

石参多糖的体外抗氧化活性研究

马宁 杨培君* 李会宁 裴会鹏 黄俊

(陕西理工学院生物科学与工程学院 陕西汉中 723001)

摘要:采用水提醇沉法提取石参粗多糖,通过比色法测定石参多糖对羟自由基($\cdot\text{OH}$)、超氧阴离子($\text{O}_2^- \cdot$)、过氧化氢(H_2O_2)和2,2-二苯基苦基苯肼自由基(DPPH \cdot)的清除率,并与 V_c 进行比较,从而对石参多糖的抗氧化活性进行研究。结果表明,石参多糖具有一定的体外抗氧化能力,与阳性对照 V_c 相比,石参多糖对 H_2O_2 有较强的清除能力,对DPPH \cdot 、 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^- \cdot$ 具有不同的清除活性,清除率与石参多糖浓度呈正相关性。

关键词:石参,多糖,抗氧化作用

Study on antioxidant effect of polysaccharide from Shishen(*Eremurus chinensis*) in vitro

MA Ning, YANG Pei-jun*, LI Hui-ning, PEI Hui-peng, HUANG Jun

(School of Biological Sciences and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723001, China)

Abstract: The polysaccharides from Shishen (*Eremurus chinensis*) were obtained through water extracting and ethanol precipitating method. Clearance rate of the polysaccharides to hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$), superoxide anion ($\text{O}_2^- \cdot$), hydrogen peroxide (H_2O_2) and 2,2-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH \cdot) was determined by UV method, and compared with V_c . Then the antioxidant effects of polysaccharides were studied. The results showed the polysaccharide had certain antioxidant capacity through comparing with positive control V_c . The polysaccharide had stronger capacity of scavenging on the H_2O_2 and had different scavenging activity on the DPPH \cdot , $\cdot\text{OH}$ and $\text{O}_2^- \cdot$. It was indicted to a positive correlation with concentration of polysaccharides.

Key words: Shishen (*Eremurus chinensis*); polysaccharide; antioxidant effect

中图分类号:TS201.1

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2011)11-0148-04

石参属百合科独尾草属独尾草(*Eremurus chinensis* Fedtsch)^[1]肉质根加工的一种稀有山野菜。独尾草属在我国有4种,1种产于西南,3种产于新疆^[2]。陕西省略阳县有独尾草分布,属陕西分布新记录属植物^[3]。石参又名石蒜苔、崖参(陕西略阳),食用部分是肉质根,味甘甜,营养丰富,是陕西南部山区一种稀见的山野菜^[3]。抗氧化活性是保健食品的27种保健功能之一,它能有效清除体内有害自由基,防止自由基对生物大分子的氧化损伤,保证细胞结构与功能的正常^[4]。研究自由基与病理现象的关系,寻找其清除剂已成为目前十分活跃的研究领域。多糖具有免疫调节^[5-6]、抗肿瘤活性^[7]及抗病毒^[8-9]、抗氧化^[10]和抗衰老^[11-12]等作用,而这些作用主要又与多糖的抗氧化作用相关。现代研究发现许多中药多糖都具有提高抗氧化酶活性、清除自由基、抑制脂质过氧化,从而保护生物膜的作用^[13]。目前,独尾草属植物多糖的研究报道较少,未见其清除活性自由基方面的研究报道。因此本文对石参粗多糖的体外抗

氧化活性进行了较为系统的研究,以期发挥资源潜在经济价值提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

石参 购于陕西省汉中市略阳县产地加工产品,烘干,粉碎,过50目筛,备用;邻苯三酚(焦性没食子酸)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、抗坏血酸(V_c)、邻菲罗啉、硫酸亚铁、30%过氧化氢(H_2O_2)、2,2-二苯基苦基苯肼(DPPH)、无水乙醇、无水乙醚、丙酮、正丁醇、三氯甲烷和盐酸均为分析纯。

AL204 电子天平 梅特勒; UV-2550 紫外分光光度计 日本岛津; 数显恒温水浴锅 北京科伟; RV10 旋转蒸发仪 德国 IKA。

1.2 实验方法

1.2.1 石参粗多糖的制备 取一定量石参粉末,置于索氏提取装置中,加入乙醚,45℃回流浸提,以脱去表面脂肪;挥干乙醚,然后加入80%乙醇,热回流去杂3次,每次2h,抽滤。滤渣在90℃料液比1:50条件下浸提2次,每次3h。浓缩滤液,采用Sevag法除蛋白,以1:4加入无水乙醇,有絮状凝胶物和粒状沉淀析出,静置过夜。抽滤,滤渣依次用无水乙醇、丙酮和乙醚洗涤,60℃干燥得淡黄色粉末,即石参粗

收稿日期:2010-11-09 * 通讯联系人

作者简介:马宁(1984-)男,在读硕士,研究方向:植物生物技术。

基金项目:陕西省教育厅研究项目(08JK251);陕西省资源生物重点实验室培育项目(SLGJD0803)。

多糖。

1.2.2 各体系特征吸收波长的确定

1.2.2.1 多糖清除羟自由基($\cdot\text{OH}$)特征波长的确定

采用邻二氮菲- Fe^{2+} 氧化法^[15],取75mmol/L邻二氮菲1.0mL,加入150mmol/L pH 7.4磷酸缓冲液(PBS)1.5mL,充分混匀后,加入7.5mmol/L FeSO_4 溶液1.0mL,每加一管立即混匀,加0.01% H_2O_2 1.0mL,最后以蒸馏水补充至总体积为10.0mL。反应液37℃保温1h后,扫描其300~600nm范围内的紫外吸收曲线,其特征吸收波长为536nm。

1.2.2.2 多糖清除DPPH \cdot 特征波长的确定

按文献[16]方法略加改动,准确称取10.0mg DPPH,用50%乙醇定容于250mL容量瓶中,得到浓度为 1×10^{-4} mol/L的DPPH溶液。取4.0mL DPPH溶液,加入4.0mL 50%乙醇,摇匀,25℃环境中放置40min,扫描其450~550nm范围内的紫外吸收曲线,其特征吸收波长为517nm。

1.2.2.3 多糖清除超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)特征波长的确定

取4.5mL 50mmol/L Tris-HCl缓冲液(pH=8.2) 4.2mL蒸馏水,混匀,置于25℃条件下保温20min后立即加入25℃预热过的0.3mL 3mmol/L邻苯三酚溶液,且加入后快速摇匀,扫描其300~500nm范围内的紫外吸收曲线,其特征吸收波长为325nm。

1.2.3 石参多糖抗氧化活性的测定

1.2.3.1 多糖对羟自由基($\cdot\text{OH}$)的清除作用

根据1.2.2.1方法所测出的吸光度值为 $A_{\text{损伤}}$,样品管中依次加入1.0mL不同浓度多糖溶液后再加入 H_2O_2 37℃保温1h,在特征吸收波长处测 $A_{\text{加样}}$ 。未损伤管为不加 H_2O_2 及多糖溶液。 V_c 为阳性对照。按下式计算自由基清除率。

$$\text{清除率}(\%) = [(A_{\text{加样}} - A_{\text{损伤}}) / (A_{\text{未损伤}} - A_{\text{损伤}})] \times 100\%$$

1.2.3.2 清除DPPH \cdot 能力的测定方法

依1.2.2.2方法,将4.0mL蒸馏水用不同浓度石参多糖样品代替,以特征吸收波长处的吸光度 A_i ,以4.0mL 50%乙醇代替样品得吸光度 A_c ,代替DPPH得吸光度记作空白校正 A_j 值。以 V_c 作为对照。按下式计算自由基清除率。

$$\text{清除率}(\%) = [1 - (A_i - A_j) / A_c] \times 100\%$$

1.2.3.3 多糖对过氧化氢(H_2O_2)清除率的测定

依文献[21]方法,在试管中加入由50mmol/L磷酸缓冲液(pH=7.4)配制的0.5mmol/L H_2O_2 溶液2.8mL,再加入不同浓度的多糖溶液1.0mL后,用纯净水补齐至10.0mL,室温放置10min后,于230nm处测定吸光度值 $A_{\text{样品}}$,对照管为不加多糖溶液。以 V_c 作为对比。按下式计算自由基清除率。

$$\text{清除率}(\%) = (A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}}) / A_{\text{对照}} \times 100\%$$

1.2.3.4 多糖对超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)的抑制作用

依文献[17]方法,按1.2.2.3,取4.5mL 50mmol/L Tris-HCl缓冲液(pH=8.2) 4.2mL蒸馏水,混匀,置于25℃保温20min后,立即加入25℃预热过的1.0mL不同浓度多糖和0.3mL 3mmol/L邻苯三酚溶液,且加入后快速摇匀,然后以空白作对照,测定样品在特征波长处的吸光值,每隔0.5min记录一次,连

续记录4min,用 V_c 作为对比,各管的氧化速率及对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除率按下列公式计算。

$$\text{氧化速率} = (\text{最后1次记录值} - \text{第1次记录值}) / 4$$

$$\text{清除率}(\%) = (\text{自氧化管氧化速率} - \text{样品管氧化速率}) / \text{自氧化管氧化速率} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 石参多糖对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用

石参粗多糖和 V_c 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除效果如图1所示。不同浓度的石参粗多糖对 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ 体系通过Fenton反应产生的 $\cdot\text{OH}$ 具有清除作用,且在所选浓度范围内,随着浓度增大,清除率上升,即清除率与多糖的浓度二者呈正相关。作为对照的 V_c 在浓度为1.0mg/mL时,清除率达到100%;而石参粗多糖浓度为4.5mg/mL时仅有20.6%的清除率,7.0mg/mL时清除率才达100%。表明 V_c 清除 $\cdot\text{OH}$ 自由基活性优良,且清除能力优于石参粗多糖。

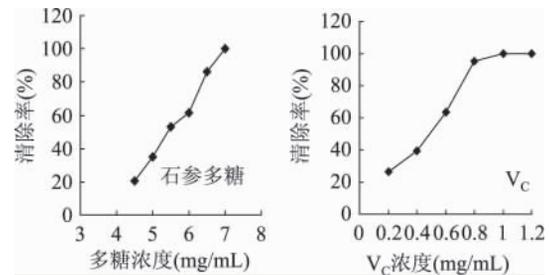


图1 石参多糖和 V_c 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力

2.2 石参多糖对DPPH \cdot 的清除作用

由图2可知,在一定的浓度范围内,石参多糖对DPPH \cdot 的清除率和多糖浓度呈一定的量效关系,随着石参多糖浓度的增加,石参多糖对DPPH \cdot 的清除率也逐步增加。石参多糖对DPPH \cdot 的清除率最终能达到100%,但此时所需石参多糖的最小质量浓度为3.5mg/mL,而 V_c 对DPPH \cdot 的最大清除率仅为94%,所需的最小质量浓度为0.12mg/mL。由此可见,在相同条件下,石参多糖对DPPH \cdot 的清除效果更加彻底,但清除能力远弱于 V_c 。

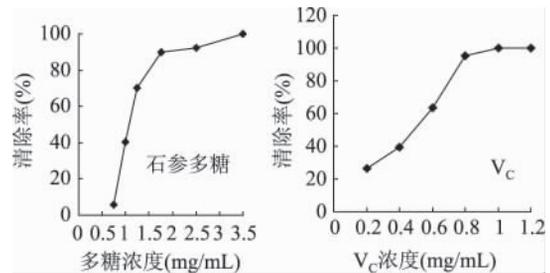


图2 石参多糖和 V_c 对DPPH \cdot 的清除能力

2.3 石参多糖对过氧化氢(H_2O_2)的清除作用

石参多糖和 V_c 对 H_2O_2 的清除率都与浓度呈一定的量效关系,随着浓度的增加,二者对 H_2O_2 的清除率也逐步增加。在0.4~0.9mg/mL质量浓度范围内, V_c 的清除能力略优于石参多糖,当浓度高于0.9mg/mL时,与 V_c 相比,石参多糖对 H_2O_2 的清除能力较强,清除率达到100%时,石参多糖的最小浓度为1.4mg/mL,而 V_c 的最小浓度为1.6mg/mL。表

明石参多糖对 H_2O_2 的清除能力优于 V_c (图3)。

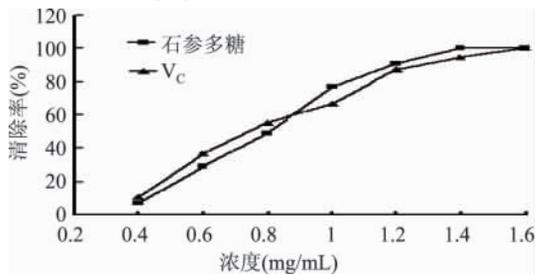


图3 石参多糖和 V_c 对 H_2O_2 的清除能力

2.4 石参多糖对超氧阴离子自由基 ($O_2^- \cdot$) 的清除作用

由图4可知,石参多糖对邻苯三酚自氧化产生的 $O_2^- \cdot$ 具有一定的抑制作用,并随浓度的增加其清除率逐渐上升,二者呈正相关。与 V_c 相比,石参多糖浓度为 10 mg/mL 时,清除率达到 100% ,而 V_c 在浓度为 0.28 mg/mL 时已达最大清除率,说明 V_c 清除 $O_2^- \cdot$ 的能力远强于石参多糖。

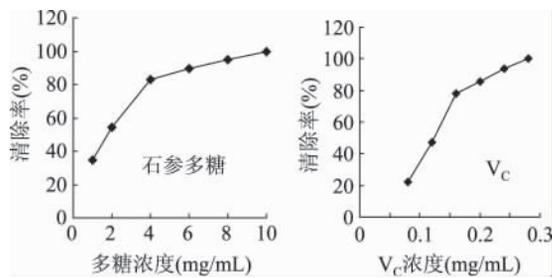


图4 石参多糖和 V_c 对 $O_2^- \cdot$ 的清除能力

3 讨论

随着人们对健康的关注,减少自由基对人体的危害,寻找低毒、高效的天然抗氧化剂已成为现今的研究热点,国内外学者一直在不断寻找能有效清除自由基活性的抗氧化食品^[18]。本实验通过4种体外实验模型研究了食用资源石参多糖的体外抗氧化活性。研究表明,石参多糖在各种体系中均表现出一定的清除能力,但强弱程度并不完全一致。与 V_c 相比,石参多糖对 H_2O_2 有较强的清除作用,浓度高于 0.9 mg/mL 时,石参多糖对 H_2O_2 的清除能力甚至高于阳性对照 V_c ; 对 $\cdot OH$ 和 $DPPH \cdot$ 的清除作用较弱;而对 $O_2^- \cdot$ 的清除作用最弱,需要较高的多糖浓度才能抑制 $O_2^- \cdot$ 。这是由于每一个反应体系的组成组分并不相同,发生的反应及抗氧化作用的机理也不相同。

目前,植物多糖体外抗氧化活性研究报道较多,张莲姬等^[19]对桔梗多糖抗氧化活性研究表明,桔梗多糖清除 $\cdot OH$ 的效果优于对 $O_2^- \cdot$ 的清除效果,这与石参多糖对二者的清除效果一致,但石参多糖对二者的清除作用弱于桔梗多糖。张泽庆等^[20]采用相同的体系研究了防风多糖对 $\cdot OH$, $DPPH \cdot$ 和 $O_2^- \cdot$ 的清除作用,结果表明,在多糖浓度为 8.0 mg/mL 时,防风多糖对 $\cdot OH$ 和 $DPPH \cdot$ 的清除率均接近 70% ,而石参多糖在 7 mg/mL 和 3.5 mg/mL 就已经分别达到二者的最大清除率 (100%),所以石参多糖对 $\cdot OH$ 和 $DPPH \cdot$ 的清除力强于防风多糖。目前,有

关多糖清除 H_2O_2 方面的研究较少,茹巧美等^[21]研究了忽地笑多糖对 H_2O_2 的清除作用,结果表明忽地笑多糖对 H_2O_2 的清除率达 50% 时所需的浓度小于 0.1 mg/mL ; 而石参多糖清除 H_2O_2 的能力明显弱于忽地笑多糖。

本研究的某些模型中,石参多糖表现出的抗氧化活性并不及其阳性对照物 V_c ,但石参是一种野生食用资源,其多糖类物质可以作为一种纯天然抗氧化剂,在人体提供多种营养物质的同时,石参多糖也能抑制人体一部分有害自由基的产生。另外,目前已有研究表明,对已有的抗氧化多糖进行硫酸化、硒化等结构修饰后,所得的硫酸化多糖和硒化多糖比修饰前的抗氧化活性有较大改善^[22-23]。因此,寻找和研究植物活性多糖资源倍受关注;对石参多糖进行进一步的结构改造,有望得到一种安全高效、经济实用的天然抗氧化剂,并在食品、医药工业、化妆品等行业应用,将拓宽石参产品的应用范围,提高其资源价值。

参考文献

- [1]中国科学院中国植物志编委会.中国植物志(第十四卷)[M].北京:科学出版社,1980:35-38.
- [2]王勇,杨培君.陕西省百合科一新纪录属——独尾草属[J].西北植物学报,2007,27(10):2116-2117.
- [3]李新生,杨培君,李会宁,等.陕西地区石参资源的调查[J].氨基酸和生物资源,2002,24(3):1-2.
- [4]凌关庭.抗氧化食品与健康[M].北京:中国医药科技出版社,2000:112-113.
- [5]成静,祝寿芬.大刺猴头多糖的免疫调节功能[J].卫生毒理学杂志,2001,9(2):165-166.
- [6]Srivastava R, Kulshreshtha D K. Bioactive polysaccharides from plants [J]. Photochemistry, 1989, 28(11): 2877-2883.
- [7]蔡永春.中药多糖防治肿瘤研究进展[J].中西医结合杂志,2001,21(12):945-947.
- [8]郑子瑞,戴玲,钟辉.多糖抗病毒活性的研究进展[J].生物技术通讯,2008,19(5):763-764.
- [9]张莅峡,刘泓,常雅萍.红毛五加多糖抗病毒效应的实验研究[J].中国中医基础医学杂志,1999,5(3):25-27.
- [10]徐大量,林辉,李盛青,等.玉竹水提液体内外抗氧化的实验研究[J].中药材,2008,31(5):729-731.
- [11]单颖,潘兴瑜,姜东,等.玉竹多糖抗衰老的实验观察[J].中国临床康复,2006,10(3):79-81.
- [12]郭景仙.重要多糖类成分抗衰老作用的现代研究与应用[J].中国自然医学杂志,2000,2(3):91-92.
- [13]辛晓林.中药多糖抗氧化作用研究进展[J].中国中医药大学学报,2000,23(5):45-46.
- [14]朱晓霞,罗学刚.多糖提取与纯化技术应用进展[J].食品研究与开发,2007,28(3):186-189.
- [15]金鸣,蔡亚欣,李金荣,等.邻二氮菲- Fe^{2+} 氧化法检测 H_2O_2/Fe^{2+} 产生的羟自由基[J].生物化学与生物物理进展,1996,23(6):553-555.
- [16]严成,严夏.枸杞多糖提取工艺比较及体外抗氧化性研

(下转第155页)

烷、芳樟醇、 α -蒎烯等合占精油总量 92.22%。

薰衣草薄荷精油中,以芳樟醇为主的醇类占 59.50%,与孟士德薰衣草挥发性主要成分种类相似^[9];酯类则以邻氨基苯甲酸芳樟酯为主,占 18.87%;但未发现酮类化合物,而郝俊蓉等^[9]对观赏类薰衣草的研究发现,Helmsdale 薰衣草以樟脑、葑酮等酮类含量最高。

迷迭香精油中,醇类和酮类含量相对较大,且主要以 1,8-桉叶素、樟脑等单精油成分为主。高于 2%的精油成分总含量可达 87.97%。

3 讨论

香桃木、薰衣草薄荷、迷迭香分属于不同科属,其精油含量不同,表现为:迷迭香 > 薰衣草薄荷 > 香桃木;残渣水提物的提取率相差不大,且远高于精油提取率。

3 种精油都有较明显的抑菌作用,以薰衣草薄荷精油效果最好,残渣水提物的抑菌敏感性则相对较低。GC/MS 分析精油成分,均发现醇类在精油中含量最高;酯类在香桃木和薰衣草薄荷精油中也占有较大比例,迷迭香精油虽只有 5 种酮类成分,含量也高达 35.31%,因此 3 种植物精油成分及含量都各有差异。

萜类广泛存在于自然界,作为挥发油的主要成分,可以是醇、醛、酮、羧酸酯等,如芳樟醇、樟脑、蒎烯、 α -松油醇等,且具有祛痰、驱虫、镇痛等生理活性。萜类及衍生物在薰衣草薄荷、香桃木和迷迭香精油中的含量分别为 79.63%、59.80% 和 60.36%,与薰衣草薄荷抑菌效果一致。1,8-桉叶素等醇类物质确有显著的抑菌活性^[10-11],推测精油中富含的醇类、酮类、酯类物质是导致其具有抑菌作用的主要原因,且各类化合物协同促使精油具备高的抑菌敏感性。

黄酮类化合物^[12]具有抗氧化、抗肿瘤、抗菌、抗炎、抗衰老等功效,酚类也可通过使蛋白质凝固发挥强烈的杀菌作用。我们研究发现此 3 种植物残渣水提物中富含黄酮类和酚类有效组分(数据未发表),与文献[13-15]报道一致,香桃木、迷迭香、薄荷等都富含黄酮类和酚类,虽然其抑菌敏感性远不如精油,却表现出较高的抗氧化性^[3,5,16]。因此,高提取率的残渣水提物仍具有较大的开发潜力。

我国拥有丰富的植物资源,充分利用芳香植物天然抗氧化剂的优势,并发展其防腐应用,可在食品保鲜、医药、化妆品等行业为人类健康发展带来更大的福音。

参考文献

- [1] Stephen A R, Xavier R, Joseph F, et al. Toxicological and metabolic investigations of the safety of LAE [J]. Food and Chemical Toxicology 2004, 42: 245-259.
- [2] 左安连, 姚雷. 香桃木不同生长期及干燥叶精油成分分析 [J]. 上海交通大学学报: 农业科学版 2006, 24(4): 349-357.
- [3] 张军, 陈季武, 袁萌芽, 等. 薰衣草薄荷叶非精油组分清除自由基作用的研究 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2008, 36(2): 159-164.
- [4] 冷桂华, 邹佑云. 迷迭香在食品工业中的应用 [J]. 安徽农业大学 2007, 35(21): 6587-6595.
- [5] 方献平, 陈季武, 肖露平, 等. 香桃木叶非精油组分体外清除自由基和抗氧化作用研究 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版 2009, 37(5): 201-210.
- [6] 何斌, 何少江. 微生物学实验 [M]. 北京: 科学出版社, 2004: 85.
- [7] 顾仁勇, 张丽, 傅伟昌, 等. 芭蕉汁的抑菌作用 [J]. 食品与发酵工业 2005, 31(3): 57-59.
- [8] 郭志坚, 郭好书, 何康明, 等. 黄柏叶黄酮醇含量测定及其抑菌实验 [J]. 暨南大学学报 2002, 23(5): 64-66.
- [9] 郝俊荣, 姚雷, 袁关心, 等. 精油类和观赏类薰衣草的生物学性状和精油成分对比 [J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2006, 24(2): 146-151.
- [10] Kim J, Marshall M R, Cheng W, et al. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens [J]. Agricultural Food Chemistry, 1995, 43(11): 2839-2845.
- [11] Sreedhar L, Kohayashi DY, Bunting TE, et al. Fungal proteinase expression in the interaction of plant pathogen Magnaporthe poae with its host [J]. Gene, 1999, 235(1-2): 121-129.
- [12] 王晓梅, 曹稳根. 黄酮类化合物药理作用的研究进展 [J]. 宿州学院学报 2007, 22(1): 41-107.
- [13] Randrianarivelo R, Sarter S, Odoux E, et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils of Cinnamomum fragrans [J]. Food Chemistry 2009, 114(2): 680-684.
- [14] 程伟贤, 陈鸿雁, 张义平, 等. 迷迭香化学成分研究 [J]. 中草药 2005, 36(11): 1622-1624.
- [15] 张继东, 王庆琪. 薄荷残渣中化学成分及抗炎作用 [J]. 山东医药工业 2000, 19(3): 34-35.
- [16] 肖露平, 陈季武, 孔静思, 等. 迷迭香叶非精油组分的清除自由基和抗氧化作用 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版 2010, 38(1): 53-59.

(上接第 150 页)

究 [J]. 食品科学 2008, 29(7): 183-187.

[17] 林丽清, 黄丽英, 郑艳洁, 等. 金钱莲多糖的提取及清除氧自由基作用的研究 [J]. 福建中医学院学报, 2006, 16(5): 37-39.

[18] 俞慧红, 竺巧玲, 戴飞, 等. 多糖抗氧化作用的研究现状 [J]. 食品研究与开发 2008, 29(3): 172-176.

[19] 张莲姬, 南昌希, 张丽霞. 桔梗多糖的提取及抗氧化作用研究 [J]. 食品与机械 2008, 24(3): 60-63.

[20] 张泽庆, 田应娟, 张静. 防风多糖的抗氧化活性研究 [J].

中药材 2008, 31(2): 268-272.

[21] 茹巧美, 裴真明, 郑海雷. 忽地笑多糖的体外抗氧化和抑菌活性研究 [J]. 中药材 2008, 31(10): 1536-1540.

[22] 张亚费, 吴风兰, 张明珠. 硒化黄芪多糖对小鼠的抑瘤和抗氧化作用研究 [J]. 中国公共卫生学报, 1997, 16(4): 22-26.

[23] Huamao Y, Weiwei Z, Xuegang L, et al. Preparation and in vitro antioxidant activity of oligosaccharides and their over sulfated, acetylated and phosphorylated derivatives [J]. Carbohydrate Research 2005, 34(4): 685-688.