

三叶崖爬藤块根多糖复合酶法提取工艺优化及其抗氧化活性研究

胡传久¹, 韩素芳¹, 魏海龙¹, 邹景泉¹, 贺亮¹, 付立忠², 程俊文¹

(1. 浙江省林业科学研究院, 浙江省森林资源生物与化学利用重点实验室, 浙江 杭州 310023;

2. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 311402)

摘要: 在单因素试验的基础上, 通过 Box-Behnken 中心组合设计和响应面分析法优化三叶崖爬藤 *Tetrastigma hemsleyanum* 根中多糖的复合酶法提取工艺条件。在前期预实验的基础上, 采用淀粉酶、木瓜蛋白酶、果胶酶按 2:2:1 (质量比) 组成复合酶对三叶崖爬藤根进行酶解处理, 对工艺中的主要参数酶解温度、加酶量和酶解时间进行了优化。响应面分析结果表明, 三叶崖爬藤根中多糖的最佳提取条件为: 酶解温度 51.7℃, 加酶量 2.8%, 酶解时间 92.3 min, 在此工艺下, 验证试验多糖得率为 3.84%, 与理论值 3.97% 基本吻合。抗氧化实验表明, 三叶崖爬藤多糖对 DPPH·, ·O₂⁻, ·OH 清除作用的 IC₅₀ 分别为 0.32, 0.46, 0.37 mg·mL⁻¹, 表明三叶崖爬藤多糖具有一定的抗氧化能力。

关键词: 三叶崖爬藤; 多糖; 复合酶; 响应面; 抗氧化

中图分类号: R284.2 文献标识码: A 文章编号: 1001-3776 (2020) 06-0024-07

Polysaccharide Extracted from Root Tuber of *Tetrastigma hemsleyanum* by Multienzymes and Its Antioxidant Activity

HU Chuan-jiu¹, HAN Su-fang¹, WEI Hai-long¹, ZOU Jing-quan¹, HE Liang¹, FU Li-zhong², CHENG Jun-wen¹

(1. Zhejiang Academy of Forestry, Key Laboratory of Biological and Chemical Utilization of Forest Resources, Hangzhou 310023, China;

2. College of Pharmaceutical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311402, China)

Abstract: In November 2017, root tubers of 3-year *Tetrastigma hemsleyanum* were collected in Pan'an, Zhejiang province. Experiments were conducted on extraction of polysaccharide from tubers by multienzymatic method and response surface analysis. Based on the results of single factor experiment, enzymolysis was carried out by multienzymes (ratio of amylase, protease, pectinase of 2:2:1). Optimization of extraction technology was implemented on enzymatic hydrolysis temperature, time and total enzyme amount. The response surface analysis demonstrated that polysaccharide yield topped 3.84% under condition of enzymatic hydrolysis temperature of 51.7℃, total enzyme amount of 2.8%, enzymatic hydrolysis time of 92.3 minutes, similar to theoretical value of 3.97%. Antioxidant activity test showed that the polysaccharide from tubers of *T. hemsleyanum* had the IC₅₀ of radical scavenging capacity on DPPH·, O₂⁻ and OH was 0.32, 0.46, 0.37 mg/mL.

Key words: *Tetrastigma hemsleyanum*; polysaccharide; multienzymes; response surface methodology; antioxidant activity

三叶崖爬藤 *Tetrastigma hemsleyanum* 为葡萄科 Vitaceae 崖爬藤属 *Tetrastigma* 多年生草质藤本, 分布于浙江、江西、福建、湖北、湖南、广东、四川等地区。因遗传基因所决定, 三叶崖爬藤块根外形呈椭圆形, 但其中有许多呈酒葫芦状, 这是其独特的外貌特征^[1-3]。药理实验证明三叶崖爬藤具有抗肿瘤、保肝、抗病毒、抗炎、镇

收稿日期: 2020-05-05; 修回日期: 2020-10-17

基金项目: 浙江省科技厅公益项目 (2017C32029), 浙江省自然科学基金项目 (LQ18C160005)

作者简介: 胡传久, 硕士, 助理研究员, 从事森林资源研究与开发; E-mail: huchuanjiu@163.com。通信作者: 程俊文, 硕士, 副研究员, 从事森林食品活性成分加工研究; E-mail: jwchengzj@163.com。

痛及解热等药理作用,并基本无毒^[4-6]。多糖是构成植物细胞壁的主要成分,三叶崖爬藤根中的多糖是其主要活性成分之一,与纤维素、蛋白质等紧密联结。同时,由于三叶崖爬藤根中淀粉含量较高,所以不易从中分离出活性多糖。

目前,三叶崖爬藤多糖(THPS)的提取方法多为传统的热水浸提法,该方法操作简单,但提取时间长,而且高含量的淀粉会使提取液有很大的粘性,提取率低,所得多糖提取物的纯度不高。生物复合酶具有水解淀粉、果胶和蛋白质的作用,酶的高效性能够节约提取能源与时间,酶的专一性使得到的产物稳定,纯度和活性高^[7]。为此,本实验采用淀粉酶、果胶酶、蛋白酶组成复合酶提取三叶崖爬藤根中的多糖,在提高多糖提取效率的同时可以有效去除多糖产物中的淀粉等杂质,避免其它物质对多糖含量测定的干扰,提高提取物中多糖的纯度。另外,本文对该方法所提取的三叶崖爬藤多糖开展了体外抗氧化活性研究,旨在为三叶崖爬藤资源能够更有效地应用于医药保健领域提供试验基础。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

三叶崖爬藤根,于2017年11月采自浙江省磐安县三叶崖爬藤种植基地,三年生;蛋白酶(酶活力 $8\times 10^4\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$)、果胶酶(酶活力 $9\times 10^4\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$)和淀粉酶(酶活力 $5\times 10^4\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$)均购自上海伯奥生物科技有限公司;苯酚、无水乙醇、氯仿、正丁醇均为国产分析醇,购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器

R-201 旋转蒸发器,上海申胜生物技术有限公司;20B 型中药粉碎机,南京邦斯特制药设备有限公司;DKZ-2 型电热恒温振荡水槽,上海福玛实验设备有限公司;PL602-S 电子天平,梅特勒—托利多仪器(上海)有限公司;UV-2600 紫外分光光度计,日本岛津公司。

1.3 方法

1.3.1 THPS 的提取 将当年采集到的三叶崖爬藤根先用自来水冲洗干净,再用蒸馏水冲洗晾干,然后放入真空冷冻干燥机中冻干,取干燥、洁净的三叶崖爬藤根,用20B型中药粉碎机粉碎成40目,用95%乙醇浸提12h,抽滤,取滤渣风干粉碎备用。称取1g粉末,按液料比40:1(mL:g)加蒸馏水混匀,根据各种生物酶的最佳酶活作用条件,在前期预实验的基础上,将淀粉酶、果胶酶、蛋白酶组成2:2:1(质量比)的复合酶,然后在一定酶解温度、加酶量、酶解时间下进行提取,3000 r·min⁻¹离心10 min,上清液用95%乙醇醇沉4 h后再经3000 r·min⁻¹离心5 min,沉淀用相应试验溶剂溶解后测定。

1.3.2 响应面法分析实验 选择酶解温度(X_1)、加酶量(X_2)、酶解时间(X_3)3个因素所确定的水平范围,运用Box-Behnken中心组合试验设计原理,采用三因素三水平的响应面设计,利用Design Expert 8.05 软件对实验数据进行回归分析。自变量的试验水平分别以-1,0,1进行编码,试验因素及水平设计见表1。

表 1 响应面分析因子及水平
Table 1 Factors and levels of RSM analysis

因素	水平		
	- 1	0	1
$X_1/^{\circ}\text{C}$	40	50	60
$X_2/\%$	1	2	3
X_3/min	60	90	120

1.4 项目测定

1.4.1 THPS 含量的测定 采用苯酚-硫酸比色法^[8]测定三叶崖爬藤根中的多糖含量。多糖得率计算公式如下:

多糖得率= (多糖含量 × 稀释体积)/样品干质量 × 100% (1)

1.4.2 三叶崖爬藤多糖抗氧化能力测定 分别准确称取提取的THPS及维生素C(Vc)各25 mg,用蒸馏水配制成1000 μg·mL⁻¹溶液,并用蒸馏水分别稀释至0,0.1,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mg·mL⁻¹。

1.4.2.1 抑制 DPPH·能力的测定^[9] 取0.04 mg·mL⁻¹的 DPPH (1,1-二苯基-2-三硝基苯肼)溶液2 mL,分别加入2 mL 不同浓度的 THPS 和 Vc 溶液后混匀,静置30 min 后在波长517 nm 处用UV-2600 紫外分光光度计测定其吸光度为 $A_{\text{样品}}$,另取浓度为50%的乙醇和待测样品溶液各2 mL 混合,在波长517 nm 处测定其吸光度为 $A_{\text{对照}}$,

再将 2 mL DPPH 乙醇溶液与 2 mL 无水乙醇混合后在波长 517 nm 处测定其吸光度 A_c 。根据所测得的不同吸光度值计算 DPPH·清除率。

$$\text{DPPH}\cdot\text{清除率}=[1-(A_{\text{样品}}-A_{\text{对照}})/A_c]\times 100\%$$

(2)

1.4.2.2 清除·O₂⁻能力的测定^[9] 采用邻苯三酚自氧化法,向试管中加入 0.05 mol·L⁻¹的 Tris-HCl(pH=8.2)缓冲液 4.5 mL,水浴(25℃)20 min,取出后加不同浓度的 THPS 和 Vc 各 0.1 mL,0.4 mL 邻苯三酚(2.5 mmol·L⁻¹,25℃预热),摇匀后水浴 4 min,最后加入 1 mL 18 mol·L⁻¹的 HCl 终止反应,在波长 560 nm 处测吸光值 A_1 。空白组以蒸馏水代替记为 A_0 。

按下式计算·O₂⁻(超氧阴离子)清除率:

$$\cdot\text{O}_2^-\text{清除率}=(A_0-A_1)/A_0\times 100\%$$

(3)

1.4.2.3 清除·OH 能力的测定^[9] 利用 H₂O₂对 Fe²⁺混合产生·OH(羟基自由基),加入水杨酸捕捉·OH 后产生有色物质,该物质在波长 510 nm 处有最大吸收。反应体系中含有 2 mL 9 mmol·L⁻¹ FeSO₄、2 mL 9 mmol·L⁻¹水杨酸-乙醇、2 mL THPS 和 2 mL Vc 溶液,最后加 2 mL 8.8 mmol·L⁻¹ H₂O₂启动反应,37℃反应 0.5 h,以蒸馏水为参比,在波长 510 nm 处测定各样品的吸光度。考虑到实验试剂本身的吸光度,以 2 mL 9 mmol·L⁻¹水杨酸-乙醇、2 mL 9 mmol·L⁻¹FeSO₄和 2 mL 不同浓度的 THPS 溶液为多糖的本底吸收。

$$\cdot\text{OH}\text{清除率}=[A_0-(A_i-A_{0i})]/A_0\times 100\%$$

(4)

式中, A_0 为对照(以蒸馏水代替多糖样品)的吸光度; A_i 为添加不同浓度 THPS 样品时的吸光度; A_{0i} 为无 H₂O₂时多糖样品的吸光度。

1.5 数据分析^[10]

采用 Design-Expert 8.0.5 软件进行数据分析、统计及作图。

2 结果与分析

2.1 THPS 提取工艺

2.1.1 响应面分析方案及结果 根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理,设计三因素三水平的响应面分析试验。共有 17 个试验点,其中 12 个为析因点,5 个零点试验用以估计试验误差。以 THPS 得率为响应值,试验方案及结果见表 2。

表 2 响应面试验设计方案及试验结果
Table 2 Experiment design of RSM and results of RSM

试验号	$X_1/^\circ\text{C}$	$X_2/\%$	X_3/min	$Y/\%$	
				实测值	预测值
BOX-1	1(60)	0(2)	1(120)	3.23±0.032	3.20
BOX-2	-1(40)	0	1	3.08±0.036	3.08
BOX-3	0(50)	-1(1)	1	3.43±0.041	3.39
BOX-4	1	0	-1(60)	3.17±0.028	3.17
BOX-5	1	-1	-0(90)	3.32±0.042	3.40
BOX-6	0	0	0	3.68±0.027	3.70
BOX-7	0	-1	-1	3.37±0.032	3.29
BOX-8	0	0	0	3.66±0.044	3.70
BOX-9	0	1(3)	-1	3.33±0.025	3.38
BOX-10	1	1	0	3.56±0.021	3.52
BOX-11	0	1	1	3.40±0.036	3.48
BOX-12	0	0	0	3.78±0.041	3.70
BOX-13	-1	1	0	3.38±0.035	3.30
BOX-14	0	0	0	3.70±0.027	3.70
BOX-15	0	0	0	3.66±0.033	3.70
BOX-16	-1	0	-1	2.88±0.041	3.91
BOX-17	-1	-1	0	3.20±0.029	3.24

2.1.2 回归模型建立及方差分析 利用 Design Expert 8.05 软件对表 2 实验数据进行分析^[9], 获得 THPS 得率对酶解温度、加酶量、酶解时间的多元二次回归方程:

$$Y = 3.70 + 0.09X_1 + 0.04X_2 + 0.05X_3 + 0.02X_1X_2 - 0.04X_1X_3 + 0.003X_2X_3 - 0.31X_1^2 - 0.02X_2^2 - 0.29X_3^2 \quad (5)$$

由表 3 可知, 以 THPS 得率为目标函数的回归方程的回归效果不显著, P 值基本大于 0.1; 模型的确定系数 $R^2 = 0.9547$, 说明模型与实际实验拟合较好; 校正决定系数 $\text{Adj } R^2 = 0.8964$, 说明该模型能解释 95.47% 响应值的变化; 模型的失拟项表示模型预测值与实际值不拟合的概率, 表 3 中模型失拟项的 P 值为 $0.0860 > 0.05$, 表明模型的失拟项不显著; 根据表 3 的显著性分析结果, 因素一次项 X_1 、二次项 X_{12} 以及 X_{32} 对 THPS 得率均呈显著影响 ($P < 0.05$)。综合以上分析表明, 这个模型建立的回归方程能运用于复合酶法提取 THPS 提取条件优化的理论预测。

2.1.3 响应面图形分析 分别将模型中的酶解温度、加酶量、酶解时间的其中一个因素固定在 0 水平, 得到另外两个因素的交互影响结果, 二次回归方程的响应面及其等高线如图 1、图 2 和图 3 所示, 各个因素及其相互间的交互作用对响应值的影响结果通过该组图可以直观地反映出来。极值条件应该在等高线的圆心处。由几组图可以看出, 影响 THPS 提取得率的最显著因素为酶解温度 (X_1), 表现为响应面变化弧度较大。加酶量 (X_3) 酶解时间 (X_2) 响应面弧度变化平缓, 说明对响应值影响相对较小。

此外, 等高线的形状可反映出交互效应的强弱, 椭圆形表示二因素交互作用显著, 而圆形则与之相反^[10]。从图 1 至图 3 可以看出, X_1 与 X_3 之间的交互作用相对更显著。

表 3 回归模型方差分析

Table 3 ANOVA on regression model					
方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.94	9	0.10	16.38	0.000 7**
X_1	0.07	1	0.07	10.77	0.013 5*
X_2	0.02	1	0.02	2.41	0.164 6
X_3	0.02	1	0.02	2.99	0.127 3
X_1X_2	0	1	0	0.14	0.717 9
X_1X_3	0	1	0	0.77	0.409 1
X_2X_3	0	1	0	0.003 933	0.951 7
X_1^2	0.41	1	0.41	64.38	<0.000 1**
X_2^2	0	1	0	0.25	0.635 5
X_3^2	0.36	1	0.36	57.35	0.000 1**
残差	0.04	7	0.01		
失拟项	0.04	3	0.01	4.65	0.086 0
纯误差	0.01	4	0		
总离差	0.98	16			

$R^2 = 0.9547$; $\text{Adj } R^2 = 0.8964$

注: “*” 表示差异显著 ($P < 0.05$); “**” 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

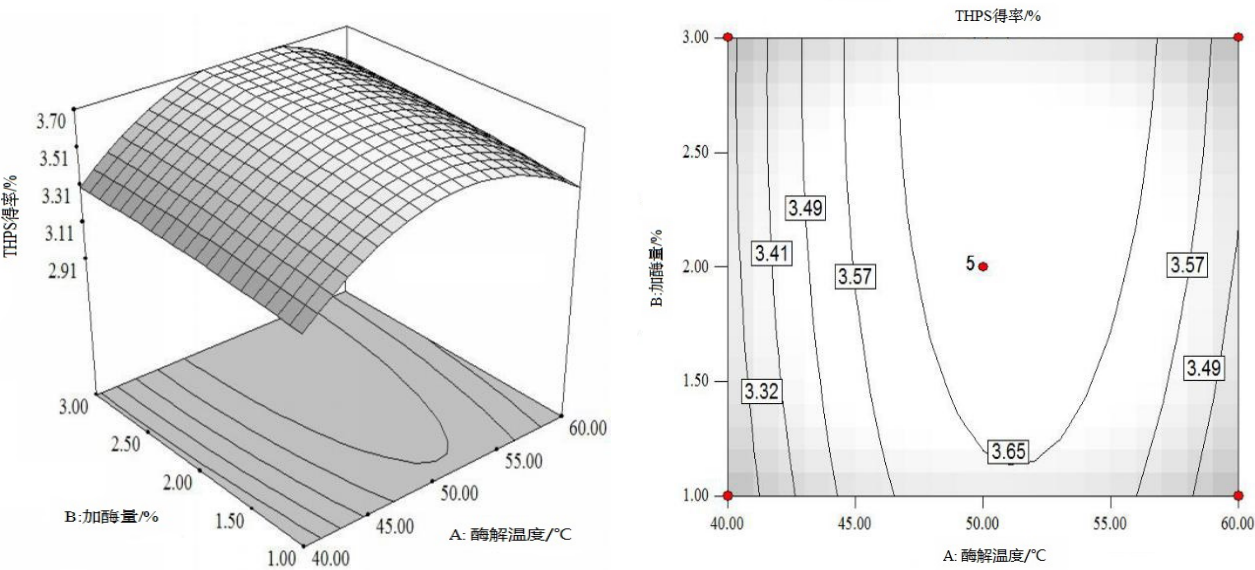


图 1 酶解温度和加酶量交互影响多糖得率的曲面图 (A) 和等高线图 (B)

Figure 1 Surface diagram and contour for polysaccharide yield by interaction of enzymatic hydrolysis temperature and total enzyme amount

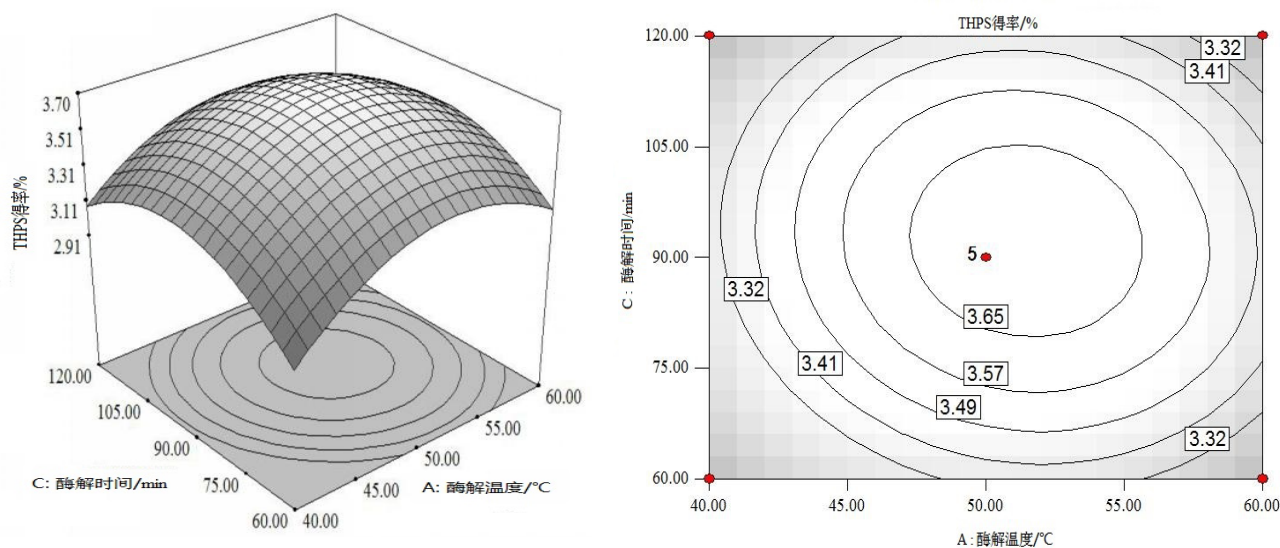


图2 酶解温度和酶解时间交互影响多糖得率的曲面图和等高线图

Figure 2 Surface diagram and contour for polysaccharide yield by interaction of enzymatic hydrolysis temperature and time

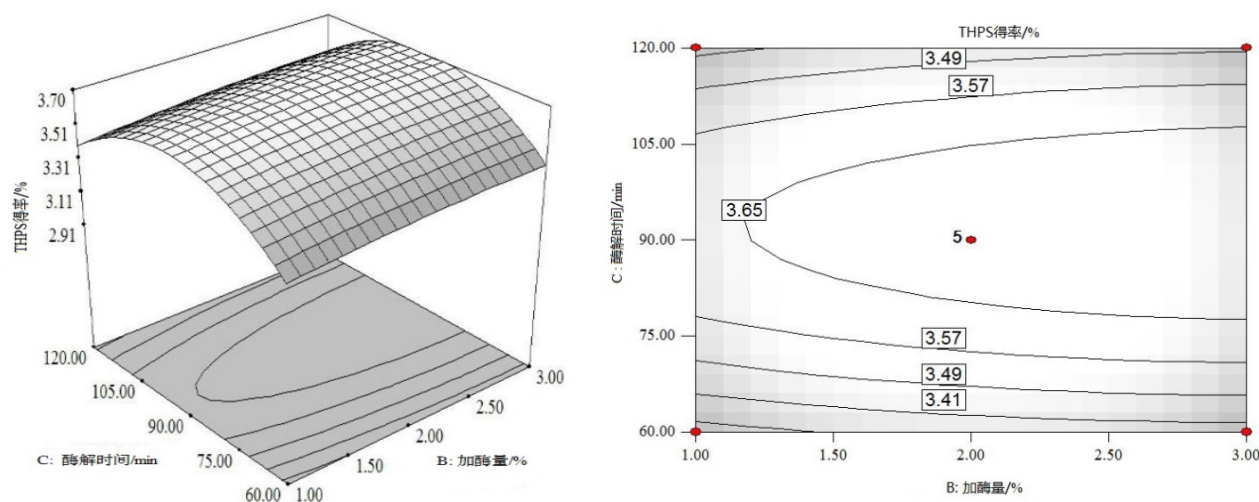


图3 加酶量和酶解时间交互影响 THPS 得率的曲面图和等高线图

Figure 3 Surface diagram and contour for polysaccharide yield by interaction of total enzyme amount and hydrolysis time

2.1.4 验证实验 根据 Box-Behnken 试验所得的结果和二次多项回归方程, 利用 Design Expert 8.05 进行数据分析, 得到最佳提取条件为: 酶解温度 51.7℃, 加酶量 2.8%, 酶解时间 92.3 min。在此条件下, THPS 得率理论值可达 3.97%。

为检验模型预测值与实际实验值之间的相关性, 即检验响应面优化模型的可靠性, 对 THPS 的提取得率进行实验验证。实验中酶解温度、加酶量和酶解时间的优化值分别为 51.7℃, 2.8%, 92.3 min, 三次平行实验, 测得 THPS 得率分别为 3.83%, 3.82%, 3.87%, 实际 THPS 得率平均值为 3.84%, 达到了回归模型预测理论值的 96.7%, 实验结果与模型符合良好, 说明

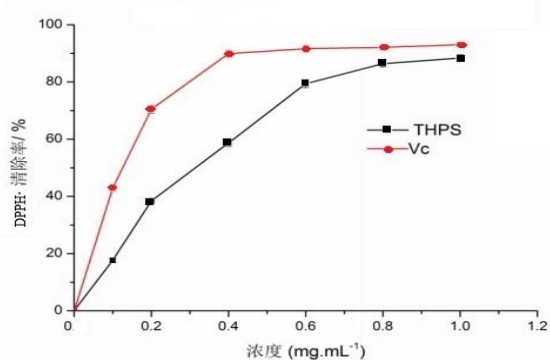


图4 THPS 和 Vc 对 DPPH· 的清除能力

Figure 4 Scavenging capacity of polysaccharides and vitamin C on DPPH·

该模型能较好地模拟和预测 THPS 得率。

2.2 THPS 抗氧化结果

2.2.1 对 DPPH·的清除能力 DPPH·是一种稳定的以氮原子为中心的自由基, DPPH·法是评价天然化合物抗氧化能力的一种有效而灵敏的方法。图 4 为 THPS 和 Vc 清除 DPPH·的能力。由图 4 表明, THPS 对 DPPH·的清除能力随着浓度的增加而增加, 呈剂量依赖性。THPS 的 IC_{50} (半抑制浓度) 值为 $0.32\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。当 THPS 的浓度达到 $0.8\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 其对 DPPH·的清除率为 86.4%, 浓度超过 $0.8\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 后, 清除率没有明显的增加。

2.2.2 清除 $\cdot\text{O}_2^-$ 能力的测定 THPS 对 $\cdot\text{O}_2^-$ 的清除能力如图 5 所示。由图 5 中可以看出, 在测试浓度范围内, THPS 表现出很强的 $\cdot\text{O}_2^-$ 清除能力。THPS 的 IC_{50} 值为 $0.46\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。在 $0.8\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度时, THPS 对 $\cdot\text{O}_2^-$ 的抑制率为 77.6%, THPS 显示出较强的对 $\cdot\text{O}_2^-$ 的清除能力。

2.2.3 清除 $\cdot\text{OH}$ 能力的测定 $\cdot\text{OH}$ 是最活跃的活性氧, 具有诱导作用, 严重破坏相邻的生物分子, 导致各种疾病。图 6 为不同浓度下 THPS 和 Vc 清除 $\cdot\text{OH}$ 的能力。从图 6 中可以看出, THPS 和 Vc 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力都与浓度的增加有很好的相关性。在 $0.4\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度以下, Vc 对 $\cdot\text{OH}$ 的抑制作用明显强于 THPS, 此后随着浓度的增加, 其抑制作用不再明显增强, 而 THPS 的抑制作用继续增强。THPS 的 IC_{50} 值为 $0.37\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。在 $0.8\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度时, THPS 对 $\cdot\text{OH}$ 的抑制率为 77.8%。

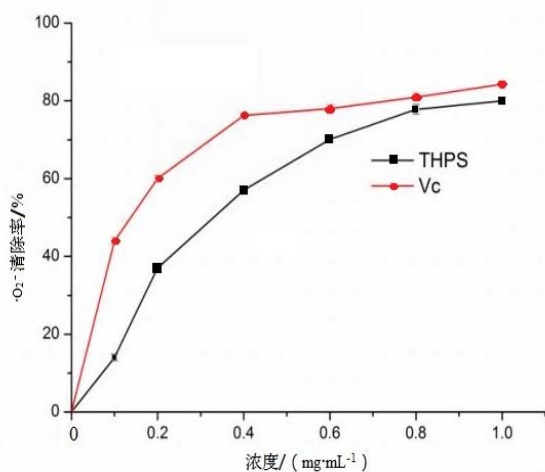


图 5 THPS 和 Vc 清除超氧阴离子自由基的能力

Figure 5 Scavenging capacity of polysaccharides and vitamin C on superoxide anion

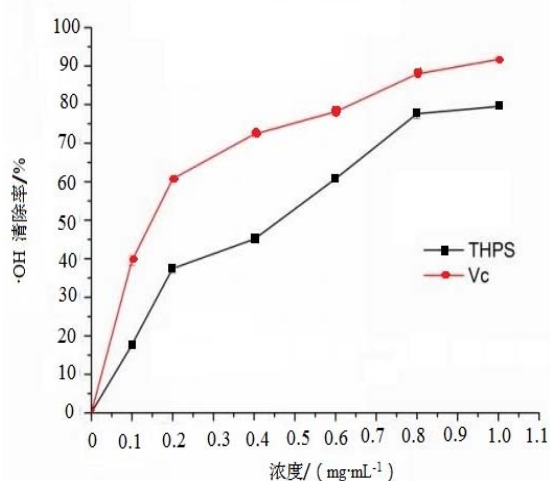


图 6 THPS 和 Vc 清除 $\cdot\text{OH}$ 的能力

Figure 6 Scavenging capacity of polysaccharides and vitamin C on hydroxyl radical

3 结论与讨论

目前对中药植物类中多糖的提取及其含量的测定大多采用热水浸提, 或辅以微波法、酶解法, 再通过苯酚-硫酸法测定含量^[11-12]。由于苯酚-硫酸法无法有效地区别淀粉与活性多糖, 因此, 对于像三叶崖爬藤中根茎部分的成分, 由于其富含大量的淀粉类(非活性多糖)物质和果胶类粘性物质, 若只是简单地采用传统的提取方法再通过苯酚-硫酸法测定其多糖含量, 往往会使测定的真实多糖的含量偏高。为此, 本实验针对三叶崖爬藤中根茎淀粉类物质丰富的特点, 采用淀粉酶、果胶酶和蛋白酶组成复合酶对三叶崖爬藤根进行酶解处理, 对工艺中主要参数酶解温度、加酶量和酶解时间等参数条件进行了实验设计, 根据 Box-Behnken 中心组合实验设计及三因素三水平的响应面分析, 通过二次多项回归模型进行方差分析和回归拟合, 预测了三叶崖爬藤多糖的最佳提取工艺条件为: 酶解温度 51.7°C , 加酶量 2.8%, 酶解时间 92.3 min。在此工艺下, 其多糖得率理论值可达 3.97%。验证实验中多糖得率平均值为 3.84%, 与预测值十分接近, 证明了该实验方法的稳定性。本实验在提高多糖提

取效率的同时可以有效去除多糖产物中淀粉等杂质,避免非多糖类物质对多糖含量测定的干扰,使其多糖含量测定值更加接近真实含量。

抗氧化实验表明,三叶崖爬藤多糖具有一定的抗氧化能力,其对 DPPH·, $\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{OH}$ 清除作用的 IC_{50} 分别为: 0.32, 0.46, 0.37 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。当三叶崖爬藤多糖的浓度达到 0.8 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,其对 DPPH·, $\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{OH}$ 的清除率分别为 86.4%, 77.6%, 77.8%。何文等也报道三叶崖爬藤多糖具有较好的抗氧化活性^[14]。同时,李盛等研究表明多糖的生物活性与其多糖的单糖组成,空间构象有紧密的联系^[15],有关三叶崖爬藤多糖生物活性与结构间的关系及三叶崖爬藤多糖作为天然抗氧化剂等产品的应用,值得进一步研究和开发。

参考文献:

- [1] 徐硕,金鹏飞,徐文峰,等. 民间中药三叶青的研究进展[J]. 中南药学, 2016, 14 (12): 1336–1339.
- [2] 伍昭龙,吕江明. 中药三叶青的研究现状[J]. 中国民族民间医药杂志, 2006 (1): 18.
- [3] 钱丽华,戴丹丽,姜慧燕,等. 濒危药用植物三叶青研究进展[J]. 浙江农业学报, 2015, 27 (7): 1301–1308.
- [4] 刘培刚,魏克民. 三叶青生物学、药理学及临床应用相关研究进展[J]. 中国中医药科技, 2018, 25 (6): 927–933.
- [5] 丁丽,章璐幸,邱彦,等. 三叶青三氯甲烷部位化学成分及其抗肿瘤活性研究[J]. 中国药学杂志, 2015, 50 (21): 1857–1860.
- [6] 林婧,纪明妹,黄泽豪,等. 三叶青的化学成分及其体外抗肿瘤活性研究[J]. 中国药学杂志, 2015, 50 (8): 658–663.
- [7] 王洪伟,崔崇士. 南瓜多糖复合酶法提取及纯化的研究[J]. 食品科学, 2007, 28 (8): 247–249.
- [8] 徐志祥,李刚,李宝建. 苯酚-硫酸法测定灵芝多糖含量的条件研究[J]. 食用菌, 2000, 22 (3): 6–7.
- [9] JIN Q L, ZHANG Z F, LV G Y, *et al.* Antioxidant and DNA damage protecting potentials of polysaccharide extracted from *Phellinus baumii* using a delignification method[J]. Carbohydr Polym, 2016, 152: 575–582.
- [10] 张成军. 实验设计与数据处理[M]. 北京: 化学工业出版社, 2009.
- [11] 郭南生. 三叶青根多糖提取、纯化、结构表征及其抗肿瘤活性的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2018.
- [12] 黄有强. 微波辅助提取三叶青多糖工艺优化及其拮抗炎症细胞的研究[J]. 浙江中医杂志, 2017, 52 (5): 384–385.
- [13] 郭南生,江和栋,张兵. 三叶青根多糖提取工艺优化、分离纯化及结构表征[J]. 食品与机械, 2018 (7): 143–147.
- [14] 何文,李瀚鑫,王晰雯,等. 三叶青不同萃取部位抗氧化活性[J]. 食品工业, 2020, 41 (2): 151–154.
- [15] 李盛,许淑琴,张俐娜. 菌类多糖链构象及其表征方法研究进展[J]. 高分子学报, 2010 (12): 1359–1375.