

防风中 1 个新多糖的结构及免疫调节活性研究

何新阳¹, 范海涛^{1,2}, 孙 萌¹, 李 洁¹, 夏 青³, 姜艳艳^{1,4*}, 刘 斌^{1,4*}

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488

2. 北京电子科技职业学院生物工程学院, 北京 100176

3. 齐鲁工业大学(山东省科学院)生物研究所, 山东 济南 250103

4. 国家中医药管理局“中药经典名方有效物质发现”重点研究室, 北京 102488

摘要: 目的 对防风 *Saposhnikovia divaricata* 中分离得到均一多糖的结构及其免疫调节活性进行研究。方法 采用 DEAE-纤维素、Sephadex G-75 等柱色谱法, 对防风多糖进行系统分离纯化, 采用 ESI-MSⁿ、GC-MS、NMR 等谱学技术, 对分离得到的防风多糖 SP800203 的相对分子质量分布、单糖组成、寡糖片段、糖残基类型和糖苷键连接方式等进行分析, 确定其结构。采用细胞实验和斑马鱼实验, 研究防风多糖 SP800203 的免疫调节活性。**结果** 从防风中分离得到防风多糖 SP800203, 糖醛酸质量分数为 75.73%, 相对分子质量约为 7.14×10^4 , 由鼠李糖、半乳糖、阿拉伯糖和半乳糖醛酸组成, 单糖物质的量比为 2.8:6.7:6:84.5。主链由半乳糖醛酸聚合而成, 2 条支链分别由阿拉伯糖、半乳糖醛酸、半乳糖、鼠李糖, 以及阿拉伯糖、半乳糖醛酸、半乳糖聚合而成, 二者分别通过 β 、 α 糖苷键与主链相连。防风多糖 SP800203 可以促进巨噬细胞一氧化氮、肿瘤坏死因子- α 、白介素-1 β 和白介素-6 的释放, 增加斑马鱼的免疫细胞密度和巨噬细胞数量。**结论** 防风多糖 SP800203 为从防风中分离得到的新的均一多糖, 具有良好的免疫调节活性; 研究结果为阐明防风免疫调节作用机制奠定了基础, 为防风临床应用及进一步研究与开发提供科学依据。

关键词: 防风; 多糖; 结构表征; 免疫调节; 半乳糖醛酸; 鼠李糖; 半乳糖; 阿拉伯糖

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)04-1089-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.04.004

Structural analysis and immunomodulatory activity of a new polysaccharide from *Saposhnikovia Radix*

HE Xinyang¹, FAN Haitao^{1,2}, SUN Meng¹, LI Jie¹, XIA Qing³, JIANG Yanyan^{1,4}, LIU Bin^{1,4}

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

2. School of Bioengineering, Beijing Polytechnic University, Beijing 100176, China

3. Biology Institute, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250103, China

4. Key Laboratory of “Discovery of Effective Substances in Classical Prescriptions of Traditional Chinese Medicine”, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 102488, China

Abstract: Objective To study the structure and immunomodulatory activity of homogeneous polysaccharides isolated from Fangfeng (*Saposhnikovia Radix*). **Methods** Polysaccharide SP800203 was isolated from *Saposhnikovia Radix* by several chromatographic techniques, such as DEAE-Cellulose and Sephadex G-75. The relative molecular weight, monosaccharide composition, oligosaccharide fragments, sugar residue types and glucosidic bond linkage modes were characterized with ESI-MSⁿ, GC-MS, and NMR. Cell and zebrafish experiments were used to explore the immunomodulatory activity of polysaccharide SP800203. **Results** Polysaccharide SP800203 was isolated from *Saposhnikovia Radix*, with a glucuronic acid content of 75.73%, a molecular weight of 7.14×10^4 , composed of rhamnose (Rha), galactose (Gal), arabinose (Ara), and galacturonic acid (GalA), the molar ratio of monosaccharides was 2.8:6.7:6:84.5. The main chain was polymerized by GalA, and the two branch chains were separately polymerized by Ara, GalA, Gal, Rha and Ara, GalA, Gal, which were connected to the backbone by β and α glycosidic bonds, respectively. Polysaccharide SP800203 could significantly promote the release of NO, TNF- α , IL-1 β , IL-6 and increase the

收稿日期: 2023-07-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(82074283); 中央高校基本科研业务费专项资金资助(2023-JYB-KYPT-15)

作者简介: 何新阳(2001—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药(复方)有效成分(组分)发现与药物创新研究。E-mail: 13109891193@163.com

*通信作者: 刘 斌(1967—), 男, 教授, 博士生导师, 博士, 研究方向为中药(复方)有效成分(组分)发现与新药创制。E-mail: liubinyn67@163.com

姜艳艳(1980—), 女, 教授, 博士生导师, 博士, 研究方向为中药药效物质基础与质量控制方法。E-mail: jyyjm1129@163.com

density of immune cells and the number of macrophages. **Conclusion** Polysaccharide SP800203 is a new homogeneous polysaccharide isolated from *Saposhnikovia Radix*, which shows good immunomodulatory activity. The results of the study lay a foundation for elucidating the mechanism of immune regulation of *Saposhnikovia Radix*, and provide a scientific basis for the clinical application and further research of *Saposhnikovia Radix*.

Key words: *Saposhnikovia Radix*; polysaccharides; structural characterization; immunomodulation; galacturonic acid; rhamnose; galactose; arabinose

防风 *Saposhnikovia Radix* 为伞形科植物防风 *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. 的干燥根, 其性味辛、甘、微温, 具有祛风解表、胜湿止痛的功效^[1], 可治疗风湿痹痛、风疹瘙痒、破伤风等疾病, 是临床常用中药, 也是多个常用中成药的主要组成药味, 如玉屏风颗粒、防风通圣颗粒、童康颗粒。防风中含有多糖、色原酮、香豆素、挥发油等化学成分, 常用于治疗免疫相关疾病, 如过敏性鼻炎、慢性支气管炎、过敏性哮喘、肾病等^[2-6]。其中, 多糖是防风发挥免疫调节作用的主要有效成分。现代药理学研究表明, 防风总多糖可有效改善过敏性鼻炎大鼠行为学及鼻黏膜病理形态, 显著促进水通道蛋白 5 (aquaporin 5, AQP5) 表达^[7], 防风总多糖经硫酸酯化可直接调控肿瘤细胞的恶性生物学行为, 发挥免疫调节作用^[8]; 从防风总多糖中分离得到的均一多糖 SDNP-2 对巨噬细胞的免疫抑制有明显的拮抗作用^[9], 防风均一多糖 SDPs 能清除 ABTS 自由基, 对 H₂O₂ 氧化损伤的 RAW264.7 细胞具有保护作用^[10]。

课题组前期对防风多糖的免疫调节活性开展了系统研究。斑马鱼实验显示, 防风总多糖能使斑马鱼的免疫细胞、巨噬细胞和中性粒细胞数目显著增加, 有抗炎、抗感染的作用^[11]; 小鼠碳粒廓清实验表明, 防风总多糖能显著提高小鼠免疫器官的脏器指数和免疫球蛋白含量, 增强机体非特异性免疫; 从防风总多糖中分离得到的均一多糖 SP800201 能显著提高细胞的增殖和吞噬能力, 对免疫抑制的斑马鱼模型、RAW264.7 巨噬细胞模型均有免疫调节作用^[12]。

为进一步阐明防风发挥免疫调节作用的物质基础, 探明其作用机制, 在前期研究基础上, 对防风多糖进行系统分离、纯化, 得到新的均一多糖 SP800203; 采用全水解衍生化、部分酶水解、甲基化以及 MS、IR、NMR 谱学等多种方法和技术, 对结构进行分析; 运用细胞实验、斑马鱼实验, 研究其免疫调节活性。本研究为防风的科学应用和进一步开发提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Bruker AVANCE-III HD700 MHz 型核磁共振仪

(德国 Bruker 公司); Agilent 1200 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司 OPENLAB 工作站); UV8000 型紫外分光光度计 (上海元析仪器有限公司); 傅里叶变换红外光谱仪 (美国 PerkinElmer 公司); TD5A-WS 型高速离心机 (金南仪器制造有限公司); 氮气吹干仪 (上海极恒实业有限公司); ZRQ30 型冷冻干燥机 (天津因赛科技发展有限公司); 生化培养箱 (上海一恒科学仪器有限公司); AR224CN 电子天平 (美国 Ohaus 公司); TSK® G5000PWXL 凝胶色谱柱 (300 mm × 7.8 mm) 和 TSK® G3000PWXL 凝胶色谱柱 (300 mm × 7.8 mm), 日本 TSK 公司; HP-5 MS 色谱柱 (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm, 美国 Agilent 公司); Forma 3111 型水套式 CO₂ 培养箱 (美国 Forma 公司); SZX16IE204E 型体视荧光显微镜 (美国 Olympus 公司); SPX-280B-G 型博讯光照培养箱 (上海基星生物科技有限公司); DS-200 高速组织捣碎机 (江苏江阴科研器械厂); 细胞超声破碎仪 (宁波新芝生物科技股份有限公司); NanoDrop 2000 紫外分光光度计 (美国 ThermoFisher 公司); C1000 Touch 梯度 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司); Light Cycler 96 实时荧光定量 PCR 仪 (瑞士 Roche 公司); Spectra-Max-190 型酶标仪 (美国分子仪器公司); BT-25S 型电子分析天平 (北京 Sartorius 公司); 微量移液器 (德国 Eppendorf 公司); Sigma3-16P 离心机 (德国 Sigma 公司); 超低温冰箱 MOF-U3386S (日本 SANYO 公司); 高压蒸汽灭菌锅 AUTOCLAVE (日本 SANYO 公司); 倒置显微镜 TE 2000-S (日本 Nikon 公司)。

1.2 试剂与药品

系列 Dextran 标准品 (GPC 分析标准, 相对分子质量为 1.2×10^4 、 2.5×10^4 、 5.0×10^4 、 8.0×10^4 、 2.7×10^5 、 4.1×10^5 , 美国 Sigma aldrich 公司); 单糖标准品 D-甘露糖、L-鼠李糖、D-半乳糖、D-葡萄糖醛酸 (上海金穗生物科技有限公司)、L-阿拉伯糖 (天津风船化学试剂科技有限公司)、D-半乳糖醛酸 (北京金泰宏达生物科技有限公司)、D-葡萄糖 (天津市北联精细化学品开发有限公司); 长春瑞滨

(NVB, 批号 A19GB145811, HPLC 质量分数 $\geq 98\%$, 上海源叶生物科技有限公司); 盐酸左旋咪唑 (LH, 批号 C10715718, 上海麦克林生化科技有限公司); 中性红 (NR, 批号 BCBC9975, 美国 Fluka 公司); 苏丹黑 B (SBB, 批号 MKBV5357V, 美国 Sigma 公司); NO 检测试剂盒 (批号 S0021S, 上海碧云天生物技术有限公司); 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素- 1β (interleukin- 1β , IL- 1β)、IL-6 试剂盒 (批号 RK00027、RK00006、RK00008, 美国 ABclonal 公司); RAW264.7 巨噬细胞 (国家实验细胞资源共享平台); DMEM 高糖培养基 (美国 Hyclone 公司); 胎牛血清 (澳洲 AusGeneX 公司); CCK-8 试剂盒 (美国 Genview 公司); 中性红 (德国 Sigma 公司); 色谱纯甲醇和乙腈 (美国 Fisher 公司), 其余试剂均为分析纯。

防风饮片购自河北华草晟中药材公司, 批号 2018050601, 经北京中医药大学张媛教授鉴定为伞形科防风属植物防风 *S. divaricata* (Turcz.) Schischk. 的干燥根, 药材标本 (SD201801) 存放于北京电子科技职业学院生物工程学院 211 实验室。

1.3 动物

免疫细胞荧光标记的转基因 Tg (lyz: DsRed) 系斑马鱼和野生型 AB 系斑马鱼, 由山东省科学院生物研究所药物筛选重点实验室提供, 按照明暗 14 h/10 h, (28.0 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 饲养, 每天定时定量喂食, 选用健康斑马鱼雌雄比例 2:2 于产卵缸中配对产卵, 收取受精卵用于实验。BALB/c 雄性小鼠, 3~5 周龄, 体质量 (20 ± 2) g, 购于斯贝福 (北京) 生物技术有限公司, 许可证号 SCXK (京) 2019-0010, 饲养于北京中医药大学动物房, 动物伦理审查编号为 BUCM-4-2020110606-4179, 12 h 昼夜循环, 室温恒定在 $22 \sim 24$ $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度为 $55\% \sim 65\%$ 。

2 方法与结果

2.1 防风多糖的提取、分离、纯化

将干燥的防风药材 (3 kg) 切成小段, 10 倍量水 (30 L) 煎煮 2 次, 每次 1.5 h, 滤过, 合并滤液。以 Sevag 试剂脱蛋白, 经紫外可见分光光度计扫描后在 280 nm 处无明显吸收峰。滤液加 95% 乙醇水混合至乙醇浓度为 60%, 静置, 滤过。上清液加 95% 乙醇水混合至乙醇浓度为 80%, 静置, 滤过。取沉淀, 以乙醇 (400 mL)、丙酮 (400 mL)、乙醚 (400 mL) 洗涤 3 次, 即得粗多糖 SP80。经 DEAE-纤维

素阴离子交换色谱柱, 以水、线性梯度氯化钠溶液 (0~2 mol/L) 洗脱, 洗脱曲线见图 1, 在 0.2 mol/L 氯化钠溶液浓度下洗脱得到 SP8002。经 Sephadex G-75 柱纯化, 以 0.01% 氯化钠溶液洗脱, 即得防风多糖 SP800203。

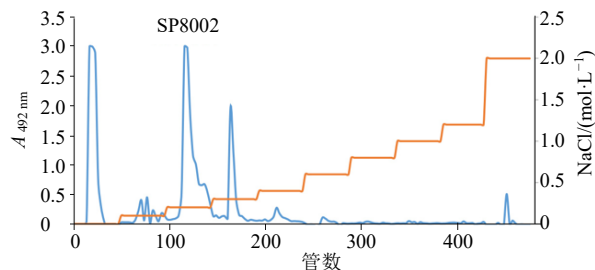


图 1 SP8002 的 DEAE 洗脱曲线

Fig. 1 DEAE elution curve for SP8002

2.2 防风多糖 SP800203 的结构表征

2.2.1 相对分子质量分布及糖醛酸含量 采用高效分子排阻色谱法 (high performance size exclusion chromatography, HPSEC) 考察均一性。以系列 Dextran 为标准品, 加 NaCl 溶液, 以 0.45 μm 滤膜滤过, 即得标准品溶液, 供试品溶液同上述方法制备。经 TSK[®] 凝胶色谱柱, 分别以 0.01% NaCl 溶液、0.02 mol/L 磷酸盐缓冲溶液、0.025 mol/L 硼酸缓冲溶液洗脱, HPLC 检测, 通过 GPC 软件对多糖的相对分子质量分布进行拟合^[13-14] (图 2), 结果表明防风多糖 SP800203 相对分子质量约为 7.14×10^4 , 均一性良好。采用间羟基联苯法对防风多糖 SP800203 的糖醛酸含量进行分析, 以 GalA 为标准品, 以吸光度 (A) 为纵坐标 (Y), GalA 含量为横坐标 (X), 制备标准曲线 (图 3), 将多糖 A 值代入回归方程, 即得防风多糖 SP800203 的糖醛酸质量分数为 75.73%。

2.2.2 单糖组成 采用 HPLC 法分析 PMP 全水解衍生化后的样品^[15-17]。取 L -阿拉伯糖标准品 1.0 mg, 以水 300 μL 溶解, 加 0.3 mol/L NaOH 溶液、0.3 mol/L PMP 甲醇溶液各 400 μL , 置烘箱 70 $^{\circ}\text{C}$ 保持 1 h。冷却, 加 0.3 mol/L HCl 溶液 400 μL , 以三氯甲烷 600 μL 萃取 3 次。取水液, 以 0.45 μm 滤膜滤过, 即得单糖标准品溶液。同法制成半乳糖、葡萄糖等其他单糖的标准品溶液。取防风多糖 SP800203 2 mg, 加 2 mol/L TFA 溶液 2 mL, 置烘箱 115 $^{\circ}\text{C}$ 水解 6 h, 减压回收溶剂至残渣无明显酸味, 以水 300 μL 溶解, 同标准品制备方法制备供试品溶液。经 C_{18} 色谱柱分离, 以乙腈-4.5% NaAc 溶液 (78:22) 洗脱, 检测并对比供试品与标准品色谱图 (图

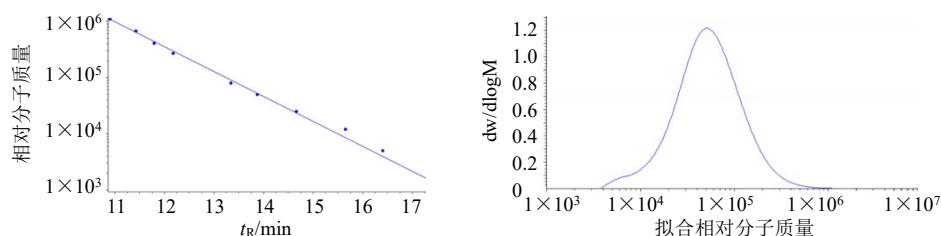


图 2 SP800203 的 HPLC-SEC 标准曲线和相对分子质量分布图

Fig. 2 HPLC-SEC standard curve and molecular weight distribution of SP800203

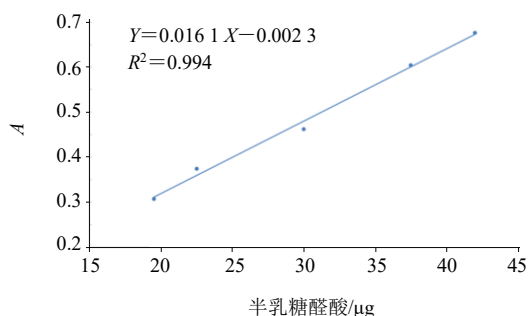
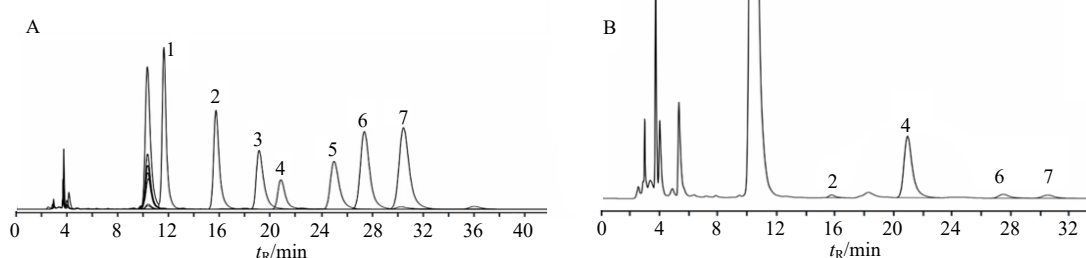


图 3 SP800203 的糖醛酸分析标准曲线

Fig. 3 Standard curve for uronic acid analysis of SP800203

4) 即得防风多糖 SP800203 的单糖组分为鼠李糖 (Rha)、半乳糖 (Gal)、阿拉伯糖 (Ara) 和半乳糖醛酸 (GalA), 物质的量比为 2.8 : 6.7 : 6 : 84.5。

2.2.3 寡糖片段 采用部分酶水解的方法水解防风多糖 SP800203, 采用 ESI-MSⁿ 技术对水解产物进行分析。取防风多糖 SP800203 1 mg, 加 50 μg/mL 果胶酶溶液 1 mL, 40 °C 水浴处理 30 min。取酶解液 0.3 mL, 加甲醇 0.9 mL, 离心。取上清液, 以 0.45 μm 滤膜滤过, 即得供试品溶液。经 ESI-MSⁿ 检测, 通过解析母离子的二级质谱, 结合裂解规律并参考相



1-D-甘露糖, 2-L-鼠李糖, 3-D-葡萄糖醛酸, 4-D-半乳糖醛酸, 5-D-葡萄糖, 6-D-半乳糖, 7-L-阿拉伯糖。

1-D-mannose, 2-L-rhamnose, 3-D-glucuronic acid, 4-D-galacturonic acid, 5-D-glucose, 6-D-galactose, 7-L-arabinose.

图 4 单糖标准品 (A) 和 SP800203 (B) PMP 衍生化产物的 HPLC 图谱

Fig. 4 HPLC spectrum of PMP derivatization products of monosaccharide standards (A) and SP800203 (B)

关文献报道^[18-20], 推断多糖酶水解产物中的寡糖片段, 见表 1。 m/z 325.0 ($C_{12}H_{21}O_{10}$, $[Gal-Rha-H]^-$) 的二级质谱出现 m/z 163.0 ($C_6H_{11}O_5$, $[Rha-H]^-$) 峰, 表明多糖中含有寡糖片段 Gal-Rha; m/z 339.1 ($C_{12}H_{19}O_{11}$, $[GalA-Rha-H]^-$) 的二级质谱出现 m/z 163.2 ($C_6H_{11}O_5$, $[Rha-H]^-$) 峰, 表明多糖中含有寡糖片段 GalA-Rha; m/z 341.0 ($C_{12}H_{21}O_{11}$, $[Gal-Gal-H]^-$) 的二级质谱出现 m/z 178.7 ($C_6H_{11}O_6$, $[Gal-H]^-$) 峰, 表明多糖中含有寡糖片段 Gal-Gal; m/z 354.8 ($C_{12}H_{19}O_{12}$, $[GalA-Gal-H]^-$) 的二级质谱出现 m/z 179.1 ($C_6H_{11}O_6$, $[Gal-H]^-$) 峰, 表明多糖中含有寡糖片段 GalA-Gal; m/z 369.1 ($C_{12}H_{17}O_{13}$, $[GalA-GalA-H]^-$) 的二级质谱

出现 m/z 192.7 ($C_6H_9O_7$, $[GalA-H]^-$) 峰, 表明多糖中含有寡糖片段 GalA-GalA; m/z 383.1 ($C_{13}H_{19}O_{13}$, $[GalAOMe-GalA-H]^-$) 的二级质谱出现 m/z 193.0 ($C_6H_9O_7$, $[GalA-H]^-$) 峰, 表明多糖中含有寡糖片段 GalAOMe-GalA; m/z 559.1 ($C_{19}H_{27}O_{19}$, $[GalAOMe-GalA-GalA-H]^-$) 的二级质谱出现 m/z 383.2 ($C_{13}H_{18}O_{13}$, $[GalAOMe-GalA-H]^-$) 峰和 m/z 193.0 ($C_6H_9O_7$, $[GalA-H]^-$) 峰, 表明多糖中含有寡糖片段 GalAOMe-GalA-GalA。

2.2.4 糖残基类型 采用改良 Hakomori 法^[21-22]对防风多糖 SP800203 进行甲基化分析, 采用 GC-MS 法测定经水解、乙酰化后的甲基化产物, 结合文献报道^[9,23-24]及 CCRC (Complex Carbohydrate Research

表 1 部分酶水解产物中寡糖片段的 ESI-MS/MS 峰值以及对应的寡糖片段

Table 1 Peak lists in ESI-MS/MS spectra of oligosaccharides by partial enzymatic hydrolysis and their deduced fragments

母离子 (m/z)	离子模式	子离子 (m/z)	SP800203 中的寡糖片段
325.0	负离子	163.0, 265.1	Gal-Rha
339.1	负离子	163.2	GalA-Rha
341.0	负离子	178.7, 221.0, 281.1	Gal-Gal
354.8	负离子	179.1, 310.9, 337.1	GalA-Gal
369.1	负离子	192.7, 234.9, 308.6	GalA-GalA
383.1	负离子	193.0, 235.0, 323.1	GalAOMe-GalA
559.1	负离子	193.0, 323.0, 364.9, 383.2	GalAOMe-GalA-GalA

Center, CCRC) 数据库, 推断多糖中的糖残基类型。取防风多糖 SP800203 5.0 mg, 加 D₂O 5 mL、碳化亚胺 200 mg, 以 0.01 mol/L DCl 溶液调 pH 至 4.7, 室温静置 2 h。加 2 mol/L NaBD₄ 溶液 0.5 mL, 室温静置 1 h。透析 24 h, 内液冷冻干燥, 备用。重复操作 3 次, 即得还原多糖。取还原多糖, 充氮气后密塞, 加甲基亚磺酰甲基钠溶液 1 mL, 超声波冰浴处理 30 min, 取出, 室温避光静置 12 h。置冰水浴, 充氮气, 加 CD₃I 1 mL, 超声波冰浴处理 1 h。淬灭反应, 减压回收溶剂, 干燥。残渣加水 1 mL, 以三氯甲烷 1 mL 萃取 3 次, 合并三氯甲烷液, 减压回收溶剂, 干燥, 备用。重复操作 3 次, 即得多糖甲基化产物。取多糖甲基化产物以 2 mol/L 三氟乙酸 (TFA) 溶液 2 mL 溶解, 110 °C 水解 2 h, 减压回收溶剂至残渣无明显酸味。加 4% NaBH₄ 溶液 1.5 mL, 置恒温箱 30 °C 保持 4 h。加醋酸至无气泡, 减压回收溶剂至残渣无明显酸味, 置真空干燥箱 55 °C 保持 4 h。加无水吡啶、乙酸酐各 1 mL, 置恒温箱 70 °C 保持 4 h。室温静置 12 h, 减压回收溶剂, 干燥, 残渣加甲醇 2 mL 溶解, 重复操作 3 次, 置真空干燥箱 55 °C 保持 4 h。室温静置 12 h, 加三氯甲烷 1.2 mL, 以 0.45 μm 滤膜滤过, 即得供试品溶液。经 HP-5 色谱柱, 以 GC-MS 分析 (图 5), 程序升温, 起始温度 100 °C, 保持 5 min, 以 5 °C/min 速度升高至 270 °C; 进样量 1 μL, EI 电离源, 源电压 70 eV, 二级质谱碰撞能 12 eV; 即得糖残基类型 (表 2)。

2.2.5 糖苷键连接方式 采用 IR、NMR 的分析方法, 归属各 C、H 信号及 C、H 相关信号, 推断糖苷键的连接方式。

取防风多糖 SP800203 适量, 与溴化钾粉末研磨均匀, 压片, 置傅里叶变换红外光谱仪红外扫描 (400~4 000 cm⁻¹)。显示有 O-H 伸缩振动特征吸收峰 (3 398 cm⁻¹), C-H 伸缩振动特征吸收峰 (2 946、2 903 cm⁻¹),

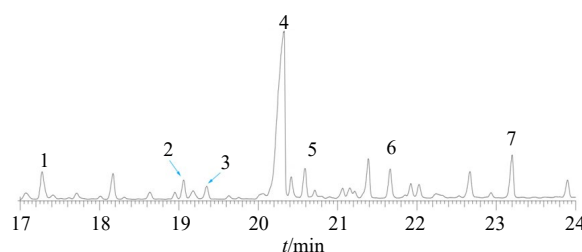


图 5 SP800203 经甲基化分析的 GC-MS 图

Fig. 5 GC-MS spectrum of SP800203 analyzed by methylation

C=O 伸缩振动特征吸收峰 (1 742 cm⁻¹), C-H 变角振动特征吸收峰 (1 412、1 331、1 236 cm⁻¹), C-O 伸缩振动特征吸收峰 (1 101 cm⁻¹), β-型糖苷键特征吸收峰 (915 cm⁻¹), α-型糖苷键特征吸收峰 (832 cm⁻¹)。

取防风多糖 SP800203 30 mg, 以 D₂O 0.6 mL 溶解, 冷冻干燥, 重复操作 3 次。以 D₂O 0.6 mL 溶解, 于 44.85 °C 进行 NMR 分析, 记录 ¹H-NMR、¹³C-NMR、¹H-¹H COSY、HSQC 和 HMBC 图谱。

在防风多糖 SP800203 的 ¹H-NMR 谱中 (图 6), δ_H 5.50~4.70 显示糖的 H-1 (端基氢) 信号, δ_H 4.70~3.05 显示糖的非端基氢信号; δ_H 5.10 为吡喃型阿拉伯糖的 H-1 信号, δ_H 5.43 为呋喃型阿拉伯糖的 H-1 信号, δ_H 4.72 为→3) Rhap (1→的 H-1 信号, δ_H 5.29 为→2) Galp (1→的 H-1 信号, δ_H 5.24 为→2) GalAp (1→的 H-1 信号, δ_H 5.03 为→3) Galp (1→的 H-1 信号, δ_H 5.08 为→4) GalAp (1→和→2,3) GalAp (1→重叠的 H-1 信号; δ_H 4.47、4.44 为→2) Galp (1→亚甲基的氢信号, δ_H 4.46、4.39 为→3) Galp (1→亚甲基的氢信号, δ_H 1.40 为→3) Rhap (1→甲基的氢信号。

在防风多糖 SP800203 的 ¹³C-NMR 谱中 (图 6), δ_C 104.0~95.0 显示糖的 C-1 (端基碳) 信号, δ_C 82.0~60.0 显示糖环上的碳信号; δ_C 95.4 为呋喃型阿拉伯糖的 C-1 信号, δ_C 100.8 为吡喃型阿拉伯

表 2 SP800203 的糖残基类型分析结果
Table 2 Analysis of sugar residue types for SP800203

峰号	t_R/min	部分甲基化的醛糖醇乙酸酯	碎片质量 (m/z)	连接类型	缩写	物质的 量比
1	17.28	1,4-di- <i>O</i> -acetyl-2,3,5-tri- <i>O</i> -methyl- <i>D</i> -arabinitol	48, 73, 120, 167, 214, 239	T-Araf(1→	AF	3.9
2	19.06	1,5-di- <i>O</i> -acetyl-2,3,4-tri- <i>O</i> -methyl- <i>D</i> -arabinitol	73, 120, 167, 214	T-Arap(1→	AP	2.3
3	19.35	1,3-di- <i>O</i> -acetyl-6-deoxy-2,4-di- <i>O</i> -methyl- <i>L</i> -mannitol	87, 120, 134, 192, 206	→3)Rhap(1→	RH	1.8
4	20.33	1,2,5-tri- <i>O</i> -acetyl-6-di-deuterio-3,4,6-tri- <i>O</i> -methyl- <i>D</i> -galactitol	50*, 73, 122, 145, 239, 288	→2)GalAp(1→	G2A	67.5
		1,2,5-tri- <i>O</i> -acetyl-3,4,6-tri- <i>O</i> -methyl- <i>D</i> -galactitol	48*, 73, 120, 145, 167, 239, 286	→2)Galp(1→	G2	1.2
5	20.59	1,3,5-tri- <i>O</i> -acetyl-2,4,6-tri- <i>O</i> -methyl- <i>D</i> -galactitol	48, 73, 120, 167, 192, 239, 286	→3)Galp(1→	G3	4.5
6	21.39	1,4,5-tri- <i>O</i> -acetyl-6-di-deuterio-2,3,6-tri- <i>O</i> -methyl- <i>D</i> -galactitol	50*, 73, 122, 169, 194, 239	→4)GalAp(1→	G4A	9.2
7	23.20	1,2,3,5-tetra- <i>O</i> -acetyl-6-di-deuterio-4,6-di- <i>O</i> -methyl- <i>D</i> -galactitol	50*, 73, 122, 145, 313	→2,3)GalAp(1→	G23A	9.6

*该碎片用于计算具有相同连接方式的半乳糖与半乳糖醛酸的物质的量比。

*The fragment is used to calculate the molar ratio of galactose to galacturonic acid with the same connection.

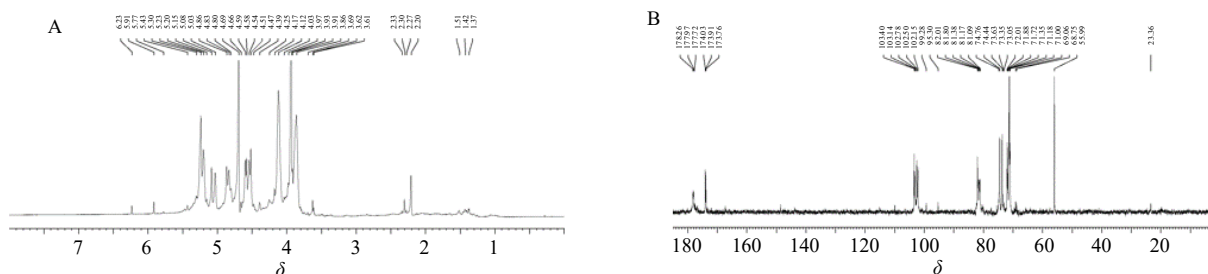


图 6 SP800203 的 ^1H -NMR 谱 (A) 和 ^{13}C -NMR 谱 (B)

Fig. 6 ^1H -NMR spectrum (A) and ^{13}C -NMR spectrum (B) of SP800203

糖的 C-1 信号, δ_{C} 99.4 为→3) Rhap (1→的 C-1 信号, δ_{C} 103.4 为→2,3) GalAp (1→的 C-1 信号, δ_{C} 103.3 为→4) GalAp (1→的 C-1 信号, δ_{C} 103.2 为→3) Galp (1→的 C-1 信号, δ_{C} 102.4 为→2) Galp (1→的 C-1 信号, δ_{C} 102.6 为→2) GalAp (1→的 C-1 信号; δ_{C} 19.8 为→3) Rhap (1→的 C-6 (甲基碳) 信号, δ_{C} 173.9 附近为糖醛酸的 C-6 (羰基碳) 信号。

在防风多糖 SP800203 的 ^1H - ^1H COSY 谱中(图 7), $\delta_{\text{H/H}}$ 5.43/3.93 为 Araf(1→的 H-1/H-2 相关信号, $\delta_{\text{H/H}}$ 5.10/4.09 为 Arap (1→的 H-1/H-2 相关信号, $\delta_{\text{H/H}}$ 4.72/4.09 为→3) Rhap (1→的 H-1/H-2 相关信号, $\delta_{\text{H/H}}$ 5.24/4.52 为→2) GalAp (1→的 H-1/H-2 相关信号, $\delta_{\text{H/H}}$ 5.29/4.11 为→2) Galp (1→的 H-1/H-2 相关信号, $\delta_{\text{H/H}}$ 5.03/3.07 为→3) Galp (1→的 H-1/H-2 相关信号, $\delta_{\text{H/H}}$ 5.08/3.86 为→4) GalAp (1→的 H-1/H-2 相关信号, $\delta_{\text{H/H}}$ 5.08/4.58 为→2,3) GalAp (1→的 H-1/H-2 相关信号; $\delta_{\text{H/H}}$ 4.74/4.09 为→3) Rhap (1→的 H-2/H-3 相关信号, $\delta_{\text{H/H}}$ 4.58/4.13 为→2,3) GalAp (1→的 H-2/H-3 相关信号, $\delta_{\text{H/H}}$ 4.52/4.11 为→2) GalAp (1→的 H-2/H-3 相关信号, $\delta_{\text{H/H}}$ 4.34/4.11 为→2) Galp (1→的

H-2/H-3 相关信号。

在防风多糖 SP800203 的 HSQC 谱中 (图 8), $\delta_{\text{C/H}}$ 95.4/5.43 为 Araf(1→的 C-1/H-1 相关信号, $\delta_{\text{C/H}}$ 100.8/5.10 为 Arap (1→的 C-1/H-1 相关信号, $\delta_{\text{C/H}}$ 99.4/4.72 为→3) Rhap (1→的 C-1/H-1 相关信号, $\delta_{\text{C/H}}$ 102.6/5.24 为→2) GalAp (1→的 C-1/H-1 相关信号, $\delta_{\text{C/H}}$ 102.4/5.29 为→2) Galp (1→的 C-1/H-1 相关信号, $\delta_{\text{C/H}}$ 103.2/5.03 为→3) Galp (1→的 C-1/H-1 相关信号, $\delta_{\text{C/H}}$ 103.3/5.08 为→4) GalAp (1→的 C-1/H-1 相关信号, $\delta_{\text{C/H}}$ 103.4/5.08 为→2,3) GalAp (1→的 C-1/H-1 相关信号。具体碳氢相关信号归属见表 3。

在防风多糖 SP800203 的 HMBC 谱中 (图 9), $\delta_{\text{C/H}}$ 73.3/5.24 为→2,3) GalAp (1→的 C-3 和→2) GalAp (1→的 H-1 相关信号, 表明在多糖中存在→2) GalAp (1→3) GalAp (2) (1→结构片段的重复单元; $\delta_{\text{C/H}}$ 81.4/5.24 为→3) Galp (1→的 C-3 和→2) GalAp (1→的 H-1 相关信号, 表明在多糖中存在→2) GalAp (1→3) Galp (1→结构片段的重复单元; $\delta_{\text{C/H}}$ 81.5/5.10 为→2) GalAp (1→的 C-2 和 Arap (1→的 H-1 相关信号, 表明在多糖中存在 Arap (1→2) GalAp (1→结

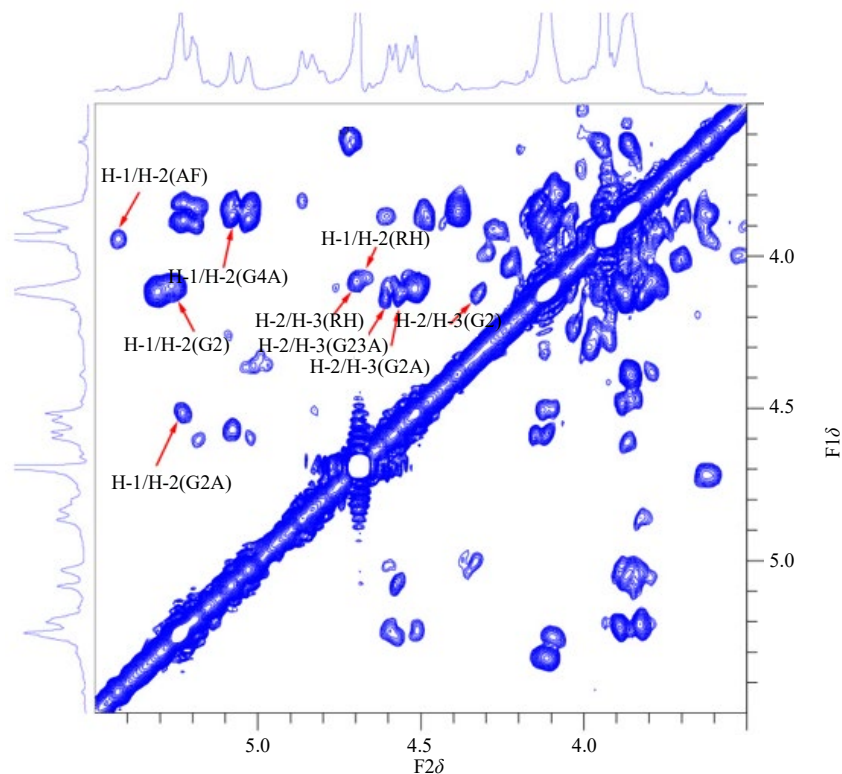


图 7 SP800203 的 ^1H - ^1H COSY 谱
Fig. 7 ^1H - ^1H COSY spectrum of SP800203

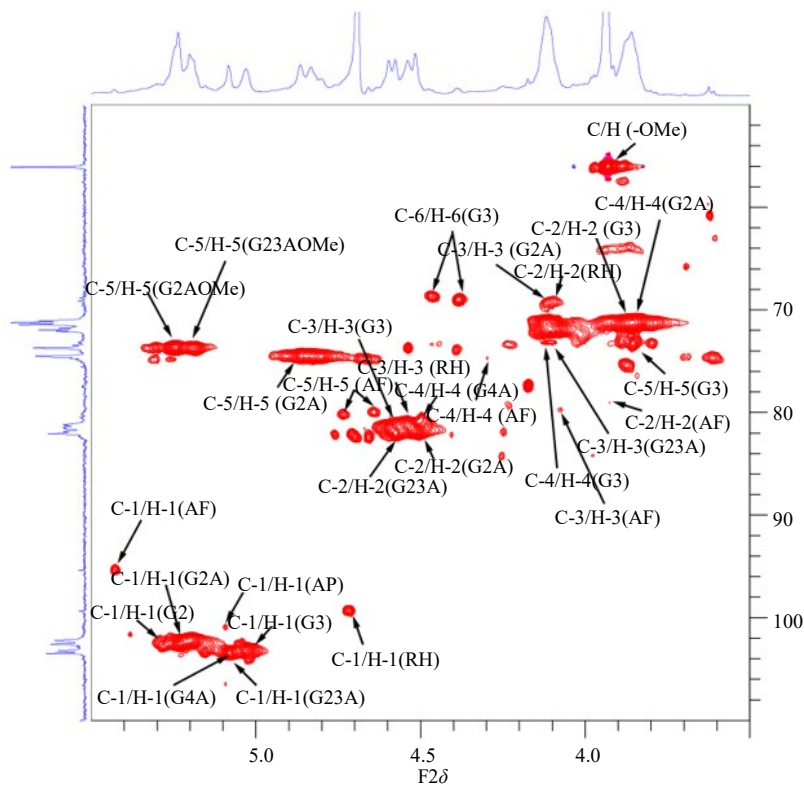


图 8 SP800203 的 HSQC 谱
Fig. 8 HSQC spectrum of SP800203

表 3 SP800203¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 的信号归属
Table 3 ¹H- and ¹³C-NMR chemical shift assignments of SP800203

残基类型	缩写	$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$					
		C-1/H-1	C-2/H-2	C-3/H-3	C-4/H-4	C-5/H-5	C-6/H-6
T-Araf (1→	AF	95.4/5.43	79.1/3.93	79.7/4.07	74.6/4.31	80.0/4.74,4.65	—
T-Arap ((1→	AP	100.8/5.10	73.1/4.09	77.5/4.17	—	—	—
→3) Rhap (1→	RH	99.4/4.72	69.3/4.09	80.0/4.74	—	—	19.8/1.40
→2) GalAp (1→	G2A	102.6/5.24	81.5/4.52	71.7/4.11	71.2/3.87	73.8/5.25, 74.5/4.88*	174.2/—
→2) Galp (1→	G2	102.4/5.29	77.8/4.11	69.8/4.34	69.2/4.10	63.9/3.87	73.2/4.47,4.44
→3) Galp (1→	G3	103.2/5.03	71.6/3.07	81.4/4.60	71.8/4.14	73.2/3.86	68.7/4.46,4.39
→4) GalAp (1→	G4A	103.3/5.08	71.4/3.86	71.2/4.11	81.4/4.51	73.9/5.26	173.6/—
→2,3) GalAp (1→	G23A	103.4/5.08	81.9/4.58	73.3/4.13	71.4/3.89	73.9/5.19	173.9/—

“—”表示在图谱中无法确定该信号，“*”表示 C-6 羧基未甲酯化的糖残基上的 C-5 信号

“—” indicates that the signal cannot be determined in the spectrum. “*” indicates the C-5 signal on the C-6 carboxylated unmethylated sugar residue

构片段的重复单元； $\delta_{\text{C/H}}$ 81.5/5.08 为→2) GalAp (1→的 C-2 和→2,3) GalAp (1→的 H-1、→2) GalAp (1→的 C-2 和→4) GalAp (1→的 H-1 相关信号，表明在多糖中存在→2,3) GalAp (1→2) GalAp (1→和→4) GalAp (1→2) GalAp (1→结构片段的重复单元； $\delta_{\text{C/H}}$ 73.3/5.08 为→2,3) GalAp (1→的 C-3 和→4) GalAp (1→的 H-1 相关信号，表明在多糖中存在→4) GalAp (1→3) GalAp (2) (1→结构片段的重复单元； $\delta_{\text{C/H}}$ 81.4/5.03 为→3) Galp (1→的 C-3 和→3) Galp (1→的 H-1 相关信号，表明在多糖中存在→3) Galp (1→3) Galp (1→结构片段的重复单元； $\delta_{\text{C/H}}$ 80.0/5.03 为→3) Rhap (1→的 C-3 和→3) Galp (1→的 H-1 相关信号，表明在多糖中存在→3) Galp (1→3) Rhap (1→结构片段的重复单元； $\delta_{\text{C/H}}$ 103.4/4.58 为→2,3) GalAp (1→的 C-2 和→2,3) GalAp (1→的 H-1 相关信号，表明在多糖中存在→2,3) GalAp (1→2) GalAp (3) (1→结构片段的重复单元； $\delta_{\text{C/H}}$ 102.6/4.58 为→2,3) GalAp (1→的 C-2 和→2) GalAp (1→的 H-1 相关信号，表明在多糖中存在→2) GalAp (1→2) GalAp (3) (1→结构片段的重复单元； $\delta_{\text{C/H}}$ 102.6/4.52 为→2) GalAp (1→的 C-2 和→2) GalAp (1→的 H-1 相关信号，表明在多糖中存在→2) GalAp (1→2) GalAp (1→结构片段的重复单元； $\delta_{\text{C/H}}$ 102.6/4.51 为→4) GalAp (1→的 C-4 和→2) GalAp (1→的 H-1 相关信号，表明在多糖中存在→2) GalAp (1→4) GalAp (1→结构片段的重复单元； $\delta_{\text{C/H}}$ 95.4/4.51 为→4) GalAp (1→的 C-4 和 Araf (1→的 H-1 相关信号，表明在多糖中存在 Araf (1→4) GalAp (1→结构片段的重复单元； $\delta_{\text{C/H}}$ 99.4/4.13 为→2,3) GalAp (1→的 C-3 和→3) Rhap (1→的 H-1 相关信

号，表明在多糖中存在→3) Rhap (1→3) GalAp (2) (1→结构片段的重复单元。以上糖残基信号归属及连接关系见表 4。

结合以上测定结果，可以推测防风多糖 SP800203 的结构见图 10。

2.3 防风多糖 SP800203 免疫调节活性

2.3.1 防风多糖 SP800203 对巨噬细胞炎性因子含量的影响 选用 RAW264.7 巨噬细胞系，采用 Griess 法测定巨噬细胞 NO 释放量，ELISA 法测定巨噬细胞 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 释放量。选用对数生长期的 RAW264.7 巨噬细胞，空白组加 DMEM 培养基，阳性对照组加 1.5 $\mu\text{g/mL}$ LPS 溶液，给药组加不同质量浓度防风多糖 SP800203 溶液（12.5、25、50、100 $\mu\text{g/mL}$ ），给药体积 2 mL，培养 24 h。取各组细胞上清液 50 μL 接种于培养板中，每孔加入 50 μL Griess Reagent I 和 Griess Reagent II，于 540 nm 处测定吸光度 (A) 值，根据 NaNO₂ 标准曲线计算 NO 的释放量；另取各组细胞上清液 2 mL，离心，上清液按试剂盒方法测定 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 释放量，结果见表 5。结果表明，与空白组相比，防风多糖 SP800203 能显著促进巨噬细胞释放 NO、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6，具有一定的免疫调节活性。

2.3.2 防风多糖 SP800203 对斑马鱼免疫细胞的影响 参照文献方法^[11]，以免疫细胞荧光标记的转基因斑马鱼 Tg (lyz: DsRed) 和野生型 AB 系斑马鱼为实验动物，选用长春瑞滨诱导免疫低下模型，分别通过荧光和中性红染色法检测空白组、模型组、阳性对照组、给药组斑马鱼体内免疫细胞密度和巨噬细胞数目，结果见表 6。与空白组相比，模型组（免疫低下模型）的免疫细胞密度、巨噬细胞数目显

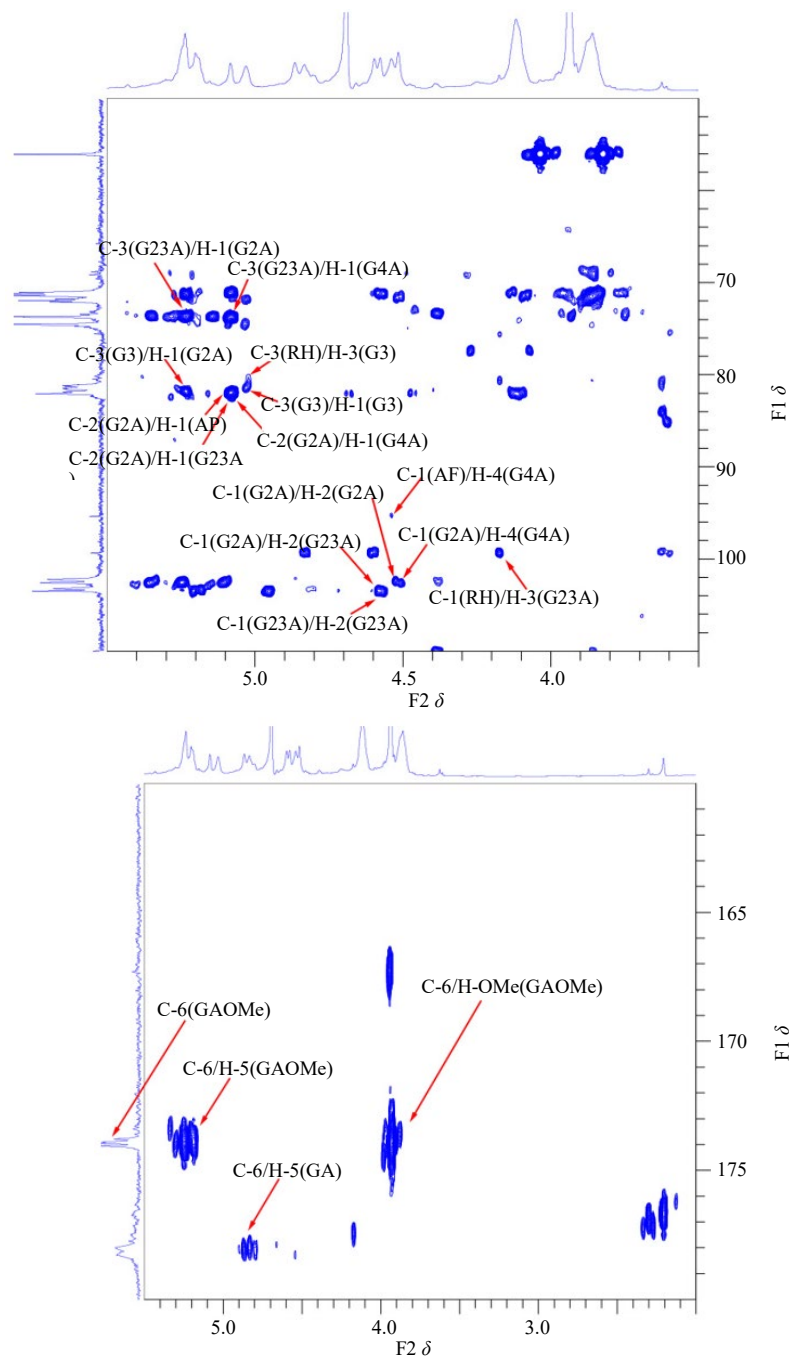


图9 SP800203的HMBC谱

Fig. 9 HMBC spectrum of SP800203

表4 SP800203 HBMC NMR 信号归属及糖残基连接关系

Table 4 HMBC NMR spectral data and connected relations of residues of SP800203					
序号	$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$	连接关系	序号	$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$	连接关系
1	5.24/73.3	G2A-(1→3)-G23A	8	5.03/80.0	G3-(1→3)-RH
2	5.24/81.4	G2A-(1→3)-G3	9	4.58/103.4	G23A-(1→2)-G23A
3	5.10/81.5	AP-(1→2)-G2A	10	4.58/102.6	G2A-(1→2)-G23A
4	5.08/81.5	G23A-(1→2)-G2A	11	4.52/102.6	G2A-(1→2)-G2A
5	5.08/81.5	G4A-(1→2)-G2A	12	4.51/102.6	G2A-(1→4)-G4A
6	5.08/73.3	G4A-(1→3)-G23A	13	4.51/95.4	AF-(1→4)-G4A
7	5.03/81.4	G3-(1→3)-G3	14	4.13/99.4	RH-(1→3)-G23A

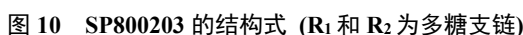


Fig. 10 Putative structure of SP800203 (R₁ and R₂ mean branches in polysaccharide)

表 5 SP800203 对巨噬细胞 NO、TNF、IL-1 β 和 IL-6 含量的影响

Table 5 Effects of SP800203 on content of NO, TNF, IL-1 β and IL-6

与空白组比较: ** $P<0.01$ ** $P<0.001$ 。

^{**}*P* < 0.01 ^{***}*P* < 0.001 vs blank group.

表 6 SP800203 对免疫细胞密度和巨噬细胞数目的影响

Table 6 Effects of SP800203 on density of immune cells and number of RAW264.7 macrophages

与空白组比较: $^{\#}P<0.05$, $^{###}P<0.001$; 与模型组比较: $^{***}P<0.001$ 。

[#]*P* < 0.05 ^{###}*P* < 0.001 vs blank group; ^{***}*P* < 0.001 vs model group.

著降低；与模型组相比，防风多糖 SP800203 各浓度组免疫细胞密度、巨噬细胞数目显著上升，具有一定的免疫调节活性。

防风多糖 SP800203 为自防风中分离得到的新
一多糖, 相对分子质量约为 7.14×10^4 , 糖醛酸

质量分数为 75.73%，由鼠李糖、半乳糖、阿拉伯糖和半乳糖醛酸组成，单糖物质的量比为 2.8 : 6.7 : 6 : 84.5。主链由半乳糖醛酸聚合而成，通过 β 、 α 糖苷键相连，2 条支链分别由阿拉伯糖、半乳糖醛酸、半乳糖、鼠李糖，以及阿拉伯糖、半乳糖醛酸、半乳糖聚合而成，二者分别通过 β 、 α 糖苷键与主链相连。

采用细胞实验和斑马鱼实验研究防风多糖 SP800203 的免疫调节活性, 结果显示, 防风多糖 SP800203 能够显著促进巨噬细胞释放 NO、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6, 使免疫细胞密度、巨噬细胞数目显著上升, 有一定的免疫调节活性。该结果丰富了防风多糖的研究成果, 为阐明防风多糖免疫调节作用机制奠定基础, 为防风的进一步开发和应用提供了科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 156.
- [2] Wang D, Tian T, Liu B, *et al.* Mechanism of modified Yupingfeng naristillae in protecting the nasal mucosal epithelial barrier during allergic rhinitis [J]. *Rev Française D'allergologie*, 2021, 61(3): 145-152.
- [3] Yao F, Yuan Q, Song X D, *et al.* Yupingfeng Granule improves Th2-biased immune state in microenvironment of hepatocellular carcinoma through TSLP-DC-OX40L pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 1263053.
- [4] Huang X, Liu B, Tian L. Intranasal concentration gradient of Yupingfeng promotes induction of microRNA-21 by PTEN to reverse activation of OVA mimicking allergic rhinitis [J]. *Rev Française D'allergologie*, 2019, 59(7): 481-486.
- [5] Zhu X L, Wang X Q, Zhang S B, *et al.* Metabolomic investigation of synergistic mechanism for Fangfeng extract preventing LPS induced neuroinflammation in BV-2 microglia cells [J]. *Appl Sci*, 2021, 11(17): 8155.
- [6] Yao L, Wang S Q, Wei P, *et al.* Huangqi-Fangfeng protects against allergic airway remodeling through inhibiting epithelial-mesenchymal transition process in mice via regulating epithelial derived TGF- β 1 [J]. *Phytomedicine*, 2019, 64: 153076.
- [7] 任俊秀, 韩燕, 张珍霞, 等. 基于 NFKB/STAT3 信号通路探究防风多糖对过敏性鼻炎大鼠行为学、AQP5 及鼻粘膜组织的影响 [J]. *西部医学*, 2023, 35(1): 39-45.
- [8] 林华, 曹亚丽, 丁景弦. 硫酸酯化防风多糖通过 CCL3 影响乳腺癌细胞 MCF-7 对巨噬细胞的募集和驯化作用 [J]. *中国药杂志*, 2018, 53(20): 1755-1761.
- [9] Dong C X, Liu L, Wang C Y, *et al.* Structural characterization of polysaccharides from *Saposhnikovia divaricata* and their antagonistic effects against the immunosuppression by the culture supernatants of melanoma cells on RAW_{264.7} macrophages [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 113: 748-756.
- [10] 孟瑶. 防风多糖的提取分离、结构解析及其抗氧化活性的初步研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2019.
- [11] 孙萌, 王文地, 丽妍, 等. 基于斑马鱼模型的防风多糖调节免疫作用机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2023, 48(7): 1916-1926.
- [12] Fan H T, Sun M, Li J, *et al.* Structure characterization and immunomodulatory activity of a polysaccharide from *Saposhnikovia Radix* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 233: 123502.
- [13] Xiao Y H, Liu S C, Shen M Y, *et al.* Physicochemical, rheological and thermal properties of *Mesona chinensis* polysaccharides obtained by sodium carbonate assisted and cellulase assisted extraction [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 126: 30-36.
- [14] Xia Y G, Wang T L, Yu S M, *et al.* Structural characteristics and hepatoprotective potential of *Aralia elata* root bark polysaccharides and their effects on SCFAs produced by intestinal flora metabolism [J]. *Carbohydr Polym*, 2019, 207: 256-265.
- [15] Hu H B, Liang H P, Li H M, *et al.* Isolation, purification, characterization and antioxidant activity of polysaccharides from the stem barks of *Acanthopanax leucorrhizus* [J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 196: 359-367.
- [16] Wang Y P, Guo M R. Purification and structural characterization of polysaccharides isolated from *Auricularia cornea* var. *Li* [J]. *Carbohydr Polym*, 2020, 230: 115680.
- [17] Hu C, Li H X, Zhang M T, *et al.* Structure characterization and anticoagulant activity of a novel polysaccharide from *Leonurus artemisia* (Laur.) S. Y. Hu F [J]. *RSC Adv*, 2020, 10(4): 2254-2266.
- [18] Son S U, Lee S J, Choi E H, *et al.* Clarification of the structural features of Rhamnogalacturonan-I type polysaccharide purified from radish leaves [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 209(Pt A): 923-934.
- [19] Xia Y G, Yu L S, Liang J, *et al.* Chromatography and mass spectrometry-based approaches for perception of polysaccharides in wild and cultured fruit bodies of *Auricularia auricular-judae* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 137: 1232-1244.
- [20] Park H R, Shin K S. Structural elucidation of an anti-metastatic polysaccharide from the peels of *Korean citrus hallabong* [J]. *Carbohydr Polym*, 2019, 225: 115222.
- [21] Lee S J, In G, Han S T, *et al.* Structural characteristics of a red ginseng acidic polysaccharide rhamnogalacturonan I with immunostimulating activity from red ginseng [J]. *J Ginseng Res*, 2020, 44(4): 570-579.
- [22] Deng Y J, Huang L X, Zhang C H, *et al.* Novel polysaccharide from *Chaenomeles speciosa* seeds: Structural characterization, α -amylase and α -glucosidase inhibitory activity evaluation [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 153: 755-766.
- [23] Meng Y, Yi L, Chen L, *et al.* Purification, structure characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Saposhnikovia divaricata* [J]. *Chin J Nat Med*, 2019, 17(10): 792-800.
- [24] Shimizu N, Tomoda M, Gonda R, *et al.* The major pectic arabinogalactan having activity on the reticuloendothelial system from the roots and rhizomes of *Saposhnikovia divaricata* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1989, 37: 1329-1332.

[责任编辑 王文倩]