

郭畅, 李超, 侯明明, 等. 荔枝草多糖的提取工艺优化及其体外抗氧化、降血糖活性分析 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(20): 211–219. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021120280

GUO Chang, LI Chao, HOU Mingming, et al. Extraction Optimization and Its Inoxidizability and Hypoglycemic Properties *in Vitro* of Polysaccharide from *Salvia plebeia* R. Br.[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(20): 211–219. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021120280

· 工艺技术 ·

荔枝草多糖的提取工艺优化及其体外抗氧化、降血糖活性分析

郭 畅¹, 李 超¹, 侯明明², 白美玉¹, 周丛丛¹, 张海燕^{1,*}

(1. 河南大学生命科学学院, 河南开封 475000;

2. 河南开封科技传媒学院理工学院, 河南开封 475000)

摘 要: 本文分别采用水提取法和碱提取法对荔枝草粗多糖提取工艺进行优化, 比较了两种粗多糖体外抗氧化和降血糖的能力, 并通过红外光谱对两者的结构进行初探。结果表明, 水提取法的最佳提取工艺为: 提取次数为 4 次, 提取温度为 100 ℃, 料液比为 1:20 g/mL, 此条件下多糖得率为 2.86%。碱提取法的最佳提取工艺为: 碱液浓度为 0.3 mol/L, 提取温度为 100 ℃, 料液比为 1:15 g/mL, 此条件下多糖得率为 7.15%。两种粗多糖对 DPPH 自由基的最大清除率分别为 81.23% 和 45.02%, 对 ABTS⁺ 自由基的最大清除率分别为 88.70% 和 88.07%, 对超氧阴离子 (O₂⁻) 自由基清除率分别维持在 20% 和 25% 左右, 对 α -淀粉酶抑制率呈现依赖剂量的增加。水提粗多糖对 DPPH 自由基和 ABTS⁺ 自由基清除能力均比碱提粗多糖高, 两种多糖均具有一定的 O₂⁻ 自由基清除活性和 α -淀粉酶抑制活性。此外, 通过红外扫描光谱对比发现, 碱提粗多糖相比于水提粗多糖中的吡喃糖和羰基被破坏, 这可能是两者生物活性存在差异的原因。

关键词: 荔枝草多糖, 水提取法, 碱提取法, 抗氧化性, 降血糖

中图分类号: Q946.3

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2022)20-0211-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021120280



本文网刊:

Extraction Optimization and Its Inoxidizability and Hypoglycemic Properties *in Vitro* of Polysaccharide from *Salvia plebeia* R. Br.

GUO Chang¹, LI Chao¹, HOU Mingming², BAI Meiyu¹, ZHOU Congcong¹, ZHANG Haiyan^{1,*}

(1. College of Life Sciences, Henan University, Kaifeng 475000, China;

2. Institute of Science and Engineering, Henan Kaifeng Institute of Science and Technology Media College, Kaifeng 475000, China)

Abstract: Water extraction and alkali extraction were used to optimize the extraction process of polysaccharides *Salvia plebeia* R. Br.. Antioxidant and hypoglycemic abilities of the two crude polysaccharides were compared *in vitro*. The results showed that the best process of *Salvia plebeia* R. Br. polysaccharide by water extraction was as follows: The extraction times were 4 times, the extraction temperature was 100 ℃, the ratio of solid to liquid was 1:20 g/mL, and the yield of polysaccharide was 2.86%. The optimal extraction process of *Salvia plebeia* R. Br. polysaccharide by alkali extraction method was as follows: Alkali concentration was 0.3 mol/L, extraction temperature was 100 ℃, solid-liquid ratio was 1:15 g/mL, and the yield of polysaccharide was 7.15%. The maximum scavenging rates of the two crude polysaccharides on DPPH free radical were 81.23% and 45.02% respectively, the maximum scavenging rates on ABTS⁺ free radical were 88.70% and 88.07% respectively, and the scavenging rates on superoxide anion (O₂⁻) free radical were maintained at about 20% and 25% respectively, the inhibition rate of α -amylase increased in a dose-dependent manner. The scavenging ability

收稿日期: 2021-12-27

基金项目: 河南省教育厅项目 (222102110327)。

作者简介: 郭畅 (1995-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 生物制药, E-mail: change1024@126.com。

* 通信作者: 张海燕 (1977-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 生物制药, E-mail: zhanghy150@sina.com。

of water extracted crude polysaccharide on DPPH free radical and ABTS⁺ free radical was higher than that of alkali extracted crude polysaccharide. Both polysaccharides had certain O₂⁻ free radical scavenging activity and α -amylase inhibition. In addition, through the comparison of infrared scanning spectra, it was found that the pyranose and carbonyl groups in the alkali extracted crude polysaccharide were destroyed compared with those in the water extracted crude polysaccharide, which may be the reason for the difference of their biological activities.

Key words: *Salvia plebeia* R. Br. polysaccharide; water extraction; alkali extraction; inoxidizability; hypoglycemic

荔枝草(*Salvia plebeia* R. Br.)属于唇形科鼠尾草属,是一种可以食用的植物,广泛分布于各个国家和地区^[1-2]。民间通常用荔枝草来治疗感冒、流感、咳嗽、腹泻、哮喘以及各种炎症^[3-4]。近期的研究表明,荔枝草全草不仅含有黄酮^[5]、萜类^[6]、多酚^[7]、蛋白质^[8]等多种化合物,还包含微量元素^[7]、咖啡酸^[9]、芹菜素^[10]、脂质^[7]等其他多种活性成分。

多糖生物活性与其结构密切相关,研究如何从植物中高效的提取多糖,且避免破坏其结构是多糖研究的基础。时至今日,已经发展出了多种提取方式,如水提取法^[11]、酸碱提取法^[12-13]、超声辅助提取法^[14]、酶提取法^[15]和超临界流体萃取法^[16]等。水提取法的操作简单,绿色安全,多糖得率较高是最常见的多糖提取方法^[11]。碱提取法操作简单而且多糖得率高,是多糖提取较常用的方法之一,但碱液浓度不可过高,否则容易破坏多糖结构^[17-18]。酸提取法,相比于水提取法,多糖得率更高,提取次数较少,但酸对糖苷键的破坏作用较大,因此相比于其他方法酸提取法并不常见^[19-20]。此外,超声辅助提取法、酶提取法、超临界流体萃取法等方法也常出现在多糖提取的报道中,但是这些方法均具有设备要求高,提取成本高,能源消耗大等缺点^[20-22]。因此,本文在结合了成本、设备、操作等因素后选择使用水提取法和碱提取法来研究荔枝草多糖的提取工艺。

植物多糖类型繁多、来源广泛,具有抗氧化、抗肿瘤、抗凝血、抗炎等生物活性^[23-24]。但是,目前对于荔枝草的报道主要集中黄酮、萜类、多酚等方面,荔枝草多糖的研究却鲜见报道,因此,本文用水提取法和碱提取法探究了荔枝草粗多糖的提取工艺,将除过蛋白的两种粗多糖进行体外抗氧化和降血糖活性的比较和结构的初探,为后续开展荔枝草多糖的纯化、结构表征和生物活性研究奠定了一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

荔枝草 采自南阳唐河,河南大学生命科学学院植物科学与技术系鉴定为唇形科鼠尾草属植物荔枝草(*Salvia plebeia* R. Br.); 葡萄糖 天津市德恩化学试剂有限公司; 石油醚 上海麦克林生物化学公司; 无水乙醇 天津市富宇精细化工有限公司; 硫酸 中平能化集团开封东大化工有限公司; 苯酚 天津市大茂化学试剂厂; 氢氧化钠 天津市科密欧化学试剂有限公司; 盐酸 宿州化学试剂有限公司;

DPPH 试剂 上海化成工业发展有限公司; ABTS 试剂 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 邻苯三酚 上海麦克林生化科技有限公司; 水杨酸、 α -淀粉酶 北京索莱宝科技有限公司; 以上试剂 均为分析纯。

DHP-9162 电热鼓风干燥箱 上海—恒科学仪器有限公司; HH-4 数显恒温水浴锅 金坛市杰瑞尔电器有限公司; QE-100 克高速万能粉碎机 浙江屹立工贸有限公司; RE-52AA 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; FA2004B 分析天平 上海天美天平仪器有限公司; SHB-III 循环水多用真空泵 郑州长城科工贸有限公司; KB3 匀浆器 海门市其林贝尔仪器制造有限公司; ZYROEU 双级反渗透型纯水机 成都优普生物科技有限公司; EPOCH2 全波长酶标仪 美国伯腾仪器有限公司北京代表处; TU-1901 全波段紫外分光光度计 北京谱析通用仪器有限责任公司; 5810R 冷冻高速离心机 Eppendorf; Spectrum Two 型傅里叶红外光谱仪 珀金埃尔默仪器有限公司; QE-100 万能搅拌机 浙江屹立工贸有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 荔枝草粗多糖提取工艺

1.2.1.1 荔枝草药材的预处理 将鲜荔枝草用烘箱烘干后用粉碎机粉碎,然后将粉碎的药材过 60 目筛,并将过筛后的药材粉末收集备用。称取 100 g 处理好的药材与 2 L 石油醚混合,室温搅拌处理 12 h,并重复三次。抽滤,将石油醚挥干,即得除脂的荔枝草药材,收集备用。

1.2.1.2 水提取工艺 准确称取 4 g 除脂的药材粉末,在一定的液料比、提取次数、提取时间和提取温度下提取粗多糖。然后离心(6000 r/min, 10 min)收集上清液,负压浓缩后,向提取液中加入 4 倍体积的无水乙醇,4 ℃ 过夜沉淀。离心(6000 r/min, 10 min)收集沉淀,加入蒸馏水复溶,即得荔枝草粗多糖溶液,用苯酚-硫酸法检测粗多糖的浓度并计算得率。

1.2.1.3 碱提取工艺 准确称取 4 g 除脂的药材粉末,在一定的液料比、提取次数、提取时间和提取温度、碱液浓度下提取粗多糖。然后离心(6000 r/min, 10 min)收集上清液,将上清液的 pH 调至中性,再次离心(6000 r/min, 10 min),收集上清液后,负压浓缩,再向提取液中加入 4 倍体积的无水乙醇,4 ℃ 过夜沉淀。离心(6000 r/min, 10 min)收集沉淀,加入蒸馏水复溶,即得碱提粗多糖溶液,用苯酚-硫酸法检测粗多糖的浓度并计算得率。

1.2.1.4 蛋白去除工艺 参考王海茹等^[25]的方法。采用 Sevag 法处理粗多糖溶液,至无明显蛋白质层,冷冻干燥即得到除蛋白的水提取荔枝草粗多糖(以下简称为水提粗多糖)和除蛋白的碱提取荔枝草粗多糖(以下简称为碱提粗多糖)。

1.2.2 单因素实验

1.2.2.1 水提取法 以粗多糖得率为指标,分析料液比、提取次数、提取时间和提取温度四个因素对粗多糖得率的影响。固定各因素水平,料液比 1:25 g/mL,提取 2 次,提取时间 0.5 h,提取温度为 80 ℃,改变各因素水平参数如下:料液比为 1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35 g/mL 时,分析料液比对得率的影响;提取次数为 1、2、3、4、5 次时,分析提取次数对得率的影响;提取时间为 0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5 h 时,分析提取时间对得率的影响;提取温度为 60、70、80、90、100 ℃ 时,分析提取温度对得率的影响;根据单因素结果进行正交试验从而确定粗多糖的最佳提取工艺参数。

1.2.2.2 碱提取法 以粗多糖得率为指标,分析料液比、提取次数、提取时间、提取温度和碱液浓度五个因素对得率的影响。固定各因素水平,料液比 1:25 g/mL,提取 1 次,提取时间 2 h,提取温度为 80 ℃,碱液浓度 0.3 mol/L,改变各因素水平参数如下:料液比为 1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35 g/mL 时,分析料液比对得率的影响;提取次数为 1、2、3、4、5 次时,分析提取次数对得率的影响;提取时间为 0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5 h 时,分析提取时间对得率的影响;提取温度为 60、70、80、90、100 ℃ 时,分析提取时间对得率的影响;碱液浓度为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mol/L 时,分析碱液浓度对得率的影响。根据单因素结果进行正交试验从而确定粗多糖的最佳提取工艺参数。

1.2.3 正交试验

1.2.3.1 水提取法 在单因素实验的基础上,采用三因素三水平设计方案,选择料液比(A)、提取温度(B)和提取次数(C)三个因素,通过正交试验,优化荔枝草粗多糖提取工艺。试验因素与水平设计见表 1。

表 1 水提取法正交试验因素和水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment of water extraction method

水平	因素		
	A: 提取次数(次)	B: 提取温度(℃)	C: 料液比(g/mL)
1	2	80	1:10
2	3	90	1:20
3	4	100	1:25

1.2.3.2 碱提取法 在单因素实验的基础上,采用三因素三水平设计方案,选择料液比(A)、提取温度(B)和碱液浓度(C)三个因素,通过正交试验,优化荔枝

草粗多糖提取工艺。试验因素与水平设计见表 2。

表 2 碱提取法正交试验因素和水平

Table 2 Factors and levels of orthogonal experiment of alkali extraction method

水平	因素		
	A: 碱液浓度(mol/L)	B: 提取温度(℃)	C: 料液比(g/mL)
1	0.1	80	1:10
2	0.2	90	1:15
3	0.3	100	1:20

1.2.4 多糖含量的测定方法

1.2.4.1 标准曲线绘制 参考论文中的苯酚-硫酸法^[26]。以葡萄糖为标准品,绘制标准曲线,检测多糖含量。葡萄糖标准溶液:精确称取干燥葡萄糖 20 mg,将浓度配制为 0.2 mg/mL。标准曲线的绘制:吸取葡萄糖标准液 0、0.1、0.3、0.5、0.7、0.9 mL 至于比色管中,用蒸馏水定容至 1 mL,加入 1 mL 5% 苯酚溶液,用回旋振荡器充分混匀,迅速加入浓硫酸 5 mL,室温反应 30 min,用酶标仪在 490 nm 处检测吸光值。以葡萄糖含量为 x 轴,490 nm 处的吸光度为 y 轴绘制葡萄糖标准曲线。得到葡萄糖标准曲线回归方程为: $y=0.00569x+0.00786$, $R^2=0.998$, 可用于定量分析。

1.2.4.2 多糖得率的计算 用 1.2.4.1 中的方法测定吸光度。并计算荔枝草粗多糖的得率,荔枝草多糖得率计算公式为:

$$W(\%) = \frac{c \times V \times n}{m} \times 100$$

式 (1)

式中: W 表示多糖得率,%; c 表示根据回归方程计算出的粗多糖溶液质量浓度, mg/mL; V 表示粗多糖溶液体积, mL; n 表示溶液稀释倍数; m 表示荔枝草粉末取样量, g。

1.2.5 红外及紫外光谱解析

1.2.5.1 红外光谱 将冻干的两种粗多糖样品,使用红外光谱仪的通用衰减全反射(UATR)模式,在 400~4000 cm⁻¹ 的波数范围内测定。

1.2.5.2 紫外全波长扫描光谱 将冻干的两种粗多糖样品配制成 1 mg/mL 的溶液,适当稀释后用全波段紫外分光光度计从 200~400 nm 扫描。

1.2.6 抗氧化活性

1.2.6.1 DPPH 自由基清除率 参考王蔚新等^[27]中的方法。取不同浓度(0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 mg/mL)的水提粗多糖和碱提粗多糖溶液进行实验,以相同浓度梯度下的抗坏血酸 V_C 为阳性对照,无水乙醇与 DPPH 混合液为参比液,样品与无水乙醇混合液为背景对照,用酶标仪在 517 nm 处测定两种粗多糖对 DPPH 自由基的清除率,并参考姚佳等^[28]的方法计算两种粗多糖清除 DPPH 自由基的 IC₅₀, 来评估多糖清除 DPPH 自由基能力的高低。

$$W_{\text{DPPH}}(\%) = \frac{A_0 - (A_x - A_{x0})}{A_0} \times 100 \quad \text{式 (2)}$$

式中: W_{DPPH} 表示 DPPH 自由基清除率, %; A_0 表示参比液吸光度; A_x 表示样品与 DPPH 反应后吸光度; A_{x0} 表示背景对照吸光度。

1.2.6.2 ABTS⁺自由基清除率 参考王蔚新等^[27]的方法。取与 1.2.6.1 相同浓度梯度的多糖溶液进行实验, 以抗坏血酸 V_C 为阳性对照, 95% 乙醇与 ABTS 工作液混合液为参比液, 用酶标仪在 734 nm 处测定两种粗多糖对 ABTS⁺自由基的清除率。并参考姚佳等^[28]的方法计算两种粗多糖清除 ABTS⁺自由基的 IC_{50} , 来评估多糖清除 ABTS⁺自由基能力的高低。

$$W_{\text{ABTS}}(\%) = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100 \quad \text{式 (3)}$$

式中: W_{ABTS} 表示 ABTS⁺自由基清除率, %; A_0 表示参比液吸光度; A 表示样品与 ABTS 工作液反应后吸光度。

1.2.6.3 超氧阴离子(O_2^-)自由基去除率 参考王蔚新等^[27]的方法。取与 1.2.6.1 相同浓度梯度的多糖溶液进行实验, 以抗坏血酸 V_C 为阳性对照, H_2O 为参比液, 邻苯三酚与 H_2O 互换重复实验作为背景对照, 用酶标仪在 320 nm 处测定两种粗多糖对超氧阴离子(O_2^-)自由基的清除率。并参考姚佳等^[28]的方法计算两种粗多糖清除 O_2^- 自由基的 IC_{50} , 来评估二者清除 O_2^- 自由基能力的高低。

$$W_{O_2}(\%) = \frac{A_0 - (A_x - A_{x0})}{A_0} \times 100 \quad \text{式 (4)}$$

式中: W_{O_2} 表示 O_2^- 自由基清除率, %; A_0 表示参比液吸光度; A_x 表示样液反应后吸光度; A_{x0} 表示背景对照吸光度。

1.2.7 降血糖活性 参考严尚隆等^[29]的方法。探究不同浓度粗多糖对 α -淀粉酶的抑制率, 阿卡波糖为阳性对照。取不同浓度 (0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2、6.4、12.8 mg/mL) 的粗多糖各 1.2 mL, 与 1.2 mL 的 α -淀粉酶混匀, 37 °C 水浴反应 5 min 后, 加入 37 °C 水浴 5 min 的 1% 淀粉 1.2 mL, 混匀置于 37 °C 的水浴锅, 反应 15 min 后, 立即加入 2 mL DNS 溶液终止反应, 沸水浴 5 min 显色后, 冰水浴 15 min, 适当稀释, 测量 540 nm 处的吸光度。

$$W(\%) = 1 - \frac{A_x - A_{x0}}{A_0 - A} \times 100 \quad \text{式 (5)}$$

式中: W 表示 α -淀粉酶的抑制率, %; A_0 表示样液替换为 PBS 后重复实验的吸光度; A 表示样液和 α -淀粉酶都替换为 PBS 后重复实验的吸光度; A_x 表示样液反应后吸光度; A_{x0} 表示 α -淀粉酶替换为 PBS 后重复实验的吸光度。

1.3 数据处理

结果采用算术平均值和标准差表示 ($\bar{x} \pm s$), 数值统计采用 SPSS 25 软件, 通过单因素方差 One-way

ANOVA 分析比较多组间的值以确定统计学上是否有显著性差异。 $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 水提取法

2.1.1.1 料液比对粗多糖得率的影响 由图 1A 结合多重比较可以看出, 得率随着料液比的增大而增大, 当料液比为 1:20 g/mL 时得率达到最大为 1.71%。这是由于干燥的药材吸水膨胀限制了多糖的溶出, 当药材充分溶胀后, 料液比的增加使植物细胞内外多糖浓度差增加, 加速了多糖的溶出^[30]。考虑实际生产成本并结合多重比较的结果, 选取 1:10、1:20、1:25 g/mL 进行正交试验。

2.1.1.2 提取次数对粗多糖得率的影响 由图 1B 可知, 随着提取次数的增加, 得率呈现显著增加 ($P < 0.05$), 从多重比较的结果来看, 当达到 4 次之后, 得率变化不再显著 ($P > 0.05$), 因此, 选取 2、3、4 次进行正交试验。

2.1.1.3 提取时间对粗多糖得率的影响 由图 1C 可知, 提取时间对得率影响不显著 ($P > 0.05$), 这可能是因为药材粉末过细, 多糖更易溶出。因此, 将提取时间固定为 0.5 h, 对剩下其他进行正交试验。

2.1.1.4 提取温度对粗多糖得率的影响 图 1D 可以看出, 随着温度升高, 得率显著增加 ($P < 0.05$), 提取温度为 100 °C 时得率达到最大为 2.49%。高温对植物细胞破坏明显, 增加传质效率, 使多糖加速溶出^[31]。故应选取 80、90、100 °C 进行正交试验。

2.1.2 碱提取法

2.1.2.1 料液比对粗多糖得率的影响 由图 1A 可以看出, 随着料液比的增加, 得率先增加再趋于稳定, 料液比为 1:15 时, 得率最大为 3.55%。因此, 选取 1:10、1:15、1:20 g/mL 进行正交试验。

2.1.2.2 提取次数对粗多糖得率的影响 由图 1B 结合多重比较的结果可知, 碱提取法中提取次数对得率几乎没有影响。原因可能是, 碱液对植物细胞的破坏作用, 极大的加速了多糖的溶出^[32]。实验结果与高宪军等^[33]的报道相似。综合考虑, 将提取次数固定为 1 次。

2.1.2.3 提取时间对粗多糖得率的影响 图 1C 表明, 得率随着提取时间增加显著 ($P < 0.05$) 上升, 达到 2.5 h 后得率不再有显著变化。结合实际生产成本后, 将提取时间固定为 2.5 h。

2.1.2.4 提取温度对粗多糖得率的影响 从图 1D 中可以看到, 与水提取法相似, 随着提取温度升高, 得率显著增加 ($P < 0.05$)。在 100 °C 下, 得率高达 6.16%。故应选取 80、90、100 °C 进行正交试验。

2.1.2.5 碱液浓度对粗多糖得率的影响 碱液可以使多糖中的不溶性纤维素、半纤维素等与果胶多糖

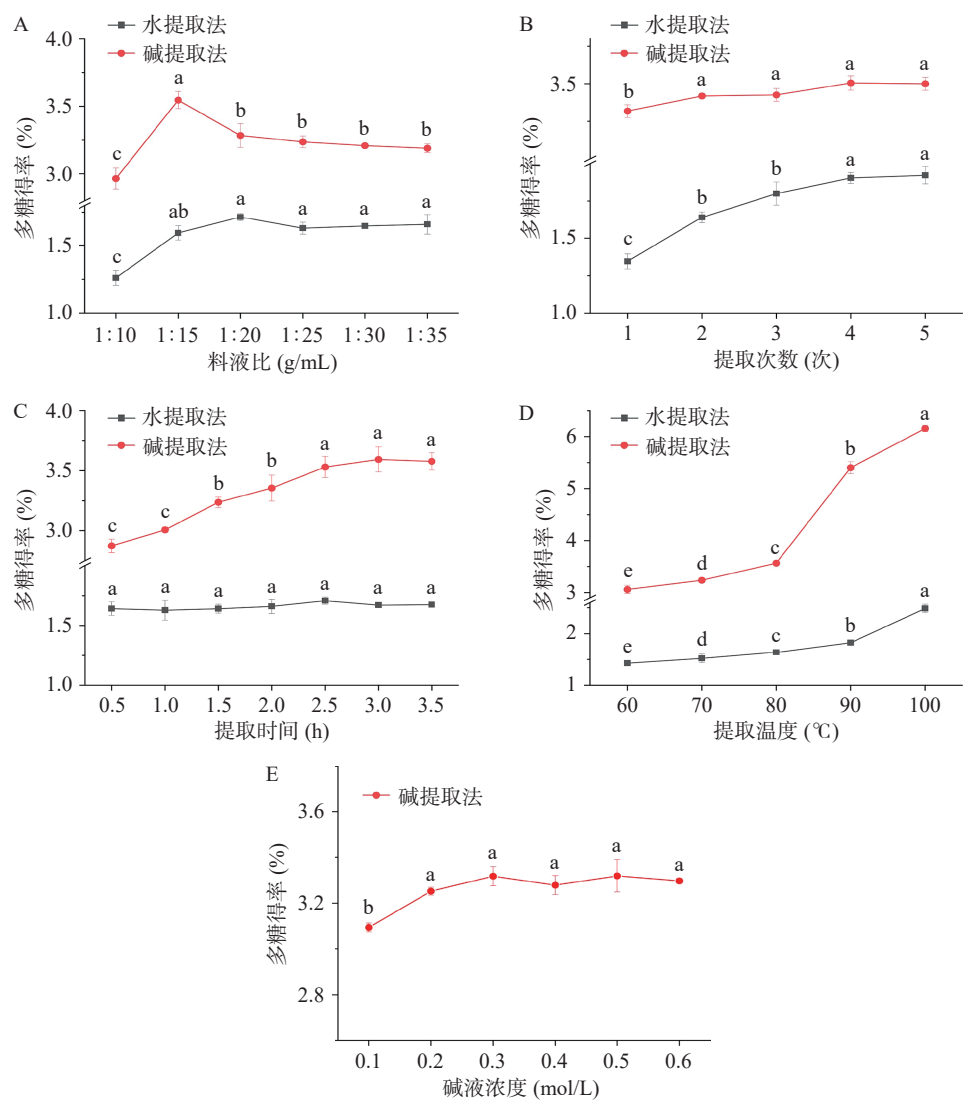


图 1 料液比(A)、提取次数(B)、提取时间(C)、提取温度(D)、碱液浓度(E)对粗多糖得率的影响
Fig.1 Effects of solid-liquid ratio (A), number of extraction (B), extraction time (C), extraction temperature (D) and alkali concentration (E) on polysaccharide yield

之间的键断裂,从而加速多糖的溶出提高得率^[32]。
图 1E 中,随着碱液浓度的增加,得率先显著($P<0.05$)上升,然后趋于稳定。从多重比较的结果来看,碱液浓度达到 0.2 mol/L 后,得率不再有显著性变化($P>0.05$)。因此选取 0.1、0.2、0.3 mol/L 进行正交试验。

2.2 正交试验结果

2.2.1 水提取法正交试验结果 设计三因素三水平正交试验表进行试验。正交实验表见表 3,方差分析表见表 4。

由直观分析表可知,对水提荔枝草粗多糖得率影响由大到小依次为: $B>A>C$,提取温度对水提荔枝草粗多糖得率影响最大,而提取次数和料液比影响较小。在综合极差 R 值之后,水提荔枝草粗多糖最佳提取工艺为: $A_3B_3C_2$,即提取次数为 4 次,提取温度为 100 ℃,料液比为 1:20 g/mL,得率为 $2.86\%\pm0.08\%$ 。

2.2.2 碱提取法正交试验结果及分析 设计三因素三水平正交试验表进行试验。正交实验表见表 5,方差分析表见表 6。

表 3 水提取法正交试验结果

Table 3 Orthogonal test results of water extraction method				
实验号	因素			粗多糖得率(%)
	A提取次数	B提取温度	C料液比	
1	1	1	1	1.26±0.10
2	1	2	2	1.84±0.04
3	1	3	3	2.49±0.10
4	2	1	2	1.90±0.14
5	2	2	3	1.98±0.04
6	2	3	1	2.71±0.13
7	3	1	3	1.96±0.42
8	3	2	1	2.07±0.73
9	3	3	2	2.86±0.08
k ₁	1.86	1.71	2.01	
k ₂	2.20	1.96	2.20	
k ₃	2.30	2.69	2.14	
R	0.44	0.98	0.19	

由直观分析表 6 可知,对碱提荔枝草粗多糖得率影响由大到小依次为: $B>A>C$,提取温度对碱提荔枝草粗多糖得率影响最大,而料液比影响最小。在综

表 4 水提取法方差分析结果

Table 4 Analysis of variance of water extraction method

因素	III 类平方和	自由度	均方	F 值	P 值
A	0.309	2	0.154	9.926	0.097
B	1.549	2	0.775	46.454	0.021
C	0.055	2	0.027	1.648	0.378
误差	0.033	2	0.017		

表 5 碱提取法正交试验结果

Table 5 Orthogonal test results of alkali extraction method

实验号	因素			粗多糖得率 (%)
	A 碱液浓度	B 提取温度	C 料液比	
1	1	1	1	3.88±0.09
2	1	2	2	3.80±0.04
3	1	3	3	5.83±0.30
4	2	1	2	3.67±0.07
5	2	2	3	4.86±0.06
6	2	3	1	6.59±0.23
7	3	1	3	4.90±0.03
8	3	2	1	5.92±0.08
9	3	3	2	7.15±0.11
K ₁	19.03	19.32	22.94	
K ₂	23.42	22.14	24.19	
K ₃	27.24	28.22	22.59	
R	8.21	8.91	1.60	

表 6 碱提取法方差分析结果

Table 6 Analysis of variance of alkali extraction method

因素	III 类平方和	自由度	均方	F 值	P 值
A	3.401	2	1.700	51.198	0.19
B	8.903	2	4.452	134.044	0.007
C	0.524	2	0.262	7.885	0.113
误差	0.066	2	0.33		

合极差 R 值之后,碱提荔枝草粗多糖最佳提取工艺为: A₃B₃C₂, 即碱液浓度为 0.3 mol/L, 提取温度为 100 ℃, 料液比为 1:15 g/mL, 得率为 7.15%±0.11%。

2.3 红外及紫外光谱解析

2.3.1 红外光谱 由图 2 可知,水提粗多糖和碱提粗多糖具有相似的峰,说明二者含有部分一致的官能团。两种粗多糖分别在 3299 和 3283 cm⁻¹ 处有宽而强的吸收峰,存在于 O-H 和 N-H 的伸缩振动区间内,因此判断,两种粗多糖中可能含有 O-H 和 N-H,又因为在 1560~1508 cm⁻¹ 区间内无吸收峰,因此多糖结构中不含有 N-H,所以在 3299 和 3283 cm⁻¹ 处的峰为 O-H 的伸缩振动^[34-35]。两种粗多糖分别在 2936 和 2941 cm⁻¹ 处的吸收峰是由多糖结构中饱和碳上的 C-H 伸缩振动引起的,此处的吸收峰为多糖的特征吸收峰^[36]。此外,水提粗多糖在 1739 cm⁻¹ 处的较强的吸收峰,在羰基的伸缩振动在 1900~1650 cm⁻¹ 区间内,再结合尹艳^[37] 中的报道,表明水提粗多糖结构中存在羰基。1599 和 1584 cm⁻¹ 处的吸收峰为羧基上 O=C=O 的非对称伸缩振动,1414 和 1391 cm⁻¹ 处的吸收峰为去质子化羧基-COOH 的

伸缩振动,两种粗多糖分别在这两处有吸收峰,说明粗多糖结构中均存在糖醛酸结构^[36]。在 1200~1000 cm⁻¹ 范围内的强吸收带是由于多糖结构中 C-O-C 和 C-O-H 基团的拉伸振动引起的^[38]。此外,在 1020 cm⁻¹ 处的吸收峰为吡喃糖的伸缩振动,同时在约 890 和 855 cm⁻¹ 附近都观察到特征峰,这表明水提粗多糖中既含有 α 构型又含有 β 构型^[38-39]。在碱提粗多糖则没有吡喃糖的特征吸收峰,因此推测,碱液提取时造成了多糖结构中吡喃糖的破坏。

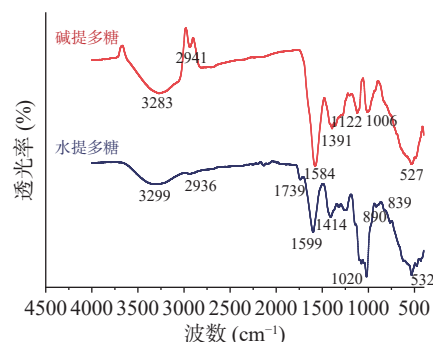


图 2 两种粗多糖的红外光谱扫描图

Fig.2 Infrared spectrum scanning diagram of two crude polysaccharides

2.3.2 紫外全波长扫描光谱 由于蛋白质和核酸在近紫外光区(220~300 nm)有紫外吸收峰,其含量的高低与峰高有关,因此全波段紫外分光光度计可以用来快速检测多糖样品中是否残留有游离的蛋白质和核酸^[40]。从图 3 中可以看出,水提多糖和碱提多糖在近紫外光区(220~300 nm)均无明显吸收峰,说明两种多糖样品中不含有游离蛋白质和核酸。

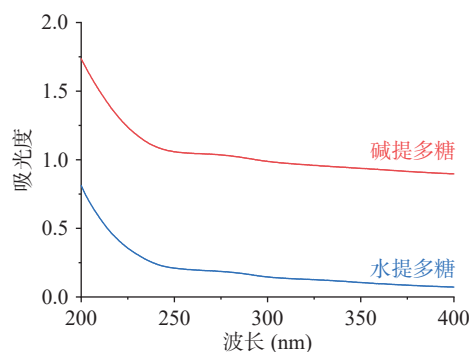


图 3 两种粗多糖的紫外光谱扫描图

Fig.3 UV spectra of two crude polysaccharides

2.4 抗氧化活性及降血糖活性

2.4.1 DPPH 自由基清除能力 由图 4 可知,在 0.05~0.4 mg/mL 的浓度范围内,随着粗多糖浓度的增加,对 DPPH 自由基的清除率呈现依赖剂量的显著性增加 ($P<0.05$)。两种粗多糖的浓度达到 0.4 mg/mL 时,清除率达到最高,分别为 81.23% 和 45.02%,此后水提粗多糖剂量增加清除率作用趋于平缓,而碱提粗多糖随着剂量继续增加清除率开始下降,下降的原因可能与碱提粗多糖含有的色素有关。水提粗多糖

对清除 DPPH 自由基的 IC_{50} 为 0.1260 mg/mL, 而碱提粗多糖的清除率未达到 50%。水提粗多糖清除 DPPH 自由基的能力远高于碱提粗多糖, 这可能是因为碱液破坏了多糖的部分官能团造成的。

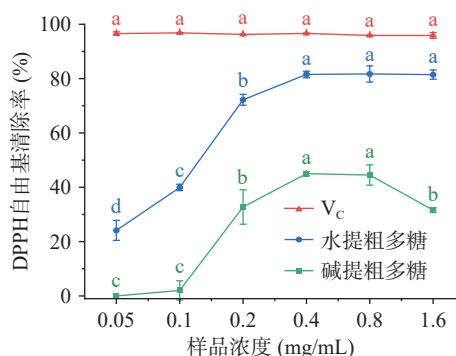


图 4 两种粗多糖对 DPPH 自由基的清除能力

Fig.4 Scavenging ability of two crude polysaccharides to DPPH free radical

2.4.2 ABTS⁺自由基清除能力 由图 5 可知, 在 0.05~0.4 mg/mL 的浓度范围内, 随着两种粗多糖浓度的增加, 二者对 ABTS⁺自由基的清除率均呈现依赖剂量的显著性增加 ($P<0.05$)。当水提粗多糖浓度达到 0.2 mg/mL、碱提粗多糖浓度达到 0.4 mg/mL 时, 二者清除率分别高达 88.70% 和 88.07%, 与 V_C 的清除能力持平, 说明二者均有很高的 ABTS⁺自由基清除能力。两者对清除 ABTS⁺自由基的 IC_{50} 分别为 0.0841 和 0.1229 mg/mL。

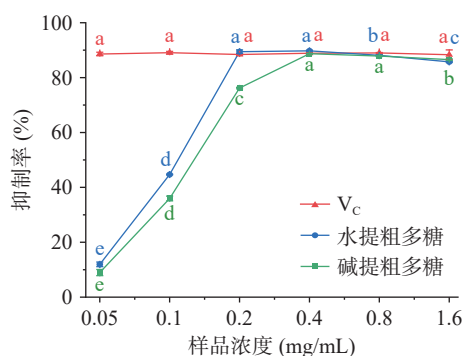


图 5 两种粗多糖对 ABTS 自由基的清除能力

Fig.5 Scavenging ability of two crude polysaccharides to ABTS⁺ free radical

2.4.3 超氧阴离子(O₂⁻)自由基清除能力 由图 6 可知, 在 0.05~1.6 mg/mL 的浓度范围内, 随着两种粗多糖浓度的增加, 对 O₂⁻自由基的清除率没有显著性的变化 ($P>0.05$), 清除率分别维持在 20% 和 25% 左右, 结果与韩丹^[41]报道的滑子菇多糖类似。与阳性对照 V_C 相比, 两种粗多糖对 O₂⁻自由基的清除率低于 V_C, 但仍然具有一定的超氧阴离子清除能力。

2.4.4 降血糖活性 α -淀粉酶等酶可以在餐后快速将碳水化合物降解为单糖, 导致胰岛素和血糖的升高。因此, 抑制 α -淀粉酶的活性, 减缓碳水化合物的水解, 降低餐后血糖的上升, 是预防和治疗二型糖尿

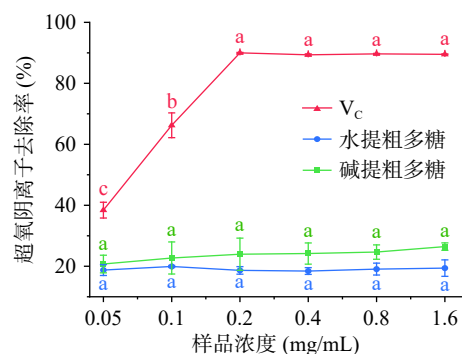


图 6 两种粗多糖对超氧阴离子自由基的清除能力

Fig.6 Scavenging capacity of two crude polysaccharides to superoxide anion free radical

病的有效手段^[42]。在二型糖尿病的治疗中, 阿卡波糖使用了数十年, 具有十分显著的疗效^[43]。因此被本实验选为水提多糖和碱提多糖的阳性对照。

如图 7 所示, 在 0.05~12.8 mg/mL 区间均呈现上升趋势。在浓度为 12.8 mg/mL 时, 两种粗多糖对 α -淀粉酶达到最大抑制率分别为 20.15% 和 11.46%, 但两种粗多糖对 α -淀粉酶具有一定的抑制作用。与水提粗多糖相比, 碱提粗多糖的抑制活性更低。碱液对多糖的结构破坏可能是造成这种差异的原因。

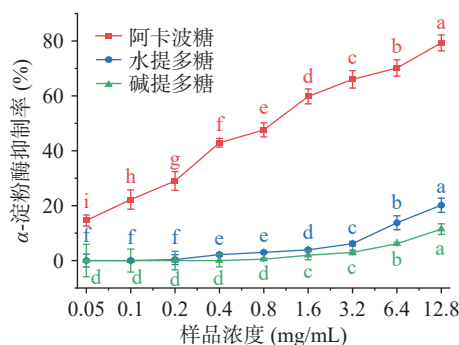


图 7 两种粗多糖对 α -淀粉酶的抑制能力

Fig.7 Effects of two crude polysaccharides on inhibition of α -amylase

3 讨论

本文用单因素实验和正交试验分别探索了水提荔枝草粗多糖和碱提荔枝草粗多糖的最佳工艺, 即水提取法最佳工艺为: 提取次数为 4 次; 提取温度为 100 ℃; 料液比为 1:20 g/mL, 得率为 2.86%。碱提取法最佳提取工艺为: 碱液浓度为 0.3 mol/L, 提取温度为 100 ℃, 料液比为 1:15 g/mL, 得率为 7.15%, 是水提取法得率的 2.5 倍。此外, 本文还将用 Sevag 法除蛋白后的两种粗多糖进行红外光谱扫描、抗氧化活性和降血糖活性研究。红外扫描光谱结果表明, 两者具有相似的结构, 但碱提粗多糖缺少了吡喃糖和羰基的吸收峰, 这可能是造成两者活性差异的原因。抗氧化实验表明, 两种粗多糖具有较强的抗氧化活性, 水提粗多糖和碱提粗多糖对 DPPH 自由基的最大清除率分别为 81.23% 和 45.02%、ABTS⁺自由基的最大清除率与 V_C 效果相近, 分别为 88.70% 和 88.07%。

两者对 O_2^- 自由基存在一定的清除能力,但清除能力有限,分别维持在 20% 和 25% 附近。此外,降血糖实验表明,两者对 α -淀粉酶的抑制率呈现剂量依赖性增加,虽然抑制率较低,但仍具有一定的抑制作用。由此可见,两种粗多糖均可以作为潜在的抗氧化剂和降血糖剂被应用于食品、医药等领域。此后还需要对两种多糖进行纯化和结构鉴定,并进一步研究荔枝草多糖的构效关系。

参考文献

- [1] BANG S, HA T K Q, LEE C, et al. Antiviral activities of compounds from aerial parts of *Salvia plebeia* R. Br.[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2016, 192: 398–405.
- [2] SEO H W, SUH J H, KYUNG J S, et al. Subacute oral toxicity and bacterial mutagenicity study of a mixture of Korean red ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) and *Salvia plebeia* R. Br. extracts[J]. *Toxicological Research*, 2019, 35(3): 215–224.
- [3] 王继锋, 颜妮妮, 徐佳馨, 等. 荔枝草的化学成分及药理作用研究新进展[J]. *湖南中医药大学学报*, 2018, 38(4): 482–485. [WANG G F, YAN W, XU J X, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Salvia plebeia* R. Br.[J]. *Journal of Hunan University of Traditional Chinese Medicine*, 2018, 38(4): 482–485.]
- [4] 卢柯遐, 郭静. 草药在皮肤病中的应用[J]. *中国民间疗法*, 2021, 29(2): 69–71. [LU K X, GUO J. Application of herbal medicine in skin diseases[J]. *Chinese Folk Therapy*, 2021, 29(2): 69–71.]
- [5] 王晓明, 于娇, 陈虹, 等. 不同采收期荔枝草中黄酮成分含量的动态变化研究[J]. *中国野生植物资源*, 2010, 29(4): 34–36, 53. [WANG X M, YU J, CHEN H, et al. Dynamic changes of flavonoids in *Salvia plebeia* R. Br. at different harvest times[J]. *Wild Plant Resources in China*, 2010, 29(4): 34–36, 53.]
- [6] NHOEK P, CHAE H S, KIM Y M, et al. Sesquiterpenoids from the aerial parts of *Salvia plebeia* with inhibitory activities on proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 expression[J]. *Journal of Natural Products*, 2021, 84(2): 220–229.
- [7] LIANG Y Y, WAN X H, NIU F J, et al. *Salvia plebeia* R. Br.: An overview about its traditional uses, chemical constituents, pharmacology and modern applications[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, 121: 109589.
- [8] 兰艳素, 王宁宁, 常相雾. 火焰原子吸收法测定荔枝草中金属元素含量[J]. *广州化工*, 2016, 44(22): 78–80. [LAN Y S, WANG N N, CHANG X W. Determination of metal elements in *Salvia plebeia* R. Br. by flame atomic absorption spectroscopy[J]. *Guangzhou Chemical Industry*, 2016, 44(22): 78–80.]
- [9] 温建辉, 倪付勇, 李明, 等. 荔枝草化学成分的研究[J]. *中成药*, 2019, 41(10): 2393–2397. [WEN J J, NI F Y, LI M, et al. Study on chemical constituents of *Salvia plebeia* R. Br.[J]. *Chinese Patent Medicine*, 2019, 41(10): 2393–2397.]
- [10] 亢文佳, 富艳彬, 李达翎, 等. 荔枝草的化学成分研究[J]. *中草药*, 2015, 46(11): 1589–1592. [KANG J W, FU Y B, LI D H, et al. Study on chemical constituents of *Salvia plebeia* R. Br.[J]. *Chinese Herbal Medicine*, 2015, 46(11): 1589–1592.]
- [11] YUN L, LI D, YANG L, et al. Hot water extraction and artificial simulated gastrointestinal digestion of wheat germ polysaccharide[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 123: 174–181.
- [12] LIN X, JI X, WANG M, et al. An alkali-extracted polysaccharide from *Zizyphus jujuba* cv. Muzao: Structural characterizations and antioxidant activities[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 136: 607–615.
- [13] 吴娟, 欧志荣, 李昭蓉, 等. 稀酸提取羊栖菜多糖的结构及其抗氧化特性研究[J]. *福建农业学报*, 2019, 34(7): 842–851. [WU J, OU Z R, LI Z R, et al. Study on structure and antioxidant properties of polysaccharide extracted from *Sargassum fusiforme* with dilute acid[J]. *Fujian Agricultural Journal*, 2019, 34(7): 842–851.]
- [14] MA J S, LIU H, HAN C R, et al. Extraction, characterization and antioxidant activity of polysaccharide from *Pouteria campechiana* seed[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 229: 115409.
- [15] LUKOVA P K, KARCHEVA-BAHCHEVANSKA D P, BIVOLARSKI V P, et al. Enzymatic hydrolysis of water extractable polysaccharides from leaves of *Plantago major* L[J]. *Folia Medica*, 2017, 59(2): 210–216.
- [16] I-LUNG YU, ZER-RAN YU, MALCOLM KOO, et al. A continuous fractionation of ginsenosides and polysaccharides from panax ginseng using supercritical carbon dioxide technology[J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2016, 40(4): 743–748.
- [17] 梁焕秋, 苏德华, 吴勇辉, 等. 凉粉草多糖的碱液提取及其粉剂的喷雾干燥制备[J]. *食品科技*, 2014, 39(5): 182–185. [LIANG H Q, SU D H, WU Y H, et al. Extraction of lye polysaccharides and preparation of powder by spray drying method[J]. *Food Technology*, 2014, 39(5): 182–185.]
- [18] 莫开菊, 周志, 汪兴平, 等. 碱液和木瓜蛋白酶预处理对葛仙米多糖提取效果的影响[J]. *食品科学*, 2007, 32(11): 194–198. [MO K J, ZHOU Z, WANG X P, et al. Effects of pretreatment with alkaline solution and papain on the extraction of polysaccharide from *Gexianmi*[J]. *Food Science*, 2007, 32(11): 194–198.]
- [19] 陈程莉, 董全, 周宇, 等. 金线莲多糖提取及功能研究进展[J]. *食品与机械*, 2018, 34(9): 196–200. [CHEN C L, DONG Q, ZHOU Y, et al. Research progress on extraction and function of polysaccharides from *Anoectochilus roxburghii*[J]. *Food and Machinery*, 2018, 34(9): 196–200.]
- [20] 梁美娜, 吴明江, 陈胜, 等. 羊栖菜多糖的提取纯化及功能活性研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(21): 8305–8312. [LIANG M N, WU M J, CHEN S, et al. Research progress on extraction, purification and functional activity of *Sargassum fusiforme* polysaccharide[J]. *Journal of Food Safety and Quality Inspection*, 2021, 12(21): 8305–8312.]
- [21] 徐青, 李冰晶, 罗丽平, 等. 蓝莓多糖的提取分离及生物活性研究进展[J]. *现代化工*, 2019, 39(5): 38–41. [XU Q, LI B L, LUO L P, et al. Research progress on extraction, separation and bioactivity of *Blueberry* polysaccharides[J]. *Modern Chemical Industry*, 2019, 39(5): 38–41.]
- [22] 连俊辉. 花脸香蘑菌丝体多糖的提取、抗氧化性及其益生活性研究[D]. 长春: 吉林大学, 2021. [LIAN J H. Study on extraction, antioxidant activity and probiotic activity of polysaccharide from mycelium of *Pleurotus ostreatus* [D]. Changchun: Jilin University, 2021.]

- sity, 2021.]
- [23] LIU C, CUI Y, PI F, et al. Extraction, purification, structural characteristics, biological activities and pharmacological applications of acemannan, a polysaccharide from *Aloe vera*: A review [J]. *Molecules* (Basel, Switzerland), 2019, 24(8): 1554.
- [24] YU Y, SHEN M, SONG Q, et al. Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: A review [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 183: 91–101.
- [25] 王海茹, 王雪飞, 姚晶. 黄柏花粉多糖除蛋白方法比较及其对抗氧化功能的影响 [J]. *食品科技*, 2015, 40(5): 224–228. [WANG H R, WANG X F, YAO J. Comparison of protein removal methods of *Phellodendron chinense pollen* polysaccharide and its effect on anti oxidative function [J]. *Food Science and Technology*, 2015, 40(5): 224–228.]
- [26] 魏绍云, 齐慧玲, 王继伦, 等. 苯酚—硫酸法测定白及多糖 [J]. *天津化工*, 2000, 33(3): 35–36. [WEI S Y, QI H L, WANG J L, et al. Phenol sulfuric acid method for the determination of white and polysaccharide [J]. *Tianjin Chemical Industry*, 2000, 33(3): 35–36.]
- [27] 王蔚新, 张俊, 占剑峰, 等. 福白菊胎菊与朵菊粗多糖体外抗氧化活性分析 [J]. *黄冈师范学院学报*, 2020, 40(6): 9–13. [WANG W X, ZHANG J, ZHAN J F, et al. *In vitro* antioxidant activity of crude polysaccharides from *Fubai chrysanthemum*, *Foetal chrysanthemum* and *chrysanthemum* [J]. *Journal of Huanggang Normal University*, 2020, 40(6): 9–13.]
- [28] 姚佳, 黄希莲, 姚玉仙, 等. 响应面法优化多穗石柯粗多糖提取工艺及抗氧化活性分析 [J]. *食品科技*, 2021, 46(9): 195–201. [YAO J, HUANG X L, YAO Y X, et al. Optimization of extraction process and antioxidant activity of crude polysaccharide from *Lycoris polyphylla* by response surface methodology [J]. *Food Technology*, 2021, 46(9): 195–201.]
- [29] 严尚隆, 潘创, 杨贤庆, 等. 长松藻多糖降解、结构表征及降血糖活性测定 [J]. *食品与发酵工*, 2021, 47(18): 119–126. [YAN S L, PAN C, YANG X Q, et al. Degradation, structural characterization and hypoglycemic activity of *Trehalose* polysaccharide [J]. *Food and Fermentation Industry*, 2021, 47(18): 119–126.]
- [30] 胡玲玲, 乌雪燕. 枸杞多糖的水提醇沉法工艺优化 [J]. *贵州农业科学*, 2021, 49(7): 128–133. [HU L L, WU X Y. Degradation, optimization of water extraction and alcohol precipitation of *Lycium barbarum* polysaccharide [J]. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2021, 49(7): 128–133.]
- [31] 高石花, 黎国庆, 覃江克, 等. 油茶枯多糖的水提工艺及纯化研究 [J]. *食品科技*, 2013, 38(4): 191–195. [GAO S H, LI G Q, QIN J K, et al. Study on water extraction and purification of *Camellia kudzu* polysaccharide [J]. *Food Technology*, 2013, 38(4): 191–195.]
- [32] 李晓洁, 曾百慧, 陈慕兰, 等. 酸性茯苓多糖的提取工艺优化 [J]. *中国酿造*, 2018, 37(10): 158–161. [LI X J, ZENG B H, CHEN M L, et al. Optimization of extraction process of acidic *Poria cocos* polysaccharide [J]. *China Brewing*, 2018, 37(10): 158–161.]
- [33] 高宪军, 段涛, 王承明. 碱提棉籽粕多糖工艺研究 [J]. *食品工业科技*, 2010, 31(11): 258–261. [GAO X J, DUAN T, WANG C M. Study on alkali extraction of polysaccharide from cottonseed meal [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2010, 31(11): 258–261.]
- [34] FENG S, LUAN D, NING K, et al. Ultrafiltration isolation, hypoglycemic activity analysis and structural characterization of polysaccharides from *Brasenia schreberi* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 135: 141–151.
- [35] 赵利霞. 碎米茅莓多糖的提取、分离纯化、结构鉴定及生物活性研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2006. [ZHAO L X. Extraction, purification, structure identification and bioactivity of selenium polysaccharide from shepherd's purse [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2006.]
- [36] SONG Y, ZHU M, HAO H, et al. Structure characterization of a novel polysaccharide from Chinese wild fruits (*Passiflora foetida*) and its immune-enhancing activity [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 136: 324–331.
- [37] 尹艳. 两种水溶性大豆多糖的红外光谱分析 [J]. *食品研究与开发*, 2013, 34(8): 67–68. [YIN Y. Infrared spectrum analysis of two water-soluble soybean polysaccharides [J]. *Food Research and Development*, 2013, 34(8): 67–68.]
- [38] SHIMADA K, KAMPS J A, REGTS J, et al. Biodistribution of liposomes containing synthetic galactose-terminated diacylglycerol-poly(ethyleneglycol)s [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1997, 1326(2): 329–341.
- [39] 周涛. 当归多糖分离分析、结构鉴定及生物活性的研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2018. [ZHOU T. Isolation, analysis, structure identification and bioactivity of *Angelica* polysaccharide [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2018.]
- [40] 连朋丽. 黑莓籽多糖抗血栓作用机制研究和禹白芷多糖生物活性研究 [D]. 开封: 河南大学, 2016. [LIAN P L. Study on antithrombotic mechanism of blackberry seed polysaccharide and bioactivity of Yubaizhi polysaccharide [D]. Kaifeng: Henan University, 2016.]
- [41] 韩丹. 滑子菇多糖提取、结构及体外抗氧化活性研究 [D]. 天津: 天津科技大学, 2018. [HAN D. Study on extraction, structure and antioxidant activity of *Pleurotus ostreatus* polysaccharide *in vitro* [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2018.]
- [42] YANG Y, JIU-LIANG Z, LU-HONG S, et al. Inhibition mechanism of diacylated anthocyanins from purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) against α -amylase and α -glucosidase [J]. *Food Chemistry*, 2021, 359: 129934.
- [43] 张金革. 探讨不同基线糖化血红蛋白下阿卡波糖和二甲双胍对中国新诊二型糖尿病患者疗效的影响 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2016. [ZHANG J P. Effect of acarbose and metformin on the efficacy of different types of baseline glycosylated hemoglobin in newly diagnosed type two diabetic patients in China [J]. Beijing: Peking Union Medical College, 2016.]