

袁高阳, 秦心睿, 聂晓兵, 等. 基于熵权 TOPSIS 模型对白芨多糖脱蛋白体系的评价研究 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(7): 76–85.
doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023050060

YUAN Gaoyang, QIN Xinrui, NIE Xiaobing, et al. Evaluation of *Bletilla striata* Polysaccharide Deproteinized System Based on Entropy Weighted TOPSIS Model[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(7): 76–85. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023050060

· 研究与探讨 ·

基于熵权 TOPSIS 模型对白芨多糖脱蛋白体系的评价研究

袁高阳¹, 秦心睿¹, 聂晓兵¹, 金文芳¹, 杨玉玉¹, 刘诗茵¹, 范宝磊^{2,3,*}, 苗潇磊^{1,3,*}

(1.湖北科技学院药学院, 湖北咸宁 437100;

2.辐射化学与功能材料湖北省重点实验室, 湖北咸宁 437100;

3.湖北省智慧康养产业研究院, 湖北咸宁 437100)

摘要: 利用熵权 TOPSIS 模型对比 Sevage 法、乙腈法和三氯乙酸 (TCA) 法脱除粗白芨多糖 (BSP) 蛋白的效果, 探究熵权 TOPSIS 用于 BSP 脱蛋白体系评价的合理性。以 BSP 保留率和蛋白质脱除率综合评分, 筛选出最佳处理条件; 构建出包括单糖组分、氧化自由基清除能力 (ORAC)、DPPH 自由基半数清除浓度 (IC₅₀) 在内的 9 个具体评价指标的白芨多糖脱蛋白评价体系, 以紫外分光光度计和傅里叶变换红外光谱仪扫描为辅, 以熵权 TOPSIS 对三种白芨多糖脱蛋白方案的结果进行评价。经过综合评分, Sevage 法最佳萃取次数为 1 次, 此时的蛋白质脱除率为 22.9%, 多糖保留率为 99.11%; 乙腈法最佳质量浓度为 60%, 蛋白质脱除率为 89.11%, 多糖保留率为 97.36%; TCA 法最佳质量浓度为 10%, 蛋白质脱除率为 70.64%, 多糖保留率为 70.03%; 对比同浓度下三种多糖的 ORAC 值和 IC₅₀ 发现, 乙腈法处理的多糖 ORAC 值高于阳性对照组 ($P < 0.05$), Sevage 法处理后的多糖具有最强的抗氧化活性; 白芨多糖脱蛋白评价体系经熵权 TOPSIS 模型分析结果表明 Sevage 法脱蛋白效果最优与预期结果相符。研究结果表明熵权 TOPSIS 模型可用于白芨多糖脱蛋白体系评价。

关键词: 白芨, 多糖, 体外抗氧化活性, 白芨多糖脱蛋白评价体系, 熵权 TOPSIS 模型

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)07-0076-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023050060

本文网刊:



Evaluation of *Bletilla striata* Polysaccharide Deproteinized System Based on Entropy Weighted TOPSIS Model

YUAN Gaoyang¹, QIN Xinrui¹, NIE Xiaobing¹, JIN Wenfang¹, YANG Yuyu¹, LIU Shihan¹,

FAN Baolei^{2,3,*}, MIAO Xiaolei^{1,3,*}

(1.School of Pharmacy, Hubei University of Science and Technology, Xianning 437100, China;

2.Hubei Provincial Key Laboratory of Radiation Chemistry and Functional Materials, Xianning 437100, China;

3.Hubei Institute of Intelligent Health Care Industry, Xianning 437100, China)

Abstract: The entropy TOPSIS model was used to compare the effects of Sevage method, acetonitrile method and trichloroacetic acid (TCA) method for removing crude *Bletilla striata* polysaccharide (BSP) protein, and to explore the rationality of entropy TOPSIS for BSP deproteinization system evaluation. Based on the comprehensive score of BSP retention rate and protein removal rate, the optimal treatment conditions were screened out. Nine evaluation indicators including monosaccharide components, oxidative radical scavenging ability (ORAC), and half scavenging concentration of DPPH radicals (IC₅₀) were constructed. Supplemented by UV and FTIR, the entropy TOPSIS was used to evaluate the

收稿日期: 2023-05-09

基金项目: 湖北省科技重大专项 (社发领域和重点研发计划) (2022BCE066)。

作者简介: 袁高阳 (2000-), 男, 本科, 研究方向: 药学, E-mail: ygy17630814755@163.com。

* 通信作者: 范宝磊 (1980-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 天然药物分析, E-mail: fan_b11980@163.com。

苗潇磊 (1987-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 药物分析, E-mail: 345701500@qq.com。

results of three BSP deproteinization programs. After comprehensive score, the best extraction times of sewage method was 1 time. At same time, the protein removal rate was 22.9%, and the polysaccharide retention rate was 99.11%. The optimal mass concentration of the TCA method was 10%, when the protein removal rate was 70.64%, and the polysaccharide retention rate was 70.03%. Compared with the ORAC values and IC_{50} of the three polysaccharide, it was found that the value of polysaccharide ORAC treated by the acetonitrile method was higher than that of the positive control group ($P<0.05$), and the polysaccharides treated by the Sewage method had the strongest antioxidant activity. The BSP deproteinization evaluation system was analyzed by the entropy TOPSIS model, and the sewage method deproteinization effect was the best and the expected result. The results showed that the entropy TOPSIS model could be used in the evaluation of BSP deproteinization system.

Key words: *Bletilla striata*; polysaccharide; *in vitro* antioxidant activity; *Bletilla striata* polysaccharide deproteinization evaluation system; entropy weighted TOPSIS model

白芨(*Bletilla striata*)最早出现于 2000 年前的《神农本草经》,它属于兰科植物,在传统中药(TCM)中被广泛使用,是中医药著名的植物之一^[1]。白芨多糖(BSP)已被证实是白芨生物功能中最重要的成分,现代药理学表明 BSP 具有广泛的生物活性,如抗溃疡、止血^[2]、抗炎^[3]、抗氧化^[4]、抗菌、抗纤维化^[5]和抗衰老^[6]等,在医疗、美容等方面具有较好的研究前景。

目前国内多糖纯化多采用 Sevage 法^[7]、盐酸法、三氯乙酸法、重复冻融法、蛋白酶法^[8]、盐析法等。对于脱除多糖蛋白效果的评价大多只以多糖回收率和蛋白脱除率为指标,近年来何思辰等^[9]、王莹等^[10]、李媛媛等^[11]将体外抗氧化活性与多糖结构表征也作为其效果的重要指标,增强了多糖脱蛋白评价的科学性和全面性,得到了医药行业广泛的认可。但多糖脱蛋白评价指标数量多且各指标重要程度未知,以至于目前的研究结果大多具有主观性和特殊性,对各指标的评价标准缺乏统一。因此,建立一种科学、操作性强、并且具有普遍性的多糖脱蛋白综合评价系统,对各种多糖脱蛋白方案进行综合评价是目前迫切需要解决的问题。

TOPSIS 法又称逼近理想解排序法^[12],是一种多目标决策算法,多用于中药药材的质量综合评估^[13-15],近年来在粮食安全^[16]、电力^[17]、矿业^[18]、军事领域^[19]也有较多应用。如图 1 所示本研究采用三种方法(Sevage 法、乙腈法、TCA 法)对白芨多糖进行处理,从蛋白质脱除率和多糖保留率进行评价,同时考察其在结构和抗氧化活性方面的差异;不同于陈

浩莹等^[20]主观比较不同脱蛋白方法对白芨多糖的影响和效果的评价思路,本研究利用熵权 TOPSIS 模型,将白芨多糖脱蛋白各项指标统一为一个体系,对其进行客观评价,结果更具有说服力,为未来白芨多糖纯化的评价研究提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

白芨 于 2022 年 9 月采摘,安徽省亳州市阳光新科药材种苗生产有限公司;纤维素酶(15000 U/g)、果胶酶(50 U/g) 国药集团化学试剂有限公司;标准品甘露糖(Man)、木糖(Xyl)、D-葡萄糖(Glc)、半乳糖(Gal)、鼠李糖(Rha)、1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP) 上海阿拉丁生化科技股份有限公司;3,5-二硝基水杨酸、酒石酸钾钠、考马斯亮蓝 G-250 染色液、无水四硼酸钠、正丁醇、1,1-二苯基-2-苦基肼(DPPH)、牛血清蛋白(BSA)、苯甲基磺酰氯、三氯乙酸、奎诺二甲基丙烯酸酯(Trolox)、偶氮二异丁脒盐酸盐(AAPH)、荧光素钠 分析纯,上海麦克林生化科技有限公司。

HPLC-16 高效液相色谱仪、UV-2700 紫外分光光度计、IRAffinity-1 红外吸收光谱仪 岛津仪器有限公司;Biotek synergy2 多功能酶标仪 美国伯腾仪器有限公司;LGJ-10A 冷冻干燥器 上海贺帆仪器有限公司;HR/20M 冷冻离心机 湖南赫西仪器装备有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 白芨粗多糖的提取 参考 Zhao 等^[21]的方法

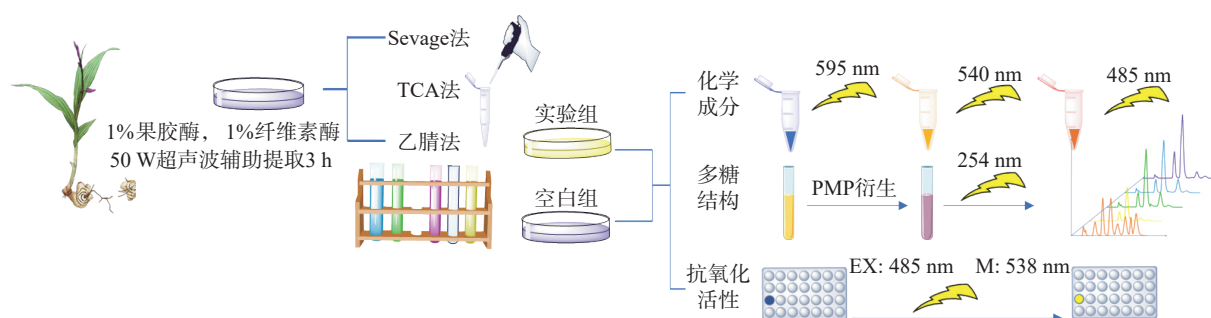


图 1 BSP 脱蛋白的概念流程图

Fig.1 Conceptual flowchart of BSP deproteinization

使用 500 mL 90% 乙醇作为溶剂对 100 g 白芨粉末进行预处理 4 h, 以去除色素等乙醇可溶性成分。过滤后, 收集残留物在真空干燥箱 55 ℃ 下干燥, 将干燥后的白芨粉末索氏提取 6 h 除去脂肪, 再次置于真空干燥箱中于 50 ℃ 将有机溶剂充分挥发, 得到预处理的白芨粉末。

将预处理的白芨粉末(20 g)和去离子水(1:30, w/v)溶解, 加入相当于 1% 的果胶酶和纤维素酶(pH=5)在 35 ℃、80 W 功率超声提取 3 h, 在此期间不断搅拌, 结束后过滤, 取滤液使用旋转蒸发仪浓缩体积至初始体积的 1/3, 向浓缩后的提取液中添加 4 倍提取液体积的无水乙醇, 4 ℃ 静置 12 h, 过滤后用无水乙醇洗涤, 去离子水溶解, 将水相用去离子水在 25 ℃ 下透析 48 h(截留相对分子质量 3600 Da)后在-37 ℃ 冷冻干燥 12 h 后得到粗白芨多糖。

1.2.2 白芨粗多糖脱蛋白方法的初步筛选 配制质量浓度为 10 g/L 的粗白芨多糖水溶液。分别用 TCA 法、Sevage 法、乙腈法脱除 BSP 中的蛋白质, 以多糖保留率和蛋白脱除率综合评分来筛选每种脱蛋白方法的最佳条件。

1.2.2.1 不同脱蛋白方法设计 **a. Sevage 法:** 参考 Chaubey 等^[22]的方法, 取 5 组质量浓度为 10 g/L 的 BSP 水溶液 50 mL, 加入等体积的 4:1 氯仿-正丁醇溶液, 分别萃取 1、2、3、4、5 次, 6000 r/min 离心 30 min 取上清液, 将水相清液用去离子水在 25 ℃ 下透析 48 h(截留相对分子质量 3600 Da)后在-37 ℃ 下冷冻干燥 12 h, 得到 5 组精制的白芨多糖样品, 分别记为 Q1、Q2、Q3、Q4、Q5, 再进行后续实验。

b. 乙腈法: 参考冷桃花等^[23]的方法取 5 组质量浓度为 10 g/L 的 BSP 水溶液 50 mL, 分别加入浓度为 20%、40%、60%、80%、100% 等体积的乙腈溶液, 搅拌 30 min, 放入冰箱 4 ℃ 静置 12 h, 取出后 6000 r/min 离心 30 min 取上清液, 将水相清液用去离子水在 25 ℃ 下透析 48 h(截留相对分子质量 3600 Da)后在-37 ℃ 下冷冻干燥 12 h, 得到 5 组精制的白芨多糖样品, 分别记为 H1、H2、H3、H4、H5, 再进行后续实验。

c. TCA 法: 参考杨培等^[24]的方法取 5 组质量浓度为 10 g/L 的 BSP 水溶液 50 mL, 分别加入浓度为 2%、5%、10%、15%、20% 等体积的三氯乙酸溶液, 搅拌 30 min, 放入冰箱 4 ℃ 静置 12 h, 取出后 6000 r/min 离心 30 min 取上清液, 将水相清液用去离子水在 25 ℃ 下透析 48 h(截留相对分子质量 3600 Da)后在-37 ℃ 下冷冻干燥 12 h, 得到 5 组精制的白芨多糖样品, 分别记为 W1、W2、W3、W4、W5, 再进行后续实验。

1.2.2.2 多糖保留率的计算 多糖含量参考 Chen 等^[25]以总糖含量减去可溶性糖含量来计算。按式(1)计算多糖保留率。

a. 总糖: 参考 Qin 等^[26]的方法, 葡萄糖作为标准

品。绘制回归方程 $y=5.9037x+0.3751(R^2=0.9991)$; 通过回归方程计算样品总糖含量。

b. 可溶性糖: 参考《NY/T 2742-2015》测定, 以葡萄糖作为标准品。绘制回归方程 $y=2.0161x+0.0387(R^2=0.9992)$, 通过回归方程计算样品可溶性糖含量。

$$P_o(\%) = \frac{a_2 - b_2}{a_1 - b_1} \times 100 \quad \text{式 (1)}$$

式中: P_o 为多糖保留率(%); a_1 为样品脱除蛋白前总糖的质量浓度(mg/mg); a_2 为样品脱除蛋白后总糖的质量浓度(mg/mg); b_1 为样品脱除蛋白前可溶性糖的质量浓度(mg/mg); b_2 为样品脱除蛋白后可溶性糖的质量浓度(mg/mg)。

1.2.2.3 蛋白质脱除率的计算 蛋白质采用考马斯亮蓝法^[27]测定, 以牛血清白蛋白(BSA)作为标准品。绘制回归方程 $y=3.5184x+0.4851(R^2=0.9958)$, 通过回归方程计算样品蛋白质含量; 按照式(2)计算蛋白质脱除率。

$$P_R(\%) = \left(1 - \frac{c_2}{c_1}\right) \times 100 \quad \text{式 (2)}$$

式中: P_R 为蛋白质脱除率(%); c_1 为样品脱除蛋白前蛋白质的质量浓度(mg/mg); c_2 为样品脱除蛋白后蛋白质的质量浓度(mg/mg)。

1.2.3 综合评分的计算 本实验采取加权计算法, 测定了 Sevage 法、乙腈法、TCA 法不同处理条件的精制白芨多糖样品的多糖保留率、蛋白质脱除率, 以综合评分^[28]作为各脱蛋白方法蛋白质脱除效果的评价指标, 比较综合评分数值大小筛选出最佳条件, 通过式(3)计算。

$$\text{综合评分} = P_o \times 50\% + P_R \times 50\% \quad \text{式 (3)}$$

1.2.4 不同脱蛋白方法最优条件下纯化白芨粗多糖

根据 1.2.2 得出的各种脱蛋白方法的较优条件进行脱蛋白处理, 通过化学成分含量、结构表征和抗氧化活性来评价其影响评价其纯化效果。

1.2.5 多糖结构

1.2.5.1 BSP 单糖含量测定 BSP 单糖的测定参考甘小凤等^[29]的 PMP 柱前衍生法, 高效液相色谱仪(HPLC)配岛津 Inertsil ODS-3(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱; 配备型号为 SPD-16 紫外检测器; 流动相为 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液(含 0.1% 乙酸)(A)-乙腈(B), 梯度洗脱: 0~10 min, 74% A, 10~15 min, 74%~78% A, 15~25 min, 78% A, 柱温及检测器温度 40 ℃; 体积流量 0.8 mL/min; 检测波长 254 nm; 进样量 20 μL。使用葡萄糖、果糖、半乳糖、木糖、甘露糖、鼠李糖作为标准, 各单糖回归方程、决定系数、线性范围见表 1。

1.2.5.2 UV 测试 取少量经过不同脱蛋白方法处理后的多糖样品用适量去离子水溶解, 用紫外分光光度

表 1 各单糖标准曲线、决定系数、线性范围

Table 1 Standard curve, determination coefficient, linear range for each monosaccharide

单糖	标准曲线	R ²	线性范围(μg/mL)
果糖	y=123272x-432.2	0.9981	50.0~1000.0
甘露糖	y=104501x+279.87	0.9995	50.0~1000.0
鼠李糖	y=139845+354.2	0.9983	50.0~1000.0
葡萄糖	y=124621x-343.74	0.9992	50.0~1000.0
半乳糖	y=18977x-637.19	0.9999	50.0~1000.0
木糖	y=118686x+328.41	0.9995	50.0~1000.0

计于 200~800 nm 进行光谱扫描。

1.2.5.3 FTIR 测试 称取少量经过不同脱蛋白方法处理后的多糖样品置于研钵中,与干燥的 KBr 粉末研磨和压片。使用傅里叶变换红外光谱仪进行测试,波数范围为 4000~400 cm⁻¹。

1.2.6 体外抗氧化活性检测

1.2.6.1 DPPH 自由基清除能力评价 参考 Fan 等^[30]的方法测定多糖样品自由基半数清除浓度 IC₅₀。配制成不同浓度样品液(2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mg/mL)各 2.0 mL,加入 2.0 mL 的 DPPH 溶液,混合均匀,避光反应 30 min 后,在 517 nm 波长下测定吸光度,用 50% 体积分数的乙醇调零,每个样品开展 3 次平行测定,取平均值。按式(4)计算 DPPH 自由基清除率:

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100 \quad \text{式 (4)}$$

式中: A₀: 2.0 mL 50% 体积分数乙醇代替多糖溶液的吸光度; A₁: 不同样品液的吸光度; A₂: 2.0 mL 50% 体积分数乙醇代替 DPPH 的吸光度。

1.2.6.2 氧自由基吸收能力(ORAC)评价 参照陈春^[31]的方法,试剂和样品溶液均用磷酸钾缓冲液(75 mmol/L, pH7.4)配制。在孔板中加入 20 μL 多糖样品溶液或 20 μL 不同浓度 Trolox 标准液(1.5625、3.125、6.25、12.5、25、50 μmol/L)随后加入 200 μL 荧光素钠(0.0478 μmol/L)。设定酶标仪摇动混合物 10 s,并在 37 ℃ 下预孵化 10 min。在每个孔中加入 20 μL AAPH(119.4 mmol/L)后,使用酶标仪测量荧光强度,激发波长为 485 nm,发射波长为 538 nm,在 37 ℃ 下每 1.5 min 测定 1 次。根据不同浓度的 Trolox 标准溶液中的荧光猝灭净面积(NETAUC)得到标准曲线 Y=4.312X+3.461(R²=0.9985)。ORAC 值以每克样品中 Trolox 的质量分数(μmol TE/g)表示。

1.2.7 熵权 TOPSIS

1.2.7.1 评价体系设计 在参考前人研究^[32]的基础上,分别从化学成分(I1)、多糖结构(I2)、体外抗氧化活性(I3)3 个层面出发,设计了包括总糖保留率、还原糖保留率、蛋白脱除率等在内的 9 个具体指标构成的不同方法脱蛋白评价体系。其中,评价指标分为正向指标和负向指标,如表 2 和表 3 所示。

表 2 白芨多糖除蛋白评价体系

Table 2 BSP protein removal evaluation system

一级指标	二级指标	指标单位	指标性质
化学成分(I1)	总糖保留率(I11)	%	正
	可溶性糖保留率(I12)	%	正
	多糖保留率(I13)	%	正
	蛋白质脱除率(I14)	%	正
多糖结构(I2)	葡萄糖相对变化率(I21)	%	负
	甘露糖相对变化率(I22)	%	负
	木糖相对变化率(I23)	%	负
体外抗氧化活性(I3)	DPPH 半数清除浓度(I31)	mg/mL	负
	ORAC 值(I32)	μmol TE/g	正

表 3 白芨多糖除蛋白评价体系各指标

Table 3 Indexes of the protein removal evaluation system of BSP

指标	Sevage 法	TCA 法	乙腈法
I11(%)	99.00	70.34	97.25
I12(%)	92.23	85.36	89.84
I13(%)	99.11	70.03	97.36
I14(%)	22.90	70.64	89.11
I21(%)	2.73	45.06	33.54
I22(%)	12.90	189.19	138.92
I23(%)	19.80	101.98	110.89
I31(mg/mL)	3.89	7.24	4.42
I32(μmol TE/g)	9.43	7.66	14.35

1.2.7.2 指标计算与说明 a.化学成分: 供给指标共有 4 个,以总糖保留率为例,本研究使用的指标计算公式为:

$$Tx(\%) = \frac{a_1}{a_2} \times 100 \quad \text{式 (5)}$$

式中: Tx 为总糖保留率; a₁ 为样品脱除蛋白前总糖的质量浓度; a₂ 为样品脱除蛋白后总糖的质量浓度。

b.粗多糖结构: 本文粗多糖结构的研究表明 BSP 主要有葡萄糖、甘露糖、木糖组成,本研究主要以这三种单糖的占比变化为依据来评价。通过相对变化率来描述各单糖的受影响的强弱,在计算各单糖变化率时,还应考虑其在多糖中的占比。本研究设计的反应供给指标有 3 个。以葡萄糖相对变化率为例,本研究使用的指标计算公式为:

$$G(\%) = \frac{G_0 - G_1}{G_0} \times G_1 \times 100 \quad \text{式 (6)}$$

式中: G 为葡萄糖相对变化率; G₀ 为脱蛋白处理前葡萄糖占比; G₁ 为脱蛋白处理后葡萄糖占比。

c.体外抗氧化活性: 供给指标有 2 个,以 DPPH 半数清除浓度为例,本指标的计算来源为 DPPH 清除率达到 50% 时对应的 BSP 浓度。

1.2.7.3 归一化处理 对原始实验数据进行归一化处理,计算指标性质为正,即越大越优型(X^{*}_{ij});计算指标为负,即指标越小越优型(X^{*}_{ij})。

$$\text{对于极小型指标 } X_{ij}^* = \frac{X_{ij} - \min(X_j)}{\max(X_j) - \min(X_j)} \quad \text{式 (7)}$$

$$\text{对于极大型指标 } X_{ij}^* = \frac{\max(X_j) - X_{ij}}{\max(X_j) - \min(X_j)} \quad \text{式 (8)}$$

式中: X_{ij} 表示第 i 被评价主体中第 j 指标的原数值; X_{ij}^* 表示是第 i 个评价对象中第 j 个指标的标准化值; $\min(X_j)$ 表示该组原始数值中的极小值; $\max(X_j)$ 表示该组原始数值中的极大值。

1.2.7.4 指标权重占比和信息熵的计算 根据公式(7)(8)(9)(10)(11)式计算出各评价指标的权重和信息熵。

$$r_{ij} = \frac{y_{ij}}{\sum_{i=1}^m y_{ij}} \quad \text{式 (9)}$$

$$e_j = -\frac{1}{\ln m} \sum_{i=1}^m r_{ij} \ln r_{ij} \quad \text{式 (10)}$$

$$w_j = \frac{1 - e_j}{\sum_{j=1}^n (1 - e_j)} \quad \text{式 (11)}$$

式中: r_{ij} 表示计算第 j 项指标下第 i 个评价对象的特征比重(贡献度); y_{ij} 表示是第 i 个评价对象中第 j 个指标的标准化值; m 为评价对象的个数; n 为评价指标的个数; e_j 为信息熵; w_j 为权重。

1.2.7.5 最优与最劣方案的确定 最优与最劣方案的确定根据加权决策矩阵得到最优方案 $Z_j^+ = \max(Z_1, Z_2, \dots, Z_m)$ 和最劣方案 $Z_j^- = \min(Z_1, Z_2, \dots, Z_m)$ 。其中, Z_j^+ 表示矩阵 Z 中第 j 项指标的极大值; Z_j^- 表示矩阵 Z 中第 j 项指标的极小值。

1.2.7.6 相对接近度的计算 根据最优与最劣方案, 计算各脱蛋白方法与正理想解距离(D_i^+), 与负理想解的距离(D_i^-), 根据公式计算相对接近度(C_i)。方案 D_i^+ 越小, C_i 越大则被评价方案越优, 反之, 越差。3 种脱蛋白方案根据 C_i 的大小排序。

$$D_i^+ = \sqrt{\sum_{j=1}^n (Z_{ij} - Z_j^+)^2} \quad \text{式 (12)}$$

$$D_i^- = \sqrt{\sum_{j=1}^n (Z_{ij} - Z_j^-)^2} \quad \text{式 (13)}$$

$$C_i = \frac{D_i^-}{D_i^+ + D_i^-} \times 100 \quad \text{式 (14)}$$

式中: D_i^+ 表示脱蛋白方法与正理想解距离; D_i^- 表示脱蛋白方法与负理想解距离; Z_{ij} 表示矩阵 Z 中第 j 项指标下第 i 个评价对象的值; C_i 表示第 i 个评价对象的脱蛋白评价方案接近最优水平的程度。

1.3 数据处理

所有实验重复 3 次, 结果以“平均值±标准差”来表示, 数据采用 IBM SPSS Statistic 26 统计软件进行分析, 图形采用 Origin 2021、ChemDraw 20.0 进行绘制, 显著性分析采用 ANOVA 法, 不同小写字母表示差异性显著($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 综合评分及最佳条件的筛选

图 2A 为 Seavage 法中不同萃取次数对综合评分及多糖保留率和蛋白质脱除率的影响。由图中观察和分析可知, Seavage 法(Q1、Q2、Q3、Q4、Q5)综合评分分别为 61.01、52.08、52.70、52.43、44.82; 随萃取次数的增加整体呈下降趋势, 在萃取次数为 1 次时综合评分最高。Seavage 法对 BSP 蛋白质具有脱除效果, 且蛋白质脱除率与萃取次数呈正相关, 随萃取次数增加有明显的上升趋势, 但效率较低, 当萃取 5 次后其脱除率只有 55.36%; Seavage 试剂对 BSP 存在损耗作用, 保留率与萃取次数呈负相关, 随萃取次数增加有明显下降趋势, 当萃取 2 次时多糖保留率大幅度下降至 64.12%。其中的原因可能有两点: 其一, 氯仿对蛋白变性起主要作用, 溶液中的蛋白

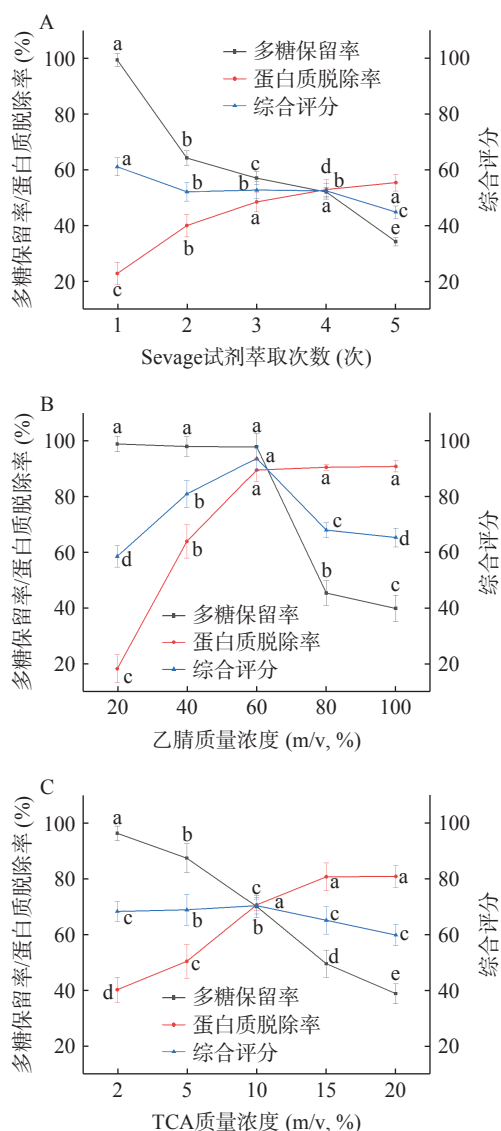


图 2 不同脱除蛋白方案对综合评分及多糖保留率和蛋白脱除率的影响

Fig.2 Effects of different protein removal regimens on overall score, polysaccharide retention and protein removal rate

注: 不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

质变性而分离清除蛋白质^[33], 处理次数越多, 脱除率越高; 其二, 正丁醇对多糖溶解起一定作用^[34], 并且在纯化过程中, 出现乳化现象^[35], 难免有多糖的损失。

图 2B 为乙腈法中不同浓度乙腈对综合评分及多糖保留率和蛋白脱除率的影响。乙腈法(H1、H2、H3、H4、H5)综合评分分别为 58.31、80.59、93.24、67.66、65.04; 随乙腈浓度增加先升高后降低, 当浓度达到 60% 时综合评分达到最高。蛋白脱除率与乙腈浓度呈正相关, 随浓度升高有明显上升趋势, 浓度达 60% 蛋白脱除率高达 85%, 并且当小于此浓度时, 对于 BSP 的损耗现象不明显, 主要体现在具有较高的多糖保留率(>90%)。这可能是由于肽和一些小分子量蛋白能溶于乙腈溶液, 而许多大分子蛋白被沉淀出去^[36], 当浓度达到 60% 时大分子沉淀完全, BSP 溶液蛋白质含量几乎不再改变。

图 2C 为 TCA 法中不同浓度 TCA 对综合评分及多糖保留率和蛋白质脱除率的影响。分析可知, TCA 法(W1、W2、W3、W4、W5)综合评分分别为 68.25、68.87、70.34、65.12、59.84; 随 TCA 浓度升高呈现出先升高后降低的趋势, 在 TCA 浓度达到 10% 时综合评分达到最高。TCA 试剂对与 BSP 蛋白质有明显的脱除效果, TCA 浓度低于 15% 时蛋白质脱除率与 TCA 浓度呈显著性相关($P<0.05$), 多糖保留率与 TCA 浓度呈显著性相关($P<0.05$); 多糖保留率随 TCA 浓度增大而降低, 蛋白质脱除率随 TCA 浓度增大而升高, 而 TCA 浓度达到 15% 以后变化不明显。具体原因可能存在以下两点: 其一, TCA 与蛋白质形成了不溶性盐, 并且 TCA 使蛋白质构象发生改变, 暴露出较多的疏水性基团而聚集沉淀^[37], 质量浓度达到 15% 时此现象达到了饱和; 其二, 除了游离蛋白质, TCA 的加入还促进了多糖-蛋白质复合物^[38]降解, 并且随 TCA 量增多加剧了此现象。

比较三种处理方法不同处理条件综合指标, 对处理条件的初步筛选, 分别选择 Sevage 法萃取 1 次; 乙腈法乙腈质量浓度为 60%; TCA 法 TCA 质量浓度为 10%(Q1、H3、W3)进行后续的研究。

2.2 脱蛋白处理对多糖结构的影响

2.2.1 单糖组成 不同脱蛋白方法处理的 BSP 中各单糖高效液相色谱图及其组分占比如图 3 和表 4 所示, 未进行脱蛋白处理的 BSP 主要由葡萄糖和甘露糖组成, 并伴有少量木糖。各单糖的摩尔占比为 18.6:80.39:1.01, 其中木糖成分较少。TCA 法、Sevage 法、乙腈法对 BSP 单糖组分均存在影响, Sevage 法更好地保持了各单糖组分的占比, 而乙腈法和 TCA 法增加了甘露糖占比, 减少了葡萄糖占比, 对其各单糖占比影响较大。结果表明, 不同脱蛋白处理对 BSP 的影响不同, Sevage 法纯化蛋白能更好地保持各单糖的组分占比。

2.2.2 UV 分析 图 4 为不同脱蛋白处理 BSP 的

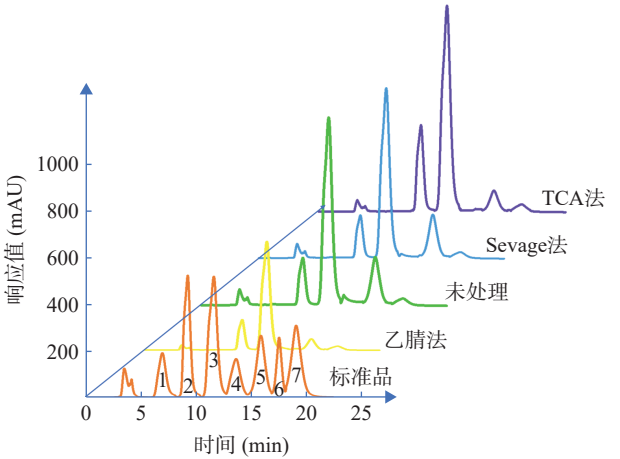


图 3 不同脱蛋白方法处理的 BSP 各单糖高效液相色谱图

Fig.3 High performance liquid chromatograms of BSP monosaccharides treated by different deproteinization methods
注: 1.果糖; 2.甘露糖; 3.PMP; 4.鼠李糖; 5.葡萄糖; 6.半乳糖; 7.木糖。

表 4 不同脱蛋白方法处理的 BSP 中各单糖组分占比
Table 4 Proportion of monosaccharide components in BSP treated by different deproteinization methods

脱蛋白方法	摩尔分数(%)					
	甘露糖	葡萄糖	木糖	果糖	鼠李糖	半乳糖
未处理	18.6	80.39	1.01	/	/	/
Sevage法	16.20	82.59	1.21	/	/	/
TCA法	53.79	44.17	2.04	/	/	/
乙腈法	44.44	53.43	2.13	/	/	/

注: “/”表示未检测出。

UV 分析图, 未处理组 BSP 溶液在 280 nm 附近有较强的紫外吸收峰, 经过三种不同脱蛋白处理紫外吸收强度均有降低。值得注意的是, 乙腈法处理的 BSP 溶液其 280 nm 处吸收强度下降最多, 其原因可能是蛋白质中酪氨酸和色氨酸残基的苯环含有共轭双键, 所以蛋白质溶液在 275~280 nm 处具有一个吸收紫外吸收高峰^[39], 在一定浓度范围内, 蛋白质溶液在最大吸收波长处的吸光度与其浓度成正比^[40], 表明乙腈法对于 BSP 的蛋白脱除效果最好。

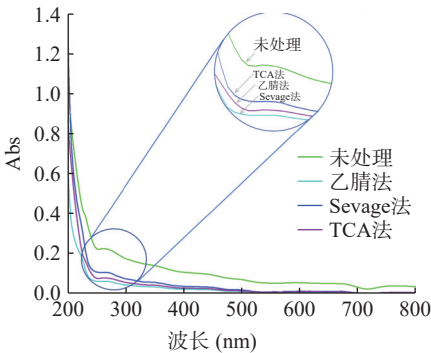


图 4 不同脱蛋白方法处理 BSP 的 UV 分析图
Fig.4 UV analysis plot of BSP treated with different deproteinization methods

2.2.3 FTIR 分析 不同脱蛋白方法处理 BSP 的 FTIR 谱图如图 5 所示, 各 FTIR 图谱中的吸收峰均

表明,出现在 $3200\sim 3500\text{ cm}^{-1}$ 波段是由拉伸振动 O-H 引起的,在约 2900 cm^{-1} 的弱信号峰表明 C-H 的不对称拉伸振动,出现在 $1000\sim 1200\text{ cm}^{-1}$ 的波段是由吡喃糖中的 C-O-C 苷键拉伸振动^[41]引起的。在 1600 cm^{-1} 处没有明显的吸收峰,可以推断白芨多糖中几乎不含糖醛酸, 799 cm^{-1} 和 884 cm^{-1} 处的吸收峰为甘露糖和葡萄糖残基,有 α -构型和 β -构型的存在^[42],这与单糖组成研究的结果相对应。结果表明不同脱蛋白方式对于 BSP 的 FTIR 图谱存在影响,但其特征峰基本没有变化。

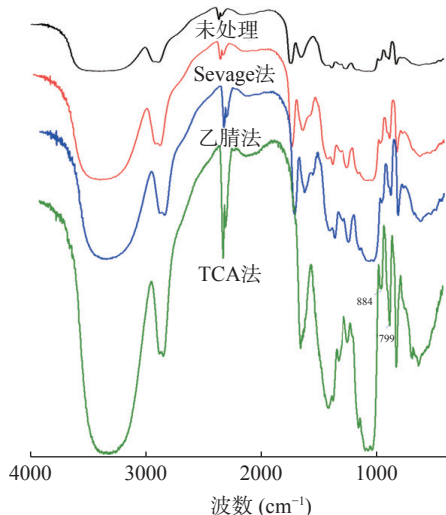


图5 不同脱蛋白方法处理 BSP 的 FTIR 谱图
Fig.5 FTIR spectra of different deproteinization methods for BSP

2.3 脱蛋白处理对多糖体外抗氧化活性的影响

不同脱蛋白方法对 BSP 体外抗氧化活性的影响如图 6 所示。经过不同脱蛋白方法处理的 BSP 体外抗氧化活性发生明显变化,具体体现在 DPPH 半数清除浓度 IC_{50} 和氧化自由基能力的改变,从强到弱依次为 Sevage 法、乙腈法、TCA 法。未进行除蛋白处理的 BSP 作为阳性对照组, DPPH 半数清除浓度 IC_{50} 为 3.78 mg/mL , ORAC 值为 $12.34\text{ }\mu\text{mol TE/g}$;

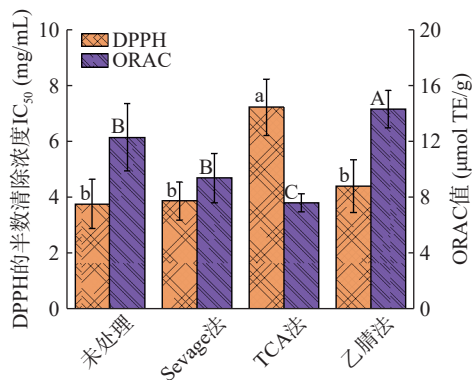


图6 不同脱蛋白方法处理对 BSP 体外抗氧化活性的影响

Fig.6 Effects of different deproteinization treatments on antioxidant activity of BSP *in vitro*

注:不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

值得注意的是乙腈法处理后的 BSP 氧化自由基能力显著高于阳性对照组($P<0.05$)。不同方式处理的 BSP 在体外抗氧化活性上存在具体差异可能与其 BSP 结构的改变^[43]和某些多肽物质的保留有关,多糖具有 -OH、-COOH 等可供氢官能团,这些官能团可以提供氢离子中和自由基中的未配对电子^[44],实现自由基的清除;分子量较小的多肽因其具有较小的空间位阻,能更好地与自由基发生反应^[45],表现出较高的 DPPH 自由基清除率,这与有着保留较好多糖结构和较高蛋白含量的 Sevage 法处理的白芨多糖的抗氧化活性研究结果相一致。

2.4 熵权 TOPSIS 分析

2.4.1 指标权重占比和信息熵的评价 结果见表 5,一级指标中,化学成分占比最高(38.18%),体外抗氧化活性占比最低(23.12%),二级指标中木糖相对变化率最高(17.10%),总糖保留率、多糖保留率、葡萄糖相对变化率占比最低(9.51%)。表明一级指标中化学成分的变化在脱蛋白评价系统中占最重要的因素,而体外抗氧化活性在脱蛋白评价体系中重要性偏低;二级指标中总糖保留率、多糖保留率、葡萄糖相对变化率在评价体系中的影响相同,木糖相对变化率影响最大。

表5 各指标权重占比和信息熵

Table 5 Weight ratio and information entropy of each indicator

一级指标	一级指标权重(%)	二级指标	信息熵	二级指标权重(%)
I1	38.71	I11	0.6563	9.51
		I12	0.6406	9.94
		I13	0.6563	9.51
		I14	0.6477	9.75
		I21	0.6563	9.51
I2	38.18	I22	0.4182	11.57
		I23	0.6179	17.10
		I31	0.6546	9.56
I3	23.12	I32	0.5099	13.56

2.4.2 指标 TOPSIS 综合评价 结果见表 6,对各指标 TOPSIS 综合评价,得出三种处理方法的综合评价大小顺序为 Sevage 法>乙腈法>TCA 法,其中 Sevage 法 C_i 值最大,说明 Sevage 法与理想解最逼近,表明 Sevage 法最优,与秦宇等^[46]和杨斌旺等^[47]的研究结果相符,符合预期结果。

表6 三种除蛋白方案综合评价

Table 6 Comprehensive evaluation of three protein removal regimens

项	正理想解距离 D^+	负理想解距离 D^-	相对接近度 C	排序结果
Sevage法	0.140	0.298	0.681	1
TCA法	0.303	0.120	0.285	3
乙腈法	0.211	0.238	0.530	2

3 结论

本研究采用三种不同的除蛋白方法,对 BSP 进行处理,通过计算多糖保留率和蛋白质脱除率的均值

筛选最佳处理条件,同时对最佳处理条件得到的三种多糖进行多糖结构和抗氧化活性的分析,并对三种处理条件 BSP 进行了 UV 和 FTIR 图谱表征,最后通过熵权 TOPSIS 法进行综合评价。结果表明:通过综合评价筛选出最佳处理条件为 Sevage 法最佳萃取次数为 1 次,此时的蛋白质脱除率为 22.9%,多糖保留率为 99.11%;乙腈法最佳质量浓度为 60%,蛋白质脱除率为 89.11%,多糖保留率为 97.36%;TCA 法最佳质量浓度为 10%,蛋白质脱除率为 70.64%,多糖保留率为 70.03%;根据各项检测指标可以看出,不同处理方法对 BSP 的影响存在明显差异,Sevage 法对 BSP 结构、体外抗氧化活性影响最小,对 BSP 生物活性有较好的保留;TCA 法对 BSP 结构等有较大的改变,其 FTIR 图谱也证实了这个结论;乙腈法对 BSP 损耗效果最小,蛋白脱除效果最好,与 UV 扫描结果相吻合;三种脱蛋白处理方案对 BSP 的 FTIR 图谱均有影响,但其特征峰基本不变。研究结果表明熵权 TOPSIS 可以作为白芨多糖脱蛋白体系的客观评价,对白芨多糖脱蛋白工艺研究具有一定的参考价值。然而本研究也存在评价体系复杂、个别指标权重占比不合理的问题,从此次综合排名来看,Sevage 法明显效果更好,该法具有较高的多糖保留率并且对于 BSP 结构和抗氧化活性影响较小,但存在蛋白质脱除率低、操作复杂等缺陷;如何简化体系、合理分配各指标权重占比、将操作难易程度等非数据因素并入体系内是在今后的研究中需要进行探索和解决的问题。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] 朱峻霄,林亚蒙,杨野,等.白芨多糖在生物医药材料领域中的应用研究进展[J].中药材,2018,41(4):1011-1014. [ZHU J X, LIN Y M, YANG Y, et al. Research progress on the application of white and polysaccharides in the field of biomedical materials[J]. Journal of Chinese Materia Medica, 2018, 41(4): 1011-1014.]
- [2] DIAO H J, LI X, CHEN J N, et al. *Bletilla striata* polysaccharide stimulates inducible nitric oxide synthase and proinflammatory cytokine expression in macrophages[J]. Journal of Bioscience & Bioengineering, 2008, 105(2): 85-89.
- [3] YUE L, WANG W, WANG Y, et al. *Bletilla striata* polysaccharide inhibits angiotensin II-induced ROS and inflammation via NOX4 and TLR2 pathways[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 89: 376-388.
- [4] ZHANG Y S, LÜ T, LI M, et al. Anti-aging effect of polysaccharide from *Bletilla striata* on nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. Pharmacognosy Magazine, 2015, 11(43): 449.
- [5] WANG Y, LIU D, CHEN S J, et al. A new glucomannan from *Bletilla striata*: Structural and anti-fibrosis effects[J]. Fitoterapia, 2014, 92: 72-78.
- [6] TAKAGI S, YAMAKI M, INOUE K. Antimicrobial agents from *Bletilla striata*[J]. Phytochemistry, 1983, 22(4): 1011-1015.
- [7] 李婷婷,王雪吟,胡丹荔,等.柱前衍生法测定桂花多糖中的 6 种单糖的含量[J].食品工业,2019,40(4):323-327. [LI T T, WANG X Y, HU D L, et al. Determination of 6 monosaccharides in osmanthus polysaccharides by pre-column derivatization method[J]. Food Industry, 2019, 40(4): 323-327.]
- [8] 叶美芝,伍紫仪,吴金松,等.山药皮多糖的分离纯化、结构特征及体外抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2023,44(19):78-85. [YE M Z, WU Z Y, WU J S, et al. Isolation and purification, structural characteristics and antioxidant activity of yam peel polysaccharides[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(19): 78-85.]
- [9] 何思辰,陈凌利,陈慧,等.不同脱蛋白方法对青钱柳多糖的结构和抗氧化活性的影响[J].食品工业科技,2023,44(16):81-89. [HE S C, CHEN L L, CHEN H, et al. Effects of different deproteinization methods on the structure and antioxidant activity of *Salix* polysaccharides[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(16): 81-89.]
- [10] 王莹,李锋涛,黄美子,等.黄精多糖脱蛋白工艺及其抗氧化活性[J].食品工业,2021,42(12):57-62. [WANG Y, LI F T, HUANG M Z, et al. Deproteinization process and antioxidant activity of polysaccharides[J]. Food Industry, 2021, 42(12): 57-62.]
- [11] 李媛媛,李静,张智远,等.远志多糖除蛋白工艺优化、单糖组成分析及神经保护研究[J].中国现代应用药学,2022,39(15):1917-1924. [LI Y Y, LI J, ZHANG Z Y, et al. Optimization of protein removal process, analysis of monosaccharide composition and neuroprotection polysaccharide of *Polygala*[J]. China Modern Applied Pharmacy, 2022, 39(15): 1917-1924.]
- [12] 史丛晶,白浩东,李雨昕,等.基于熵权法结合灰色关联法和 TOPSIS 法的不同产地知母及盐知母质量评价研究[J].中国现代应用药学,2023,40(7):873-880. [SHI C J, BAI H D, LI Y X, et al. Research on quality evaluation of different origin *Anemarrhenae rhizoma* and salt *Anemarrhenae rhizoma* based on entropy weight method combined with gray correlation method and TOPSIS method[J]. China Modern Applied Pharmacy, 2023, 40(7): 873-880.]
- [13] 吴红伟,李东辉,张育贵,等.基于熵权 TOPSIS 模型对不同加工方式黄芪药材质量的综合评价[J].中国药学杂志,2021,56(16):1325-1331. [WU H W, LI D H, ZHANG Y G, et al. Comprehensive evaluation of the quality of *Astragalus* medicinal materials under different processing methods based on entropy-weight TOPSIS model[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2021, 56(16): 1325-1331.]
- [14] 吴学辉,程心玲,张晓斌,等.基于 HPLC-QAMS 多指标成分联合化学计量学及熵权 TOPSIS 的白芨综合质量评价[J].中国中医药信息杂志,2023,30(5):127-134. [WU X H, CHENG X L, ZHANG X B, et al. White and comprehensive quality evaluation based on HPLC-QAMS multi-index component combined with chemometrics and entropy weight TOPSIS[J]. China Journal of Information of Traditional Chinese Medicine, 2023, 30(5): 127-134.]
- [15] 刘天亮,董诚明,齐大明,等.不同产地及加工方式金银花的质量评价[J].中药材,2020,43(3):582-586. [LIU T L, DONG C M, QI D M, et al. Quality evaluation of honeysuckle in different origins and processing methods[J]. Journal of Chinese Materia Medica, 2020, 43(3): 582-586.]
- [16] 张小允,鲍洁,许世卫.基于熵权 TOPSIS 模型的中国粮食安全评价研究[J].中国农业资源与区划,2023,44(4):35-44. [ZHANG X Y, BAO J, XU S W. Research on food security evaluation in China based on entropy-weight TOPSIS model[J]. Agriculture

- tural Resources and Regional Planning in China, 2023, 44(4): 35–44.]
- [17] 杨春. 基于熵权 TOPSIS 模型的风电光伏发展潜力评估[J]. 太阳能学报, 2022, 43(12): 70–78. [YANG C. Evaluation of development potential of wind power photovoltaic based on entropy weight TOPSIS model[J]. Journal of Solar Energy, 2022, 43(12): 70–78.]
- [18] 田水承, 冯帅, 高晓颖, 等. 一线矿工不安全状态的熵权 TOPSIS 法评价研究[J]. 安全与环境学报, 2023, 23(11): 49–56. [TIAN S C, FENG S, GAO X Y, et al. Evaluation of entropy weight TOPSIS method in unsafe state of first-line miners[J]. Journal of Safety and Environment, 2023, 23(11): 49–56.]
- [19] 邱雄飞, 张桦, 高翠娟, 等. PCA 和熵权 TOPSIS 法综合评估新型信息化装备保障能力[J]. 火炮发射与控制学报, 2023, 44(6): 86–91. [QIU X F, ZHANG H, GAO C J, et al. Comprehensive evaluation of new information equipment support capability by PCA and entropy weight TOPSIS method[J]. Journal of Artillery Launch and Control, 2023, 44(6): 86–91.]
- [20] 陈浩莹, 王斌, 李金鹏, 等. 碱提白芨粗多糖脱蛋白方法比较及抗氧化活性[J]. 精细化工, 2023, 40(2): 290–296. [CHEN H Y, WANG B, LI J P, et al. Comparison of deproteinization methods and antioxidant activity of crude polysaccharides of *Platyptus alba albican*[J]. Fine Chemicals, 2023, 40(2): 290–296.]
- [21] ZHAO M, HAN Y, LI J, et al. Structural characterization and antioxidant activity of an acetylated *Cyclocarya paliurus* polysaccharide (Ac-CPP0.1)[J]. International Journal of Biological Macromolecules: Structure, Function and Interactions, 2021, 171(1): 112–122.
- [22] CHAUBEY M, KAPOOR V P. Structure of a galactomannan from the seeds of *Cassia angustifolia* Vahl[J]. Carbohydrate Research, 2001, 332(4): 439–444.
- [23] 冷桃花, 万丽佳, 施依文, 等. 乙腈沉淀-离子色谱法测定婴幼儿米粉中硝酸盐和亚硝酸盐[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(10): 4095–4099. [LENG T H, WAN L J, SHI Y W, et al. Determination of nitrate and nitrite in infant rice flour by acetonitrile precipitation-ion chromatography[J]. Journal of Food Safety and Quality Detection, 2021, 12(10): 4095–4099.]
- [24] 杨培, 张瑞, 翟阳, 等. 响应面法优化北豆根粗多糖的除蛋白工艺及其神经保护活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(4): 579–586. [YANG P, ZHANG R, ZHAI Y, et al. Optimization of protein removal process and neuroprotective activity of crude polysaccharides in northern bean root by response surface method[J]. Natural Product Research and Development, 2019, 31(4): 579–586.]
- [25] CHEN H Y, ZENG J S, WANG B, et al. Structural characterization and antioxidant activities of *Bletilla striata* polysaccharide extracted by different methods[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 266(3): 118149.
- [26] QIN X M, FAN X P, ZHANG L Y, et al. Extraction, purification, and structure characterization of polysaccharides from *Crasostrea rivularis*[J]. Food Science Nutrition, 2018, 6(6): 1621–1628.
- [27] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(12): 248–254.
- [28] 王新嘉, 雷国风, 翟志军, 等. 平菇多糖中蛋白质脱除方法的比较[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(5): 111–118. [WANG X J, LEI G F, ZHAI Z J, et al. Comparison of protein removal methods in oyster mushroom polysaccharides[J]. Food Research and Development, 2017, 38(5): 111–118.]
- [29] 甘小凤, 韦国良, 李婷婷, 等. 基于 RSM 及 PMP-HPLC 特征图谱分析黄精炮制过程中多糖组分含量变化[J]. 中草药, 2019, 50(20): 4932–4941. [GAN X F, WEI G L, LI T T, et al. Analysis of polysaccharide component content changes during the processing process of *Polygonatum* based on RSM and PMP-HPLC characteristic maps[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2019, 50(20): 4932–4941.]
- [30] FAN J, FENG H B, YU Y, et al. Antioxidant activities of the polysaccharides of *Chuanminshen violaceum*[J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 157: 629–636.
- [31] 陈春. 桑葚多糖的结构鉴定、活性评价及其体外消化降解[D]. 广州: 华南理工大学, 2018. [CHEN C. Structure identification, activity evaluation and in vitro digestion and fermentation of mulberry polysaccharides[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018.]
- [32] 初雅洁. 辣木多糖除蛋白的工艺技术[J]. 现代食品, 2020(19): 86–89. [CHU Y J. Process technology of protein removal of moringa polysaccharides[J]. Modern Food, 2020(19): 86–89.]
- [33] 张萍, 贺茂萍, 殷力, 等. 石榴皮多糖的 Sevage 法除蛋白工艺研究[J]. 食品科技, 2013, 38(12): 219–222, 231. [ZHANG P, HE M P, YIN L, et al. Study on protein removal process by Sevage method of pomegranate peel polysaccharides[J]. Food Science and Technology, 2013, 38(12): 219–222, 231.]
- [34] 刘晓茵, 赵帅, 路芳, 等. 半枝莲多糖的 Sevage 法除蛋白工艺研究[J]. 中国食物与营养, 2016, 22(3): 56–58. [LIU X Y, Z S, LU F, et al. Study on protein removal process by Sevage method of *Hemibranthus* polysaccharides[J]. China Food and Nutrition, 2016, 22(3): 56–58.]
- [35] ORVISKY E, DRAKE S K, MARTIN B M, et al. Enrichment of low molecular weight fraction of serum for MS analysis of peptides associated with hepatocellular carcinoma[J]. Proteomics, 2006, 6(9): 2895–2902.
- [36] HUANG G L, CHEN Y, WANG X Q. Extraction and deproteinization of pumpkin polysaccharide[J]. International Journal of Food Science Nutrition, 2021, 62(6): 568–571.
- [37] 胡会刚, 赵巧丽, 鹿振才. 菠萝皮渣多糖脱蛋白脱色方法研究及其抗氧化活性[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(24): 12–20. [HU H G, ZHAO Q L, PANG Z C. Study on depigmentation method and antioxidant activity of pineapple peel pomace polysaccharide[J]. Food Research and Development, 2018, 39(24): 12–20.]
- [38] ZHU D M, QIAN F, WU Y M, et al. Determination of protein concentration for protein-protein conjugates using ultraviolet absorption[J]. Journal of Immunological Methods, 2013, 387(1–2): 317–321.
- [39] 曹红翠. 紫外分光光度法测定蛋白质的含量[J]. 广东化工, 2007, 172(8): 93–94, 84. [CAO H C. Determination of protein content by ultraviolet spectrophotometry[J]. Guangdong Chemical Industry, 2007, 172(8): 93–94, 84.]
- [40] CHEN J K, LÜ L Y, LI Y, et al. Preparation and evaluation of *Bletilla striata* polysaccharide/graphene oxide composite hemostatic sponge[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 130: 827–835.
- [41] QU Y, LI C X, ZHANG C, et al. Optimization of infrared-assisted extraction of *Bletilla striata* polysaccharides based on response surface methodology and their antioxidant activities[J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 148: 345–53.
- [42] 赵谋明, 刘敏, 林恋竹, 等. 山苦茶多糖结构表征及抗氧化活

性研究[J]. 现代食品科技, 2015, 31(7): 61-66, 276. [ZHAO M M, LIU M, LIN L Z, et al. Structural characteristics and antioxidant activity of polysaccharides from *Mallotus oblongifolius*[J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(7): 61-66, 276.]

[43] 赵志强, 朱叙丞, 冯真颖, 等. 沙棘果多糖的理化特征及其体外抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2023, 44(13): 30-38. [ZHAO Z Q, ZHU X C, FENG Z Y, et al. Physicochemical characteristic and antioxidant activity *in vitro* of sea buckthorn fruit polysaccharide[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(13): 30-38.]

[44] 付稼榕, 胡小静, 马尚玄, 等. 不同分子量澳洲坚果多肽制备工艺与抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2023, 44(20): 414-421.

[FU J R, HU X J, MA S X, et al. Preparation process and antioxidant activity of macadamia polypeptides of different molecular weights[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(20): 414-421.]

[45] 何宝峰, 马新换, 徐志伟, 等. 基于改进熵权法联合 TOP-

SIS 模型和 BPNN 建模优化甘草糖类成分提取工艺[J]. 中国药理学杂志, 2023, 58(8): 675-682. [HE B F, MA X H, XU Z W, et al. Optimization of glycyrrhizan component extraction process based on improved entropy weight method combined with TOPSIS model and BPNN model[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2023, 58(8): 675-682.]

[46] 秦宇, 华宗, 张敏, 等. 响应面法优化日本蛇菰多糖脱色、脱蛋白工艺[J]. 食品工业科技, 2023, 44(10): 177-184. [QIN Y, HUA Z, ZHANG M, et al. Optimization of decolorization and deproteinization process of Japanese snake polysaccharides by response surface method[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(10): 177-184.]

[47] 杨斌旺, 刘平古, 刘龙飞, 等. 药桑叶多糖的脱蛋白工艺与抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(10): 156-160. [YANG B W, LIU P G, LIU L F, et al. Deproteinization process and antioxidant activity of polysaccharides in mulberry leaves[J]. Food Research and Development, 2020, 41(10): 156-160.]