

· 研究简报 ·

1 种新型乌贼墨糖胺聚糖的分离纯化、理化性质及其抗氧化活性研究^{△*}

牛庆凤¹, 王斌^{1,2}, 李涛¹, 张申微¹, 陈荫^{1*}

(1. 浙江海洋学院 食品与医药学院, 浙江 舟山 316022;

2. 浙江省海洋生物医用制品重点工程技术研究中心, 浙江 舟山, 316022)

摘要:目的 从金乌贼墨(*Sepia esculenta* ink)中提取其活性多糖成分,对其理化性质及体外抗氧化活性进行研究。方法 依次采用两步酶解法提取乌贼墨粗多糖,并使用 Q Sepharose 4 Fast Flow 阴离子交换层析柱对其进行分离纯化,获得主要组分。通过高效液相(HPLC)、紫外光谱(UV)、红外光谱(IR)、离子色谱法对乌贼墨多糖进行理化性质分析以及初步的结构研究,采用 ABTS 法对乌贼墨进行总体抗氧化活性研究。结果 两步酶解后乌贼墨粗多糖的得率为 3%,分离纯化后得到 0.05、0.25、0.5 mol/L NaCl 3 个洗脱组分,分别命名为 SE-1、SE-2、SE-3,其中以 SE-2 为最主要组分,得率为 50%。SE-2 为均一性多糖,分子量 8.5 kD,主要含有半乳糖胺(GalN)、岩藻糖(Fuc)、葡萄糖胺(GlcN)、乙酰氨基半乳糖(GalNAc)、葡萄糖醛酸(GlcUA)以及甘露糖(Man)等单糖;该多糖 SE-2 的总糖含量、蛋白质含量、硫酸根含量、氨基己糖含量和糖醛酸含量分别为 54.20%、3.92%、7.74%、20.50%和 9.86%;IR 光谱进一步证明该糖为 SE-2 糖胺聚糖,构象为 D-吡啶环结构,并有硫酸根的存在;SE-2 对 ABTS 自由基的清除能力较强,其半数清除质量浓度为 0.210 mg/mL。结论 金乌贼墨多糖 SE-2 是 1 种硫酸酯化的新型糖胺聚糖,具有较强的体外 ABTS 自由基的清除活性。

关键词:乌贼墨;糖胺聚糖;单糖组成;理化性质;抗氧化活性

中图分类号:R931

文献标志码:A

文章编号:1002-3461(2015)03-059-06

Separation, purification and analyses on physicochemical properties, antioxidative activity of a novel glycosaminoglycans from *Sepia esculenta* ink

NIU Qing-feng¹, WANG Bin^{1,2}, LI Tao¹, ZHANG Shen-wei¹, CHEN Yin^{1*}

(1. School of Food and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China;

2. Zhejiang Provincial Key Engineering Technology Research Center of Marine Biomedical Products, Zhoushan 316022, China)

Abstract: Objective To extract, isolate and purify polysaccharides from *Sepia esculenta* ink and analyze physicochemical properties and antioxidative activity of the polysaccharides. **Methods** The crude polysaccharides were extracted through two-step enzymatic hydrolysis by papain and trypsin. The main component from the crude polysaccharides was fractionated by a Q Sepharose fast flow column. HPLC, HPGPC, UV spectrophotometer, IR spectrometry and ion chromatography were used to determinate the physicochemical and structural properties; ABTS was used to analyze the total antioxidative activity

* [△]基金项目:国家自然科学基金项目(41406142);海洋药物教育部重点实验室基金(KLMD(OUC)201402)资助

作者简介:牛庆凤(1990-),女,硕士,从事天然产物研究。

* 通讯作者:陈荫(1984-),男,副教授,从事海洋药物相关研究。E-mail: mojojo1984@163.com;

收稿日期: 2014-10-09

of the main polysaccharide. **Results** After enzymatic hydrolysis, the yield of the crude polysaccharide was 3%. Three components were eluted with a step-wise gradients of 0.05, 0.25 and 0.5 mol/L NaCl on Q Sepharose fast flow column, which were named SE-1, SE-2, SE-3 respectively. While SE-2 was the main component, the yield of which was 50% relative to the pure polysaccharides. SE-2 was a homogeneous polysaccharide with a molecular weight of 8.5 kD and was composed of galactosamine, fucose, glucosamine, N-acetylgalactosamine, glucuronic acid and mannose. The contents of total sugar, protein, sulfate, aminohexose and hexuronic acid of SE-2 were 54.2%, 3.92%, 7.74%, 20.5% and 9.86% respectively. In the IR spectrogram, it was shown the typical absorption of sugar residues, glycosaminoglycans and sulfate ester. SE-2 showed strong scavenging ability on the ABTS free radicals. The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) against ABTS free radicals was 0.21 mg/mL. **Conclusion** The polysaccharide SE-2 isolated from *Sepia esculenta* ink was a novel sulfated glycosaminoglycans and had excellent antioxidative activity on ABTS free radicals.

Key words: *Sepia esculenta* ink; glycosaminoglycans; monosaccharide composition; physicochemical property; antioxidative activity

乌贼墨是乌贼由墨囊中的分泌腺合成并储存,可以在遇到天敌时喷出以保护自身安全的黑色物质,自古以来就被作为一味海洋中药来使用。其味苦,性平,归肝经,临床主要用于止血。《神农本草经》中就有乌贼墨“可收敛止血,固精止带,制酸定痛,除湿敛疮”的记载^[1]。《本草拾遗》中也有“止血刺心痛”的记载^[2]。作为传统的海洋中药,乌贼墨在乌贼加工过程中被作为废弃物丢弃,其药用价值未得到有效的开发利用。近年来随着对头足动物的进一步研究,原来的废弃物终于变废为宝,从乌贼墨提取得到大量活性物质。研究表明,乌贼墨主要由黑色素和蛋白多糖复合体组成,其中的黑色素是吲哚醌的聚合物^[3],而多糖部分是主要由葡糖醛酸(GlcA)、N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)和岩藻糖(Fuc)构成的糖胺聚糖(GAG)^[3-4]。20世纪90年代,日本研究人员 Takaya 等^[5]首先发现乌贼墨肽聚糖具有抗肿瘤作用,乐小炎、王光^[6-7]等的研究表明,乌贼墨多糖对环磷酰胺损伤小鼠生精功能具有一定的保护作用,对环磷酰胺所致大鼠骨髓造血功能的抑制具有缓解作用。后续的研究又相继发现乌贼墨具有抗凝血、抗病毒、降血脂、增强免疫力^[3]作用。因而,乌贼墨及其活性多糖成分受到了日益广泛的关注。

1 材料和仪器

1.1 材料

新鲜乌贼内脏,购于浙江舟山定海区南珍菜

市场,乌贼经赵盛龙教授鉴定为金乌贼(*Sepia esculenta* Hoyle);木瓜蛋白酶(上海源聚生物科技有限公司);胰蛋白酶(上海源叶生物科技有限公司);透析袋(biosharp, Mw > 3500); Q Sepharose Fast Flow 柱(Pharmacia Biotech, 瑞士, 3.5 cm × 30 cm);其余试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 乌贼墨糖胺聚糖的提取^[8-9]

从新鲜乌贼内脏团中剥离出墨囊,吸取乌贼墨汁浓缩后冻干备用。采用两步酶解法提取乌贼墨多糖:按料液比 1:20(质量体积比)加入蒸馏水,40℃下磁力搅拌 2 h,均匀分散乌贼墨颗粒→水浴加热至 60℃,调 pH=7,加入 2%木瓜蛋白酶,酶解 3 h→调 pH=10,保持温度 60℃,加入 0.5%胰蛋白酶,酶解 3 h→调 pH 至中性后 100℃水浴加热 15 min 灭酶→调节 pH 至弱酸性,使乌贼墨黑色素易于沉淀→静置后 6 000 r/min 离心 15 min→取上清,调 pH 至中性→浓缩至原体积的 1/20→用终浓度为 80%的乙醇进行醇沉→离心后取沉淀 40℃下烘干→溶解后对蒸馏水透析 2 d(截留分子量 3 500)→浓缩后冷冻干燥,得乌贼墨粗多糖。乌贼墨多糖为白色絮状,得率为 3.0%。

2.2 乌贼墨糖胺聚糖的分离纯化^[10]

将样品溶于水中,配成 2 mL 60 mg/mL 的溶液,离心后采用 Q Sepharose 4 Fast Flow 柱层析

(3.5 cm × 30 cm)连于 AKTA-FPLC 快速蛋白质纯化系统进行线性洗脱。洗脱液为 0~2 mol/L 不同浓度的 NaCl 溶液,流速为 1 mL/min,采用部分收集器收集洗脱液,5 mL/管。采用苯酚-硫酸法在 490 nm 处检测糖含量,以吸光度对洗脱体积绘制洗脱曲线。

由线性洗脱曲线确定糖分布之后采用合适浓度的 NaCl 溶液进行分段洗脱分离。部分收集器收集洗脱液,用苯酚-硫酸法分析并分别收集合并含糖组分,旋转蒸发浓缩,透析脱盐,冻干。

2.3 单糖组成分析^[11-12]

精密称取 5.0 mg 分离纯化后的乌贼墨多糖样品,置于安瓿瓶中,加入 2 mol/L 的三氟乙酸(TFA) 1.0 mL。封管后 105 °C 条件下水解 6 h。水解后反复加入甲醇蒸出 TFA,最后将样品溶于水中,配成 5 mg/L 的溶液,备用^[13]。

单糖标准品溶液:分别精确称取等摩尔干燥至恒重的甘露糖(Man)、氨基葡萄糖(GlcN)、鼠李糖(Rha)、葡萄糖醛酸(GlcUA)、半乳糖醛酸(GalUA)、乙酰氨基半乳糖(GalNAc)、葡萄糖(Glc)、半乳糖(Gal)、木糖(Xyl)、阿拉伯糖(Ara)和岩藻糖(Fuc)12种单糖标准品,加水充分溶解,配制成 1.0 mg/mL 的溶液。

众所周知,海洋动物多糖的单糖组成复杂多样,本实验采用 PMP 柱前衍生高效液相色谱法分析其单糖组成。采用 PMP 衍生化方法,对等摩尔配制的单糖标准品和各多糖全水解后产物进行衍生,然后进行高效液相色谱分析。

色谱条件:Agilent XDB-C18 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相:磷酸盐缓冲液(pH=6.7)/CH₃CN(82:18,体积分数);流速:1.0 mL/min;柱温:30 °C;进样量:20 μL;检测器:DAD(245 nm)。

2.4 乌贼墨糖胺聚糖纯度分析以及分子量测定^[14]

采用高效凝胶渗透色谱法(HPGPC)测定。

色谱条件:

色谱柱:Shodex Ohpak SB-804HQ 凝胶色谱柱(300 mm × 7.8 mm);柱温:35 °C;流动相:0.1 mol/L 的 Na₂SO₄;流速:0.5 mL/min;检测器:示差检测器(RID)。

2.5 乌贼墨类糖胺聚糖的理化性质分析

硫酸根含量测定

采用离子色谱法测定硫酸根含量^[15]。

色谱条件

色谱柱:SH-AC-1 阴离子交换柱(苯乙烯和二乙烯基苯共聚物,4.6 mm × 250 mm,13 μm);3.6 mmol/L 碳酸钠和 4.5 mmol/L 碳酸氢钠的混合液;流速:1.5 mL/min;电导检测器检测;抑制器电流:75 mA;柱温:35 °C;柱压:5.5 MPa;背景电导:65 μS/cm;进样量:100 μL;采集时间:12 min。

以乌贼墨多糖单糖组成分析中得出的主要单糖组成及其比例为标准配制成的溶液为标准液,采用硫酸-苯酚法测定总糖含量^[16];以氨基葡萄糖为标准品,采用改良的 Ehrlich 法测定氨基己糖含量^[17];采用 Folin-酚法测定蛋白质含量^[18-19];采用咔唑-硫酸法测定糖醛酸含量,以葡萄糖醛酸为标准品^[20]。

2.6 红外光谱分析^[17]

运用 KBr 压片法,将适量多糖样品与干燥的 KBr 粉末在玛瑙研钵中研磨均匀,经压片机压制成透明薄片,在红外光谱仪下进行测定。红外光谱仪测定参数如下:背景扫描次数:32 次;扫描范围为 400~4 000 cm⁻¹;分辨率:4.0 cm⁻¹;检测器:DTGS。

2.7 体外 ABTS 自由基清除活性测定

罗萍等^[1]已经对乌贼墨多糖的体外抗氧化作用作了比较系统的研究,他们的研究表明,乌贼墨多糖对羟自由基和 DPPH 具有较高的清除能力,而且,还具有较高的还原能力。所以,本实验主要研究乌贼墨多糖对 ABTS 自由基(2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐)的清除能力^[21],进而得到对乌贼墨多糖的抗氧化活性的更加全面的研究。

将 ABTS 溶于过硫酸钾溶液(2.45 mmol/L)中,使之浓度达到 7 mmol/L,在暗室静置 16 h,用 PBS 缓冲溶液稀释,使其吸光度在 734 nm 下检测值为 0.70±0.02,该值为 A_c。

将 1 mL ABTS 稀释液与 1 mL 不同浓度(0.25,0.5,1.0,1.5,2.0 和 4.0 mg/mL)的待测样品充分混合后,静置 10 min,在 734 nm 处测其吸光度为 A_s。以 V_c 为阳性对照,样品的抗氧化活性用样品对 ABTS 自由基的清除率表示:

样品对 ABTS 自由基清除率 = (Ac-As)/Ac × 100%

3 结果与讨论

3.1 乌贼墨糖胺聚糖的分离纯化

采用 0~2 mol/L 的 NaCl 溶液进行线性洗脱后进行梯度洗脱,得到乌贼墨类糖胺聚糖的梯度洗脱曲线,如图 1 所示。从该图中可以看出,主要有 3 个多糖洗脱组分。根据各峰对应的盐浓度确定出乌贼墨粗多糖的洗脱条件,分别为 0.05 mol · L⁻¹、0.25 mol · L⁻¹、0.5 mol · L⁻¹ 的 NaCl 溶液 3 个梯度,分别将这 3 个组分命名为 SE-1、SE-2、SE-3,由图可以看出,尤以第二个组分 SE-2 即 0.25 mol/L 的 NaCl 溶液洗脱下来的组分最多,故本实验主要对 SE-2 这个组分进行研究。收集 SE-2 这个组分,透析除去盐分,浓缩并冻干。SE-2 相对于

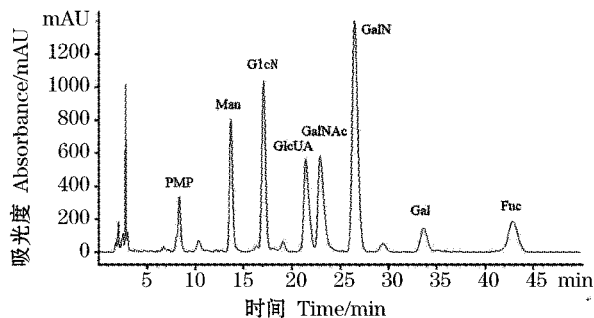


图 2 SE-2 的 PMP 柱前衍生液相色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of the PMP pre-column derivative SE-2

研究表明,乌贼墨多糖均为类糖胺聚糖,但不同来源的乌贼墨多糖在单糖组成和理化性质上有很大的区别。李孝东、王凤山等^[3]研究曼氏无针乌贼墨多糖是由等摩尔比例的 GlcUA、GalN 以及 Fuc 3 种单糖组成; Chunhui Liu, Xiaodong Li 等^[22]对无针乌贼墨的研究结果显示,无针乌贼墨多糖由 Fuc、GalN 以及 Man 以摩尔比例 2 : 2 : 1 构成; Shiguo Chen, Jie Xu^[23] 等对鱿鱼墨多糖进行研究,得出其由 GlcUA、GalNAc 以及 Fuc 3 种单糖组成。而在本实验研究中(见图 3),SE-2 单糖组成更为复杂,主要含有 GalNAc、Gal 和 Fuc,还含有 Man、GlcN 和 GlcUA。其摩尔比例为 Man : GlcN : GlcUA : GalNAc : GalN : Gal : Fuc = 1 : 1.54 : 1.23 : 1.39 : 3.33 : 0.48 : 2.05。

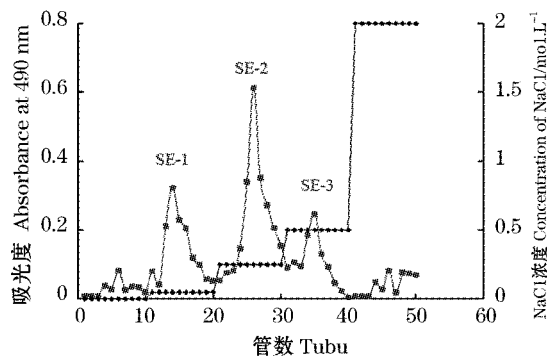


图 1 乌贼墨多糖 Q sepharose fast flow 层析柱上的梯度洗脱图

Fig. 1 Segment elution of the crude *Sepia esculenta* polysaccharides on Q Sepharose fast flow

3.2 单糖组成分析

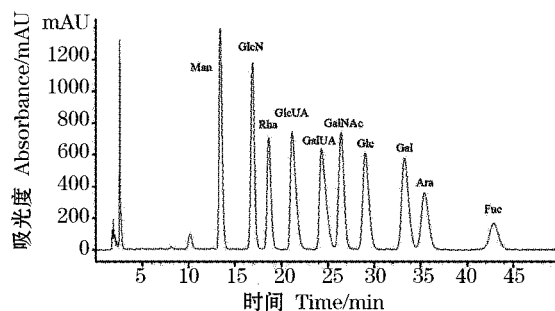


图 3 单糖标准品的 PMP 柱前衍生液相色谱图

Fig. 3 HPLC chromatogram of the PMP pre-column derivative standard monosaccharides

由分析可知乌贼墨多糖 SE-2 为 1 种同时含有 3 种碱性单糖 GlcN、GalN 和 GalNAc 并以 GalN 为主要含量,含有 1 种糖醛酸 GlcUA,含有在很多海洋糖胺聚糖中都存在的 Fuc,同时还含有 Man 和 Gal,由这些单糖组成的糖胺聚糖还未见报道。

3.3 纯度分析以及分子量测定

利用高效凝胶色谱法,测定纯度的同时根据已知分子量的标准品(20.0, 10.7, 4.71, 2.11, 9.6 和 5.9 kD,中国药品生物制品检定所)的出峰时间即可推算出多糖的分子量。由 SE-2 的高效凝胶色谱图可知,SE-2 呈单一对称狭窄的峰,表明其纯度高,计算得到其分子量为 8.6 kDa。而 Chunhui Liu 等^[22]得到的无针乌贼墨多糖分子量为 11.3 kDa。

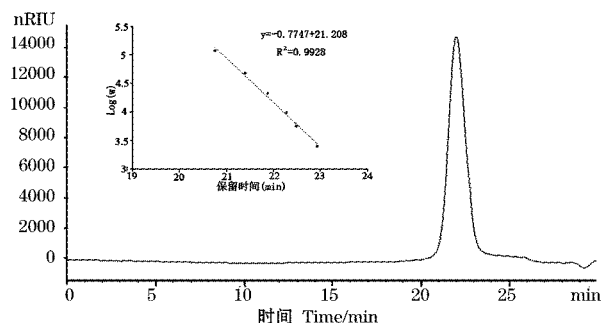


图4 SE-2的高效凝胶色谱图

Fig. 4 HPGPC chromatogram of SE-2

3.4 理化性质测定

多糖的理化性质为多糖进一步的结构鉴定和活性筛选提供重要的参考价值。通过离子色谱法以及比色法对 SE-2 的理化性质进行比较分析。离子色谱法确定多糖的硫酸根含量为 7.74%。SE-2 中含有硫酸基,表明其为硫酸酯化的糖胺聚糖。另外,SE-2 的总糖含量为 54.2%,含有 3.92% 的蛋白,20.5% 的氨基糖和 9.86% 的糖醛酸。

3.5 红外光谱分析

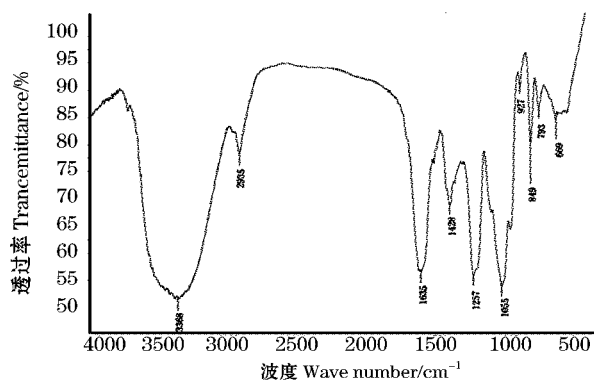


图5 SE-2的红外吸收光谱

Fig. 5 IR of SE-2

红外光谱可以直观的给出多糖官能团、取代基及及结构相关信息。红外吸收光谱见图 5。该图表明样品具有典型的糖胺聚糖红外吸收特征。3 368 cm^{-1} 有强烈的 O-H 和 N-H 伸缩振动的特征吸收带;2 935 cm^{-1} 是糖类 C-H 伸缩振动吸收峰;1 428 cm^{-1} 是 C-H 变角振动峰;1 055 cm^{-1} 为环醚 C-O-C 的伸缩振动,以上可判断该物质为多糖类化合物。1 635 cm^{-1} 为酰胺键中的 C=O 伸缩振动峰,表明存在着乙酰氨基结构;1 257 cm^{-1} (强)为 S=O 伸缩振动,849 cm^{-1} 为 C-O-S 伸缩振动(赤道配位);这 2 个峰证明含有硫酸基。SE-2

在 927 cm^{-1} 处有吸收峰,说明该多糖为 D-吡啶环结构^[24]。此图谱与曼氏无针乌贼墨多糖的红外光谱^[3] 基本相同,但是在 1 257 cm^{-1} 处有强的吸收,而曼氏无针乌贼墨多糖在此区域没有吸收,所以本实验中金乌贼墨多糖和曼氏无针乌贼墨多糖相比,为硫酸酯化程度更高的糖胺聚糖。

3.6 清除 ABTS 自由基的抗氧化活性研究

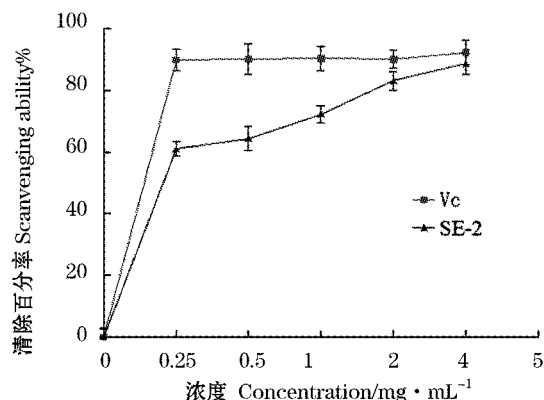


图6 SE-2对ABTS的清除曲线

Fig. 6 Scavenging curve of SE-2 to ABTS radicals

对从乌贼墨分离纯化得到的 SE-2 组分进行体外抗氧化活性测试,实验结果显示,SE-2 组分对 ABTS 自由基的清除能力比较强。从图 6 可以看出,在一定范围内,随着样品浓度的增加,其对 ABTS 自由基的清除能力也在提高。而到浓度达到 4.0 mg/mL 时,其清除能力达到 88.64%,其半数清除质量浓度为 0.21 mg/mL 。

采用两步酶提法提取乌贼墨糖胺聚糖,经 Q Sepharose 4 Fast Flow 离子交换层析柱分离得到 0.25 mol/L NaCl 洗组分 SE-2。本实验采用两步酶解法大大降低了蛋白质在乌贼墨糖胺聚糖中的含量,进而提高了该糖胺聚糖的纯度。该乌贼墨多糖为均一性的多糖,分子量约为 8.5 kDa 左右。通过研究其理化性质和单糖组成,得出乌贼墨多糖为硫酸酯化的糖胺聚糖,硫酸根含量为 7.74%。

红外光谱(IR)分析表明,SE-2 是 1 种 D-吡啶环结构。对该多糖进行的单糖组成分析表明,该糖胺聚糖含有包括 GlcN、GalN 和 GalNAc 在内的碱性单糖,并以 GalN 为主要含量,含有 1 种糖醛酸(GlcUA)。这与曼氏无针乌贼^[3]、鱿鱼^[23] 以及无针乌贼墨多糖^[22] 有所不同,而其分子量也不同于无针乌贼墨多糖,由 IR 分析结果显示,本实验研究的金乌贼墨多糖硫酸酯化的程度更高。鉴于

乌贼墨作为主要保健品来使用的现状,本实验对金乌贼墨多糖的理化性质以及抗氧化活性等作了研究,对进一步研究乌贼墨的药用价值以及对乌贼墨的综合利用提供了依据,丰富了乌贼墨糖胺聚糖的来源。

4 结论

采用木瓜蛋白酶和胰蛋白酶两步酶解法从金乌贼墨中提取多糖类成分,通过离子交换逐层析分离纯化获得主要组分 SE-2。SE-2 为由 Man、GlcN、GlcUA、GalNAc、GalN、Gal 和 Fuc 组成的硫酸酯化类糖胺聚糖,硫酸根含量为 7.74%,分子量为 8.6 kDa。SE-2 具有较强的 ABTS 自由基的清除能力。同时,本实验表明,乌贼墨糖胺聚糖在生物学活性中尚有深入的研究价值,其生物活性有待进一步研究。

参考文献

- [1] 罗萍,师莉莎,刘华忠. 乌贼墨多糖的体外抗氧化作用 [J]. 食品研究与开发, 2013, 34(8):1-4.
- [2] 吕昌龙,洪明标,钟建国,等. 乌贼墨对小鼠移植瘤的抑制作用 [J]. 实用肿瘤学杂志, 1994, 1:6-7.
- [3] 李孝东,王凤山,宋允胜,等. 乌贼墨糖胺聚糖的制备与理化性质研究 [J]. 中国海洋药物, 2004, 23(4):24-27.
- [4] 赫姓,吕昌龙,王兰,等. 乌贼墨抗肿瘤活性的实验研究 [J]. 中国医科大学学报, 1996, 25(2):134-135.
- [5] Takaya Y, Uchisawa H, Narumi F, et al. Illexins A, B, and C from squid ink should have a branched structure [J]. *Biochem biophys res commun*, 1996, 226(2):335-338.
- [6] 乐小炎,许泽旋,师莉莎,等. 乌贼墨多糖对环磷酰胺损伤小鼠生精功能的影响 [J]. 中国海洋药物, 2012, 31(5):23-26.
- [7] 王光,钟杰平,刘华忠. 乌贼墨多糖缓解环磷酰胺致大鼠骨髓功能抑制作用的研究 [J]. 营养与健康, 2012, 17(17):365-367.
- [8] 吴金龙,刘华忠,师莉莎,等. 乌贼墨多糖提取工艺优化 [J]. 食品工业科技, 2011, 32(7):289-296.
- [9] 许静,周凤梅,彭芳,等. 酶法提取海参脏器多糖条件优化研究 [J]. 食品研究与开发, 2010, 31(8):28-30.
- [10] Chen Y, Mao W, Wang B, et al. Preparation and characterization of an extracellular polysaccharide produced by the deep-sea fungus *Penicillium griseofulvum* [J]. *Bioresour Technol*, 2013, 132:178-81.
- [11] Chen Y, Mao W, Yang Y, et al. Structure and antioxidant activity of an extracellular polysaccharide from coral-associated fungus, *Aspergillus versicolor* LCJ-5-4 [J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 87(1):218-226.
- [12] 梁军,夏永刚,杨炳友,等. 柱前衍生化_HPLC法分析麻黄多糖 ESP-B1 的单糖组成 [J]. 中草药, 2011, 42(10):1985-1988.
- [13] 陈茵. 四株不同来源海洋微生物胞外多糖的结构及抗氧化活性研究 [D]. 青岛:中国海洋大学, 2012.
- [14] 殷秀红,赵峡,张紫恒,等. 紫贻贝多糖的提取、分离和基本理化性质分析 [J]. 中国海洋药物杂志, 2011, 30(2):12-17.
- [15] 张丽萍,王月秋,姜世成,等. 离子色谱法测定高山红景天多糖硫酸酯中硫酸根含量的研究 [J]. 分子科学学报, 2000, 16(3):161-164.
- [16] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances [J]. *Anal Chem*, 1956, 28(3):350-356.
- [17] 张惟杰. 糖复合物生化研究 [M]. 第 2 版. 杭州:浙江大学出版社, 1999.
- [18] 宿玮,常耀光,薛长湖,等. 海地瓜多糖中蛋白含量测定方法比较 [J]. 食品科学, 2011, 32(2):201-204.
- [19] 张贤忠,刘铁兵,郭小青,等. 茶叶中蛋白质含量的测定 [J]. 2013, 41(21):9058-9059.
- [20] Bitter T, Muir H M. A modified uronic acid carbazole reaction [J]. *Anal Chem*, 1962, 4:330-334.
- [21] 郑善元,陈填烽,郑文杰,等. 单从茶水提取物清除 DPPH 和 ABTS 自由基的光谱学研究 [J]. 光谱学与光谱分析, 2010, 30(9):2417-2423.
- [22] Liu C H, Li X D, Li Y H, et al. Structural characterization and antimutagenic activity of a novel polysaccharide isolated from *Sepiella maindroni* ink [J]. *Food Chem*, 2008, 110:807-813.
- [23] Chen S G, Xu J, Xue C H, et al. Sequence determination of a non-sulfated glycosaminoglycan-like polysaccharide from melanin-free ink of the squid *Ommastrephes bartrami* by negative-ion electrospray tandem mass spectrometry and NMR spectroscopy [J]. *Glycoconj J*, 2008(25): 481-492.
- [24] Wu Y L, Sun C R, Pan Y J. Studies on isolation and structural features of a polysaccharide from the mycelium of an Chinese edible fungus (*Cordyceps sinensis*) [J]. *Carbohydr Polym*, 2006, 63:251-256.