghai: Shanghai Normal University(上海师范大学), 2009.
- Xing L(邢丽). Sulfated polysaccharides from pine pollen on the effects of immune regulation of mice macrophages [D]. Jinan: Shandong Normal University(山东师范大学), 2015.
- Sun ZL, Peng Y, Zhao WW, et al. Purification, characterization and immunomodulatory activity of a polysaccharide from *Celosia cristata*[J]. *Carbohydr Polym*, 2015, 133-337.
- Jiao L, Li X, Li T, et al. Characterization and anti-tumor activity of alkali-extracted polysaccharide from *Enteromorpha intestinalis*[J]. *Int immuno pharmacol*, 2009, 9 (3): 324-329.

(上接第 1020 页)

- Fu YX(傅亚欣). Research on extraction, purification and cell immune activity of polysaccharides from the base of *flammulina velutipes* stipe[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University(南京农业大学), 2012.
- Ma WC(马伟超). A Study of bi-directional immunomodulatory activity of *trametesversicolor* intra-and exo-mycelial polysaccharide extracts on Raw264. 7 cells [D]. Shanghai: Shanghai Normal University(上海师范大学), 2009.
- Xing L(邢丽). Sulfated polysaccharides from pine pollen on the effects of immune regulation of mice macrophages [D]. Jinan: Shandong Normal University(山东师范大学), 2015.
- Sun ZL, Peng Y, Zhao WW, et al. Purification, characterization and immunomodulatory activity of a polysaccharide from *Celosia cristata*[J]. *Carbohydr Polym*, 2015, 133-337.
- Jiao L, Li X, Li T, et al. Characterization and anti-tumor activity of alkali-extracted polysaccharide from *Enteromorpha intestinalis*[J]. *Int immuno pharmacol*, 2009, 9 (3): 324-329.