

北青龙衣多糖的提取、分离纯化及分析

杨洪霞¹,任晓蕾¹,霍金海¹,王伟明^{1,2}

(1. 黑龙江省中医药科学院中药研究所,黑龙江 哈尔滨 150036;
2. 黑龙江省林下经济资源研发与利用协同创新中心,黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要:对北青龙衣中总多糖进行分离纯化,获得分子量均一多糖,并对其结构进行分析。北青龙衣药材经沸水提取,浓缩醇沉,木瓜蛋白酶脱蛋白,D101大孔树脂柱纯化脱色,再经DEAE Cellulose 52离子交换柱层析、Sephacryl S-300凝胶柱层析得到纯化多糖组分。采用高效凝胶渗透色谱-蒸发光检测器对其进行纯度鉴定、分子量测定。气-质联用、红外光谱分析其单糖组成与结构。北青龙衣多糖经分离得到两个均一组分PJP-1a、PJP-3a,其分子量分别为: 1.34×10^3 Da、 1.70×10^7 Da。气-质联用分析PJP-3a是由鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖组成,单糖摩尔比为:4.56:7.53:1:2.48:41.4:17.94。红外光谱提示PJP-1a、PJP-3a可能均具有吡喃环结构,糖苷键的连接方式均为 β 型,PJP-1a存在乙酰氨基结构。

关键词:北青龙衣;多糖;分离纯化;分析

中图分类号:R284.2

文献标志码:A

文章编号:1673-7717(2017)01-0119-05

Extract, Isolation, Purification and Identification of Polysaccharides from Exocarp of Unripe Fruits of *Juglans mandshurica*

YANG Hongxia¹, REN Xiaolei¹, HUO Jinhai¹, WANG Weiming^{1,2}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, Heilongjiang Academy of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150036, Heilongjiang, China;
2. Center of Forest Resources Research and Development of Heilongjiang, Harbin 150040, Heilongjiang, China)

Abstract: The purpose of this study was to extract, isolate and purify polysaccharide from exocarp of unripe fruits of *Juglans mandshurica*, analyze the monosaccharide composition and preliminarily analyze its structure of the obtained homogeneous molecular weight polysaccharide. A purified polysaccharide was obtained by hot water extraction, ethanol

收稿日期:2016-09-16

基金项目:国家“重大新药创制”科技重大专项项目(2009ZX09102-138);哈尔滨市科技局青年科技创新人才项目(2013RFQYJ056)

作者简介:杨洪霞(1989-),女,山东单县人,硕士研究生,研究方向:中药制剂分析。

通讯作者:王伟明(1964-),女,研究员,博士,研究方向:中药新产品研发。E-mail:zyjy@163.com。

- | | |
|--|---|
| [10] 隋·巢元方. 诸病源候论[M]. 北京:人民卫生出版社,1991:856-859. | [19] 李曰庆,何清湖. 中医外科学[M]. 北京:中国中医药出版社,2012:3. |
| [11] 汉·华佗. 华佗神方[M]. 北京:中国古籍出版社,1992:41,125. | [20] 明·陈实功. 外科正宗[M]. 北京:中国医药科技出版社,2011:107-108. |
| [12] 唐·孙思邈. 备急千金要方[M]. 北京:华夏出版社,2008:440,482. | [21] 清·吴谦. 外科心法要诀[M]. 北京:中国医药科技出版社,2012:339. |
| [13] 宋·王怀隐. 太平圣惠方[M]. 北京:人民卫生出版社,1958:1049. | [22] 明·孙志宏. 简明医彙[M]. 北京:人民卫生出版社,1984:300. |
| [14] 宋·赵佶. 圣济总录[M]. 北京:人民卫生出版社,1962:1460. | [23] 明·徐春甫. 古今医统大全[M]. 北京:人民卫生出版社,1991:354. |
| [15] 宋·陈无择. 三因极一病证方论[M]. 北京:中国中医药出版社,2007:296. | [24] 明·薛己. 薛氏医案选[M]. 北京:人民卫生出版社,1983:228. |
| [16] 宋·严用和. 严氏济生方[M]. 北京:中国医药科技出版社,2012:112-113. | [25] 明·皇甫中. 明医指掌[M]. 北京:中国中医药出版社,1997:233. |
| [17] 宋·窦材. 扁鹊心书[M]. 北京:中国医药科技出版社,2011:88. | [26] 明·无忌. 保幼新编[M]. 北京:中国古籍出版社,1988:42. |
| [18] 金·张从正. 儒门事亲[M]. 北京:中国医药科技出版社,2011:177. | [27] 明·申斗垣. 外科启玄[M]. 北京:人民卫生出版社,1955:63. |
| | [28] 陈曦. 关于中医理论体系框架研究的若干思考[J]. 中医基础医学杂志,2013,19(1):3. |

precipitation, deproteinization and decolor. The purified polysaccharide then was isolated with DEAE Cellulose 52 column chromatography and Sephacryl S-300 column chromatography. The purity identification and molecular weight determination were adopted by HPGPC. The monosaccharide composition and structure were analyzed by GC-MS and IR. The result showed that both the two obtained polysaccharides were homogeneous polysaccharide. The molecular weights of PJP-1a and PJP-3a were 1.34×10^3 Da and 1.70×10^7 Da, respectively. PJP-3a was mainly composed of rhamnose, arabinose, xylose, mannose, glucose and galactose at a molar ratio of 4.56 : 7.53 : 1 : 2.48 : 41.4 : 17.94. IR suggested that both PJP-1a and PJP-3a had pyran ring structure and glycosidic bonds of PJP-1a and PJP-3a were both β type and PJP-1a had acetamido structure.

Key words: Juglans mandshurica; polysaccharide; isolate; purify; analysis

青龙衣是胡桃科胡桃属植物胡桃楸 *Juglans emandehurica Maxim.* 未成熟果实的外果皮^[1]。秋季采收,及时晒干而得。在《开宝本草》及《本草纲目》中均有记载^[2]。北青龙衣辛、苦、涩、平,有清热解暑、祛风疗痹、止痛止痢的功效^[3]。现代药理研究表明北青龙衣药理作用广泛,具有抗炎、镇痛、抗菌、抗氧化^[4]和抗肿瘤^[5]等作用。北青龙衣化学成分复杂,主要为萜醌及其苷类、多糖类、黄酮及其苷类、二芳基庚烷类、蒽类、有机酸类、鞣质等。

多糖是构成生命的四大基本物质之一,作为一类重要的生物大分子,具有广泛的生物作用。据报道多糖具有一定的免疫调节作用,是许多中药的主要活性成分,具有调节机体免疫^[6-7]、抗肿瘤^[8-12]、抑菌抗病毒^[13-14]、抗氧化等功效^[15]。近年来尤其是其调节免疫、抗肿瘤作用受到广泛的关注。本课题组前期选用环磷酰胺致免疫低下小鼠的免疫试验对北青龙衣多糖的免疫调节作用进行初步研究,结果表明北青龙衣多糖具有一定的免疫增强活性,为北青龙衣多糖的深入研究奠定了一定的理论基础。

多糖的结构决定多糖的生物活性,但由于其结构极其复杂,目前针对北青龙衣多糖的研究主要为提取工艺^[16-17]和树脂纯化^[18]方面的研究,对于其多糖的结构研究仍然比较模糊。因此本研究对北青龙衣多糖进行提取分离与初步的结构分析。

多糖的生物活性与其分子量与结构密切相关^[19-24],确定均一多糖的分子量为其生物活性的研究奠定基础,并利用气-质联用技术分析其单糖组成及比例,红外光谱初步分析其结构,为下一步结构研究、北青龙衣多糖抗肿瘤物质基础及作为抗肿瘤药物的后续开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

UV-160 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司); KD-2KY 型韩药抽油机(瑞安市永历制药机械有限公司); RE-52AA 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); JM1812-1 型卷式膜小型实验机及各个分子量卷式膜(大连屹东膜工程设备有限公司); LC-10AS 型液相色谱仪(日本岛津公司); Alltech ELSD 2000ES 型蒸发光检测器(美国奥泰公司); PL aquagel-OH MIXED-H 8 μ m GPC 柱(美国安捷伦公司); Spectrum Two 型傅里叶变换红外光谱仪(美国 Perkin Elmer 公司); Clarus 680-SQ8T 型气相色谱-质谱联用仪(美国 Perkin Elmer 公司); 3500 Da 透析袋(美国 Viskase 公司)。

北青龙衣于 2014 年 8 月采自哈尔滨市宾县铜矿山区,

经黑龙江省中医药科学院王伟明研究员鉴定为核桃楸 *Juglans emandehurica Maxim.* 的未成熟果实外果皮;木瓜蛋白酶(活力单位 $> 200 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$,北京博奥拓达科技有限公司); D101 大孔吸附树脂(天津市光复精细化工研究); DEAE Cellulose 52(美国 Whatman 公司); 丙烯葡聚糖凝胶 Sephacryl S-300(瑞典 Pharmacia 公司); 标准分子量葡聚糖(00892-100MG, 00270-100MG, 00271-100MG, 00891-100MG, 00983-100MG)(SIGMA-ALDRICH 公司); D-葡萄糖(批号: P-012-110821), D-半乳糖(批号: B-079-140425), D-甘露糖(批号: G-042-130612), D-木糖(批号: M-066-110701), L-阿拉伯糖(批号: A-012-140111), L-鼠李糖(批号: S-037-1401267)(纯度 $> 98\%$, 购于成都瑞芬思公司)。

1.2 北青龙衣粗多糖的提取

3 kg 干燥北青龙衣加入 14 倍量水,于韩药抽油机内煎煮 1 h,滤过,滤渣加 14 倍量水复煎 1 h,合并滤液,浓缩至适量。浓缩后的水提液加 4 倍量 95% 乙醇于 4 $^{\circ}\text{C}$ 醇沉过夜。4000 r/min 离心 15 min 取沉淀,沉淀依次用无水乙醇、丙酮、乙醚冲洗,干燥得北青龙衣粗多糖。

1.3 北青龙衣粗多糖的纯化

1.3.1 粗多糖脱蛋白工艺 采用木瓜蛋白酶法对粗多糖进行脱蛋白。将粗多糖配制成 $0.01 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的多糖溶液,调 pH 值为 6 后加入 3% 的木瓜蛋白酶,60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴酶解 2 h,反应完成后沸水浴酶灭活 5 min,冷却至室温,离心^[25],取上清液得脱蛋白多糖溶液。

1.3.2 粗多糖纯化工艺 采用 D101 大孔吸附树脂对粗多糖进行纯化脱色。脱蛋白后的多糖溶液浓缩后,经过预处理的 D101 大孔吸附树脂柱,静态吸附 1 h 后,以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速进行洗脱,收集洗脱液,浓缩,既得纯化后多糖溶液。

1.4 北青龙衣总多糖的分离

1.4.1 DEAE Cellulose 52 离子交换柱层析 取多糖溶液 30 mL 浓缩至 3 mL 进行 DEAE Cellulose 52 离子交换柱层析,以 0、0.1、0.2、0.3、0.5 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 梯度洗脱,流速保持 $2.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,收集洗脱液,5 mL/管,蒽酮-硫酸法于 620 nm 检测波长下隔管检测,直到无多糖组分流出。以管数为横坐标,吸光度为纵坐标绘制洗脱曲线。合并洗脱峰部分,浓缩后于 3500 Da 透析袋中自来水透析 12 h,纯水透析 12 h 除盐,冷冻干燥。得到多糖组分 PJP-1、PJP-2、PJP-3、PJP-4、PJP-5。

1.4.2 Sephacryl S-300 凝胶柱层析 精密称取冻干糖样 35 mg,溶于 2.5 mL 超纯水中进行 Sephacryl S-300 凝胶柱

层析,以超纯水洗脱,流速保持 $0.3\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,收集洗脱液 $3\text{ mL}/\text{管}$,蒽酮-硫酸法于 620 nm 检测波长下隔管检测,直到无多糖组分流出。以管数为横坐标,吸光度为纵坐标绘制洗脱曲线。合并洗脱峰部分,浓缩,冷冻干燥。得到多糖组分 PJP-1a、PJP-3a。

1.5 多糖组分的纯度鉴定及分子量测定

1.5.1 多糖组分的纯度鉴定 本实验采用高效液相-凝胶渗透色谱(HPLC-GPC)对得到的多糖组分进行纯度鉴定。精密称取糖样 2 mg 溶于 1 mL 超纯水中,制成 $2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的样品溶液。 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤后检测分析。色谱条件:岛津 LC-10AS HPLC,PL aquagel-OH MIXED-H $8\text{ }\mu\text{m}$ GPC 柱,Alltech ELSD 2000ES 蒸发光检测器。样品浓度 $2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,进样量 $10\text{ }\mu\text{L}$,流动相为超纯水,流速 $0.3\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。漂移管温度 $115\text{ }^\circ\text{C}$,气流速 $1.8\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

1.5.2 多糖组分的分子量测定 精密称取糖样 2 mg 溶于 1 mL 超纯水中,制成 $2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的样品溶液。 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤,进样 $10\text{ }\mu\text{L}$ 检测分析。将不同相对分子质量葡聚糖标准品配制成 $2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液,以保留时间与 T-系列葡聚糖标准品相对分子质量的对数值($\log M_w$)为横纵坐标绘制标准曲线,计算样品的分子量。色谱条件同 1.5.1。

1.6 单糖组成测定

1.6.1 多糖酸水解 称取 10 mg 糖样,溶解于 4.0 mL $2.0\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的三氟乙酸(TFA)溶液中,封管后于 $110\text{ }^\circ\text{C}$ 烘箱中水解 3 h 。待试管冷却后, $4000\text{ r}/\text{min}$ 离心 10 min 水解液,加甲醇反复减压蒸干,以完全除去 TFA。 $110\text{ }^\circ\text{C}$ 烘箱干燥 15 min 除去水分后备用。

1.6.2 硼氢化钠还原 向多糖水解产物中加入 2.0 mL 蒸馏水,沉淀溶解后加入 60 mg 硼氢化钠,室温震荡还原 3 h 。反应完全后,向反应液中加入几滴冰醋酸,至不再产生气泡,减压蒸干溶液后,反复加入甲醇蒸干,以除去硼酸。 $110\text{ }^\circ\text{C}$ 烘 15 min 以除去水分。

1.6.3 衍生化处理 加入 3.0 mL 乙酸酐和 1.0 mL 吡啶, $100\text{ }^\circ\text{C}$ 反应 2 h ,减压蒸干反应液后,甲醇反复蒸干,加入 5.0 mL 三氯甲烷定容。加入等体积蒸馏水洗涂有机溶剂 3 次,以除去离子或者多余的乙酸酐。弃去上层水溶液后,加入一定的无水硫酸钠除水,吸取上清液,经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 有机滤膜过滤供气相质谱联用仪检测分析。

1.6.4 GC-MS 分析 ①色相色谱条件:分析柱:DB-5 弹性石英毛细管柱($30\text{ m}\times 0.25\text{ mm}\times 0.25\text{ }\mu\text{m}$);程序升温条件:柱温 $80\text{ }^\circ\text{C}$,保持 1 min ,以 $5\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 至 $200\text{ }^\circ\text{C}$,以 $2\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 至 $220\text{ }^\circ\text{C}$,以 $10\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 至 $270\text{ }^\circ\text{C}$,保持 1

min ,氦气作载气,进样口温度 $25\text{ }^\circ\text{C}$,分流比 $1:42$,柱流速 $1.2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。②质谱条件:电子轰击源 EI,电子能量 70 eV ,离子源温度 $250\text{ }^\circ\text{C}$,接口温度 $250\text{ }^\circ\text{C}$,质量数扫描范围 $m/z\ 43\sim 500$,扫描速率 $2.5\text{ scan}\cdot\text{s}^{-1}$ 。

1.7 红外光谱分析

称取 1 mg 多糖样品,与 200 mg 干燥的 KBr 混匀,玛瑙研钵中充分研磨混合,压片机压片,然后于 $400\sim 4000\text{ cm}^{-1}$ 波数范围进行红外扫描分析^[26]。

2 结果与分析

2.1 DEAE Cellulose 52 离子交换柱层析

本研究在进行 DEAE Cellulose 52 离子交换柱层析时,选择了 5 个浓度梯度进行洗脱,由纯水洗脱得到 PJP-1 组分, $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 洗脱得 PJP-2 组分, $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 洗脱得 PJP-3 组分, $0.3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 洗脱得 PJP-4 组分, $0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 洗脱得 PJP-5 组分,组分见图 1。

结果显示 PJP-1、PJP-3 组分的多糖含量较大且洗脱峰峰型对称,较适合进一步分离纯化,因此选择 PJP-1、PJP-3 组分进行凝胶柱层析。

2.2 Sephacryl S-300 凝胶柱层析

PJP-1、PJP-3 组分分别进行 Sephacryl S-300 凝胶柱层析,过膜超纯水洗脱,得到 PJP-1a、PJP-3a 两个组分。

2.3 PJP-1a、PJP-3a 组分的纯度鉴定及分子量测定

2.3.1 PJP-1a、PJP-3a 组分的纯度鉴定 采用高效液相-凝胶渗透色谱(HPLC-GPC)对得到的 PJP-1a、PJP-3a 两个组分进行纯度鉴定,见图 2。结果显示 PJP-1a、PJP-3a 组分均呈现单一对称峰形,可以初步断定它们均为纯度较高的物质。

2.3.2 PJP-1a、PJP-3a 组分的分子量测定 标准分子量葡聚糖标准曲线方程为 $y=0.2563x+14.293$, $R^2=0.996$ 。PJP-1a、PJP-3a 两组分在 HPLC-GPC 谱图上的洗脱时间分别为 31.340 min 、 19.823 min 。根据标准曲线计算得出该两组分的分子量分别为: $1.34\times 10^3\text{ Da}$ 、 $1.70\times 10^7\text{ Da}$ 。

2.4 单糖组成测定

本研究选择纯度相对较高的 PJP-3a 组分进行单糖组成测定,根据 GC-MS 结果可知,PJP-3a 组分主要含有 L-鼠李糖(22.90 min)、L-阿拉伯糖(23.21 min)、D-木糖(23.51 min)、D-甘露糖(27.82 min)、D-葡萄糖(27.93 min)和 D-半乳糖(28.24 min)。6 种单糖的摩尔比为 $4.56:7.53:1:2.48:41.4:17.94$ 。混合对照品和 PJP-3a 的 GC-MS 图谱见图 3~图 4。

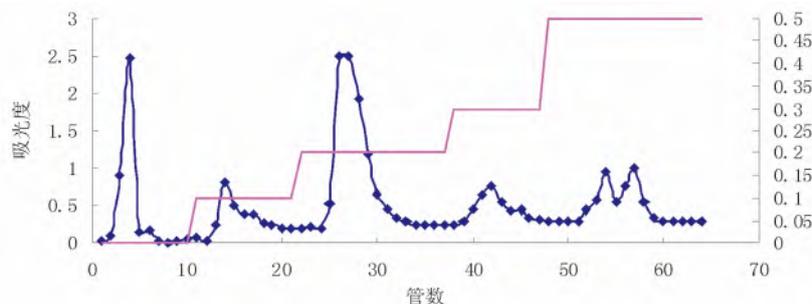


图1 北青龙衣多糖的 DEAE Cellulose 52 离子交换柱层析图

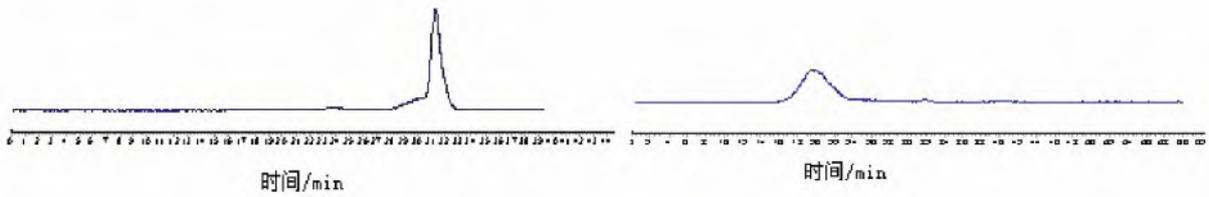


图2 PJP-1a(左)和PJP-3a(右)的HPLC-GPC谱图

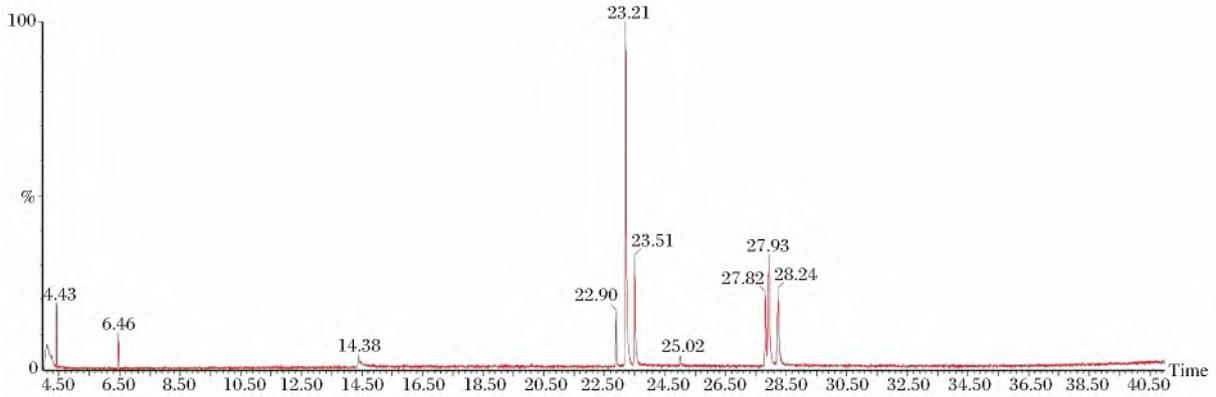


图3 混合对照品的GC-MS图谱

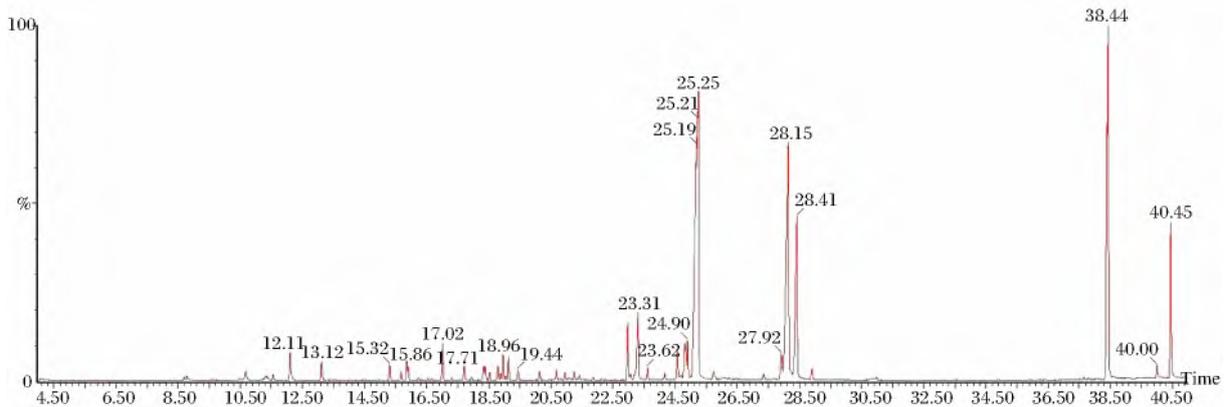


图4 PJP-3a的GC-MS图谱

2.5 红外光谱分析

PJP-1a、PJP-3a的红外光谱图见图5。结果表明,PJP-1a、PJP-3a均具有多糖的特征吸收峰,即 3400 cm^{-1} 、 2935 cm^{-1} 左右的-OH伸缩振动峰及C-H的伸缩振动吸收峰,PJP-1a在 1615 cm^{-1} 处的吸收峰为乙酰氨基(-NH₂COCH₃)的C=O伸缩震动^[27]。PJP-1a、PJP-3a的红外光谱在 1600 cm^{-1} 左右处吸收强度明显不同,推测是由于PJP-1a为离子交换柱层析经水洗脱下来的中性糖,而PJP-3a为离子交换柱层析经 $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NaCl}$ 洗脱下来的酸性糖,酸性糖中糖醛酸的C=O的吸收明显而显现出两糖红外光谱在 1600 cm^{-1} 左右处吸收强度的不同。PJP-1a在 892.61 cm^{-1} 处有吸收提示存在 β -糖苷键,在 764.85 cm^{-1} 处有吡喃环对称伸缩震动吸收^[28]。PJP-3a在 1099.52 cm^{-1} 处有吡喃环C-O-C震动吸收^[29],在 891.30 cm^{-1} 处有吸收提示存在 β -糖苷键。由此提示PJP-1a、PJP-3a两组分可能为具有吡喃环结构及 β -糖

苷键结构的多糖组分。

3 讨论

前期考察了Sephadex G100与Sephacryl S-300两种填料的分离效果,结果显示后者的粒径及样品保留时间适中,较适合本研究中的多糖样品的分离。

考察了高效凝胶渗透色谱-蒸发光检测器的漂移管温度、气流速、流动相流速及样品浓度和进样量,结果显示样品浓度 $2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,进样量 $10\text{ }\mu\text{L}$,漂移管温度 $115\text{ }^\circ\text{C}$,气流速 $1.8\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$,流动相为超纯水,流速 $0.3\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 时检测结果稳定可靠,本研究还对该方法进行了方法学考察,结果显示该方法稳定可行。

采用高效凝胶渗透色谱对其进行纯度鉴定与分子量测定,结果准确可靠。GC-MS、IR用于测定单糖组成与初步分析结构,结果显示PJP-3a是由鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖组成,摩尔比为 $4.56:7.53:1:2.48:41.4:17.94$ 。红外光谱提示PJP-1a、PJP-3a可能

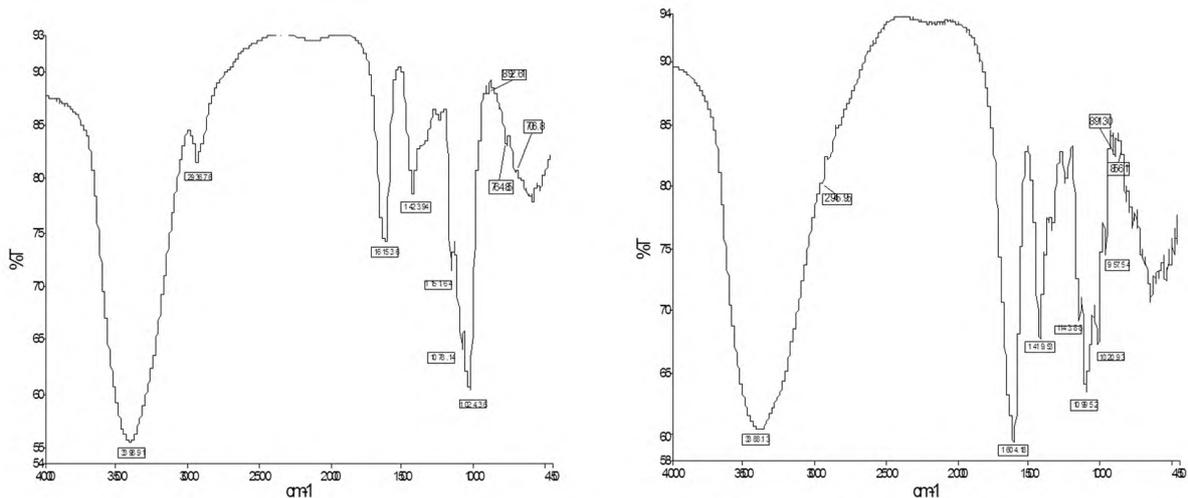


图5 PJP-1a(左)和PJP-3a(右)的红外光谱图

均具有吡喃环结构。糖苷键的连接方式均为β型,且PJP-1a存在乙酰氨基结构。

多糖的结构决定多糖的生物活性,本研究对北青龙衣多糖进行分离纯化得到两个均一分子量多糖,并对其进行纯度鉴定、分子量测定并对其进行初步分析,为更深入的研究北青龙衣多糖抗肿瘤物质基础奠定基础。更详细的结构还需要高碘酸氧化-Smith降解、甲基化等化学法与核磁共振等仪器分析法结合分析。

参考文献

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典. 下册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986: 1544.

[2] 周媛媛, 王栋. 青龙衣中二芳基庚烷类成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(22): 92-93.

[3] 吴任镒, 周太炎, 肖培根, 等. 新华本草纲目(第三册)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1990.

[4] Liu L, Li W, Sasaki T, et al. Juglanone a novel α-tetralonyl derivative with potent antioxidant activity from Juglans mandshurica [J]. J Nat Med 2010, 64(4): 496-499.

[5] 曲中原, 邹翔, 崔兰, 等. 青龙衣不同萃取部位抗肿瘤活性研究[J]. 上海中医药杂志, 2009, 1: 87-90.

[6] 沈学香, 杨焱, 张劲松, 等. 桑黄多糖的分离纯化及体外免疫活性的研究[J]. 食用菌学报, 2008, 15(2): 31-36.

[7] 刘云, 孔伟丽, 姜国良, 等. 2种免疫多糖对刺参组织主要免疫酶活性的影响[J]. 中国水产科学, 2008, 15(5): 787-793.

[8] Ruijun W, Shi W, Yijun X, et al. Antitumor effects and immune regulation activities of a purified polysaccharide extracted from Juglan regia[J]. Int J Biol Macromol 2015, 72: 771-775.

[9] 李石军, 王凯平, 汪柳, 等. 香菇多糖 LNT₂ 的提取分离纯化、结构及体外抗肿瘤活性研究[J]. 中草药, 2014, 45(9): 1232-1237.

[10] 邹宇晓, 廖森泰, 何轩辉, 等. 纯化工艺对金针菇多糖体外抗肿瘤活性的影响[J]. 中国食品学报, 2013, 13(6): 9-14.

[11] 林俊, 李萍, 陈靠山. 近5年多糖抗肿瘤活性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(8): 1116-1125.

[12] 范灵婧, 倪鑫炎, 吴纯洁, 等. 菊花多糖的结构特征及其对NF-κB和肿瘤细胞的活性研究[J]. 中草药, 2013, 44(17): 2364-2371.

[13] 蔡鹃, 黄敏桃, 黄云峰, 等. 苦丁茶多糖活性成分动态累积及其抑菌活性[J]. 食品科学, 2014, 35(9): 43-47.

[14] 付娟, 边静静, 赵桦. 密棘和吴茱萸果实多糖的体外抗氧化和抑菌活性研究[J]. 食品科学, 2010, 31(11): 69-72.

[15] 丁一芳, 李连闯, 赵玺. 多糖的研究进展[J]. 黑龙江医药, 2008, 19(2): 123-126.

[16] 吕建平, 张直峰, 聂倩, 等. 核桃青皮多糖超声辅助提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 湖北农业科学, 2014, 53(5): 1148-1152.

[17] 陆娟, 常清泉, 王思齐, 等. 响应面法优化核桃青皮粗多糖超声提取工艺研究[J]. 北方园艺, 2015(22): 125-129.

[18] 聂倩, 张直峰, 吕建平, 等. 4种大孔吸附树脂纯化核桃青皮中多糖的比较[J]. 西北农业学报, 2014, 23(2): 150-154.

[19] 戴伟, 刘新义, 胡雄彬. 香菇多糖的分子量和结构与生物活性之间的关系[J]. 中南药学, 2012, 10(6): 453-455.

[20] 孙西峰, 刘效磊. 不同分子量孔石莼多糖保湿活性的研究[J]. 生物技术世界, 2014(12): 155-156.

[21] 肖朱洋. 多糖的结构分析与构效关系[J]. 海峡药学, 2007, 19(3): 98-100.

[22] 赵雪, 董诗竹, 孙丽萍, 等. 海带多糖清除氧自由基的活性及机理[J]. 水产学报, 2011, 35(4): 531-537.

[23] 王晓娟, 魏传晚, 徐淑永, 等. 生物活性多糖结构与功效关系的研究进展[J]. 广州化工, 2004, 32(1): 6-9.

[24] 张冬雪, 王晓玲, 刘高强. 灵芝多糖的结构及构效关系[J]. 食品工业, 2015, 36(11): 258-261.

[25] 任晓蕾, 霍金海, 董文婷, 等. 北青龙衣总多糖脱蛋白工艺比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(10): 16-18.

[26] Papageorgiou S. K., Kouvelos E. P., Favvas E. P., et al. Metal-carboxylate interactions in metal-alginate complexes studied with FTIR spectroscopy[J]. Carbohydrate Research, 2010, 345: 469-473.

[27] 石宝霞, 车会莲, 赵丽霞, 等. 碎米荠多糖的分离纯化及光谱分析[J]. 食品科学, 2007, 28(6): 298-302.

[28] 张赛金, 邓永智, 陈清花, 等. 海洋微藻多糖的红外光谱分析初探[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2005, 44(Sup.): 212-214.

[29] 丛媛媛, 王勇, 米仁沙·牙库甫, 等. 阿里红多糖的气相色谱和红外光谱[J]. 光谱实验室, 2011, 28(4): 2147-2150.