

鹿蹄橐吾多糖 LW₂₁ 的分离纯化及其结构分析

刘春兰¹, 杜宁¹, 徐桂云², 黄潇¹, 阿西娜¹

(1. 中央民族大学生命与环境科学学院, 北京 100081; 2. 中国科学院化学研究所, 北京 100080)

摘要: 目的: 确定鹿蹄橐吾多糖 LW₂₁ 的结构, 为探讨鹿蹄橐吾多糖的药理活性, 合理利用鹿蹄橐吾这种植物资源提供依据。方法: 水提取醇沉获得鹿蹄橐吾水溶性粗多糖 LW, 经酸性乙醇分级和 DEAE-Sephadex A-25 纯化得多糖 LW₂₁。纸层析、醋酸纤维薄膜电泳和 Sepharose CL-4B 柱层析进行纯度鉴定, LW₂₁ 结构分析采用高碘酸氧化、Smith 降解、甲基化分析及 IR、NMR、GC 和 GC-MS 等方法。结果表明: LW₂₁ 为均一多糖, 相对分子质量约为 1.1×10^6 。其单糖组成为鼠李糖(Rha)、阿拉伯糖(Ara)、甘露糖(Man)、葡萄糖(Glc)、半乳糖(Gal), 物质的量比为 7.4:11.9:25.7:40.0:14.9。多糖 LW₂₁ 为有分枝结构, 主链由 Glc 和 Man 构成, 其中其中 Man 主要以 $\beta(1 \rightarrow 2)$ 和 $\beta(1 \rightarrow 6)$ 糖苷键连接, $\beta(1 \rightarrow 2)$ 糖苷键在 3-O 处和 6-O 处有分枝, $\beta(1 \rightarrow 6)$ 糖苷键在 2-O 和 4-O 处有分枝, Glc 也主要以 $\beta(1 \rightarrow 2)$ 及 $\beta(1 \rightarrow 6)$ 糖苷键连接, $\beta(1 \rightarrow 2)$ 糖苷键在 6-O 处有分枝, $\beta(1 \rightarrow 6)$ 糖苷键连接, 在 2-O 处有分枝。分子支链由 Ara、Rha、Gal 构成。末端残基为 Gal、Ara、Rha、Glc。结论: 鹿蹄橐吾多糖 LW₂₁ 是一新结构多糖, 为首次从鹿蹄橐吾中分离得到。

关键词: 鹿蹄橐吾; 多糖; 甲基化分析; 结构分析

Isolation, Purification and Structural Analysis of Water-Soluble Polysaccharide LW₂₁ from *Ligularia hodgsonii*

LIU Chun-lan¹, DU Ning¹, XU Gui-yun², HUANG Xiao¹, A Xi-na¹

(1. College of Life and Environmental Science, Minzu University of China, Beijing 100081, China;

2. Institute of Chemistry Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: Objective: to isolate, purify and structurally characterize a water-soluble polysaccharide from the whole herbs of *Ligularia hodgsonii*. Methods: crude polysaccharide named as LW was extracted from *Ligularia hodgsonii*. A polysaccharide fraction named as LW₂₁ was obtained after acidic ethanol fractionation and DEAE-Sephadex A-25 gel filtration. The purity of LW₂₁ was identified by paper chromatography, Sepharose CL-4B chromatography and cellulose acetate electrophoresis, and its structure was analyzed by HIO₄ oxidation, Smith degradation, methylation, IR, NMR, GC and GC-MS. Results: LW₂₁ was a homogenous polysaccharide. LW₂₁ was composed of rhamose (Rha), arabinose (Ara), mannose (Man), glucose (Glc) and galactose (Gal) with a molar ratio of 7.4: 11.9: 25.7: 40.0: 14.9. Its average molecular weight was 110 kD. Its main chain was made up of β -(1 \rightarrow 2)-linked or β -(1 \rightarrow 6)-linked Man, and β -(1 \rightarrow 2)-linked or β -(1 \rightarrow 6)-linked Glc residues. The β -(1 \rightarrow 2)-linked Man was substituted at 2-O and 4-O; β -(1 \rightarrow 6)-linked Man was substituted at 3-O and 6-O; and β -(1 \rightarrow 2)-linked Glc was substituted at 6-O; β -(1 \rightarrow 6)-linked Gal was substituted at 2-O. The side chain was composed of Rha, Ara and Gal. The non-reduced end was composed of Gal, Ara, Rha and Glc. Conclusion: LW₂₁ is a new polysaccharide isolated from *Ligularia hodgsonii* for the first time.

Key words: *Ligularia hodgsonii*; polysaccharide; methylation analysis; structural analysis

中图分类号: Q629

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)11-0057-05

橐吾属 (*Ligularia* Cass.) 为菊科 (Compositae) 千里光族, 全属约有 130 种。该属药用植物较多, 许多种类的根及根茎作为藏药、维药和民间草药使用, 有很长

的药用历史^[1]。鹿蹄橐吾, 别名滇紫菀, 是菊科植物鹿蹄橐吾 (*Ligularia hodgsonii*) 的干燥全草, 分布于我国四川东部、湖北、湖南等省。其根及根茎收入云南省

收稿日期: 2011-05-27

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目 (0910KYZY44); “111 创新引智计划” 工程项目 (B08044);

中央民族大学 “985” 工程项目 (MUC985-9)

作者简介: 刘春兰 (1962—), 女, 教授, 硕士, 研究方向为多糖化学。E-mail: liuchunlan888@yahoo.com.cn

药品标准, 药理研究表明醇溶物中具有祛痰镇咳、杀菌消炎和抗肿瘤的活性^[2-3]。鹿蹄橐吾的化学成分包括倍半萜类、生物碱、多羟基类小分子等^[4]。刘春兰等^[5]对大黄橐吾水溶性多糖进行了研究, 证明其具有清除自由基的功能。目前国内外对鹿蹄橐吾多糖结构的研究还未见报道。多糖的多种生物活性与它的化学结构密切相关, 活性多糖的化学结构是其生物活性的基础。因此本文选用鹿蹄橐吾为原料, 对鹿蹄橐吾水溶性多糖提取、分离纯化并测定其结构, 为进一步探讨鹿蹄橐吾多糖的药理活性, 合理利用鹿蹄橐吾资源提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鹿蹄橐吾(*Ligularia hodgsonii*)全草, 采自四川阿坝, 由中国科学院植物研究所陈艺林研究员鉴定。

NaBH₄ 美国 Sigma-Aldrich 公司; DEAE-Sephadex A-25、Sephrose CL-4B 瑞典 Pharmacia 公司; 乙醇、乙醚、乙酸乙酯、醋酸、苯酚、高碘酸、碘甲烷、二甲基亚砷等均为分析纯。

1.2 仪器与设备

DB-5MS 石英毛细管(30m × 0.25mm, 0.25 μm) 美国 GE 公司; FC-95A 馏分自助收集器 上海青浦沪西仪器厂; 8002 型电热恒温水浴锅 天津市中环实验电炉有限公司; LD4-8 型离心机 北京医用离心机; Qp2010A 型气相色谱质谱(GC-MS)联用仪、Specord 型红外光谱仪 日本岛津公司; AVANCE400 型超导核磁共振波谱仪 瑞士 Bruker 公司。

1.3 方法

1.3.1 鹿蹄橐吾粗多糖 LW 的提取^[6]

称取 5g 干燥的鹿蹄橐吾, 加入体积分数 95% 的乙醇回流脱脂后, 按料液比 1:12(m/V)在 85℃水浴提取 3h, 再加入 4 倍体积的 95% 乙醇沉淀, 静置过夜, 3000r/min 离心 10min, 回收上清乙醇, 沉淀用无水乙醇、乙醚洗涤后真空干燥后得粗品鹿蹄橐吾多糖 LW。

1.3.2 鹿蹄橐吾纯化多糖 LW₂₁ 制备

将粗多糖 LW 配成 2g/100mL 溶液, 采用链酶蛋白酶与 Sevag 法联合脱蛋白^[7-8]。用 pH2.5 的酸性乙醇分级得 LW₂。LW₂ 经 DEAE-Sephadex A-25(2.5cm × 90cm)柱层析, 用 0.5mol/L NaCl 溶液洗脱, 流速 0.75mL/min, 每支试管接洗脱液 2mL, 苯酚-硫酸法显色。根据苯酚-硫酸法检测的结果合并收集相同峰位的组分, 流水透析 24h, 去离子水透析 24h, 减压浓缩至适当体积, 加入 4 倍体积的 95% 乙醇沉淀, 常规干燥制备得多糖 LW₂₁。

1.3.3 多糖 LW₂₁ 纯度鉴定

1.3.3.1 纸层析法^[9-10]

用新华 1 号中速滤纸(15cm × 40cm)进行层析, 溶剂系统为乙酸乙酯-醋酸-水(体积比为 4:1:1), 苯胺-邻苯二甲酸试剂显色。

1.3.3.2 醋酸纤维薄膜电泳法

采用 0.025mol/L 硼酸盐为电极缓冲液(pH12.5), 电压 250V, 电泳时间 30min, 用 0.5% 甲苯胺蓝乙醇溶液染色。

1.3.3.3 柱层析法^[10]

取 5mg 多糖配成 10mg/L 溶液, 取 0.5mL Sephrose CL-4B(1.5cm × 90cm)柱层析上样, 0.1mol/L NaCl 溶液洗脱, 流速 0.45mL/min, 每管收集 2mL, 根据苯酚-硫酸法测定多糖, 绘制层析图谱, 观察结果。

1.3.4 鹿蹄橐吾水溶性多糖 LW₂₁ 的相对分子质量测定

用 0.5mL 水溶解 5mg 标准葡聚糖上样, 以 Sepharose CL-4B(90cm × 1.5cm)层析, 0.1mol/L NaCl 洗脱, 流速为 0.22mL/min, 苯酚-硫酸法测多糖分布, 用标准葡聚糖已知相对分子质量的(M_w 分别为 1.0×10^7 、 5.0×10^6 、 2.0×10^6 、 7.0×10^5 、 1.0×10^4)相对分子质量对数值为纵坐标, 以洗脱体积(V_e)为横坐标, 绘制 $\lg M_w - V_e$ 标准曲线^[11-12]。

同样条件下测定 LW₂₁ 的洗脱体积, 与标准曲线对照, 求出相对分子质量。

1.3.5 单糖组成分析

取 2mol/L H₂SO₄ 完全水解后进行纸层析^[13]。

取 1mg 粗多糖, 溶解于 3mL 三氟乙酸水溶液(2mol/L)中, 120℃保温 1h, 氮气除去三氟乙酸水溶液。加入硼氢化钠 50mg 氮气流保护酸水解, 加吡啶 4mL, 90℃水浴 10min, 加 4mL 乙酸酐 90℃水浴 20min, 乙酰化上样, 后进行 GC 分析^[14-15]。

GC 条件: OV-210 毛细管柱(30m × 0.32mm, 0.25 μm); 柱温 100℃升高到 250℃, 程序升温 5℃/min; 载气为氢气; 流速为 1.5mL/s; 检测器: FID。

1.3.6 LW₂₁ 的结构分析

1.3.6.1 红外光谱(IR)分析与核磁共振谱分析

取 1mg 多糖 LW₂₁ 与 10mg KBr 研磨混合后压片, 红外光谱仪在 500~4000cm⁻¹ 扫描^[16]进行 IR 分析。称取 10mg 多糖 LW₂₁, 溶于重水(D₂O), 进行核磁共振波谱分析^[17]。

1.3.6.2 高碘酸氧化与 Smith 降解分析

准确称取 50mg 样品按文献^[19-20]进行高碘酸氧化、Smith 降解, 透析。透析后对袋内外产物 GC 分析。GC 条件同 1.3.5 节。

1.3.6.3 LW₂₁ 的甲基化糖制备

取 6mg LW₂₁, 用二甲基亚砷、固体氢氧化钠粉、

碘甲烷按文献[17]进行甲基化, IR 检测确证甲基化完全后, 将甲基化产物用 4mol/L 三氟乙酸, 100℃水解 4h, 氮气吹干, 经乙酰化制成乙酰化衍生物^[21-23], GC-MS 定性和定量分析。

GC 条件: 柱室初始温度 120℃, 以 5℃/min 升至 250℃, 保持 10min, 检测器和进样器均为 250℃。载气为氦气, 线速 41cm/s。

MS 分析条件: EI 源, 离子源温度 250℃, 离子化电势 70eV。

样品用二氯甲烷溶解直接进样。根据色谱的各峰面积计算各种连接方式的物质的量比, 根据各峰的保留时间和质谱碎片峰, 确定其连接方式。

2 结果与分析

2.1 鹿蹄橐吾水溶性多糖的提取及分离纯化

鹿蹄橐吾经水提醇沉后得粗多糖 LW, 提取率为 4.78%。LW 为灰白粉末状固体, 溶于水, 不溶于乙醇、乙醚等有机溶剂。粗多糖经分离纯化得多糖 LW₂₁。LW₂₁ 为浅棕色粉末状, 易溶于水, 不溶于丙酮、乙醇等有机溶剂。

2.2 鹿蹄橐吾水溶性多糖 LW₂₁ 的纯度鉴定

LW₂₁ 经 Sephrose CL-4B 柱层析, 苯酚-硫酸法检测得单一对称峰(图 1), 醋酸纤维薄膜电泳呈单一谱带(图 2), 纸层析呈单一斑点。说明 LW₂₁ 为相对分子质量及极性均一的纯化多糖^[18]。用凝胶洗脱法与标准葡聚糖对照测 LW₂₁ 的相对分子质量约为 1.1×10^6 。

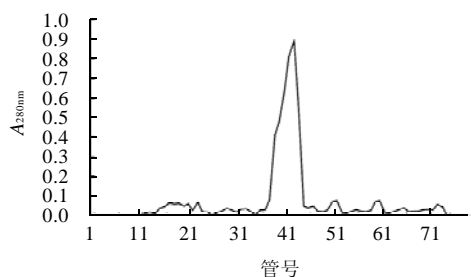


图 1 多糖 LW₂₁ 的 Sephrose CL-4B 柱层析谱图

Fig.1 Chromatogram of LW₂₁ on Sephrose CL-4B



图 2 多糖 LW₂₁ 的醋酸纤维薄膜电泳谱带

Fig.2 Cellulose acetate electrophoresis of LW₂₁

2.3 鹿蹄橐吾水溶性多糖 LW₂₁ 的组成分析

LW₂₁ 经纸层析和气相色谱 GC 分析结果见图 3。经与标准谱图(谱图略)比较, 结果表明, 其单糖组成为: 鼠李糖(Rha)、阿拉伯糖(Ara)、甘露糖(Man)、葡萄糖(Glc)、半乳糖(Gal), 物质的量比为 7.4: 11.9: 25.7: 40.0: 14.9。LW₂₁ 是由 5 种单糖残基组成的杂多糖。

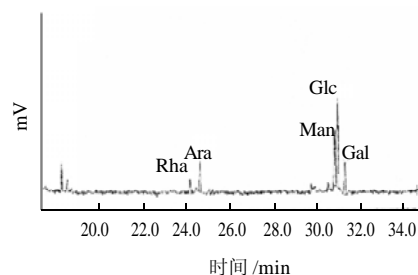


图 3 多糖 LW₂₁ 的 GC 谱图

Fig.3 GC chromatogram of LW₂₁

2.4 鹿蹄橐吾水溶性多糖 LW₂₁ 的结构分析

2.4.1 鹿蹄橐吾水溶性多糖 LW₂₁ 的 IR、NMR 分析

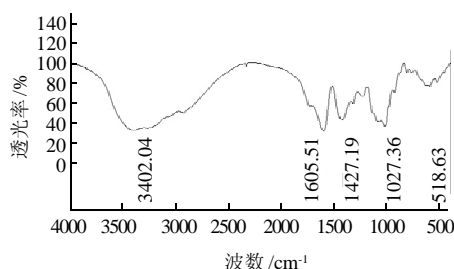


图 4 多糖 LW₂₁ 的红外谱图

Fig.4 IR spectrum of LW₂₁

由图 4 可知, 在 3417、2941、1100cm⁻¹ 附近处出现多糖的特征吸收峰, 1000cm⁻¹ 附近有 3 个吸收峰, 说明 LW₂₁ 可能含有吡喃环和呋喃环。890cm⁻¹ 处的吸收峰说明多糖 LW₂₁ 有 β 型糖苷键。810cm⁻¹ 处的吸收峰说明多糖 LW₂₁ 也有 α 型糖苷键^[10,15-16]。

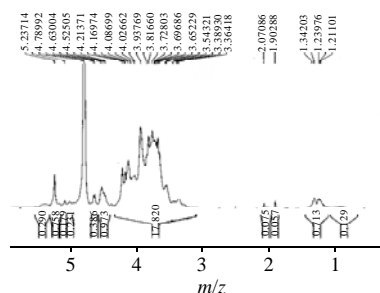


图 5 LW₂₁ 甲基化产物 GC 谱图

Fig.5 GC-MS of Chromatogram of LW₂₁

多糖 LW₂₁ 以 AVANCE400 型核磁共振谱分析仪测定 ¹H NMR, 由图 5 可知, 在 ¹H NMR 谱中 δ 4.8~5.5 范围有 5 个 C1 上质子的信号, 化学位移 δ 值大于 5.0 的有 1 个, 小于 5.0 的有 5 个, 说明多糖 LW₂₁ 中存在 α 型和 β 型两种^[19], 与红外分析结果相符。

2.4.2 高碘酸氧化和 Smith 降解

LW₂₁ 进行高碘酸氧化, 经紫外光谱在 223nm 检测反应完全后, 测得每摩尔己糖消耗 0.99mol IO₄⁻, 大于释放甲酸量(0.40mol)的 2 倍, 表明其除 1→末端及 1→6 糖基外, 尚有可被高碘酸氧化但不产生甲酸的 1→2 或 1→4 糖基, 即可氧化糖基占 70.30%, 不可氧化糖基占 29.70%^[20]。

LW₂₁ 经 Smith 降解, 对蒸馏水透析。袋内、袋外产物进行 GC 分析, 结果如表 1 所示。

表 1 Smith 降解结果分析
Table 1 Smith degradation analysis

Smith 降解	Gly	Ery	Glc	Gal	Man	Rha	Ara
袋内上清部分	—	—	—	+	+	—	—
袋内沉淀部分	—	—	—	+	+	—	—
袋外部分	+	+	—	—	—	—	—

注: +, 存在; —, 不存在。

由表 1 可知, 袋内上清和沉淀部分均检出 Gal 和 Man, 袋外部分检出赤藓糖(Ery)和甘油(Gly)。根据高碘酸选择性氧化的规则, 说明多糖 LW₂₁ 中 Gal 和 Man 有不被高碘酸氧化的键型。袋外检出赤藓醇、甘油, 说明多糖 LW₂₁ 中存在 1→4、1→4,6、1→末端、1→2、1→6、1→2,6 键型。

2.5 LW₂₁ 的甲基化及其产物分析

为确定糖苷键的位置, 对甲基化的多糖 LW₂₁ 经水解、还原、乙酰化后的产物作气相色谱-质谱分析^[21], 结果列于表 2。

根据其衍生物的气相色谱相对保留值和每个组分的质谱图可分析各组碎片峰, 可确定甲基、乙酰基在衍生物分子上的位置, 从而可确认多糖中单糖组成和糖苷键连接位置^[22]。

由表 1 中 LW₂₁ 甲基化产物 GC-MS 分析可知, LW₂₁ 单糖组成为 Rha、Ara、Man、Glc、Gal, 与 PC 和 GC 分析结果一致。含有 β (1→2)糖苷键的 Man 的物质的量比为 15.0, 在多糖 LW₂₁ 中所占比例最大, 构成多糖 LW₂₁ 的主链之一, 且在 3 位和 6 位上有分支, 由物质的量比可计算出平均每 15 个糖残基有 7 个分枝。含有 β (1→6)糖苷键的 Man 的物质的量比为 14.0, 也构成主链, 且在 2 位和 4 位上有分枝, 由物质的量比可计算出平均每 2 个糖残基有 1 个分枝。含有 β (1→2)糖苷键的 Glc 的物质的量比为 12.0, 在多糖 LW₂₁ 中所占比例较

大, 构成多糖 LW₂₁ 的主链之一, 且在 6 位上有分支, 由物质的量比可计算出平均每 3 个糖残基有 2 个分枝。含有 β (1→6)糖苷键的 Glc 的物质的量比为 7.0, 也构成多糖 LW₂₁ 的主链之一, 且在 2 位上有分枝, 由物质的量比可计算出平均每 11 个糖残基有 4 个分枝。支链由 Ara、Rha、Gal 构成, 其中 Ara 以 1→2, 1→4 或 1→5 连接, Rha 以 1→2, 1→5 连接, Gal 以 1→6, 1→2,3 或 1→4, 6 连接, 与高碘酸氧化 Smith 降解时在袋内未检出 Rha、Ara、Man, 袋内检出 Gal 的分析结果一致。Gal、Ara、Rha、Glc 都有一部分构成分子的末端残基^[23]。

表 2 LW₂₁ 甲基化产物的 GC-MS 分析
Table 2 GC-MS analysis of methylated LW₂₁

峰号	甲基化 单糖	相对保留 时间/min	主要离子 碎片 m/z	物质的 量比	糖苷 键
1	2,3,5-Rha	9.4	43, 72, 89, 101, 115, 131, 161	3.0	1→
2	2,3,4-Ara	10.3	43, 71, 87, 101, 117, 129, 161	5.0	1→
3	2,3-Rha	11.4	43, 58, 87, 101, 117	3.0	1→5
4	3,5-Rha	12.0	43, 87, 89, 99, 117, 129, 235	2.0	1→2
5	3,5-Ara	12.2	43, 87, 99, 117, 129	4.0	1→2
6	2,3-Ara	12.3	43, 87, 101, 117, 129, 189,	3.0	1→4 或 1→5
7	2,3,5,6-Glc	13.1	43, 85, 99, 117, 12	14.0	1→
8	2,3,5,6-Gal	13.3	43, 71, 87, 101, 117, 129, 145, 161, 205	6.0	1→
9	2,3,4,6-Gal	13.5	43, 87, 101, 117, 129, 143, 189, 203	3.0	1→
10	3,4,6-Man	14.7	43, 87, 99, 101, 113, 117, 131, 233	8.0	1→2
11	3,4,6-Glc	14.8	43, 87, 99, 101, 113, 117, 129, 233	8.0	1→2
12	2,3,6-Man	14.9	43, 71, 85, 101, 117, 129, 161, 233	3.0	1→4
13	2,3,6-Glc	15.5	43, 87, 99, 101, 114, 117, 129, 233	1.0	1→4
14	2,3,4-Gal	15.8	43, 71, 87, 99, 101, 117, 129, 161, 189, 233	2.0	1→6
15	2,3,5-Man	15.9	43, 85, 99, 101, 117, 127, 261	7.0	1→6
16	2,3,5-Glc	16.0	43, 87, 99, 101, 113, 117, 131, 233	2.0	1→6
17	2,3,4-Glc	16.1	43, 45, 87, 99, 101, 113, 117, 129, 23, 33	5.0	1→6
18	4,6-Man	16.4	43, 85, 99, 101, 119, 139	2.0	1→2,3
19	4,6-Gal	16.6	43, 85, 99, 101, 117, 139	2.0	1→2,3
20	3,4-Glc	16.7	43, 85, 99, 117, 129, 139	4.0	1→2,6
21	2,3-Man	17.1	43, 85, 87, 99, 101, 117	2.0	1→4,6
22	3,4-Man	17.2	43, 85, 87, 97, 117, 139	5.0	1→2,6
23	2,3-Gal	17.3	43, 85, 99, 101, 117, 127, 261	2.0	1→4,6

3 结 论

鹿蹄橐吾经提取分离纯化得均一多糖 LW₂₁, 相对分子质量约为 1.1×10^6 。经高碘酸氧化、Smith 降解、甲基化分析、IR 分析、NMR 波谱分析, 结果均一致。证明 LW₂₁ 的基本结构为 Glc 和 Man 构成主链, 其中 Man 主要以 β (1→2)和 β (1→6)糖苷键连接, β (1→2)糖苷键在 3—O 处和 6—O 处有分枝, β (1→6)糖苷键在 2—O 和 4—O 处有分枝; Glc 也主要以 β (1→2)及 β (1→6)糖苷键连接, β (1→2)糖苷键在 6—O 处有分枝, β (1→6)糖苷键连接在 2—O 处有分枝。分子支链由 Ara、Rha、Gal 构成, 其中 Ara 以 1→2、1→4 或 1→5 连接, Rha 以 1→2、1→5 连接, Gal 以

1 → 6、1 → 2, 3 或 1 → 4, 6 连接。末端残基为 Gal、Ara、Rha、Glc。LW₂₁ 是多分支结构复杂的中性多糖。

鹿蹄橐吾多糖 LW₂₁ 为首次从四川天然鹿蹄橐吾中分离得到的均一多糖并测定其一级结构。对于此多糖的构效关系还有待于进行后续工作。

参考文献:

- [1] 刘守金, 戚欢阳, 齐辉, 等. 中国西北地区真吾属植物的种类及药用资源[J]. 中国中药杂志, 2006, 13(1): 28-32.
- [2] 赵显国, 王峥涛, 马继元, 等. 中药山紫菀类研究[J]. 中草药, 1999, 30(1): 35-36.
- [3] 云南省药材公司. 云南中药资源名录[M]. 北京: 科学出版社, 1993: 577.
- [4] 王文蜀, 卢鹏, 赵坤, 等. 鹿蹄橐吾化学成分研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2009, 11(7): 176-177.
- [5] 刘春兰, 周博, 杜宁, 等. 大黄橐吾水溶性多糖的初步纯化及清除自由基活性研究[J]. 中央民族大学学报: 自然科学版, 2007, 16(4): 14-17.
- [6] 刘春兰, 邓义红, 杨林, 等. 雪莲水溶性多糖提取工艺的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 2(3): 43-47.
- [7] 刘延吉, 祝寰宇. 沙棘多糖脱蛋白工艺的优化研究[J]. 河南农业科学, 2008, 37(3): 84-87.
- [8] 郭育东, 单斌, 李敏仪. 苦瓜多糖脱蛋白方法的比较研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(7): 3225-3227.
- [9] 刘海青, 刘银才, 刘春兰, 等. 沙棘叶水溶性多糖 SJ1 的研究[J]. 食品工业科技, 2006, 27(10): 61-63.
- [10] 张惟杰. 复合多糖生化技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999: 7; 242-253; 209-212; 193-198; 110; 65-68.
- [11] SEKKAL M, HUVENNE J P, LEGRAND P, et al. Direct structural identification of polysaccharides from red algae by FTIR microspectrometry I: localization of agar in *Gracilaria verrucosa* section[J]. Mikrokchim Acta, 1993, 112(1/4): 1-10.
- [12] 王晓娟, 曾和平, 魏传晚, 等. 葛根地连汤水溶性多糖的研究[J]. 中草药, 2005, 36(3): 345-347.
- [13] 徐桂云, 陈汝贤. 用毛细管气相色谱法测定多糖中单糖的组成[J]. 分析测试学报, 2000, 19(3): 71-73.
- [14] WANG C C, CHANG S C, CHEN B H. Chromatographic determination of polysaccharides in *Lycium barbarum* Linnaeus[J]. Food Chemistry, 2009, 116(2): 595-603.
- [15] 龚志华, 陈美丽, 肖文军. 辐照降解茯苓多糖效应研究[J]. 分析测试学报, 2010, 29(10): 1011-1016.
- [16] 夏朝红, 戴奇, 陈和生, 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.
- [17] 孙元琳, 陕方, 崔武卫, 等. 当归多糖 ASP3 及其水解产物的 NMR 光谱分析[J]. 高等学校化学学报, 2009, 30(9): 1739-1743.
- [18] GLOAGUEN V, BRUDIEUX V, CLOSS B, et al. Structural characterization and cytotoxic properties of an apiose-rich pectic polysaccharide obtained from the cell wall of the marine phanerogam *Zostera marina*[J]. J Nat Prod, 2010, 73(6): 1087-1092.
- [19] 李伟欣, 陈倩, 李平兰, 等. 双歧杆菌 22-5 胞外多糖结构分析[J]. 食品科学, 2008, 29(4): 267-271.
- [20] WU Yalin, WANG Denong. Structural characterization and DPPH radical scavenging activity of an arabinoglucogalactan from *Panax notoginseng* root[J]. Journal of Natural Products, 2008, 71(2): 241-245.
- [21] 李波, 许时婴. 难溶于二甲亚砜多糖的甲基化方法研究[J]. 天然产物研究与开发, 2004, 16(3): 207-209.
- [22] 孔元琳, 申瑞玲, 汤坚, 等. 当归多糖 ASP3 的甲基化分析[J]. 高等学校化学学报, 2008, 29(7): 1367-1370.
- [23] WU Yalin, PAN Yuanjiang, SUN Cuirong, et al. Structural analysis of an alkali-extractable polysaccharide from the seeds of *Retama raetam* ssp. *gussonei*[J]. Journal of Natural Products, 2006, 69(7): 1109-1112.