

Extraction and Bioactivity Determination of Polysaccharide from *Elsholtzia rugulosa* Hemsl.

Kun Wang¹, Kuangzheng Qu¹, Mengmeng Huo¹, Jing Zhang¹, Mo Li¹, Chunlan Liu^{1,2,3*}

¹College of Life and Environmental Science, Minzu University of China, Beijing

²Center on Translational Neuroscience, Minzu University of China, Beijing

³Beijing Engineering Research Center of Food Environment and Public Health, Beijing

Email: *13520669416@163.com

Received: May 10th, 2019; accepted: May 22nd, 2019; published: May 29th, 2019

Abstract

Ultrasound-assisted water extraction and alcohol precipitation method was used to extract the polysaccharide from *Elsholtzia rugulosa* Hemsl. (YBZc), the extraction rate is 5.63%. The uronic acid content was determined by the sulfuric acid-carbazole method to be 32.2%, and the protein content measured by the Kjeldahl method was 2.98%. The results of gas chromatography showed that the monosaccharide composition of YBZc was Rha, Ara, Man, Glc, Gal, and the relative molar ratio was 1.000:0.793:0.440:0.557:0.994. When the concentration reached 3.2 mg/mL, the maximum clearance rate of YBZc to ·OH and DPPH· was 50.14% and 97.37%, respectively, and there was a dose-effect relationship in a certain range; when the concentration reached 1 mg/mL, YBZc had the best inhibitory effect on α -glucosidase, which was 90.28%, and there is a dose-effect relationship within a certain range. It indicates that YBZc has certain activities of clearing ·OH and DPPH· and hypoglycemic effects. YBZc can attenuate STS-mediated hippocampal neuronal damage in rats and has protective effects on hippocampal neurons.

Keywords

Elsholtzia rugulosa Hemsl., Polysaccharide, Extraction, Biological Activity

野巴子粗多糖的提取及生物活性测定

王 坤¹, 曲匡正¹, 霍萌萌¹, 张 景¹, 李 默¹, 刘春兰^{1,2,3*}

¹中央民族大学生命与环境科学学院, 北京

²中央民族大学转化神经科学中心, 北京

³北京市食品环境与健康工程技术研究中心, 北京

*通讯作者。

Email: *13520669416@163.com

收稿日期: 2019年5月10日; 录用日期: 2019年5月22日; 发布日期: 2019年5月29日

摘要

采用超声波辅助水提醇沉法从野巴子叶中提取野巴子粗多糖(YBZc), 野巴子多糖的提取率为5.63%, 硫酸-咔唑法测得其糖醛酸含量为32.2%, 凯氏定氮法测得蛋白质含量为2.98%。气相色谱分析结果表明YBZc的单糖组成为Rha、Ara、Man、Glc、Gal, 相对摩尔比为1.000:0.793:0.440:0.557:0.994。YBZc的活性实验表明, 在浓度达到3.2 mg/mL时, YBZc对·OH、DPPH·的清除率最大分别为50.14%、97.37%, 且在一定的范围内存在量效关系; 在浓度达到1.0 mg/mL时, YBZc对 α -葡萄糖苷酶抑制效果最佳, 为90.28%, 且在一定的范围内存在量效关系。表明YBZc具有一定的清除·OH和DPPH·的活性以及降血糖效果。YBZc能减弱STS介导的乳鼠海马神经元损伤, 具有对海马神经细胞的保护作用。

关键词

野巴子, 多糖, 提取, 生物活性

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

野巴子(*Elsholtzia rugulosa* Hemsl.)是唇形科香薷属植物, 又名野拔子、草芝麻蒿、细皱香薷等[1], 为一年生药食同源植物, 主产于西南地区的山坡草地中, 包括云贵高原以及四川等地, 在云南分布尤为丰富[2]。野巴子性凉、略苦, 具有疏风解表、消食化积的作用[3]。现代研究表明, 野巴子含有黄酮类、挥发油类成分, 有清除自由基、抑菌、降血糖活性[4] [5] [6]。目前有关野巴子多糖生物活性的研究报道得较少。

张玉婷等对云南楚雄野巴子中多糖含量进行了测定[7], 本论文对野巴子多糖的提取、理化性质及生物活性进行初步探究, 为后续药用及保健功能产品开发提供一定的指导。

2. 材料与方法

2.1. 材料与试剂

本实验材料为唇形科香薷属的野巴子(*Elsholtzia rugulosa* Hemsl.)晒干后的叶片。本次研究所用的干燥野巴子叶于2016年采自云南省楚雄彝族自治州, 经中央民族大学生命与环境科学学院刘博老师鉴定。

实验动物为SD大鼠E18孕鼠。实验老鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号: SCXK(京)2016-0011。

D-糖醛酸, 北京拜尔迪生物公司产品; 鼠李糖、木糖、葡萄糖、甘露糖、岩藻糖、阿拉伯糖、半乳糖 sigma 公司; 水杨酸、无水碳酸钠、磷酸氢二钠、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical 2,2-Diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl) hydrazyl, DPPH)、无水苯酚、二甲基亚砜(分析纯)国药集团产品; 正丁醇、

硫酸、三氯甲烷(分析纯)北京化工厂产品; 4-硝基苯基-D-吡喃糖苷(p-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranoside, PNPg)、对硝基苯酚、阿卡波糖、 α -葡萄糖苷酶(纯度 100 U/mg)、Dextran 标准品(分子量 5000、10,000、20,000、40,000、70,000、100,000、500,000)上海源叶生物科技有限公司产品; WST-1 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒、LDH 乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒碧云天生物技术有限公司。

2.2. 仪器与设备

KDY-9820 型凯式定氮仪, 北京瑞邦兴业; KQ-500DE 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; UV-Jasco53 型紫外分光光度计、GC-2014 型毛细管气相色谱仪, 日本岛津; 高效液相色谱仪(RI2041 视差折光检测器)德国 KNAUER; Benchmark plus 酶标仪, 美国伯乐公司。

2.3. 实验方法

2.3.1. 野巴子粗多糖(YBZc)的提取

野巴子叶粉碎→95%乙醇回流→脱脂野巴子叶→超声波辅助水提法提取[8]

↓

野巴子粗多糖←3.5 倍体积 95%乙醇醇沉

2.3.2. YBZc 提取率计算方法

采用超声波辅助水提醇沉法对野巴子多糖进行提取, 按公式(1)计算多糖提取率[9]:

$$\text{野巴子粗多糖提取率} / \% = \frac{\text{粗多糖质量} / \text{g}}{\text{原材料质量} / \text{g}} \times 100 \quad (1)$$

2.3.3. YBZc 的理化性质测定

对野巴子粗多糖溶液进行如下理化性质测定:

硫酸-吡啶反应: 在浓硫酸的作用下, 糖醛酸会水解成带有-COOH 的糠醛衍生物或糠醛, 能够继续与吡啶发生反应, 生成紫红色的化合物[10]。

菲林试剂反应: 菲林试剂与还原性糖(葡萄糖、果糖等)反应生成砖红色沉淀[11]。

苯酚-硫酸反应: 在硫酸存在的条件下, 五碳糖类和六碳糖类以及它们的双糖类能够被分解成羟甲基糠醛并与苯酚作用产生橘黄色缩合产物[11]。

碘-碘化钾反应: 淀粉遇到碘-碘化钾溶液显示特征蓝色[10]。

多糖鉴定: 向两只试管中各加入 1 mL 浓度为 1 mg/mL 的野巴子粗多糖溶液, 其中一支试管中加 1 mL 浓硫酸进行加热酸水解, 然后将两支试管进行斐林试剂反应[11]。

2.3.4. 硫酸-吡啶法测定 YBZc 糖醛酸含量和气相色谱分析

按文献中方法制作糖醛酸标准曲线, 得回归方程[10]。取浓度为 1 mg/mL 的野巴子粗多糖溶液 1 mL, 进行上述反应, 计算得糖醛酸含量。

YBZc 的气相色谱(GC)分析: 按文献中方法对各标准单糖和 YBZc 进行水解、还原、乙酰化[12], 之后进行 GC 分析。

条件: Rtx-225 毛细管柱(30 m × 0.32 mm × 0.25 μ m); 程序升温条件: 100 $^{\circ}$ C → 200 $^{\circ}$ C, 升温速度为 5 $^{\circ}$ C /min; 载气: 氢气; 线速为 48 cm/s; 进样方式: 分流; 分流比为 10:1; 检测器: FID。

2.3.5. 凯氏定氮法测定野巴子粗多糖中蛋白质含量

本实验按照 GB5009.5-2010 中凯氏定氮法对 YBZc 中的蛋白质含量进行测定。

2.3.6. YBZc 的相对分子质量测定

YBZc 的高效液相色谱法(HPLC)检测

将不同相对分子质量的葡聚糖配成 2 mg/ml 的糖溶液, 得到 lgMp-RT 校正曲线。将 YBZc 也配制成 2 mg/ml 的糖溶液, 进行相同测定, 代入线性方程, 以测 YBZc 的相对分子质量。

条件: OHpak SB-805HQ series 凝胶柱(分子量 $< 4 \times 10^6$, 8×300 mm); 柱温, 38℃; 流动相, 0.1 mol/L NaNO₃; 流速, 0.8 mL/min; 进样量, 20 μL。

2.3.7. YBZc 清除自由基活性测定

1) YBZc 清除·OH 自由基活性的测定

按参考文献进行活性测定[13], 计算·OH 清除率公式如(2):

$$\text{清除率} / \% = \frac{A_o - A_x}{A_o} \times 100 \quad (2)$$

式中: A_x 为 510nm 处测得的吸光度; A_o 为空白组的吸光度。

2) YBZc 清除 DPPH·自由基活性的测定

按参考文献进行活性测定[13], 计算 DPPH·清除率公式如(3):

$$\text{清除率} / \% = \frac{1 - (A_s - A_r)}{A_o} \times 100 \quad (3)$$

式中: A_s 为所测得的吸光度; A_r 为空白组的吸光度; A_o 为未加样液的 DPPH 溶液的吸光度。

2.3.8. α-葡萄糖苷酶法进行 YBZc 体外降血糖活性研究

按参考文献进行活性测定[14], α-葡萄糖苷酶清除率计算公式如(4):

A_1 为 405 nm 下测定的吸光度值, A_2 为样品本底的吸光度值, A_0 则为不加样品测定酶的活力吸光度值。阿卡波糖作为阳性对照,

$$\text{抑制率} / \% = \frac{A_0 - (A_1 \times A_2)}{A_0} \times 100 \quad (4)$$

2.3.9. 野巴子多糖对 STS 介导的神经元损伤的保护作用

1) 乳鼠海马神经元的原代培养及分组处理

按照参考文献中方法培养乳鼠原代海马神经元[15], 实验随机分为 4 组: 正常对照组、STS 模型组、YBZc 组和 YBZc 预处理组。对照组不加其他处理; 模型组加终浓度为 0.3 μmol/L 的星形孢菌素(staurosporine, STS), 使得细胞损伤程度为 50%, 建立 STS 介导神经元损伤细胞模型; YBZc 组加入不同浓度的野巴子粗多糖溶液; YBZc 预处理组加入 0.3 μmol/L 的 STS 和不同浓度的野巴子粗多糖溶液。24 h 后使用 WST-1 法和 LDH 法检测细胞存活率和细胞毒性。

2) 细胞增殖率测定

细胞系与 WST-1 共培养于 37℃ 下 2 h, 450 nm 波长测定其吸光度。按公式(5)计算细胞增殖率:

$$\text{细胞增殖率} = \frac{\text{实验组吸光值}}{\text{对照组吸光值}} \times 100 \quad (5)$$

3) LDH 细胞毒性检测

将细胞培养于 96 孔板, 进行处理后, 吸取上清 20 uL 并加入 20 μL LDH 检测工作液。混匀, 室温(约 25℃)避光孵育 30 min, 然后在 490 nm 处测定吸光度。按公式(6)计算细胞毒性:

$$\text{细胞毒性} = \frac{\text{实验组吸光值}}{\text{对照组吸光值}} \times 100 \quad (6)$$

4) 统计分析

实验数据用 $\bar{x} \pm SE$ 表示, 应用 GraphPad Prism7.00 软件进行独立性 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3. 结果与分析

3.1. 野巴子粗多糖(YBZc)提取及理化性质

在料液比 1:30 g/mL, 提取温度 70℃, 提取时间 2 h, 超声功率 300 W 条件下, YBZc 提取率为 5.63%。YBZc 为棕黄色粉末, 易溶于水, 不溶于有机溶剂。对 YBZc 定性检测, 结果如表 1 所示。

Table 1. The qualitative test results of YBZc

表 1. 野巴子粗多糖定性试验结果

试剂	现象	试验结论
I ₂ -KI	无蓝色出现	不含有淀粉
Fehling 试剂	砖红色沉淀	含有还原性糖
硫酸-呋唑	溶液呈现紫色	多糖含有糖醛酸
硫酸-苯酚	溶液呈橘红色	含有糖

3.2. YBZc 中糖醛酸的含量测定及气相色谱分析

采用硫酸 - 呋唑法对 YBZc 中的糖醛酸含量进行测定[10], 制作糖醛酸标准曲线如图 1:

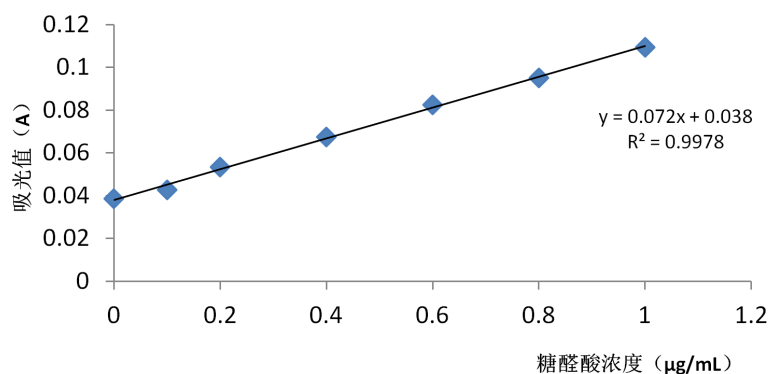


Figure 1. Standard curve of uronic acid content

图 1. 糖醛酸含量的标准曲线

线性回归方程 $y = 0.072x + 0.038$, $R^2 = 0.9978$ 。将野巴子粗多糖溶液吸光度值代入, 计算得 YBZc 中糖醛酸含量为 32.2%, 表明 YBZc 中含有糖醛酸。

YBZc 进行 GC 单糖组成分析[12], 与标准单糖比较, 结果显示 YBZc 的单糖组成为 Rha、Ara、Man、Glc、Gal, 相对摩尔比为 1.000:0.793:0.440:0.557:0.994, 其中 Rha 占比最高, Man 占比最低, YBZc 是含有糖醛酸的酸性粗多糖。

3.3. YBZc 中的蛋白质含量测定

凯氏定氮法测得实验提取到的 YBZc 中, 蛋白质含量为 2.98%, 可见粗提物中含有游离的蛋白质。

3.4. YBZc 的相对分子质量测定

多糖的活性同分子量大小关系密切[16], 所以对 YBZc 分子量分布范围进行测定。采用 HPLC 和标准曲线法测 YBZc 的分子量(图 2), 得到标准葡聚糖的标准曲线, 线性方程为 $y = -0.7956x + 14.654$, $R^2 = 0.9935$ 。

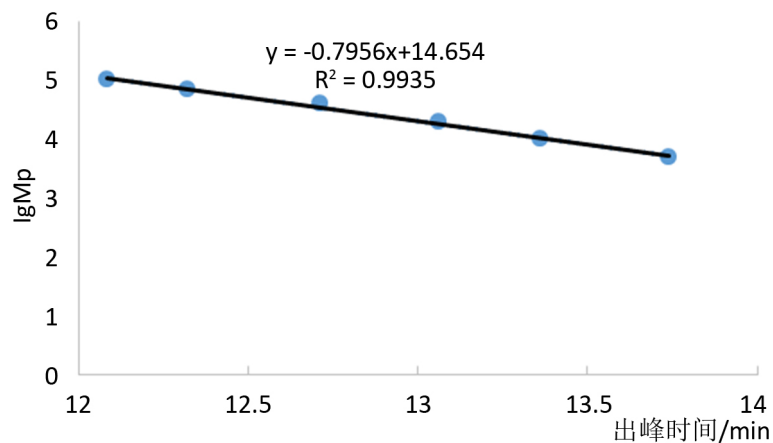


Figure 2. Calibration curve for molar mass of YBZc
图 2. YBZc 的分子量标准曲线图

YBZc 的最高峰的保留时间为 13.67 min, 代入上述线性方程, 计算得分子量为 5901.84 u。

3.5. YBZc 清除自由基活性测定

3.5.1. YBZc 体外清除·OH 自由基

在清除·OH 体系中加入 YBZc, 以抗坏血酸(Vitamin C, Vc)为阳性对照, 酶标仪检测[13], 结果如图 3。

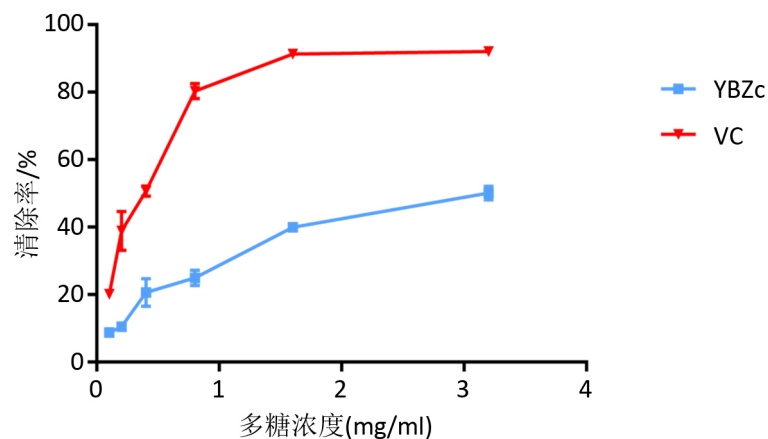


Figure 3. Scavenging effect of YBZc and Vc on ·OH
图 3. YBZc 及 Vc 对·OH 的清除作用

YBZc 对·OH 清除作用存在一定的剂量关系; 当野巴子粗多糖溶液浓度为 0.1 mg/mL 时, 其对·OH 的清除率为 8.7%; 当野巴子粗多糖溶液浓度达到 3.2 mg/mL 时, 其对·OH 的清除率达 50.14%, 剂量关系表明野巴子多糖在高浓度条件下具有良好的清除·OH 的活性。

3.5.2. 野巴子多糖体外清除 DPPH 自由基的活性

测定不同浓度多糖对 DPPH 的清除作用, 以 Vc 为阳性对照, 酶标仪检测[13], 结果见图 4。

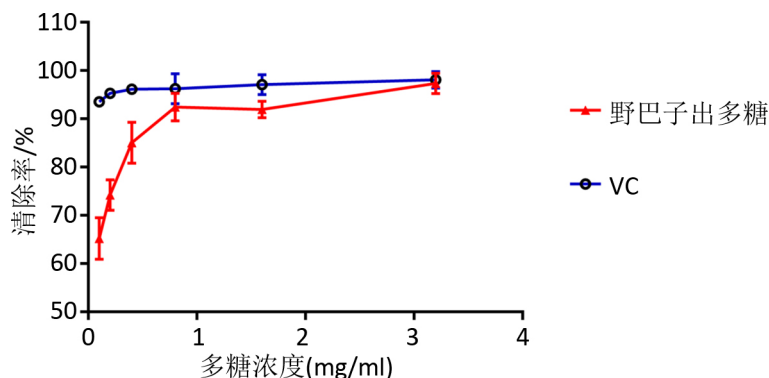


Figure 4. Scavenging effect of YBZc and Vc on DPPH·
图 4. YBZc 及 Vc 对 DPPH· 的清除作用

YBZc 对 DPPH· 清除作用存在一定的剂量关系; 当野巴子粗多糖溶液浓度为 0.1 mg/mL 时, 其对 DPPH· 的清除率为 65.22%; 当野巴子粗多糖溶液浓度达到 3.2 mg/mL 时, 其对 DPPH· 的清除率达 97.37%, 与 VC 清除率相当, 表明野巴子多糖具有良好的清除 DPPH· 的活性。而多糖具有毒副作用小、无抗药性等优点, 为后续研发为清除自由基替代药物提供一定的依据。

3.6. 野巴子体外降血糖的活性

测定不同浓度多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制率, 以阿卡波糖为阳性对照, 酶标仪进行检测[14]。如图 5:

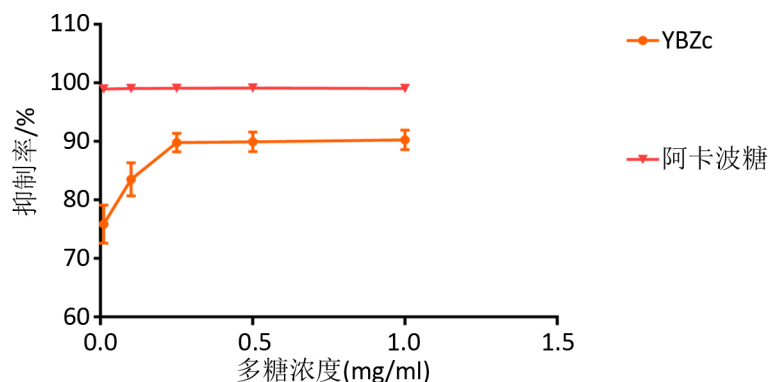


Figure 5. The inhibition rate of Alpha-glucosidase by the acarbose and YBZc
图 5. 野巴子多糖及阿卡波糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制率

不同浓度的野巴子粗多糖对 α -葡萄糖苷酶均有显著的抑制作用; 随着浓度的增加, 抑制作用显著升高, 在浓度达到 1 mg/mL 时, 多糖对 α -葡萄糖苷酶抑制效果最佳, 达到 90.28%。表明野巴子粗多糖有一定的降血糖作用, 且效果较好。

3.7. 野巴子多糖对 STS 介导的神经元损伤的保护作用

3.7.1. YBZc 对乳鼠海马神经元细胞增殖率的影响

与对照组相比, STS 模型组乳鼠海马神经元细胞的吸光值下降为 0.174 ($P < 0.001$), 表明损伤模型建立成功。不同浓度的 YBZc + STS 预处理组增殖率明显高于 STS 模型组 ($P < 0.001$), 且增殖率随 YBZc 浓度升高而升高; 不同浓度的 YBZc 与正常处理组比较无显著性差异(表 2)。说明 YBZc 能减弱 STS 介导的乳鼠海马神经元损伤。

Table 2. The cell viability of each group with the treatment of different YBZc (n = 6)
表 2. 不同浓度的 YBZc 对各组细胞存活率的影响(n = 6)

组别	A 值	细胞增殖率(%)
Control	0.265 ± 0.0082	100.00
STS 模型组	0.174 ± 0.0049 ^{***}	65.50
0.001 mg/mL YBZc + STS 预处理组	0.204 ± 0.0065 ^{##}	76.82
0.01 mg/mL YBZc + STS 预处理组	0.219 ± 0.0079 ^{###}	82.84
0.1 mg/mL YBZc + STS 预处理组	0.231 ± 0.0046 ^{###}	86.94
1 mg/mL YBZc + STS 预处理组	0.249 ± 0.0084 ^{###}	93.93
0.001 mg/L YBZc 处理组	0.246 ± 0.0202	92.58
0.01 mg/mL YBZc 处理组	0.232 ± 0.0233	87.30
0.1 mg/mL YBZc 处理组	0.265 ± 0.0190	99.85
1 mg/mL YBZc 处理组	0.229 ± 0.0167	86.20

(注: *与对照组比, #与 STS 模型组比较; ##或**P < 0.01, ###或***P < 0.001)。

3.7.2. YBZc 对 STS 介导的乳鼠海马神经元 LDH 释放率的影响

STS 模型组的细胞毒性损伤程度明显大于对照组(P < 0.001); 不同浓度的 YBZc + STS 预处理组的神经细胞毒性损伤程度明显低于 STS 模型组(P < 0.01)。结果表明, YBZc 能减弱 STS 介导的乳鼠海马神经元损伤(表 3)。

Table 3. Comparison of the degree of cell toxicity damage of each group analyzed by LDH release rate (n = 6)
表 3. 各组 LDH 释放率及细胞毒性损伤程度比较(n = 6)

组别	A 值	细胞毒性损伤程度(%)
Control	0.019 ± 0.0013	100.00
STS 模型组	0.044 ± 0.0015 ^{***}	235.77
0.001 mg/mL YBZc + STS 预处理组	0.032 ± 0.0008 ^{###}	172.25
0.01 mg/mL YBZc + STS 预处理组	0.034 ± 0.0008 ^{###}	183.33
0.1 mg/mL YBZc + STS 预处理组	0.034 ± 0.0013 ^{###}	181.08
1 mg/mL YBZc + STS 预处理组	0.032 ± 0.0022 ^{###}	170.54
0.001 mg/L YBZc 处理组	0.022 ± 0.0005	118.74
0.01 mg/mL YBZc 处理组	0.022 ± 0.0006	119.01
0.1 mg/mL YBZc 处理组	0.022 ± 0.0005	119.28
1 mg/mL YBZc 处理组	0.026 ± 0.0004	140.23

(注: *与对照组比, #与 STS 模型组比较; ##或**P < 0.01, ###或***P < 0.001)。

4. 结论

采用超声波辅助水提醇沉法从野巴子叶中提取野巴子粗多糖(YBZc), 野巴子多糖的提取率为 5.63%, 糖醛酸含量为 32.2%, 蛋白质含量为 2.98%。气相色谱分析结果表明 YBZc 的单糖组成为 Rha、Ara、Man、Glc、Gal, 相对摩尔比为 1.000:0.793:0.440:0.557:0.994。YBZc 的活性实验表明, 在浓度达到 3.2 mg/mL 时, YBZc 对·OH、DPPH 的清除率最大分别为 50.14%、97.37%, 且在一定的范围内存在量效关系; 在浓

度达到 1.0 mg/mL 时, YBZc 对 α -葡萄糖苷酶抑制效果最佳, 为 90.28%, 且在一定的范围内存在量效关系。表明 YBZc 具有一定的清除·OH 和 DPPH 的活性以及降血糖效果。YBZc 能减弱 STS 介导的乳鼠海马神经元损伤, 具有对海马神经细胞的保护作用。

野巴子有多种生物活性, 是新药物开发的优良材料。本实验研究显示, 野巴子多糖具有较好的清除自由基、降血糖效果及神经保护作用, 对于抗衰老、降血糖和神经保护的药物研发提供了依据, 有利于对其属植物资源更好的开发与利用。本实验对野巴子多糖进行初步研究, 对野巴子多糖的研究还有很多后续工作, 包括野巴子多糖的分离纯化、一级结构及动物体内清除自由基活性的测定、神经保护作用机制的探究等, 本实验室还会继续开展这些方面的研究工作。

基金项目

中央民族大学一流大学一流学科建设项目(YLDX01013); 中央民族大学硕士研究生自主科研项目资助(182113)。

参考文献

- [1] 朱兆云, 韦群辉. 云南民族药志[M]. 昆明: 云南民族出版社, 2010.
- [2] 毛绍春, 李竹英, 李聪. 野香苏籽油的提取方法及性质分析[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(12): 8-10.
- [3] 江苏新医学院. 中药大词典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986.
- [4] 郭志琴, 吕海宁, 陈巧莲, 等. 野坝子体外清除自由基活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(11): 180-183.
- [5] 周杨晶, 罗伦才. 彝药野坝子的 α -葡萄糖苷酶抑制作用研究[J]. 中医药信息, 2014, 31(4): 7-9.
- [6] 蒋桂华, 杨莎, 兰志琼, 等. 野巴子不同提取液体外抗菌实验研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(1): 172-173.
- [7] 张玉婷, 文美琼. 野坝子多糖含量的测定[J]. 楚雄师范学院学报, 2017, 32(6): 153-156.
- [8] Duan, M., Shang, H., Chen, S., *et al.* (2018) Physicochemical Properties and Activities of Comfrey Polysaccharides Extracted by Different Techniques. *International Journal of Biological Macromolecules*, **115**, 876-882. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.188>
- [9] 张莉. 爬山虎吸盘多糖的分离纯化、结构表征与粘附性能研究[D]: [博士学位论文]. 广州: 华南理工大学, 2014.
- [10] 赵鹤鹏, 许秋达, 周鸿立. 玉米须多糖中糖醛酸含量的测定及抗氧化作用的研究[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2017, 38(4): 81-85.
- [11] 何永超, 刘雅敏, 朱艳慧, 等. 苯酚-硫酸显色法测定炙甘草汤的总多糖含量研究[J]. 中医学报, 2013, 28(4): 547-549.
- [12] 黄雅婷, 邹芳, 孙秋, 等. 粘柄丝膜菌多糖的提取工艺及抗氧化活性[J]. 食用菌学报, 2018, 25(2): 72-78.
- [13] Bo, J., Liu, Z.C., Wang, Y., *et al.* (2010) Extraction of Water-Soluble Polysaccharide and the Antioxidant Activity from *Ginkgo biloba* Leaves. *Medicinal Chemistry Research*, **19**, 262-270. <https://doi.org/10.1007/s00044-009-9189-5>
- [14] 王坤, 陈波, 桂略宁, 等. 超声辅助提取省沽油多糖工艺的优化及生物活性比较[J]. 食品科技, 2018, 43(10): 239-246.
- [15] 曹畅, 刘婷婷, 蔡哲平, 等. ERK1/2 介导姜黄素抑制 STS 诱导神经毒性损伤的作用[J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35(4): 1-4.
- [16] 徐晓霞, 李炎, 刘华, 等. 高效凝胶色谱法测定多花黄精多糖分子量与分子量分布[J]. 四川生理科学杂志, 2008, 30(3): 102-103.

知网检索的两种方式：

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2160-441X，即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入，输入文章标题，即可查询

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：pi@hanspub.org