

邢艺缤, 王馨悦, 王慕尧, 等. 人参不定根总皂苷的提取工艺优化及其抗氧化与抗疲劳作用 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(6): 193–201. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023050180

XING Yibin, WANG Xinyue, WANG Muyao, et al. Process Optimization of Total Saponins from Adventitious Roots of Ginseng and Their Antioxidant and Anti-fatigue Effects[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(6): 193–201. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023050180

· 工艺技术 ·

人参不定根总皂苷的提取工艺优化及其 抗氧化与抗疲劳作用

邢艺缤¹, 王馨悦¹, 王慕尧¹, 齐欣^{1,*}, 崔承弼^{1,2,*}

(1. 延边大学农学院, 吉林延吉 133000;

2. 延边大学药学院, 吉林延吉 133000)

摘要:目的: 探究人参不定根总皂苷 (ginseng adventitious roots total saponins, GARS) 的最佳提取工艺及抗氧化和抗疲劳作用。方法: 利用乙醇回流法提取 GARS, 通过正交试验考察乙醇浓度、料液比、提取温度、提取时间对 GARS 含量的影响; 以 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH)、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸) 二铵盐 (ABTS⁺)、3-氧代-2-苯基-4,4,5,5-四甲基咪唑啉-1-氧 (PTIO)、羟自由基 ($\cdot\text{OH}$)、超氧阴离子自由基 ($\text{O}_2^{\cdot-}$) 清除能力及还原力作为测定抗氧化活性指标; 通过测定小鼠力竭游泳和爬杆时间, 测定肌/肝糖原、乳酸 (LD)、尿素氮 (BUN) 含量及乳酸脱氢酶 (LDH) 活性来判定 GARS 抗疲劳能力。结果: 通过正交试验得到最佳提取工艺条件为乙醇浓度 70%、料液比 1:30 g/mL、提取温度 70 °C、提取时间 40 min, 得到 GARS 含量为 107.85 mg/g; GARS 对 DPPH、ABTS⁺、PTIO、OH、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 自由基都有一定程度清除作用, 且具有还原性, 其清除能力和还原性与浓度呈正比; GARS 能够显著延长小鼠力竭游泳和爬杆时间 ($P < 0.05$), 显著增加肌/肝糖原含量 ($P < 0.05$), 降低 LD、BUN 含量, 提高 LDH 活性, 并与其浓度呈正比。结论: GARS 提取的最优条件为乙醇浓度 70%、料液比 1:30 g/mL、提取温度 70 °C、提取时间 40 min, 可为 GARS 产业化生产提供依据, 且 GARS 具有一定的抗氧化和抗疲劳作用, 可为明确人参不定根营养成分和活性物质提供理论支持, 为开发人参不定根药食同源的相关产品提供技术参考。

关键词: 人参不定根, 总皂苷提取物, 工艺优化, 抗氧化, 抗疲劳

中图分类号: TS201.4

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2024)06-0193-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023050180



本文网刊:

Process Optimization of Total Saponins from Adventitious Roots of Ginseng and Their Antioxidant and Anti-fatigue Effects

XING Yibin¹, WANG Xinyue¹, WANG Muyao¹, QI Xin^{1,*}, CUI Chengbi^{1,2,*}

(1. Agricultural College, Yanbian University, Yanji 133000, China;

2. School of Pharmacy, Yanbian University, Yanji 133000, China)

Abstract: Objective: To investigate the optimal extraction process and antioxidant and anti-fatigue activities of ginseng adventitious roots total saponins (GARS). Methods: GARS was extracted using ethanol reflux method, and the effects of different factors such as ethanol concentration, solvent-to-solid ratio, extraction temperature, and extraction time on the content of GARS were studied by orthogonal test. The antioxidant and anti-fatigue activities of GARS were determined by measuring the scavenging abilities of DPPH, ABTS⁺, PTIO, $\cdot\text{OH}$, and $\text{O}_2^{\cdot-}$, as well as the reducing power. The effects of GARS on the swimming and climbing times of mice, the contents of muscle/gallbladder glycogen, lactate (LD), and urea

收稿日期: 2023-05-16

基金项目: 长白山人参系列功能性化妆品的研究与开发 (2023C037-8)。

作者简介: 邢艺缤 (1999-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: 1711342935@qq.com。

* 通信作者: 齐欣 (1992-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 功能性食品, E-mail: qixin812@sina.com。

崔承弼 (1968-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品营养, E-mail: Cuichengbi@ybu.edu.com。

nitrogen (BUN) were determined to evaluate its anti-fatigue ability. Results: The optimal extraction conditions were ethanol concentration of 70%, solvent-to-solid ratio of 1:30 g/mL, extraction temperature of 70 °C, and extraction time of 40 min, with a GARS content of 107.85 mg/g. GARS showed significant antioxidant and anti-fatigue activities, with its antioxidant and reducing power being positively correlated with its concentration. GARS significantly prolonged the swimming and climbing times of mice ($P<0.05$), increased the contents of muscle/gallbladder glycogen ($P<0.05$), decreased the levels of LD and BUN, and increased the activity of lactate dehydrogenase (LDH), indicating its anti-fatigue ability. Conclusion: The optimal extraction process of GARS was ethanol reflux method with ethanol concentration of 70%, solvent-to-solid ratio of 1:30 g/mL, extraction temperature of 70 °C, and extraction time of 40 min. GARS showed significant antioxidant and anti-fatigue activities, which can support the development of ginseng adventitious roots as a food or health supplement ingredient.

Key words: ginseng adventitious roots; total saponins extract; process optimization; antioxidation; antifatigue

疲劳是指由于运动过度而引起的机能生理功能减弱,导致不能持续维持特定的运动水平的现象,即运动性疲劳^[1]。通常会表现为极度疲倦、疲惫或虚弱,若疲劳不能及时消除,还可造成一系列继发性问题,如焦虑、失眠、抑郁、身体功能障碍、认知障碍、能量失衡,严重甚至会导致与生物调节和免疫系统相关的严重疾病^[2-3]。疲劳的机制很复杂,主要包括以下几种理论,一种是LD和BUN等代谢物的过度产生和积累导致肌肉疲劳^[4];另一种是“自由基理论”,即自由基是体内各种生化反应的结果,具有强氧化性。自由基过度积累可导致生物大分子氧化,并影响人体器官。因此抗氧化和抗疲劳之间可能存在着关联^[5]。

人参(*Panax ginseng* C.A. Mey)具有很高的药用价值,其主要成分是人参皂苷,是人参中主要活性成分,属于固醇类化合物,又称为三萜皂苷。人参皂苷主要的功效与作用包括提高机体免疫力、抗菌、改善心脑血管的供血不足、调节中枢神经系统以及抗疲劳和延缓衰老等,人参开发前景巨大,但由于野生人参受气候环境的变化经常造成质量波动,且随着近年来野生人参资源被过度开采,再加上人工种植栽培时间长,易受环境因素影响,不能满足国内外市场的需要。因此使用组织培养技术诱导和大规模生产不定根,是缓解人参皂苷供给不足,实现可持续发展的有效手段^[6-7]。人参不定根(ginseng adventitious roots, GAR)是一种通过生物发酵技术培养出的人参组织培养物^[8],GAR在遗传信息层面与野生人参具有很高的相似性,还具有成本低、产量高、易于控制和生长周期短等独特优势^[9-10],可得到更多的生物量及代谢产物,其所产生的人参皂苷含量、种类也与天然人参相似。Murthy等^[11]通过高效液相色谱法对组织培养的山参不定根和栽培的高丽参根中的人参皂苷进行了化学分析,发现两种植物中活性成分都含有Rb1、Rc、Rd、Rg1等,且与正常人参相比,GAR中人参皂苷的含量更高。屈青松等^[12]优化了人参皂苷的提取工艺,提高人参皂苷转化率,并测定其具有抗氧化活性。蓝瑞高等^[13]研究发现人参皂苷可以增加肌/肝糖原含量,降低LA、BUN水平,有效缓解运动性疲劳。吕世鑫等^[14]研究发现西洋参不定根总皂苷

具有较好的DPPH和OH自由基清除能力,有较强的抗氧化性。目前GAR已批准认为与5年以下人参实质等同,可以作为新食品原料在食品中应用,但是利用生物反应器生产出的GAR,其化学成分积累及生物活性可能与传统人参相比具有其独特性,因此研究GAR中的总皂苷具有重要意义。

本试验以乙醇回流法提取的GARS为研究对象,采用单因素实验考察提取时间、提取温度、乙醇浓度、料液比对GARS得率的影响,进一步进行正交试验对GARS的提取工艺进行优化,测定其体外抗氧化活性,通过动物实验来评定其抗疲劳作用。本文探究了影响GARS含量的多种因素及抗氧化、抗疲劳作用,为GAR资源的开发利用提供了良好理论基础,为GAR作为一种良好的抗氧化剂原料和开发具有抗疲劳性质的功能性食品提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与amp;仪器

人参不定根 大连农科院提供,将其根洗净、切断、晒干;昆明小鼠 20只,雄性,2周龄,体重(18~22 g),延边大学实验动物中心提供,在恒温(23±2 °C)、相对湿度55%±10%的食品研究中心动物室饲养,动物许可号:SYXK(吉)2020-0009;人参皂苷Re标准品、ABTS 上海源叶生物科技有限公司;抗坏血酸(V_C) 国药集团化学试剂有限公司;DPPH、PTIO 梯希爱(上海)化成工发展有限公司;刺五加片 上海华源安徽仁济制药有限公司;肌/肝糖原测试盒、乳酸(LD)测试盒、乳酸脱氢酶(LDH)测试盒、尿素氮(BUN)测试盒 南京建成生物工程研究所。

DF-35型落地式连续投料粉碎机 温岭市林大机械有限公司;HWS-24型电热恒温水浴锅 上海一恒仪器有限公司;KQ3200DE型数控超声波清洗器 昆山超声仪器公司;DHG-9620A型立式鼓风干燥箱 上海百典设公司;LyoQuest-55型实验型冷冻干燥机 西班牙Telstar集团公司;N-1110型旋蒸支架 东京理化器械株式会社;SK-0180-E型摇床 大龙兴创试验仪器(北京)有限公司;TG16A-WS型离心机、BXM-30R型立式压力蒸汽灭菌 上海卢湘仪器有限公司;MS 3 basic型涡旋混匀器 德国IKA集

团; SP-Max3500FL 型多功能荧光酶标仪 上海闪谱生物科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 人参不定根总皂苷的提取 将 GAR 粉碎过 80 目筛, 得到粉末, 用 70% 乙醇溶液按料液比 1:10 浸泡过夜, 抽滤取上清液, 沉淀继续按料液比 1:10 添加 70% 乙醇溶液混匀, 重复抽滤步骤, 合并滤液。将上清液在 60 °C 条件下旋转蒸发, 将残留物溶解于蒸馏水中, 用水饱和正丁醇于分液漏斗中多次萃取至上层有机层澄清, 合并上层, 使用旋转蒸发器在 50 °C 下蒸发正丁醇部分, 加少量蒸馏水溶解后置于 -80 °C 冷冻, 冻干^[15]。

1.2.2 人参不定根总皂苷含量测定

1.2.2.1 标准曲线的制备 取人参 Re 对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液, 得到对照品溶液。精密吸取对照品溶液 20、40、80、120、160、200 μL , 分别置于具塞试管中, 低温挥去溶剂, 加入 1% 香草醛高氯酸试液 0.5 mL, 置 60 °C 恒温水浴充分混匀后加热 15 min, 立即用冰水冷却 2 min, 加入 77% 硫酸溶液 5 mL, 摇匀; 以对照品溶液作空白。消除气泡后按照“紫外-可见分光光度法”(通则 0401), 在 540 nm 的波长处测定吸光度^[16-17], 经测定 GARS 的标准曲线为 $y=1.9498x+0.0018$ ($R^2=0.9991$)。

1.2.2.2 总皂苷含量测定 根据中国药典 2015 版中人参总皂苷含量测定方法, 取待测品约 50 mg, 精密称定, 置于烧杯中, 用 25 mL 甲醇溶解并摇匀, 精密吸取 50 μL , 照 1.3.2.1 的方法, 测定吸光度, 带入 GARS 的标准曲线, 计算溶液中人参皂苷 Re 含量, 单位为 mg/g, 计算结果乘以校正系数 0.84, 即得^[18]。

1.2.3 单因素实验 在利用乙醇水浴浸提法对 GAR 中的皂苷提取时, 会有多种因素对提取效果产生影响。对主要影响因素: 乙醇浓度、料液比、提取温度和提取时间进行单因素实验^[19]。分别精密称取 4 g GAR 粉末 6 个样品, 确定提取时间 40 min, 提取温度 80 °C, 乙醇溶液浓度 70%, 料液比 1:35 g/mL。分别考察乙醇浓度(40%、50%、60%、70%、80%、90%), 料液比(1:20、1:25、1:30、1:35、1:40、1:45 g/mL), 提取温度(40、50、60、70、80、90 °C), 提取时间(10、20、30、40、50、60 min)对 GARS 含量的影响。

1.2.4 正交试验 在单因素实验结果的基础上, 选择

表 1 正交试验因素与水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平	因素			
	A 提取时间(min)	B 提取温度(°C)	C 乙醇浓度(%)	D 料液比(g/mL)
1	40	60	60	1:25
2	50	70	70	1:30
3	60	80	80	1:35

对 GARS 含量影响最大的 4 个因素^[20], 进行四因素三水平正交试验, 因素与水平见表 1。

1.2.5 人参不定根总皂苷抗氧化活性测定

1.2.5.1 DPPH 自由基清除能力测定 用蒸馏水配制浓度为 0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mg/mL 的人参不定根总皂苷提取液, 取不同质量浓度的样品溶液 20 μL 加入配置好的 DPPH 溶液 180 μL 并充分混匀, 在摇床 450 r/min 避光反应 20 min, 以蒸馏水作为空白对照, 以 Vc 作为阳性对照, 用酶标仪测量 560 nm 波长处各组的吸光值, 平行测定 3 次, 按公式(1)计算 DPPH 自由基清除率^[21]:

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

式中: A_0 为空白组吸光度; A_1 为实验组吸光度; A_2 为阴性对照组吸光度。

1.2.5.2 ABTS⁺自由基清除能力测定 用蒸馏水配制浓度为 0.1、0.15、0.2、0.25、0.3 mg/mL 的人参不定根总皂苷提取液, 取不同质量浓度的样品溶液 30 μL 加入配置好的 ABTS⁺溶液 270 μL 并充分混匀, 反应 10 min, 以蒸馏水作为空白对照, 以 Vc 作为阳性对照, 用酶标仪测量 405 nm 波长处各组的吸光值, 平行测定 3 次, 按公式(2)计算 ABTS⁺自由基清除率^[22]:

$$\text{ABTS}^+ \text{ 自由基清除率}(\%) = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100 \quad \text{式(2)}$$

式中: A_0 为空白组吸光度; A_1 为为实验组吸光度; A_2 为阴性对照组吸光度。

1.2.5.3 PTIO 自由基清除能力测定 用蒸馏水配制浓度为 0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mg/mL 的人参不定根总皂苷提取液, 取不同质量浓度的样品溶液 0.2 mL 加入配置好的 PBS 贮备液、PTIO 溶液, 水浴 37 °C 避光反应 3 h, 以 Vc 为阳性对照, 用酶标仪测量在 557 nm 波长处各组的吸光值, 平行测定 3 次, 按公式(3)计算 PTIO 自由基清除率^[23]:

$$\text{PTIO 自由基清除率}(\%) = \frac{(A_0 - A)}{A_0} \times 100 \quad \text{式(3)}$$

式中: A_0 为空白组吸光度; A 为实验组吸光度。

1.2.5.4 OH 自由基清除率的测定 用蒸馏水配制浓度为 0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mg/mL 的人参不定根总皂苷提取液, 取不同质量浓度的样品溶液 2 mL、2 mL FeSO₄ 溶液(10 mmol/L)、2 mL 水杨酸乙醇溶液(10 mmol/L)、再加入 2 mL H₂O₂ 溶液(8.8 mmol/L) 启动反应, 在 37 °C 恒温水浴加热 30 min, 以蒸馏水作为空白对照, 以 Vc 作为阳性对照, 用酶标仪测量 510 nm 波长处各组的吸光值, 平行测定 3 次^[24], 按公式(4)计算羟自由基清除率:

$$\text{OH自由基清除率}(\%) = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100$$

式(4)

式中: A_0 为空白组吸光度; A_1 为实验组吸光度; A_2 阴性对照组吸光度。

1.2.5.5 O_2^- 自由基清除率的测定 用蒸馏水配制浓度为 0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mg/mL 的人参不定根总皂苷提取液, 取不同质量浓度的样品溶液 0.2 mL, 加入 pH8.2 的 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 5.6 mL, 于 25 °C 水浴 20 min, 立即加入 3 mmol/L 邻苯三酚溶液 0.2 mL, 反应 5 min, 用酶标仪测量 510 nm 波长处各组的吸光值^[25], 平行测定 3 次, 按公式(5)计算 O_2^- 自由基清除率:

$$\text{O}_2^- \text{自由基清除率}(\%) = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100$$

式(5)

式中: A_0 为空白组; A_1 为实验组; A_2 为阴性对照组。

1.2.5.6 还原力的测定 用蒸馏水配制浓度为 0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mg/mL 的人参不定根总皂苷提取液, 取不同质量浓度的样品溶液 2.5 mL, 依次加入 2.5 mL 0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲溶液 (pH6.6), 2.5 mL 1% 的 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 溶液, 于 50 °C 水浴 20 min, 再加入 2.5 mL 10% 的三氯乙酸溶液, 4000 r/min 下离心 10 min。取 2.5 mL 上清液, 加入 2.5 mL 蒸馏水, 0.5 mL 0.1% 的 FeCl_3 溶液, 混匀反应 10 min, 以 V_c 为阳性对照, 用酶标仪测量 700 nm 波长处各组的吸光值^[26], 平行三次测定。

1.2.6 试验动物分组与给药 将 20 只昆明鼠平均分成五组, 每组各 4 只, 依次分为空白对照组(蒸馏水)、阳性对照组(刺五加 500 mg/kg·BW)、高剂量组(GARS 500 mg/kg·BW)、中剂量组(GARS 250 mg/kg·BW)、低剂量组(GARS 50 mg/kg·BW)^[27], 正常饲养, 并每天记录体重, 适应性培养 7 d 后连续灌胃 28 d^[28]。

1.2.7 小鼠爬杆时间测定 第 28 d 灌胃 1 h 后, 进行小鼠爬杆实验。准备一根表面光滑的塑料棒, 并把爬杆架放置于水温 20~25 °C、水深约 30 cm 的水箱中进行试验, 将小鼠放置在塑料棒的顶端, 使其肌肉处于静力紧张状态, 记录小鼠从爬杆开始, 持续到肌肉疲劳, 无力抱住塑料棒而掉落到水中的时间。按照此方法, 于小鼠第 3 次跌落时停止实验, 累计 3 次的总时间作为爬杆时间, 爬杆结束后将小鼠擦干继续饲养^[29]。

1.2.8 小鼠力竭游泳时间测定 待小鼠休息一晚后, 将小鼠放置于水温 20~25 °C、水深约 30 cm 的游泳箱中进行游泳实验, 时刻观察小鼠, 要保证小鼠尾部不触碰游泳箱底部, 当发现小鼠静止漂浮于水面时用玻璃棒轻轻敲击小鼠身体, 使其肌肉一直处于紧张状

态, 让小鼠不停的游泳。小鼠游泳力竭表现为头部沉入水中并在 10 s 内不露出水面, 将其捞出并记录时间^[30]。

1.2.9 小鼠基础指标的测定

1.2.9.1 小鼠试验前后体重、体重增加量测定 每天在灌胃前测量小鼠的体重^[31] 并加以记录, 于 28 d 后依据各组数据进行分析。

1.2.9.2 小鼠肌糖原/肝糖原含量的测定 小鼠在力竭游泳实验后休息 0.5 h, 用乙醚迷晕后取眼球血, 装入 EP 试管中。将小鼠脱颈取出小鼠的肝脏、腿部肌肉, 将其浸泡于生理盐水漂洗后, 滤纸吸干, 称重(样品重量 ≤ 100 mg 为宜, 不要 >100 mg), 具体试验操作方法按照试剂盒说明书, 对肌糖原/肝糖原含量进行测定。

1.2.9.3 小鼠血液中乳酸、乳酸脱氢酶、尿素氮含量的测定 用乙醚将小鼠迷晕后取眼球血, 装入 EP 试管中, 置于冰袋上保持低温。将得到的血液进行离心, 转速 3000 r/min, 温度 25 °C, 时间 10 min 后, 按照试剂盒说明书, 吸取上层血清测定乳酸、乳酸脱氢酶、尿素氮含量。

1.3 数据处理

使用 Origin 软件对数据进行统计并绘制图表, 以均值 \pm 标准偏差的形式表示; 利用 SPSS 22.0 进行统计学分析, 采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示存在显著性差异, $P > 0.05$ 表示无显著性差异。

2 结果与分析

2.1 人参不定根总皂苷提取工艺单因素实验结果

如图 1A 所示, 随着乙醇浓度的增加, GARS 含量也随之提高, 当乙醇浓度达到 70% 时, GARS 含量最高。而当乙醇浓度持续增加, GARS 含量会有所下降, 其极性降低, 这是因为乙醇浓度的不同导致极性也不同, 70% 乙醇极性与 GARS 极性相似, 根据相似相溶原理, 得率较高, 但乙醇浓度超出一定范围时, 提取溶剂与 GARS 极性会有很大差别, 某些脂溶性物质的溶出量增加, 各种杂质增多, 会对皂苷的浸出有一定的影响, 从而导致总皂苷含量降低, 所以 70% 的乙醇溶液为最佳溶剂体积分数。

如图 1B 所示, 当料液比增加, GARS 含量呈现出递增趋势, 在料液比 1:30 g/mL 时, GARS 含量最大, 之后呈现出下降趋势, 其原因是当溶剂量增加时, 试样与溶剂的接触面积也会随之增加, 在料液比 1:30 g/mL 时, 溶剂充分包裹试样, 然后持续增大溶剂量, 不会影响 GARS 的含量。另外, 随着溶剂量的增加, 非皂苷的杂质溶出也会随之增大, 从而阻碍 GARS 的溶出, 并降低其含量, 因此最优料液比是 1:30 g/mL。

如图 1C 所示, 温度在 40~70 °C, GARS 含量随温度的增大而增大, 当温度高于 70 °C, GARS 含量达到峰值, 温度上升到 90 °C, GARS 含量也随之下

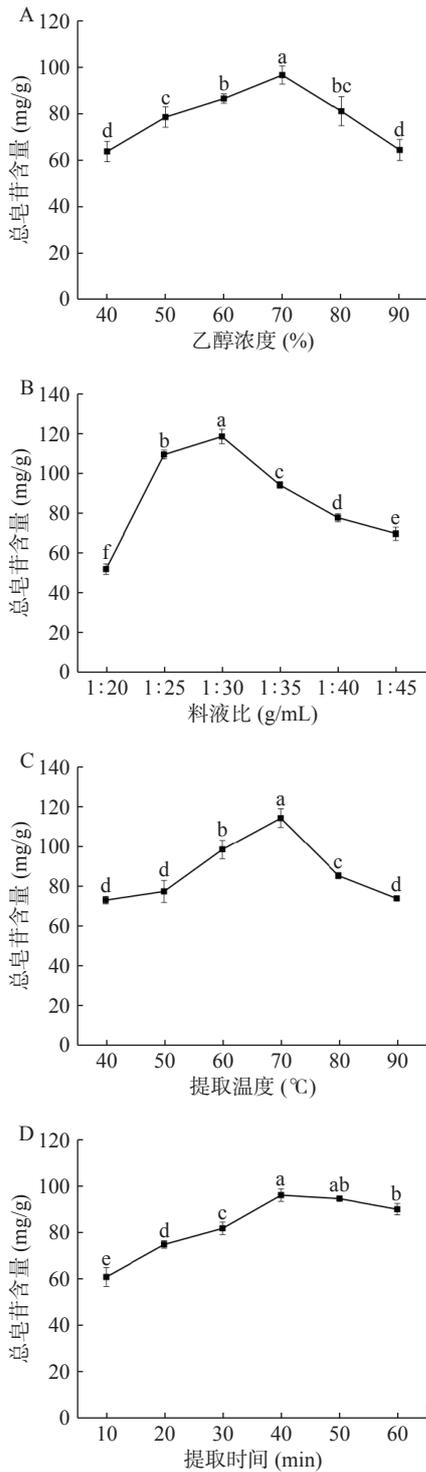


图 1 乙醇浓度(A)、料液比(B)、提取温度(C)和提取时间(D)对总皂苷含量的影响

Fig.1 Effects of ethanol concentration (A), solvent-to-solid ratio (B), extraction temperature (C), and extraction time (D) on the total saponin content

注: 不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。

降,但随着温度的升高,分子的热量提高溶液的粘度,总皂苷萃取系数的增加随水解速度的增加而增加;但温度过高易分解总皂苷的分子结构,对总皂苷的分子结构造成损伤,使其含量下降,因此 70 °C 是提取最佳温度。

如图 1D 所示,提取时间低于 40 min, GARS

含量随提取时间的延长而增加,在 40 min 时达到高峰值,在超过 40 min 后则渐趋稳定,但随着提取时间的逐步拉长, GARS 含量有小幅降低,可能由于在最初阶段萃取溶液迅速包裹试样,提取液中皂苷类物质浓度迅速增加,而随着浸泡时间的增长,试样在提取液中慢慢沉淀,从而使得提取液中的有效物质降低,所以 40 min 是最佳提取时间。

2.2 人参不定根总皂苷提取正交试验结果

在单因素实验的基础上,进行四因素三水平正交试验,正交试验结果与分析见表 2。

表 2 正交试验结果与分析

Table 2 Experimental results and analyses for optimization of total flavonoids

实验号	A 提取时间 (min)	B 提取温度 (°C)	C 乙醇浓度 (%)	D 料液比 (g/mL)	总皂苷含量 (mg/g)
1	40	60	60	1:25	89.67
2	40	70	70	1:30	107.85
3	40	80	80	1:35	86.38
4	50	60	70	1:35	89.93
5	50	70	80	1:25	90.79
6	50	80	60	1:30	97.74
7	60	60	80	1:30	95.53
8	60	70	60	1:35	86.67
9	60	80	70	1:25	90.46
K_{1j}	283.90	275.03	274.28	270.92	835.02(T)
K_{2j}	278.36	285.51	288.14	301.12	
K_{3j}	272.86	274.58	272.70	263.08	
$^*K_{1j}$	94.63	91.68	91.43	90.31	
$^*K_{2j}$	92.79	95.17	96.05	100.37	
$^*K_{3j}$	90.95	91.53	90.90	87.69	
极差R	1.83	3.64	5.15	12.68	

由表 2 可知,依据直观分析法中极差 R 的大小,对因素进行主次排列,次序为: D>C>B>A,即料液比是最主要的因素,其次为乙醇浓度,其最佳组合为 $A_1B_2C_2D_2$ 。由表 3 可知,乙醇浓度、料液比、提取温度和提取时间对 GARS 的得率均有显著影响 ($P < 0.05$)。因此 GARS 含量最高时的正交试验最佳方案为:乙醇浓度 70%,料液比 1:30 g/mL,提取温

表 3 方差分析结果

Table 3 Analysis of variance results

源	III类平方和	自由度	均方	F	显著性
修正模型	9211.073 ^a	8	1151.384	256.843	显著
截距	151839.072	1	151839.072	33871.271	显著
A	2061.787	2	1030.894	229.965	显著
B	2917.242	2	1458.621	325.380	显著
C	915.860	2	457.930	102.152	显著
D	3316.183	2	1658.092	369.876	显著
误差	40.345	9	4.483		
总计	161090.491	18			
修正后总计	9251.418	17			

度 70 °C, 提取时间 40 min, 该条件下提取到的 GARS 含量为 107.85 mg/g。方差分析结果如表 3 所示。

2.3 人参不定根总皂苷抗氧化活性测定

DPPH 自由基在有机溶剂中长期存在的, 其在波长 715 nm 处的吸收能力最强。当 DPPH 被清除时, 其在最大吸收波长 715 nm 处可以检测到吸光值逐渐减小, 来判断抗氧化活性的强弱。由图 2A 可知, 随着浓度的不断增加, GARS 对 DPPH 自由基的清除能力逐渐加强, 并且在浓度 0.4~1.2 mg/mL, GARS 对 DPPH 自由基清除率均有显著性差异 ($P < 0.05$), 但浓度在 1.2~2.0 mg/mL, GARS 对 DPPH 自由基清除率逐渐放缓。由此可见, GARS 对 DPPH 自由基具有一定的清除作用。

过硫酸钾与 ABTS⁺反应生成稳定的阳离子自由基, GARS 与自由基反应, 使反应体系褪色, 以此来检测样品的抗氧化能力。由图 2B 可知, GARS 对 ABTS⁺自由基的清除能力随着浓度增大而逐渐加

强。虽然在浓度 0.4~2 mg/mL, GARS 对 ABTS⁺自由基清除率均有显著性差异 ($P < 0.05$), 但与 V_C 相比有较大的差距。由此可见, GARS 对 ABTS⁺自由基有一定程度的清除作用。

PTIO 溶解后为紫色溶液, 当有抗氧化剂清除 PTIO 时, 溶液颜色会减淡, 通过测量吸光度的改变可以测量抗氧化活性。PTIO 有良好的稳定性, 呈剂量依赖性关系且测量简单直接。由图 2C 可知, 随着浓度的不断增加, GARS 对 PTIO 自由基的清除能力逐渐加强。GARS 浓度在 0.4~2.0 mg/mL, 其对 PTIO 自由基清除率均有显著性差异 ($P < 0.05$)。由此可见 GARS 对 PTIO 自由基具有一定的清除能力。

OH 自由基是活性氧自由基中毒性最大的一种自由基, 若人体中有过多的 OH 自由基, 会影响细胞膜而产生活性氧和过氧化氢, 从而导致诸如易疲劳、老化、突变、动脉硬化等症状, 使人体的健康受到严重危害。由图 2D 可知, 随着 GARS 浓度的不断增加, OH 自由基的清除能力逐渐加强。GARS 浓度

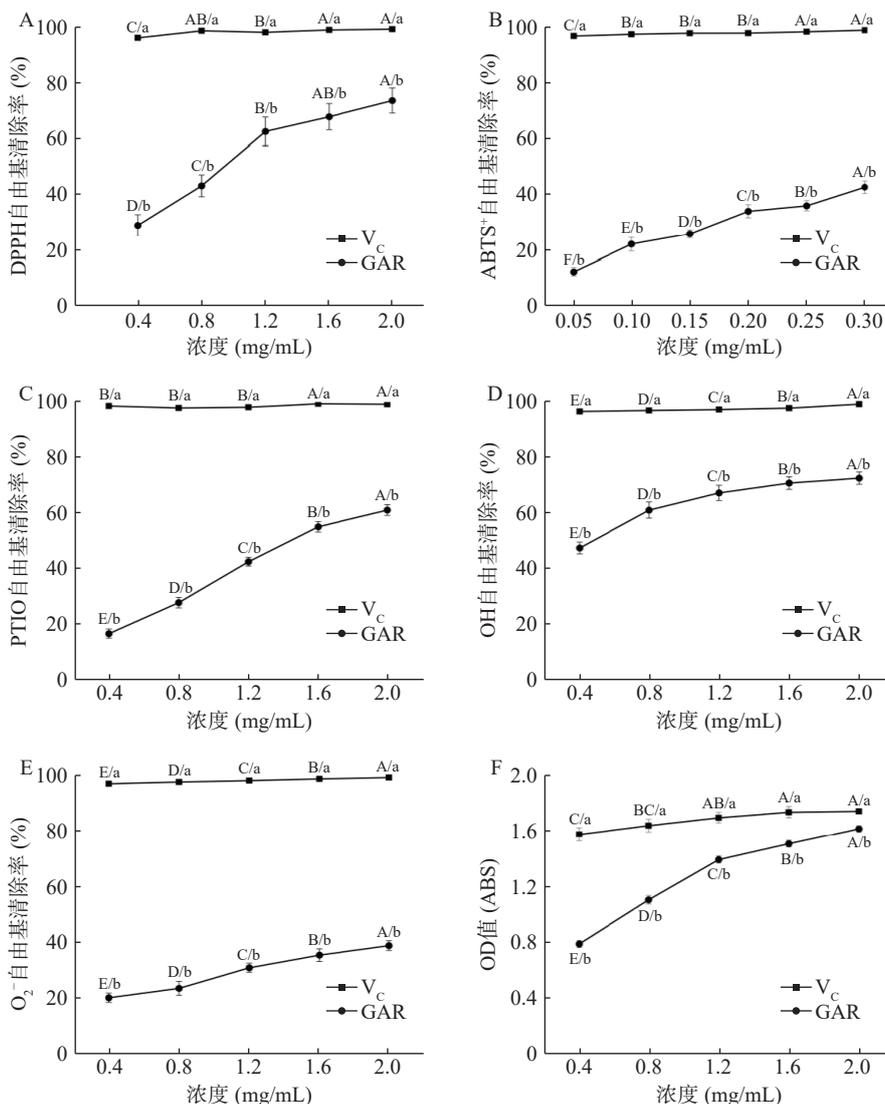


图 2 人参不定根总皂苷的抗氧化活性的测定结果

Fig.2 Determination results of antioxidant activity of GARS

注: 不同小写字母表示相同浓度不同样品之间差异显著 ($P < 0.05$); 不同大写字母表示同一样品不同浓度之间差异显著 ($P < 0.05$)。

从 0.4 mg/mL 增长到 2.0 mg/mL 过程中, 其对 OH 自由基清除率均有显著性差异($P<0.05$)。但随着浓度增长, 其对 OH 自由基清除能力逐渐趋于平稳。由此可见, GARS 对 OH 自由基具有一定程度的清除能力。

O_2^- 自由基是指在人体代谢中产生的未配对电子原子团, 虽然其氧化性与其他氧自由基比较弱, 但它在代谢过程中会分解成氧化性很强的单线态氧自由基或 OH 自由基, 从而造成生物大分子结构的变化或细胞组织损伤, 使人产生疲劳。由图 2E 可知, O_2^- 自由基清除率随 GARS 浓度的增加而升高, GARS 浓度在 0.4~2.0 mg/mL, 其对 O_2^- 自由基清除率均有显著性差异($P<0.05$), 但其对 O_2^- 自由基的清除率要远远低于 V_C 。由此可见, GARS 对 O_2^- 自由基仅仅只有一定程度的清除作用。

抗氧化活性的机制主要包括还原力机制, 链引发的抑制机制, 过渡金属离子催化剂的折叠机制, 过氧化物的分解和自由基清除机理。因此, 一种化合物的还原能力可以作为具有潜在抗氧化活性的一个重要指标。由图 2F 可知, 随着浓度不断升高, GARS 的还原性不断增强, 并且还原性与其浓度呈正相关。GARS 的最大 OD 值与 V_C 只相差了 0.13, 由此可见, GARS 具有较强的铁离子还原能力。

2.4 人参不定根总皂苷抗疲劳作用测定

2.4.1 人参不定根总皂苷对小鼠爬杆与力竭游泳时间的影响

小鼠爬杆和力竭游泳时间是评价抗疲劳能力的两种实验模型, 它们能够很好地评价小鼠的疲劳耐受能力, 再现性较高。由表 4 可知, 灌胃高剂量组时, 小鼠运动时间延长最多, 灌胃蒸馏水与灌胃低剂量组的爬杆时间不存在显著性差异($P>0.05$), 灌胃中剂量组、高剂量组与低剂量组的爬杆时间相比存在显著性差异($P<0.05$)。高、中、低剂量组均增加小鼠爬杆和力竭游泳时间, 高剂量组增加小鼠运动时间最多, 表明 GARS 具有增强疲劳小鼠运动耐力作用, 并随着浓度的增加, 效果越明显。

表 4 小鼠爬杆和力竭游泳时间结果

Table 4 Results of mice pole climbing and exhausted swimming time

组别	动物数(n)	爬杆运动时间(min)	游泳运动时间(min)
空白对照组	4	1.34±0.09 ^c	35.19±2.06 ^c
高剂量组	4	3.41±0.13 ^a	66.61±3.99 ^a
中剂量组	4	2.72±0.40 ^b	56.70±2.91 ^b
低剂量组	4	1.95±0.32 ^c	40.96±1.68 ^c
阳性对照组	4	2.06±0.74 ^c	45.90±3.33 ^b

注: 同列不同小写英文字母表示数据差异显著($P<0.05$)。

2.4.2 小鼠试验前后体重、体重增加量结果

体重变化可以直接反映小鼠运动量的多少。由表 5 可知, 经过 28 d 的灌胃后, 空白对照组小鼠体重增长较快; 灌胃刺五加提取物的阳性对照组小鼠体重较空白

对照组小鼠有下降; 灌胃蒸馏水小鼠的体重增加量与灌胃 GARS 的高、中、低剂量组的体重增加量存在显著性差异($P<0.05$), 相比于空白对照组小鼠, 高、中、低剂量组小鼠体重有明显降低, 其中高剂量组体重最轻, 表明小鼠运动加剧, 并随着 GARS 浓度增加, 小鼠运动量逐渐增加。

表 5 试验前后小鼠体重指标变化

Table 5 Mouse index results before and after the test

指标	空白对照组	高剂量组	中剂量组	低剂量组	阳性对照组
第 1 d 体重(g)	35.5±1.9 ^a	32.7±1.2 ^a	34.0±3.3 ^a	35.2±1.3 ^a	35.0±0.7 ^a
28 d 体重(g)	53.4±3.4 ^a	45.5±3.7 ^b	46.1±4.3 ^b	48.9±1.5 ^{ab}	50.4±3.1 ^{ab}
体重增加量(g)	17.9±4.5 ^a	13.3±2.6 ^b	11.8±1.0 ^b	13.6±0.9 ^b	15.4±2.9 ^a

注: 同行不同小写英文字母表示数据差异显著($P<0.05$)。

2.4.3 小鼠肌糖原和肝糖原含量测定结果

糖原是主要的能源储备物质, 糖和糖原在体内可以相互转化。在机体调节下, 血糖浓度高时, 糖可以转化为糖原储存; 血糖浓度低时, 糖原又可以转化为糖释放到血液中, 以维持血糖浓度。所以, 糖原储备的多少直接影响运动能力的强弱。在机体剧烈运动时, 肝糖原可以转化为糖进入血液而供能; 肌糖原通过无氧酵解, 直接为肌肉供能, 以延长运动时间。因此, 能量储备物质肝糖原和肌糖原可以作为机体抗疲劳指标。由表 6 可知, 灌胃蒸馏水小鼠的肌/肝糖原含量与低剂量组相比不存在显著性差异($P>0.05$), 灌胃中剂量组、高剂量组的肌/肝糖原含量与低剂量组相比存在显著性差异($P<0.05$)。低剂量组灌胃剂量较少, 对肌/肝糖原含量影响较小, 因此与空白对照组相比差异不显著($P<0.05$)。而高剂量组灌胃剂量最多, 小鼠肌/肝糖原含量最高, 所以高剂量对提高小鼠肌/肝糖原含量最有效, 表明 GARS 能增加小鼠体内肌/肝糖原的贮存, 从而为运动提供更多能量。

表 6 各组小鼠肌糖原与肝糖原含量

Table 6 Muscle glycogen and liver glycogen content in mice of each group

组别	动物数(n)	肌糖原含量(mg/g)	肝糖原含量(mg/g)
空白对照组	4	1.23±0.06 ^c	16.17±0.47 ^c
高剂量组	4	1.55±0.03 ^a	19.73±1.20 ^a
中剂量组	4	1.39±0.08 ^b	18.29±0.56 ^b
低剂量组	4	1.28±0.09 ^c	17.06±0.40 ^c
阳性对照组	4	1.34±0.18 ^b	17.48±0.58 ^b

注: 同列不同小写英文字母表示数据差异显著($P<0.05$)。

2.4.4 小鼠乳酸、尿素氮含量和乳酸脱氢酶活性测定结果

长时间的剧烈运动会增加肌肉的氧气消耗, 导致机体相对缺氧, 此时肌肉中的糖原会被分解产生乳酸, 为机体提供能量。但大量乳酸的产生则会影响到机体内环境的酸碱平衡, 引起肌肉酸痛, 导致肌肉运动能力下降。同时为了满足能量需求, 蛋白质的代谢显著增加, 使肝脏中的尿素水平明显增加, 过量的尿

素会在体内积累并对机体造成危害。BUN的含量在一定程度上可以反映机体的疲劳程度。LDH的主要作用是将肌肉中过多乳酸转变为丙酮酸,从而减少乳酸的积累。LDH活力越强,乳酸的转变越多,抗疲劳性就越强。由表7可知,灌胃蒸馏水小鼠的LD含量与低剂量组相比存在显著性差异($P<0.05$),灌胃中剂量组与低剂量组相比不存在显著性差异($P>0.05$)。空白对照组小鼠LD含量最高,高剂量组LD含量最低。灌胃高剂量组时对于降低LD含量最有效;灌胃蒸馏水小鼠的BUN含量与低剂量组相比存在显著性差异($P<0.05$),灌胃中剂量组与低剂量组相比不存在差异性显著($P>0.05$)。空白对照组小鼠BUN含量最高,高剂量组BUN含量最低,灌胃高剂量组对于降低BUN含量最有效,表明GARS能减少蛋白质分解,降低疲劳小鼠血清尿素氮的生成;灌胃蒸馏水小鼠的LDH活性与低剂量组相比存在显著性差异($P<0.05$),灌胃中剂量组与低剂量组相比存在显著性差异($P<0.05$),灌胃高剂量组与中剂量组相比存在显著性差异($P<0.05$)。空白对照组LDH活性最低,高剂量组LDH活性最高。灌胃高剂量组时对于提高LDH活性最有效,表明随着GARS浓度增大,体内乳酸脱氢酶的活力增强,从而减少体内乳酸的累积。

表7 各组小鼠LD、BUN含量和LDH活性

Table 7 LD, BUN content and LDH activity of mice in each group

组别	动物数 (n)	LD含量 (mmol/L)	BUN含量 (mmol/L)	LDH活性 (U/L)
空白对照组	4	8.70±0.41 ^a	7.33±0.39 ^a	3617.73±241.23 ^d
高剂量组	4	5.26±0.34 ^c	6.02±0.29 ^c	5698.58±358.28 ^a
中剂量组	4	6.33±0.53 ^b	6.68±0.19 ^b	5054.08±634.96 ^b
低剂量组	4	7.13±0.98 ^b	6.94±0.24 ^b	4302.48±323.38 ^c
阳性对照组	4	7.28±0.62 ^b	7.00±0.43 ^b	4814.18±289.37 ^b

注:同列不同小写英文字母表示数据差异显著($P<0.05$)。

3 结论

本实验通过优化提取工艺,有效减少对提取活性成分的影响,缩短提取时间,从而提高GARS含量。通过体外抗氧化实验和动物实验,表明GARS具有抗氧化和抗疲劳活性,与人参总皂苷的功能相似。因此本研究为研发GARS抗氧化和抗疲劳相关药物和功能性食品等深加工产品提供理论基础和技术参考。但本试验没有测定体内抗氧化活性,难以反映GAR在体内真实的抗氧化水平,不能确定GARS是否有通过清除体内自由基来缓解疲劳的作用,有待进一步研究。

参考文献

[1] 陈慧,马璇,曹丽行,等.运动疲劳机制及食源性抗疲劳活性成分研究进展[J].食品科学,2020,41(11):247-258. [CHEN H, MA X, CAO L X, et al. Research progress on the mechanism of exercise fatigue and foodborne antifatigue active ingredients[J]. Food

Science, 2020, 41(11): 247-258.]

[2] LI Zilin, ZHU Hongkang, HUA Hanyi, et al. Anti-fatigue activity of brassica rapa l. extract and correlation among biochemical changes in forced swimming mice[J]. Food Bioscience, 2022, 47: 101633.

[3] WANG Yu, ZHANG Yubiao, HOU Mingxiao, et al. Anti-fatigue activity of parsley (*Petroselinum crispum*) flavonoids via regulation of oxidative stress and gut microbiota in mice[J]. Journal of Functional Foods, 2022, 89: 104963.

[4] 李秋阳,唐金鑫,刘士伟,等.黑参发酵对疲劳应激诱导氧化损伤的防护作用及与白参、红参和人参浆果的比较[J].食品科学,2022,43(21):226-232. [LI Q Y, TANG J X, LIU S W, et al. The protective effect of black ginseng fermentation on oxidative damage induced by fatigue stress and its comparison with white ginseng, red ginseng, and ginseng berries[J]. Food Science, 2022, 43(21): 226-232.]

[5] ZHU Song, YANG Wei, LIN Yue, et al. Antioxidant and anti-fatigue activities of selenium-enriched peptides isolated from *Cardamine violifolia* protein hydrolysate[J]. Journal of Functional Foods, 2021, 79: 104412.

[6] WANG Shihui, WANG June, LIANG Wenxia, et al. Promotion of ginsenosides production in a co-cultivation system of Panax ginseng adventitious roots and immobilized *Aspergillus niger*[J]. Industrial Crops & Products, 2019, 140(C): 111564.

[7] 苗佳琪.人参、西洋参不定根诱导及培养条件对其生长和皂苷含量的影响[D].长春:吉林农业大学,2022. [MIAO J Q. Effects of adventitious root induction and culture conditions on the growth and saponin content of ginseng and american ginseng[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2022.]

[8] 陈一豪,刘益凤,曲雪峰,等.人参不定根乙醇提取物保护肾丙肾上腺素诱导的心肌缺血作用研究[J].食品安全质量检测学报,2022,13(12):4014-4020. [CHEN Y H, LIU Y F, QU X F, et al. Study on the protective effect of ethanol extract from ginseng adventitious roots on isoproterenol induced myocardial ischemia[J]. Journal of Food Safety and Quality Testing, 2022, 13(12): 4014-4020.]

[9] 王曼莹,付宝玉,徐晓浩,等.人参组培不定根蛋白对小鼠的抗疲劳作用及其机制[J].吉林大学学报(医学版),2022,48(1):18-25. [WANG M Y, FU B Y, XU X H, et al. Antifatigue effect and mechanism of ginseng tissue cultured adventitious root protein on mice[J]. Journal of Jilin University (Medical Edition), 2022, 48(1): 18-25.]

[10] ZHANG L, QI X, LU X T, et al. Study on hypoglycemic effects of irradiated ginseng adventitious roots[J]. Food Chemistry: X, 2022, 13: 100234.

[11] MURTHY H N, DANDIN V S, LEE E J, et al. Efficacy of ginseng adventitious root extract on hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2014, 153(3): 917-921.

[12] 屈青松,林峰,赵崇妍,等.发酵乳杆菌发酵人参工艺优化及人参皂苷抗氧化活性测定[J].中成药,2020,42(10):2738-2743.

[QU Q S, LIN F, ZHAO C Y, et al. Optimization of ginseng fermentation by *Lactobacillus fermentans* and determination of antioxidant activity of Ginsenoside[J]. Chinese Patent Drug, 2020, 42(10): 2738-2743.]

[13] 蓝瑞高,梁益军.人参皂苷CK对力竭游泳大鼠抗疲劳作用及骨骼肌氧化应激的影响[J].云南农业大学学报(自然科学),2022,37(3):491-496. [LAN R G, LIANG Y J. Effects of Ginsenoside CK on anti fatigue and oxidative stress of skeletal muscle

- in exhaustive swimming rats[J]. *Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science)*, 2022, 37(3): 491-496.]
- [14] 吕世鑫,田潇然,王洪涛,等.西洋参不定根总皂苷的响应面优化提取工艺及抗氧化活性研究[J].*食品科技*,2019,44(9):248-254. [LÜ S X, TIAN X R, WANG H T, et al. Optimization of extraction process and antioxidant activity of total saponins from american ginseng adventitious roots by response surface methodology[J]. *Food Technology*, 2019, 44(9): 248-254.]
- [15] 宋志花,李盛红,杨刚强,等.人参皂苷类化合物样品前处理及分析检测[J].*化学进展*,2020,32(Z1):239-248. [SONG Z H, LI S H, YANG G Q, et al. Sample pretreatment and analysis of Ginsenoside[J]. *Progress in Chemistry*, 2020, 32(Z1): 239-248.]
- [16] 孙乐,李春梅,郭迎迎,等.人参花中总皂苷的提取工艺优选[J].*中国实验方剂学杂志*,2015,21(1):21-23. [SUN L, LI C M, GUO Y Y, et al. Optimization of extraction process for total saponins in ginseng flowers[J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2015, 21(1): 21-23.]
- [17] 徐启祥,鄢海燕,阮玲,等.Box-Behnken 响应面优化分光光度法测定瓜蒌总皂苷的显色条件[J].*国际药学研究杂志*,2017,44(1):65-69. [XU Q X, YAN H Y, RUAN L, et al. Optimization of coloring conditions for the determination of total saponins in fructus trichosanthes by box behnken response surface methodology[J]. *International Journal of Pharmaceutical Research*, 2017, 44(1): 65-69.]
- [18] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:2015年版一部[M].北京:中国医药科技出版社,2015. [Chinese Pharmacopoeia Commission. pharmacopoeia of the people's republic of china: 2015 Edition One[M]. Beijing: The Medicine Science and Technology Press of China, 2015.]
- [19] 程晶,雷建都,刘静,等.响应面法优化人参叶总皂苷提取工艺的研究[J].*北京林业大学学报*,2015,37(2):142-147. [CHENG J, LEI J D, LIU J, et al. Optimization of extraction process of total saponins from ginseng leaves using response surface methodology [J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2015, 37(2): 142-147.]
- [20] 刘斌,邵美玲,杨洋,等.重楼中4种皂苷提取方法的正交试验优化设计[J].*时珍国医国药*,2020,31(7):1591-1594. [LIU B, SHAO M L, YANG Y, et al. Orthogonal experimental optimization design of four saponin extraction methods from *Paris polyphylla*[J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2020, 31(7): 1591-1594.]
- [21] 葛思琪,赵庆生,孙广利,等.芦笋总皂苷的提取纯化及抗氧化研究[J].*食品研究与开发*,2018,39(20):57-62. [GE S Q, ZHAO Q S, SUN G L, et al. Extraction, purification and antioxidant study of total saponins from *Asparagus*[J]. *Food Research and Development*, 2018, 39(20): 57-62.]
- [22] WANG Yunxiao, GU Dongyu, LIU Chang, et al. Enrichment, analysis, identification and mechanism of antioxidant components in *toona sinensis*[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2022, 14: 100198.
- [23] 王钦波,王晓东.PTIO 自由基清除分析法的 PH 值效应与黄芩素及黄芩苷的构效分析[J].*现代医院*,2019,19(1):145-148,153. [WANG Q B, WANG X D. pH effect of ptio free radical scavenging assay and structure activity analysis of baicalein and baicalin[J]. *Modern Hospitals*, 2019, 19(1): 145-148,153.]
- [24] 农彦彦,吴子瑜,林诗莹,等.铁皮石斛花黄酮含量及其自由基清除力分析[J].*食品安全导刊*,2022,363(34):42-44,54. [NONG Y Y, WU Z Y, LIN S K, et al. Analysis of flavonoids content and free radical scavenging ability in *Dendrobium officinale* flower[J]. *Food Safety Guide*, 2022, 363(34): 42-44,54.]
- [25] 张璐.洋槐花总皂苷提取工艺及抗氧化活性研究[J].*饲料研究*,2022,45(1):82-86. [ZHANG L. Study on the extraction process and antioxidant activity of total saponins from *Robinia pseudoacacia* flower[J]. *Feed Research*, 2022, 45(1): 82-86.]
- [26] JUNG Jieun, JANG Hyeji, EOM Sujin, et al. Fermentation of red ginseng extract by the probiotic *lactobacillus plantarum* kccm 11613p: ginsenoside conversion and antioxidant effects[J]. *Journal of Ginseng Research*, 2019, 43(1): 20-26.
- [27] 王艳艳,翟春梅,申柯欣,等.东北刺人参抗疲劳及改善睡眠节律作用研究[J].*食品工业科技*,2020,41(2):307-311,323. [WANG Y Y, ZHAI C M, SHEN K X, et al. A study on the anti fatigue and improving sleep rhythm effects of northeast ginseng[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(2): 307-311, 323.]
- [28] 田沙沙.黄芪总皂苷抗小鼠运动疲劳作用及机制研究[D].南昌:江西科技师范大学,2021:11-13. [TIAN S S, Study on the anti exercise fatigue effect and mechanism of total saponins of *Astragalus membranaceus* in mice[D]. Nanchang: Jiangxi Science and Technology Normal University, 2021: 11-13.]
- [29] 藏威,李国金,耿红梅.欧亚旋覆花总黄酮增强小鼠/抗疲劳抗缺氧能力研究[J].*时珍国医国药*,2013,24(2):384-385. [ZANG W, LI G J, GENG H M. Study on the enhancement of mice/anti fatigue and anti hypoxia ability of total flavonoids from eurasian convolvulus[J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2013, 24(2): 384-385.]
- [30] 刘兴琴,丁济超,李继兴,等.西归粗多糖对运动疲劳小鼠的免疫调节作用[J].*食品工业科技*,2021,42(5):317-321,327. [LIU X Q, DING J C, LI J X, et al. Immunomodulatory effect of Xigui crude polysaccharide on exercise fatigue mice[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(5): 317-321,327.]
- [31] YU Yang, LIU Hao, NIE Jianing, et al. Acidic polysaccharides of mountain cultivated ginseng: the potential source of anti-fatigue nutrients[J]. *Journal of Functional Foods*, 2022, 95: 105198.