

树莓果肉多糖超声提取工艺优化及其抗疲劳作用

吴云¹, 陈薇¹, 田文慧¹, 杨永晶^{1,2*}

¹青海大学生态环境工程学院; ²青海大学省部共建三江源生态与高原农牧业国家重点实验室, 西宁 810016

摘要:本研究利用响应面法对树莓果肉多糖的超声提取工艺进行优化,并通过游泳小鼠实验测评其抗疲劳活性。结果表明,树莓果肉多糖的最佳提取条件为温度 58 °C,时间 84 min,超声功率 58 W,料液比 1:20,此时多糖的提取得率高达 11.75%。树莓果肉多糖在红外光谱中呈现出典型的多糖吸收峰;主要含有的单糖类型有半乳糖、鼠李糖、葡萄糖、木糖、甘露糖以及阿拉伯糖,且摩尔比分别为 2.3:2.0:7.1:1.0:1.1:19.9。通过游泳小鼠实验发现,树莓果肉多糖能有效提高游泳小鼠的运动耐力和运动适应性,维持血糖及糖原水平,减少乳酸产生,加速其清除,显示出较好的抗疲劳活性。

关键词:树莓果肉多糖;超声提取;提取工艺优化;抗疲劳活性;小鼠游泳实验

中图分类号:TS201

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)12-2081-13

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.12.013

Ultrasonic extraction optimization of raspberry (*Rubus idaeus* L.) pulp polysaccharides and its anti-fatigue activity

WU Yun¹, CHEN Wei¹, TIAN Wen-hui¹, YANG Yong-jing^{1,2*}

¹Qinghai University, College of Ecology-Environment Engineering,;

²State Key Laboratory of Plateau Ecology and Agriculture, Qinghai University, Xining 810016, China

Abstract: In this study, the ultrasonic extraction process of raspberry pulp polysaccharides (RPP) was optimized using response surface methodology and the anti-fatigue activity of RPP was evaluated by swimming mice experiments. The results showed that the optimal ultrasonic extraction conditions of RPP were temperature 58 °C, extraction time 84 min, ultrasonic power 58 W and material-liquid ratio 1:20, in which the extract yield of RPP could reach 11.75%. RPP showed a typical polysaccharides infrared spectrum and was composed of galactose, rhamnose, glucose, xylose, mannose and arabinose, with the molar ratio of 2.3:2.0:7.1:1.0:1.1:19.9. Furthermore, RPP exhibited significant anti-fatigue activity in the swimming mice experiments, for it could effectively improve the exercise endurance and adaptability of swimming mice, maintain the level of blood sugar and glycogen, reduce the production of lactic acid and accelerate its clearance.

Key words: raspberry pulp polysaccharides (RPP); ultrasonic extraction; extraction process optimization; anti-fatigue activity; swimming mice test

树莓(*Rubus idaeus* L.)是一类蔷薇科植物,进一步分类后,属于悬钩子属,从分布情况来看,北半球温带分布的树莓较多^[1]。据研究,树莓中能够检测出多种活性成分,如多糖、氨基酸、酚类等。这些活性成分使得树莓在抗氧化、抗肿瘤、免疫调节、降糖降脂、抗菌、抗紫外^[2]等方面效果突出。树莓广泛的生物活性使其在功能性食品开发、美容美体和药物

研发等诸多方面均展示出极为广阔的开发前景。

多糖是植物重要的生物活性成分^[3],植物多糖也早已成为研究的热点之一。树莓果实中多糖含量较高,是多糖提取的理想原料。关于树莓多糖已有一些相关报道,主要涉及多糖的分离纯化、结构表征、药理活性和应用。如 Yu^[4]从树莓中分离得到一种新型水溶性多糖 RCP-II,其具有良好的抗氧化能力和非酶糖基化抑制活性。本团队前期在树莓果肉多糖体内抗肿瘤活性研究时发现其具有显著的免疫增强活性,在荷瘤小鼠模型中表现出良好的抑制黑色素瘤活性,且能明显增强化疗药物多西他赛的体

收稿日期:2020-05-25 接受日期:2020-10-28

基金项目:青海省科技厅基础研究计划(2019-ZJ-953Q);国家自然科学基金(81860619)

*通信作者 Tel:86-013709746170; E-mail:yongjing223@163.com

内抗肿瘤效果,有望用作免疫增强剂或化学治疗辅助剂以治疗恶性黑色素瘤^[5]。此外,Mierczynska^[6]用柠檬酸从树莓中提取到富含果胶的馏分,并发现该果胶可在食品工业中作为增稠剂和胶凝剂使用。相信随着研究的不断拓展和深入,树莓多糖也将成为一种极具开发前景的天然植物多糖。

研究和优化提取工艺对很多生物活性物质的规模开发和利用具有重要促进作用。本文利用响应面法对树莓多糖的超声提取工艺进行了优化,为其规模化提取提供参考。此外,关于树莓多糖的抗疲劳活性研究尚未见报道。故本文采用小鼠游泳实验研究树莓果肉多糖的体内抗疲劳作用,并通过测定小鼠负重游泳时间和游泳后肝糖原、血糖、血清尿素氮及肌酸激酶等多项生理生化指标进一步阐明树莓果肉多糖的抗疲劳机理,进一步拓展树莓多糖的活性研究内容,为其开发利用提供依据。

1 材料与仪器

1.1 材料与试剂

树莓冷冻果,购自青海树莓农林产业化有限公司(青海湟源);共于甘肃中医学院购买小白鼠 80 只,体重处于 19~21 g 之间;粮食酒精、浓硫酸(两者质量分数分别为 95% 和 98%)、分析纯的苯酚、葡萄糖、氟乙酸(TFA)及氯仿等均采购于青海天顺化学试剂公司;多种单糖标准品,如木糖、半乳糖等全部在中国药品生物制品检定所采购;测试生理生化指标的测试盒,于南京建成生物工程中心采购。

1.2 仪器与设备

高速连续型超微粉碎机(CLF-30B,浙江省温岭市创力药材器械厂);旋转蒸发仪、低速台式离心机、紫外-可见分光光度计、冷冻干燥机、常温离心机(RE-2000A、TDL-50C、UV-759、FD10、TDL-50C,上海精密科学仪器有限公司);恒温水浴锅(DZKW-D-4,河南郑州南北仪器设备有限公司);超声清洗仪(KQ-100VDB,昆山市超声仪器有限公司);傅里叶变换红外光谱分析仪(Bruker Tensor 27,天津市金贝尔科技有限公司);凝胶渗透色谱(LC-20AT,岛津);涡旋混合仪(TD-RS-1,北京同德创业科技有限公司);扫描电镜(JSM-7500,深圳瑞盛科技有限公司);气相色谱-质谱联用仪(7890A-5975c,Agilent Technology);超高温型电热恒温干燥箱(202-3,沅泽科技有限公司);安瓿瓶(如皋市天丰包装材料厂);酒精喷灯(北京鑫淼腾达仪器设备有限公司);酶标仪(RT-6000,北京裕天医疗技术);冷冻离心机(4-

5R,湖南恒诺仪器设备有限公司);组织匀浆仪(FSH-2A,金坛市友联仪器研究所)。

2 实验方法

2.1 树莓果肉多糖提取工艺优化

2.1.1 树莓果肉多糖的提取

2.1.1.1 标准曲线的绘制

在 105 °C 温度下对葡萄糖标准品进行干燥,并在保证重量稳定后,通过天平进行标准品的称量,精准称量 0.1 g,并转到量杯中,进一步采用纯水定容到 1 L,以此得到浓度为 0.1 g/L 的葡萄糖溶液,依次吸取该溶液,吸取量分别为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL,并分别加入试管,通过加入纯水,使最终的体积达到 2 mL。再取出浓度为 5% 的苯酚,各加入 1 mL,再于所有试管中加入浓硫酸,加入量为 5 mL,振荡混合,保证充分混合后于室温下静置,时长 30 min,再测定所有试管 490 nm 波长下的吸光值,取一支空试管,向其中加入 2 mL 纯水,以此得到空白对照。横纵坐标分别设置为多糖浓度(C, g/mL)以及吸光值(A),以此得到标准曲线,并进一步明确回归方程 $A = 1.82C (R^2 = 0.999)$ 。

2.1.1.2 树莓果肉多糖的提取及含量测定

得到树莓果粉后,向其中加入质量分数为 80% 的乙醇(W:V=1:4),再进行加热回流,温度设置为 60 °C,以此除去果粉中存在的色素、单糖以及寡糖,重复 2 次。称取挥干乙醇的树莓果粉 0.1 g 放于锥形瓶中,之后完成超声提取,在这个过程中,保证提取温度、时间、功率等参数的适宜,提取完毕之后进行离心,离心速度设置为 3 500 rpm,时间设置为 15 min,再将得到的上清中含有的蛋白去除,该步骤通过 Sevag 法来实现,反复进行 3 次此项操作。将水溶液置于 60 °C,通过减压浓缩,从而能够得到原体积 1/4 的溶液,再向其中加入 4 体积 95% 的粮食酒精,再进行沉淀,沉淀温度为 4 °C,在沉淀 24 h 之后进行离心。后将树莓果肉多糖沉淀、冷冻、干燥,可获得浅粉色树莓果肉多糖粉末,并按如下公式计算树莓果肉多糖提取得率:树莓果肉多糖提取得率=(树莓果肉多糖含量/树莓果粉质量)×100%。此外,采用硫酸-萘酚法和考马斯亮蓝法分别测定树莓果肉多糖中的多糖含量与蛋白质含量。

2.1.2 树莓果肉多糖提取工艺的优化

2.1.2.1 单因素实验

选择料液比、超声提取时间、温度和超声功率四项因素进行单因素实验,当其中一项因素改变时,其

它因素恒定,单次实验重复3次。

2.1.2.2 响应面法及数据分析方法

通过单因素实验筛选出明显影响树莓果肉多糖提取得率的几个主要因素,而后遵循 Box-Behnken 设计原理,以影响较显著的因子作自变量进行组合,并分别以-1、0、+1表示各个自变量的低、中、高3个水平。通过运用 Design expert 8.0 软件完成实验所得数据的处理和分析,从而得到如下二次多项式方程。

$$Y = \sum A_0 + \sum_{i=1}^k A_i X_i + \sum_{i=1}^k A_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k A_{ij} X_i X_j$$

($k = n$)

在该方程中, Y 所代表的含义是预测响应值,由此可以明确提取得率; X_i 以及 X_j 所代表的含义是自变量编码水平($i \neq j$); k 所代表的是变量个数; A_0 、 A_i 、 A_{ij} 所代表的含义分别是常数项、线性回归系数以及二次项回归系数。

通过计算 R^2 能够明确所得方程的拟合可靠性,若该数值越趋近于1,则表示可靠性越好;通过进行 F 值检验,能够得到两变量之间的相关性程度,并且 F 值与相关性显著之间为成正比关系;通过进行 P 值检验,能够得到线性效应、平方效应、交互效应的显著性,并且 P 值与显著性之间呈现出反比关系^[7], $P < 0.05$ 时影响显著, $P < 0.01$ 时影响极显著。

2.2 树莓果肉多糖结构初步分析

2.2.1 树莓果肉多糖的红外光谱分析

取适量光谱级的溴化钾粉末,将其加入到样品中,并将二者完全混合,之后置于红外光谱仪,进而完成测定,扫描范围设置在 $400 \sim 4\,000 \text{ cm}^{-1}$ 之间,分辨率设置为 4 cm^{-1} ,共进行64次扫描。

2.2.2 树莓果肉多糖表面结构观察

用真空镀膜仪在树莓果肉多糖样品表面薄薄地镀一层金,并将样品放到扫描电镜下进行观察,以详细明确其表面结构,将加速电压设置为5 kV,放大倍数为10 000、5 000、2 000和1 000。

2.2.3 树莓果肉多糖其单糖组分分析

借助于GC-MS分析,可以对样品的单糖组分进行明确,具体分析方法参照 Yang 等^[8]的实验。

2.3 树莓果肉多糖的抗疲劳作用

2.3.1 动物分组及给药方案

购买后正常喂养小鼠,在1周后开始进行实验,并且在喂养期间,应保证室温在 $22 \text{ }^\circ\text{C}$ 左右,湿度在45%左右,保证供水和食物充足。1周之后,对参与实验的80只小鼠基于平均和随机的原则进行分组,

共分为4组,各小组中包含了20只小鼠,四个小组有空白对照组(完全为生理盐水)以及树莓果肉多糖高(RPP-H:200 mg/kg)、中(RPP-M:100 mg/kg)、低(RPP-L:50 mg/kg)剂量组,树莓果肉多糖用生理盐水配制。所有的小鼠每日接受一次灌胃,并保证每日灌胃的时间、剂量固定,持续28天。

2.3.2 小鼠负重游泳实验

在灌胃28天之后,即可从所有分组内随机选取小鼠完成负重游泳实验,在各小组取10只,通过于小鼠尾部增添铅皮来完成负重处理,重量为小鼠体重的5%,保证游泳水温为 $25 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ 。若小鼠沉入水底后时长不低于9 s,则为游泳终止时间,以此对游泳时长进行测定和记录。

2.3.3 血糖、血清中乳酸、乳酸脱氢酶、尿素氮和肌酸激酶的测定

剩余的40只小鼠在水温为 $25 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ 的水中进行游泳,时长为90 min,再休息1 h之后摘眼球完成血液采集,并将其放于室温下静置,时长为30 min,静置完毕后离心, $3\,000 \text{ rpm}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$,10 min,从而得到血清样本。依据于测试盒中的说明书完成相关生理生化指标的检测,如乳酸、葡萄糖等。

2.3.4 肝糖原与肌糖原的测定

通过脱颈椎处死血液采集后的小鼠,并在最短时间内分离出肝脏以及股四头肌。肝脏与肌肉组织称重后分别在冰浴中用事先预冷的匀浆介质(pH7.4、Tris-HCl、EDTA-2Na以及蔗糖的浓度分别为0.01、0.000 1、0.01 mol/L、0.8% NaCl溶液)充分混合之后得到10%匀浆液。再进行离心, $3\,000 \text{ rpm}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$,10 min后取上清备用。肝糖原和肌糖原的分析均按照其测试说明书进行。

2.3.5 数据处理

基于SPSS13.0软件完成数据分析,并通过 t 检验完成两组间均数的分析、比较,通过单因素方差分析完成多组间均数的比较,对于所得到的实验统计数据的表示,采用平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$),若以 $P < 0.05$,则为差异显著,若 $P < 0.01$,则为差异极显著。

3 结果与讨论

3.1 单因素实验结果

3.1.1 超声提取温度对树莓果肉多糖提取得率的影响

改变超声提取温度,并保证其他参数的固定,来完成超声提取温度与树莓果肉多糖提取得率相关性的探究,在进行温度设置时,分别在 $40 \sim 80 \text{ }^\circ\text{C}$ 之间

设置五个梯度,时间、功率以及料液比分别为 40 min、70 W、1:20。结果如图 1 所示,树莓果肉多糖提取得率在 40~60 °C 之间随温度的升高而增加,在提取温度 60 °C 时,多糖提取得率最大。之后多糖提取得率随提取温度的升高而逐渐下降。因此,将 60 °C 设定为响应面实验中超声提取温度的中间水平值。

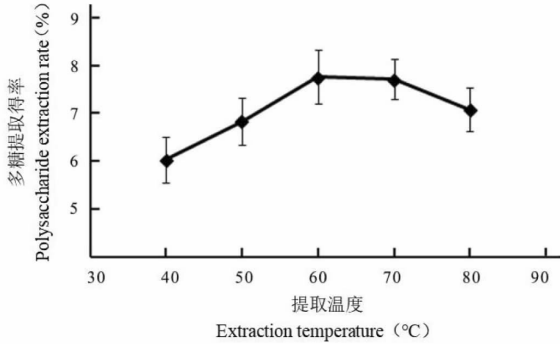


图 1 温度与树莓果肉多糖提取得率之间的相关性分析
Fig. 1 Correlation analysis between temperature and extraction rate of RPP

3.1.2 超声功率对树莓果肉多糖提取得率的影响

改变超声功率,并保证其他参数的固定,来完成超声功率与树莓果肉多糖提取得率相关性的探究,分别设置六个超声功率,分别为 50、60、70、80、90 以及 100 W。时间、温度以及料液比分别为 40 min、50 °C、1:20。结果如图 2 所示,当超声功率在 50~60 W 时,树莓果肉多糖的提取得率不断增加,到 60 W 时达到峰值。之后随超声功率的加大开始逐渐下降。因此,将 60 W 设定为响应面实验中超声提取功率的中间水平值。

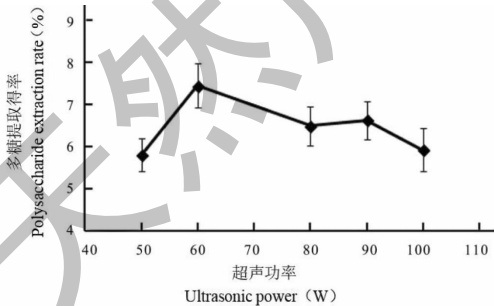


图 2 超声功率与树莓果肉多糖提取得率的相关性分析
Fig. 2 Correlation analysis between ultrasonic power and extraction rate of RPP

3.1.3 超声提取时间与树莓果肉多糖提取得率的影响

改变提取时间,并保证其他参数的固定,来完成

提取时间与树莓果肉多糖提取得率相关性的探究,采用五个提取时间,即 20、40、60、80 以及 100 min。功率、温度以及料液比分别为 70 W、50 °C、1:20。结果如图 3 所示,当提取时间在 20~60 min 时,提取得率呈现出缓慢升高的趋势。当时间高于 60 min 之后,提取得率出现剧烈上升趋势,并且当时间为 80 min 时,提取得率最高,80 min 之后,提取得率出现剧烈降低趋势。因此,将 80 min 设定为响应面实验中超声提取时间的中间水平值。

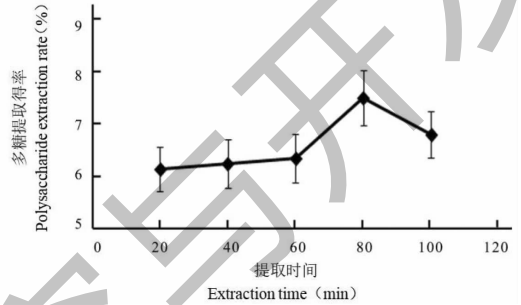


图 3 提取时间与树莓果肉多糖提取得率的相关性分析
Fig. 3 Correlation analysis between extraction time and extraction rate of RPP

3.1.4 料液比对树莓果肉多糖提取得率的影响

料液比是影响多糖提取得率的重要因素之一,过小的料液比不能充分提取材料中的多糖,过大的料液比则会造成提取耗时长、耗能多,成本高等诸多不便。改变料液比,并保证其他参数的固定,来完成料液比与树莓果肉多糖提取得率相关性的探究,采用五个不同的料液比,即 1:10、1:15、1:20、1:25 以及 1:35。时间、温度以及功率分别为 40 min、50 °C、70 W。最终测定结果见下图 4,料液比在 1:10~1:20 之间,则二者为正相关,而高于 1:20 后,提取得率不再有明显改变。从时间和能耗方面考虑,最终选择 1:20 作为响应面实验的恒定料液比。

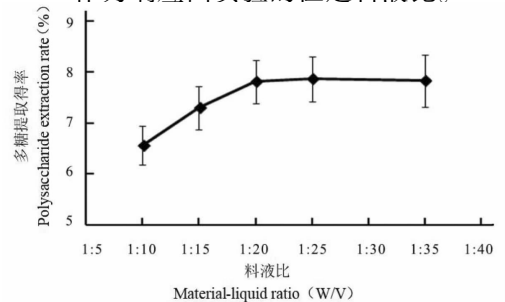


图 4 料液比与树莓果肉多糖提取得率的相关性分析
Fig. 4 Correlation analysis between material liquid ratio and extraction rate of RPP

3.2 响应面法优化树莓果肉多糖提取工艺

超声提取温度、时间以及功率设置为三因素,将 60

3.2.1 Box-Behnken 设计因素水平及编码

℃、80 min、60 W 设定为中间水平值、进行响应面实验,具体因素水平及编码详见表 1。

结合单因素实验中所得到的数据结果,分别将

表 1 Box-Behnken 设计因素水平及编码

Table 1 Box behnken design factor level and coding

因素 Factor	水平 Level		
	-1	0	+1
X_1 超声提取温度 Extrction temperatur(℃)	50	60	70
X_2 超声提取时间 Extraction time(min)	60	80	100
X_3 超声提取功率 Extraction power(W)	50	60	70

3.2.2 响应面分析方案与结果

响应面详细方案及结果如表 2 所示。

表 2 Box-Behnken 实验设计与结果

Table 2 Box-Behnken design matrix and the response values

编号 Run	X_1 提取温度 Extraction temperature(℃)	X_2 提取时间 Extraction time(min)	X_3 超声功率 Ultrasound power(W)	提取得率 Extraction rate(%)	
				实际值 Actual yield	预测值 Predicted yield
1	+1(70)	-1(60)	0(60)	9.45	9.40
2	0(60)	0(80)	0(60)	11.63	11.68
3	0(60)	-1(60)	-1(50)	9.21	9.20
4	0(60)	+1(100)	-1(50)	9.91	9.89
5	+1(70)	0(80)	+1(70)	9.86	9.80
6	0(60)	0(80)	0(60)	11.72	11.68
7	+1(70)	+1(100)	0(60)	9.57	9.54
8	0(70)	-1(80)	+1(70)	7.98	8.00
9	-1(50)	-1(60)	0(60)	8.40	8.43
10	-1(50)	+1(100)	0(60)	10.81	10.86
11	0(60)	0(80)	0(60)	11.66	11.68
12	0(60)	0(80)	0(60)	11.65	11.68
13	0(60)	+1(100)	+1(70)	9.86	9.87
14	-1(50)	0(80)	+1(70)	10.56	10.51
15	-1(50)	0(80)	-1(50)	10.70	10.67
16	+1(70)	0(80)	-1(50)	10.89	10.94
17	0(60)	0(80)	0(60)	11.75	11.68

由表 3 可见,三个因素的交互项、线性及平方项对树莓果肉多糖的提取得率都呈现出显著相关性 ($P < 0.05$),并且是极为明显的线性关系。计算 R^2 的结果为 0.998 9,该数值在一定程度上说明所构建的模型具有较好的拟合度,以此也能够证实可以采用该方程来进行实际分析。除此之外,通过计算 F

值能够发现,可以基于相关性的显著程度对三个因素进行排序,其中提取时间与提取得率之间的相关性最为显著,超声功率居中,提取温度相关性相对较小。

基于拟合模型,进一步得到三维响应面图以及等高线图,通过两图能够使响应面的最高点更加直

观地呈现出来,即极值及三因素的相互作用与响应值的相关性,以此能够使最佳提取工艺参数范围得

表 3 方差分析结果

Table 3 Result of ANOVA analysis

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 <i>df</i>	均方 Mean square	<i>F</i>	<i>P</i>
模型 Model	22.33	9	2.48	697.38	<0.000 1
<i>A-X</i> ₁	0.061	1	0.061	17.22	0.004 3
<i>B-X</i> ₂	3.26	1	3.26	917.41	<0.000 1
<i>C-X</i> ₃	0.75	1	0.75	210.89	<0.000 1
<i>AB</i>	1.31	1	1.31	368.49	<0.000 1
<i>AC</i>	0.20	1	0.20	55.66	0.000 1
<i>BC</i>	0.35	1	0.35	97.84	<0.000 1
<i>A</i> ²	0.78	1	0.78	219.84	<0.000 1
<i>B</i> ²	12.08	1	12.08	3 394.05	<0.000 1
<i>C</i> ²	2.36	1	2.36	663.03	<0.000 1
残差 Residual	0.025	7	0.003 6		
失拟项 Lack of fit	0.015	3	0.004 9	1.90	0.271 4
纯误差 Pure error	0.019	4	0.002 6		
总离差 Cor total	13.96	16			
<i>R</i> ²	0.998 9				
调整 <i>R</i> ² <i>R</i> ² _{Adj}	0.997 5				
预测 <i>R</i> ² <i>R</i> ² _{Pred}	0.988 8				
精密密度 Adequate precision	80.485				

到明确^[9]。图 5 显示出超声提取功率为 58.38 W 时,提取时间及温度与提取得率间的相关性。当超

声提取温度为 50~60℃时,树莓果肉多糖提取得率维持在 11.46% 以上。

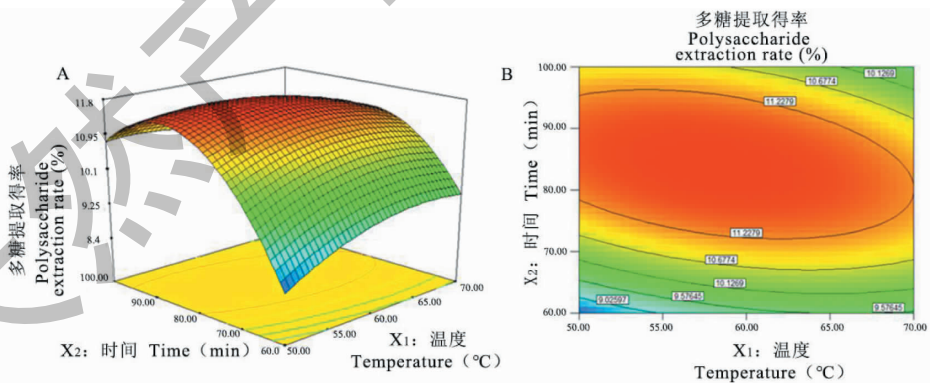


图 5 超声提取时间与温度对树莓果肉多糖提取得率的影响

Fig. 5 Effect of ultrasonic extraction time (*X*₂) and temperature (*X*₁) on extraction rate of RPP

注:A:3D 响应面图;B:等高线图,下同。Note:A:Response surface plot;B:Contour plot,the same below.

图 6 显示了超声提取时间为 84.32 min 时不同超声提取功率和温度对树莓果肉多糖提取得率的影响。由图可知,在超声功率设置为 55~60 W 之间,

温度设置为 50~65℃之间的情况下,树莓果肉多糖提取得率维持在顶峰水平。

图 7 显示了超声提取温度为 58.63℃时不同超

声提取功率和时间对树莓果肉多糖提取得率所产生的影响。由图可见,时间设置在 80 ~ 90 min 之间,

功率设置在 50 ~ 65 W 之间,树莓果肉多糖提取得率达到最高。

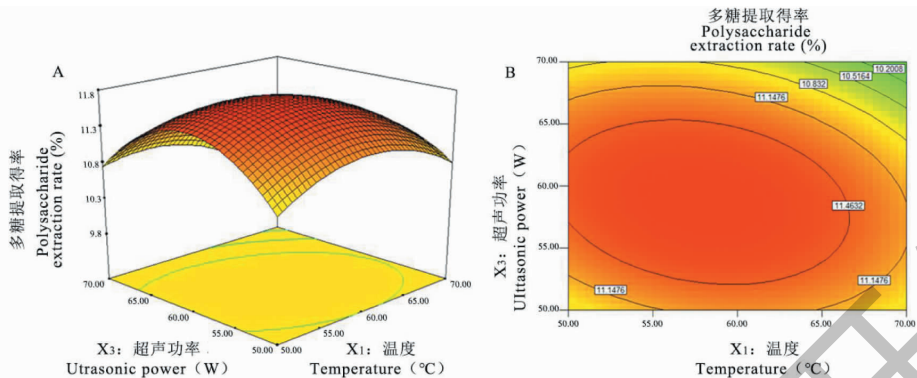


图6 超声提取功率与温度对树莓果肉多糖产率的影响

Fig. 6 Effect of ultrasonic power (X_3) and temperature (X_1) on extraction rate of RPP

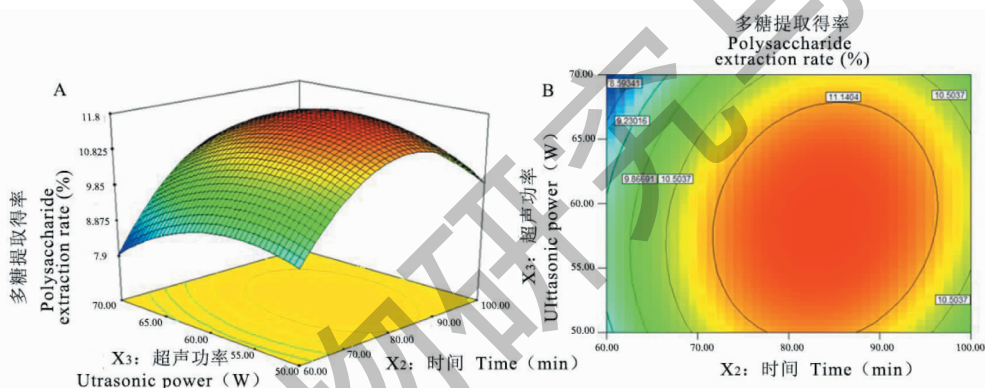


图7 超声提取功率和时间对树莓果肉多糖提取得率的影响

Fig. 7 Effect of ultrasonic power (X_3) and time (X_2) on extraction rate of RPP

3.2.3 树莓果肉多糖最优提取工艺的确定

通过 Design expert 8.0 软件来对三个因素回归拟合,最终能够获得如下方程: $Y = 11.68 - 0.087X_1 + 0.64X_2 - 0.31X_3 - 0.57X_1X_2 - 0.22X_1X_3 + 0.29X_2X_3 - 0.43X_1^2 - 1.69X_2^2 - 0.75X_3^2$ 。其中, Y 为树莓果肉多糖提取得率, X_1 、 X_2 和 X_3 分别代表提取温度、提取时间和超声功率。基于 Design expert 8.0 软件能够实现方程求解,最终能够总结出最佳提取工艺条件,即提取温度是 57.92 °C,时间是 84.24 min,超声功率 58.69 W。结合具体实际情况,同时又达到省时减耗的目的,可以对该条件进行进一步的完善,即温度设置为 58 °C,时间设置为 84 min,功率设置为 58 W,并且保证料液比为 1:20。对以上工艺条件进行效果验证,得到结果见表 4,最终计算得到提取得率达 $11.75 \pm 0.025\%$,预测值为 11.78%,将实际结果与该值比较发现差异较小。此

外,经测定树莓果肉多糖的多糖含量为 $76.2\% \pm 6.57\%$,蛋白质含量为 $1.18\% \pm 0.02\%$ 。

3.3 树莓果肉多糖的红外光谱分析

通过进行红外光谱分析后得到光谱图如图 8 所示,对该图进行分析后发现,3 300 ~ 3 500 cm^{-1} 范围内得到了 O-H 的吸收峰,而于 2 900 ~ 2 940 cm^{-1} 范围内得到了 C-H 吸收峰^[10]。1 740 cm^{-1} 以及 1 600 ~ 1 650 cm^{-1} 分别为糖醛酸结构和 C = O 的吸收峰^[11]。1 485 ~ 1 350 cm^{-1} 之间的一系列吸收峰是 -CH(O-CH₂)结构的变性吸收峰,1 000 ~ 1 200 cm^{-1} 的范围内得到的是吡喃糖基团的吸收峰^[12]。850 ~ 810 cm^{-1} 之间得到 C-O-S 的吸收峰。350 ~ 600 cm^{-1} 的吸收峰为吡喃糖环结构^[13]。

3.4 树莓果肉多糖电镜下的表面结构

图 9 为使用扫描电镜在 10 000 倍、5 000 倍、2 000 倍和 1 000 倍下观察到的树莓果肉多糖超微结

表 4 模型验证实验结果

Table 4 Results of model validation experiments

编号 No.	最优条件 Optimum condition			提取得率 Extraction rate(%)	
	提取温度 Extraction temperature(°C)	提取时间 Extraction time(min)	超声功率 Ultrasound power(W)	实际值 Actual yield(%)	预测值 Predicted yield(%)
1	58	84	58	11.71	11.78
2	58	84	58	11.75	11.78
3	58	84	58	11.76	11.78
4	58	84	58	11.78	11.78
5	58	84	58	11.75	11.78
平均值 Average value				11.75	11.78

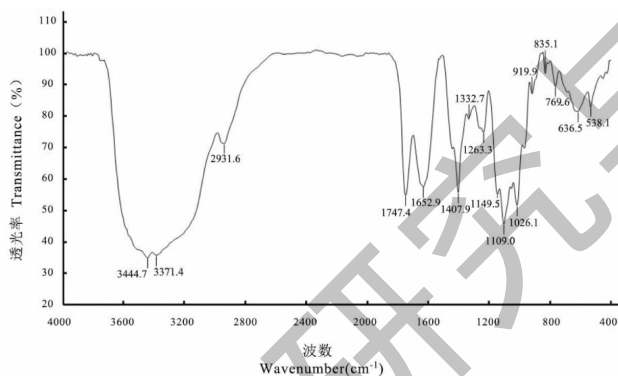


图 8 树莓果肉多糖红外光谱图

Fig. 8 Infrared spectrum of RPP

构。从图中可以看出,树莓果肉多糖表面比较粗糙,且分布着大小不一的卵圆形颗粒。该结果与虫草多

糖在电镜下的超微结构非常类似,这种卵圆形颗粒可能与多糖的分支和网状结构关系密切^[14]。

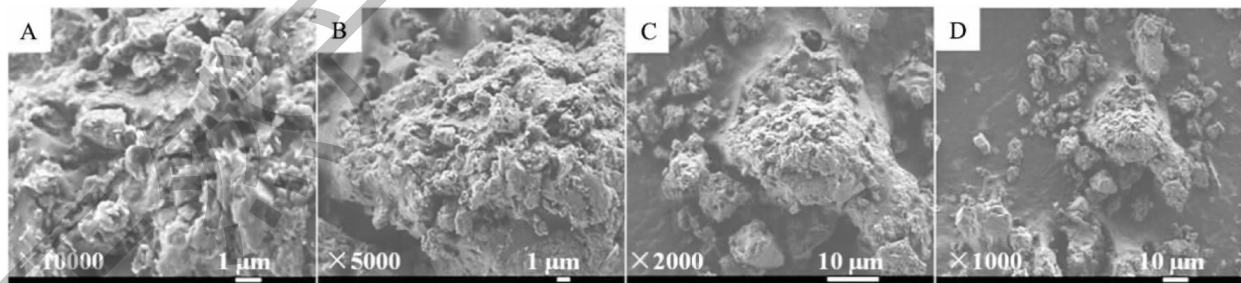


图 9 扫描电镜下观察到的树莓果肉多糖表面结构

Fig. 9 SEM images of RPP

3.5 树莓果肉多糖的单糖组成

3.5.1 标准曲线的绘制

在进行标准曲线绘制时,横纵坐标分别设置为浓度和衍生产物,再实现各单糖标准品的线性回归,设置线性范围是 25 ~ 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。最终得到的结果如下表 5。

3.5.2 单糖标准品乙酰化衍生物的 GC-MS 图谱

乙酰化衍生产物的分析结果见下图 10,通过对该图进行分析可以发现,分离效果较佳,无明显杂质产生,并进一步分析后得到如下表 6 中的结果,就目前所采用的多糖衍生方法来看,硅烷化以及乙酰化的应用频率相对较高。前者的优点众多,如耗时短、

操作简便等,但是其缺点也是不可忽视的,即多峰以及重叠峰等现象出现可能性较高,使得后续的分析工作极为困难^[8,15]。所以本实验选取了盐酸羟胺肟化以及乙酸酐乙酰化衍生法,以此能够最大可能地减少副生物的产生,有效防止多峰等现象出现,不同类型的单糖对应单一的色谱峰,使得后续分析能

够顺利进行^[16]。

3.5.3 树莓果肉多糖的单糖组成分析

通过对树莓果肉多糖进行乙酰化衍生之后,能够得到 GC-MS 图谱,即图 11 所示。基于单糖标准品保留时间以及离子碎片,能够进一步分析得到树莓果肉多糖中的单糖组成,即半乳糖(含量为 40.57

表 5 7 种单糖标准品的标准曲线方程与相关系数

Table 5 The standard curve equation and correlation coefficient of seven monosaccharide standards

单糖标准品 Monosaccharide standards	相关系数 Correlation coefficient	回归方程 Standard curve equation
鼠李糖 Rha	0.999 8	$y = 86\ 472x - 154\ 083$
阿拉伯糖 Ara	0.999 8	$y = 72\ 472x - 51\ 750$
果糖 Fru	0.999 5	$y = 10\ 197x + 147\ 979$
木糖 Xyl	0.999 6	$y = 74\ 569x + 347\ 094$
甘露糖 Man	0.999 9	$y = 195\ 909x - 771\ 962$
葡萄糖 Glu	0.999 8	$y = 86\ 963x - 337\ 613$
半乳糖 Lac	0.999 6	$y = 195\ 909x - 771\ 962$

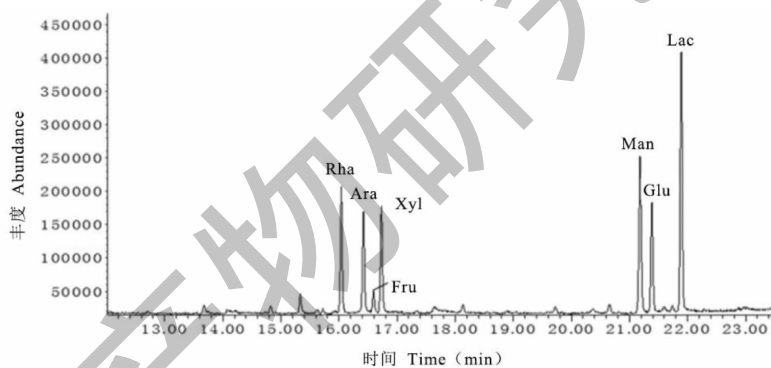


图 10 7 种单糖标准品的乙酰化衍生物 GC-MS 图谱

Fig. 10 The acetyl derivatives of seven monosaccharide standards

表 6 7 种单糖标准品的保留时间及特征离子

Table 6 The retention time and characteristic ion of seven monosaccharide standards

单糖 Monosaccharide	保留时间 Retention time (min)	定量离子 Quantitative ion	定性离子 Qualitative ion
鼠李糖 Rha	16.041	145	129, 113, 117, 159
阿拉伯糖 Ara	16.423	145	103, 115, 200, 242
果糖 Fru	16.595	145	103, 129, 117
木糖 Xyl	16.728	145	103, 115
甘露糖 Man	21.182	145	115, 187, 212, 103, 314
葡萄糖 Glu	21.385	145	115, 187, 212
半乳糖 Lac	21.894	145	212, 115, 103

$\mu\text{g}/\text{mL}$)、鼠李糖($32.06 \mu\text{g}/\text{mL}$)、葡萄糖($127 \mu\text{g}/\text{mL}$)、木糖($15.13 \mu\text{g}/\text{mL}$)、甘露糖($19.63 \mu\text{g}/\text{mL}$)以及阿拉伯糖($298.49 \mu\text{g}/\text{mL}$),进一步得到摩尔比为 $2.3:2.0:7.1:1.0:1.1:19.9$,该图谱中并未发现果糖。从该结果中可以发现,含量较高的有阿拉伯糖以及葡萄糖。这与本团队前期对树莓多糖的单糖

组成研究结果一致^[8],但 Yu^[4]、Teng^[17]对单糖结果的研究结果中并未检测到甘露糖,其树莓果实样品产地为哈尔滨, Yang 与本实验的树莓样品产地为青海湟源,推测可能是受到树莓生长地光照与气候等环境条件的影响。

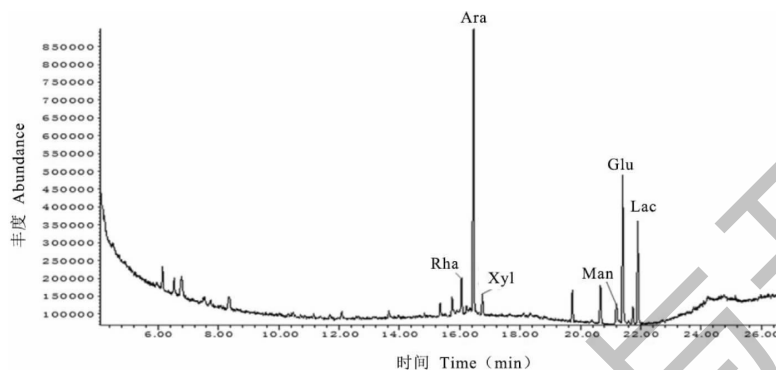


图 11 树莓果肉多糖水解衍生产物 GC-MS 色谱图

Fig. 11 The acetyl derivatives of RPP

3.6 树莓果肉多糖对小鼠负重游泳时间的影响

通过相关数据整理得到下表 7,对表中的数据进行分析后发现,树莓果肉多糖与游泳时间之间有着显著相关性,并且所应用的浓度越高,小鼠力竭游泳时间越长。树莓果肉多糖低剂量组小鼠的平均力竭游泳时间为 $647.3 \pm 85.4 \text{ s}$,空白对照组的游泳时间为 $477.5 \pm 102.1 \text{ s}$,将两组数据进行对比发现,二者差异显著($P < 0.05$);树莓果肉多糖中、高剂量组

小鼠的平均力竭游泳时间分别为 $872.9 \pm 95.7 \text{ s}$ 和 $1072 \pm 111.5 \text{ s}$,与空白组相比较,存在极显著性差异($P < 0.01$)。

在持续高强度劳动之后,工作能力呈现出短时间内的降低,这种生理现象即疲劳^[18]。力竭游泳时长可以在一定程度上代表运动能力。本研究表明,与空白对照相比,树莓果肉多糖在 $50 \sim 200 \text{ mg}/\text{kg}$ 的浓度下能显著提高负重游泳小鼠的运动耐力。

表 7 树莓果肉多糖对小鼠负重游泳时间的影响

Table 7 Effect of RPP on loaded-swimming time of mice

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	动物数量 Number of animals	负重游泳时间 Loaded-swimming time (s)
空白对照 Control	0	10	477.5 ± 102.1
树莓果肉多糖低剂量 RPP-L	50	10	$647.3 \pm 85.4^*$
树莓果肉多糖中剂量 RPP-M	100	10	$872.9 \pm 95.7^{**}$
树莓果肉多糖高剂量 RPP-H	200	10	$1072 \pm 111.5^{**}$

注:与空白对照组相比, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$,下同。

Note: Compared with control, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, the same below.

3.7 树莓果肉多糖对小鼠血糖、肝糖原和肌糖原的影响

如表 8 所示,树莓果肉多糖处理过的小鼠运动后血清葡萄糖浓度比空白对照组高,且葡萄糖浓度随树莓果肉多糖的浓度增加而升高。其中,树莓果肉多糖低剂量组小鼠运动后的平均血清葡萄糖浓度为 $8.85 \pm 0.71 \text{ mmol}/\text{L}$,空白对照组的结果为 9.50

$\pm 0.70 \text{ mmol}/\text{L}$,对两组数据进行对比分析发现,差异较小;但树莓果肉多糖中、高剂量组的小鼠运动后平均血清葡萄糖浓度分别为 $10.55 \pm 0.70 \text{ mmol}/\text{L}$ 和 $12.65 \pm 0.68 \text{ mmol}/\text{L}$,极显著地高于空白组($P < 0.01$)。

此外,树莓果肉多糖也能较好地维持小鼠运动后肝糖原和肌糖原的水平,且两种糖原的浓度与两种树莓果肉多糖的浓度成正比。如表 8 所示,树莓

果肉多糖低剂量组小鼠运动后的平均肝糖原的量为 6.43 ± 0.31 mg/g, 空白对照组的结果为 6.12 ± 0.39 mg/g, 对两组数据进行对比分析发现, 差异较小。树莓果肉多糖中、高剂量组小鼠的运动后平均肝糖原极显著地高于空白对照组 ($P < 0.01$)。树莓果肉多糖低、中和高剂量组与空白对照组相比, 运动后平均肌糖原水平更高, 且差异均极其显著 ($P < 0.01$)。

血糖的含量除了可以用来评估机体的糖代谢水平, 还可以反映出中枢系统的疲劳情况。多数情况下, 机体处于高强度运动状态时, 依靠糖类物质实现

能量的供给, 肝糖原和肌糖原水平迅速降低, 因此通过明确机体内糖原具体的储备量, 能够进一步得到机体的运动能力。所以在运动后产生的疲劳恢复时, 糖原的合成以及储备起着关键作用^[19]。在本研究中, 树莓果肉多糖在 $100 \sim 200$ mg/kg 浓度时能显著增加运动小鼠的血糖浓度和肝糖原含量, 在 $50 \sim 200$ mg/kg 浓度时能明显增加运动小鼠的肌糖原水平。说明树莓果肉多糖能通过提高小鼠的血糖和糖原水平, 为小鼠运动提供充足的能量, 从而有效提高小鼠的运动耐力。

表 8 树莓果肉多糖对小鼠血糖、肝糖原和肌糖原的影响

Table 8 Effect of RPP on blood glucose, liver glycogen and muscle glycogen of mice

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	动物数量 Number of animals	血糖 Blood glucose (mmol/L)	肝糖原 Liver glycogen (mg/g)	肌糖原 Muscle glycogen (mg/g)
空白对照 Control	0	10	9.50 ± 0.70	6.12 ± 0.39	0.91 ± 0.04
树莓果肉多糖低剂量 RPP-L	50	10	8.85 ± 0.71	6.43 ± 0.31	$1.26 \pm 0.04^{**}$
树莓果肉多糖中剂量 RPP-M	100	10	$10.55 \pm 0.70^{**}$	$10.19 \pm 0.46^{**}$	$1.67 \pm 0.02^{**}$
树莓果肉多糖高剂量 RPP-H	200	10	$12.65 \pm 0.68^{**}$	$12.07 \pm 0.58^{**}$	$2.00 \pm 0.03^{**}$

3.8 树莓果肉多糖对小鼠血清中乳酸和乳酸脱氢酶活性的影响

由表 9 可知, 树莓果肉多糖低、中和高剂量组小鼠运动后血清中的平均乳酸含量分别为 10.83 ± 0.18 、 10.30 ± 0.05 、 9.13 ± 0.23 mmol/L, 与空白对照组的 11.74 ± 0.10 mmol/L 相比差异极显著 ($P < 0.01$), 且树莓果肉多糖组小鼠运动后血清中的平均乳酸含量随多糖浓度呈负相关。相反, 树莓果肉多糖能明显提高运动后小鼠血清中乳酸脱氢酶的活性, 树莓果肉多糖中、高剂量组小鼠运动后血清中乳酸脱氢酶的活性分别为 37967.21 ± 15729.42 和 97180.33 ± 2191.45 U/L, 空白对照组的结果为

4524.59 ± 2712.61 U/L, 分析两组数据发现, 差异极大 ($P < 0.01$), 且小鼠的运动后血清中乳酸脱氢酶的活性与树莓果肉多糖浓度呈正相关。

机体在进行高强度的运动时会产生大量的乳酸, 但是借助于乳酸脱氢酶的作用, 可以将所产生的乳酸转化为丙酮酸, 从而在一定程度上降低乳酸含量。本研究表明, 树莓果肉多糖在 $50 \sim 200$ mg/kg 浓度时能明显减少运动小鼠血清中乳酸的产生, 同时, 在 $100 \sim 200$ mg/kg 浓度时能显著增加运动小鼠血清中乳酸脱氢酶的活性。说明树莓果肉多糖能通过加速乳酸的清除缓解小鼠运动疲劳。

表 9 树莓果肉多糖对小鼠血清中乳酸和乳酸脱氢酶的影响

Table 9 Effects of RPP on lactic acid and lactic dehydrogenase in serum of mice

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	动物数量 Number of animals	乳酸 Lactic acid (mmol/L)	乳酸脱氢酶 Lactic dehydrogenase (U/L)
空白对照 Control	0	10	11.74 ± 0.10	4524.59 ± 2712.61
树莓果肉多糖低剂量 RPP-L	50	10	$10.83 \pm 0.18^{**}$	6918.03 ± 2697.21
树莓果肉多糖中剂量 RPP-M	100	10	$10.30 \pm 0.05^{**}$	$37967.21 \pm 15729.42^{**}$
树莓果肉多糖高剂量 RPP-H	200	10	$9.13 \pm 0.23^{**}$	$97180.33 \pm 2191.45^{**}$

3.9 树莓果肉多糖对小鼠血清中尿素氮和肌酸激酶的影响

由表 10 可见, 树莓果肉多糖处理过的小鼠运动

后血清中的平均尿素氮含量和肌酸激酶活性较空白对照组都有明显的下降, 且两者与树莓果肉多糖的浓度呈负相关。树莓果肉多糖低剂量组小鼠运动后

平均血清尿素氮含量和肌酸激酶活性分别为 0.773 ± 0.068 mmol/L 和 1.393 ± 0.176 U/mL, 与对照相比无显著性差异。树莓果肉多糖中、高剂量组小鼠运动后平均血清尿素氮含量和空白对照的结果进行比较后发现, 存在差异显著 ($P < 0.05$) 和差异极显著 ($P < 0.01$), 基于肌酸激酶活性进行对比分析, 同血清尿素氮含量的结果。

血清中含有尿素氮以及肌酸激酶, 有研究发现二者含量能够显著影响到运动适应性, 含量越低, 则机体的运动适应性越强^[20]。在本研究中, 与空白对照相比, 树莓果肉多糖在 100 ~ 200 mg/kg 浓度时能显著降低小鼠运动后血清中尿素氮含量和肌酸激酶活性。说明树莓果肉多糖能通过增强小鼠的运动适应性达到抗疲劳效果。

表 10 树莓果肉多糖对小鼠血清中尿素氮和肌酸激酶的影响

Table 10 Effects of RPP on urea nitrogen and creatine kinase in serum of mice

组别 Group	记录 Dose (mg/kg)	动物数量 Number of animals	尿素氮 Urea nitrogen (mmol/L)	肌酸激酶 Creatine kinase (U/mL)
空白对照 Control	0	10	0.869 ± 0.033	1.264 ± 0.194
树莓果肉多糖低剂量 RPP-L	50	10	0.773 ± 0.068	1.393 ± 0.176
树莓果肉多糖中剂量 RPP-M	100	10	$0.716 \pm 0.032^*$	$0.886 \pm 0.041^*$
树莓果肉多糖高剂量 RPP-H	200	10	$0.643 \pm 0.048^{**}$	$0.501 \pm 0.020^{**}$

以上研究结果与很多植物多糖抗疲劳的研究结果相似, 如魔芋多糖可以明显延长游泳时间, 显示出良好的抗疲劳作用^[21]; 又如巴戟天多糖能降低 NIH 小鼠体内的尿素氮和乳酸含量, 升高肝糖原含量, 达到抗疲劳的效果^[22]。

4 结论

树莓果肉多糖超声提取的最佳工艺条件为提取温度 58 °C、提取时间 84 min、超声功率 58 W、料液比 1:20, 其平均提取得率为 11.75%。初步结构分析发现树莓果肉多糖含有半乳糖、鼠李糖、葡萄糖、木糖、甘露糖以及阿拉伯糖 6 种单糖类型, 阿拉伯糖和葡萄糖含量较高; 其具有典型的多糖红外光谱吸收峰, 在电镜下表面粗糙, 呈大小不一的卵圆形颗粒。抗疲劳实验结果表明, 树莓果肉多糖能有效提高游泳小鼠的运动耐力和运动适应性, 维持血糖及糖原水平, 减少乳酸产生, 加速其清除, 显示出较好的抗疲劳活性。下一步我们将进一步从细胞和分子水平揭示其抗疲劳的深层机理, 为树莓多糖的开发应用夯实理论基础。

参考文献

- Chen Q, Zong W, Sun MY, et al. Effect of four different yeast strains on passion raspberry wine brewing[J]. North Hortic (北方园艺), 2019(22): 114-120.
- Gao MM, Li SW, Zhu HY, et al. Structure of polysaccharide and its resistance to GMC proliferation activity from *Irpex lacteus*[J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发),

- 2019, 31: 1954-1959.
- Yi P, Li N, Wan JB, et al. Structural characterization and antioxidant activity of a heteropolysaccharide from *Ganoderma capense*[J]. Carbohydr Polym, 2015, 121: 183-189.
- Yu Z, Liu L, Xu Y, et al. Characterization and biological activities of a novel polysaccharide isolated from raspberry (*Rubus idaeus* L.) fruits[J]. Carbohydr Polym, 2015, 132: 180-186.
- Yang Y, Xu H, Suo Y, et al. Raspberry pulp polysaccharides inhibit tumor growth via immunopotential and enhance docetaxel chemotherapy against malignant melanoma *in vivo*[J]. Food Funct, 2015, 6: 3022-3034.
- Mierczynska J, Cybulska J, Zdunek A, et al. Rheological and chemical properties of pectin enriched fractions from different sources extracted with citric acid[J]. Carbohydr Polym, 2017, 156: 443-451.
- He YF, Yang RM, Hu N, et al. Optimization of extraction process of polysaccharides from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) by response surface methodology[J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2012, 24: 1463-1467.
- Yang YJ, Han LJ, Suo YR. Analysis the monosaccharide composition in raspberry polysaccharides by gas chromatography-mass spectrometry[J]. Chin J Anal Lab (分析实验室), 2015, 34: 688-691.
- Zhao K, Xie HX, Zhang N. Optimization of ultrasound extraction technology of total saponins from *Clematis intricata* Bunge by response surface method[J]. China J Tradit Chin Med Pharm (中华中医药杂志), 2015, 30: 1239-1241.

- 10 Huang H, Wu M, Yang H, et al. Structural and physical properties of sanxan polysaccharide from *Sphingomonas sanxanigenens* [J]. Carbohydr Polym, 2016, 144: 410-418.
- 11 Jeong HK, Lee D, Kim HP, et al. Structure analysis and antioxidant activities of an amylopectin-type polysaccharide isolated from dried fruits of *Terminalia chebula* [J]. Carbohydr Polym, 2019, 211: 100-108.
- 12 Gao X, Qu H, Shan S, et al. A novel polysaccharide isolated from *Ulva pertusa*: structure and physicochemical property [J]. Carbohydr Polym, 2020, 233(1): 115849.
- 13 Li B, Zhang N, Xue D, et al. Structural analysis and antioxidant activities of neutral polysaccharide isolated from *Epimedium koreanum* Nakai [J]. Carbohydr Polym, 2018, 196: 246-253.
- 14 Jing YS, Cui XL, Chen ZY, et al. Elucidation and biological activities of a new polysaccharide from cultured *Cordyceps militaris* [J]. Carbohydr Polym, 2014, 102: 288-296.
- 15 Chiantore O, Riedo C, Scalzone DM, et al. Gas chromatography-mass spectrometric analysis of products from on-line pyrolysis/silylation of plant gums used as binding media [J]. Int J Mass Spectrom, 2009, 284(1): 35-41.
- 16 Hu JW, Luo B, Wu L, et al. Physicochemical characterization and antioxidant and immunomodulatory activity of polysaccharides from *Gynura procumbens* stem [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2019, 31: 1299-1306.
- 17 Teng X. Studies on extraction, purification, structure analysis and biological activity of polysaccharides in raspberry fruit [D]. Harbin: Northeast Agricultural University(东北农业大学), 2014.
- 18 Ye M, Wen Z, Huang JZ, et al. Effects of *Dictyophora rubroalbata* polysaccharide on anti-fatigue and hypoxia endurance in mice [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2016, 28: 416-419.
- 19 Wu LW, Chen N. Progress in understanding the mechanism of exercise-induced fatigue and its regulation by soybean peptide [J]. Food Sci(食品科学), 2019, 40(17): 302-308.
- 20 Tung YT, Wu MF, Lee MC, et al. Anti fatigue activity and exercise performance of phenolic-rich extracts from *Calendula officinalis*, *Ribes nigrum*, and *Vaccinium myrtillus* [J]. Nutrients, 2019, 11(8): 1715.
- 21 Gong P, Wang S, Du C, et al. Anti-fatigue and anti-hyperglycemic activities of two konjac polysaccharides [J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技), 2019, 40(7): 259-262.
- 22 Liang XJ, Wei BD, Chen Q, et al. Optimization of polysaccharide extraction process from *Morinda officinalis* how and its biological activity *in vitro* and *in vivo* [J]. Food Mach(食品与机械), 2018, 34(7): 158-163.
- (上接第 2072 页)
- 15 Yang J, Fei JX, Su HJ, et al. Flavonoids from the flowers of *Sophora davidii* and their anti-tobacco mosaic virus activities [J]. Nat Prod Commun, 2019, 14: 1-4.
- 16 Manel H, Afifa ZB, Fethia HS, et al. Isolation and structure elucidation of secondary metabolites from the roots of the tunisian *Convolvulus dorycnium* [J]. Chem Nat Compd, 2016, 52: 830-833.
- 17 Wei Q, Wang Q, Sun CZ, et al. Two new furofuran lignan glycoside derivatives from the fruit of *Forsythia suspensa* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2020, 22: 803-809.
- 18 Jiang H, Yang L, Xing XD, et al. Chemical constituents from fruits of *Xanthium sibiricum* [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2017, 48(1): 47-51.
- 19 Thuy NTK, Trang DT, Trang MTN, et al. Flavonol glycosides and dammarane saponin from *Gouania leptostachya* [J]. Vietnam J Chem, 2019, 57: 277-280.
- 20 Zhao Y, Zhao K, Jiang K, et al. A review of flavonoids from cassia species and their biological activity [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2016, 17: 1134-1146.
- 21 Yang J, Huang TJ, Luo JF, et al. Chemical constituents from *Leea asiatica* [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2018, 30: 1382-1386.