

新疆藁本多糖的提取、理化性质与生物活性

李文文, 蔺永刚, 边鹏, 庞娟霞,
王俊龙*, 时文盼, 努尔买买提*

(伊犁师范大学 微生物资源保护与开发利用重点实验室, 新疆 伊宁 835000)

摘要: 采用超声辅助离子液体 [1-乙基-3-甲基咪唑溴盐 (EMIMBr)] 对新疆藁本多糖进行提取, 优化了提取工艺。采用 FTIR、SEM、UV-Vis 吸收光谱对新疆藁本多糖经除蛋白、色素和小分子等杂质后得到的新疆藁本粗多糖 (CV-1) 进行了表征; 评价了 CV-1 体外抗氧化能力和降糖能力。结果表明, 在料液比 (即新疆藁本干粉质量与蒸馏水体积之比, g : mL) 1 : 50、果胶酶含量 (以新疆藁本干粉质量为基准, 下同) 0.6%、超声时间 115 min、超声温度 55 °C、酶解时间 90 min、离子液体质量浓度 4 g/L 的最佳提取工艺条件下, 新疆藁本多糖提取量为 (125.278±0.707) mg/g; CV-1 单糖重均相对分子质量为 17570, 主要含有 (摩尔分数) 40.83%岩藻糖、28.03%鼠李糖、18.40%阿拉伯糖、6.80%葡萄糖和 5.94%甘露糖; CV-1 是无定形与晶体结构共存的、具有三螺旋构象的 α -构型糖苷, 且含有极少量的蛋白质和糖醛酸; CV-1 呈片状结构, 局部表面平整, 在 550 °C 时失重率 81.55%; CV-1 水溶液对羟基自由基、2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐自由基半数抑制浓度 (IC₅₀) 分别为 1.373、1.122 g/L, 对 α -葡萄糖苷酶、 α -淀粉酶的 IC₅₀ 分别为 14.799、15.739 g/L。

关键词: 新疆藁本多糖; 提取工艺; 理化性质; 抗氧化活性; 降糖活性; 中药现代化技术

中图分类号: TQ28

文献标识码: A

文章编号: 1003-5214 (2024) 09-1966-12

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Extraction, physicochemical properties and bioactivities of polysaccharides from *Conioselinum vaginatum*

LI Wenwen, LIN Yonggang, BIAN Peng, PANG Juanxia,
WANG Junlong*, SHI Wenpan, NUER Maimaiti*

(Key Laboratory of Microbial Resources Conservation and Development and Utilization, Yili Normal University, Yining 835000, Xinjiang, China)

Abstract: Polysaccharides were extracted from *Conioselinum vaginatum* via ultrasonic-assisted ionic liquid [1-ethyl-3-methylimidazole bromide (EMIMBr)], with the optimal extraction process optimized. The crude polysaccharides of *Conioselinum vaginatum* (CV-1), with impurities such as protein, pigment and small molecules removed, were characterized by FTIR, SEM and UV-Vis absorption spectroscopy, and were further evaluated for its *in vitro* antioxidant and hypoglycemic capacities. The results showed that under the optimal extraction process of material-liquid ratio (the ratio of *Conioselinum vaginatum* dry powder mass to distilled water volume, g : mL) 1 : 50, pectinase content (based on the mass of *Conioselinum vaginatum* dry powder, the same below) 0.6%, sonication time 115 min, sonication temperature 55 °C, enzyme digestion time 90 min, ionic liquid mass concentration 4 g/L, polysaccharides extracted from *Conioselinum vaginatum* reached (125.278±0.707) mg/g. CV-1 showed a weight-average relative molecular mass of 17570, and mainly consisting of 5 kinds of monosaccharide (molar fraction): fucose (40.83%), rhamnose (28.03%), arabinose (18.40%), glucose (6.80%) and mannose (5.94%), but very little protein and uronic acid. Meanwhile, CV-1 was an

收稿日期: 2023-09-22; 定用日期: 2023-11-10; DOI: 10.13550/j.jxhg.20230800

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82060774); 2022 年伊犁师范大学微生物资源保护与开发利用重点实验室项目 (YLUKLM2022001); 伊犁师范大学科研创新团队项目 (CXZK2021003)

作者简介: 李文文 (1996—), 女, 硕士生, E-mail: 1456801508@qq.com。联系人: 王俊龙 (1992—), 男, 实验师, E-mail: 974881461@qq.com; 努尔买买提 (1971—), 男, 副教授, E-mail: 2696232271@qq.com。

amorphous and crystalline α -configurational glycoside with trihelical conformation, and displayed a lamellar structure with a flat local surface and a mass loss rate of 81.55% at 550 °C. The median inhibition concentrations (IC₅₀) for diammonium 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) radical and hydroxyl radical were 1.122 and 1.373 g/L, respectively, and those for α -glucosidase and α -amylase were 14.799 and 15.739 g/L.

Key words: *Conioselinum vaginatum* polysaccharides; extraction process; physicochemical properties; antioxidant activities; hypoglycemic activities; modernization technology of traditional Chinese medicine

藁本 (*Ligusticum sinense* Oliv) 为伞形科藁本属, 其干燥的根茎可以入药, 具有祛风散寒、除湿止痛、降血脂等功效^[1-2]。藁本药用历史悠久, 价值较高, 以其为主要原料, 已开发了百余种中成药, 如: 小儿鼻炎片、芍菊上清丸、女金丸、天菊脑安胶囊、镇脑宁胶囊等^[3]。近年来, 由于人为破坏和过度采挖, 藁本资源日益枯竭。新疆藁本 [*Conioselinum vaginatum* (Spreng)] 为伞形科山芎属植物鞘山芎的干燥根茎, 与藁本外观相同、功效相似。新疆藁本蕴藏量较大, 资源更为丰富, 且在新疆伊犁等地区已有大面积的人工栽培, 在一定程度上可以弥补藁本的短缺。

目前, 有关新疆藁本的研究主要集中在挥发油成分上, 活性研究也只局限在抑菌、抗炎等方面^[4], 关于新疆藁本多糖的研究鲜见报道。多糖是由单糖聚合形成的一类天然高分子化合物, 广泛分布于植物、动物和微生物中。植物多糖中单糖组成种类较多, 结构较为复杂。现代药理学研究表明, 植物多糖具有抗肿瘤^[5-6]、抗病毒^[7]、降血糖^[8-9]、抗氧化^[10-11]等药理活性。目前对植物多糖的研究, 尤其是多糖结构的高级表征方面相对薄弱, 导致植物多糖资源尚未被充分利用。

离子液体是由有机阳离子和无机阴离子组成, 具有低熔点、高热稳定性、宽液相范围和低蒸汽压等特性。作为溶剂使用时, 与传统有机溶剂相比, 具有灵敏度高、不易挥发、用量少等优点。超声波作为一项物理加工技术, 常作为辅助手段应用于植物多糖的提取中^[12]。徐湘等^[13]比较了酶解超声辅助、热水浸提、超声提取、酶解提取淮山多糖的最优提取工艺条件, 结果发现, 酶解超声辅助多糖得率最高, 体外抗氧化活性最好。ZHENG 等^[14]采用离子液体、热水和酶提取人参多糖, 得到的离子液体可溶性人参多糖对人体内淋巴细胞增殖的刺激作用优于热水和淀粉酶提取的多糖。

本文拟以新疆藁本为原料, 采用超声辅助离子液体对新疆藁本多糖提取工艺进行优化, 对经除蛋白和小分子杂质后的多糖的单糖组成、重均相对分子质量 (简称分子量) 进行测定, 并对其理化性质进行研究, 考察其抗氧化能力和体外降糖活性, 以

期为新疆藁本多糖的开发、替代藁本药材用药提供一定的实验依据。

1 实验部分

1.1 材料、试剂与仪器

新疆藁本根茎, 采自新疆伊犁新源县, 由伊犁师范大学伊犁河谷药用植物资源重点实验室、微生物资源保护与开发利用重点实验室张维教授、崔东教授共同鉴定为伞形科山芎属植物新疆藁本 (*Conioselinum vaginatum*)。

葡萄糖、无水乙醇、苯酚、硫酸、 α -葡萄糖苷酶、 α -淀粉酶、蓝色葡聚糖、七水合硫酸亚铁 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), AR, 天津市科密欧化学试剂有限公司; Seavage 试剂 (氯仿与正丁醇体积比为 4 : 1), 自制; 1-苯基-3-甲基-5-吡啶酮 (PMP)、2,2'-联氮双(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二胺盐 (ABTS)、4-硝基苯基- β -D-半乳糖苷 (PNPG)、乙二胺四乙酸 (EDTA)、1-乙基-3-甲基咪唑溴盐 (EMIMBr)、四乙基氯化铵 (TEAC)、1-丁基-3-甲基咪唑氯盐 (BMIMCl)、1-辛基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐 ([OMIM]PF₆), AR, 福州飞净生物科技有限公司; 浓硫酸 (质量分数 98%), 国药集团化学试剂有限公司; 过氧化氢 (质量分数 30%), CP, 成都金山化学试剂有限公司; 抗坏血酸 (V_C), AR, 天津基准化学试剂有限公司; 正丁醇 (C₄H₁₀O), AR, 天津市富宇精细化工有限公司; 实验用水为蒸馏水, 自制。

UV-2550 型紫外-可见分光光度计, 上海赫普国际贸易有限公司; MB-580 型酶标仪, 上海闪谱生物科技有限公司; IR Prestige-21 型傅里叶变换红外光谱仪 (FTIR)、LC-20AB 型高效液相色谱仪, 日本 Shimadzu 公司; D8 Avance A25 型 X 射线衍射仪 (XRD), 德国 Bruker 公司; TGL-16C 型高速台式离心机, 上海安亭科学仪器有限公司; RE-2000A 型旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器公司; 7500F 型扫描电子显微镜 (SEM), 日本 Hitachi 公司; STA449 F3 型同步热分析仪, 德国 Netzsch 公司。

1.2 方法

1.2.1 新疆藁本预处理

将新疆藁本常温干燥 15 d、粉碎, 过 20 目筛后,

精确称取 10.0 g 于索氏提取器中用石油醚脱脂 24 h、无水乙醇脱色素 24 h 后, 收集滤渣在 60 °C 下烘干 24 h, 得到 9.4 g 新疆藁本干粉, 备用。

1.2.2 新疆藁本多糖提取

精确称量 1.0 g 新疆藁本干粉于烧杯中, 加入 50 mL 蒸馏水 (加酶或离子液体) 进行超声加热提取 (50 °C 提取 80 min), 待溶液冷却后离心取上清液, 旋转蒸发至原体积 1/3 后加入 1/4 体积 Sevage 试剂搅拌均匀, 离心, 弃沉淀, 再次取上清液加 4 倍体积的无水乙醇于 4 °C 过夜后离心, 将沉淀物装入透析袋 (截留分子量 350000) 透析 3 d, 透析袋内液体经真空冷冻干燥 (-70 °C、5 Pa) 得 0.29 g 浅黄色片状新疆藁本粗多糖 (CV-1), 备用。

1.2.3 多糖标准曲线绘制及新疆藁本多糖提取量计算

多糖标准曲线绘制参照文献[15]稍加修改, 精确配制质量浓度为 1 g/L 的葡萄糖标准液备用。分别移取 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 mL 葡萄糖标准液于试管中, 加蒸馏水补至 1 mL, 然后分别加入 1 mL 质量分数为 6% 的苯酚水溶液、5 mL 质量分数为 98% 的浓硫酸混匀, 静置 15 min 后, 于沸水浴反应 20 min 后, 冷却至室温, 用酶标仪测定其在 490 nm 波长下的吸光度。以葡萄糖质量浓度 (g/L) 为横坐标, 吸光度为纵坐标绘制标准曲线, 得到标准曲线方程为: $y=8.2476x+0.0508$ ($R^2=0.9994$)。将 1.2.2 节得到的粗多糖加蒸馏水配成与葡萄糖标准液同质量浓度的溶液代替葡萄糖标准液, 用酶标仪测定溶液在 490 nm 处的吸光度, 根据标准曲线方程得到多糖质量浓度, 按公式 (1) 计算多糖提取量 (mg/g)。

$$\text{多糖提取量} = \frac{\rho \times V \times N}{M} \quad (1)$$

式中: ρ 为粗多糖溶液中多糖的质量浓度, g/L; V 为定容体积, mL; N 为稀释倍数; M 为新疆藁本干粉质量, g。

1.2.4 单一生物酶、离子液体对新疆藁本多糖提取量的影响

分别称取质量分数为 0.6% (以新疆藁本干粉质量计, 下同) 的蛋白酶、纤维素酶、果胶酶、木聚糖酶、甘露糖酶, 在 5 种酶各自最佳酶解条件下超声加热 80 min, 考察其对新疆藁本多糖提取量的影响, 以直接水提法为对照 (工艺条件与加酶后完全一致), 选取对多糖提取量影响最大的生物酶作为辅助酶。单一生物酶推荐最佳酶解条件如下: 蛋白酶, 50 °C、pH=5.0; 纤维素酶, 38 °C、pH=4.5; 果胶酶, 50 °C、pH=5.0; 木聚糖酶, 55 °C、pH=5.0; 甘露糖酶, 50 °C、pH=4.5。分别称取一定量的 EDTA、EMIMBr、TEAC、BMIMCl、[OMIM]PF₆, 加入蒸

馏水配成质量浓度为 5 g/L 的离子液体水溶液, 以直接水提法作为对照 (工艺条件与加离子液体后完全一致), 选取对多糖提取量影响最大的离子液体作为辅助液。

1.2.5 单因素实验

为确定最佳提取条件, 依次考察超声时间、酶解时间、超声温度、离子液体质量浓度、料液比 (g : mL) 和辅助酶质量分数 6 个单因素对新疆藁本多糖提取量的影响。

首先考察超声时间 (40、60、80、100、120、140、160 min) 对新疆藁本多糖提取量的影响, 其他条件为: 酶解时间 90 min, 超声温度 50 °C, 离子液体质量浓度 4 g/L, 料液比 (g : mL) 1 : 60, 添加质量分数为 0.6% 的辅助酶 (以新疆藁本干粉质量为基准, 下同)。以确定的最佳超声时间为反应条件, 其他基本反应条件为酶解时间 90 min、超声温度 50 °C、离子液体质量浓度 4 g/L、料液比 (g : mL) 1 : 60、辅助酶质量分数 0.6%, 考察单一因素时其他条件以此为准。

按照上述方法, 依次考察并确定其他 5 个影响因素: 酶解时间 (30、50、70、90、110、130、150 min)、超声温度 (20、30、40、50、60、70、80 °C)、离子液体质量浓度 (1、2、3、4、5、6、7 g/L)、料液比 (g : mL, 1 : 30、1 : 40、1 : 50、1 : 60、1 : 70、1 : 80、1 : 90)、辅助酶质量分数 (0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%、1.2%、1.4%) 对新疆藁本多糖提取量的影响。直至单因素实验结束, 每个因素平行 3 次实验。

1.2.6 响应面实验

在单因素实验结果的基础上, 选取超声时间 (A)、酶解时间 (B)、超声温度 (C)、离子液体质量浓度 (D) 为自变量, 以新疆藁本多糖提取量 (mg/g) 为响应值, 设计 Box-Behnken 的四因素三水平 (-1、0、1) 实验。

1.2.7 新疆藁本粗多糖的纯化

将 1.2.5 节优化提取的新疆藁本多糖与 Sevage 试剂按体积比 4 : 1 混匀, 离心 (4000 r/min, 10 min), 弃沉淀, 收集上清液得到新疆藁本粗多糖溶液, 将粗多糖溶液置于透析袋 (截留分子量为 350000) 中透析除去色素和小分子杂质后, 在 -60 °C、10 kPa 下冷冻干燥得到棉絮状的粗纯化多糖, 标记为 CV-1。

1.3 CV-1 中蛋白质、糖醛酸质量分数的测定

1.3.1 蛋白质质量分数的测定

参照文献[16]稍加修改。样品中蛋白质质量分数采用考马斯亮蓝法测定: 用蒸馏水精确配制质量浓度为 1 g/L 的牛血清白蛋白标准液, 备用; 用无水乙醇配制质量浓度为 2 g/L 的考马斯亮蓝溶液

100 mL 后, 加入 100 mL 质量分数 85% 的磷酸, 加蒸馏水定容至 1 L 棕色容量瓶中, 得到考马斯亮蓝标准液, 备用; 分别移取 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mL 牛血清白蛋白标准液于试管中, 加蒸馏水补至 1 mL, 然后依次加入 4 mL 考马斯亮蓝标准液, 静置 20 min 待充分混匀后, 用酶标仪测其在 595 nm 处的吸光度。以牛血清白蛋白质量浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标绘制标准曲线, 得到标准曲线方程为: $y=1.9725x+0.0399$ ($R^2=0.9991$)。用待测样品代替牛血清白蛋白标准液, 处理后用酶标仪测定其在 595 nm 波长处的吸光度, 代入标准曲线方程后得样品中蛋白质的质量浓度。按公式 (2) 计算蛋白质质量分数:

$$\text{蛋白质或糖醛酸质量分数} / \% = \frac{\rho V}{m} \times 100 \quad (2)$$

式中: ρ 为蛋白质或糖醛酸质量浓度, g/L; V 为定容体积, mL; m 为粗纯化多糖质量, mg。

1.3.2 糖醛酸质量分数的测定

参考文献[15]稍加修改。样品中糖醛酸质量分数采用硫酸咔唑法测定: 用蒸馏水配制质量浓度为 1 g/L 半乳糖醛酸标准液; 用浓硫酸配制质量分数为 0.5% 的四硼酸钠-硫酸溶液; 用无水乙醇配制质量分数为 0.1% 咔唑溶液, 备用。分别移取 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mL 半乳糖醛酸标准液于试管中, 加蒸馏水补至 1 mL, 然后分别加入 4 mL 四硼酸钠-硫酸溶液、0.2 mL 咔唑溶液, 静置 10 min 待充分混匀后, 用酶标仪在 530 nm 波长下测其吸光度。以半乳糖醛酸质量浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标绘制标准曲线, 得到标准曲线方程为: $y=2.0739x+0.023$ ($R^2=0.9992$)。用待测样品代替半乳糖醛酸标准液, 处理后用酶标仪测其在 530 nm 处的吸光度, 代入标准曲线方程得到样品中糖醛酸的质量浓度。按公式 (2) 计算糖醛酸质量分数。

1.4 CV-1 理化性质测定

1.4.1 重均分子量测定

CV-1 重均分子量用高效液相色谱法进行测定。精密配制质量浓度为 3 g/L 的 CV-1 水溶液; 采用不同重均分子量的葡聚糖 ((5、10、15、20、25、30) $\times 10^3$) 为标准液。色谱分析条件: 水为流动相, 上样量 15 μ L, 流速 0.4 mL/min, TSK-gel-G3000PWXL 柱 (300 mm \times 7.8 mm \times 7 μ m), RID-10A 示差检测器; 柱温 35 $^{\circ}$ C; 进样葡聚糖标准液得到 HPLC 谱图。以出峰时间为横坐标, 葡聚糖重均分子量的对数为纵坐标绘制标准曲线, 得到标准曲线方程为: $y=-0.3952x+9.134$ ($R^2=0.9904$)。将进样换成 CV-1 水溶液, 得到的出峰时间代入标准曲线方程中得到其重均分子量。

1.4.2 单糖组成分析

参考文献[17]并稍作修改。CV-1 衍生化: 精确称量 30.0 mg 的 CV-1, 与 5 mL 浓度为 2 mol/L 三氟乙酸 (TFA) 混匀, 沸水浴水解 6 h 后, 加入 10 mL 甲醇, 减压旋蒸除去多余 TFA (重复 3~5 次) 后加入 5 mL 蒸馏水溶解得到 CV-1 溶液。取 200 μ L 的 CV-1 溶液、200 μ L 浓度为 0.6 mol/L 的 NaOH 水溶液、400 μ L 用甲醇溶解的浓度为 0.5 mol/L 的 PMP 溶液三者涡旋混合, 于 70 $^{\circ}$ C 反应 120 min, 冷却至室温后, 加入 400 μ L 浓度为 0.3 mol/L 盐酸终止反应, 用等体积的二氯甲烷萃取 5 次, 取水层用滤膜 (0.45 μ m) 过滤, 待检测。

单糖衍生化: 无需 TFA 处理, 其余步骤同 CV-1 衍生化一样。

采用高效液相色谱法测定 CV-1 单糖组成。色谱条件: ZORBEXplus 柱 (4.6 mm \times 250 mm \times 5 μ m), 进样量 20 μ L, 浓度为 50 mmol/L 的磷酸钠缓冲液 (pH=6.8) 与乙腈体积比为 83:17 的混合液作为流动相, 检测波长 245 nm, 流速 1 mL/min。

1.4.3 UV-Vis 光谱测试

精确配制质量浓度为 1 g/L 的 CV-1 水溶液, 用蒸馏水作对照, 于 200~400 nm 内进行全波长扫描, 观察 260、280 nm 处是否有紫外吸收峰。

1.4.4 FTIR 测试

精确称取 CV-1 粉末 10.0 mg 与 200 mg 溴化钾粉末一起研磨至细粉状, 将其进行压片制成厚 1 mm 透明薄片, 测试波数范围 4000~400 cm^{-1} 。

1.4.5 三螺旋结构测试

取 2 mL 质量浓度为 4 g/L 的 CV-1 水溶液, 依次加入各 2 mL 浓度为 0.3 mmol/L 的刚果红水溶液和 NaOH 水溶液 (0~0.5 mol/L), 混匀后避光反应 10 min, 采用紫外-可见分光光度计在 200~800 nm 范围内进行扫描, 记录不同浓度 NaOH 溶液的最大吸收波长。以不加入 CV-1 的刚果红水溶液-NaOH 溶液作空白组。每次实验平行 3 次。

1.4.6 XRD 测试

将 CV-1 研磨成细粉, 在室温下用 XRD 扫描 $2\theta=5^{\circ}\sim 80^{\circ}$ 范围内衍射峰, 扫描速率 6 ($^{\circ}$)/min。

1.4.7 TGA 测试

取 10 mg 的 CV-1 置于铂坩埚中, N_2 作为样品保护气, 升温速率 10 $^{\circ}$ C/min, 通过同步热分析仪采集从 25 $^{\circ}$ C 到 550 $^{\circ}$ C 的热失重 (TGA) 数据和差示扫描量热法 (DTG) 数据。

1.4.8 SEM 测试

取适量 CV-1 置于样品架上, 使用离子溅射仪喷金处理后, 在加速电压 10 kV 下用 SEM 观察 CV-1 的表面形貌。

1.5 CV-1 抗氧化、降糖能力测定

工作液制备：精确称量 8.00 g 的 NaCl、0.20 g 的 KCl、1.44 g 的 NaHPO₄、0.24 g 的 KH₂PO₄ 溶于蒸馏水，使用磷酸和 NaOH 调至中性后，定容至 1 L 容量瓶中，即得磷酸盐缓冲液（PBS）；精确称量 0.0384 g 的 ABTS 粉末，用浓度为 3 mmol/L 的过硫酸钾水溶液溶解后定容至 10 mL，避光反应 12 h 后，用 PBS 稀释至 200 mL 即得 ABTS 工作液；精确称量 3.0 g 的 3,5-二硝基水杨酸，加蒸馏水溶解后定容至 500 mL，50 °C 水浴加热 30 min，同时缓慢加入 100 mL 质量浓度为 200 g/L 的 NaOH 水溶液，待溶液清澈后，依次加入四水合酒石酸钾 10.0 g、苯酚 3.00 g、无水亚硫酸钠 2.50 g，继续水浴加热 30 min，待固体完全溶解后，停止加热，冷却至室温避光保存 7 d 后即得二硝基水杨酸（DNS）试剂。

1.5.1 羟基自由基清除率

取 0.2 mL 不同质量浓度（0.25、0.5、1、2、4、8、16 g/L）的 CV-1 水溶液，加入各 0.2 mL 浓度为 6 mmol/L 的 FeSO₄ 溶液、质量分数为 30% 的过氧化氢溶液、以无水乙醇配制的浓度为 6 mmol/L 水杨酸溶液，振荡混匀，于 37 °C 水浴加热 1 h，移至 96 孔板，以 V_C 为阳性对照，用酶标仪在 510 nm 波长下测吸光度。CV-1 水溶液加 FeSO₄ 溶液、过氧化氢溶液、水杨酸溶液测定吸光度 A₁；以等体积蒸馏水代替 CV-1 水溶液测定吸光度 A₀；以等体积的蒸馏水代替过氧化氢溶液测定吸光度 A₂。按公式（3）计算羟基自由基清除率（%），平行实验 3 次，取算数平均值。

$$\text{自由基清除率} / \% = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0} \right) \times 100 \quad (3)$$

1.5.2 ABTS 自由基清除率

取 0.2 mL 不同质量浓度（0.25、0.5、1、2、4、8、16 g/L）的 CV-1 水溶液，加入 0.2 mL 的 ABTS 工作液，振荡混匀，移至 96 孔板，以 V_C 为阳性对照，用酶标仪在 734 nm 波长下测其吸光度。CV-1 水溶液加 ABTS 工作液测定吸光度 A₁，以等体积质量分数为 30% 过氧化氢溶液代替 CV-1 水溶液测定吸光度 A₀；以等体积质量分数为 30% 过氧化氢溶液代替 ABTS 工作液测定吸光度 A₂。按公式（3）计算 ABTS 自由基清除率（%），平行实验 3 次，取算数平均值。

1.5.3 α-葡萄糖苷酶抑制率

参照文献[18]稍加修改。将 CV-1 和阿卡波糖分别用 PBS 配制成质量浓度为 0.25、0.5、1、2、4、8、16 g/L 的溶液；用 PBS 分别配制浓度为 8 mmol/L 的 PNPG 溶液和 0.2 U/mL 的 α-葡萄糖苷酶溶液；取 50 μL 不同质量浓度的 CV-1/PBS 溶液、100 μL 的 α-

葡萄糖苷酶溶液，移至 96 孔板，于 37 °C 温孵 20 min 后加 50 μL 的 PNPG 溶液，以阿卡波糖为阳性对照，用酶标仪在 405 nm 波长下测定吸光度 A₁；以等体积 PBS 代替 CV-1/PBS 溶液测定吸光度 A₀；以等体积 PBS 代替 α-葡萄糖苷酶溶液测定吸光度 A₂。按公式（4）计算 α-葡萄糖苷酶抑制率（%），平行实验 3 次，取算数平均值。

$$\text{抑制率} / \% = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0} \right) \times 100 \quad (4)$$

1.5.4 α-淀粉酶抑制率

用 PBS 分别配制质量分数为 5% 可溶性淀粉溶液、2 U/mL 的 α-淀粉酶溶液；取 300 μL 不同质量浓度的 CV-1/PBS 溶液（同 1.5.3 节）、400 μL 的 α-淀粉酶溶液、300 μL 可溶性淀粉溶液，混匀后于 37 °C 温孵 20 min，加 DNS 试剂沸水浴 10 min，冷却后用 PBS 定容至 10 mL，以阿卡波糖为阳性对照，用酶标仪在 540 nm 波长下测定吸光度 A₁；以等体积 PBS 代替 CV-1/PBS 溶液测定吸光度 A₀；以等体积 PBS 代替 α-淀粉酶溶液测定吸光度 A₂。按公式（4）计算 α-淀粉酶抑制率（%），平行实验 3 次，取算数平均值。

2 结果与讨论

2.1 单一生物酶、离子液体对多糖提取量的影响

图 1 为单一生物酶、离子液体对新疆藁本多糖提取量的影响。

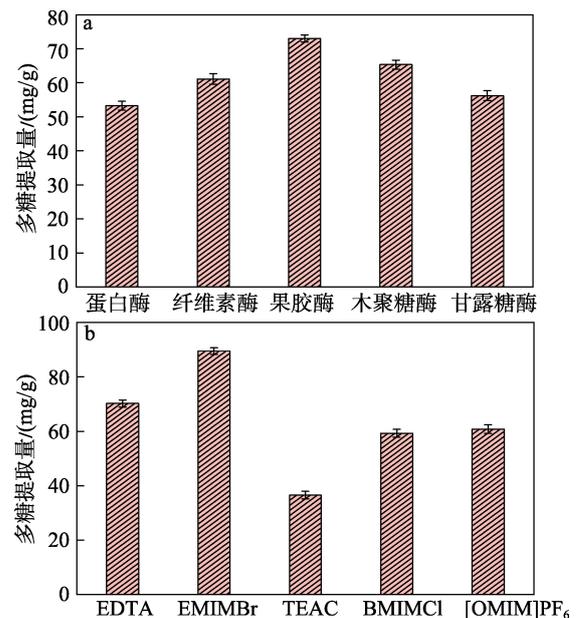


图 1 单一生物酶 (a) 和单一离子液体 (b) 对多糖提取量的影响

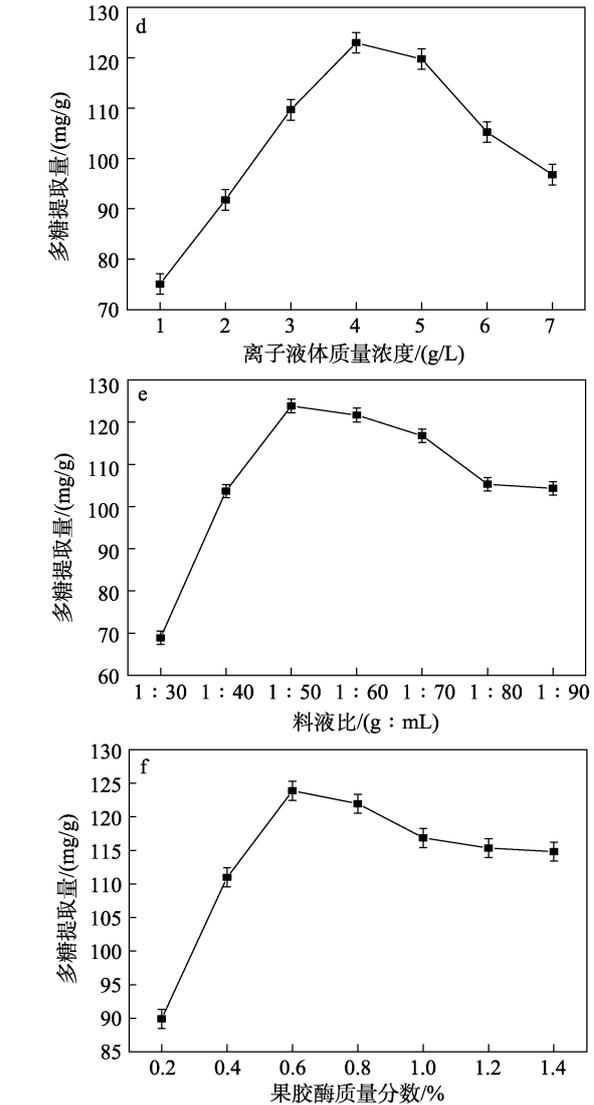
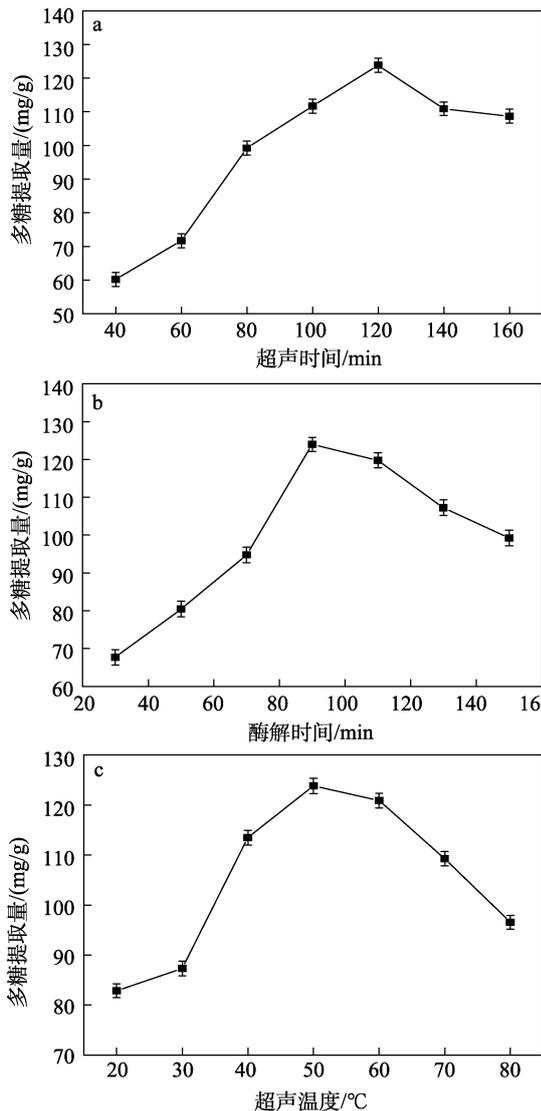
Fig. 1 Effects of single enzyme (a) and single ionic solution (b) on extraction of polysaccharides

从图1可以看出,以蛋白酶、纤维素酶、果胶酶、木聚糖酶、甘露糖酶为辅助酶,多糖提取量分别为 (53.24 ± 0.29) 、 (61.11 ± 0.21) 、 (72.98 ± 0.33) 、 (65.33 ± 0.17) 、 (56.17 ± 0.26) mg/g (图1a);以EDTA、EMIMBr、TEAC、BMIMCl、[OMIM]PF₆为离子液体,多糖提取量分别为 (70.21 ± 0.13) 、 (89.47 ± 0.77) 、 (36.54 ± 0.65) 、 (59.28 ± 0.43) 、 (60.77 ± 0.67) mg/g (图1b)。故本文采用果胶酶为辅助酶,EMImBr为离子液体进行后续实验。

2.2 单因素实验结果分析

图2为单因素实验结果。

从图2a~f可以看出,多糖提取量在各因素的考察范围内,均呈现先提高后降低的趋势。在超声时间120 min、酶解时间90 min、超声温度为50℃、离子液体质量浓度为4 g/L、料液比(g:mL)为1:50和果胶酶质量分数为0.6%时,单因素考察的多糖提取量分别达到各自的最大值(122.29~124.39 mg/g)。



a—超声时间; b—酶解时间; c—超声温度; d—离子液体质量浓度; e—料液比; f—果胶酶质量分数

图2 不同因素对多糖提取量的影响

Fig. 2 Effects of different factors on extraction of polysaccharides

分析影响多糖提取量的影响因素,多糖提取量从最大值降低的原因在于:超声波的强剪切力破坏CV-1的糖苷键,使CV-1这种长链聚合物的分布从重均分子量较大的区域转移到重均分子量较小的区域,过长的超声时间造成CV-1重均分子量降低、粒径减小^[19];酶解时间过长, CV-1被酶通过裂解或 β 消去作用切断糖苷键而裂解为多聚半乳糖醛酸^[20];超声温度过高使CV-1主链的糖苷键发生断裂变性,重均分子量降低,空间结构被破坏,热稳定性变差;离子液体量少时会增强破壁效果,但是过量会使溶液黏度过高,细胞通透性下降;增加溶剂量会增大溶剂与溶质的接触面积,利于多糖溶出,但是当溶剂呈饱和状态后,继续增加溶剂量会阻碍超声波传递;果胶酶用量过多会使酶分子之间的相互作用变得频繁强烈,造成酶分子变性,活性降低。

考虑到后续降压旋蒸溶剂和离心除杂耗时较长, 所以将料液比 (g : mL) 定为 1 : 50, 果胶酶质量分数定为 0.6%; 将超声时间、酶解时间、超声温度和离子液体质量浓度确定为响应面优化因子。

2.3 响应面优化实验结果分析

表 1 为根据单因素实验结果, 设计响应面实验的因素与水平。

表 1 响应面实验的因素与水平
Table 1 Factors and levels of response surface methodology

因素	水平		
	-1	0	1
A 超声时间/min	100	120	140
B 酶解时间/min	70	90	110
C 超声温度/°C	40	50	60
D 离子液体质量浓度/(g/L)	3	4	5

表 2 为设计的 29 个编码值与实际值对照实验点的结果。

由 Design-Expert 10.0 软件将响应值和各因素进行多元回归拟合, 得多项二次回归方程:

$$Y=166.3+1.19A+2.85B+3.88C+2.79D-14.08AB+7.59AC+7.45AD-3.51BC+7.01BD+22.62CD-14.30A^2-21.04B^2-26.12C^2-20.26D^2 \quad (5)$$

表 3 为响应面实验回归模型方差分析。

从表 3 可以看出, 该模型 P 值 < 0.0001, 说明此模型极显著, 具有统计学意义且有良好的模拟效果; 失拟项 $P=0.37 > 0.05$, 结果为不显著, 表明模型与实验结果差值很小; 相关系数 $R^2=0.9882 > 0.9$, $R_{adj}=0.9764$, 表明该模型拟合程度较高, 可以用该模型预测多糖提取量。

表 2 响应面实验设计方案及响应值
Table 2 Experimental design scheme and response value of response surface methodology

序号	A 超声时间	B 酶解时间	C 超声温度	D 离子液体质量浓度	多糖提取量/(mg/g)
1	0	1	1	0	123.8
2	1	1	0	0	122.8
3	0	0	0	0	124.4
4	1	0	1	0	123.7
5	1	0	0	1	124.2
6	-1	1	0	0	123.1
7	0	-1	1	0	123.0
8	0	0	0	0	124.2
9	-1	0	0	-1	120.7
10	0	0	-1	-1	120.8
11	0	1	0	-1	122.1
12	0	0	1	-1	122.6
13	-1	-1	0	0	120.5
14	0	-1	-1	0	121.0
15	0	-1	-1	1	123.2
16	-1	-1	-1	0	120.6
17	0	-1	-1	0	122.6
18	1	0	0	0	123.6
19	0	0	0	0	124.1
20	1	0	0	-1	122.1
21	0	0	0	0	124.3
22	0	0	0	0	123.9
23	0	0	0	-1	121.1
24	0	0	0	1	123.3
25	1	-1	-1	0	122.7
26	-1	1	1	0	123.5
27	0	1	1	1	124.2
28	0	0	0	1	123.8
29	-1	0	0	1	123.1

表 3 响应面实验回归模型方差分析
Table 3 Regression model analysis of variance

变异来源	平方和	自由度	均方值	F 值	P 值	显著性
模型	43.32	14	3.09	83.77	<0.0001	**
A 超声时间	4.76	1	4.76	128.93	<0.0001	**
B 酶解时间	2.71	1	2.71	73.29	<0.0001	**
C 超声温度	8.23	1	8.23	222.89	<0.0001	**
D 离子液体质量浓度	12.81	1	12.81	346.86	<0.0001	**
AB	2.89	1	2.89	78.23	<0.0001	**
AC	0.94	1	0.94	25.47	0.0002	**
AD	0.02	1	0.02	0.61	0.4481	○
BC	0.16	1	0.16	4.34	0.0563	○
BD	0.06	1	0.06	1.69	0.0214	*
CD	0.17	1	0.17	5.07	0.0674	○
A ²	4.68	1	4.68	126.62	<0.0001	**
B ²	4.60	1	4.60	124.39	<0.0001	**
C ²	3.29	1	3.29	88.93	<0.0001	**
D ²	3.94	1	3.94	106.60	<0.0001	**
残差	0.52	14	0.04			

续表 3

变异来源	平方和	自由度	均方值	F 值	P 值	显著性
失拟误差	0.37	10	0.04	1.00	0.5495	不显著
纯误差	0.15	4	0.04			
总误差	43.84	28				

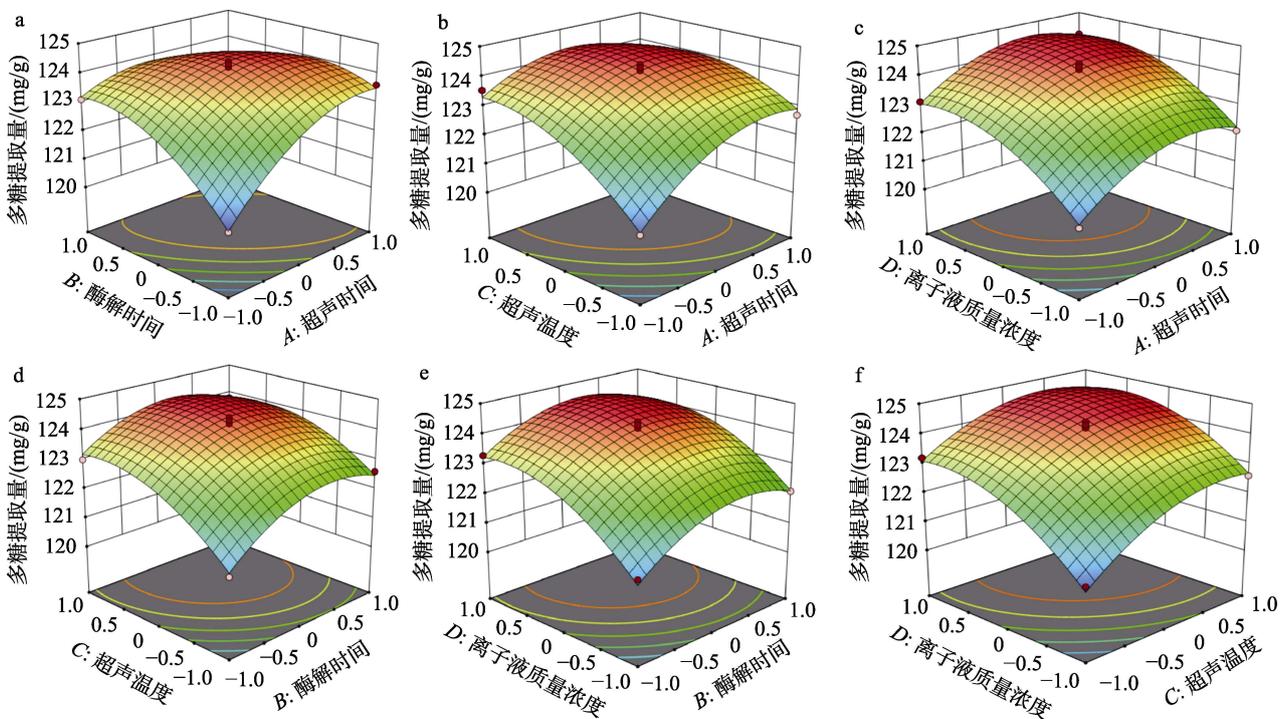
注: “*”代表差异显著 ($P < 0.05$); “**”代表差异极显著 ($P < 0.01$); “o”代表差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.3.1 响应面分析

图 3 和图 4 为由 Design-Expert 10.0 软件绘制多糖提取量、超声时间、超声温度、酶解时间以及离子液体质量浓度之间的三维曲面图和等高线图。

各因素间的响应面曲面图能反映各因素之间的交互作用, 曲线坡度越大表示该因素对响应值影响越大^[21]。由图 3 结合表 3 可知, 超声时间 (A) 和

离子液体质量浓度 (D)、酶解时间 (B) 和超声温度 (C)、超声温度 (C) 和离子液体质量浓度 (D) 交互作用均不显著 ($P > 0.05$); 超声时间 (A) 和酶解时间 (B)、超声时间 (A) 和超声温度 (C) 交互作用极显著 ($P < 0.01$); 酶解时间 (B) 和离子液体质量浓度 (D) 交互作用显著 ($P < 0.05$)。这一结果与方差分析相吻合。



a—超声时间和酶解时间; b—超声时间和超声温度; c—超声时间和离子液体质量浓度; d—酶解时间和超声温度; e—酶解时间和离子液体质量浓度; f—超声温度和离子液体质量浓度

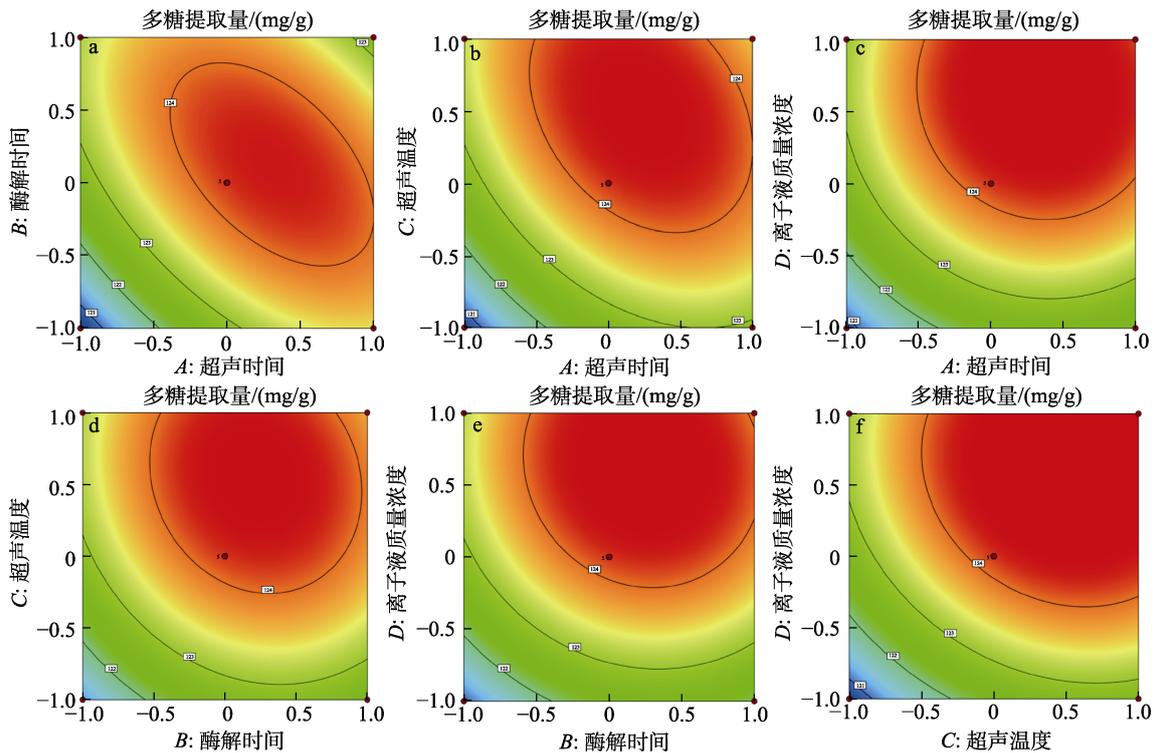
图 3 各因素交互作用对多糖提取量影响响应面图

Fig. 3 Response surface diagrams of interaction of various factors on extraction of polysaccharides

2.3.2 等高线分析

等高线的形状可以反映单因素两两交互作用对多糖提取量的影响, 若等高线呈椭圆状说明单因素两两交互作用对多糖提取量影响显著; 若等高线呈接近圆形, 说明其对多糖提取量影响不显著。图 4 为各因素交互作用对多糖提取量影响等高线图。从图 4 可以看出, 图 4a 椭圆形最为明显, 说明超声时间 (A) 和酶解时间 (B) 交互作用对多糖提取量影响极其显著 ($P < 0.01$), 图 4a、b、e 椭圆形较为明显,

说明超声时间 (A) 和酶解时间 (B), 超声时间 (A) 和超声温度 (C) 对多糖提取量影响极显著 ($P < 0.01$) 酶解时间 (B) 和离子液体质量浓度 (D) 对多糖提取量影响显著 ($P < 0.05$), 图 4c、d、f 接近圆形, 说明超声时间 (A) 和离子液体质量浓度 (D)、酶解时间 (B) 和超声温度 (C)、超声温度 (C) 和离子液体质量浓度 (D) 交互作用均不显著 ($P > 0.05$), 两两交互作用对多糖提取量影响依次为: $AB > AC > CD > BC > BD > AD$ 。



a—超声时间和酶解时间；b—超声时间和超声温度；c—超声时间和离子液体质量浓度；d—酶解时间和超声温度；e—酶解时间和离子液体质量浓度；f—超声温度和离子液体质量浓度

图 4 各因素交互作用对多糖提取量影响等高线图

Fig. 4 Contour maps of interaction of various factors on extraction of polysaccharides

通过响应面分析，确定多糖提取量最佳工艺参数为：超声时间 115.117 min、酶解时间 90.514 min、超声温度 56.069 °C、离子液体质量浓度 3.94 g/L。多糖提取量预测值为 126.18 mg/g。在模型优化后，为验证实验结论，根据实验实际调整参数为：超声时间 115 min、酶解时间 90 min、超声温度 55 °C、离子液体质量浓度 4 g/L、料液比 (g : mL) 1 : 50、果胶酶质量分数 0.6%。在此条件下重复 3 次实验，多糖提取量为(125.278±0.707) mg/g。与预测值相差不大，说明该模型拟合程度高，具有可行性。

2.4 CV-1 结构鉴定结果与分析

2.4.1 CV-1 单糖组成分析

多糖重均分子量在 10000~800000 之间能保持最大生物活性。植物多糖发挥生物活性的重均分子量区间则为 5000~30000，其他重均分子量区间的多糖的生物活性则与单糖组成、空间构象等有关^[22]。经测定，CV-1 单糖重均分子量为 17570，蛋白质质量分数 0.207%±0.06%，糖醛酸质量分数 0.176%±0.31%；CV-1 单糖组成有 5 种糖，分别是甘露糖、葡萄糖、鼠李糖、阿拉伯糖、岩藻糖，其摩尔分数分别为 5.94%、6.80%、28.03%、18.40%、40.83%，表明 CV-1 单糖主要是由鼠李糖、阿拉伯和岩藻糖组成。

2.4.2 紫外-可见吸收光谱分析

图 5 为 CV-1 的紫外-可见吸收光谱图。由图 5 可知，CV-1 在 200~400 nm 处无明显的吸收峰，表明 CV-1 含有极少量核酸和蛋白质，与 2.4.1 节的单糖组成成分结果相似。

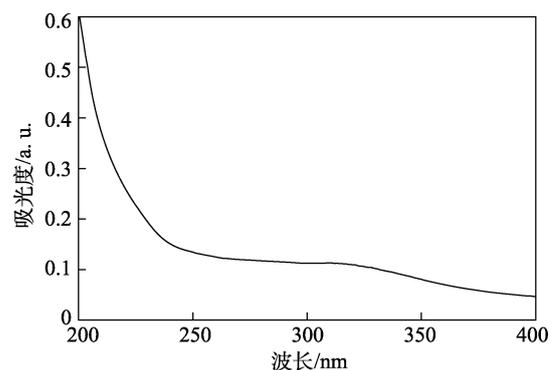


图 5 CV-1 的 UV-Vis 光谱

Fig. 5 UV-Vis adsorption spectrum of CV-1

2.4.3 FTIR 分析

图 6 为 CV-1 的 FTIR 谱图。由图 6 可知，在 3288.23 cm⁻¹ 处有一明显的宽峰，是由 O—H 键伸缩振动引起的；2905.98 cm⁻¹ 处峰是由糖链上的 C—H 键伸缩振动引起的^[23]；1633.33 cm⁻¹ 处吸收峰是由羧基和羰基伸缩振动引起；在 1342.27 和 1240.19 cm⁻¹

处弱吸收峰为 C—H 键的平面弯曲振动; 1017.64、1093.77 cm^{-1} 处吸收峰表明此糖存在呋喃糖苷; 在 925.49 cm^{-1} 处有吸收峰说明 CV-1 结构中存在 α -构型糖苷键。以上分析表明, CV-1 具有糖类化合物特征吸收峰^[24]。

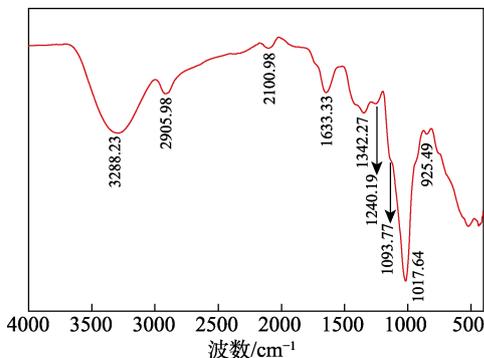


图 6 CV-1 的 FTIR 谱图
Fig. 6 FTIR spectrum of CV-1

2.4.4 三螺旋结构分析

氢键是维持多糖三螺旋构象的主要分子力, 具有三螺旋构象的多糖复合物的最大吸收波长 (λ_{max}) 可以在低浓度下向更长的波长移动, 并且随着 NaOH 浓度增加而降低。图 7 为 CV-1 三螺旋结构表征的结果。可以看出, CV-1 与空白组相比, λ_{max} 随 NaOH 浓度 ($\geq 0.1 \text{ mol/L}$) 的升高发生红移, 说明 CV-1 与刚果红形成复合物, 证明此 CV-1 含有三螺旋结构; 当 NaOH 浓度 $> 0.3 \text{ mol/L}$ 后, λ_{max} 发生蓝移, 这可能是由于在 NaOH 浓度逐渐增加过程中, CV-1 与刚果红形成复合物的结构遭到破坏, CV-1 从三螺旋结构变为单链状结构。

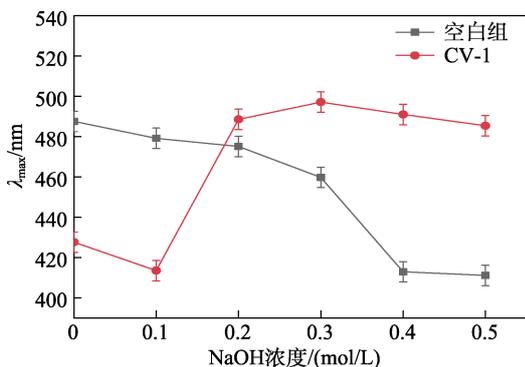


图 7 CV-1 三螺旋结构测试结果
Fig. 7 CV-1 triple helix structure test results

2.4.5 XRD 分析

晶体的晶型结构通常使材料具有一定的生物降解性、光学性质。图 7 为 CV-1 的 XRD 表征结果。可以看出, CV-1 在 $2\theta=17^\circ$ 处有一宽峰, 可能与多糖的结晶度有关, 并且在 $2\theta=29^\circ$ 、 39° 附近有峰,

这是由于 CV-1 存在半晶体结构所致^[25], 其余部分为光滑曲线, 说明 CV-1 中也存在非晶体结构, 表明 CV-1 是无定形与晶体共存的结构。

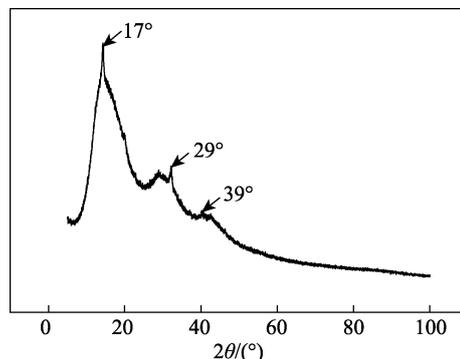


图 8 CV-1 的 XRD 谱图
Fig. 8 XRD pattern of CV-1

2.4.6 TGA 分析

图 9 为 CV-1 的 TGA 测试结果。

由图 9 可知, CV-1 的 TGA 曲线可分为 3 个阶段: 第一阶段在 $79\sim 125^\circ\text{C}$ 之间, 失重率为 6.98%, 这可能是由于 CV-1 水分散失造成的质量损失, 表明 CV-1 中主要含有自由水, 几乎不含有结合水; 第二阶段在 $125\sim 330^\circ\text{C}$ 之间, 本阶段有明显的失重台阶, 失重率为 59.97%, 表明多糖在本阶段大量受热分解, 可能包括化学结构降解、糖环脱水、解聚以及水和二氧化碳的形成; 第三阶段在 $330\sim 550^\circ\text{C}$ 之间, 本阶段多糖失重率平缓下降, 表明多糖分解速率减慢, 这可能是 CV-1 炭化导致。CV-1 在整个过程中失重率 81.55%。张翼飞等^[26]研究的 3 种香加皮 (CPP1、CPP2、CPP3) 多糖总失重率分别为 95%、88%、86%, 均大于 CV-1 失重率, 表明 CV-1 具有较好的热稳定性。

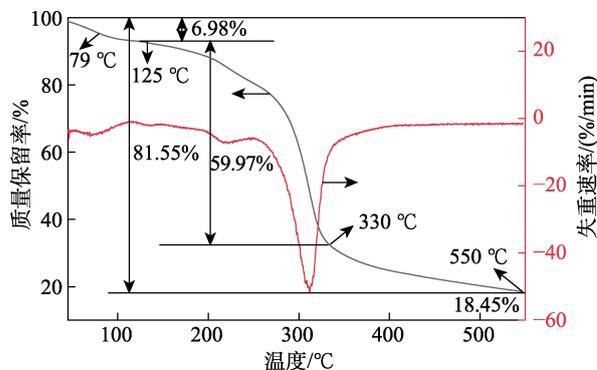


图 9 CV-1 的 TGA 和 DTG 曲线
Fig. 9 TGA and DTG curves of CV-1

2.4.7 SEM 分析

图 10 为 CV-1 在不同放大倍数下的 SEM 图。由图 10 可知, CV-1 呈片状结构, 局部表面平

整光滑, 结构分散, 破碎程度较明显, 具有较强的分子间关联, 这可能与导致 CV-1 分子聚集的分子间和分子内氢键的存在有关。

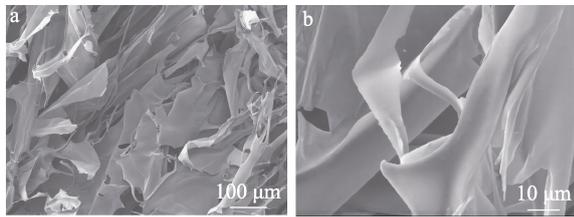


图 10 CV-1 在不同放大倍数下的 SEM 图

Fig. 10 SEM images of CV-1 at different magnifications

2.5 CV-1 抗氧化及降糖活性分析

2.5.1 羟基自由基和 ABTS 自由基清除率分析

自由基具有高度活性且能引起迅速且广泛的连锁反应, 当血液或组织中超氧化自由基的特异性清除酶活性下降时, DNA 被过量的活性氧持续损伤, 就会导致细胞癌变。因此, 肿瘤发生与活性氧的代谢失衡和抗氧化酶防御系统功能低下有关, 同时糖尿病也与氧化应激导致的胰岛素抵抗^[27]和 β 细胞受损^[28]有关。ABTS 自由基和羟基自由基是稳定的自由基, 常以其清除率指标作为多糖抗氧化能力的定量测定, 清除率越高, 抗氧化能力越强。图 11 为 CV-1 的羟基自由基和 ABTS 自由基清除率测定结果。

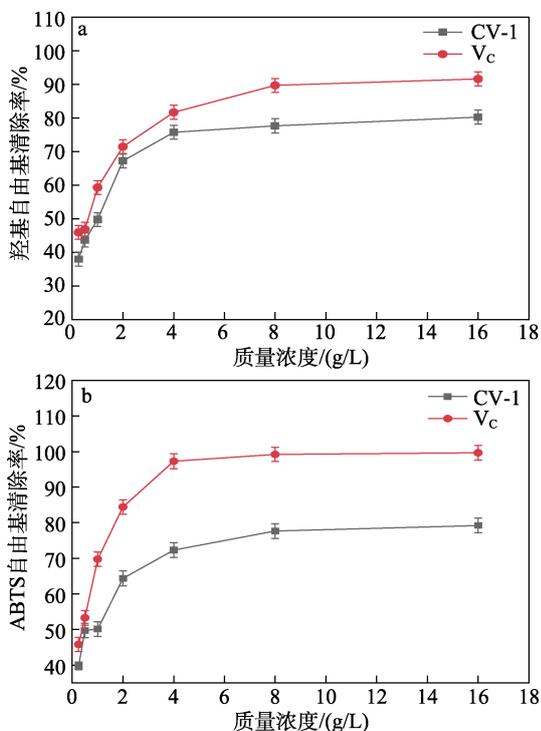


图 11 不同质量浓度 CV-1 和 V_C 的羟基 (a) 及 ABTS (b) 自由基清除率

Fig. 11 Scavenging rates of hydroxyl free radical (a) and ABTS free radical (b) by CV-1 and V_C with different mass concentrations

由图 11 可知, 羟基自由基和 ABTS 自由基清除率均随 CV-1 质量浓度的升高而增强, CV-1 对羟基自由基、ABTS 自由基的半数抑制浓度 (IC₅₀) 分别为 1.373 和 1.122 g/L, 对照组 V_C 对两者的 IC₅₀ 分别为 0.792 和 0.372 g/L。结果表明, CV-1 具有较强的抗氧化能力, 与已被研究证实的有显著抗氧化性并有防治糖尿病的多糖具有相同功效^[29], 这一结果可为藁本类药材多糖在食品和医药领域的开发提供理论依据。

2.5.2 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶抑制率分析

II 型糖尿病是一种以慢性高血糖为特征的复杂代谢性疾病^[30], 抑制 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶可以延缓肠道对葡萄糖吸收, 可以有效降低高血糖。阿卡波糖是常用于治疗糖尿病的药物, 是通过抑制 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶活性降低碳水化合物的水解, 但是阿卡波糖会对人体产生很大的副作用, 会引起胃肠道不适、肾功能损害等, 因此, 寻找副作用较小的抑制 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的天然抑制剂应用于高血糖治疗非常重要。图 12 为 CV-1 的 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶抑制率测定结果。

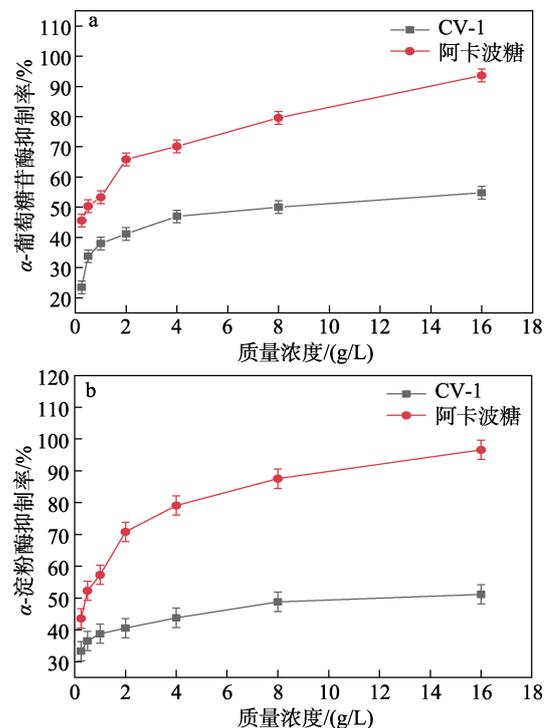


图 12 不同质量浓度 CV-1 和阿卡波糖的 α -葡萄糖苷酶 (a) 及 α -淀粉酶 (b) 抑制率

Fig. 12 Inhibition rates of α -glucosaccharase (a) and α -amylase (b) by CV-1 and acarbose with different mass concentrations

由图 12 可知, 不同质量浓度 CV-1 水溶液对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶均有一定的抑制作用, CV-1 质量浓度越高, 对两种酶的抑制率越高, CV-1 对 α -葡

葡萄糖苷酶、 α -淀粉酶的 IC_{50} 分别 14.799 和 15.739 g/L; 对照组的阿卡波糖对两种酶的 IC_{50} 分别为 0.438 和 0.475 g/L。这表明, CV-1 具有较好的降糖活性, 可以为藁本类多糖开发降糖药物提供理论数据支撑。

3 结论

采用超声辅助离子液体法提取 CV-1, 通过单因素及响应面实验优化最佳提取工艺, 多糖提取量达到(125.278±0.707) mg/g; CV-1 重均分子量为 17570, 符合具有生物活性的多糖重均分子量范围 (5000~30000); CV-1 单糖主要组成和摩尔分数为岩藻糖 40.83%、鼠李糖 28.03%、阿拉伯糖 18.40%、葡萄糖 6.80%、甘露糖 5.94%; CV-1 表面平整且附着颗粒, 为无定形结构和晶体结构, 含有三螺旋结构, 核酸和蛋白质含量极少; CV-1 有一定的体外抗氧化和降糖能力, 对羟基自由基、ABTS 自由基 IC_{50} 为 1.373 和 1.122 g/L, 对 α -葡萄糖苷酶、 α -淀粉酶 IC_{50} 为 14.799 和 15.739 g/L。

本文研究结果可为新疆藁本多糖及新疆藁本作为藁本类药材使用提供一定理论依据。

参考文献:

- [1] SONG Q (宋奇), LIANG Y M (梁勇满), XU L (许亮), *et al.* Herbal textural of chinese lovage and progress in resource research[J]. Chinese Traditional Medicine Modern Distance Education (中国中医药现代远程教育), 2017, 15(19): 147-149.
- [2] SUN W S (孙文松), LI L (李玲), YU C L (于春雷), *et al.* Research status and development countermeasures of Liaozhou *ligusticum*[J]. Liaoning Agricultural Sciences (辽宁农业科学), 2018(5): 60-63.
- [3] LIU J S (刘久石), ZHANG X Y (张小艺), LI B (李斌), *et al.* Anti-inflammatory active component in raw materials of *ligustici hizoma et adix* based on spectrum-effect relationship[J]. Chinese Journal of traditional Chinese Medicine (中国中药杂志), 2022, 47(12): 3295-3302.
- [4] CHEN Y H (陈月华), ZHI Y N (智亚楠), SONG H (宋欢), *et al.* Chemical constituents and antifungal activity of essential oil from *conioselinum vaginatum*[J]. Chemical Research and Application (化学研究与应用), 2019, 31(9): 1655-1659.
- [5] LU R J (卢睿加), XIA Y L (夏友霖), YOU Y (游宇), *et al.* Structure identification, immune activities and antitumor activities *in vitro* of polysaccharides from Tianfu *Arachis hypogaea* Leaves[J]. Food Science (食品科学), 2023, 44(23): 45-54.
- [6] XU J (徐晋), PANG Q C (庞倩婵), SUN J G (孙京格), *et al.* Polysaccharides from dandelion leaves: Optimization of ultrasonic cell crushing-assisted extraction and antioxidant activity[J]. Food Research and Development (中国食品研究与开发), 2023, 44(10): 132-139.
- [7] GAO X Y (高星熠), ZHANG S Y (张诗悦), ZHANG W (张伟), *et al.* Research progress in antiviral activities of seaweed polysaccharides and related mechanism[J]. Central South Pharmacy (中南药学), 2023, 21(7): 1852-1858.
- [8] LIU S F (刘铄菲), TANG N C (唐年初), XU D P (徐德平), *et al.* Isolation and identification of hypoglycemic polysaccharide from *Achyranthes bidentata*[J/OL]. Journal of Food Science and Biotechnology (食品与生物技术学报). <https://link.cnki.net/urlid/32.1751.TS.20230817.1441.018>.
- [9] ZHANG X C (张心驰), HUI H P (惠和平), GUO D F (郭栋费), *et al.* Analysis on structure and hypoglycemic activity of Lanzhou lily polysaccharides from gradient alcoholic precipitation[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2023, 40(10): 2231-2240.
- [10] HOU M N (侯敏娜), LIU Z P (刘朝鹏), HOU S P (侯少平), *et al.* Comparison of polysaccharide content and antioxidant activity of *Fritillaria taipaiensis* P. Y. Li in different rears[J]. Chinese Wild Plant Resources (中国野生植物资源), 2023, 42(8): 44-48.
- [11] YU Y Y (虞跃跃), YU Y S (俞瑶帅), WANG Y Y (汪铨宇), *et al.* Recent advances in the study of the immunomodulatory and antitumor mechanisms of astragalus polysaccharides[J]. World Chinese Medicine (世界中医药), 2023, 18(20): 2998-3004.
- [12] MA X B (马晓彬), ZHANG L F (张丽芬), XU Y T (徐玉亭), *et al.* Research progress on the application of ultrasound technology in physical modification of polysaccharides[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology (中国食品学报), 2015, 15(10): 163-169.
- [13] XU X (徐湘), PANG X J (庞旭佳), ZHANG M W (张名位), *et al.* Physicochemical properties and antioxidant activity of Chinese yam polysaccharides[J/OL]. Modern Food Science and Technology (现代食品科技). <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1620.TS.20230217.1033.001>.
- [14] ZHENG Y, YANG G, ZHAO Z H, *et al.* Structural analysis of ginseng polysaccharides extracted by EDTA solution[J]. RSC Advances, 2015, 6(4): 2724-2730.
- [15] FENG Y Y (冯莹莹). Study on the structural characteristics and anti-tumor effects of low-molecular polysaccharides extracted from *atractylodes macrocephala koidz*[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology (天津科技大学), 2021.
- [16] ZHANG X F (张喜峰), NAN Y (南艳), LI X R (李雪茹), *et al.* Physicochemical properties and physiological activities of polysaccharides extracted from borage leaves by two methods[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2022, 39(11): 2297-2304.
- [17] ZHOU L Q (周丽倩), HUANG Y (黄瑶), LU Y (鲁艳), *et al.* Structural identification and *in vitro* antitumor activity of wild *morhella esculenta* polysaccharide from Xiaojin county of Sichuan province[J]. Natural Products and Development (天然产物与开发), 2022, 34(6): 2077-2088.
- [18] YANG Y J (杨玉洁), LIU H (刘焕), WANG S H (王淑慧), *et al.* Hypoglycemic effect and mechanism of polysaccharides from finger citron from Guangdong province based on enzyme activities and cell model[J]. Food Science (食品科学), 2022, 43(23): 149-157.
- [19] GUO F J (郭峰君), YANG L L (杨乐乐). Application of free radical combined ultrasonic degradation in laminaria petroglycan sulfate[J]. Jiangsu agricultural sciences (江苏农业科学), 2020, 48(12): 204-207.
- [20] LI P (李萍), LI W Y (李卫燕), CAO W (曹蔚), *et al.* Application progress of enzymolysis technology in the study of the structure and activity of polysaccharides[J]. Northwest Journal of Pharmacy (西北药学杂志), 2015, 30(14): 433-436.
- [21] LIU X Z (刘晓珍), LI F X (李福香), ZHU Z L (祝兆亮), *et al.* Optimization of ultrasound-assisted extraction and antimicrobial activity of polyphenols from mango core[J]. Food Research and Development (食品研究与开发), 2021, 42(14): 56-61.
- [22] ZHANG G F (张桂凤), LIU C (刘闯), LIU G D (刘光东), *et al.* Research progress on antitumor mechanism and structure-activity relationship of plant polysaccharides[J]. Science and Technology of Food Industry (食品工业科技), 2023, 44(7): 428-437.
- [23] HUANG M H (黄明浩), HUANG T Q (黄泰奇), DENG L J (邓丽娟), *et al.* Optimization of solanum lyratum crude polysaccharide extraction process using response surface methodology and analysis of its *in vitro* antioxidant activity[J/OL]. Science and Technology of Food Industry (食品工业科技). <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023040182>.