

石榴瓢多糖提取工艺的优化及其抑制透明质酸酶活性

王占一¹, 廖成斌¹, 公金艳¹, 赵春林¹, 孙晓梅¹, 向 兰²
(1. 枣庄学院食品科学与制药工程学院, 山东 枣庄 277160; 2. 山东大学药学院, 山东 济南 250012)

摘要: **目的** 优化石榴瓢多糖提取工艺, 并评价其抑制透明质酸酶活性。**方法** 在单因素试验基础上, 以料液比、超声时间、超声温度为影响因素, 多糖得率为评价指标, Box-Behnken 设计优化提取工艺。Elson-Morgan 法检测多糖对透明质酸酶活性的抑制作用。**结果** 最佳条件为料液比 1 : 22, 超声时间 35 min, 超声温度 48.5 ℃, 多糖得率 7.13%。多糖对透明质酸酶的最大抑制率为 67.2%, IC₅₀ 为 1.723 mg/mL, 其抑制机理属于可逆性抑制和非竞争性抑制。**结论** 该方法稳定可靠, 可用于提取抑制透明质酸酶活性较强的石榴瓢多糖。
关键词: 石榴瓢; 多糖; 提取; 抑制透明质酸酶活性; Box-Behnken 设计; Elson-Morgan 法
中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2020)09-2266-06
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.09.004

Extraction process optimization and anti-hyaluronidase activity of polysaccharides from *Punica granatum* pericarp

WANG Zhan-yi¹, LIAO Cheng-bin¹, GONG Jin-yan¹, ZHAO Chun-lin¹, SUN Xiao-mei¹, XIANG Lan²
(1. College of Food Science and Pharmaceutical Engineering, Zaozhuang University, Zaozhuang 277160, China; 2. College of Pharmacy, Shandong University, Jinan 250012, China)

ABSTRACT: **AIM** To optimize the extraction process for polysaccharides from *Punica granatum* pericarp and to evaluate their anti-hyaluronidase activity. **METHODS** With solid-liquid ratio, ultrasonic time and ultrasonic temperature as influencing factors, polysaccharides yield as an evaluation index, the extraction process was optimized by Box-Behnken design on the basis of single factor test. Elson-Morgan method was applied to dectcting the effects of polysaccharides on inhibiting hyaluronidase activity. **RESULTS** The optimal conditions were determined to be 1 : 22 for solid-liquid ratio, 35 min for ultrasonic time, and 48.5 ℃ for ultrasonic temperature, the polysaccharides yield was 7.13%. The maximal inhibition rate of polysaccharides on hyaluronidase was 67.2% with the IC₅₀ of 1.723 mg/mL, whose inhibition mechanisms belonged to reversible inhibition and non-competitive inhibition. **CONCLUSION** This stable and reliable method can be used for the extraction of polysaccharides with strong anti-hyaluronidase activity from *P. granatum* pericarp.
KEY WORDS: *Punica granatum* pericarp; polysaccharides; extraction; anti-hyaluronidase activity; Box-Behnken design; Elson-Morgan method

石榴 *Punica granatum* L. 是石榴科石榴属多年生木本植物^[1], 在我国栽培历史悠久, 拥有丰富的资源。石榴瓢为石榴果实的内果皮, 存在于石榴籽假种皮外部间隙, 《全国中药炮制规范》规定石榴皮炮制方法为“除去杂质, 去除残留的内瓢及种子, 洗净, 切块, 干燥, 或洗净, 干燥后粉

收稿日期: 2019-11-06
基金项目: 山东省自然科学基金 (ZR2018LH020); 山东省重点研发计划项目 (2016GSF202010); 山东省高等学校科技计划项目 (J18KA305)
作者简介: 王占一 (1980—), 男, 硕士, 副教授, 执业药师, 从事天然药物活性成分提取与分离方面的研究。Tel: (0632) 3785886, E-mail: zhyiwang@126.com

碎”^[2]，可见在此过程中石榴瓢通常作为废物被丢弃，造成资源浪费^[3]。国内已有关于石榴皮多糖^[4-6]、石榴叶多糖^[7]、石榴籽多糖^[8]的研究，但石榴瓢作为石榴果实结构的一部分，其所含的该成分鲜有关注。

多糖具有抗过敏^[9]、调节免疫^[10]、抗氧化^[11]等多种生物活性，以及抑制酶活性的作用^[12-13]，但关于石榴瓢多糖对透明质酸酶的抑制作用尚无报道。因此，本实验采用 Box-Behnken 设计优化石榴瓢多糖提取工艺，并测定它对透明质酸酶的抑制作用，以期为其开发利用提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器 HN-CQY 低温超声波萃取仪（上海汗诺仪器有限公司）；XFB-200 小型多功能粉碎机（永康市小宝电器有限公司）；FA1104 电子分析天平（上海越平科学仪器有限公司）；UV-2000 紫外-可见分光光度计（上海尤尼柯仪器有限公司）；HH-S6 数显恒温水浴锅（常州普天仪器制造有限公司）；SHZ-D（Ⅲ）循环水式真空泵（巩义市予华仪器有限责任公司）；RE52CS-2 旋转蒸发仪（上海亚荣生化仪器厂）；WFZ 真空冷冻干燥机（上海高致精密仪器有限公司）。

1.2 试剂与药物 石榴于 2018 年 10 月采自山东省枣庄市峄城区“万亩石榴园”主产区，经枣庄学院闫志佩教授鉴定为石榴科石榴属多年生木本植物石榴 *Punica granatum* L，将新鲜样品洗干净后手工撕取瓢部分，阴干，粉碎后过 60 目筛，备用。D-无水葡萄糖对照品（纯度≥98%，上海源叶生物科技有限公司）；透明质酸酶（5 000 U/g）、透明质酸钾（上海联迈生物工程有限公司）；Ehrlich 试剂（上海如吉科技发展有限公司）；乙酰丙酮（西陇科学股份有限公司）；DNS 显色剂（上海誉宇新材料科技有限公司）；抗坏血酸（天津市河东区红岩试剂厂）。3，5-二硝基水杨酸、苯酚、浓盐酸、浓硫酸、氯仿、正丁醇等均为分析纯（国药集团化学试剂有限公司）；水为蒸馏水，由枣庄学院生物学省级教学示范中心提供。

2 方法与结果

2.1 多糖提取与纯化 精密称取干燥的石榴瓢粉末 10.0 g，置于 500 mL 干燥锥形瓶中，加水至一定料液比，保鲜膜、橡皮筋封住瓶口后置于超声波提取器中，设定超声功率为 300 W，在一定超声温度下提取一段时间后减压抽滤，滤液定容至 100 mL（滤液超过 100 mL 时，旋转蒸发仪将其浓

缩至 80 mL 左右后再定容），加入 1/4 倍体积的氯仿-正丁醇混合溶剂（比例 4：1）搅拌 30 min，3 000 r/min 离心 15 min，取上清液，重复 3 次以除去蛋白质。将粗多糖溶液置于透析袋（截留分子量 3 500 Da）中透析 36 h 以除去小分子杂质，完毕后加入 3 倍量无水乙醇，封口膜封好，静置冷藏过夜，于第 2 天过滤，滤饼复溶于水，再加入 3 倍量无水乙醇，重复 3 次以除去色素，得到白色多糖沉淀，真空冷冻干燥，即得精多糖，称定质量。将精多糖用蒸馏水溶解并定容至 50 mL，作为供试品溶液，测定得率、纯度，公式分别为得率=（样品中多糖含量/样品质量）×100%、纯度=（样品中多糖含量/精多糖质量）×100%。

2.2 总糖含量测定

2.2.1 对照品溶液制备 精密称取干燥至恒重的 D-无水葡萄糖对照品 50 mg，蒸馏水定容至 100 mL，即得（0.5 mg/mL）。

2.2.2 方法学考察

2.2.2.1 线性关系考察 采用苯酚-硫酸法^[14]。将“2.2.1”项下对照品溶液依次稀释至 10、20、30、40、50、60、70 μg/mL，各取 1 mL，置于 10 mL 具塞试管中，加入 0.5 mL 5% 苯酚溶液，摇匀，滴加 5.5 mL 浓硫酸，摇匀，室温下静置 30 min，在 490 nm 波长处测定吸光度。以溶液质量浓度为横坐标（X），吸光度为纵坐标（A）进行回归，得方程为 $A = 0.079\ 2X - 0.005\ 5$ （ $r = 0.999\ 5$ ），在 1.43 ~ 10 μg/mL 范围内线性关系良好。

2.2.2.2 精密度试验 精密量取“2.2.1”项下对照品溶液，按“2.2.2.1”项下方法测定 6 次，测得总糖含量 RSD 为 1.26%，表明仪器精密度良好。

2.2.2.3 重复性试验 精密称取干燥的石榴瓢粉末适量，按“2.1”项下方法制备 6 份供试品溶液，按“2.2.2.1”项下方法测定，测得总糖含量 RSD 为 1.48%，表明该方法重复性良好。

2.2.2.4 稳定性试验 精密称取干燥的石榴瓢粉末适量，按“2.1”项下方法制备供试品溶液，室温下于 0、2、4、8、12、16 h 按“2.2.2.1”项下方法测定，测得总糖含量 RSD 为 0.85%，表明溶液在 16 h 内稳定性良好。

2.2.2.5 加样回收率试验 精密称取含有量已知的干燥石榴瓢粉末适量，按“2.1”项下方法制备 6 份供试品溶液，精密加入“2.2.1”项下对照品

溶液 0.5 mL, 按“2.2.2.1”项下方法测定, 测得总糖平均加样回收率为 101.12%, RSD 为 0.92%。

2.3 还原糖含有量测定 采用 DNS 显色法^[14]。精密量取“2.2.1”项下对照品溶液 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 于具塞刻度试管中, 不足 1.0 mL 的蒸馏水补足 1.0 mL, 加入 3, 5-二硝基水杨酸 (DNS) 显色剂 2.0 mL, 沸水浴 5 min 后用自来水冷却, 蒸馏水补至 10 mL, 于 540 nm 波长处测定吸光度。以溶液质量浓度为横坐标 (X), 吸光度为纵坐标 (A) 进行回归, 得方程为 $A=0.0172X-0.1862$ ($r=0.9993$), 在 5~50 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。

2.4 多糖含有量测定 按“2.2”项下方法测定总糖含有量, 按“2.3”项下方法测定还原糖含有量, 多糖含有量=总糖含有量-还原糖含有量。

2.5 提取工艺优化

2.5.1 单因素试验

2.5.1.1 料液比 精密称取石榴瓢粉末 3.0 g, 固定超声时间 35 min、超声温度 45 $^{\circ}\text{C}$, 考察粉末与水比例 (料液比) 1:8、1:12、1:16、1:20、1:24、1:28 对多糖得率的影响, 结果见图 1。由此可知, 随着提取溶剂用量增加, 多糖得率呈先升后降的趋势, 料液比为 1:20 时达到最大; 进一步加大提取溶剂用量后, 多糖得率反而略呈下降趋势, 其原因是溶剂量过多会增加该成分损失。因此, 确定料液比为 1:20 左右。

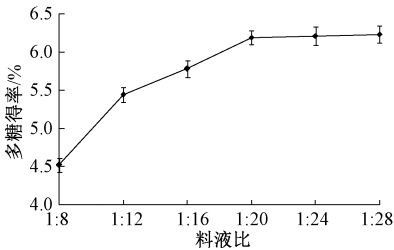


图 1 料液比对多糖得率的影响
Fig. 1 Effect of solid-liquid ratio on polysaccharides yield

2.5.1.2 超声时间 精密称取石榴瓢粉末 3.0 g, 固定料液比 1:20、超声温度 45 $^{\circ}\text{C}$, 考察超声时间 20、25、30、35、40、45 min 对多糖得率的影响, 结果见图 2。由此可知, 提取 20~35 min 时, 多糖得率升高趋势明显; 超过 35 min 后, 多糖得率反而略有下降, 其原因是超声时间过长时该成分结构会发生改变。因此, 确定超声时间为 35 min 左右。

2.5.1.3 超声温度 精密称取石榴瓢粉末 3.0 g,

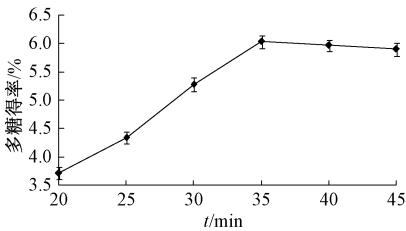


图 2 超声时间对多糖得率的影响
Fig. 2 Effect of ultrasonic time on polysaccharides yield

固定料液比 1:20、超声时间 35 min, 考察超声温度 25、35、45、55、65、75 $^{\circ}\text{C}$ 对多糖得率的影响, 结果见图 3。由此可知, 在 25~45 $^{\circ}\text{C}$ 下, 多糖得率升高趋势明显; 超过 45 $^{\circ}\text{C}$ 后, 多糖得率反而呈下降趋势, 其原因是温度过高时该成分会氧化变质或水解损失。因此, 确定超声温度为 45 $^{\circ}\text{C}$ 左右。

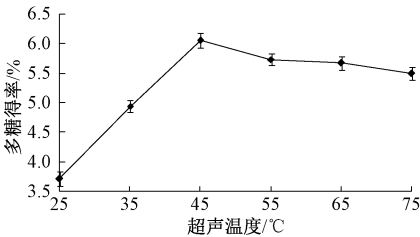


图 3 超声温度对多糖得率的影响
Fig. 3 Effect of ultrasonic temperature on polysaccharides yield

2.5.2 Box-Behnken 设计 在单因素试验基础上, 以料液比 (A)、超声时间 (B)、超声温度 (C) 为影响因素, 多糖得率为评价指标 (Y), 应用 Design-Expert 8.0.6 软件进行 Box-Behnken 设计, 优化提取工艺。因素水平见表 1, 结果见表 2。

表 1 因素水平

Tab. 1 Factors and levels

水平	因素		
	A 料液比	B 超声时间/min	C 超声温度/ $^{\circ}\text{C}$
-1	1:16	30	35
0	1:20	35	45
1	1:24	40	55

将表 2 数据进行多元回归拟合, 得到方程为 $Y=7.09+0.13A+0.090B+0.083C-0.15AB+0.28AC+0.090BC-0.18A^2-0.27B^2-0.37C^2$, 方差分析见表 3。由此可知, 模型 $P<0.0001$, 表明模型达到极显著水平; 失拟项 $P>0.05$, 表明未知因素对实验结果影响较小; R^2 为 98.96%, 表明模型拟合程度良好, 可代替真实点进行分析; 各因素及其交互项、二次项均达到显著 ($P<0.05$) 或极显著 ($P<0.01$) 水平。

表 2 试验设计与结果

Tab. 2 Design and results of tests

试验号	A	B	C	Y 多糖得率/%
1	0	0	0	7.11
2	1	0	1	6.97
3	0	1	-1	6.34
4	1	-1	0	6.86
5	0	0	0	7.12
6	0	1	1	6.73
7	1	0	-1	6.29
8	-1	1	0	6.71
9	0	-1	1	6.37
10	0	0	0	7.09
11	-1	0	-1	6.67
12	-1	0	1	6.23
13	0	0	0	7.06
14	0	-1	-1	6.34
15	-1	-1	0	6.23
16	0	0	0	7.05
17	1	1	0	6.74

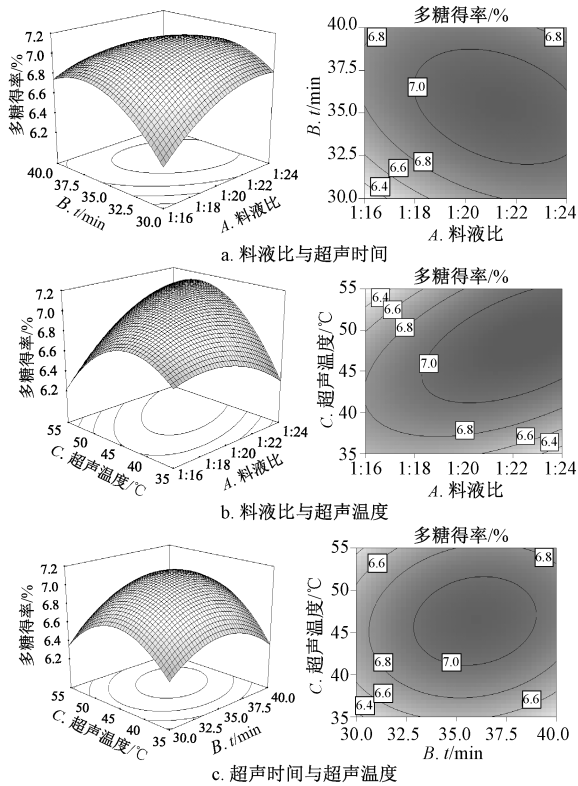
表 3 方差分析

Tab. 3 Analysis of variance

来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	1.81	9	0.20	74.00	<0.000 1
A	0.13	1	0.13	47.86	0.000 2
B	0.065	1	0.065	23.85	0.001 8
C	0.054	1	0.054	20.04	0.002 9
AB	0.090	1	0.090	33.12	0.000 7
AC	0.31	1	0.31	115.42	<0.000 1
BC	0.032	1	0.032	11.92	0.010 6
A ²	0.13	1	0.13	49.10	0.000 2
B ²	0.31	1	0.31	115.42	<0.000 1
C ²	0.57	1	0.57	209.86	<0.000 1
残差	0.019	7	0.002 7	—	—
失拟项	0.015	3	0.005 1	5.48	0.066 9
误差项	0.003 7	4	0.000 9	—	—
总离差	1.83	16	—	—	—

响应面分析见图 4。由此可知,固定超声温度(C)时,因素 A(料液比)、B(超声时间)对多糖得率的影响均呈倒 U 型变化;A 对响应面坡度的改变程度大于 B,表明前者影响较大。同理,其他因素影响程度为 A>C、B>C。

通过 Design Expert 8.0.6 软件对表 3 数据进行分析,得到最优工艺为料液比 1:22.44,超声时间 35.30 min,超声温度 48.50 ℃,多糖得率为 7.14%,考虑到实际生产条件,将其修正为料液比 1:22,超声时间 35 min,超声温度 48.5 ℃。在此优化工艺下进行 3 批验证试验,测得多糖得率分别为 7.14%、7.12%、7.13%,平均 7.13%,与预测值 7.14% 接近,表明模型具有较好的稳定性。



注:左图为三维曲面图,右图为等高线图。

图 4 各因素响应面图

Fig. 4 Response surface plots for various factors

2.6 抑制透明质酸酶活性检测

2.6.1 抑制率测定 采用 Elson-Morgan 法^[15]。按“2.1”项下方法测得精多糖纯度约为 75%,通过含有量换算,将其依次配制成 0.1、0.2、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0、2.4、2.8、3.2 mg/mL 溶液,各精密量取 0.5 mL 至 10 mL 试管中,加入 0.5 mL 透明质酸酶(500 U/mL)混匀,37 ℃下水浴 20 min,取出试管,加入 0.1 mL CaCl₂ 溶液(2.5 mol/L)混匀,37 ℃水浴 20 min,取出试管,加入 0.5 mL 透明质酸钾溶液(0.5 mg/mL)混匀,37 ℃下水浴 40 min,取出试管,静置 5 min,加入 2 滴 NaOH 溶液(5 mol/L)、0.5 mL 乙酰丙酮溶液混匀,沸水浴 15 min 后冰水浴冷却 5 min,取出试管,静置 10 min 后加入蒸馏水 0.5 mL、Ehrlich 试剂 0.5 mL、浓 HCl 2 mL,补加无水乙醇至 10 mL,振摇混匀,静置 30 min 后在 530 nm 波长处测定吸光度,以相同质量浓度的抗坏血酸为阳性对照,计算透明质酸酶抑制率(R),公式为 $R = [(A_0 - A) / A_0] \times 100\%$,其中 A₀ 为对照组吸光度(以不加样品、酶液、透明质酸钾为空白对照),A 为样品组吸光度(以加样品,不加酶液、透明质酸钾为空白对照)。抑制曲线见图 5。

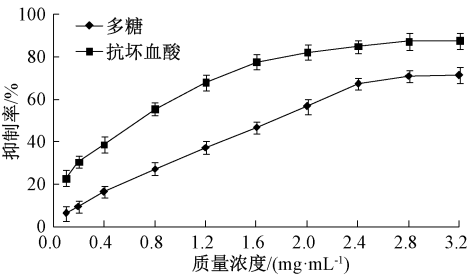


图 5 多糖对透明质酸酶活性的抑制曲线

Fig. 5 Inhibitory curves for polysaccharides on hyaluronidase activity

由此可知，在 0.1~2.4 mg/mL 质量浓度范围内多糖对透明质酸酶活性的抑制率明显增加，在 2.4 mg/mL 时最大，达 67.2%，但超过 2.4 mg/mL 后其升高程度趋缓；多糖溶液质量浓度 (X) 与抑制率 (Y) 之间呈正相关，方程为 $Y = 26.12X + 4.99$ ($R^2 = 0.9982$)， IC_{50} 为 1.723 mg/mL；抗坏血酸 IC_{50} 为 0.816 mg/mL，表明其作用强于多糖。

2.6.2 酶抑制动力学分析

经前期预实验得知，反应体系透明质酸酶反应初速率维持时间 ≥ 36 min。本实验固定多糖溶液质量浓度为 2.4 mg/mL，底物透明质酸钾浓度为 3.0 mmol/L，选择透明质酸酶活性 2.5、5.0、7.5、10.0、12.5 U/mL。研究分为 2 组，1 组为实验组，加入多糖；另 1 组为空白对照组，不加入多糖而以空白溶液代替，测定反应初速率 (V)，以

加入反应体系前的透明质酸酶活性为横坐标，初速率为纵坐标绘图，以确定多糖对透明质酸酶的抑制作用是否属于可逆性抑制类型^[16]，结果见图 6。由此可知，无论加或未加抑制剂，曲线均通过原点，表明多糖对透明质酸酶的抑制作用属于可逆性抑制^[17]。

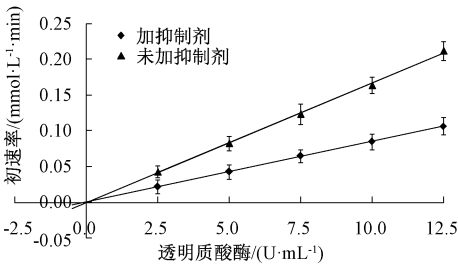


图 6 透明质酸酶活性-反应初速率曲线

Fig. 6 Curves for hyaluronidase activity-initial reaction rate

以 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mmol/L 透明质酸钾为底物，加入 0.8、1.2、1.6、2.0、2.4 mg/mL 多糖溶液，测定其在 18 min 时的吸光度。以反应速率的倒数 ($1/V$) 为纵坐标，加入反应体系前底物透明质酸钾浓度的倒数 ($1/[S]$) 为横坐标绘图，以确定多糖对透明质酸酶抑制作用类型^[18]，结果见图 7。由此可知，曲线在 X 轴的负半轴几乎交于一点，属于非竞争性抑制类型^[19]，表明底物浓度升高不能降低多糖对透明质酸酶的抑制活性。

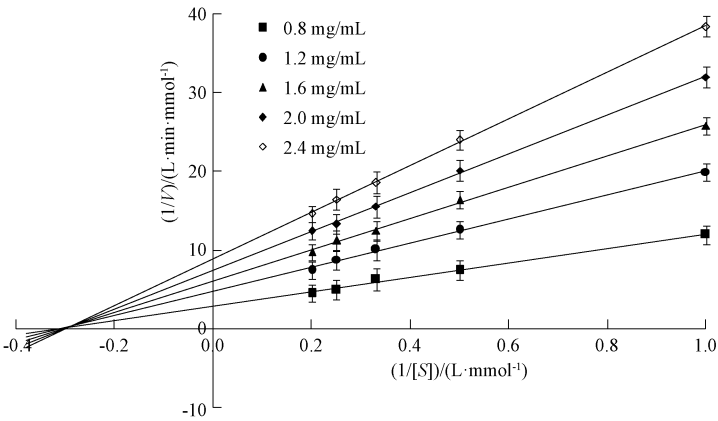


图 7 多糖 Lineweaver-Burk 曲线

Fig. 7 Lineweaver-Burk curves for polysaccharides

3 讨论

本实验在单因素试验的基础上采用 Box-Behnken 设计优化石榴瓢多糖提取工艺，得到最佳条件为料液比 1 : 22 g/mL，超声时间 35 min，超声温度 48.5 ℃，多糖得率为 7.13%，与预测值

7.14% 接近，表明工艺准确可靠。

透明质酸能在具有一定活性透明质酸酶的条件下水解，产生 β -N-乙酰葡萄糖胺，后者可在碱的催化下与乙酰丙酮缩合而形成生成色原，它在酸性条件下与 Ehrlich 试剂缩合显色，缩合产物在 530 nm 波

长处有最大吸收，故通过可见分光光度法测定β-N-乙酰葡萄糖胺含有量可得知透明质酸被水解的程度，进而间接判断透明质酸酶活性，该成分含有量越高，酶活性也越高，反之则越低，上述方法即为国际通用的 Elson-Morgan 法。本实验采用该方法测定石榴瓢多糖体外抑制透明质酸酶活性，发现其 IC₅₀ 为 1.723 mg/mL，表明其抑制作用较强。

由此推测，石榴瓢多糖对透明质酸酶的抑制机理可能是前者作用于后者上的活性位点，并优先以非共价键结合，使后者无法再作用于底物透明质酸，导致其活性暂时丧失；或两者以共价键的形式结合而发生反应，使后者结构改变，丧失其催化透明质酸水解的活性位点，从而永久性失活。

参考文献：

[1] 汪小飞,周耘峰,黄 埔,等. 石榴品种数量分类研究[J]. 中国农业科学, 2010, 43(5): 1093-1098.

[2] 中华人民共和国卫生部药政管理局. 全国中药炮制规范[S]. 北京: 人民卫生出版社, 1988: 144.

[3] 王占一,王京龙,王玉海,等. 石榴瓢总黄酮表面活性剂-超声波协同提取工艺优化及其动力学、热力学行为[J]. 中成药, 2018, 40(8): 1726-1732.

[4] 邓红梅,徐国强,丘慧萍,等. 石榴皮多糖的提取、纯化和结构分析[J]. 化学与生物工程, 2018, 35(11): 38-43.

[5] 李 云. 石榴皮多糖的提取、纯化及免疫调节作用研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2018.

[6] 李 云,朱彩平,张 扬,等. 微波辅助提取石榴皮多糖工艺优化及其免疫调节作用研究[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(6): 1015-1020; 1077.

[7] 王占一,孔德营,戴 博,等. 石榴叶多糖亚临界水提取工

艺的优化及其体外抗氧化活性[J]. 中成药, 2017, 39(10): 2039-2044.

[8] 王占一,张立华,王玉海,等. 复合酶法提取石榴籽多糖的工艺优化[J]. 食品科学, 2016, 37(18): 19-25.

[9] 高媛媛. 紫菜多糖及深海放线菌代谢产物的抗过敏活性[D]. 厦门: 集美大学, 2018.

[10] 刘 洋,黄 菲,李巍巍,等. 荔枝多糖的超声-微波提取工艺优化及其免疫调节作用[J]. 中国食品学报, 2019, 19(4): 184-190.

[11] 田淑雨,鹿士峰,吴杨洋,等. 超声破碎辅助提取灵芝多糖工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(8): 101-107.

[12] 张 捷,陈忠浩,叶 森,等. 羊栖菜多糖提取物对酪氨酸酶的抑制作用研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(20): 116-120.

[13] 张 洋. 绿藻中提取的硫酸鼠李糖对酶的抑制作用研究[J]. 安徽农学通报, 2018, 24(10): 11-13.

[14] 王占一,戴 博,王玉海,等. 石榴皮多糖提取过程的动力学分析[J]. 中成药, 2015, 37(5): 971-977.

[15] 赵丰丽,李洁荣,杨健秀. 黄皮叶不同溶剂提取物抗过敏性研究[J]. 食品工业科技, 2009, 30(1): 110-112; 115.

[16] 刘富月,王晓东,李守鹏,等. 不同品种生姜提取物对α-葡萄糖苷酶的抑制作用[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(12): 6-9.

[17] Wei J F, Li Y Y, Shang F D. Antioxidant activities, α-glucosidase inhibitory *in vitro* and effects of *Lysimachia paridiformis* Franch. var. *stenophylla* Franch. on alloxan-induced diabetic mice *in vivo*[J]. *J Med Plants Res*, 2012, 6(14): 2793-2800.

[18] 罗晶洁,王 尉,曹学丽. 桑叶多糖的分离纯化及对α-葡萄糖苷酶的抑制活性[J]. 食品科学, 2011, 32(3): 112-116.

[19] Cheng N, Yi W B, Wang Q Q, *et al.* Synthesis and α-glucosidase inhibitory activity of chrysin, diosmetin, apigenin, and luteolin derivatives [J]. *Chin Chem Lett*, 2014, 25(7): 1094-1098.