

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201601032

引文格式: 乔雪, 卓燊, 杨子明, 等. 千斤拔多糖的提取纯化及其结构鉴定 [J]. 广西植物, 2017, 37(2):265-270

QIAO X, ZHUO S, YANG ZM, et al. Extraction, purification and structural identification of *Moghania* polysaccharides [J]. *Guihaia*, 2017, 37(2):265-270

千斤拔多糖的提取纯化及其结构鉴定

乔雪¹, 卓燊², 杨子明³, 陆玉婷², 秦海洸^{4*}

(1. 广西中医药大学, 南宁 530001; 2. 广西科技大学医学院, 广西柳州 545005; 3. 广西植物功能物质研究与利用重点实验室

广西 壮族自治区 广西植物研究所, 广西桂林 541006; 4. 山东中医药高等专科学校, 山东烟台 264199)

摘要: 利用正交试验考察千斤拔多糖的提取工艺, 并比较脱蛋白方法中的 Sevag 法和三氯乙酸法的纯化效果, 总糖含量测定采用苯酚-硫酸法, 蛋白质含量测定采用考马斯亮蓝法; 采用 DEAE-52 纤维柱法来分离多糖, 并运用 HPLC 色谱来分析千斤拔多糖中的单糖成分。结果表明: 经正交试验得出千斤拔多糖的最佳提取条件为时间 2.5 h, 料液比为 1:30, 温度 80 °C, 其多糖得率为 8.558%。对比两种脱蛋白的方法, Sevage 法萃取 3 次时蛋白的脱除效果最好。经 DEAE-52 纤维柱来分离多糖共分得 7 个组分。经 HPLC 色谱鉴定出有葡萄糖, 甘露糖和阿拉伯糖, 主要单糖成分为葡萄糖。

关键词: 千斤拔, 多糖, 正交设计, 提取分离, 纯化, DEAE-52

中图分类号: Q946 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2017)02-0265-06

Extraction, purification and structural identification of *Moghania* polysaccharides

QIAO Xue¹, ZHUO Shen², YANG Zi-Ming³, LU Yu-Ting², QIN Hai-Guang^{4*}

(1. *Guangxi University of Traditional Chinese Medicine*, Nanning 530001, China; 2. *College of Medicine, Guangxi University of Science and*

Technology, Liuzhou 545005, Guangxi, China; 3. *Guangxi Key Laboratory of Functional Phytochemicals Research and Utilization*,

Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006,

Guangxi, China; 4. *Shandong College of Traditional Chinese Medicine*, Yantai 264199, Shandong, China)

Abstract: In order to investigate the extraction process of polysaccharide from the *Moghania* with the orthogonal design, we compared the deproteinization process conditions of polysaccharides by Sevage with TCA method, determined the total polysaccharide contents with the method of phenol-sulfuric acid and the protein content by the method of Coomassie brilliant blue. And we also purified the *Moghania* polysaccharide by DEAE-52 and analyzed the monosaccharide composition by of *Moghania* polysaccharide by the method of high performance liquid chromatography (HPLC). The results showed that the best time, ratio of solid to liquid and extraction temperature of the extraction process were in 2.5 h, 1:30, 80 °C, as the extraction condition, the yield of polysaccharide was 8.558%. By comparison with the Sevage method and TCA method, the optimal conditions of deproteinization were proved to be extracted three times with Sevage method. *Moghania* polysaccharide was isolated into seven fractionates by DEAE-52 cellulose column chromatography;

收稿日期: 2016-04-21 修回日期: 2016-06-28

基金项目: 山东中医药高等专科学校高学历人才科研启动基金 (GXL201501); 广西教育厅一般资助项目 (2013YB289); 广西卫生厅自筹经费科研课题 (Z2012602); 广西植物功能物质研究与利用重点实验室项目 (FPRU2014-8) [Supported by the Start Fund for Higher-educated Talents Shandong College of Traditional Chinese Medicine (GXL201501); Guangxi Education Department (2013YB289); Program of Health Department of Guangxi (Z2012602); Guangxi Key Laboratory of Functional Phytochemicals Research and Utilization (FPRU2014-8)].

作者简介: 乔雪 (1989-), 女, 吉林长春人, 硕士研究生, 主要从事中药药理药效研究, (E-mail) 1262840617@qq.com。

*通信作者: 秦海洸, 博士后, 教授, 硕士生导师, 主要从事中医外科学、临床中药学、方剂学的教学和科研及临床工作, (E-mail) qhgwhy@126.com。

three kinds of saccharide were investigated by the HPLC, which were glucose, mannose and arabinose. In the three kinds of saccharide, peak area of the glucose was biggest than others, so the major saccharides was glucose.

Key words: *Moghania*, polysaccharide, orthogonal design, extraction and separation, purification, DEAE-52

千斤拔为豆科植物蔓性千斤拔(*Moghania philippinensis*)、大叶千斤拔(*M. macrophylla*)或绣毛千斤拔(*M. ferruginea*)的干燥根(中国药典,2010)。在我国主要分布于云南、广西、贵州、广东、台湾、海南、四川等地(宋立人等,2001)。其味微苦而香,性平,具有祛风除湿、消淤解毒、舒通筋络、补虚壮骨等功效,民间主要用于治疗风湿骨病、腰肌劳损、痈肿、咽喉肿痛、白带、阳痿、跌打损伤、妇女白带多等症。被广泛用于中成药生产,如补血调经片、活络止痛丸、复方挫伤灵(官燕红等,2008)、妇科千金片(许宁等,2013)等。

鉴于多糖具有调节免疫力的作用且千斤拔水煎剂亦有提高免疫力的作用,现阶段,有学者(任朝琴等,2009)运用正交试验对千斤拔的多糖提取进行了优化,但是对于千斤拔多糖的除蛋白及分析单糖类成分的研究报道还很少。本研究考察了千斤拔多糖的提取工艺,运用冷凝回流提取法,未用有机试剂来处理,类似于最传统的煎煮方法,纯化多糖,并运用 HPLC 色谱来鉴定所含的单糖成分,为今后千斤拔多糖的活性研究及开发提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

T6 新世纪紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),LC-20A 高效液相色谱仪(日本岛津公司),TgL-16R 型台式离心机(上海市离心机械研究所),JA-2003N 型电子天平(上海菁海仪器有限公司)。

千斤拔,购自广西贺州八步区(经广西中医药大学刘寿养教授鉴定为蔓性千斤拔(*Moghania philippinensis*)。果糖,葡萄糖,纤维二糖,甘露糖,木糖,阿拉伯糖,木二糖,半乳糖购自食品药品检定研究院。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 千斤拔多糖的提取工艺

1.2.1 苯酚-硫酸法测定千斤拔多糖的含量

(1) 葡萄糖线性回归方程:按张居作等(2015)的方法取适量无水葡萄糖,105℃下真空干燥,精密称取干燥后的葡萄糖,置于 100 mL 容量瓶中,配得浓度

为 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的葡萄糖储备液。精密移取 1 mL 葡萄糖储备液于 10 mL 容量瓶中,加蒸馏水至刻度,摇匀,得到葡萄糖标准溶液。分别精密移取该溶液 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 mL 于具塞比色管中,加蒸馏水补至 2 mL,摇匀,加入 5% 的苯酚溶液 0.5 mL,混匀,加入浓硫酸 2.5 mL(缓缓加入),混匀,室温静置,冷却至室温时,以 0 号管作为空白对照,得线性回归方程($Y=4.6821X+0.0087, R^2=0.9991$,式中, Y 为吸光度, X 为糖含量)。

(2) 千斤拔粗多糖含量测定:按张居作等(2015)的方法吸取 1.0 mL 样品液,按照 1.1.1.1 中的步骤操作,测定 490 nm 处的吸光度,计算样品的多糖含量。

1.2.2 单因素考察 准确称取千斤拔粉末 10 g,按 1:20 的料液比回流提取 1 h,趁热过滤,将滤液浓缩至原体积的 1/5,室温冷却后,将 5 倍体积的 95% 乙醇缓缓加入下层溶液中,静置醇析,4 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,用无水乙醇洗涤沉淀,收集多糖沉淀,冷冻干燥得粗多糖,计算粗多糖得率(Peasura et al, 2015)。

粗多糖得率(%) = 粗多糖质量/千斤拔粉末的质量 $\times 100\%$

考察回流提取过程中提取时间、料液比、提取温度对粗多糖得率的影响(黄晓君等,2013)。

1.2.2.1 考察提取时间对粗多糖得率的影响 精密称取千斤拔粉末 10 g,按照 1.2.2 中的试验方法,选择提取时间为 1、1.5、2、2.5、3 h,料液比 1:20,提取温度为 80℃,选取最佳浸提时间。结果表明,最佳提取时间是 2.5 h。

1.2.2.2 考察料液比对粗多糖得率的影响 精密称取千斤拔粉末 10 g,按照 1.2.2 中的试验方法,时间为 2.5 h,选取提取温度为 80℃,改变料液比为 1:20、1:30、1:40、1:50、1:60,选取最佳料液比。结果表明,最佳料液比为 1:30。

1.2.2.3 考察提取温度对粗多糖得率的影响 精密称取千斤拔粉末 10 g,按照 1.2.2 中的方法,提取时间为 2.5 h,料液比为 1:30,提取温度为 50、60、70、80、90、100℃,选取合适的温度。最佳提取温度为 80℃。

1.2.3 正交试验 精密称取千斤拔粉末 20 g,按照

1.2.2 中的试验方法,根据表 1 中的提取工艺因素水平进行 $L_9(3^3)$ 正交试验 (Ye et al, 2015)。并对正交实验进行极差分析和方差分析 (陈佳丽等, 2015)。

表 1 提取工艺因素水平

Table 1 Factor levels of extraction process

水平 Level	A (时间) Time (h)	B (料液比) Stock ratio	C (温度) Temperature (°C)
1	2	1 : 20	70
2	2.5	1 : 30	80
3	3	1 : 40	90

1.3 千斤拔多糖的脱蛋白

在提取多糖的过程中同时会析出蛋白质,所以脱蛋白是多糖纯化的重要环节之一,蛋白质和多糖都是亲水性大分子,其结构具有复杂性、多样性等特点 (郭思维等, 2013)。粗多糖脱蛋白的好次以蛋白脱除率及多糖保留率为评判指标 (张帅等, 2015)。其中:①蛋白脱除率(%) = (脱蛋白前蛋白含量 - 脱蛋白后蛋白含量) / 脱蛋白前蛋白含量 × 100%; ②多糖保留率(%) = 脱蛋白后多糖的含量 / 脱蛋白前多糖的含量 × 100%。

1.3.1 蛋白质的含量测定 采用考马斯亮蓝 G-250 法 (柳荫等, 2013), 制作蛋白质的标准曲线 ($Y = 0.510 1X + 0.008 1$, $R^2 = 0.999 1$ 。式中, Y 为吸光度, X 为牛血清蛋白含量)。

1.3.2 Sevag 法 取粗多糖溶液 100 mL 置于分液漏斗中,加入 25 mL Sevage 试剂 (氯仿与正丁醇体积比为 4 : 1),上下振摇约 5 min,静置分层后,保留上层的无机层,将上清液再加入相同比例的 Sevage 试剂,同法分别萃取 1、2、3、4 次,每次测定上清液中蛋白质及多糖的吸光度 (夏泉等, 2007)。

1.3.3 三氯乙酸 (TCA) 法 取 5 份同样浓度的多糖溶液,分别加入浓度为 1%、3%、5%、7%、9% 的三氯乙酸溶液,混匀,静置,过夜,4 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液,测其蛋白质和多糖吸光度。

1.4 分级分离

1.4.1 DEAE-52 树脂和透析袋的处理 取适量 DEAE-52 纤维素,蒸馏水浸泡 24 h,去掉悬浮物,然后在 1 000 mL 0.5 mol · L⁻¹ NaOH 溶液中浸泡 1 h,抽滤,用蒸馏水洗至 pH 为中性,然后在 1 000 mL 0.5 mol · L⁻¹ HCl 溶液中浸泡 1 h,抽滤,用蒸馏水洗至

pH 为中性,最后用 1 000 mL 0.5 mol · L⁻¹ NaOH 浸泡 1 h 抽滤,再用蒸馏水洗至中性,使 DEAE-52 纤维素洗至碱性。将处理好的纤维素装入层析柱,用蒸馏水平衡 24 h (薛丹等, 2014)。

将透析袋放置于蒸馏水中,水煮 10 min 后,用 60 °C 蒸馏水冲洗 2 min,最后放置在 4 °C 蒸馏水中待用 (颜小捷等, 2012)。

1.4.2 上柱分离 称取 3 g 纯化后的千斤拔多糖适量双蒸水超声溶解,离心后上清液,用 DEAE-52 纤维素柱色谱进行分离,依次用双蒸水,0.05、0.1、0.2、0.5 mol · L⁻¹ 氯化钠溶液,0.5 mol · L⁻¹ 氢氧化钠溶液洗脱,流速 1 mL · min⁻¹,分部收集,每管收集 10 mL,用苯酚-硫酸法测吸光度,以横坐标为洗脱体积,纵坐标为其吸光度值,制作洗脱曲线。

将各段高峰部分分别合并,装入透析袋中,自来水透析 24 h,去离子水透析 48 h,每隔 4~6 h 换一次水。离心,减压浓缩,干燥。

1.4.3 HPLC 测定千斤拔多糖中的单糖或多糖 称取 10 g 纯化后的千斤拔多糖用蒸馏水超声溶解,溶于 3 mL 浓度为 3 mol · L⁻¹ 硫酸中,置沸水浴中冷凝回流水解 8 h,过滤,减压浓缩 (颜小捷等, 2012),浓缩液中加入 0.02 g 活性炭进行脱盐,再加入适量强碱,强酸性阴离子树脂,震摇,电导仪测其电导,电导率低于 10 $\mu\text{s} \cdot \text{cm}^{-1}$ 时,将浓缩液经滤纸及 0.45 μm 微孔滤膜过滤,超声进高效液相色谱分析。

各标准品用纯净水配制成 10.0 g · L⁻¹ 后经 HPLC 分析 (Pan et al, 2015)。

高效液相色谱仪 (HPLC), 控制器 CBM-20A, 泵 LC-20AT, 示差折光检测器 RID-10A, 色谱柱 Transnomic Ca²⁺。柱温 85 °C, 流动相为超纯水, 流速 0.5 mL · min⁻¹, RID-10A 示差折光检测器, 进样量: 20 μL (丁海龙等, 2010)。

2 结果与分析

2.1 各单因素水平

根据单因素实验的最佳提取时间、液料比及提取温度,分别选取各单因素的 3 个水平 (表 1)。

2.2 正交试验结果

根据单因素水平设计的正交试验,各实验结果及极差分析如表 2,方差分析结果如表 3。经查 F 分布表,查得 $F_{0.10(2,2)} = 9.0$, $F_{0.05(2,2)} = 19.0$, $F_{0.01(2,2)} = 99.0$, A、B、C 三因素的 F 值均小于 $F_{0.10(2,2)}$ 、

$F_{0.05(2,2)}$ 、 $F_{0.01(2,2)}$,因此均无显著性,但 B 因素的作用明显强于 A 与 C,且 A 的作用又大于 C。通过表 2 中的极差分析的结果也表明,B 因素也是其主要影响因素,同时 $A > C$,因此 $B > A > C$,得到最佳提取条件为 $A_2B_2C_2$,即时间 2.5 h,料液比为 1:30,温度 80 ℃,按照此条件 3 次试验,得出其粗多糖得率为 $(8.558 \pm 0.5)\%$,并测得其多糖含量为 8.971%。

表 2 正交试验及极差分析结果

Table 2 Results of orthogonal test and range analysis

因素 Factor	A	B	C	吸光度 Absorbancy	粗多糖得率 Yield (%)
1	1	1	1	0.041	3.432
2	1	2	2	0.061	5.449
3	1	3	3	0.078	7.327
4	2	1	2	0.077	7.186
5	2	2	3	0.088	8.222
6	2	3	1	0.056	5.026
7	3	1	3	0.040	3.326
8	3	2	1	0.086	8.133
9	3	3	2	0.081	7.682
K_1	16.208	13.944	16.591		
K_2	20.434	21.804	20.317		
K_3	19.141	20.035	18.875		
R	4.226	6.091	3.726		

2.3 两种脱蛋白方法的比较

脱蛋白前多糖的吸光度为 0.237,蛋白的吸光度为 0.225。由表 4 可知,随着萃取次数的增多,蛋白的脱除率也增大,但是 3 次之后就有所下降,而多糖的保留率会一直在减小,显而易见萃取 3 次时除蛋白的效果较好。

由表 5 所示,随着三氯乙酸浓度的增加蛋白的脱除率也增大,当浓度大于 7%时蛋白的脱除率有所下降,而多糖的保留率也在减少,综合考虑,浓度为 7%时除蛋白的效果较好。

Sevag 法和三氯乙酸法脱蛋白两种方法各有各的特点,但综合考虑蛋白脱除率及多糖保留率,选用 Sevag 法,萃取 3 次较好,其多糖保留率为 76.41%,蛋白脱除率为 65.22%。

2.4 DEAE-52 纤维素柱对千斤拔粗多糖的分离

称取 3 g 脱蛋白后的千斤拔多糖用适量蒸馏水

表 3 方差分析结果

Table 3 Results of variance analysis

方差来源 Source of variation	离差平方和 Sum of squares of deviations	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value
A	3.126	2	1.563	0.235	>0.05
B	11.334	2	5.667	0.851	>0.05
C	2.353	2	1.177	0.177	>0.05
误差 Error	13.314	2	6.657		
总和 Total	30.128				

表 4 Sevag 法脱蛋白

Table 4 Deproteinization of Sevag

次数 Times	1	2	3	4
蛋白脱除率 (%) Rate of deproteinization	47.57	62.27	65.22	62.45
蛋白吸光度 Protein absorbancy	0.122	0.090	0.084	0.089
多糖保留率 (%) Retention rate of polysaccharides	79.50	77.94	76.41	74.23
多糖吸光度 Polysaccharide absorbancy	0.190	0.186	0.183	0.178

表 5 三氯乙酸(TCA)法脱蛋白

Table 5 Deproteinization of TCA

三氯乙酸浓度 Concentration of trichloroacetic acid (%)	1	3	5	7	9
蛋白脱除率 (%) Rate of deproteinization	44.35	49.91	50.70	57.75	55.27
蛋白吸光度 Protein absorbancy	0.129	0.158	0.125	0.099	0.105
多糖保留率 (%) Retention rate of polysaccharides	81.67	79.96	77.55	74.43	69.08
多糖吸光度 Polysaccharide absorbancy	0.195	0.191	0.185	0.178	0.166

超声溶解,经 DEAE-52 纤维素柱分离得到 7 个纯化组分,如图 1 所示。其中,各组分的质量如下:①以蒸馏水为洗脱剂(58.43 mg);②以 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$ 为洗脱剂(30.15 mg);③以 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$ 为洗脱剂(26.17 mg);④以 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$ 为洗脱剂(22.63 mg);⑤以 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$ 为洗脱剂(25.94 mg);⑥以 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaOH}$ 为洗脱剂(80.67 mg);⑦以 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaOH}$ 为洗脱剂(29.61 mg)。

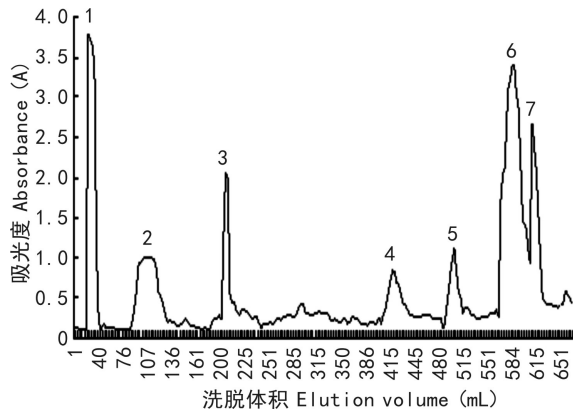


图 1 洗脱曲线
Fig.1 Curve of elution

2.5 千斤拔粗多糖的单糖组成分析

将常见标准品制备后用高效液相进行分析,保留时间分别为果糖(15.350 min),葡萄糖(11.780 min),纤维二糖(9.404 min),甘露糖(13.783 min),木糖(13.138 min),阿拉伯糖(15.495 min),木二糖(10.433 min),半乳糖(13.333 min)。样品处理后其纯度为94%,经HPLC检测,其结果如图2所示,根据标准品的出峰保留时间,千斤拔多糖出峰时间分别为峰1:10.558 min,峰2:11.771 min,峰3:13.667 min,峰4:15.421 min,得出千斤拔多糖中含有葡萄糖(峰2),甘露糖(峰3),阿拉伯糖(峰4),各峰的峰面积所占百分比为峰1:6.11%,峰2:57.40%,峰3:17.18%,峰4:19.31%。根据葡萄糖峰面积所占的百分比,酸水解的千斤拔多糖中主要的单糖成分为葡萄糖。

3 讨论与结论

用酸或碱提取植物中的多糖时,多糖活性结构遭到破坏,发生水解,所以千斤拔多糖用水提比较适宜。回流提取法与传统中药的煎煮方式很相似,在方法上具有操作简单、价格低等特点。

多糖在提取的过程中会伴有蛋白质的出现,在纯化多糖时就要先除去蛋白类物质,由于蛋白质和多糖结合紧密,所以在脱除蛋白质的过程中会出现多糖被消耗的现象,所以只能较大程度地脱蛋白(张帅等,2015)。有学者在研究同科植物黄芪多糖除蛋白时发现,采用Sevag法6次处理可达到较为

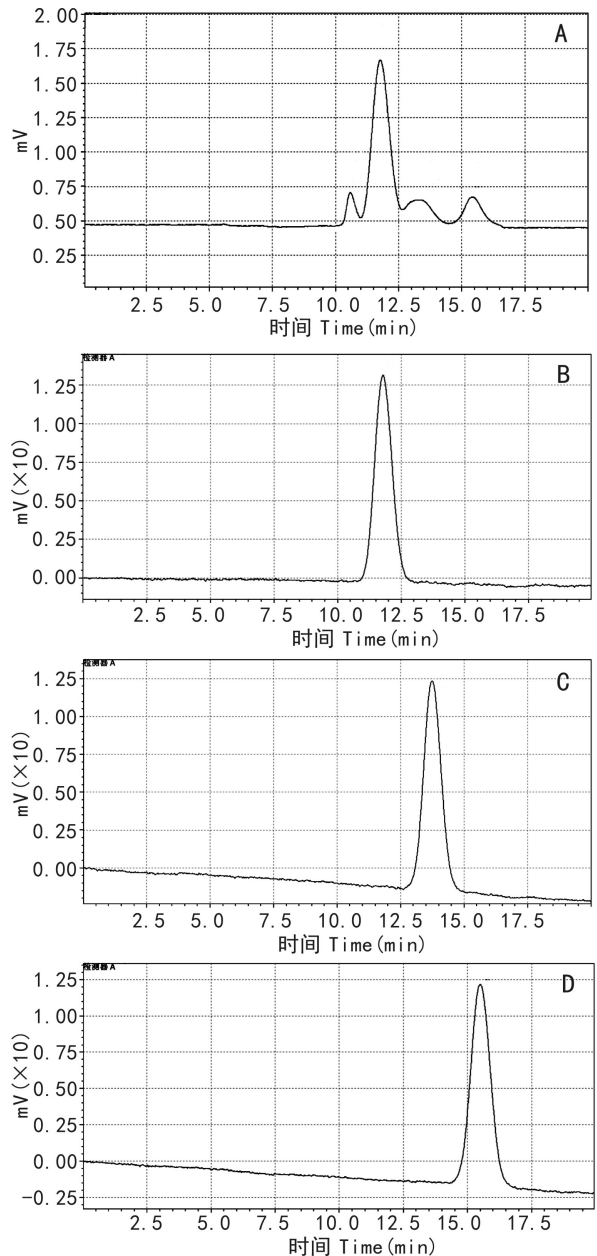


图 2 对照品溶液及水解多糖的 HPLC 图 A. 千斤拔多糖; B. 葡萄糖标准品; C. 甘露糖标准品; D. 阿拉伯糖标准品。

Fig. 2 High chromatograms standard and polysaccharide of hydrolyzation A. *Moghania* polysaccharides; B. Glucose standard; C. Mannose standard; D. Arabinose standard.

理想的结果(夏泉等,2007)。目前对于千斤拔多糖除蛋白质的研究甚少,本实验比较了Sevag法和三氯乙酸法,发现采用Sevag法处理3次时的效果较好。且Sevag法方法简单,在温和的反应中达到脱蛋白的目的。

多糖是由单糖聚合而成,其分离有很多方法,比如分级沉淀法,离子交换色谱法,凝胶柱色谱法等。据文献报道,同科植物黄芪采用 DEAE-52 纤维素色谱分离,分得 7 个组分,且含有甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖(唐雨薇等,2014)。而对于千斤拔多糖目前还没有专家学者对其进行分离,而本实验亦采用了 DEAE-52 纤维素分离柱,亦分得 7 个组分,这 7 个组分具体含有的物质还需后面的实验研究。千斤拔多糖经酸水解,虽然峰 1 和木二糖的保留时间很接近,但是木二糖在酸性条件下很容易水解成木糖,在样品峰中没有木糖的保留时间(13.138 min),所以峰 1 不是木二糖,其具体物质还要后面的研究验证,所以由高效液相检测出来的有葡萄糖、甘露糖、阿拉伯糖 3 种单糖成分,葡萄糖为其主要糖类成分。今后我们将进一步研究千斤拔多糖的分子量及千斤拔多糖对小鼠的免疫功能、抗肿瘤活性等药理作用。

参考文献:

CHEN JL, LOU TT, TIAN WH, et al, 2015. Optimization of extracting technology for Bushen Quyu Granules by orthogonal test [J]. Chin J Exp Trad Med Form, 21(13):20-23. [陈佳丽, 楼婷婷, 田文慧, 等, 2015. 正交试验法优选补肾祛瘀颗粒的提取工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 21(13):20-23.]

CHINESE PHARMACOPOEIA COMMISSION, 2010. Chinese Pharmacopoeia [S] 2010, Beijing: Chemical Industry Press; Appendix 22. [国家药典委员会, 2010. 中国药典, 2010 版 [S]. 北京: 化学工业出版社: 附录 22.]

DING HL, HE KZ, ZHANG L, et al, 2010. Extraction and fractional separation of polysaccharide from *Astragalus membranaceus* on the basis of molecular weight [J]. Chin J Appl Environ Biol, 16(5):719-723. [丁海龙, 何开泽, 张磊, 等, 2010. 黄芪多糖的提取及按相对分子质量分段分离 [J]. 应用与环境生物学报, 16(5):719-723.]

GUAN YH, ZENG J, ZHANG LX, 2008. Preparations research situation and adhibition of *Flemingia* root in Dai [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharm, 10(10):39-40. [管燕红, 曾君, 张丽霞, 2008. 千斤拔制剂研究概况及在傣医中的应用 [J]. 中国民族医药, 10(10):39-40.]

GUO SW, LIU SZ, LI W, et al, 2013. Decoloration and deproteization of *Cordyceps sinensis* polysaccharides [J]. Food Sci Technol, 38(5):207-211. [郭思维, 刘胜姿, 李威, 等, 2013. 人工冬虫夏草多糖脱色脱蛋白工艺研究 [J]. 食品科技, 38(5):207-211.]

HUANG XJ, NIE SP, WANG YT, et al, 2013. Optimized extraction and compositional analysis of polysaccharides from dried stems of *Dendrobium officinale* [J]. Food Sci, 34(22):21-26. [黄晓君, 聂少平, 王玉婷, 等, 2013. 铁皮石斛多糖提取工艺优化及其成分分析 [J]. 食品科学, 34(22):21-26.]

LIU Y, WU FZ, CHEN L, et al, 2013. Determination of water-soluble protein in walnut by Bradford method [J]. Chin

Brewing, 12(32):131-133. [柳荫, 吴凤智, 陈龙, 等, 2013. 考马斯亮蓝法测定核桃水溶性蛋白含量的研究 [J]. 中国酿造, 12(32):131-133.]

PAN Y, LI N, WAN JB, et al, 2015. Structural characterization and antioxidant activity of a heteropolysaccharide from *ganoderma caespense* [J]. Carbohydr Polym, 30(121):183-189.

PEASURA N, LAOHAKUNJIT N, KERDCHOECHUEN O, et al, 2015. Characteristics and antioxidant of ulvaintestinalis sulphated polysaccharides extracted with different solvents [J]. Int J Biol Macromol, 27(5):912-919.

REN CQ, LIU Y, YUAN W, 2009. To filtrate extract separation technology of *Flemingia* polysaccharide by the orthogonal experiment [J]. Lishizhen Med Mat Med Res, 20(5):1051-1053. [任朝琴, 刘圆, 袁玮, 2009. 正交实验法筛选千斤拔多糖的提取分离工艺 [J]. 时珍国医国药, 20(5):1051-1053.]

SONG LR, HONG X, DING XL, et al, 2001. China Chinese materia medica dictionary [M]. Vol. 1. Beijing: People's Medical Publishing House; 195. [宋立人, 洪恂, 丁续亮, 等, 2001. 中国中药学大辞典 [M]. 上册. 北京: 人民卫生出版社: 195.]

TANG YW, ZHANG Y, WANG YL, et al, 2014. Isolation and structure feature analysis of *Astragalus* polysaccharides [J]. Lishizhen Med Mat Med Res, 25(5):1097-1100. [唐雨薇, 张宇, 王宇亮, 等, 2014. 黄芪多糖分离与结构特征分析 [J]. 时珍国医国药, 25(5):1097-1100.]

XIA Q, LIU G, GE CL, et al, 2007. Removal of proteins from crude *Astragalus* polysaccharides by Sevag method [J]. Anhui Med Pharmac J, 11(12):1069-1071. [夏泉, 刘钢, 葛朝亮, 等, 2007. Sevag 法去除黄芪粗多糖中蛋白质成分的研究 [J]. 安徽医药, 11(12):1069-1071.]

XUE D, HUANG DD, HUANG GH, et al, 2014. The research progress of plant polysaccharides extraction purification [J]. J Chin Med Mat, 37(1):157-161. [薛丹, 黄豆豆, 黄光辉, 等, 2014. 植物多糖提取分离纯化的研究进展 [J]. 中药材, 37(1):157-161.]

XU N, LI XP, 2013. Preparation process of Fukeqianjin granules [J]. Strait Pharm J, 25(3):8-9. [许宁, 李喜平, 2013. 妇科千金颗粒制备工艺的研究 [J]. 海峡药学, 25(3):8-9.]

YAN XJ, LU FL, CHEN HY, et al, 2012. Studies on isolation, purification, structural identification and its antitumor activity of polysaccharides from *Momordica grosvenori* swingle's root [J]. Guihaia, 32(1):138-142. [颜小捷, 卢凤来, 陈换莹, 等, 2012. 罗汉果根多糖的分离纯化、结构鉴定及抗肿瘤活性研究 [J]. 广西植物, 32(1):138-142.]

YE D, JIANG Z, ZHENG F, et al, 2015. Optimized extraction of polysaccharides from *grateloupia livida*(Harv.) Yamada and biological activities [J]. Molecules, 20(7):16817-16832.

ZHANG JZ, XU QL, XU JF, 2015. Determination of momordica charantia polysaccharide by improved phenol-sulfuric acid method [J]. Food Res Devel, 36(5):82-85. [张居作, 许巧玲, 徐君飞, 2015. 苦瓜多糖含量的苯酚硫酸法检测研究 [J]. 食品研究与开发, 36(5):82-85.]

ZHANG S, ZHENG BD, LIN LM, et al, 2015. Comparison of deproteination methods for bamboo shoot shell polysaccharides [J]. Chin J Trop Crops, 36(5):987-990. [张帅, 郑宝东, 林良美, 等. 笋壳多糖脱蛋白方法的比较 [J]. 热带作物报, 2015, 36(5):987-990.]