

本文引用:李可昕,王翔,刘莘然,刘洋. 柳叶白前粗多糖组成、形貌特征及抗氧化研究[J]. 湖南中医药大学学报,2021,41(6):832-836.

柳叶白前粗多糖组成、形貌特征及抗氧化研究

李可昕¹,王翔¹,刘莘然²,刘洋^{3*}

(1.天津中医药大学研究生院,天津 301617;2.天津中医药大学中药学院,天津 301617;

3.天津中医药大学中医学院,天津 301617)

〔摘要〕目的 提取获得柳叶白前粗多糖(CSP90),对其单糖组成、形貌特征和抗氧化活性进行分析。方法 通过水提醇沉法提取CSP90,利用HPLC测定单糖组成,通过扫描电子显微镜分析形貌特征,并测定CSP90对1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基的清除作用。结果 CSP90的糖含量和蛋白质含量分别为94.7%和2.86%,主要由葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖组成,其微观结构的聚集状态部分呈凹凸不平的不规则薄碎片状结构,边缘不平整,而部分结构呈光滑连绵的薄片,伴有一些分支,说明CSP90呈无定形结构。在1.6 mg·mL⁻¹的浓度下,CSP90与抗坏血酸(VC)对DPPH自由基的清除率分别为96.5%和97.6%,表明CSP90具有较好的DPPH自由基清除活性。结论 CSP90含有多种单糖,并且对DPPH自由基的清除能力较好,有望被开发成一种天然的抗氧化剂。

〔关键词〕 柳叶白前;多糖;单糖;形貌特征;抗氧化性

〔中图分类号〕R284;R285

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2021.06.003

Study on Composition, Morphological Characteristics and Antioxidant Activity of Crude Polysaccharide from *Cynanchum Stauntonii*

LI Kexin¹, WANG Xiang¹, LIU Xinran², LIU Yang^{3*}

(1. Graduate School, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China; 2. School of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China; 3. Chinese Medical College, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China)

〔Abstract〕 Objective The crude polysaccharides were extracted and purified from *Cynanchum stauntonii* (CSP90), and the monosaccharide composition, morphological characteristics and antioxidant activities were analyzed. **Methods** CSP90 was obtained by water extraction and alcohol precipitation. The monosaccharides composition of CSP90 was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC). The morphological characteristics were analyzed by scanning electron microscopy. While the 1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine (DPPH) radical scavenging activity of CSP90 was further determined. **Results** The sugar and protein contents of CSP90 were 94.7% and 2.86%, respectively. CSP90 was mainly composed of glucose, galactose, and arabinose. Some of the microstructures of CSP90 were irregular and thin fragments with uneven edges, while some of the microstructures were smooth and continuous slices with some branches, indicating that CSP90 had an amorphous structure. At a concentration of 1.6 mg·mL⁻¹, the scavenging rates of DPPH radical by CSP90 and ascorbic acid (VC) were 96.5% and 97.6%.

〔收稿日期〕2021-03-19

〔基金项目〕天津市自然科学基金项目(18JCYBJC28700)。

〔作者简介〕李可昕,女,在读硕士研究生,研究方向:中药活性成分研究。

〔通信作者〕*刘洋,女,博士,副教授,硕士研究生导师,E-mail:yliu66@126.com。

indicating that CSP90 had better DPPH radical scavenging activity. **Conclusion** CSP90 contained a variety of monosaccharides and had a good DPPH radical scavenging ability. It is hoped that CSP90 will be developed into a natural antioxidant.

[**Keywords**] *Cynanchum stauntonii*; polysaccharide; monosaccharide; morphological characteristics; antioxidant activity

人体在生命活动中会不断地产生自由基,健康的人体中自由基的产生与清除维持着动态平衡,一旦平衡被破坏,人体就可能受到氧化损伤^[1]。研究^[2]表明,炎症、衰老等常常与人体产生的过量自由基有关,所以为保证人体健康,人们不断开发具有抗氧化作用的药品、食品和保健品。多糖是一种由单糖通过糖苷键连接而成的高分子化合物,常分布于天然植物、动物及微生物中,是生命活动中不可缺少的物质^[3]。现代药理学研究^[3-4]发现多糖具有抗炎、抗肿瘤、抗高血压、抗氧化及提高免疫力等作用,其中抗氧化作用一直是多糖药理学研究的热点之一。

药典收录的白前来源有两种,包括萝藦科植物柳叶白前 [*Cynanchum stauntonii* (Decne.) Schltr. ex Lévl.] 和芫花叶白前 [*Cynanchum glaucescens* (Decne.) Hand.-Mazz.], 以根茎和根入药,具有降气、消痰、止咳的作用,常用于治疗肺气壅实、咳嗽痰多等症状^[5]。现有报道中关于柳叶白前的成分研究主要集中于甾体类、高级脂肪酸、植物甾醇和挥发性成分,而对于白前多糖的研究较少^[6-8]。当前药材市场中常常将白薇、白射干、徐长卿和老瓜头药材与白前混用^[9],鉴定这些药材的化学成分能够减少用药的错误,保证临床用药的安全性。为进一步发掘柳叶白前多糖成分的组成和活性,本研究通过水提醇沉法提取粗多糖,采用 HPLC 进行单糖组成分析,同时利用扫描电子显微镜观察多糖的形貌特征,并进行初步的体外抗氧化检测,为进一步研究柳叶白前多糖提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料、仪器与试剂

柳叶白前药材购自河北安国中药材市场,由南开大学郭远强教授对饮片进行了物种鉴定,确定为萝藦科植物柳叶白前的干燥根及根茎。I2000 型数字电子天平(深圳市无限量衡器有限公司);紫外分光光度计(PerkinElmer 公司);Quanta 200 扫描电子显微镜(美国 FEI 公司);LC-3000 高效液相色谱仪(北京创新恒通科技有限公司)。甘露糖(批号:DST180130-047,纯度 $\geq 98.0\%$)、葡萄糖醛酸(批号:DST190226-016,纯度 $\geq 98.0\%$)、半乳糖醛酸

(DST190325-065,纯度 $\geq 98.0\%$)、葡萄糖(批号:DST180817-041,纯度 $\geq 98.0\%$)、半乳糖(批号:DST190320-168,纯度 $\geq 98.0\%$)、岩藻糖(批号:DST-180325-566,纯度 $\geq 98.0\%$)均购于德思特生物技术有限公司(成都);鼠李糖(批号:815A035,纯度 $\geq 98.0\%$)、木糖(批号:1228A023,纯度 $\geq 98.0\%$)、阿拉伯糖(批号:718G043,纯度 $\geq 99.0\%$)购于 Solarbio 科技有限公司(北京)。三氟乙酸(TFA)(批号:T103291)和 VC(批号:A103533)购自阿拉丁试剂有限公司(上海),1-苯基-3-甲基-5-吡啶啉酮(PMP)(批号:P109105)购自国药集团化学试剂有限公司(上海),乙腈为色谱纯,其他化学药品和试剂均为分析纯。

1.2 柳叶白前多糖的提取与纯化

采用水提醇沉法对柳叶白前多糖进行提取,称取柳叶白前药材 500 g,在室温下经水浸泡 12 h 后,以 1:10 的料液比在 90 °C 煎煮提取 3 次,每次 3 h。过滤除去药材残渣后,合并上清液并减压浓缩得到 600 mL 溶液。得到的浓缩液经过无水乙醇沉淀至终浓度为 90%,在 4 °C 放置 12 h 后,离心得到 139 g 90-沉淀。将 90-沉淀溶解在 1 600 mL 蒸馏水中,加入 400 mL Sevag 试剂(氯仿:正丁醇=4:1),转移至分液漏斗中,剧烈振摇后,静置 5 h 等待分层。分层结束后,弃去中下层的蛋白和有机试剂,再加入 400 mL Sevag 试剂重复除蛋白 2 次。浓缩上层的多糖溶液,分装进透析袋中(截留分子量:8 kDa),经去离子水透析 2 d 后,将透析袋内液体通过旋转蒸发仪浓缩至 30 mL,真空冻干后即得柳叶白前粗多糖,标记为 CSP90。

1.3 糖含量的测定

采用改良苯酚-硫酸法^[10]测定 CSP90 的糖含量:吸取 0.4 mg·mL⁻¹ 葡萄糖溶液各加 0、20、40、60、80、100、120、140、160 μ L 于试管内,加蒸馏水补足至 200 μ L 备用。配制 0.1 mg·mL⁻¹ CSP90 样品溶液,取 200 μ L 备用。向葡萄糖溶液和 CSP90 溶液中各加入 100 μ L 苯酚溶液,摇匀,迅速加入 1 mL 浓硫酸,摇匀,室温静置 30 min,在 490 nm 处测定吸光度。实验平行测定 3 次,记录数据,以葡萄糖浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线 $y=3.060 3 x+$

0.024 3, $R^2=0.999 8$, 依据样品的吸光度计算出糖含量。

1.4 蛋白质含量测定

参照刘玉明等^[14]的方法配置成含有 0.01% 考马斯亮蓝 G-250、4.7% 乙醇和 8.5% 磷酸的混合溶液备用。配制 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的牛血清白蛋白标准溶液, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。吸取 0、0.01、0.02、0.03、0.04、0.06、0.08、0.10 mL 蛋白标准液, 加入蒸馏水补足至 0.1 mL。再避光加入 5 mL 考马斯亮蓝混合溶液, 充分混匀。将溶液在 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 反应 5 min, 冷却至室温后, 于 595 nm 处测定吸光度。同时配制 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 CSP90 样品溶液, 取 0.1 mL 按上述步骤处理, 测定吸光值。实验平行测定 3 次, 记录数据。以蛋白溶液浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线 $y=0.905 9 x+0.032 6$, $R^2=0.999 9$, 依据样品的吸光度计算出蛋白质含量。

1.5 全波长扫描检测

全波长扫描常用来测定多糖中是否有蛋白质和核酸残留, 当多糖溶液在 260 nm 和 280 nm 中未观察到吸收峰时, 说明多糖中不含核酸和蛋白质^[12]。配制 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 CSP90 溶液, 通过紫外分光光度计在 200~400 nm 进行全波长扫描, 分析得到图谱。

1.6 单糖组成分析

单糖组成依据 Zhang 等^[13]的方法进行检测, 根据图谱中的色谱峰时间和峰面积计算出样品的单糖组成及比例。将 4 mg CSP90 与 2 mL TFA ($2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 在 $120 \text{ }^\circ\text{C}$ 下油浴 6 h, 得到多糖水解液, 再加入 $100 \text{ } \mu\text{L}$ PMP 甲醇溶液 ($0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 $100 \text{ } \mu\text{L}$ NaOH 溶液 ($0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 标记为样品溶液, 备用。标准品的处理如下: 配置 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖和岩藻糖的单糖标准品溶液各 $50 \text{ } \mu\text{L}$, 分别加入 $500 \text{ } \mu\text{L}$ NaOH 溶液 ($0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 $500 \text{ } \mu\text{L}$ PMP 甲醇溶液 ($0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 混匀后备用。将样品和标准品溶液在 $70 \text{ }^\circ\text{C}$ 的水浴锅中反应 30 min, 冷却后, 在样品溶液中加入 $105 \text{ } \mu\text{L}$ 盐酸 ($0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 溶液, 标准品溶液中各加入 $510 \text{ } \mu\text{L}$ 盐酸 ($0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 溶液中和, 再分别加入等体积的氯仿溶液, 剧烈震荡后, 离心, 去除氯仿层, 反复萃取两次。取上层水相经 $0.45 \text{ } \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 滤液经 HPLC 分析 (Kromasil 100-5-C₁₈ 色谱柱 ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$, $5 \text{ } \mu\text{m}$), 以 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲溶液-乙腈 (83:17) 为流动相, 进样体积为 $20 \text{ } \mu\text{L}$, 流速为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长设

定为 250 nm。将 CSP90 和标准单糖的图谱进行对比分析。

1.7 形貌特征分析

扫描电子显微镜是一种观察大分子物质形貌特征的重要工具, 通过捕获样品表面的电子信号形成图像, 成像清晰, 立体效果好^[14]。参照张淑杰等^[15]的方法, 采用扫描电镜对 CSP90 的形貌特征进行分析。将冻干的 CSP90 样品用导电胶带粘在样品台上, 并镀上一层金粉。通过扫描电子显微镜在 15 kV 加速电压下捕获图像, 放大倍数选择 400、800 和 1 600 倍, 选取适当的视野进行拍照记录。

1.8 DPPH 自由基清除能力测定

DPPH 自由基清除能力的试验根据 Wang 等^[16]的方法, 稍做改动。分别配制 0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度的 VC 溶液及 CSP90 样品溶液, $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DPPH-无水乙醇溶液。配置样品组 A1 为 1 mL CSP90+1 mL DPPH-乙醇溶液, A2 为 1 mL CSP90+1 mL 无水乙醇溶液; 对照组 A'1 为 1 mL VC+1 mL DPPH-乙醇溶液, A'2 为 1 mL VC+1 mL 无水乙醇溶液; 空白组 A0 为 1 mL 去离子水+1 mL DPPH-乙醇溶液。将各组溶液混合均匀后, 室温暗处理 30 min, 用紫外分光光度计在 517 nm 处测定吸光度。实验平行测定 3 次, 记录数据。通过 Graphpad 软件 (Prism 7.0) 计算半数清除率 (IC_{50})。DPPH 自由基清除率的计算公式: $R_{\text{CSP90}}=[A_0-(A_1-A_2)]/A_0 \times 100\%$; $R_{\text{VC}}=[A_0-(A'1-A'2)]/A_0 \times 100\%$ 。

2 结果

2.1 CSP90 中糖含量和蛋白含量

以柳叶白前药材重量 (500 g) 为标准, 计算 CSP90 的提取率为 5.56%。CSP90 的糖含量测定通过苯酚-硫酸法进行显色, 紫外分光光度计测定吸光度, 对 3 次重复试验的数据进行分析, 计算出 CSP90 的糖含量为 94.7%, 说明提取的多糖纯度较高。通过考马斯亮蓝染色法测定蛋白质的含量, 对 3 次重复实验的数据进行分析, 计算出 CSP90 中蛋白质含量为 2.86%。

2.2 CSP90 中核酸与蛋白质残留检测

通过紫外分光光度计对 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 CSP90 溶液在 200~400 nm 进行全波长扫描, 如图 1 所示, 在 260 nm 处无明显吸收, 说明核酸含量接近于 0; 在 280 nm 处有微弱吸收, 说明有少量蛋白质残存, 这与蛋白质含量计算结果也相符合。

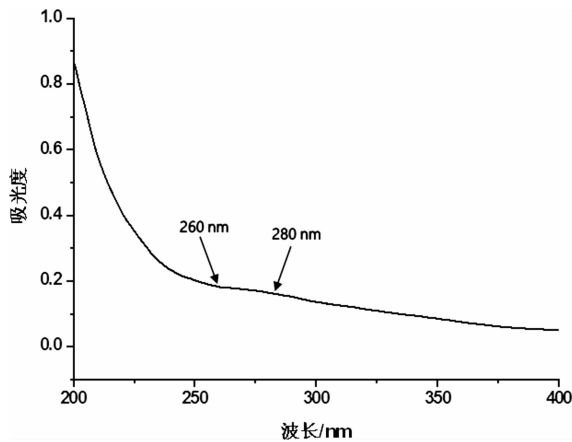
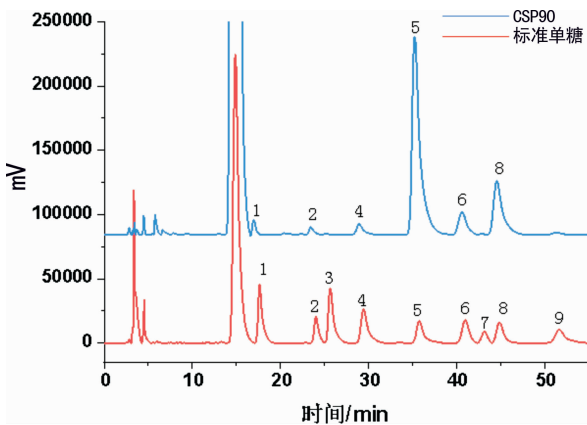


图1 CSP90的全波长扫描

2.3 CSP90的单糖组成检测

通过 HPLC 对 CSP90 进行单糖分析,与标准单糖的色谱图对比,如图 2 所示,根据出峰时间和峰面积计算出 CSP90 含有的单糖及摩尔比例为甘露糖:鼠李糖:半乳糖醛酸:葡萄糖:半乳糖:阿拉伯糖=0.03:0.02:0.04:1.00:0.12:0.37。CSP90 中葡萄糖的含量最高,占总糖的比例达到 65.81%;其次是阿拉伯糖的含量,占 20.27%;半乳糖、半乳糖醛酸、甘露糖、鼠李糖含量分别为 7.63%、2.88%、1.97%、1.43%。

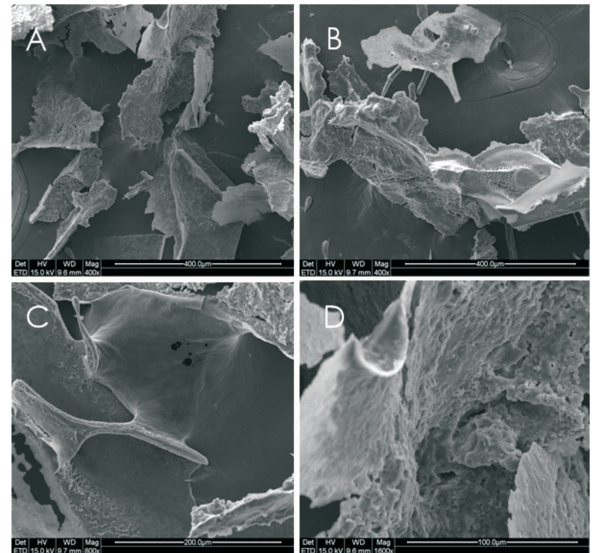


注:1.甘露糖;2.鼠李糖;3.葡萄糖醛酸;4.半乳糖醛酸;5.葡萄糖;6.半乳糖;7.木糖;8.阿拉伯糖;9.岩藻糖

图2 CSP90的单糖组成分析

2.4 CSP90的形貌特征检测

通过扫描电镜观察 CSP90 的形态特征和微观结构。如图 3A、3B 所示,在放大 400 倍下,发现部分 CSP90 微观结构的聚集状态呈凹凸不平的不规则薄片状结构,边缘不平整,而部分结构呈光滑连绵的薄片,伴有一些分支。在放大 800 倍下(图 3C),观察到部分多糖呈光滑平整的薄片形状同时可见分支呈长杆柱状。继续放大 1 600 倍下(图 3D),观察到部分多糖表面厚度不均,有凹陷、波峰,可见圆球状颗粒。



注:A.×400;B.×400;C.×800;D.×1 600

图3 CSP90的形貌特征分析(扫描电镜)

2.5 CSP90体外抗氧化能力检测

对 CSP90 进行 DPPH 自由基清除实验,以 VC 为阳性对照,设置 0.05~1.6 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度梯度进行实验。结果如图 4 所示,CSP90 具有一定的 DPPH 自由基清除能力,并且随着浓度的增加,清除能力有所增强。随着浓度从 0.05 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 增加到 0.8 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,CSP90 对 DPPH 自由基的清除率从 46.5% 增加到 93.4%。在 1.6 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的浓度下,CSP90 与 VC 对 DPPH 自由基的清除率分别为 96.5% 和 97.6%,表明在此浓度下两者清除能力的差别很小。通过 Graphpad 软件计算 IC_{50} 值为 0.083 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,CSP90 对 DPPH 自由基具有良好的清除作用。

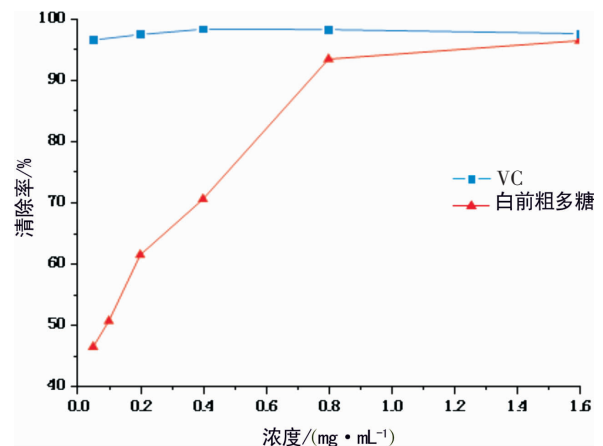


图4 CSP90的DPPH自由基清除率图

3 讨论

通过扫描电镜观察 CSP90 的微观结构时,发现部分多糖呈光滑平整的薄片状,说明分子之间作用较强,结合紧密^[17-18]。Shi 等^[19]从大叶冬青中纯化出一

种均一多糖(ILP50-2),通过扫描电镜进一步观察微观结构,发现 ILP50-2 在聚合状态下呈分支不规则网状结构,表面不平整,表明多糖具有无定形结构,在放大 400 倍和 800 倍下观察,发现 ILP50-2 厚度不均匀,呈凹陷和凸起,推测可能是 ILP50-2 的分支结构引起的。观察 IL50-2 和 CSP90 的扫描电镜图谱有部分相似,推测 CSP90 中的部分多糖也存在分支结构。

DPPH 自由基是一种稳定的自由基,在乙醇溶液中呈紫色,在此体系中加入抗氧化剂后,DPPH 自由基可以很容易地接受抗氧化剂提供的氢原子,形成稳定的分子后紫色溶液就会变成无色或浅黄色^[16,20]。初步的体外抗氧化实验结果表明 CSP90 的 IC_{50} 值为 $0.083 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,在较低的浓度下就有较好的 DPPH 自由基清除活性,有望被开发为一种天然的抗氧化剂。该实验结果为更深入的研究柳叶白前多糖的结构和活性提供了理论依据。

水提醇沉法提取多糖具有提取液澄明,操作简单,成本低,仪器设备常见的优点^[21]。随着科学技术的发展,出现了越来越多提取多糖的新型方法,包括微波萃取法,加速溶剂萃取法,生物酶解法等等^[21-23]。相比于水提醇沉法,新型提取法具有提取效率高,提取效果好的优点^[21]。期望今后的实验可以采用更多新型方法提取得到柳叶白前多糖,对比水提醇沉法进行分析,继续优化柳叶白前多糖的提取工艺。

参考文献

- [1] 胡一鸿,叶 龙,朱术超,等.番荔枝种子粗多糖抗氧化能力研究[J].热带作物学报,2011,32(6):1051-1054.
- [2] 吴 静,胡居吾,熊 伟,等.樟树不同器官中多糖抗氧化、免疫调节活性的研究[J].江西农业大学学报,2019,41(4):804-813.
- [3] CHEN F, HUANG G L. Preparation and immunological activity of polysaccharides and their derivatives[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 112: 211-216.
- [4] 郭元亨,张利军,曹丽丽,等.植物多糖中单糖组成分析技术的研究进展[J].食品科学,2018,39(1):326-332.
- [5] WANG K M, LI A, ZHANG R L, et al. Five new steroidal glycosides from the roots of *Cynanchum stauntonii*[J]. Phytochemistry Letters, 2016, 16: 178-184.
- [6] 李婷婷.柳叶白前化学成分及其抗氧化活性研究[D].延吉:延边大学,2015.
- [7] 田效民,李 凤,黄顺菊,等.柳叶白前挥发性成分的 GC-MS 分析[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(5):111-113.
- [8] 林 好,陈镜安,李斯璐,等.白前及其混伪品的 ITS2 分子鉴定[J].中药材,2017,40(11):2531-2536.
- [9] DUBOIS M, GILLES K A, HAMILTON J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. Analytical Chemistry, 1956, 28(3): 350-356.
- [10] 刘玉明,钱甜甜,蒋定文,等.凯氏定氮法和考马斯亮蓝法测定方格星虫多糖中蛋白质的含量[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(19): 96-98.
- [11] 张遥遥,张 梦,胡 悦,等.黄精多糖的提纯、硫酸化和羧甲基化修饰及其抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2019,40(21):45-51.
- [12] ZHANG S J, ZHANG Q, AN L J, et al. A fructan from *Anemarrhena asphodeloides* Bunge showing neuroprotective and immunoregulatory effects[J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 229: 115477.
- [13] 凌 妍,钟娇丽,唐晓山,等.扫描电子显微镜的工作原理及应用[J].山东化工,2018,47(9):78-79,83.
- [14] 张淑杰,权威,姜宏伟,等.不同纯化程度豌豆水溶性多糖的电镜扫描分析[J].农业生物技术学报,2019,27(10):1822-1830.
- [15] WANG M C, ZHU P L, ZHAO S W, et al. Characterization, antioxidant activity and immunomodulatory activity of polysaccharides from the swollen culms of *Zizania latifolia*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 95: 809-817.
- [16] 倪德江,陈玉琼,谢笔钧,等.乌龙茶多糖 OTPS 2-1 的光谱特性、形貌特征及热特性研究[J].高等学校化学学报,2004,25(12): 2263-2268.
- [17] 官春宇,徐 硕,徐先梅,等.超滤分离制备玉米须粗多糖的分析及促益生菌增殖活性研究[J/OL].食品与发酵工业:1-8 [2021-04-16].<https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.026296>.
- [18] SHI Z Y, AN L J, ZHANG S J, et al. A heteropolysaccharide purified from leaves of *Ilex latifolia* displaying immunomodulatory activity in vitro and in vivo[J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 245: 116469.
- [19] HAN N, WANG L, SONG Z H, et al. Optimization and antioxidant activity of polysaccharides from *Plantago depressa*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 93: 644-654.
- [20] 赵跃东,曹春琪,叶永山,等.水提醇沉法及其替代方法的研究进展[C]//中华中医药学会中药化学分会第九届学术年会论文集(第一册).厦门:2014:316-322.
- [21] 周伟娥,周学锋,王宇阳,等.中药多糖成分前处理及检测方法研究进展[J].分析测试学报,2020,39(9):1168-1175.
- [22] 魏晓楠,郝铁成.中药提取新技术研究进展[J].中国野生植物资源,2020,39(9):47-50.