



王梦园,向蜚宇,刘婕,等.四逆汤多糖的抗氧化活性及其提取工艺优化研究[J].中兽医学杂志,2025,60(2):28-41.
WANG M Y,XIANG F Y,LIU J,et al.Study on antioxidant activity and extraction process optimization of polysaccharides from Sini Decoction[J].Traditional Chinese veterinary medicine,2025,60(2):28-41.

四逆汤多糖的抗氧化活性 及其提取工艺优化研究

王梦园¹,向蜚宇^{1#},刘婕²,刘言¹,左昕宝¹,侯冉冉^{1*}

(1.青岛农业大学 化学与药学院/农用生物药物创制技术国家地方联合工程实验室,山东 青岛 266109;2.山东省畜产品质量安全中心,山东 济南 250000)

摘要:【目的】旨在探究四逆汤多糖的体外抗氧化活性,并优化其水提醇沉工艺参数,为四逆汤多糖在畜禽健康养殖及绿色饲料添加剂研发等领域的开发利用提供参考。【方法】采用体外抗氧化活性评价体系,通过DPPH自由基、羟自由基、ABTS⁺·自由基清除能力评估四逆汤多糖的体外抗氧化能力,并采用单因素试验考察提取时间、液料比、提取温度对四逆汤多糖提取率的影响,利用Box-Behnken设计结合响应面法,优化获得四逆汤多糖的最佳提取条件。【结果】四逆汤多糖对DPPH自由基、羟自由基、ABTS⁺·自由基均表现出显著的清除效果,表明其具有良好的体外抗氧化能力。四逆汤多糖的最佳提取工艺参数:提取时间75 min、液料比20 mL/g、提取温度86 °C,在此条件下的多糖提取率为3.22%,与模型预测值3.232%无明显差异。【结论】采用单因素结合响应面分析优化的四逆汤多糖提取工艺简便可行,同时证实四逆汤多糖具有优异的体外抗氧化活性,为其作为天然抗氧化剂在畜牧与兽医领域的深入研究及产品开发奠定了重要基础。

关键词:四逆汤;多糖;抗氧化活性;提取工艺;响应面法

中图分类号:S853.7 文献标志码:A 文章编号:1003-8655(2025)02-028-14

Study on antioxidant activity and extraction process optimization of polysaccharides from Sini Decoction

WANG Mengyuan¹,XIANG Feiyu^{1#},LIU Jie²,LIU Yan¹,
ZUO Xinbao¹,HOU Ranran^{1*}

(1.National Joint Local Engineering Laboratory of Agricultural Bio-Pharmaceutical Laboratory, College of Chemistry and Pharmaceutical Sciences, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266000, China;
2.Shandong Provincial Center for Quality and Safety of Animal Products, Jinan 250000, China)

Abstract: [Objective] This study aims to investigate the *in vitro* antioxidant activity of polysaccharides from Sini Decoction and optimize the parameters of its water extraction and alcohol precipitation process,

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(31802229)和山东省重点研发计划项目(2021CXGC011305)

Project supported by the National Natural Science Foundation of China(31802229) and the Key R & D Program of Shandong Province(2021CXGC011305)

作者简介:王梦园, orcid.org/0009-0002-2758-1303, 15650186036@163.com; #共同第一作者; *通信作者:侯冉冉, 副教授, 博士, 主要从事天然产物活性/兽药研发, orcid.org/0000-0002-8491-340X, rhou@qau.edu.cn。

©《中兽医学杂志》编辑部, 开放获取CC BY-NC-ND协议

thereby providing a reference for the development and application of Sini Decoction polysaccharides in fields such as healthy livestock and poultry breeding and research and development of green feed additives. [Method] An *in vitro* antioxidant activity evaluation system was adopted. The *in vitro* antioxidant capacity of Sini Decoction polysaccharides was assessed by determining their scavenging abilities against DPPH free radicals, hydroxyl free radicals, and ABTS⁺ free radicals. Single-factor experiments were conducted to examine the effects of extraction time, liquid-material ratio, and extraction temperature on the extraction rate of the polysaccharides. The Box-Behnken design and response surface methodology were employed to optimize the extraction conditions. [Result] Sini Decoction polysaccharides exhibited significant scavenging effects on DPPH free radicals, hydroxyl free radicals, and ABTS⁺ free radicals, confirming their good *in vitro* antioxidant capacity. Additionally, the optimal extraction conditions for Sini Decoction polysaccharides were as follows: extraction time of 75 min, liquid-material ratio of 20 mL/g, and extraction temperature of 86 °C. Under these conditions, the polysaccharide extraction rate reached 3.22%, which showed no significant difference from the model-predicted value of 3.232%. [Conclusion] The extraction process of Sini Decoction polysaccharides optimized by combining single-factor experiments with response surface methodology is simple and feasible. Meanwhile, it is confirmed that Sini Decoction polysaccharides possess excellent *in vitro* antioxidant activity, which lays an important foundation for their in-depth research and product development as a natural antioxidant in the fields of animal husbandry and veterinary medicine.

Keywords: Sini Decoction; polysaccharides; antioxidant activity; extraction process; response surface methodology

【研究意义】近年来,随着消费者对动物源性食品安全的日益关注,以及在畜牧业可持续发展背景下饲料端“禁抗”、养殖端“减抗”政策的实施,中草药添加剂的广泛运用已成为必然趋势^[1]。中草药添加剂具有无耐药性、低残留、毒副作用小和绿色环保等多种优点,兼具防病与营养的双重作用,适用于畜禽疾病防治^[2]。大量研究证实,中药多糖类饲料添加剂在畜牧和水产养殖中成效显著:黄芪多糖可提升畜禽的免疫功能与生产性能^[3],并改善黄颡鱼的生长指标、抗氧化能力及肠道组织形态^[4];甘草多糖能优化仔猪生长性能与免疫功能^[5];中草药多糖及植物多糖类添加剂均能有效调节动物生长节律、缓解氧化应激损伤,以及提高饲料报酬^[6]。因此,中药多糖在畜牧养殖领域的开发应用具有广阔前景。【前人研究进展】中药复方是在传统中医理论指导下,由两味或两味以上中药遵循“君臣佐使”的配伍原则组合而成的方剂。中药复方多糖作为其发挥药效的重要物质之一,其提取工艺和生物活性逐渐成为研究热点。周帅飞等^[7]对四君子汤复方多糖的超声提取及脱蛋白工艺进行了优化;杨书彬等^[8]应用响应面法优化了左归饮中总多糖成分的提取工艺;熊永昌等^[9]优化了开心散多糖热水浸提法的提取工艺,并发现开心散多糖具有显著的体外抗氧化作用及良好的体外消炎作用;孙亚丽等^[10]通过星点设计-响应曲面法确定了白虎汤多糖的最佳提取工艺,并发现其具有良好的降血糖作用。这些研究都为中药复方多糖作为中草药添加剂的开发利用提供了丰富的理论依据。四逆汤(Sini Decoction, SND)是中医经典方剂,始载于东汉张仲景的《伤寒论》,由附子、干姜、甘草三味药材按3:2:3组成,其组方精妙,配伍严谨,具有温中祛寒、回阳救逆的功效^[11-12]。现代研究表明,四逆汤主要含有生物碱类、姜辣素类、二苯庚烷、三萜皂苷和黄酮类等化学成分^[13],具有改善心功能、抗休克、抗氧化应激、抗心肌纤维化、抗动脉粥样硬化、抗肿瘤、免疫调节及肾保护等多种生理作用^[14-15]。在兽医临床实践中,四逆汤治疗患畜四肢厥逆疗效显著^[6],对猪低温症亦表现出良好效果^[17]。目前,关于四逆汤方中单味药材多糖的研究已取得了一定进展:附子多糖采用超声辅助热水浸提法提取效果最佳,提取率高达45.91%^[18];张晓琳^[19]研究发现附子多糖具有较强的还原能力和抗氧化能力;谢衣恒等^[20]研究发现附子多糖具有增强免疫活性的功能,并采用超高压提取法提取生姜多糖的提取率较高,达(18.06±0.05)%^[21];孟宪伟等^[22]研究发现,随着生姜多糖浓度的增加,其对羟自由基活性清除能力和还原力均增强,表明生姜多糖具有较好的抗氧化作用。柴美灵等^[23]优化了超声辅助

水浴法提取甘草多糖的工艺,并发现甘草多糖对 DPPH 自由基和 ABTS⁺·自由基均有清除作用,且清除能力与多糖浓度存在一定的量效关系。这些针对单味药多糖的研究成果,为四逆汤多糖的提取工艺优化及生物活性研究提供了科学参考。

【本研究切入点】目前,国内外学者关于四逆汤多糖活性及提取工艺的研究报道甚少。相关试验已成功提取出四逆汤多糖组分,并证实其具有出色的体外抗氧化活性。这表明,四逆汤多糖具备作为新型天然抗氧化剂的潜力,有望开发为畜禽饲料用中草药添加剂。近年来,随着中药价格持续攀升以及人畜争药现象的出现,如何高值化研发中兽药产品已成为开发者关注的焦点。【拟解决的关键问题】本研究以四逆汤多糖为试验对象,采用单因素试验结合响应面法(response surface methodology, RSM)中的 Box-Behnken Design(BBD),以多糖提取率为评价指标,系统优化其水提工艺参数,为四逆汤多糖的深入研究及其在畜牧产业和兽医领域的合理开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 药材与试剂

附子(产地四川)、干姜(产地云南)、甘草(产地甘肃),均采购于北京同仁堂药房。

无水乙醇(货号:250728,天津市富宇精细化工有限公司)、浓硫酸(货号:20240906,上海沪试实验室器材股份有限公司)、D(+)-无水葡萄糖(货号:SG8510,上海索宝生物科技有限公司)、苯酚(货号:20240530,上海沪试实验室器材股份有限公司)、30%过氧化氢(货号:202411061,莱阳市康德化工有限公司)、水杨酸(货号:C11593852,上海麦克林生化科技股份有限公司)、硫酸亚铁(货号:20250206,天津市巴斯夫化工有限公司)、过硫酸钾(货号:20240915,天津市广成化学试剂有限公司)、L-抗坏血酸(货号:C11608262,上海麦克林生化科技股份有限公司)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)(货号:JZ5ZI-PQ,上海索宝生物科技有限公司)、2,2'-联氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS)(货号:C12824509,上海麦克林生化科技股份有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 抗氧化试验所用四逆汤多糖的提取

取药材附子、干姜、甘草,用95%的乙醇浸泡过夜,去除色素和脂溶性物质^[24-25],自然晾干,经中草药粉碎机粉碎,过70目筛备用。将预处理后的附子、干姜、甘草按3:2:3的比例,称取8 g/份,以液料比20 mL/g,提取温度90℃热水浸提75 min,离心(4 000 r/min, 10 min)去除杂质,收集上清液。向上清液中加入4倍体积的无水乙醇,静置过夜进行醇沉;醇沉后离心(4 000 r/min, 10 min),收集沉淀,冷冻干燥,即得到四逆汤多糖。

1.2.2 DPPH 自由基清除能力测定

参照黄玉华等^[26]的方法并加以修改。首先精密称取2 mg DPPH,用50 mL的无水乙醇溶解,配制成0.1 mmol/L的DPPH工作液,放置在4℃的冰箱中保存备用。配制质量浓度分别为0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 mg/mL的四逆汤多糖样品溶液各10 mL,每个质量浓度的样品分别取100 μL后加入100 μL DPPH,混合均匀,室温避光反应30 min。于517 nm处检测吸光度值,重复3次。以L-抗坏血酸(维生素C)作为阳性对照,每个质量浓度梯度平行操作3次。按式(1)计算DPPH自由基清除率:

$$SD_1 = [1 - (A_{12} - A_{13}) / (A_{11} - A_{10})] \times 100\% \quad (1)$$

式(1)中:SD₁为DPPH自由基清除率,%;A₁₂为样品组吸光度值(100 μL样品溶液+100 μL DPPH溶液);A₁₃为样品空白组吸光度值(100 μL样品溶液+100 μL无水乙醇);A₁₁为对照组吸光度值(100 μL无水乙醇+100 μL DPPH溶液);A₁₀为对照组吸光度值(200 μL无水乙醇)。

1.2.3 羟自由基清除能力测定

参照相关方法^[27-29]并加以修改。将FeSO₄溶液(9 mmol/L, 1 mL)、水杨酸-乙醇溶液(9 mmol/L, 1 mL)和H₂O₂溶液(9 mmol/L, 0.05 mL)在反应管中混匀,在室温下反应1 h。取不同质量浓度(0.2, 0.4,

0.8, 1.2, 1.6 mg/mL)的四逆汤多糖样品溶液与混合试剂按照1:2的比例混合, 37 °C反应30 min后, 在波长510 nm下测定吸光度, 重复3次。以L-抗坏血酸(维生素C)溶液为阳性对照, 每个质量浓度梯度平行操作3次。按式(2)计算羟自由基清除率:

$$SD_2 = [1 - (A_{22} - A_{23}) / (A_{21} - A_{20})] \times 100\% \quad (2)$$

式(2)中: SD_2 为羟自由基清除率, %; A_{22} 为样品组吸光度值(70 μ L样品溶液+140 μ L试剂溶液); A_{23} 为样品空白组吸光度值(70 μ L样品溶液+70 μ L无水乙醇+70 μ L蒸馏水); A_{21} 为对照组吸光度值(70 μ L蒸馏水+140 μ L试剂溶液); A_{20} 为对照组吸光度值(70 μ L无水乙醇+70 μ L蒸馏水)。

1.2.4 ABTS⁺·自由基清除能力测定

参照彭浪等^[30]的方法并加以修改。将7 mmol/L ABTS溶液与2.45 mmol/L过硫酸钾溶液吹打混匀, 在室温下避光反应16 h。将反应后的ABTS溶液用蒸馏水稀释, 直至其在734 nm吸光度为0.70±0.02, 即得ABTS工作液。分别配制质量浓度为2, 4, 6, 8, 10 mg/mL四逆汤多糖样品溶液各10 mL, 每个质量浓度取20 μ L后加入180 μ L ABTS工作液, 混合均匀, 室温避光反应30 min, 在734 nm处检测吸光度。重复3次。以L-抗坏血酸(维生素C)作为阳性对照, 每个质量浓度梯度平行操作3次。按式(3)计算ABTS⁺·自由基清除率:

$$SD_3 = [1 - (A_{32} - A_{33}) / (A_{31} - A_{30})] \times 100\% \quad (3)$$

式(3)中: SD_3 为ABTS⁺·自由基清除率, %; A_{32} 为样品组吸光度值(180 μ L ABTS工作液+20 μ L样品溶液); A_{33} 为样品空白吸光度值(180 μ L蒸馏水+20 μ L样品溶液); A_{31} 为对照组吸光度值(180 μ L ABTS工作液+20 μ L蒸馏水); A_{30} 为空白对照组吸光度值(200 μ L蒸馏水)。

1.2.5 多糖提取率测定

(1)葡萄糖标准曲线的绘制。四逆汤多糖提取率的测定采用硫酸-苯酚法^[31]。于10 mL容量瓶中加入10 mg葡萄糖标准品, 用蒸馏水溶解并定容至刻度, 配制成终质量浓度为1 mg/mL的标准溶液。分别吸取上述溶液0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 mL置于5支1.5 mL的离心管中, 再依次加入蒸馏水补至终体积为1.0 mL, 摇匀。分别取上述不同质量浓度的溶液0.2 mL, 置于另外5支1.5 mL的离心管中, 加入0.1 mL 5%苯酚溶液, 混匀后迅速垂直加入0.5 mL浓硫酸。摇匀后室温放置30 min, 于490 nm处检测吸光度。以葡萄糖质量浓度为 x 轴, 吸光度为 y 轴, 绘制标准曲线。

(2)四逆汤多糖提取率测定。

精密称取四逆汤多糖5 mg, 溶于5 mL蒸馏水中, 配制成1 mg/mL溶液。取上述溶液0.2 mL置于1.5 mL的离心管中, 加入0.1 mL 5%苯酚溶液, 混匀后迅速垂直加入0.5 mL浓硫酸, 摇匀后室温放置30 min, 于490 nm处检测吸光度。根据标准曲线计算四逆汤多糖质量浓度及提取率。

$$Y = \frac{C \times V \times m}{A \times M}$$

式(4)中: Y 为四逆汤多糖提取率; C 为上述方法测定的四逆汤多糖质量浓度; V 为待测体积(5 mL); m 为总样品提取的四逆汤多糖质量; A 为测定所用四逆汤多糖质量(5 mg); M 为四逆汤总样品质量(8 g)。

1.2.6 单因素试验

影响四逆汤多糖提取率的主要因素有提取时间、液料比和提取温度等, 按照1.2.1工艺流程和1.2.5多糖含量测定方法, 考察不同提取时间(30, 45, 60, 75, 90 min)、液料比(10, 15, 20, 25, 30 mL/g)及提取温度(60, 70, 80, 90, 100 °C)对四逆汤多糖提取率的影响。

1.2.7 响应面试验设计

依据相关方法^[32-33], 在单因素试验结果的基础上, 选取提取时间(A)、液料比(B)以及提取温度(C)3个影响因素作为自变量, 以四逆汤多糖提取率(Y)为响应值, 采用Box-Behnken Design (BBD)中心组合设计(central composite design, CCD)原理, 应用Design-Expert 13.0.1.0软件, 设计三因素三水平的响应面试验, 分析、建立数学回归模型, 根据考察因子的分析结果及响应面等高线图及三维模型, 优化确定从四逆汤中提取多糖的最佳条件。响应面试验因素及水平设计见表1。

表 1 响应面试验因素与水平
Tab.1 Factors and levels in the response surface experiment

水平 Level	因素 Factor		
	A 提取时间/min Extraction time	B 液料比/(mL·g ⁻¹) Liquid-material ratio	C 提取温度/°C Extraction temperature
-1	60	15	80
0	75	20	90
1	90	25	100

2 结果与分析

2.1 四逆汤多糖抗氧化活性的测定

2.1.1 四逆汤多糖对 DPPH 自由基的清除效果

DPPH作为一种稳定的自由基,能在有机溶剂中稳定存在,其醇溶液呈紫色,且需低温避光储藏,具有单一电子,故能接受一个电子或氢原子,在波长为 517 nm 时具有最大吸收^[34]。由图 1 可知,在试验质量浓度范围内,随着四逆汤多糖质量浓度的升高,其对 DPPH 自由基的清除能力逐渐增大,呈现出一定的量效关系。0.2 mg/mL 的抗坏血酸对 DPPH 自由基的清除率可达 (97.86±0.27)%,四逆汤多糖在 1.6 mg/mL 时对 DPPH 自由基清除率高达 (73.05±2.99)% 以上,表明四逆汤多糖对 DPPH 自由基的清除具有质量浓度依赖性。

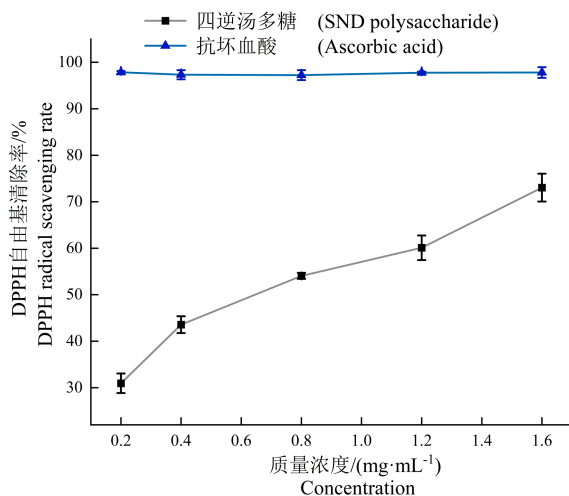


图 1 四逆汤多糖对 DPPH 自由基的清除效果

Fig.1 Scavenging effect of SND polysaccharides on DPPH free radicals

2.1.2 四逆汤多糖对羟自由基的清除效果

羟自由基是人体中最为主要的自由基之一,因其反应活性大,反应体系较为稳定^[35]。水杨酸可以捕获羟自由基,生成 2,3-二羟基苯甲酸和 2,5-二羟基苯甲酸,二者在波长 510 nm 处有最大吸收^[36]。羟自由基的清除率常被用作评价药物抗氧化能力的指标之一。由图 2 可知,在四逆汤多糖质量浓度介于 0.2~1.6 mg/mL 时,其阳性对照的羟自由基清除率呈逐渐上升趋势,在 0.4 mg/mL 时逐渐稳定,清除率达到 (96.74±0.10)%。四逆汤多糖羟自由基的清除率也随着质量浓度升高而逐渐增强,表现出一定的量效关系。多糖在 1.6 mg/mL 时,对羟自由基的清除率达到 (48.98±1.46)%,但清除能力远低于阳性对照组。试验结果表明,四逆汤多糖有较为良好的羟自由基清除效能。

2.1.3 四逆汤多糖对 ABTS· 自由基的清除效果

ABTS 法是测定自由基清除能力应用最广泛的间接检测法之一,可用于多糖的抗氧化能力的测定。ABTS 在氧化剂作用下被氧化为蓝绿色的 ABTS· 自由基,在 734 nm 处具有特征吸收峰;当体系中存在自由基清除剂时,ABTS· 被还原,导致反应体系褪色,其吸光度下降^[37]。由图 3 可知,在四逆汤多糖质量浓

度介于 2~10 mg/mL 时,其对 ABTS⁺· 自由基的清除率与质量浓度呈现出良好的线性关系;当多糖的质量浓度达到 10 mg/mL 时,其清除率可达 (97.40±0.93)%,表现出极好的 ABTS⁺· 自由基清除能力,与阳性对照组无显著差异,表明四逆汤多糖具有良好的抗氧化活性。

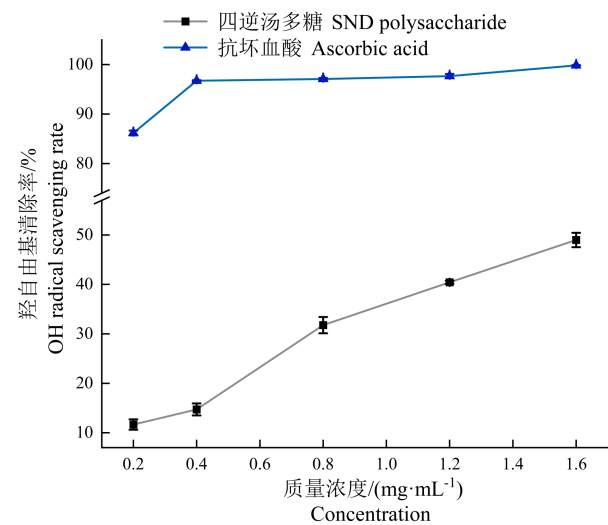


图 2 四逆汤多糖对羟自由基的清除效果
Fig.2 Scavenging effect of SND polysaccharides on hydroxyl free radicals

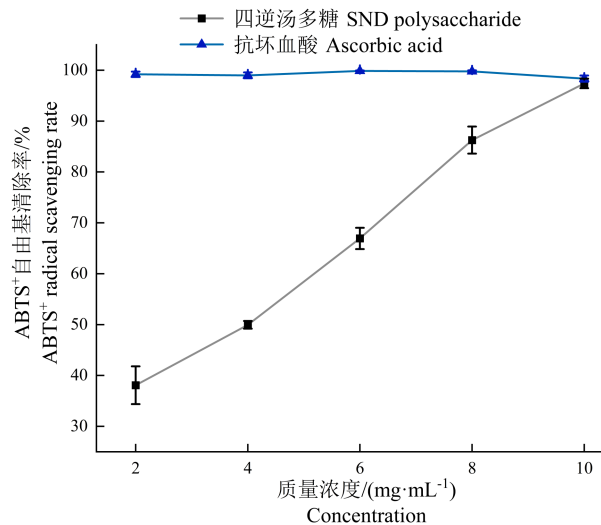


图 3 四逆汤多糖对 ABTS⁺· 自由基的清除效果
Fig.3 Scavenging effect of SND polysaccharides on ABTS⁺· free radicals

2.2 绘制标准曲线

根据试验结果进行线性回归分析(图 4),得到葡萄糖标准曲线方程 $y=0.0048x-0.0051$, $R^2=0.999$, 在葡萄糖质量浓度介于 0~80 $\mu\text{g/mL}$ 时,其吸光度与质量浓度呈现良好的线性关系,可用于计算四逆汤多糖的质量浓度。

2.3 单因素试验

2.3.1 提取时间对四逆汤多糖提取率的影响

固定液料比为 20 mL/g,提取温度为 90 $^{\circ}\text{C}$,研究不同提取时间(30, 45, 60, 75, 90 min)对四逆汤多糖提取率的影响。由图 5 可知,随着提取时间延长,四逆汤多糖的提取率逐渐增大;当提取时间为 75 min 时,四逆汤多糖的提取率达到最大值(3.25±0.02)%。之后,随着提取时间的增加,四逆汤的提取率反而下降。分析其原因可能是,当多糖提取率达到最大时,细胞膜内外多糖质量浓度达到平衡,多糖含量无明显增加;当提取时间增加时,一方面药材中溶解出的杂质成分增多,挤占了有限的溶剂

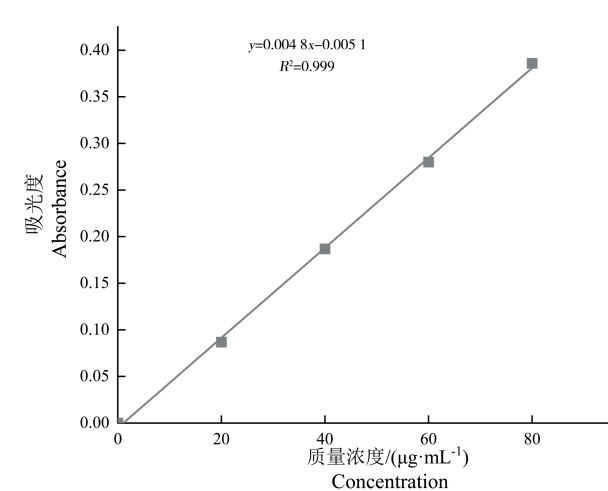


图 4 葡萄糖溶液标准曲线
Fig.4 Standard curve of glucose solution

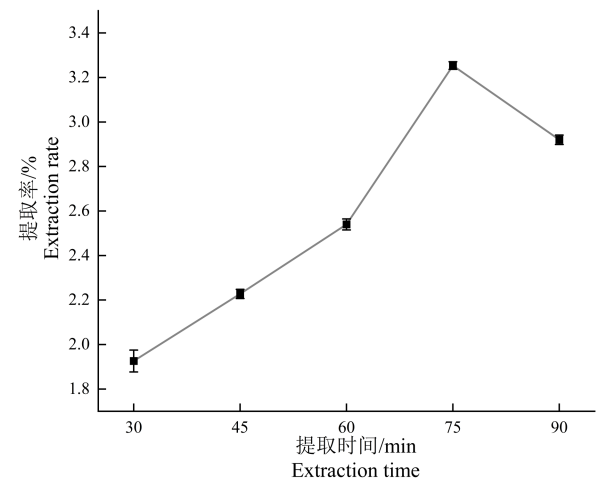


图 5 提取时间对四逆汤多糖提取率的影响
Fig.5 The effect of extraction time on the extraction rate of SND polysaccharides

空间,从而抑制多糖的进一步浸出;另一方面,多糖分子结构可能因煎煮时间过长而发生降解或改变,从而降低多糖的提取率。因此,确定最佳提取时间为 75 min,选择 60 min、75 min 和 90 min 这 3 个水平进行响应面试验。

2.3.2 液料比对四逆汤多糖提取率的影响

固定提取时间为 75 min,提取温度为 90 ℃,研究不同液料比(10, 15, 20, 25, 30 mL/g)对四逆汤多糖提取率的影响。由图 6 可知,随着液料比的提高,四逆汤多糖的提取率随之增大,可能是细胞内外的多糖质量浓度梯度增大,多糖被充分地溶解出来。当液料比为 20 mL/g 时,多糖提取率达到最大值(3.23 ± 0.03)%。然而,当液料比超过某一限度时,固体药材和溶剂间吸附作用减小,若要达到同等的植物细胞壁破碎效果,则需要吸收更多的外界能量,才能释放细胞内多糖。因此,在本试验中,液料比过大时,多糖提取率呈现下降趋势。综上,确定最佳液料比为 20 mL/g,选择液料比 15, 20, 25 mL/g 这 3 个水平进行响应面试验。

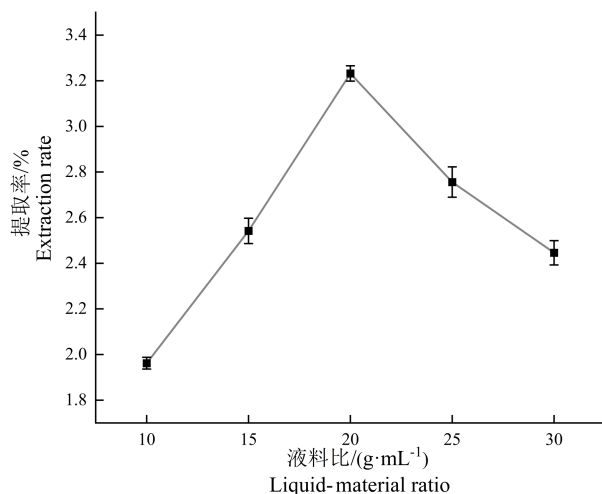


图 6 液料比对四逆汤多糖提取率的影响

Fig.6 The effect of liquid-material ratio on the extraction rate of SND polysaccharides

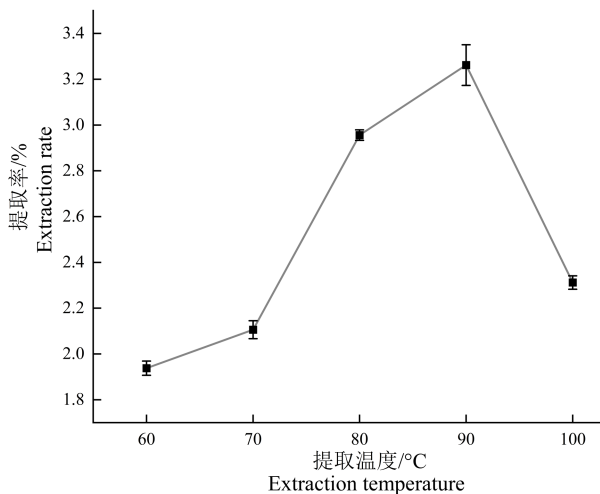


图 7 提取温度对四逆汤多糖提取率的影响

Fig.7 The effect of extraction temperature on the extraction rate of SND polysaccharides

2.3.3 提取温度对四逆汤多糖提取率的影响

固定液料比为 20 mL/g,提取时间为 75 min,研究不同提取温度(60, 70, 80, 90, 100 ℃)对四逆汤多糖提取率的影响。由图 7 可知,提取温度介于 60~100 ℃时,随着温度的提高,四逆汤多糖的提取率先增加后下降。当提取温度为 90 ℃时,四逆汤多糖的提取率达到最高,为(3.26 ± 0.09)%;继续升高温度,四逆汤提取率反而下降,可能是煎煮温度的升高导致多糖结构被破坏,使其转化为寡糖或单糖,从而提取率降低。因此,确定最佳提取温度为 90 ℃,选择 80 ℃、90 ℃和 100 ℃这 3 个水平进行响应面试验。

2.4 响应面法优化四逆汤多糖提取工艺

2.4.1 响应面试验设计及试验结果

根据单因素试验结果,将提取时间(A)、液料比(B)、提取温度(C)作为自变量,四逆汤多糖提取率(Y)为响应值,进行三因素三水平的响应面试验设计,结果见表 2。

2.4.2 建模与显著性分析

通过 Design-Expert 13.0.1.0 软件对表 2 中试验数据进行响应面多元回归拟合分析,得到回归方程: $Y=3.20-0.016\ 3A-0.115B+0.273\ 8C-0.417\ 5AB-0.16AC+0.377\ 5BC-0.865A^2-0.457\ 5B^2-0.6C^2$ 。进一步验证回归模型与因素的显著性,回归方程的方差分析和拟合结果见表 3。

由表 3 可知,该试验模型的 F 值为 57.18, $P<0.000\ 1$,表明本试验模型的差异性极显著。失拟项 $P=0.211\ 1>0.05$,说明失拟不显著,该模型的可信度较高。决定系数 $R^2=0.986\ 6$,校正决定系数 $R^2_{Adj}=0.969\ 3$,两数值相接近,证明试验误差较小,该回归模型的拟合效果可靠,可用于分析和预测 3 个因素(提取时间、液料比、提取温度)组合下的四逆汤多糖提取率。此外,方差分析中结果显示,一次项 C、二次项 A^2 、 B^2 、 C^2

和交互项 AB 、 BC 都对四逆汤多糖提取率 Y 值的影响极显著 ($P<0.01$), 一次项 B 和交互项 AC 对 Y 值的影响显著 ($P<0.05$), 而一次项 A 对 Y 值影响不显著 ($P>0.05$)。再根据 F 值可知, 3 个因素对四逆汤多糖提取率的影响主次顺序为 C 、 B 和 A , 即提取温度、液料比和提取时间。

表 2 响应面试验设计与结果
Tab.2 Response surface experimental design and results

试验编号 Experiment number	A	B	C	Y/%
1	-1	0	-1	1.41
2	1	0	1	1.74
3	0	0	0	3.32
4	1	1	0	1.45
5	-1	0	1	2.20
6	0	0	0	3.18
7	-1	1	0	2.21
8	0	-1	1	2.26
9	-1	-1	0	1.47
10	1	-1	0	2.38
11	0	0	0	3.06
12	1	0	-1	1.59
13	0	0	0	3.27
14	0	1	1	2.65
15	0	-1	-1	2.39
16	0	0	0	3.17
17	0	1	-1	1.27

表 3 回归模型方差分析
Tab.3 Analysis of variance for regression model

来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
模型 Model	8.220 0	9	0.913 0	57.18	<0.000 1	**
A	0.002 1	1	0.002 1	0.13	0.726 8	
B	0.105 8	1	0.105 8	6.63	0.036 8	*
C	0.599 5	1	0.599 5	37.54	0.000 5	**
AB	0.697 2	1	0.697 2	43.66	0.000 3	**
AC	0.102 4	1	0.102 4	6.41	0.039 1	*
BC	0.570 0	1	0.570 0	35.70	0.000 6	**
A^2	3.150 0	1	3.150 0	197.30	<0.000 1	**
B^2	0.881 3	1	0.881 3	55.19	0.000 1	**
C^2	1.520 0	1	1.520 0	94.93	<0.000 1	**
残差 Residual	0.111 8	7	0.016 0			
失拟项 Lack of fit	0.071 6	3	0.023 9	2.37	0.211 1	
纯误差 Pure error	0.040 2	4	0.010 0			
总和 Cor total	8.330 0	16				

*表示差异在 5% 水平显著性, **表示差异在 1% 水平显著性。

* significance at 0.05 level, ** significance at 0.01 level。

2.4.3 各因素交互作用的结果分析

借助 Design-Expert 13.0.1.0 软件绘制三因素交互作用的响应面图和等高线图(图 8~图 10)。等高线的形状和疏密程度可以反映两因素交互效应的强弱,若形状越接近椭圆形且曲线分布越密集,则表示两因素交互作用越显著;相反,若形状接近圆形且曲线分布越分散,则表示交互作用不显著。此外,响应面的坡度也可以反映各因素对响应值的影响程度,若曲线越陡峭,说明各因素交互作用有显著影响,反之亦然^[38-39]。

由图 8 可知,响应面的曲线陡峭且等高线呈现较为明显的椭圆形,表明提取时间(A)和液料比(B)的交互作用对四逆汤多糖提取率的影响极为显著。其中,在液料比(B)方向上的响应面曲线较提取时间(A)坡度更陡峭,且液料比(B)的等高线分布密度更大,说明与提取时间相比,液料比对四逆汤多糖的提取率影响更为显著。

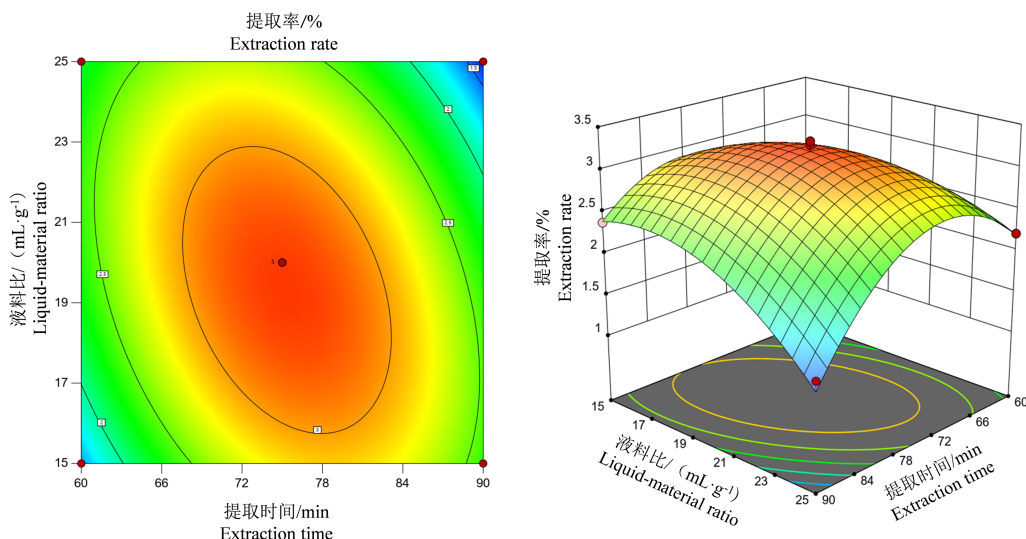


图 8 提取时间与液料比的等高线图与响应面分析

Fig.8 Contour plot and response surface plot for extraction time and liquid-material ratio

由图 9 可知,响应面曲线走势比较陡峭,等高线图为椭圆形但曲面弧度不大,说明提取时间(A)和提取温度(C)的交互作用对响应值的影响较为显著。其中,沿着提取温度(C)方向上的响应曲面变化趋势比提取时间(A)更大,表明在两因素的交互效应中,提取温度对四逆汤多糖提取率的影响更大。

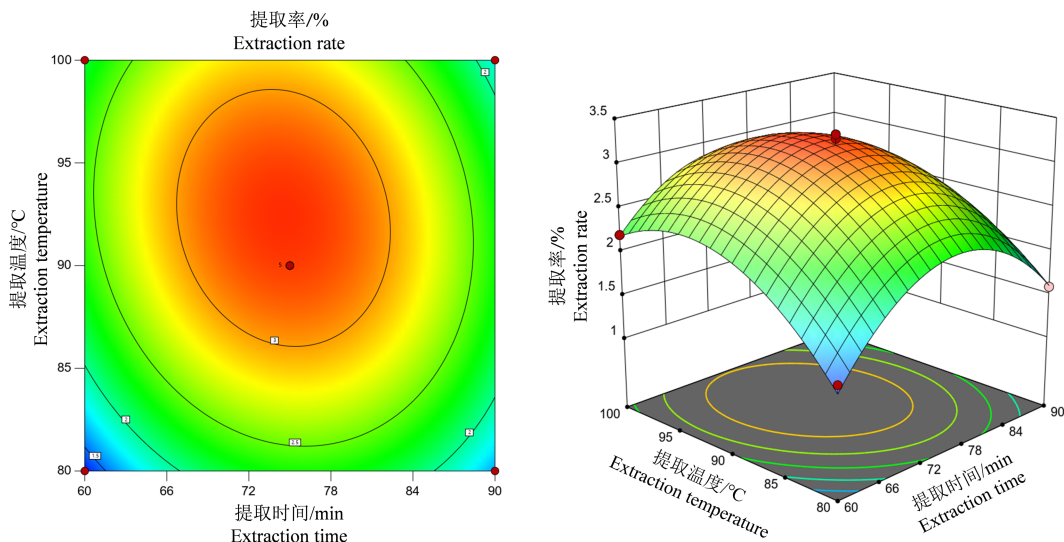


图 9 提取时间与提取温度的等高线图与响应面分析

Fig.9 Contour plot and response surface plot for extraction time and extraction temperature

由图 10 可知,响应面图像呈现为抛物线,等高线为椭圆状且有明显的曲面弧度,表明液料比(B)与提取温度(C)的交互作用对四逆汤多糖提取率有显著影响。其中,液料比(B)方向的响应曲线较提取温度(C)更为平缓,且提取温度(C)的等高线分布更密集,表明在这 2 个因素的交互作用中,提取温度较液料比对多糖提取率的影响更显著。

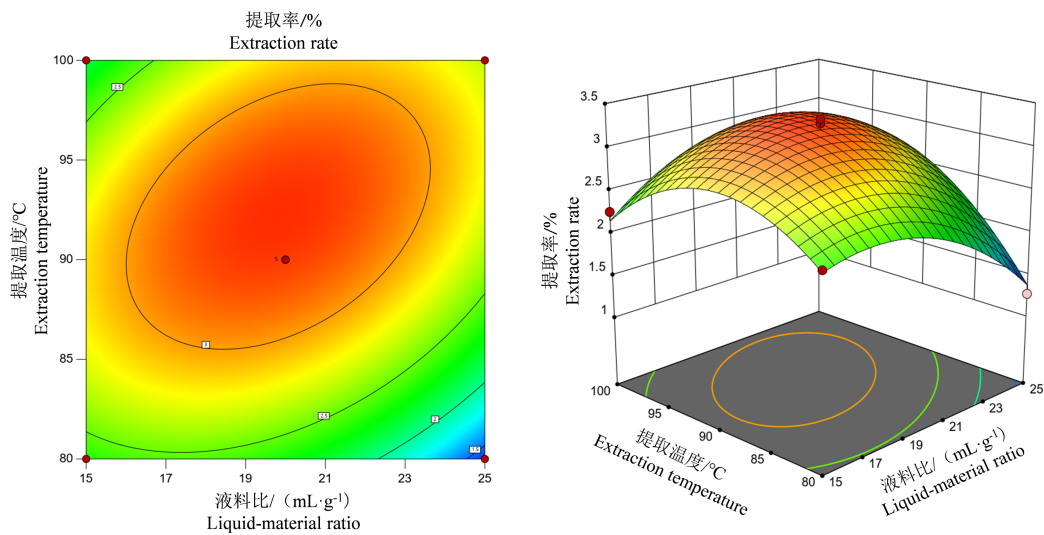


图 10 液料比与提取温度的等高线图与响应面分析

Fig.10 Contour plot and response surface plot for liquid-material ratio and extraction temperature

2.4.4 条件优化与验证试验结果

通过 Design-Expert 13.0.1.0 软件对拟合的回归模型进一步分析,确定四逆汤多糖的最优提取参数为提取时间 74.618 min、液料比 19.891 mL/g、提取温度 86.124 °C。结合试验条件及操作的可行性,将四逆汤多糖的提取工艺调整为提取时间 75 min、液料比 20 mL/g、提取温度 86 °C。在此条件下进行 3 次平行验证试验,得到四逆汤多糖提取率为 3.22%,与模型预测值 3.232% 基本相符,充分说明了该回归模型的准确性,采用响应面法优化四逆汤多糖的提取工艺具有良好的可行性。

3 讨 论

四逆汤源自《伤寒论》,是由附子、干姜及甘草三味药材组成的经典复方,具有“温中祛寒、回阳救逆”之功效。现代研究显示,该方剂含多种活性成分^[40],其中多糖类成分因其潜在的生物活性而备受关注。体外抗氧化试验表明,四逆汤多糖具有较强的自由基清除能力,提示其在兽医临床及动物保健领域具有潜在的应用价值,因此本研究进一步对其多糖提取工艺进行了系统优化。

在生物活性方面,多糖的抗氧化机制涉及自由基清除、氧化反应抑制以及抗氧化酶活性调节等多个方面^[41]。目前,关于四逆汤多糖抗氧化作用的研究较为有限。本究结果表明,在 1.6 mg/mL 质量浓度下,四逆汤多糖对 DPPH 自由基和羟自由基的清除率分别可达 73.05% 与 48.98%;在 10 mg/mL 质量浓度下,对 ABTS^{•+} 自由基的清除率高达 97.40%,充分说明其具有显著的体外抗氧化能力,为该复方多糖作为饲料添加剂或兽用抗氧化制剂的开发提供了试验依据。

多糖的提取工艺直接影响其提取率与生物活性。热水浸提法因操作简便、成本低且对多糖结构破坏较小,成为常用方法^[42]。为进一步提升四逆汤多糖的提取效率,在单因素试验基础上,采用响应面法中的 Box-Behnken 设计,系统优化水提醇沉工艺中的提取时间、液料比和提取温度等关键参数。最终确定最佳工艺条件为提取时间 75 min、液料比 20 mL/g、提取温度 86 °C,该条件下多糖提取率达 3.22%,为四逆汤多糖在兽用制剂中的标准化制备与产业化开发提供了数据基础。

尽管四逆汤多糖的工艺优化与体外活性评价取得了阶段性成果,但仍存在若干局限。例如,四逆汤多糖的构效关系尚未明确,其在动物体内的抗氧化效能、适宜给药方式及安全性仍有待进一步验证。未

来研究可聚焦于多糖的结构解析,利用实验动物模型和靶向畜禽开展体内药效评价及作用机制解析,以推动四逆汤多糖在兽药与动物功能性饲料中的科学应用。

4 结 论

四逆汤多糖具有较强的体外抗氧化能力,在一定浓度下对 DPPH 自由基、羟自由基、ABTS⁺· 自由基的清除率分别可达 73.05%、48.98%、97.40%,为其在兽医临床及饲料添加剂领域的开发提供了试验依据。同时,以热水浸提法为基础,通过单因素试验结合响应面法 Box-Behnken 设计,确定四逆汤多糖水提醇沉最佳工艺为提取时间 75 min、液料比 20 mL/g、提取温度 86 °C,在此条件下提取率达 3.22%,为其标准化制备与产业化开发提供了数据支撑。

参考文献 References:

- [1] 张泽铭. 兽医药品在畜牧业中的应用现状与发展趋势[J]. 北方牧业, 2025(8): 14.
ZHANG Z M. Current application status and development trend of veterinary drugs in animal husbandry[J]. Northern animal husbandry, 2025(8): 14.
- [2] 秦千禧, 程林丽, 赵军杰, 等. 中草药饲料添加剂对动物多种性能的影响[J]. 中国饲料, 2024(1): 71-76.
QIN Q X, CHENG L L, ZHAO J J, et al. Effects of Chinese herbal feed additives on several properties of animals[J]. China feed, 2024(1): 71-76.
- [3] 吴秋玉, 郑远鹏, 林志谦, 等. 黄芪多糖作为饲料添加剂及免疫增强剂在畜牧生产中的应用[J]. 中国饲料, 2018(2): 30-33.
WU Q Y, ZHENG Y P, LIN Z Q, et al. The application of *Astragalus* polysaccharides as feed additive and immune potentiator in animal production[J]. China feed, 2018(2): 30-33.
- [4] 熊航, 杨代勤, 易提林. 饲料中添加黄芪多糖对黄颡鱼生长、抗氧化及肠道组织形态的影响[J]. 淡水渔业, 2025, 55(5): 85-93.
XIONG H, YANG D Q, YI T L. Effects of dietary *Astragalus* polysaccharides on growth performance, antioxidant capacity, and intestinal morphology in *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. Freshwater fisheries, 2025, 55(5): 85-93.
- [5] 马振生. 饲料中添加甘草多糖对仔猪生长性能和免疫性能的影响[J]. 猪业科学, 2023, 40(12): 78-80.
MA Z S. Effects of dietary licorice polysaccharides on growth performance and immune performance of piglets[J]. Swine industry science, 2023, 40(12): 78-80.
- [6] 史莹华, 栗守仁, 程佳雯, 等. 植物多糖的功能及其在饲料中的应用[J]. 饲料工业, 2025, 46(15): 1-8.
SHI Y H, LI S R, CHENG J W, et al. Research progress on functions of plant polysaccharides and their applications in animal feed[J]. Feed industry, 2025, 46(15): 1-8.
- [7] 周帅飞, 刘玉红. 四君子汤复方多糖超声提取及脱蛋白工艺优化[J]. 山东中医杂志, 2015, 34(2): 134-136.
ZHOU S F, LIU Y H. Optimization of ultrasonic extraction parameters and deprotein process for polysaccharide from Sijunzi Decoction [J]. Shandong journal of traditional Chinese medicine, 2015, 34(2): 134-136.
- [8] 杨书彬, 孙佳宝, 陈光伟, 等. 响应面法优化左归饮总多糖提取工艺研究[J]. 黑龙江医药, 2019, 32(3): 514-517.
YANG S B, SUN J B, CHEN G W, et al. Optimization of extraction of polysaccharide in Zuoguiyin by response surface method[J]. Heilongjiang medicine journal, 2019, 32(3): 514-517.
- [9] 熊永昌, 刘校妃, 周立分, 等. 开心散多糖提取工艺优化及其体外抗氧化、抗炎活性评价[J]. 中国现代应用药学, 2025, 42(4): 549-557.
XIONG Y C, LIU X F, ZHOU L F, et al. Optimization of extraction process and evaluation of *in vitro* antioxidant and anti-inflammatory activities of Kai-Xin-San polysaccharides [J]. Chinese journal of modern applied pharmacy, 2025, 42(4): 549-557.
- [10] 孙亚丽, 吕邵娃, 吴佳霖, 等. 白虎汤中多糖的提取工艺优化及其降血糖活性研究[J]. 中南药学, 2018, 16(4):

- 495-499.
- SUN Y L, LYU S W, WU J L, et al. Optimization of polysaccharide extraction from Bai-hu decoction and its hypoglycemic activity[J]. Central south pharmacy, 2018, 16(4): 495-499.
- [11] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典二部[M]. 北京: 中国农业出版社, 2020.
- Chinese Pharmacopoeia Commission. Chinese veterinary pharmacopoeia (Volume II)[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2020.
- [12] 李颜, 王苏童, 曲一玮, 等. 经方四逆汤源流考证及应用探析[J]. 辽宁中医药大学学报, 2025, 27(9): 75-81.
- LI Y, WANG S T, QU Y W, et al. Research on origin and application of the classical prescription Sini Decoction[J]. Journal of Liaoning university of traditional Chinese medicine, 2025, 27(9): 75-81.
- [13] 李翔. 四逆汤化学成分和抗心肌缺血作用的研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2008.
- LI X. Study of chemical constituents and anti-myocardial ischemia effect of Sini Decoction[D]. Shanghai: Second Military Medical University, 2008.
- [14] 施钟政, 郭超峰. 经方四逆汤的临床应用概况[J]. 中华中医药学刊, 2025, 43(3): 79-84.
- SHI Z Z, GUO C F. General situation of clinical application research of Sini Decoction[J]. Chinese archives of traditional Chinese medicine, 2025, 43(3): 79-84.
- [15] 杨宏梅, 王燕燕. 四逆汤的药理作用及其机制研究进展[J]. 医药导报, 2014, 33(10): 1348-1352.
- YANG H M, WANG Y Y. Research progress on pharmacological effects and mechanisms of Sini Decoction[J]. Herald of medicine, 2014, 33(10): 1348-1352.
- [16] 李国军, 张登鹤, 马正文. 对《伤寒论》理中汤和四逆汤疗效的验证[J]. 中兽医学杂志, 2017(5): 44.
- LI G J, ZHANG D H, MA Z W. Verification of curative effects of Lizhong Decoction and Sini Decoction in "Treatise on Febrile Diseases"[J]. Chinese journal of traditional veterinary medicine, 2017(5): 44.
- [17] 刘长有. 四逆汤治疗猪低温症[J]. 中兽医学杂志, 2000(4): 24.
- LIU C Y. Treatment of swine hypothermia with Sini Decoction[J]. Chinese journal of traditional veterinary medicine, 2000(4): 24.
- [18] 王萍, 吴璇, 吴璐, 等. 附子多糖的提取、纯化及药理活性研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(10): 182-187.
- WANG P, WU X, WU L, et al. Research progress on extraction, purification and pharmacological activities of Fuzi (Radix Aconiti Lateralis Praeparata) polysaccharide [J]. Chinese archives of traditional Chinese medicine, 2023, 41(10): 182-187.
- [19] 张晓琳. 酶辅助提取法制备附子多糖及其体外抗氧化活性研究[J]. 浙江中医杂志, 2016, 51(12): 912-913.
- ZHANG X L. Study on preparation of *Aconitum carmichaelii* Debx. polysaccharides by enzyme-assisted extraction and their *in vitro* antioxidant activity[J]. Zhejiang journal of traditional Chinese medicine, 2016, 51(12): 912-913.
- [20] 谢衣恒, 张芮, 郭海洋, 等. 附子多糖的提取纯化、结构表征及其对 RAW 264.7 巨噬细胞免疫活性的影响[J]. 中国抗生素杂志, 2024, 49(12): 1329-1337.
- XIE Y H, ZHANG R, GUO H Y, et al. Extraction, purification, structural characterization of polysaccharide from Aconiti Lateralis Radix Praeparata and its biological evaluation on immune activity of RAW 264.7 cells [J]. Chinese journal of antibiotics, 2024, 49(12): 1329-1337.
- [21] 景永帅, 程文境, 张钰炜, 等. 姜多糖的提取、结构表征和生物活性研究进展[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(21): 176-183.
- JING Y S, CHENG W J, ZHANG Y W, et al. Research progress in extraction, structural characterization and biological activity of ginger polysaccharides[J]. Food research and development, 2021, 42(21): 176-183.
- [22] 孟宪伟, 罗亮, 孙源, 等. 生姜多糖的提取及抗氧化作用研究[J]. 安徽农业科学, 2024, 52(11): 149-153.
- MENG X W, LUO L, SUN Y, et al. Study on extraction and antioxidant effect of polysaccharide from *Zingiber officinale* rosc. [J]. Journal of Anhui agricultural sciences, 2024, 52(11): 149-153.
- [23] 柴美灵, 李娜, 乔宏萍, 等. Box-Behnken 法优化甘草多糖提取工艺及其体外抗氧化活性分析[J]. 食品工业科技, 2021,

- 42(23):192-200.
- CHAI M L, LI N, QIAO H P, et al. Application of Box-Behnken design for ultrasonic-assisted extraction of *Glycyrrhiza* polysaccharide and its antioxidant activity analysis *in vitro* [J]. Science and technology of food industry, 2021, 42(23):192-200.
- [24] 戴天伦. 赤水麻竹叶多糖的制备工艺及抗氧化性能研究 [D]. 贵阳: 贵州民族大学, 2021.
- DAI T L. Study on preparation technology and antioxidant activity of polysaccharides from *Dendrocalamus latiflorus* Munro leaves in Chishui County [D]. Guiyang: Guizhou Minzu University, 2021.
- [25] YANG X Q, WU Y H, ZHANG C, et al. Extraction, structural characterization, and immunoregulatory effect of a polysaccharide fraction from Radix Aconiti Lateralis Preparata (Fuji) [J]. International journal of biological macromolecules, 2020, 143:314-324.
- [26] 黄玉华, 张猛猛, 辛璇, 等. 香露兜叶总黄酮的提取及抗氧化活性评估 [J/OL]. 现代食品科技, 2025: 1-15 [2025-09-30]. <https://link.cnki.net/urlid/11.2206.TS.20251023.1617.020>
- HUANG Y H, ZHANG M M, XIN X, et al. Extraction and antioxidant activity evaluation of total flavonoids from *Pandanus amaryllifolius* Roxb. leaf [J/OL]. Modern food science and technology, 2025: 1-15 [2025-09-30]. <https://link.cnki.net/urlid/11.2206.TS.20251023.1617.020>
- [27] 王欢, 陈长宝, 张波, 等. 响应面法优化黄绿卷毛菇子实体多糖的提取工艺及其体外抗氧化活性研究 [J]. 菌物学报, 2019, 38(10):1681-1688.
- WANG H, CHEN C B, ZHANG B, et al. Antioxidant activities and extraction technique optimization of crude polysaccharides from the fruiting body of *Floccularia luteovirens* [J]. Mycosystema, 2019, 38(10):1681-1688.
- [28] CHEN B J, SHI M J, CUI S, et al. Improved antioxidant and anti-tyrosinase activity of polysaccharide from *Sargassum fusiforme* by degradation [J]. International journal of biological macromolecules, 2016, 92:715-722.
- [29] DOU J, MENG Y H, LIU L, et al. Purification, characterization and antioxidant activities of polysaccharides from thinned-young apple [J]. International journal of biological macromolecules, 2015, 72:31-40.
- [30] 彭浪, 张沙沙, 覃小慧, 等. 响应面法优化黔产黄连总生物碱提取工艺及其抗氧化活性研究 [J]. 时珍国医国药, 2025, 36(22):1-6.
- PENG L, ZHANG S S, QIN X H, et al. Optimization of extraction process and antioxidant activity of total alkaloids from Guizhou-grown coptis Chinensis by response surface methodology [J]. Journal of Li-shizhen traditional Chinese medicine, 2025, 36(22):1-6.
- [31] 孙俊乐, 顾相瑞, 李梦瑶, 等. 响应面法优化三颗针多糖提取工艺 [J]. 当代化工研究, 2021(23):128-132.
- SUN J L, GU X R, LI M Y, et al. Optimization of extraction process of polysaccharide from barberry root by response surface methodology [J]. Modern chemical research, 2021(23):128-132.
- [32] FENG Y N, ZHANG X F. Polysaccharide extracted from *Huperzia serrata* using response surface methodology and its biological activity [J]. International journal of biological macromolecules, 2020, 157:267-275.
- [33] MARAN J P, MANIKANDAN S, THIRUGNANASAMBANDHAM K, et al. Box-Behnken design based statistical modeling for ultrasound-assisted extraction of corn silk polysaccharide [J]. Carbohydrate polymers, 2013, 92(1):604-611.
- [34] 韦献雅, 殷丽琴, 钟成, 等. DPPH法评价抗氧化活性研究进展 [J]. 食品科学, 2014, 35(9):317-322.
- WEI X Y, YIN L Q, ZHONG C, et al. Advances in the DPPH radical scavenging assay for antioxidant activity evaluation [J]. Food science, 2014, 35(9):317-322.
- [35] 颜军, 苟小军, 邹全付, 等. 分光光度法测定 Fenton 反应产生的羟基自由基 [J]. 成都大学学报 (自然科学版), 2009, 28(2):91-93.
- YAN J, GOU X J, ZOU Q F, et al. Determination of hydroxyl radical generated from Fenton reaction by spectrophotometry [J]. Journal of Chengdu university (natural science edition), 2009, 28(2):91-93.
- [36] 张昊, 任发政. 羟基和超氧自由基的检测研究进展 [J]. 光谱学与光谱分析, 2009, 29(4):1093-1099.
- ZHANG H, REN F Z. Research progress on detection of hydroxyl and superoxide anion radicals [J]. Spectroscopy and spec-

- tral analysis, 2009, 29(4): 1093-1099.
- [37] 曾维才, 石碧. 天然产物抗氧化活性的常见评价方法[J]. 化工进展, 2013, 32(6): 1205-1213.
- ZENG W C, SHI B. Common methods of antioxidant activity evaluation for natural products: a review[J]. Chemical industry and engineering progress, 2013, 32(6): 1205-1213.
- [38] 陈林, 韩林, 周浓, 等. 响应面法优化太白贝母粗多糖超声波提取工艺研究[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(1): 109-113.
- CHEN L, HAN L, ZHOU N, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of crude polysaccharide from *Fritillaria taipaiensis* P.Y.Li using response surface methodology[J]. Natural product research and development, 2015, 27(1): 109-113.
- [39] 郭丽丽, 李小兰, 田小丽, 等. 黄芪茎叶总皂苷的响应面提取工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 中国食品添加剂, 2023, 34(4): 158-167.
- GUO L L, LI X L, TIAN X L, et al. Optimization of extraction technology of total saponins from stems and leaves of *Astragalus membranaceus* by response surface methodology and their antioxidant activity[J]. China food additives, 2023, 34(4): 158-167.
- [40] 谭光国. 中药四逆汤化学物质组和代谢组学研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2012.
- TAN G G. Chemome and metabonomics studies of traditional Chinese medicine Sini Decoction[D]. Shanghai: Second Military Medical University, 2012.
- [41] 俞慧红, 竺巧玲, 戴飞, 等. 多糖抗氧化作用的研究现状[J]. 食品研究与开发, 2008(3): 172-176.
- YU H H, ZHU Q L, DAI F, et al. Research status of antioxidant activity of polysaccharides[J]. Food research and development, 2008(3): 172-176.
- [42] 方积年, 丁侃. 天然药物—多糖的主要生物活性及分离纯化方法[J]. 中国天然药物, 2007(5): 338-347.
- FANG J N, DING K. Main bioactivities and separation/purification methods of polysaccharides from natural medicines[J]. Chinese journal of natural medicines, 2007(5): 338-347.

(责任编辑: 熊淑琪)