

• 研究论文 •

沙蒿籽水溶性胶多糖 ASPI-A 的结构与免疫活性的初步研究

郝毓倩^a 黄琳娟^a 齐春会^b 王仲孚^{*,a}

(^a 西北大学生命科学学院 西北大学糖生物学与糖工程研究中心 西安 710069)

(^b 军事医学科学院毒物药物研究所 北京 100850)

摘要 从沙蒿籽中提取出水溶性胶多糖, 经柱色谱分离纯化得到一种中性多糖组分 ASPI-A. 采用高效凝胶渗透色谱法 (HPGPC) 测定其为均一性多糖, 平均分子量为 5.42×10^4 Da. 经 IR, GC 部分酸水解、甲基化分析等方法对该多糖的化学结构进行了表征. 结果表明, 该多糖由阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖及半乳糖组成, 其物质的量的比为 1 : 2.8 : 4.9 : 1.9. ASPI-A 为多分支结构, 以 (1→4)- β -Glc 构成主链, 部分葡萄糖 C⁶ 存在分支, 由甘露糖以-4)Man(1-连接在葡萄糖 C⁶ 位, Glc(1-和 Gal(1-连接在甘露糖 C⁴ 位构成. 免疫活性实验结果表明, ASPI-A 在 $10 \sim 50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度范围内对 Con A 诱导的小鼠 T 淋巴细胞增殖反应具有促进作用.

关键词 沙蒿籽; 多糖; 分离纯化; 结构; 免疫活性

Structure Elucidation and Preliminary Immunological Activity Studies of the Water-soluble Gum Polysaccharide ASPI-A Isolated from *Artemisia sphaerocephala* Krasch Seeds

Hao, Yuqian^a Huang, Linjuan^a Qi, Chunhui^b Wang, Zhongfu^{*,a}

(^a Glycobiology and Glycotechnology Research Center, Life Science College, Northwest University, Xi'an 710069)

(^b Institute of Pharmacology and Toxicology, The Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850)

Abstract *Artemisia sphaerocephala* Krasch is an important resource of northwest in China, and it has potential pharmaceutical value and environment protective function. Our purpose to the study of *Artemisia* seeds polysaccharide is to get more theory support to illustrate the structure-function relationship in molecule research. A water-soluble gum polysaccharide ASPI-A was isolated from *Artemisia* seeds with water extraction and column chromatography. ASPI-A was determined to be homogeneous with average molecular weight of 5.42×10^4 Da by high performance gel permeation chromatography (HPGPC). Monosaccharide analysis by gas chromatography (GC) showed that it was composed of arabinose, mannose, glucose and galactose at a molar ratio of 1 : 2.8 : 4.9 : 1.9. Based on IR, GC, partial hydrolysis with acid, methylation and GC-MS analysis, ASPI-A was shown to be a highly branched polysaccharide with a backbone of β -1,4-linked-Glucose. The backbone was partially substituted at O⁶ of glucosyl residues with mannose, and the non-reducing end were Glc(1- and Gal(1- which were attached to O⁴ of mannose. The immunological activity assay revealed that ASPI-A $10 \sim 50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ can enhance the Con A induced T lymphocyte proliferation of mice.

Keywords *Artemisia sphaerocephala* Krasch seeds; polysaccharide; isolation and purification; structure; immunological activity

* E-mail: wangzhf@nwu.edu.cn

Received September 18, 2009; revised January 15, 2010; accepted January 25, 2010.

国家“十一五”科技支撑计划项目(No. 2006BAD06B00)、国家高技术研究发展计划(Nos. 2007AA10Z338, 2007AA091601)和教育部新世纪优秀人才支持计划(No. NCET-08-0893)资助项目.

白沙蒿(*Artemisia sphaerocephala* Krasch)为菊科蒿属浅根性野生植物,它耐干旱、耐瘠薄、抗风蚀、喜沙埋、结实丰富、采种容易、生长迅速、固沙作用强,在我国的西北、内蒙古等地的沙漠中都有广泛生长^[1],具有重要的资源价值和环境保护作用。其籽可入药,有消炎、散瘀等功效^[2]。沙蒿籽含糖量为 91.10%,主要为胶多糖^[3],在石油、化工、医药等领域有潜在应用价值,但对沙蒿籽水溶性多糖的物理化学性质、结构和活性研究却少见报道。本研究以白沙蒿籽作为研究对象,提取了水溶性胶多糖,利用离子交换柱层析及凝胶柱层析对其进行分离纯化,得到了均一多糖组分 ASPI-A,研究了其物理化学性质及糖链结构,对其免疫活性进行了初步研究,以期在分子水平上为阐明沙蒿胶多糖的构效关系提供理论依据。

1 实验部分

1.1 材料、试剂与仪器

白沙蒿籽购于西安中药材市场,经鉴定为菊科植物白沙蒿(*Artemisia sphaerocephala* Krasch)的种子。鼠李糖、岩藻糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖为上海国药集团产品;葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、蓝色葡聚糖($M_w=2000000$)、鸡蛋白蛋白、二甲基亚砷(DMSO)为 Sigma 产品;碘甲烷为上海山浦化工有限公司产品;DOWEX 50WX8-200 离子交换树脂为 Alfa 产品;DEAE-纤维素(DE-52)为 Whatman 产品;Bio-Gel P-60 为 Bio-Rad 产品;Dextran 标准品(5000, 12000, 25000, 50000, 80000, 160000 Da)为 Fluka 产品;Balb/c 小鼠,雄性, (20±2) g, 购于军事医学科学院实验动物中心;胎牛血清(fetal calfserum, FCS)为黑龙江五江制药厂产品;RPMI-1640 购于北京天润善达生物科技有限责任公司;其余产品均为国产分析纯。

Waters 2695 型高效液相色谱仪,配置 2414 示差折光检测器,美国 Waters 公司;Shimadzu GC2010 型气相色谱仪,采用 FID 检测器,日本岛津公司;Shimadzu GCMS-QP2010 型气质联用仪,采用电子轰击(EI)离子源,日本岛津公司;Perkin Elmer Lambda 25 UV/VIS 型紫外分光光度计,美国 Perkin Elmer 公司;Bruker EQUINOX 55 型傅立叶红外光谱仪,德国 Bruker 公司;Thermo LTQ XL 型液质联用仪,采用电喷雾(ESI)离子源,美国热电公司。

1.2 实验过程

1.2.1 ASPI-A 的分离与纯化

沙蒿籽经热水提取、醇沉、Sevag 脱蛋白、透析得沙蒿籽水溶性粗多糖 CASP。CASP 经 DEAE-cellulose 和

Bio-Gel P-150 柱进一步纯化得到组分 ASPI-A^[3]。

1.2.2 均一性及分子量测定

采用高效凝胶渗透色谱法(HPGPC)对样品进行纯度及相对分子质量的测定。色谱条件为:TSK-Gel G3000SW 色谱柱(7.5×300 mm),流动相为磷酸缓冲液(0.02 mol·L⁻¹, pH=6.0),标准品及样品浓度均为 0.2% (w/V),进样量 20 μL,流速 0.5 mL·min⁻¹,柱箱温度和检测器温度均为 30 °C。

先将 Dextran 标准品 5, 12, 25, 50, 80 和 160 kD 按相对分子质量由小到大顺序依次进样,然后对样品进样,测定保留时间。以 lg M_w (相对分子质量对数)对 K_{av} (分配系数)绘制标准曲线,根据线性回归方程计算样品的相对分子质量。

1.2.3 糖组成分析

取 2 mg 样品,加入 2 mL 2 mol/L TFA,密闭,121 °C 水解 2 h,减压抽干。按照 Jacob Lehrfeld^[4]的方法通过气相色谱同时检测中性糖和糖醛酸。色谱柱为 rtx-50 柱(30.0 m×0.25 mm×0.25 μm)。程序升温条件为:180 °C (2 min)—6 °C/min, 210 °C—0.3 °C/min, 215 °C—6 °C/min, 240 °C (30 min)。

1.2.4 糖与蛋白质含量的测定

总糖含量、糖醛酸含量及蛋白质含量分别按文献[5]、文献[6]及 Bradford 法^[7]测定,绘制标准曲线,根据它们的标准系列回归方程求出样品中总糖、糖醛酸及蛋白质的含量。

1.2.5 红外(IR)分析

样品用 KBr 压片,于 4000~400 cm⁻¹ 范围内进行扫描。

1.2.6 部分酸水解

取 30 mg ASPI-A 样品,加入 6 mL 0.05 mol/L TFA,100 °C 水解 2 h,减压抽干,透析 3 d。透析袋内的水溶液浓缩,醇沉,用甲醇洗沉淀,将沉淀复溶于水,冷冻干燥;透析袋外的水溶液减压抽干。按照 1.2.3 节的方法分别测定透析袋外与透析袋内样品的单糖组成。透析袋内样品进行分子量测定,方法同 1.2.2 节;透析袋外样品进行 ESI-MS 质谱分析。将样品溶于水,过 DOWEX H⁺ 型离子交换柱以除盐,然后进行 ESI-MS 分析。样品用正离子模式进行检测。

1.2.7 甲基化分析

甲基化采用 Needs 等^[8]的方法。将样品加入 2 mL DMSO 中,充入氮气,密闭,超声使样品溶解,加入 100 mg 干的 NaOH 粉末,充氮气,超声至大部分 NaOH 溶解。冰浴中加入 1 mL 碘甲烷,室温搅拌 2 h,加入 3 mL 水使反应终止,透析,冷冻干燥。以上步骤重复 3 次,得

完全甲基化的样品. 将甲基化样品加入 3 mL 甲酸中, 100 °C 水解 3 h. 减压抽干, 加甲醇再抽干(3 次). 加 2 mol/L TFA 121 °C 水解 2 h. 用硼氢化钠还原, 然后乙酰化, 制备部分甲基化的糖醇乙酸酯衍生物, 进行 GC 与 GC-MS 分析. GC-MS 色谱柱为 rtx-5ms 柱(30.0 m×0.25 mm×0.25 μm), 程序升温条件: 140 °C (3 min)—2 °C/min, 250 °C (20 min). 以氦气为载气, 流速 1.24 mL/min.

1.2.8 ASPI-A 体外对小鼠脾细胞增殖反应的影响

无菌制备小鼠脾淋巴细胞悬液, 调整细胞密度为 $5 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$. 将细胞 100 μL、不同浓度的 CASP, ASPI-A 50 μL 以及 Con A ($0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 加入 96 孔细胞培养板, 对照组用 50 μL RPMI-1640 培养液代替药物, 于 5% CO₂ 细胞培养箱培养, 56 h 后加 ³H-TdR, 继续培养 16 h 后用多头细胞收集仪收集细胞, 微量液体闪烁计数仪测 ³H-TdR 的掺入值. 每样品 3 复孔, 结果用均数±标准差表示, 统计学分析采用单因素多水平方差分析, 各给药组与 RPMI-1640 对照组比较采用 Dunnett *t* 检验.

2 结果与讨论

2.1 分离纯化及部分理化性质

沙蒿籽水溶性粗多糖 CASP, 得率为 6.76%. CASP 经 DEAE-cellulose 柱层析分离得到四个组分. ASPI 经 Bio-Gel P-150 柱进一步纯化得到组分 ASPI-A. ASPI-A 在 HPLC 上得到一个单一对称峰, 表明其具有均一性, 测得 ASPI-A 平均相对分子质量为 $5.42 \times 10^4 \text{ Da}$. 间羟联苯法测得糖醛酸含量为 0.4%, 硫酸苯酚法测得其总糖含量为 96.25%, Bradford 法测得蛋白质总量为 0.2%. 为进一步精确确定其是否含有糖醛酸, 我们用灵敏度较高的 GC 色谱法对中性糖和糖醛酸同时测定, 经分析, ASPI-A 由阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖及半乳糖组成, 物质的量的比为 1:2.8:4.9:1.9^[3], 未检测到糖醛酸. ASPI-A 的红外光谱具有多糖特征吸收峰, 877 cm⁻¹ 处有弱吸收, 表明有 β-D-型吡喃糖存在^[3].

2.2 ASPI-A 的甲基化分析

ASPI-A 分别甲基化 3 次, 得到完全甲基化的多糖. 经水解、还原、乙酰化, 生成部分甲基化的糖醇乙酸酯衍生物, 对其进行 GC 与 GC-MS 分析, 气相色谱如图 1 所示. ASPI-A 在 GC 中有 10 个峰. 根据它们的保留时间及其在 GC-MS 中特征碎片离子峰, 经与标准图谱对照, 可以推断部分甲基化糖基的类型. 根据部分甲基化糖基在 GC 中的峰面积与相应的响应因子^[9], 计算它们的物质的量的比, 结果如表 1 所示.

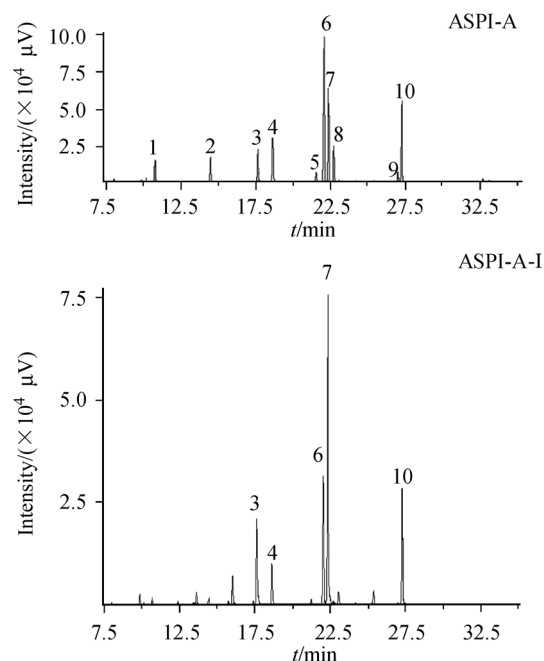


图 1 ASPI-A 和 ASPI-A-I 的部分甲基化部分乙酰化衍生物气相色谱图

Figure 1 Gas chromatogram of partially methylated alditol acetates of ASPI-A and ASPI-A-I

从表 1 可见, ASPI-A 糖链末端由阿拉伯糖、葡萄糖及半乳糖组成. 分支糖主要由葡萄糖组成, 此外还有少量的甘露糖. 葡萄糖以-4)Glc(1-, -4,6)Glc(1-, -2)Glc(1-和 Glc(1-四种连接方式. 阿拉伯糖有 Ara(1-和-3)Ara(1-两种连接方式. 半乳糖有 Gal(1-和-2)Gal(1-两种连接方式. 甘露糖有-4)Man(1-和-4,6)Man(1-两种连接方式, 表明甘露糖可能以-4)Man(1-方式连接, 部分 C⁶ 位存在分支.

2.3 部分酸水解

ASPI-A 经部分酸水解后透析, 分别对透析袋内和袋外的样品进行气相色谱分析. 透析袋内样品命名为 ASPI-A-I, 透析袋外样品命名为 ASPI-A-O. 结果显示: 醇沉后 ASPI-A-I 单糖组成为甘露糖、葡萄糖及半乳糖, 物质的量的比为 1:3.6:0.3, 表明甘露糖、葡萄糖及半乳糖构成主链或其边缘. ASPI-A-O 由阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖构成, 物质的量的比为 1:1.7:0.9:1.4. 阿拉伯糖全部存在于透析袋外, 说明阿拉伯糖构成支链.

ASPI-A-I 在 TSK-Gel G3000SW 柱上的测定其只有一个对称的峰, 表明其均一性良好. 根据 1.2.2 节的方法得到线性回归方程: $Y = 3.23554 - 0.64952X$, $R = 0.996$ ($N = 5$). 分配系数为 0.6488, 代入回归方程得到 ASPI-A-I 的分子量约为 $9.6 \times 10^3 \text{ Da}$.

表 1 ASPI-A 和 ASPI-A-I 的甲基化分析比较

Table 1 Comparison of methylation analysis of ASPI-A and ASPI-A-I

Peak number ^a	Partially methylated sugar	Deduced linkage	Relative molar ratio	
			ASPI-A	ASPI-A-I
1	2,3,5-Me ₃ -Ara	Ara(1-	1	—
2	2,5-Me ₃ -Ara	-3)Ara(1-	1	—
3	2,3,4,6-Me ₄ -Glc	Glc(1-	2	2
4	2,3,4,6-Me ₄ -Gal	Gal(1-	2	1
5	3,4,6-Me ₃ -Glc	-2)Glc(1-	Trace	—
6	2,3,6-Me ₃ -Man	-4)Man(1-	7	3
7	2,3,6-Me ₃ -Glc	-4)Glc(1-	5	7
8	3,4,6-Me ₃ -Gal	-2)Gal(1-	2	—
9	2,3-Me ₂ -Man	-4,6)Man(1-	Trace	—
10	2,3-Me ₂ -Glc	-4,6)Glc(1-	5	3

^a The numbers of the peaks are the same as in Figure 1.

2.4 ASPI-A-O 的 ESI-MS 分析

由于 ESI-MS 能够产生非常稳定的分子离子, 其谱图中单电荷分子离子峰占主要地位, 而碎片离子少, 使得这一技术成为寡糖混合物分析的理想手段.

图 2 中, 荷质比(m/z)为 527, 689, 851, 1013, 1175, 1337, 1499, 1661 和 1823 的峰, 分别为聚合度(DP)3~11 的己糖的 $[M+Na]^+$ 离子峰. ASPI-A-O 包括 3 种己糖: Man, Glc 和 Gal, 因此可以推测支链上的 Man, Glc 及 Gal 可能相互连接成糖链. 图谱中未发现戊糖的聚合物的峰, 可能由于 Ara 位于支链末端而被水解成单糖, 因而未被检测到.

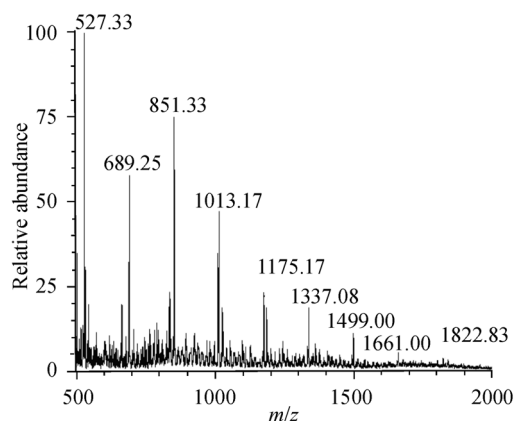


图 2 ASPI-A-O 寡糖的电喷雾电离质谱图

Figure 2 ESI mass spectrum of oligosaccharides in ASPI-A-O

2.5 ASPI-A-I 的甲基化分析

将 ASPI-A-I 进行甲基化分析, 气相色谱如图 1 所示. 经分析表明 ASPI-A-I 为一种分支糖. 糖链非还原末端由葡萄糖和半乳糖组成. 葡萄糖占总糖的 74%, 以-4)Glc(1-和-4,6)Glc(1-两种连接方式存在, 表明葡萄

糖可能以-4)Glc(1-连接方式位于主链上, C⁶ 位存在分支. 且分支糖与末端糖残基数目基本相等, 说明甲基化反应完全. 此外, 甘露糖还存在-4)Man(1-连接方式, 且其含量与 Gal(1-和 Glc(1-的含量相等.

在比较 ASPI-A 与 ASPI-A-I(表 1)的甲基化结果时, 发现 ASPI-A-I 所含有的单糖在 ASPI-A-O 中都含有, 因此不能设 ASPI-A-I 中某种甲基化糖基的量与 ASPI-A 中相应的甲基化糖基的量相等. 由于 ASPI-A 部分酸水解后, 其分子量减小, 考虑根据 ASPI-A 与 ASPI-A-I 分子量计算其组成单糖的个数, 进而推断某种甲基化糖基的量, 得到结果如表 1 所示.

由表 1 可见, 与 ASPI-A 相比, ASPI-A-I 中 2,3,4,6-Me₄-Glc 的量不变; 2,3,4,6-Me₄-Gal, 2,3,6-Me₃-Man 与 2,3-Me₂-Glc 均减少; 2,3,6-Me₃-Glc 的量增加; 而 2,3,5-Me₃-Ara, 2,5-Me₂-Ara, 3,4,6-Me₃-Glc, 3,4,6-Me₃-Gal 与 2,3-Me₂-Man 消失. 其中, 2,3,6-Me₃-Man, 2,3,4,6-Me₄-Gal 与 2,3-Me₂-Glc 的减少可能是由于葡萄糖 C⁶ 位的分支 Gal(1→4)Man(1→被 0.05 mol/L TFA 水解掉而使 Gal 与 Man 在透析的过程中扩散到透析袋外, 并且使 2,3-Me₂-Glc 变为 2,3,6-Me₃-Glc, 可看出 2,3,6-Me₃-Glc 增加的量等于 2,3-Me₂-Glc 减少的量. ASPI-A-I 中不存在 2,3,5-Me₃-Ara, 2,5-Me₂-Ara, 3,4,6-Me₃-Gal, 3,4,6-Me₃-Glc 与 2,3-Me₂-Man, 表明它们位于支链上.

根据红外光谱分析, ASPI-A 中的吡喃糖以 β 型糖苷键存在, 说明主链可能为(1→4)- β -Glc.

结合甲基化、部分酸水解的结果分析, 可以推断 ASPI-A 为杂多糖: 以(1→4)- β -Glc 构成主链, 部分葡萄糖 C⁶ 存在分支, 由甘露糖以-4)Man(1-连接在葡萄糖 C⁶ 位, Glc(1-和 Gal(1-连接在甘露糖 C⁴ 位构成. 支链由

-3)Ara(1-, -2)Glc(1-, -2)Gal(1-, -4)Man(1-, -4,6)Man(1-, Ara(1-与 Gal(1-连接构成。由此推断 ASPI-A 的主链可能结构如图 3。

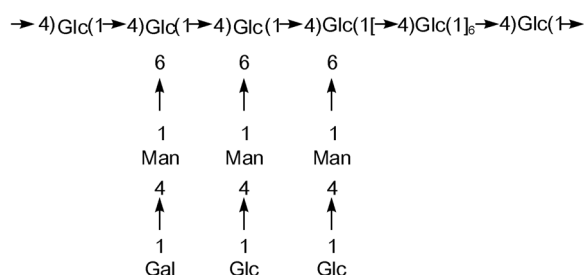


图3 ASPI-A 主链的重复单元示意图

Figure 3 Structural unit of backbone of ASPI-A

2.6 免疫活性分析

用 ^3H -TdR 掺入法测定 CASP 和 ASPI-A 体外对小鼠 T 淋巴细胞增殖反应的影响, 实验结果见表 2。由表 2 可见, T 细胞有丝分裂原 Con A 组 ^3H -TdR 掺入值与 RPMI-1640 对照组比较显著增加($P<0.01$), 表明 T 淋巴细胞被 Con A 活化; CASP 在 $1\sim 100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度范围内与 Con A 合用, 其 ^3H -TdR 掺入值与 Con A 组比较无明显变化; ASPI-A 在 $10\sim 50\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度范围内与 Con A 合用, 其 ^3H -TdR 掺入较 Con A 组明显升高($P<0.01$)。上述结果表明, ASPI-A 在 $10\sim 50\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度范围内对 Con A 诱导的 T 淋巴细胞增殖反应具有促进作用, CASP 作用不明显, 提示 ASPI-A 可能是一种免疫活

表2 CASP 和 ASPI-A 体外对小鼠 T 淋巴细胞增殖反应的影响

Table 2 Effects of CASP and ASPI-A on T lymphocyte proliferation in mice *in vitro*

Groups	Doses/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	^3H -TdR incorporation (cpm, $\bar{x}\pm s$)
RPMI-1640		(750 $\pm$ 84)
Con A	0.5	(27103 $\pm$ 4707) ^a
Con A+CASP	1	(29113 $\pm$ 8204)
	10	(21090 $\pm$ 2897)
	20	(27172 $\pm$ 3560)
	50	(25324 $\pm$ 3574)
	100	(23695 $\pm$ 3249)
Con A+ASPI-A	1	(26343 $\pm$ 4303)
	10	(34550 $\pm$ 1146) ^b
	20	(29163 $\pm$ 708) ^b
	50	(30285 $\pm$ 2011) ^b
	100	(23189 $\pm$ 4373)

Mean $\pm$ SD, $n=3$. ^a $P<0.01$, compared with RPMI-1640 group; ^b $P<0.01$, compared with Con A group.

性成分, 对小鼠的细胞免疫功能可能具有一定的促进作用。另外, ASPI-A 在 $10\sim 50\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时对 Con A 诱导的 T 淋巴细胞增殖反应具有促进作用, 在 1 和 $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时无明显作用, 该作用特点与以往报道的大多数中药多糖如枸杞多糖的作用特点相似^[10], 即在一定浓度范围内, 低浓度和高浓度时无免疫活性, 中等浓度时具有明显的免疫促进作用, 其原因尚未阐明, 有待深入研究。

3 结论

本文对沙蒿籽水溶性胶多糖 ASPI-A 进行了分离纯化, 表征了其化学结构, 并对它的免疫活性进行了初步研究。ASPI-A 为一种杂多糖, 分子量为 5.42×10^4 Da, 它由阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖及半乳糖构成, 其中葡萄糖含量最高。ASPI-A 为多分支结构, 其糖链结构可能为: 以(1 $\rightarrow$ 4)- β -Glc 构成主链, 部分葡萄糖 C⁶ 存在分支, 由甘露糖以-4)Man(1-连接在葡萄糖 C⁶ 位, Glc(1-和 Gal(1-连接在甘露糖 C⁴ 位构成。支链由-3)Ara(1-, -2)Glc(1-, -2)Gal(1-, -4)Man(1-, -4,6)Man(1-, Ara(1-与 Gal(1-连接而成。ASPI-A 可能是一种免疫活性成分, 对小鼠的细胞免疫功能可能具有一定的促进作用。对于其支链的具体结构及多糖结构与活性的构效关系正在进一步研究中。

References

- Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, *Flora of Qinghai*, Qinghai People's Press, Xining, 1996, pp. 405~407.
(中国科学院西北高原研究所, 青海植物志, 青海人民出版社, 西宁, 1996, pp. 405~407.)
- Huang, Z. H.; Liu, Y. X. *J. Arid Land Resour. Environ.* 1991, 5(1), 12 (in Chinese).
(黄兆华, 刘瑛心, 干旱区资源与环境, 1991, 5(1), 12.)
- Hao, Y. Q.; Sun, X.; Huang, L. J.; Qi, C. H.; Wang, Z. F. *Food Sci.* 2009, 30(7), 11 (in Chinese).
(郝毓倩, 孙璇, 黄林娟, 齐春会, 王仲孚, 食品科学, 2009, 30(7), 11.)
- Lehrfeld, J. *Anal. Chem.* 1985, 57, 346.
- Lin, Y.; Wu, Y. M.; Wu, W.; Tian, G. Y. *Nat. Prod. Res. Deve.* 1996, 8(3), 5 (in Chinese).
(林颖, 吴毓敏, 吴雯, 田庚元, 天然产物研究与开发, 1996, 8(3), 5.)
- Blumenkrantz, N.; Asbose-Hansen, G. *Anal. Biochem.* 1973, 54, 484.
- Bradford, M. M. *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248.
- Needs, P. W.; Swlvendran, R. R. *Carbohydr. Res.* 1993, 245, 1.

-
- 9 Sweet, D. P.; Shapiro, R. H.; Albersheim, P. *Carbohydr. Res.* **1975**, *40*, 217. *Immunol.* **1999**, *15*(9), 419 (in Chinese).
(齐春会, 张永祥, 陈保文, 顾国明, 中国免疫学杂志, **1999**, *15*(9), 419.)
- 10 Qi, C. H.; Zhang, Y. X.; Chen, B. W.; Gu, G. M. *Chin. J.*

(A0909183 Qin, X.)