

北沙参多糖的分离、纯化及其体外免疫活性考察

杜宝香, 相美容, 付业佩, 张静, 蒋海强, 容蓉*
(山东中医药大学药学院, 实验中心, 济南 250355)

[摘要] 目的:分离、纯化北沙参多糖(Glehniae Radix polysaccharides, GRP)并对各纯化组分(GRP-1, GRP-2, GRP-3)进行结构表征及体外免疫活性研究。方法:采用水提醇沉法获得 GRP, Sevage 法除蛋白, 活性炭脱色素, DEAE 纤维素 DE-52 柱色谱法及葡聚糖凝胶 G-75 (Sephadex G-75) 柱色谱法分离与纯化。采用紫外分光光度法(UV)及 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)衍生化-HPLC 对北沙参多糖的含量及其单糖组成进行分析, 采用傅里叶红外光谱仪(IR)及多角度激光散射仪对 GRP-1 进行结构表征及相对分子质量测定, 并考察北沙参多糖体外对小鼠脾淋巴细胞增殖活性的影响。结果:GRP 经柱色谱分离可获得 GRP-1, GRP-2, GRP-3 共 3 种多糖组分, UV 测得三者的多糖质量分数分别为 96.16%, 48.64% 和 89.73%。其中, GRP-1 为具有相对均一分子质量的多糖组分, 相对分子质量 23.01 kDa, 由甘露糖-葡萄糖醛酸-鼠李糖-葡萄糖-半乳糖-阿拉伯糖组成, 摩尔比为 81.86:0.12:0.17:1 259.7:0.54:0.33, 红外光谱表明其结构中存在 α 型糖苷键。体外免疫活性结果表明 GRP-1 组分对体外脾脏淋巴细胞的增殖具有较好的促进作用, 此外 GRP-2 及 GRP-3 对脾脏淋巴细胞的增殖也具有一定的推动作用。结论:GRP-1 是由多种单糖组成的相对均一的多糖组分, 并具有较好的体外免疫活性。

[关键词] 北沙参; 多糖; 分离; 纯化; 免疫活性; 抗肿瘤; 红外光谱

[中图分类号] R22; R289; R283.6; R284; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)11-0027-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.20181104

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180315.0919.008.html>

[网络出版时间] 2018-03-15 14:38

Investigation of Isolation, Purification, Structural Identification and *in Vitro* Immunological Function of Polysaccharides in Glehniae Radix

DU Bao-xiang, XIANG Mei-rong, FU Ye-pei, ZHANG Jing, JIANG Hai-qiang, RONG Rong*
(*Experimental Center, School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China*)

[Abstract] **Objective:** To isolate and purify polysaccharides in Glehniae Radix (GRP) and investigate the structural characterization and *in vitro* immunological activity of each purified fraction (GRP-1, GRP-2 and GRP-3). **Method:** GRP was obtained by water extraction and ethanol precipitation method, and then GRP was subjected to protein removal by Sevage method, and then underwent further purification by DEAE cellulose DE-52 column chromatography and Sephadex G-75 column chromatography. The content of GRP and its monosaccharide composition were determined by ultraviolet spectrophotometry (UV) and high performance liquid chromatography combined with derivatization of 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (HPLC-PMP), molecular weight and structural characterization of GRP-1 were carried out by infrared spectrometer (IR) and multi-angle laser light scattering instrument, respectively. The viability of mouse spleen lymphocytes treated with the three fractions was determined by methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay. **Result:** Three fractions of GRP-1, GRP-2 and GRP-3 were obtained after separation and purification, GRP-1 with a relative molecular weight of 23.01 kDa was a

[收稿日期] 20171013(023)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2017ZX09101003-003-004);山东省重点研发计划项目(2017CXGC1309)

[第一作者] 杜宝香,在读硕士,从事中药及复方活性成分与质量控制研究, E-mail:1441836096@qq.com

[通信作者] *容蓉,博士,教授,从事中药及复方活性成分与质量控制研究, Tel:0531-89628192, E-mail:rosierong@163.com

homogeneous polysaccharide, while GRP-2 and GRP-3 were two hetero polysaccharides. The contents of polysaccharides in the three fractions were 96.16%, 48.64% and 89.73%, respectively. GRP-1 was composed of mannose, glucuronic acid, rhamnose, glucose, galactose and arabinose in a molar ratio of 81.86:0.12:0.17:1.259.7:0.54:0.33. Structure of GRP-1 might have α -glycosidic bond. In the end, *in vitro* immunological activity results showed that the three polysaccharide components exhibited good immune activity. **Conclusion:** GRP-1 is a homogeneous polysaccharide with strong immunological activity *in vitro*.

[Key words] Glehniae Radix; polysaccharides; isolation; purification; immune activity; anti-tumor; infrared spectroscopy

北沙参为伞形科植物珊瑚菜的干燥根,味甘、微苦,性微寒,归肺、胃经,具有养阴清肺、益胃生津的功效。研究表明北沙参主要含有挥发油类、香豆素类及糖类等成分^[1-2],作为北沙参的主要成分之一,北沙参总多糖质量分数达 70% 以上^[3],在调节机体免疫、消除自由基以及抗肿瘤等方面发挥着不可替代的作用^[4-5]。目前,对北沙参多糖的研究主要侧重于提取方法和含量测定方面^[6-7],对其药理活性的研究也仅集中在粗多糖组分,关于北沙参总多糖的分离、纯化及活性研究的报道较少。本实验采用热水浸提、分级醇沉法获得北沙参粗多糖组分(GRP),经 Sevage 法脱蛋白、活性炭除色素及柱色谱分离纯化得到 3 个北沙参多糖组分(GRP-1, GRP-2, GRP-3),并对其进行多糖含量测定、单糖组成及体外免疫活性研究,重点对 GRP-1 进行相对分子量测定及红外光谱分析,旨在进一步对北沙参多糖类成分的结构进行表征。

1 材料

UV-2800 型紫外-可见分光光度计(日本日立公司),DAWN HELEOS II 型多角度激光散射仪和 Optilab rEX 型示差折光检测仪(美国 Wyatt 技术公司),e2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),Frontier 型红外光谱仪(美国 PerkinElmer 公司),TD5A 型高速离心机(盐城凯特实验仪器有限公司),DNM-9602 型多功能酶标仪(北京普朗新技术有限公司)。

北沙参药材购于山东省济南市百味堂中药饮片有限公司,经山东中医药大学徐凌川教授鉴定为伞形科植物珊瑚菜 *Glehnia littoralis* 的干燥根。DEAE 纤维素 DE-52(北京 Solarbio 科技有限公司),葡聚糖凝胶 G-75(Sephadex G-75,上海源叶生物科技有限公司),D-无水葡萄糖对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号 MUST-14072601,纯度 > 98%),牛血清白蛋白(上海伯奥生物科技有限公司,批号 130102),RPMI-1640 培养液(江苏凯基生物技术

股份有限公司),水为蒸馏水,试剂均为国产分析纯。

SPF 级雄性昆明种小鼠,体质量 18 ~ 22 g,购自济南朋悦实验动物繁育有限公司,合格证号 SCXK(鲁)2014-0007。本文涉及的动物实验经山东中医药大学伦理委员会批准,批准号 2016-007。

2 方法

2.1 北沙参粗多糖的提取^[8] 取北沙参药材 1 kg,粉碎,过四号筛,加 80% 乙醇回流脱脂。取药渣 500 g,加入 25 倍量水,于 94.9 °C 条件下浸提 2 次,每次 2 h,过滤,离心(3 000 r·min⁻¹, 15 min,下同),上清液减压浓缩,得北沙参热水浸提液,加入适量无水乙醇,控制乙醇体积分数在 40%,于 4 °C 冰箱静置 24 h,抽滤得沉淀,分别用少量无水乙醇和丙酮洗涤 2 ~ 3 次,冷冻干燥,得北沙参粗多糖。

2.2 北沙参粗多糖的纯化与分离

2.2.1 除蛋白 取 2.1 项下北沙参粗多糖以水复溶,加入 Sevage 试剂[三氯甲烷-水饱和正丁醇(4:1)]振荡,离心,弃去下层有机层和中间变性蛋白,重复此步骤 3 次至两层交界处无明显变性蛋白。

2.2.2 脱色素 取 2.2.1 项下除蛋白后的北沙参多糖溶液,加入多糖质量 1% 的活性炭,70 °C 水浴保温 10 min,离心(3 000 r·min⁻¹, 5 min)除去活性炭,重复 2 次,上清液浓缩后冷冻干燥,得脱色素后北沙参乙醇沉淀多糖。

2.2.3 北沙参多糖的柱色谱分离 取除蛋白、脱色素后北沙参多糖组分进行 DEAE 纤维素 DE-52 柱色谱分离和纯化,分别用水和浓度为 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 mol·L⁻¹ 的 NaCl 溶液梯度洗脱,利用苯酚-硫酸法跟踪检测,对同一洗脱峰的流分进行合并,得到的组分进行 Sephadex G-75 柱色谱分离,以水为洗脱剂,流分收集、合并,得多糖组分 GRP-1, GRP-2, GRP-3。由于浓度为 0.3, 0.5 mol·L⁻¹ 的 NaCl 溶液的洗脱组分得率较少,故未对这 2 个组分进行下一步的 Sephadex G-75 柱色谱分离。

2.3 多糖含量的测定

2.3.1 对照品溶液的配制 精密称取 *D*-无水葡萄糖对照品 10 mg,加水溶解并定容至 100 mL 量瓶中,得 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 储备液,备用。

2.3.2 线性关系考察 分别精密移取葡萄糖储备液 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mL 置于 10 mL 刻度管中,加水定容至 1 mL,加入 5% 苯酚溶液 1 mL,迅速加入浓硫酸 4 mL,摇匀,80 °C 水浴中放置 15 min,冷却至室温,以水为空白对照,于 490 nm 处测定吸光度 *A*。

2.3.3 样品测定 取北沙参各多糖组分样品适量,精密称定,加水溶解并定容至 10 mL,取定容后样品溶液 1 mL 置于 10 mL 刻度管中,按 2.3.2 项下步骤测定 *A*。

2.4 单糖组成的分析

2.4.1 完全酸水解 分别称取 2.2.3 项下北沙参各多糖组分适量于具塞试管中,加入 $2 \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 三氟乙酸(TFA)溶液,使多糖完全溶解,置 100 °C 烘箱中水解 10 h,冷却后转移至蒸发皿中,水浴蒸干,加甲醇洗涤,蒸干,重复洗涤 4 次,至 TFA 蒸发完全。

2.4.2 样品衍生物的制备 精密称定 *L*-鼠李糖, *D*-阿拉伯糖, *D*-甘露糖, *D*-无水葡萄糖, *D*-半乳糖, *D*-木糖,岩藻糖,果糖, *D*-葡萄糖醛酸及 2.4.1 项下水解多糖样品各 5 mg,按文献[9-10]的方法制备样品衍生物。分别取各单糖对照品衍生物 1.0 mL,混匀,得混合单糖对照品溶液,供 HPLC 分析用。

2.4.3 色谱条件 采用 Synchronis AQ-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-磷酸盐缓冲液(KH₂PO₄-NaOH, pH 6.81)(16:84),柱温 30 °C,检测波长选择 250 nm,进样量 20 μL,流速设定 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

2.4.4 各单糖摩尔比的计算^[11] 根据以下公式对 HPLC 测定的北沙参多糖中所含单糖的摩尔比(物质的量之比)进行计算。 $n_1 : n_2 : n_3 : n_x = (A1' \times m1) / (A1 \times M1) : (A2' \times m2) / (A2 \times M2) : (A3' \times m3) / (A3 \times M3) : (AX' \times mX) / (AX \times MX)$,式中 $n_1 \sim n_x$ 分别为供试品溶液中各单糖的物质的量, $A1' \sim AX'$ 分别为供试品溶液中各单糖衍生物的峰面积, $A1 \sim AX$ 分别为混合对照品中各单糖衍生物的峰面积, $m1 \sim mX$ 分别为混合对照品中各单糖对照品的质量, $M1 \sim MX$ 分别为混合对照品中各单糖对照品的相对分子质量。

2.5 GRP-1 的相对分子质量测定

2.5.1 供试品溶液的制备 精密称取北沙参多糖

组分 GRP-1 适量,加流动相使溶解,配成 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 样品溶液,供相对分子质量测定用。

2.5.2 色谱条件 Shodex SB-806M 色谱柱,流动相 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaNO₃ 溶液(含 0.02% NaN₃),流速 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,激光发射波长 658.0 nm,Optilab rEX 示差折光检测仪,进样量 200 μL,检测温度为室温。

2.6 GRP-1 的红外光谱分析 取北沙参多糖组分 GRP-1 适量,加入 200 倍量干燥的 KBr,研磨混匀,取少量研磨后的样品制成均匀透明的压片,测定其在 $400 \sim 4000 \text{ cm}^{-1}$ 的红外光谱。

2.7 北沙参多糖对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响

2.7.1 小鼠脾脏淋巴细胞的制备 小鼠颈颈椎处死,用 75% 乙醇浸泡 2~3 min,在超净工作台内,用眼科剪切开小鼠腹腔,取出脾脏,把脾脏放在 200 目滤网膜上研磨,收集研磨液于细胞培养液中,将含有脾脏细胞的悬液置于 1.5 mL 离心管中离心(转速 $800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min),弃去上清液,用 RPMI-1640 培养液重悬细胞,计数,稀释成密度约 5×10^6 个/mL 的小鼠脾淋巴细胞悬液。

2.7.2 供试品溶液的制备 取 2.2.3 项下北沙参各多糖组分适量,精密称定,溶于水中,过滤,用 RPMI-1640 培养液稀释,使各多糖组分的终质量浓度分别为 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.8 mg·L⁻¹, 备用。

2.7.3 脾脏细胞免疫试验 取小鼠脾淋巴细胞悬液 100 μL(密度约 5×10^6 个/mL),加入到 96 孔板,加入 2.7.2 项下各供试品溶液,每孔加入体积为 100 μL,每个质量浓度均设置为 3 孔。同时设置空白组(含细胞培养液和脾脏细胞),置于 37 °C, 5% CO₂ 的培养箱中连续培养 44 h,每孔加入 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 噻唑蓝(MTT) 20 μL,继续培养 4 h,离心(转速设定 $2000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min),弃上清,每孔加入二甲基亚砜(DMSO) 150 μL,震荡 10 min,于 492 nm 处测定 *A*,根据公式增殖率 = $(A_{\text{试验组}} - A_{\text{空白组}}) / A_{\text{空白组}}$ 计算细胞增殖率,式中 $A_{\text{试验组}}$ 为各试验组的吸光度, $A_{\text{空白组}}$ 为空白组的吸光度。

3 结果

3.1 北沙参 40% 乙醇沉淀多糖的分离纯化 北沙参多糖经 DEAE 纤维素 DE-52 柱色谱及 Sephadex G-75 凝胶柱色谱分离、苯酚-硫酸法跟踪检测,以洗脱管数为横坐标, *A* 为纵坐标,绘制洗脱曲线,见图 1。合并同一洗脱峰流分,水浴蒸干,得各多糖干燥粉末 GRP-1, GRP-2 和 GRP-3。

3.2 多糖含量测定 以葡萄糖对照品溶液的质量

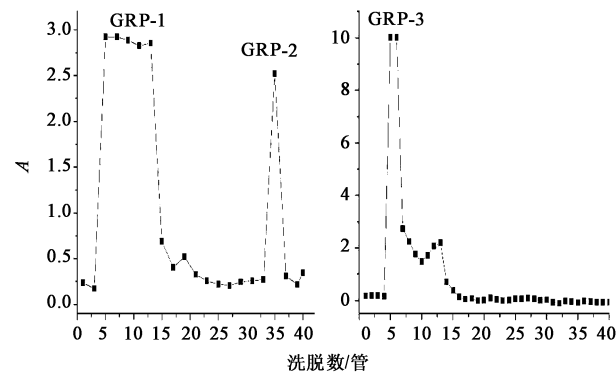


图 1 Sephadex G75 柱色谱分离北沙参多糖的洗脱曲线
Fig. 1 Elution curves of polysaccharides in *Glehnia Radix* by Sephadex G75 column chromatography

浓度为横坐标, A 为纵坐标, 得回归方程 $Y = 11.41X - 0.067 (r = 0.9994)$ 。取定容后北沙参各多糖样品溶液 1 mL 置于 10 mL 刻度管中, 按 2.3.2 项下方法测定 A , 根据回归方程计算 GRP-1, GRP-2 和 GRP-3 中多糖质量分数分别为 96.16%, 48.64%, 89.73%。

3.3 单糖组成研究 取 2.4.2 项下的多糖衍生物溶液, 按 2.4.3 项下色谱条件进行分析。根据各多糖组分的单糖组成, 按 2.4.4 项下公式对各单糖的摩尔比进行计算。见表 1 和图 2。

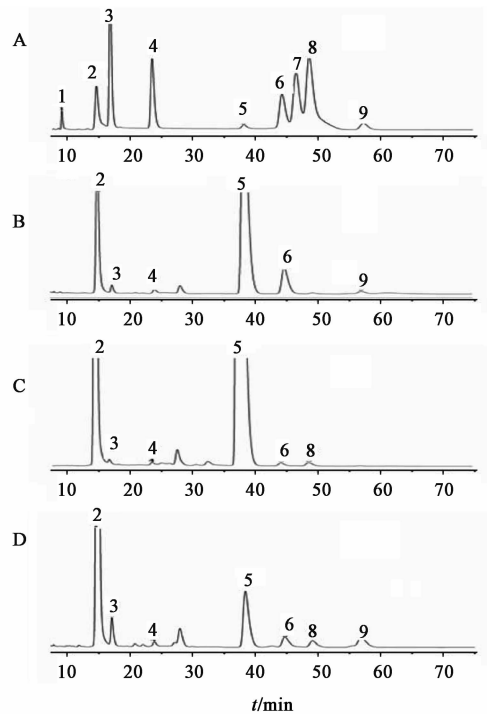
表 1 北沙参各多糖组分的单糖组成及其摩尔比计算

Table 1 Calculation of monosaccharide composition and their molar ratio of each polysaccharide component in *Glehnia Radix*

多糖组分	单糖组成	摩尔比
GRP-1	甘露糖-葡萄糖醛酸-鼠李糖-葡萄糖-半乳糖-阿拉伯糖	81.86:0.12:0.17:1259.7:0.54:0.33
GRP-2	甘露糖-葡萄糖醛酸-鼠李糖-葡萄糖-半乳糖-岩藻糖	24.15:0.4:0.46:541.3:8.25:2.50
GRP-3	甘露糖-葡萄糖醛酸-鼠李糖-葡萄糖-半乳糖-阿拉伯糖-岩藻糖	94.7:1.23:0.48:110:2.73:0.8:13.4

3.4 GRP-1 的相对分子质量测定 GRP-1 多糖组分多角度激光散射相对分子质量测定色谱图见图 3。结果发现此多糖组分主要有 1 个色谱峰, 经 Astra 6.0 数据分析软件处理, 测得其重均相对分子质量 2.301×10^4 Da。

3.5 GRP-1 的红外光谱测定 见图 4。结果发现 GRP-1 在 3413 cm^{-1} 处有很宽的伸缩振动吸收峰, 表明有 -OH 存在; 2923 cm^{-1} 处肩峰及 1425 cm^{-1} 处吸收峰表明有 -CH 存在; 1650 cm^{-1} 处显示 -CO 的弯曲振动吸收峰; 1208 cm^{-1} 处吸收峰表明有 -CO 的存



A. 混合对照品; B. GRP-1; C. GRP-2; D. GRP-3; 1. PMP 溶剂峰; 2. D -甘露糖; 3. 葡萄糖醛酸; 4. L -鼠李糖; 5. D -葡萄糖; 6. D -半乳糖; 7. D -木糖; 8. D -阿拉伯糖; 9. 岩藻糖

图 2 北沙参各多糖组分的 HPLC

Fig. 2 HPLC of each polysaccharide component in *Glehnia Radix*

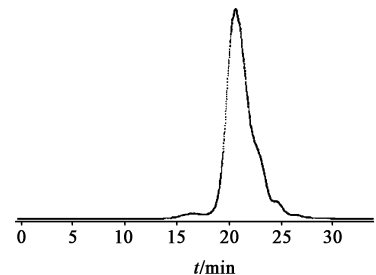


图 3 GRP-1 相对分子质量的 HPLC

Fig. 3 HPLC chromatogram of relative molecular weight of GRP-1

在 1019 cm^{-1} 处吸收峰表明 GRP-1 的主要组成单糖为葡萄糖^[12]; 855 cm^{-1} 和 750 cm^{-1} 处的 2 个振动吸收峰位于糖类 $900 \sim 700 \text{ cm}^{-1}$ 的环振动吸收区, 说明 GRP-1 的糖苷键主要为 α -构型^[13]。

3.6 北沙参多糖对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响 GRP-1, GRP-2 和 GRP-3 对小鼠脾脏淋巴细胞增殖均有一定的刺激作用, 见表 2。以 GRP-3 为例, 当多糖质量浓度达到 $31.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 增殖率 21.85%, 显示该质量浓度能明显促进小鼠脾脏淋巴细胞的增殖, 随着质量浓度的进一步降低仍然存在一定的刺激作用, 但作用减弱。

4 讨论

本实验中多糖采用三氟乙酸 (TFA) 进行水解,

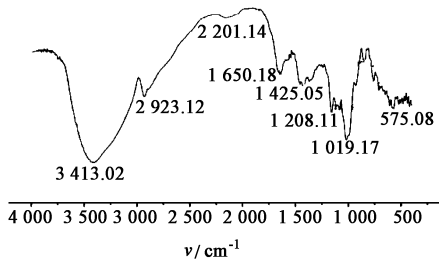


图 4 GRP-1 的红外光谱 (KBr)

Fig. 4 Infrared spectrum of GRP-1 (KBr)

表 2 不同质量浓度的北沙参多糖组分对脾脏淋巴细胞增殖作用的影响 (n=3)

Table 2 Effect of polysaccharide components in *Glehniae Radix* with different concentrations on proliferation of mouse spleen lymphocytes (n=3)

质量浓度 /mg·L ⁻¹	GRP-1		GRP-2		GRP-3	
	A($\bar{x} \pm s$)	增殖率/%	A($\bar{x} \pm s$)	增殖率/%	A($\bar{x} \pm s$)	增殖率/%
0	0.118 ± 0.010	-	0.116 ± 0.006	-	0.119 ± 0.010	-
7.8	0.124 ± 0.002 ¹⁾	5.08	0.130 ± 0.004 ²⁾	12.07	0.129 ± 0.004	8.40
15.625	0.130 ± 0.001 ²⁾	10.17	0.122 ± 0.003	5.17	0.123 ± 0.004	3.37
31.25	0.124 ± 0.001 ¹⁾	5.08	0.110 ± 0.002 ¹⁾	-5.17	0.145 ± 0.018 ¹⁾	21.85
62.5	0.117 ± 0.002	-0.84	0.111 ± 0.005	-4.31	0.124 ± 0.001	4.20
125	0.116 ± 0.002	-1.69	0.111 ± 0.007	-4.31	0.118 ± 0.008	-0.84
250	0.098 ± 0.001 ²⁾	-16.94	0.104 ± 0.014	-10.34	0.107 ± 0.011 ¹⁾	-10.08

注:与空白组比较¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01。

参多糖对小鼠脾脏淋巴细胞增殖的影响,结果表明 3 种多糖组分 GRP-1, GRP-2, GRP-3 在一定浓度范围内对小鼠脾脏淋巴细胞的增殖具有显著促进作用,且呈一定的剂量依赖性。

本研究尚存在若干不足之处,柱色谱分离纯化后得到了 3 种多糖组分,仅选择呈白色粉末状的 GRP-1 多糖组分进行了相对分子质量测定,其他多糖组分因含有少许色素,没有对其进一步纯化处理及相对分子质量测定,而且并未对 GRP-1 多糖组分进行结构研究。

[参考文献]

[1] 刘伟,李中燕,田艳,等.北沙参的化学成分及药理作用研究进展[J].国际药学研究杂志,2013,40(3):291-294.
 [2] 原忠,赵梦飞,陈发奎,等.北沙参化学成分的研究[J].中草药,2002,33(12):10-12.
 [3] 石俊英,李宝国,牟彩萍.山东地产药材北沙参多糖含量测定[J].山东中医药大学学报,2002,26(2):139-142.
 [4] 李建刚,李庆典.沙参多糖对自由基的清除作用[J].中国酿造,2011,30(3):66-68.
 [5] 荣立新,鲁爽,刘咏梅.北沙参多糖对甲亢型阴虚小鼠的免疫调节作用[J].中国中医基础医学杂志,2013,19(6):640-641.

加入 PMP 作为衍生化试剂,进行 HPLC 分析,获得了良好的分离效果。由单糖组成分析可知,北沙参多糖中还含有多种未知单糖,后续实验应收集更多的单糖对照品,以便于更加准确、全面地对北沙参多糖的单糖组成进行研究^[14]。

淋巴细胞包括参与体液免疫应答的 B 淋巴细胞和参与细胞免疫应答的 T 淋巴细胞,多糖通过影响淋巴细胞的增殖能力、亚群的结构及细胞因子的分泌等途径发挥调节作用^[15]。本实验研究了北沙

[6] 周红英,吕莎.微波辅助提取北沙参多糖工艺及抗氧化活性研究[J].食品研究与开发,2016,37(12):62-65.
 [7] 吕方军,叶国华,许一平,等.北沙参茎叶多糖的含量测定[J].中药新药与临床药理,2012,23(1):84-86.
 [8] 相美容,王朋展,蒋海强,等.星点设计-响应面法优化热水浸提北沙参多糖的工艺研究[J].山东中医杂志,2017,36(1):66-70,77.
 [9] 刘宇,姜燕,张耀文,等.柱前衍生 HPLC 分析酸枣仁汤中多糖的单糖组成[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(17):121-126.
 [10] 范刚,唐策,李艳,等.柱前衍生 HPLC 分析黄连多糖的单糖组成[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(11):74-78.
 [11] 吕朝耕,杨健,康传志,等.铁皮石斛中 10 种黄酮类成分 UPLC-MS/MS 测定与多糖组成含量分析[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(17):47-52.
 [12] 夏朝红,戴奇,房韦,等.几种多糖的红外光谱研究[J].武汉理工大学学报,2007,29(1):45-47.
 [13] 张惟杰.糖复合物生化研究技术[M].杭州:浙江大学出版社,1999:41-45.
 [14] 张丽芝,沈荣.单糖组成分析方法的研究进展[J].微生物学免疫学进展,2013,41(1):77-81.
 [15] 玉米,杨锐乐,张丽芳,等.蛹虫草多糖对小鼠脾脏淋巴细胞体外增殖的影响[J].黑龙江畜牧兽医,2013,16(5):116-120.

[责任编辑 刘德文]