

不同分子量菊芋多糖的生物活性研究

李 璋^{1,2},袁平川^{1,2},王颜天池^{1,2},周宇杰^{1,2},柳春燕^{1,2,3},陈靠山^{1,2,3*}¹皖南医学院药学院;²安徽省多糖药物工程技术研究中心;³活性生物大分子研究安徽省重点实验室,芜湖 241002

摘要:研究不同醇沉组份的菊芋多糖分子量和其抑制 α -葡萄糖苷酶活性与抗氧化活性差异。菊芋水提物分级醇沉获得粗多糖,过 Sephadex G-50 凝胶柱进行纯化,得到重均分子量为 1959、2180、2746、2011 Da 的多糖组分:JAP-1、JAP-2、JAP-3 和 JAP-4。测定这些组分体外抑制 α -葡萄糖苷酶活性和对 DPPH 与羟基自由基清除能力。结果表明,JAP-4 具有较明显的抑制 α -葡萄糖苷酶活性,在 5 mg/mL 时抑制率为 20.32%。JAP-1、JAP-2、JAP-3 和 JAP-4 均有显著的抗氧化活性,其中 JAP-2 对 DPPH 自由基和羟基自由基的清除活性优于其他组分。JAP-2 在 2 mg/mL 时对 DPPH 自由基和羟基自由基清除率分别达到 84.50% 和 89.74%,接近于 Vc 的抗氧化活性。不同分子量菊芋多糖的活性存在差异,可能是由于分子量的不同所导致。

关键词: 菊芋;多糖;分子量; α -葡萄糖苷酶抑制剂;抗氧化

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.7.022

The Biological Activity of Jerusalem Artichoke Polysaccharides with Different Molecular Weights

LI Zhang^{1,2}, YUAN Ping-chuan^{1,2}, WANG Yan-tianchi^{1,2}, ZHOU Yu-jie^{1,2},
LIU Chun-yan^{1,2,3}, CHEN Kao-shan^{1,2,3*}

¹Department of Pharmacy, ²Anhui Provincial Engineering Research Center for Polysaccharide Drugs,

³Anhui Province Key Laboratory of Active Biological Macro-Molecules, Wannan Medical College, Wuhu 241000, China

Abstract: We conduct this experiment in order to know the differences of molecular weight of polysaccharides from Jerusalem artichoke with different ethanol precipitation components, as well as inhibition of α -glucosidase and antioxidant activity *in vitro*. The polysaccharides JAP-1, JAP-2, JAP-3 and JAP-4 with molecular weight of 1959 Da, 2180 Da, 2746 Da and 2011 Da were obtained by the method of fractional ethanol precipitation, and purified by Sephadex G-50. The inhibitory effects of these components on the activity of α -glucosidase and the scavenging ability of DPPH and hydroxyl radical were measured. The results showed that JAP-4 inhibited the activity of α -glucosidase significantly, and the inhibition rate was 20.32% at 5 mg/mL. At the same time, JAP-1, JAP-2, JAP-3 and JAP-4 all exhibited strong scavenging capacities on DPPH and hydroxyl radicals, the scavenging activity of JAP-2 against DPPH radical and hydroxyl radical was better than other components. The scavenging rate of DPPH radical and hydroxyl radical reached 84.50% and 89.74% at 2 mg/mL, and the scavenging activity was closed to Vc. The activity of polysaccharides with different molecular weights were different, which may be due to the different molecular weights.

Key words: Jerusalem artichoke; polysaccharide; molecular weight; α -glucosidase inhibitor; antioxidation

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是一种以高血糖为特点,由于胰岛素分泌绝对不足或相对不足而引起的代谢性疾病。目前全世界糖尿病患者数为 2.3 亿,预计到 2025 年可达到 3.5 亿。临床上常用于治

疗糖尿病的药物有胰岛素、双胍类、磺酰脲类、胰岛素增敏剂、 α -葡萄糖苷酶抑制剂等^[1-3]。 α -葡萄糖苷酶抑制剂为糖或多糖衍生物,可以竞争性结合 α -葡萄糖苷酶的活性中心,进而延缓单糖吸收,降低餐后血糖,对餐后血糖较高的患者具有较好的疗效^[4-6]。氧化应激是糖尿病并发症发生的重要机制之一,抗氧化剂可以抑制自由基的产生,减少自由基对机体的损伤,有益于糖尿病患者的健康^[2,7]。寻找可以抑制 α -葡萄糖苷酶,并且有一定抗氧化活性的物质

收稿日期:2018-01-15 接受日期:2018-03-26

基金项目:安徽省自然科学基金(1408085MH197);安徽省教育厅重点项目(KJ2015A199);皖南医学院大学生科研资助项目(WK2016S20);安徽省高校自然科学研究重大项目(KJ2018ZD025)

*通信作者 Tel:86-015054151538;E-mail:ksc313@126.com

对糖尿病的治疗具有重要意义。

菊芋 (*Helianthus tuberosus* L.) 的储藏地下茎含菊芋多糖达 19%, 研究证明菊芋多糖具有降低血脂、血糖的药理活性^[8-10]。但菊芋多糖对 α -葡萄糖苷酶抑制活性未见报道, 抗氧化活性研究也较少。本研究采用分级醇沉的方法获得了 4 种分子量范围不同的菊芋多糖组分, 并研究这些组分对 α -葡萄糖苷酶抑制活性和抗氧化活性。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜菊芋购自江苏省徐州市, 皖南医学院药学院生药学教研室包淑云副教授鉴定为菊科植物菊芋 (*Helianthus tuberosus* L.) 的块茎。实验用水为去离子水, 蒽酮、3,5 二硝基水杨酸、标准果糖(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 三氯甲烷、乙醚、正丁醇、无水乙醇(分析纯, 天津市福晨化学试剂厂); 葡聚糖标准品(色谱纯, 美国 Sigma-Aldrich 公司); 对硝基苯- α -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG)、 α -葡萄糖苷酶(分析纯, 美国 Sigma-Aldrich 公司); 抗坏血酸、1,1-二苯基-2-苦肼基(分析纯, 上海源叶生物科技有限公司); 羟自由基测试试剂盒(南京建成生物研究所); BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型, 碧云天生物技术有限公司)。

1.2 主要仪器与设备

WK-2000A 小型高速粉碎机, 青州市精诚医药装备制造有限公司; DHG-9070 型电热恒温鼓风干燥箱, 金坛市荣华仪器制造有限公司; SHB-III S 型循环水式多用真空泵, 郑州长城科工贸有限公司; 酶标仪, 美国 Bio-Tek; FA2004N 型电子天平, 上海民桥精密科学仪器有限公司; AFZ-1001-U 型艾科浦超纯水系统, 颐洋企业发展有限公司; GKC4 型数显控温水浴锅, 上海波洛实验设备有限公司; LC-20A 型高效液相色谱仪, 日本岛津公司; DKB-501S 型超级恒温水槽, 上海精宏实验设备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 原料的预处理

原料(新鲜菊芋块茎)→洗净、晾干→切片→60℃烘干→粉碎、过 40 目筛→菊芋干粉(常温下保存备用)。

1.3.2 菊芋多糖的提取

取 200 g 新鲜菊芋干粉用去离子水(固液比 1:20)重复提取两次, 提取温度为 90℃。合并提取液

过滤两次得滤液, 减压浓缩至 250 mL。分次加入一定体积无水乙醇使乙醇终浓度分别为 40%、60%、80%、90% 并分别在 4℃ 冰箱静置过夜, 收集各种醇沉浓度下的沉淀, 复溶后离心去除杂质。将各种醇沉浓度下的提取液分别用 D101 大孔吸附树脂除杂并脱色, 将洗脱液分别减压浓缩至 200 mL, 分别加入 1/3 体积 Sevage 试剂(三氯甲烷: 正丁醇 = 4:1), 搅拌 90 分钟后置于分液漏斗中萃取 30 分钟, BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白质含量, 重复上述操作直至无蛋白质。加水减压浓缩去除有机试剂至 165 mL, 将溶液分别置于截留分子量为 1 000 Da 的透析袋中在 4℃ 冰箱中用流动水透析 48 h, 冷冻干燥 3 天得到粗多糖成品。取适量粗多糖成品配置成 5 mg/mL 水溶液, 用 Sephadex G-50 凝胶色谱柱纯化, 用硫酸蒽酮检测并收集, 冷冻干燥得 JAP-1、JAP-2、JAP-3 和 JAP-4^[9]。硫酸蒽酮法测定 JAP-1、JAP-2、JAP-3 和 JAP-4 多糖含量, 检测结果显示多糖含量均大于 95%, 可以用于菊芋多糖活性的测定。

1.3.3 菊芋多糖分子量测定

采用高效凝胶过滤色谱法测定 JAP-1、JAP-2、JAP-3 和 JAP-4 的分子量及分子量分布情况。色谱条件如下, 色谱柱: TSKgel G2500PWXL, 以超纯水为流动相, 流动相流速为 0.6 mL/min, 柱温控制在 30℃, 每次进样量为 20 μ L, 检测器为示差折光检测器(RID)。采用 Sigma 公司的葡聚糖标准品(重均分子量分别为 1 000、1 500、3 500、5 000 和 10 000 Da), 得标准曲线 $y = 0.668x^3 - 23.8x^2 + 281.632x - 101.851$, $R^2 = 0.9878$ 。分别取各组样品 20 mg, 溶解于 4 mL 纯水后用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤后精密吸取 20 μ L 待测溶液注入液相色谱仪中, 用 GPC 软件分析得出分子量及分子量分布情况^[11]。

1.3.4 α -葡萄糖苷酶抑制活性测定

样品制备: JAP-1、JAP-2、JAP-3 和 JAP-4 分别用磷酸盐缓冲溶液(pH6.8, 0.1 mol/L)溶解配置成 8.3 mg/mL 供试液, 用超滤膜过滤后备用。

反应体系参照 Wang^[5]建立的方法。取 60 μ L 适量质量浓度的供测样品溶液与 20 mL 1U/mL α -葡萄糖苷酶磷酸盐溶液(pH6.8, 0.1 mol/L)振荡混匀, 于 37℃ 水浴中孵育 20 min, 加入 20 μ L PNPG 溶液(pH6.8, 5 mmol/L)开始启动反应, 振荡摇匀后于 37℃ 下孵育 30 min, 加入 100 μ L 0.2 mol/L Na_2CO_3 溶液终止反应, 振荡摇匀后在 405 nm 处测定吸光值。以等体积磷酸盐缓冲溶液(pH6.8, 0.1 mol/L)

代替多糖样品溶液测定阴性对照组吸光值,以等体积磷酸盐缓冲溶液代替酶溶液测定样品本底组吸光值。各组样品对 α -葡萄糖苷酶抑制率($\%$) $=1 - [(As - A0)/Ac] \times 100$, As 为样品组吸光值, $A0$ 为本底吸光值, Ac 为阴性对照组吸光值^[12,13]。

1.3.5 菊芋多糖对 DPPH 自由基清除能力的测定

DPPH 在有机试剂中是一种稳定的自由基,在 515 nm 处有强吸收,当抗氧化物质存在时该体系吸光值降低。本实验参考鲍素华^[14]的实验方法并进行改进,精密称定 4.0 mg 1,1-二苯基-2-苦肟基(DPPH)置于 100 mL 容量瓶中,用 95% 乙醇定容至 100 mL 刻度线后避光保存备用。称取 JAP-1、JAP-2、JAP-3、JAP-4 和 Vc 适量用超纯水溶解后用超滤膜过滤备用,取不同质量浓度样品溶液 0.25 mL 与 1.25 mL DPPH 溶液(0.04 mg/mL)振荡混匀并于 28 °C 下避光水浴 30 min,在 515 nm 波长处测定吸光值。以 Vc 为阳性对照,以等体积超纯水代替多糖样品溶液测定空白对照组吸光值,以等体积 95% 乙醇代替 DPPH 溶液测定样品本底吸光值。DPPH 自由基清除率($\%$) $=1 - [(As - A0)/Ac] \times 100$, As 为样品组吸光值, $A0$ 为样品本底吸光值, Ac 为空白对照组吸光值^[15]。

1.3.6 菊芋多糖对羟基自由基清除能力的测定

Fenton 反应是最常见的产生自由基的化学反应,本实验采用南京建成生物研究所提供的羟基自由基测定试剂盒,利用 Griess 试剂与体系中羟基自由基发生显色反应,测定显色物质的吸光值。样品溶液配制同 1.3.5,以等体积超纯水代替多糖样品溶液测定空白对照组吸光值,以等体积超纯水代替工作液测定样品本底吸光值。羟基自由基清除率($\%$) $=1 - [(As - A0)/Ac] \times 100$, As 为样品组吸光值, $A0$ 为样品本底吸光值, Ac 为空白对照组吸光值

表 1 菊芋多糖分子量分布表

Table 1 Molecular weight distribution table of polysaccharides from Jerusalem artichoke

组别 Group	数均分子量 (Mn)	重均分子量 (Mw)	Z 均分子量 (Mz)	Z + 1 均分子量 (Mz1)	粘均分子量 (Mv)	Mw/Mn	Mv/Mn	Mz/Mw	固有黏度 Intrinsic viscosity	百分比 Percentage (%)
JAP-1	1 541	1 959	2 806	4 565	0	1.271 37	0	1.432 14	1	100
JAP-2	1 516	2 180	5 464	16 490	0	1.437 99	0	2.506 64	1	100
JAP-3	2 074	2 746	3 643	4 672	0	1.324 07	0	1.326 94	1	100
JAP-4	1 409	2 011	31 380	309 235	0	1.426 77	0	15.607 71	1	100

由表一可知 JAP-1、JAP-2、JAP-3 和 JAP-4 的重均分子量分别为 1959 Da、2180 Da、2746 Da 和 2011

值^[16,17]。

1.3.7 统计学分析

每组数据重复三次以上,采用 SPSS18.0 统计软件对数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 菊芋多糖分子量测定

利用高效凝胶过滤色谱法和 GPC(Gel Permeation Chromatography)软件对 JAP-1、JAP-2、JAP-3 和 JAP-4 的分子量分布进行测定。

2.1.1 菊芋多糖高效液相色谱图

采用高效液相色谱法测定 JAP-1、JAP-2、JAP-3 和 JAP-4 的分子量,结果见图 1。

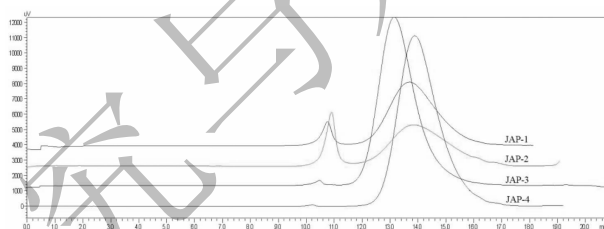


图 1 菊芋多糖 HPLC 色谱图

Fig. 1 High performance liquid chromatography of polysaccharides from Jerusalem artichoke

由图一可知, JAP-1、JAP-2、JAP-3 和 JAP-4 的保留时间分别为 13.701、13.859、13.149 min 和 13.888 min。JAP-1 和 JAP-2 在 10.65 min 处存在杂峰。JAP-1、JAP-2 分子量分布范围较广,而 JAP-3 和 JAP-4 分子量分布较集中。并且由峰面积大小差异可知 JAP-1、JAP-2 含量相对较低。

2.1.2 菊芋多糖分子量分布

利用 GPC 软件拟合出标准曲线并分析菊芋多糖分子量分布情况,结果见表 1。

Da, 四种组份的多分散指数 Mw/Mn 分别为 1.27、1.44、1.32、1.43,均在接受范围内。实验结果表明,

分级醇沉可以得到不同分子量的菊芋多糖。

2.2 菊芋多糖对 α -葡萄糖糖苷酶抑制活性测定

采用 α -葡萄糖糖苷酶抑制剂筛选模型,测定 JAP-1、JAP-2、JAP-3 和 JAP-4 对 α -葡萄糖糖苷酶抑制活性。

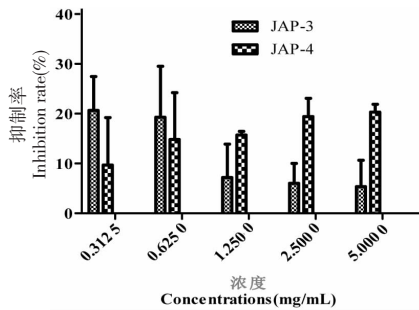


图2 菊芋多糖对 α -葡萄糖糖苷酶抑制活性

Fig. 2 α -glucosidase inhibitory activity of polysaccharides from Jerusalem artichoke

实验结果表明, JAP-1 和 JAP-2 对 α -葡萄糖糖苷酶无抑制活性;而 JAP-3 和 JAP-4 对 α -葡萄糖糖苷酶具有一定的抑制活性,结果见图 2。JAP-4 在浓度范围内对 α -葡萄糖糖苷酶抑制活性呈现剂量依赖性,其在 5 mg/mL 时,对 α -葡萄糖糖苷酶活性的抑制率为 20.32%;JAP-3 在浓度大于 0.625 mg/mL 后随着浓度的升高而抑制率降低。不同分子量菊芋多糖可能具有不同的空间结构因而对 α -葡萄糖糖苷酶抑制活性的差异较大。实验结果表明,不同分子量的菊芋多糖对 α -葡萄糖糖苷酶抑制的活性差异较大,而 JAP-4 相对具有较强的 α -葡萄糖糖苷酶抑制活性。

2.3 菊芋多糖对 DPPH 自由基的清除作用

采用有机自由基清除模型评定 JAP-1、JAP-2、JAP-3 和 JAP-4 的抗氧化活性,结果见图 3。

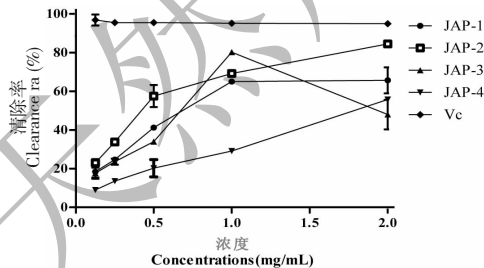


图3 菊芋多糖对 DPPH 自由基清除率

Fig. 3 Scavenging effects of polysaccharides to DPPH radical

如图三所示,菊芋多糖对 DPPH 自由基具有一定的清除活性。JAP-1、JAP-2、JAP-3 和 JAP-4 在 2 mg/mL 时对 DPPH 自由基清除率分别为 65.675%、84.495%、47.975% 和 55.735%, JAP-1、JAP-2 和

JAP-4 在实验浓度范围内 DPPH 自由基清除率呈现一定的剂量依赖性, JAP-3 可能由于分子量和结构的原因在浓度大于 1.0 mg/mL 时随着浓度的增高清除率下降。其中 JAP-2 对 DPPH 自由基具有较强的清除能力,清除率接近于阳性对照 Vc。

2.4 菊芋多糖对羟基自由基的清除作用

羟基自由基是毒性较强的活性氧自由基,因此对羟基自由基的清除作用是评价抗氧化剂的重要指标^[18]。JAP-1、JAP-2、JAP-3 和 JAP-4 对羟基自由基清除作用见图四。

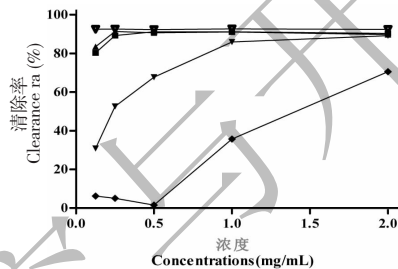


图4 菊芋多糖对羟基自由基清除作用

Fig. 4 Scavenging effects of polysaccharides to hydroxyl free radical

如图四所示,菊芋多糖具有较好的羟基自由基清除能力。JAP-1、JAP-2、JAP-3 和 JAP-4 在 2 mg/mL 时对羟基自由基的清除率为 90.348%、89.739%、89.217% 和 70.522%,并在实验浓度范围内对羟基自由基清除率呈现一定的剂量依赖性。其中 JAP-1 和 JAP-2 对羟基自由基具有较好的清除能力,清除率接近于阳性对照 Vc;并且在浓度达到 0.5 mg/mL 后对羟基自由基的清除率趋于平稳。

3 结论

本研究通过分级醇沉的方法获得四种醇沉组份的菊芋多糖,分析四种醇沉组份分子量和活性。实验结果表明:不同醇沉组份的菊芋多糖具有不同的分子量, JAP-1、JAP-2、JAP-3 和 JAP-4 的重均分子量分别为 1959 Da、2180 Da、2746 Da、2011 Da。其中 JAP-1 和 JAP-2 分子量分布较广,明显存在杂峰, JAP-3 和 JAP-4 分子量分布较集中。不同醇沉组份之间活性差异较大, JAP-4 和 JAP-3 具有一定的 α -葡萄糖糖苷酶抑制活性,而 JAP-1、JAP-2 对 α -葡萄糖糖苷酶没有抑制活性; JAP-4 在 5 mg/mL 时对 α -葡萄糖糖苷酶的抑制率为 20.32%。四种醇沉组份均具有较好的抗氧化活性, JAP-2 的抗氧化活性最高,其在 2 mg/mL 时对 DPPH 自由基和羟基自由基

清除率为 84.50% 和 89.74%。

通过合适的方法得到不同分子量的多糖对其生物活性具有重要意义,目前用于得到不同分子量多糖的方法有化学法、物理法、降解法,均存在工艺复杂、实验周期长等缺点^[19]。目前菊芋多糖生物活性与分子量的关系研究较少,Li 等^[11]利用菊芋在生长过程中菊芋多糖聚合度的变化获得不同聚合度菊芋多糖,并测定不同聚合度菊芋多糖益生及抗氧化活性差异。实验结果得出聚合度越低,益生及抗氧化活性越好。本实验结果证明分级醇沉可以获得不同分子量的菊芋多糖,并相对来说较为简单有效;同时,小分子量菊芋多糖 JAP-4 对 α -葡萄糖糖苷酶抑制活性较好,而中等分子量菊芋多糖 JAP-2 抗氧化活性较好,实验结果与 Li 等人得到的结论有所差异^[20]。本实验为将菊芋多糖开发为 α -葡萄糖糖苷酶剂和抗氧化剂提供了理论基础,但不同分子量的菊芋多糖对 α -糖苷酶的抑制活性和抗氧化活性存在差异的原因还有待进一步深入研究。

参考文献

- Jiang S(姜爽). Experimental study on the extraction and separation of coptis Chinensis polysaccharide and anti-diabetic effect on rats of T2DM[D]. Jilin: Jilin University(吉林大学),2013.
- Zhang RR(张然然). Radix astragali combined with insulin effects on the levels of oxidative stress in diabetic rats[D]. Jilin: Jilin University(吉林大学),2013.
- Xia LZ(夏伦祝), Xu XX(徐先祥), Zhang R(张睿). Effects of pseudostellaria polysaccharides on glucose and lipid metabolism in diabetic rats[J]. *Chin Pharm*(中国药业), 2009, 9: 17-18.
- Yang JR, Luo JG, Kong LY. Determination of alpha-glucosidase inhibitors from *Scutellaria baicalensis* using liquid chromatography with quadrupole time of flight tandem mass spectrometry coupled with centrifugal ultrafiltration[J]. *Chin J Nat Med*, 2015, 13: 208-214.
- Wang Z, Hwang SH, Lee SY, et al. Fermentation of purple Jerusalem artichoke extract to improve the alpha-glucosidase inhibitory effect in vitro and ameliorate blood glucose in db/db mice[J]. *Nutr Res Pract*, 2016, 10: 282-287.
- Wu ZQ(吴志强). Research on extraction and purification of HuidouBa polysaccharides and their inhibition on α -glycosidase[D]. Guangzhou: South China University of Technology(华南理工大学), 2014.
- Jin L(金雷), Xue HY(薛宏宇), Jin LJ(金礼吉), et al. Research progress on antioxidants in application of diabetes mellitus[J]. *Prog Mod Biomed*(现代生物医学进展), 2008, 2: 383-385.
- Radulovic NS, Dordevic MR. Chemical composition of the tuber essential oil from *Helianthus tuberosus* L. (Asteraceae)[J]. *Chem Biodivers*, 2014, 11: 427-437.
- Zhang ZH(张忠华). Jerusalem artichoke extract polysaccharides, separation, purification and analysis[D]. Jilin: Jilin University(吉林大学), 2015.
- Liu F(刘飞), Liu WJ(刘文静), Yang W(杨稳), et al. Extraction and isolation of polysaccharide from Jerusalem artichoke and its pharmacological effects[J]. *J Jinan Univer: Nat Sci Med*(暨南大学学报: 自科与医学版), 2017, 38: 121-126.
- Li W, Zhang J, Yu C, et al. Extraction, degree of polymerization determination and prebiotic effect evaluation of inulin from Jerusalem artichoke[J]. *Carbohydr Polym*, 2015, 121: 315-319.
- Wang JJ(王佳佳), Liu W(刘玮), Zhu J(朱静), et al. Hypoglycemic activity of a polysaccharide from the roots of *Arctium lappa* L. [J]. *J Chin Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2013: 455-459.
- Gong LX(龚凌霄), Cao WY(曹文燕), Zhang Y(张英), et al. Anti- α -glucosidase activities and bioactive components of Tibetan Hull-Less barley bran extracts[J]. *Food Sci*(食品科学), 2017: 179-184.
- Bao SH(鲍素华). Studies on antioxidant activity of polysaccharide from dendrobium candidum *in vitro*[D]. Hefei: Hefei University of Technology(合肥工业大学), 2009.
- Lu XL(鲁晓丽), Mu JQ(慕家琪), Zhang ZP(张自萍). Comparison of antioxidant activities of *Lycium barbarum* polysaccharides prepared with different Treatment methods[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物开发与研究), 2015, 27: 267-270.
- Xie R(谢瑞), Wei YX(魏艳霞), Ding YZ(丁玉竹), et al. Effects of different processing methods on the antioxidant activity of polysaccharide from *Nitraria sibirica* Pall [J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物开发与研究), 2016, 28: 41-45.
- Li JE, Wang WJ, Zheng GD, et al. Physicochemical properties and antioxidant activities of polysaccharides from *Gynura procumbens* leaves by fractional precipitation [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 95: 719-724.
- Cao X(曹旭), Cao JF(曹剑锋), Chen KS(陈靠山). Study on antioxidant activity of total flavonoids of burdock root[J]. *Sci Technol Food Ind*(食品工业科技), 2012: 138-142.
- Zhao TT(赵婷婷). Preparation of different molecular weight polysaccharides from *Porphyra haitanensis* and their anti-aging activity [D]. Institute of Oceanology. Qingdao: Chinese Academy of Sciences(中国科学院海洋研究所), 2007.
- Koh GY, Chou G, Liu Z. Purification of a water extract of Chinese sweet tea plant (*Rubus suavissimus* S. Lee) by alcohol precipitation [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57: 5000-5006.