

夏枯草水解寡糖组分的分离、结构解析与体外抗氧化及肠道菌群丰富度调节作用

栗依诺, 黄佳琪[#], 董一凡, 马伶俐, 赵 鑫, 李 雪*, 杨文志*

天津中医药大学 现代中药创制全国重点实验室, 天津 301617

摘要: 目的 从夏枯草 *Prunella vulgaris* (PV) 多糖中挖掘结构相对清楚的活性寡糖组分, 并评价其体外抗氧化与肠道菌群调节作用。方法 通过水提醇沉、Sevag 法除蛋白制备夏枯草总多糖, 分别在 80 °C 与 100 °C、0.5 mol/L 三氟乙酸 (trifluoroacetic acid, TFA) 条件下进行酸水解, 并利用亲水相互作用色谱 (hydrophilic interaction chromatography, HILIC) 进行分级纯化。通过亲水相互作用色谱/离子淌度-四极杆飞行时间质谱 (hydrophilic interaction chromatography-ion mobility-quadrupole time-of-flight-HDMS^E, HILIC/IM-QTOF-HDMS^E)、超高效液相色谱-紫外检测器 (ultra-high performance liquid chromatography-ultraviolet detector, UHPLC-UV) 及一维/二维核磁共振 (¹H/¹³C-NMR、¹H-¹H COSY、HSQC、HMBC) 对获得的寡糖组分进行结构解析; 通过 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 自由基清除实验和体外小鼠粪便菌群厌氧共培养-实时荧光定量聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 模型, 评估其抗氧化活性及对肠道菌群丰度的调控作用。**结果** 获得聚合度 (degrees of polymerization, DP) 分别为 2、3、5 的寡糖组分 DP2 (得率 5.60%)、DP3 (1.19%) 和 DP5 (1.70%), 明确了各寡糖组分中的优势结构: DP2 主要含由 3-甲氧基- α -葡萄糖醛酸与木糖构成的二糖, 其木糖端基存在 α/β 异构; DP3 主要包含由木糖-阿拉伯糖-糖醛酸组成的三糖, 其末端为 4-甲氧基- β -葡萄糖醛酸或 α -半乳糖醛酸; DP5 主要由以 2-甲氧基- α -葡萄糖醛酸起始、经 3 个木糖单元连接并以 α/β 2 种构象共存的 3-甲氧基-葡萄糖醛酸结尾的线性五糖构成。抗氧化活性评价表明, DP2、DP3 和 DP5 均具有显著的 DPPH 自由基清除能力, 其中 DP5 的活性最优, 半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC₅₀) 为 0.36 μ g/mL。在 0.1 mg/mL 质量浓度下, DP3 和 DP5 清除率均超过 84%, 与阳性对照维生素 C (VC, IC₅₀=0.11 μ g/mL) 相比无显著差异。体外肠道菌群分析显示, 3 种寡糖组分对肠道菌群表现出一定的调控作用, DP2 可显著促进益生性乳杆菌属 *Lactobacillus* 的增殖; DP3 能够上调有益菌门拟杆菌门 (Bacteroidetes) 的丰度, 同时显著抑制致病菌门放线菌门 (Actinobacteria); DP5 主要表现出对放线菌门的显著抑制作用。**结论** 从夏枯草多糖中分离富集得到聚合度分别为 2、3、5 的寡糖组分, 并解析了其中优势结构特征, 揭示了它们兼具抗氧化与肠道菌群调节活性。

关键词: 夏枯草; 寡糖组分; 结构鉴定; 抗氧化活性; 肠道菌群调节活性

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)17-6682-19

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.17.004

Isolation and structural elucidation of hydrolyzed oligosaccharide components from *Prunella vulgaris* and their *in vitro* antioxidant and gut microbiota abundance-modulating effects

LI Yinuo, HUANG Jiaqi, DONG Yifan, MA Lingli, ZHAO Xin, LI Xue, YANG Wenzhi

State Key Laboratory of Chinese Medicine Modernization, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

Abstract: Objective To isolate structurally defined bioactive oligosaccharide fractions from *Prunella vulgaris* (PV) polysaccharides and evaluate their *in vitro* antioxidant activity and intestinal microbiota-modulating effects. **Methods** Total polysaccharides were

收稿日期: 2026-04-02

基金项目: 天津市杰出青年科学基金项目 (23JCJQJC00030); 现代中药新质生产力科技创新专项项目 (24ZXZKSY00010)

作者简介: 栗依诺, 硕士研究生, 研究方向为中药多糖研究。E-mail: 13833324878@163.com

[#]共同第一作者: 黄佳琪, 硕士研究生, 研究方向为中药多糖结构与活性分析。E-mail: h15222489820@163.com

*通信作者: 李 雪, 副研究员, 从事中药药效物质发现研究。E-mail: tjdxsyx@163.com

杨文志, 研究员, 博士生导师, 从事中药质量控制新方法研究。E-mail: wzyang0504@tjutcm.edu.cn

extracted via water extraction and alcohol precipitation, followed by deproteinization using the Sevag method. Partial acid hydrolysis was performed under two conditions (80 °C and 100 °C, 0.5 mol/L trifluoroacetic acid). The hydrolysates were fractionated and purified by hydrophilic interaction chromatography (HILIC). Structural characterization of the dominant components in each fraction was performed using HILIC/IM-QTOF-HDMS^E, UHPLC-UV and 1D/2D-NMR (¹H/¹³C-NMR, COSY, HSQC, HMBC). Antioxidant activity of three oligosaccharide components was assessed via a DPPH free radical scavenging assay, while their modulatory effects on gut microbial abundance were evaluated using an *in vitro* anaerobic co-culture model of mouse fecal microbiota coupled with real-time quantitative PCR. **Results** Three oligosaccharide fractions with degrees of polymerization (DP) of 2, 3, and 5 were obtained, namely DP2 (yield: 5.60%), DP3 (1.19%), and DP5 (1.70%). The dominant structural features of three fractions were elucidated as follows: DP2 is mainly composed of a disaccharide composed of 3-*O*-methyl- α -glucuronic acid linked to xylose, with α/β anomerism at the xylose terminus; DP3 mainly contains a trisaccharide consisting of xylose-arabinose-uronic acid, terminating in either 4-*O*-methyl- β -glucuronic acid or α -galacturonic acid; DP5 is primarily a linear pentasaccharide starting with 2-*O*-methyl- α -glucuronic acid, linked through three xylose units, and ending with 3-*O*-methyl-glucuronic acid existing in both α - and β -forms. Antioxidant assessment revealed that all three fractions exhibited significant DPPH radical-scavenging activity, with DP5 being the most potent ($IC_{50} = 0.36 \mu\text{g/mL}$). At 0.1 mg/mL, both DP3 and DP5 showed scavenging rates exceeding 84%, comparable to the positive control VC ($IC_{50} = 0.11 \mu\text{g/mL}$, $P > 0.05$). Microbiota analysis indicated that all three fractions modulated the intestinal flora: DP2 significantly promoted the growth of the probiotic genus *Lactobacillus*; DP3 increased the abundance of the beneficial phylum *Bacteroidetes* while suppressing the potentially pathogenic phylum *Actinobacteria*; DP5 primarily exerted inhibitory effects on *Actinobacteria*. **Conclusion** This study successfully isolated three oligosaccharide fractions (DP2, DP3, and DP5) from the PV polysaccharides and characterized their predominant structural features, revealing the antioxidant and gut microbiota-regulating activities.

Key words: *Prunella vulgaris* L.; oligosaccharide component; structural characterization; antioxidant activity; gut microbiota-regulating activity

夏枯草 *Prunella vulgaris* L. 是一种来自唇形科的多年生草本植物, 是我国药食同源大宗药材之一^[1], 主产于贵州、安徽、江苏等地, 其味辛、苦, 性寒。夏枯草常用于治疗肝火郁结、目赤肿痛、急性肝炎和高血压等病症。迄今为止, 研究人员已从夏枯草中分离出约 200 种化合物, 主要包括三萜、甾醇、黄酮、多糖、香豆素、苯丙素和挥发油类化合物。其中夏枯草多糖 (*Prunella vulgaris* polysaccharides, PVPs) 作为夏枯草的主要活性成分之一, 被认为是重要的生物反应调节剂, 具有保健和治疗疾病的潜力。已有大量关于其活性的报道表明, PVPs 具有抗病毒^[2-3]、抗氧化^[4]、抗癌^[5]、调血脂^[6-7]、免疫调节等作用^[8-9]。目前对夏枯草的研究多集中于其小分子成分及多糖的整体活性, 而对其多糖降解产物——寡糖的结构与功能研究尚不深入。寡糖作为连接单糖与多糖的关键结构层次, 其明确的化学结构是阐释多糖构效关系、建立基于特征寡糖片段的质量控制方法的重要基础。

寡糖是由 2~10 个单糖单元通过糖苷键连接而成的碳水化合物, 其结构介于单糖和多糖之间。它们在生物体的各种生理过程中发挥着重要作用。寡糖的特定药理活性取决于其结构特征, 包括单糖组成、排列顺序和糖苷键构型。根据生物学功能, 寡

糖可分为一般寡糖和功能性寡糖。随着对传统中药作用机制的深入研究, 可以发现从中药中提取的寡糖具有广泛的药理活性, 包括降血糖^[10]、通便^[11]、免疫调节^[12]、抗骨质疏松^[13]、调节肠道微生物群^[14]、抗炎和抗菌作用。目前临床上一些治疗疾病的药物存在着不良反应严重的问题^[15], 而来源于植物的天然糖类成分相比其他活性物质安全性更高^[16], 具有稳定、不良反应小等优点。

与多糖相比, 寡糖通常具有结构明确、相对分子质量较低以及生物利用度较高等特点^[17], 部分寡糖甚至展现出与多糖相当或更优的生物活性, 使其成为质量评价的理想指标。这一观点在其他中药研究中亦得到佐证: 灵芝降解后的寡糖在结肠炎模型中的疗效优于其天然多糖^[18]; 苍术中的特定寡糖组分也表现出更显著的免疫调节活性^[19]。此外, 巴戟天中寡糖含量占干质量 20% 以上, 并已被证实为其主要活性成分之一^[20]。基于这种卓越的药理活性和应用潜力, 有必要将寡糖研究扩展到夏枯草上。尽管夏枯草多糖已得到广泛研究, 但其特征性寡糖成分至今尚未被系统鉴定与解析。鉴于此, 本研究旨在系统探究夏枯草中多糖水解寡糖的提取分离和结构解析, 并进一步评估其生物活性, 为药食同源的夏枯草资源深度开发利用奠定基础。

从夏枯草的药理活性出发,本研究主要从抗氧化活性和肠道菌群调节能力 2 方面对其寡糖进行活性考察。适量补充外源性抗氧化剂,可有效清除体内过量自由基,延缓多种慢性疾病的发生发展,并减轻活性氧所致的组织损伤。已有大量研究证实,夏枯草多糖具有显著的体外抗氧化活性,能够有效清除 DPPH 自由基、超氧阴离子自由基和羟自由基,并表现出较强的还原能力^[4]。口服多糖及寡糖类成分难以直接被肠道上皮吸收,其药理效应往往通过调节肠道微生态环境而间接发挥。近期研究表明,夏枯草多糖能够显著增加肠道菌群的丰富度和多样性,调节菌群结构,恢复肠道微生态平衡^[14]。该发现提示,肠道菌群可能是夏枯草多糖发挥免疫调节、抗乳腺增生等功效的重要作用靶点。

本研究分别在 80 °C 和 100 °C 条件下采用 0.5 mol/L 三氟乙酸(trifluoroacetic acid, TFA)对夏枯草多糖进行部分酸水解,以获得寡糖片段。随后,利用亲水相互作用色谱对水解产物进行分离纯化,富集得到聚合度分别为 2、3、5 的寡糖组分 DP2、DP3 和 DP5。综合利用亲水相互作用色谱/离子淌度-四极杆飞行时间质谱(hydrophilic interaction chromatography-ion mobility-quadrupole time-of-flight-HDMS^E, HILIC/IM-QTOF-HDMS^E)、超高效液相色谱-紫外检测器(ultra-high performance liquid chromatography-ultraviolet detector, UHPLC-UV)以及 600 MHz ¹H-/¹³C-NMR、COSY、HSQC、HMBC 等多谱学技术对其结构进行详细鉴定。并选择 DPPH 自由基清除活性作为评价体外抗氧化能力的指标,同时采用体外小鼠粪便菌群共培养模型评估其对肠道菌群结构的调节作用,系统地比较不同酸水解样品在药理活性方面的差异,以期阐释夏枯草寡糖的药效物质基础及其构效关系提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 材料

夏枯草果穗(产地安徽)购自北京同仁堂中药有限公司,经天津中医药大学李先宽副教授鉴定为唇形科夏枯草属植物夏枯草 *P. vulgaris* L. 的干燥果穗,并将其存放在天津中医药大学中医药研究院中药标准化技术实验室。TFA 购自罗恩北京科技有限公司,色谱级乙腈(ACN)、甲酸(FA, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司)、氢氧化钠(sodium hydroxide, NaOH, 天津市津科精细化工研究所)。甲醇、二氯甲烷、正丁醇、无水乙醇(天津康科德公司)。甲酸

铵和醋酸铵(上海阿拉丁生化科技公司)实验用水为超纯水和纯水,均经 Milli-Q 系统(Millipore, Bedford, MA, 美国)纯化。粪便基因组 DNA 提取试剂盒购自北京索莱宝科技公司,厌氧培养液(青岛海博生物技术有限公司),PerfectStart Green qPCR SuperMix(+Dyell)由北京全式金生物技术股份公司提供。盐酸(hydrochloric acid, HCl, 天津大茂化学试剂厂),维生素 C(vitamin C, VC, CAS: 50-81-7, 质量分数≥99.7%)购自天津市科密欧化学试剂有限公司,10 种单糖标准品[葡萄糖(Glc, CAS: 50-99-7, 质量分数>98%);甘露糖(Man, CAS: 3458-28-4, 质量分数>99%);半乳糖(Gal, CAS: 59-23-4, 质量分数>99%);木糖(Xyl, CAS: 58-86-6, 质量分数>98%);阿拉伯糖(Ara, CAS: 147-81-9, 质量分数>98%);半乳糖醛酸(GalA, CAS: 91510-62-2, 质量分数>98%);鼠李糖(Rha, CAS: 6155-35-7, 质量分数>98%);葡萄糖醛酸(GlcA, CAS: 6556-12-3, 质量分数>98%);岩藻糖(Fuc, CAS: 3615-37-0, 质量分数>98%);核糖(Rib, CAS: 50-69-1, 质量分数>99%)]购自上海迈瑞尔化学技术有限公司。

1.2 仪器

恒温超声波提取仪购自宁波新芝生物科技股份有限公司;Vortex-2 旋涡混匀仪购自上海沪析实业有限公司;5804R 型台式高速冷冻离心机购自德国 Eppendorf 公司;截留相对分子质量 3500 透析袋购自美国联合碳化(Viskase);Agilent 1260 Infinity II 购自美国 Agilent 公司;Bruker Avance III-600 核磁共振光谱仪购自瑞士布鲁克公司;XBridge BEH Amide OBD Prep Column(250 mm×30 mm, 5 μm)购自美国 Waters 公司。

2 方法

2.1 DP2、DP3 及 DP5 的分离与制备

2.1.1 部分酸水解寡糖总提取物的制备 取夏枯草 4.5 kg 粉碎并将其与 10 倍体积的水混合均匀,在 70 °C 下超声提取 1 h,功率为 400 W。冷却至室温后,4 000 r/min 离心 20 min。上清液加入无水乙醇(1:4),同时不断搅拌,至乙醇含量为 80%,静置 48 h,4 000 r/min 离心 10 min,沉淀干燥 4 h,即得到夏枯草粗多糖。粗多糖按照 1:10 的比例和超纯水混合,充分溶解后,加入 Sevag 试剂,混匀 1 h,4 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,装入截留相对分子质量为 3 500 的透析袋中透析 48 h 后,

冷冻干燥,分别称取 20 g 夏枯草多糖粉末 2 份,加入 1 L TFA (5 mol/L),充分涡旋溶解,将样品溶液分别于 80、100 °C 水浴条件下加热水解 3 h。使用旋转蒸发仪 60 °C 减压回收溶剂,在蒸发的过程中不断加入无水乙醇溶剂以加快蒸干速度,当溶液无醇、酸味后,进行冷冻干燥,得到水解寡糖总提物样品 ZTW-80、ZTW-100。

2.1.2 基于 HILIC 寡糖组分的制备 将 ZTW-80 溶于水,配制成 200 mg/mL 的供试品溶液,14 000 r/min 离心 10 min 后,滤过,取上清备用。使用 Agilent 半制备高效液相色谱仪进行分段富集。具体参数如下:负离子模式;色谱柱 Xbridge BEH Amide OBD Prep 柱 (250 mm×30 mm, 5 μm);进样量 100 μL;流动相为 0.1% FA-H₂O (A) 和 0.1% FA-ACN (B);体积流量 2.5 mL/min。洗脱梯度:0~20.0 min, 85% B; 20.0~32.0 min, 85%~72% B; 32.0~42.0 min, 72% B; 42.0~57.0 min, 72%~69% B; 57.0~63.0 min, 69%~65% B; 63.0~73.0 min, 65%~62% (B); 73.0~74.0 min, 62%~50.0% B; 74.0~114.0 min, 50% B。根据洗脱时间手动收集流分: F1, 0~20 min; F2, 20~40 min; F3, 40~60 min; F4, 60~80 min; F5, 80~114 min, 各流分经旋转蒸发去除溶剂后冷冻干燥,获得 F1~F5 寡糖组分,保存备用。

从 F3 中进一步分离纯化寡糖组分,采用相同色谱柱与流动相体系,调整梯度进行二次纯化:0~40.0 min, 82% B; 40.0~50.0 min, 82%~80% B; 50.0~60.0 min, 80%~75% B; 60.0~80.0 min, 75% B; 80.0~90.0 min, 75%~72% B; 90.0~95.0 min, 72%~50% B; 95.0~105.0 min, 50% B。于指定时段收集次级组分: F3-1, 34.0~36.0 min; F3-2, 39.0~41.0 min; F3-3, 49.0~51.0 min; F3-4, 64.0~68.0 min; F3-5, 70.0~74.5 min。各组分使用旋转蒸发仪进行溶剂回收,冻干备用。

取 ZTW-100 按上述方法配制供试品溶液并预处理。预先对其进行质谱检测,确定目标峰的出峰时间,再采用与第一次纯化 ZTW-80 相同的半制备液相色谱条件,通过靶向收集策略,收集 23.9~31.8 min 的流分,其余部分弃去。所得流分经相同方式浓缩与冻干,获得 ZTW-100 来源的寡糖组分。

2.2 基于 HILIC/IM-QTOF-HDMS^E 寡糖分析

夏枯草寡糖分析在 Waters ACQUITY UPLC I-Class/Vion IMS-QTOF 系统上展开。色谱柱: BEH Amide (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱;柱温

30 °C; 体积流量 0.3 mL/min; 进样量 3 μL; 流动相为 0.1% FA-H₂O (A) 和 0.1% FA-ACN (B); 梯度洗脱: 0~5.0 min, 90% B; 5.0~7.0 min, 90%~85% B; 7.0~10.0 min, 85%~80% B; 10.0~18.0 min, 80%~76% B; 18.0~28.0 min, 76%~70% B; 28.0~38.0 min, 70%~60% B; 38.0~41.0 min, 60% B; 离子源: ESI 源; 采集模式: 负离子, HDMS^E 模式; 毛细管电压、锥孔电压为: -1.5 kV、-60 V; MS 碰撞能量、MS² 碰撞裂解能量: 6 eV、20~40 eV; 扫描时间 0.3 s; 扫描范围 *m/z* 150~2 000。

2.3 基于 PMP 衍生化/UHPLC-UV 单糖组成分析

分别精确称取 DP2、DP3 和 DP5 各 2 mg, 将其溶解于 1 mL 的超纯水中,充分震荡后,14 000 r/min 离心 10 min。将 200 μL 的上层清液加入离心管内,加入 200 μL TFA (最终浓度为 4.0 mol/L),在 110 °C 下水解 2 h 后,放入 60 °C 水浴锅中以去除 TFA。在此期间,重复加入甲醇溶液以提高蒸发速度,蒸干后的残渣即为夏枯草水解单糖样品。将 200 μL 的超纯水、50 μL 0.6 mol/L 氢氧化钠以及 100 μL 0.5 mol/L 1-苯基-3-甲基-5-吡啶酮 (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one, PMP) 逐一添加至干燥样品中,在 70 °C 烘箱中衍生化 30 min 后。将 100 μL HCl (0.3 mol/L) 溶液加入样品中,进行酸碱中和反应。最后,加入 400 μL 的二氯甲烷萃取剩余 PMP,重复此过程 3 次,得到单糖衍生化样品。单糖标准品不需要水解,衍生化过程与上述保持一致。

使用 Agilent 1290 超高效液相色谱仪配置 DAD 检测器进行单糖组成的检测,具体参数如下:检测波长 250 nm; 色谱柱: Waters XBridge[®] Shield RP18 (150 mm×4.6 mm, 3.5 μm); 流动相: 10 mmol/L 乙酸铵-水 (A) 和乙腈 (B); 柱温 28 °C; 体积流量 1 mL/min; 进样量 3 μL; 等度洗脱: 0~45.0 min, 17% B。

2.4 NMR 特征信号采集与分析

将 DP2、DP3 和 DP5 样品 (10 mg) 溶解于 D₂O, 以 14 000 r/min 离心 10 min, 将样品移到核磁管中。使用 Bruker Avance III-600 型核磁共振波谱仪采集数据。主要包括 ¹H-NMR、¹³C-NMR、DEPT135、¹H-¹H COSY、¹H-¹³C HSQC、¹H-¹³C HMBC 谱图^[21]。使用 MestReNova 软件处理和分析核磁数据。

2.5 DPPH 自由基清除实验

将 DPPH (3.943 2 mg) 加入无水乙醇中使其完全溶解,定容至 100 mL 量瓶并避光保存,将不同质量浓度 (0.005、0.01、0.02、0.05、0.1 mg/mL)

样品溶液与 500 μL 的 DPPH 溶液充分混匀，避光反应 30 min 后，测定反应液在 517 nm 波长处吸光度 (*A*) 值，对照组为不同浓度的待测样品与无水乙醇混悬液，空白组为无水乙醇和 DPPH 溶液混合溶液，并以 VC 作为阳性对照^[22]。根据公式计算 DPPH 自由基清除率。

$$\text{DPPH 自由基清除率} = 1 - (A_s - A_c) / A_0$$

A_s、*A_c* 分别为实验组、对照组的 *A* 值，*A₀* 为空白组的 *A* 值

2.6 体外肠道菌群丰富度调控研究

2.6.1 引物设计与合成 通过查阅文献设计肠道菌群中常见门水平和属水平菌的特异性序列，见表 1。

2.6.2 寡糖与肠道菌群共培养 采用体外厌氧共培

表 1 肠道菌群中常见门、属水平菌的引物序列

Table 1 Primer sequence table of common phylum and genus level bacteria in intestinal flora

菌属分类	引物名称	序列 (5'-3')
厚壁菌门 (Firmicutes)	PFir-F	TGAAACTYAAAGGAATTGACG
	PFir-R	ACCATGCACCACCTGTC
拟杆菌门 (Bacteroidetes)	PBac-F	CRAACAGGATTAGATACCCT
	PBac-R	GGTAAGGTTCTCGCGTAT
变形菌门 (Proteobacteria)	yPro-F	TCGTCAGCTCGTGTGTGA
	yPro-R	CGTAAGGGCCATGATG
放线菌门 (Actinobacteria)	PAct-F	TACGGCCGCAAGGCTA
	PAct-R	TCRTCCCCACCTTCCTCCG
双歧杆菌属 <i>Bifidobacterium</i>	Bif-F	TCGCGTCYGGTGTGAAAG
	Bif-R	CCACATCCAGCRTCCAC
乳杆菌属 <i>Lactobacillus</i>	Lab-F	AGCAGTAGGGAATCTTCCA
	Lab-R	CACCGCTACACATGGAG
拟杆菌属 <i>Bacteroides</i>	Bac-F	GGTGTGCGCTTAAGTGCCAT
	Bac-R	CGGAYGTAAGGGCCGTGC
艾克曼菌属 <i>Akkermansia</i>	Akk-F	CAGCACGTGAAGGTGGGGAC
	Akk-R	CCTTGCGGTTGGCTTCAGAT
16S 通用引物 (内参)	Universal-F	AAACTCAAAGAATTGACGG
	Universal-R	CTCACRRCACGAGCTGAC

养模型评估夏枯草寡糖对小鼠粪便菌群结构的调节作用。具体方法如下：配制适量厌氧培养液，于 121 ℃ 下高压灭菌 20 min，冷却后于 4 ℃ 冰箱保存备用。随后使用灭菌后的厌氧培养液配制质量浓度为 5 mg/mL 的各部分酸水解样品混悬液，涡旋混匀，超声 30 min，现用现配。

参考相关文献方法^[23]并适当改变条件制备肠菌培养液，取适量新鲜小鼠粪便 50 mg 置于 EP 管中，然后转移至厌氧培养箱中，用 100 μL 无菌生理盐水混匀 (粪便-生理盐水 1 : 5)，12 000 r/min 离心 10 min，取上清液得到肠菌孵育液。

给药组：将肠菌孵育液与含药的厌氧培养液按 1 : 9 比例混合，37 ℃，厌氧条件下培养 24 h 取样。

空白组：不含药厌氧培养液与肠菌孵育液按 1 : 9 比例混合，37 ℃、厌氧条件下培养 0、24 h 取样。

2.6.3 从样本中提取粪便基因组 DNA 使用粪便基因组 DNA 提取试剂盒，提取发酵样品的基因组

DNA，分别取给药组与空白组的厌氧培养肠菌孵育液于冰上，分别加入 500 μL 缓冲液 SA、100 μL 缓冲液 SC、15 μL 试剂 Proteinase K、0.25 g 研磨珠，间歇震荡 1 min，70 ℃ 水浴加热 15 min，期间间歇震荡 3 次，12 000 r/min 离心 3 min，取上清液 1 000 μL，加入 10 μL 试剂 RNase A，震荡后常温静置 5 min 加入 200 μL 缓冲液 SH，震荡后冰上静置 5 min，12 000 r/min 离心 3 min，取 400 μL 上清液于 RNase A-Free 吸附柱 CR2，放入收集管中，加入等体积的缓冲液 GFA，12 000 r/min 离心 30 s，加入粪便基因组 DNA 提取试剂盒中的 700 μL 漂洗液 PW (Buffer PW)，以清洗离心吸附柱上吸附的 DNA，去除残留的蛋白质、盐离子等杂质，12 000 r/min 离心 30 s，弃废液再加 700 μL 漂洗液 PW，12 000 r/min 离心 30 s，弃废液后，将收集管放置于干净的离心管上，晾干，悬空滴加 50 μL 洗脱缓冲液 TB 于吸附膜中间位置，12 000 r/min 离心 2 min，离心管中溶液于

-20 ℃ 冰箱保存，后于超微量分光光度计下测量 DNA 的浓度并记录。

2.6.4 实时荧光定量聚合酶链式反应 (real-time quantitative polymerase chain reaction, qPCR) 按照 qPCR SuperMix (+Dyell) 试剂盒说明书进行 qPCR 反应，以“2.6.3”项提取的样品基因组 DNA 为模板，模板量统一设置为 10 ng。加样体系包含 10 μmol/L 引物 F 0.4 μL、10 μmol/L 引物 R 0.4 μL、模板、2×PerfectStart Green qPCR SuperMix 10 μL、Universal Passive Reference Dye (50×) (optional) 0.4 μL 及无菌水，共计 20 μL。qPCR 程序采用两步法，即 95 ℃ 预变性 1 min，1 个循环；95 ℃，15 s，60 ℃，1 min，40 个循环。数据使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算各菌群相对表达量，以空白组 0 h 样本为校准基准，实验组结果表示为相对于校准基准的倍数变化。

2.6.5 数据处理分析 使用 Graphpad Prism 9.0 (GraphPad Software 公司，美国) 进行绘图及统计学

分析，数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，若数据符合正态分布和方差齐性，多组间比较采用单因素方差分析，否则，采用 Kruskal-Wallis H 检验，检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 夏枯草多糖水解后寡糖组分的制备

采用优化的 HILIC 半制备色谱方法，从夏枯草多糖水解产物中分离获得多个寡糖组分。由于 ZTW-80 中不同聚合度多糖/寡糖在质谱中的响应信号较低，对其采用分段富集策略以提高分离效率。经初次分段收集，馏份 F1~F5 的得率分别为 34.13%、27.44%、17.24%、15.07% 和 6.12%。并对 F3 进行二次梯度洗脱，在 F3-2 段获得寡糖组分 DP3 (图 1-A)，在 F3-5 段获得寡糖组分 DP5 (图 1-A)。基于 ZTW-100 的质谱预分析结果，采用靶向收集策略，在 23.9~31.8 min 洗脱区间内回收得到 DP2 组分 (图 1-B)。3 个寡糖组分的得率分别为 DP2，5.60%；DP3，1.19%；DP5，1.70%。

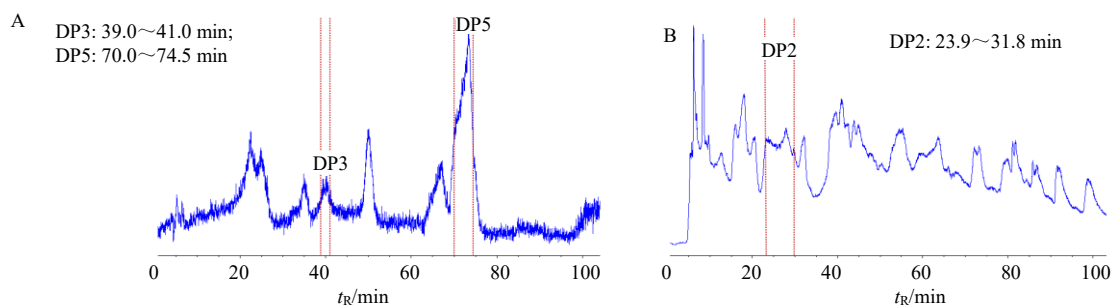


图 1 F3 (A) 和 ZTW-100 (B) 的 HPLC-MS 图谱

Fig. 1 HPLC-MS spectra of F3 (A) and ZTW-100 (B)

3.2 单糖组成分析

如图 2 所示，基于 UHPLC-UV 单糖组成分析，DP2 的单糖组成得到鉴定。与单糖标准品 (图 2-A) 的保留时间对比表明，DP2 主要由 5 种单糖构成：Man (25.71%)、GlcA (11.23%)、Glc (17.17%)、Gal (28.13%) 和 Xyl (17.76%)。除了常见的己糖外，夏枯草寡糖中还含有戊糖及葡萄糖醛酸，这表明夏枯草部分水解寡糖的结构比人参寡糖更为复杂^[24]。将该结果与 MS 及 NMR 数据结合，共同解析 DP2 的结构组成。

与单糖标准品 (图 3-A) 的保留时间对比表明，DP3 包含 6 种单糖：Rha (11.27%)、GlcA (12.62%)、GalA (14.53%)、Gal (19.57%)、Xyl (20.61%) 和 Ara (21.41%)。其中，阿拉伯糖与木糖含量显著高于其他单糖，合计占比超过 40%，提示二者可能构成 DP3 的核心骨架结构。

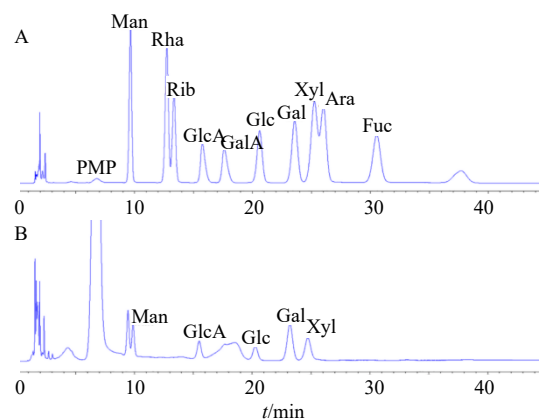


图 2 单糖标准品 (A) 及 DP2 (B) 在 250 nm 波长下的 UHPLC-UV 光谱分析

Fig. 2 Monosaccharide composition of monosaccharide standards (A) and DP2 (B) analyzed by UHPLC-UV at 250 nm

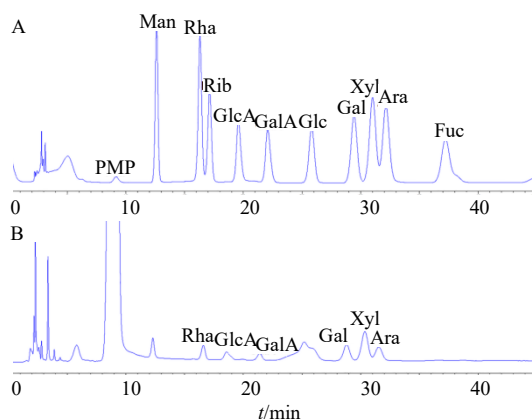


图 3 单糖标准品 (A) 及 DP3 (B) 在 250 nm 波长下的 UHPLC-UV 光谱分析

Fig. 3 Monosaccharide composition of monosaccharide standards (A) and DP3 (B) analyzed by UHPLC-UV at 250 nm

如图 4 所示, DP5 包含 5 种单糖, 占比分别为 Man (23.06%)、GlcA (16.00%)、Glc (5.63%)、Gal (11.13%) 及 Xyl (44.20%)。值得注意的是, 木糖为最主要的构成单元, 占总单糖含量的近一半, 根据这一结构特征推断 DP5 可能含有以木糖为主链的线性寡糖结构。其余单糖中, 甘露糖与葡萄糖醛酸亦占有显著比例, 共同构成了寡糖组分 DP5 的结构多样性基础。

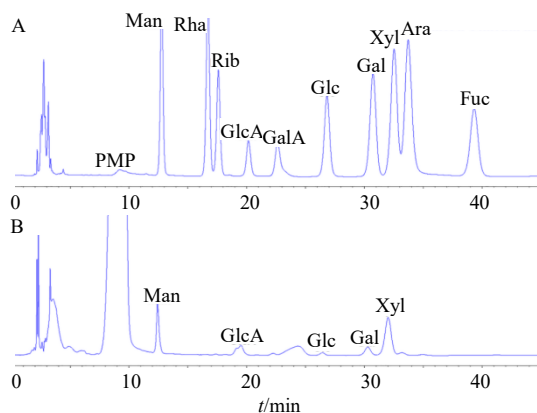


图 4 单糖标准品 (A) 及 DP5 (B) 在 250 nm 波长下的 UHPLC-UV 光谱分析

Fig. 4 Monosaccharide composition of monosaccharide standards (A) and DP5 (B) analyzed by UHPLC-UV at 250 nm

鉴于夏枯草中糖类成分的复杂性以及文献中已证实存在游离单糖这一情况^[25], 结构解析需要综合运用 MS 和 NMR 数据进行全面分析。

3.3 MS 数据分析

图 5 展示了基于 HILIC/IM-QTOF-HDMS^E 技术

获得的 DP2、DP3 与 DP5 的高分辨二级质谱 (MS/MS) 图。通过对其中高质量精度的 MS² 碎片离子进行系统解析, 进一步验证并确认了各寡糖组分的糖基种类和连接顺序。

如图 5-A 所示, 负离子模式下 DP2 的 MS² 谱图显示出母离子峰位于 m/z 339.092 6 ($[M-H]^-$), 表明 DP2 的分子式为 $C_{12}H_{20}O_{11}$ 。谱图中观察到特征碎片离子 m/z 207.05 (C_1^- , 源于糖苷键断裂丢失 132 的中性片段) 以及糖骨架上 90.03 的中性丢失, 符合 $^{0,2}A_2$ 型跨环断裂的裂解路径, 与文献报道的寡糖裂解行为相符^[26], 结合单糖组成分析结果, 推测 DP2 结构可能为 GlcA-Xyl。

如图 5-B 所示, DP3 在负离子模式下的 MS² 谱图中, 母离子峰位于 m/z 471.137 2 ($[M-H]^-$), 对应分子式 $C_{17}H_{28}O_{15}$ 。裂解图谱中清晰观察到特征碎片离子 m/z 321.084 9 ($[M-H-H_2O-132]^-$) 和 m/z 189.039 6 ($[M-H-H_2O-264]^-$), 表明依次丢失 1 分子水及 2 个戊糖单元 (各 132)。此外, 谱图中存在 60.02 ($^{2,4}A_1$ 型跨环断裂) 及 78.03 ($[^{2,4}A_1-H_2O]^-$) 的中性丢失, 符合 $^{2,4}A_1$ 型跨环断裂的裂解方式。综合单糖组成分析结果 (含木糖、阿拉伯糖及葡萄糖醛酸/半乳糖醛酸), 推测 DP3 结构由 2 分子戊糖和 1 分子糖醛酸组成。

如图 5-C 所示, 在负离子模式下检测到母离子 m/z 793.227 4 ($[M-H]^-$) 的碎片信息, 同时观察到特征碎片离子 m/z 603.18 (C_4^- , 来源于丢失末端 190)、471.13 (C_3^- , 进一步丢失 132)、249.06。糖骨架上还存在 60.02 ($^{0,2}A_5$) 和 78.03 ($[^{0,2}A_5-H_2O]^-$) 的中性丢失, 符合 $^{0,2}A_5$ 型跨环断裂的裂解路径, 进一步印证了糖环结构。结合单糖组成数据 (以木糖为主, 并含葡萄糖醛酸), 初步推断 DP5 结构为 GlcA-Xyl-Xyl-Xyl-GlcA, 该序列与观测到的逐级碎片丢失规律高度吻合。

3.4 核磁共振数据分析

DP2 的核磁共振谱图如图 6 所示, 数据见表 2。在 1H -NMR 谱的低场区 (δ 4.4~5.4) 观测到 7 组糖端基氢信号, 结合 HSQC 谱对应的端基碳信号 (δ 94~98), 归属如下: A1 (δ 4.70; 96.86)^[27]、B1 (δ 5.07; 96.58)^[28]、C1 (δ 4.70; 96.86)^[27]、D1 (δ 4.63; 95.95)^[29]、E1 (δ 5.19; 94.07)^[30-31]、F1 (δ 5.36; 97.74)^[32]、G1 (δ 4.58; 96.49)^[33-34]。其中, δ_H 4.70、5.07 与 4.63 处信号积分面积比约为 0.70:0.38:0.32, 表明 DP2 在溶液中存在 α/β 2 种构象。将 2 种

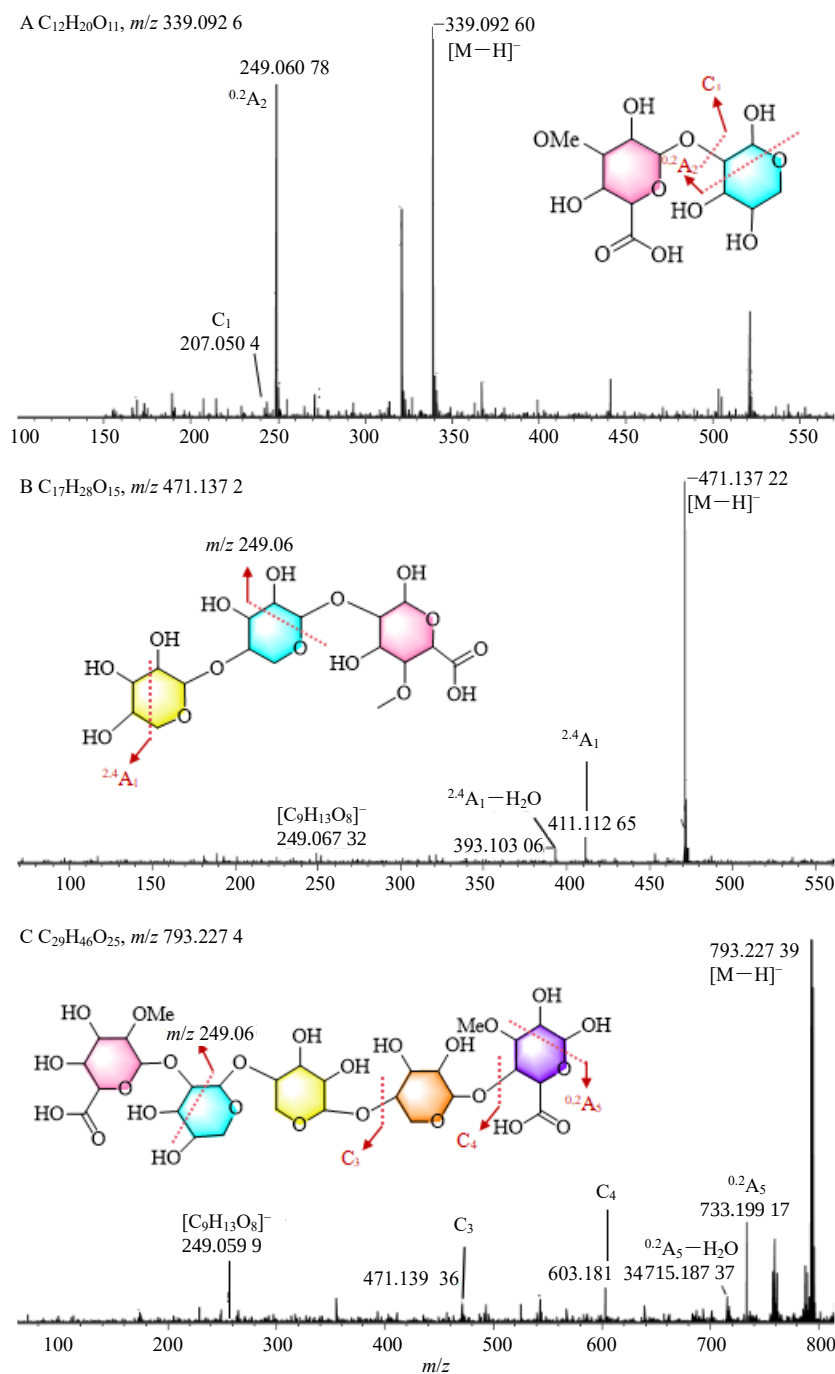
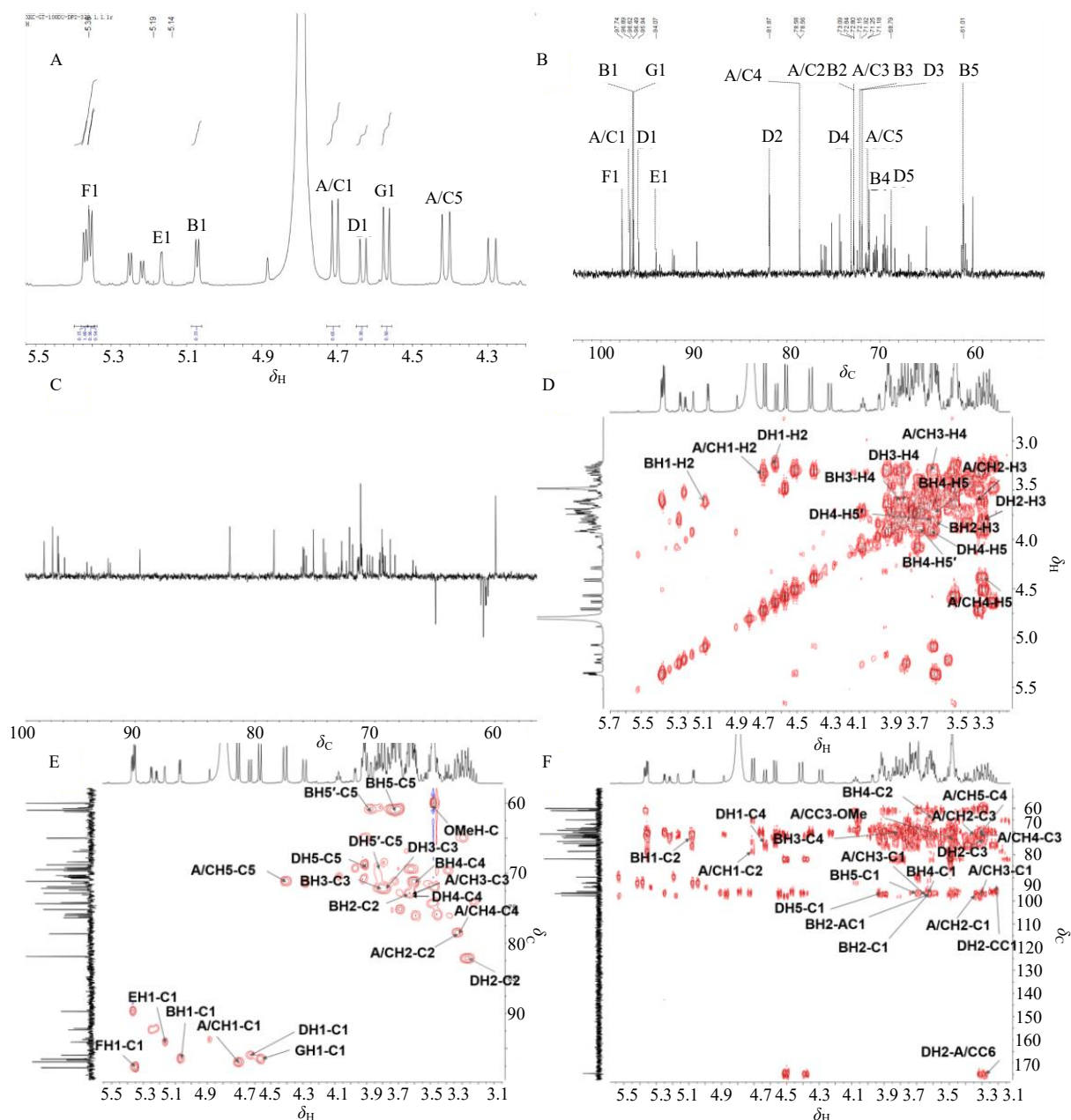


图 5 基于 HILIC/IM-QTOF-HDMS^E 技术在负离子模式下获得的 DP2 (A)、DP3 (B)、DP5 (C) 组分的 MS/MS 图谱及可能的裂解图

Fig. 5 MS/MS spectra of the DP2 (A), DP3 (B), DP5 (C) components obtained by HILIC/IM-QTOF-HDMS^E in negative mode and illustration of their possible cleavages

构象中的葡萄糖醛酸残基与木糖残基分别标记为残基 A/C 和残基 B/D。HMBC 谱显示残基 A/C 的 C1 与残基 B/D 的 H2 (δ 3.63, 3.23/96.85) 存在相关信号, 证实 GlcA 与 Xyl 之间通过 1 $\rightarrow$ 2 糖苷键连接。此外, HSQC 谱中检测到 -OCH₃ 相关信号 (δ

3.48/59.86), HMBC 谱显示 OCH₃-H 与 A/C-C3 (δ 3.47/72.80) 存在相关信号, 表明葡萄糖醛酸的 C3 位发生甲基化修饰。综上推断 DP2 的结构为 α -D-GlcAp-3-OMe-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Xylp, 并在溶液中共存其 α -木糖端基异构体 (即 α -D-GlcAp-3-OMe-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-



A- ^1H -NMR; B- ^{13}C -NMR; C-DEPT 135; D- ^1H - ^1H COSY; E-HSQC; F-HMBC, 图 7、8 同。

A- ^1H -NMR; B- ^{13}C -NMR; C-DEPT 135; D- ^1H - ^1H COSY; E-HSQC; F-HMBC, same as Figs. 7 and 8.

图 6 DP2 寡糖组分的核磁共振分析

Fig. 6 NMR analysis of the oligosaccharide component DP2

Xylp) 动态共存, 与核磁谱图中观测到的多组端基信号及积分比例相符。

DP3 的核磁共振谱图如图 7 所示, 化学位移数据见表 3。在 ^1H -NMR 谱的低场区 δ 4.4~5.4 存在 6 种糖端基碳氢信号。根据 DP3 的单糖组成分析, 这 6 种糖端基碳氢信号归属为: A1 (δ 4.46; 96.59) [35]、B1 (δ 5.20; 97.60) [36]、C1 (δ 4.47; 101.58) [37]、D1 (δ 4.46; 96.59) [35]、E1 (δ 5.20; 97.60) [36]、F1 (δ 5.18; 97.60) [38]。HMBC 谱显示残基 B/E 的

H4 与残基 A/D 的 C1 之间存在相关信号 (δ 4.11/96.59), 表明存在 β -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-Araf 的连接模式。此外, 观察到残基 C 的 H2 与残基 B 的 C1 在 δ 3.39/97.69 处存在相关峰, 表明存在 $\rightarrow$ 4)- β -D-Araf-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-GlcAp-(1 $\rightarrow$ 连接。同时, 残基 F 的 H2 与残基 E 的 C1 之间存在相关信号峰 (δ 3.41/97.60), 表明存在 $\rightarrow$ 4)- β -D-Araf-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-GalAp-(1 $\rightarrow$ 连接。HSQC 谱中检测到 -OCH₃ 的 C/H 相关信号 (δ 3.38/59.40)。HMBC 谱进一步显示,

表 2 DP2 组分的化学位移信息

Table 2 Chemical shift information of DP2 component

糖残基	氢/碳	$\delta_{H/C}$					
		1	2	3	4	5	5'/6
A: α -D-GlcAp	H	4.70	3.35	3.64	3.30	4.40	
	C	96.86	78.21	72.81	78.80	71.17	174.61
B: $\rightarrow$ 1)- α -D-Xylp-(2 $\rightarrow$	H	5.07	3.63	3.81	3.62	3.71	3.83
	C	96.58	72.62	72.13	71.23	61.09	
C: α -D-GlcAp	H	4.70	3.35	3.64	3.30	4.40	
	C	96.86	78.21	72.81	78.80	71.17	174.61
D: $\rightarrow$ 1)- β -D-Xylp-(2 $\rightarrow$	H	4.63	3.27	3.79	3.61	3.91	3.83
	C	95.95	74.02	72.01	73.7	68.82	

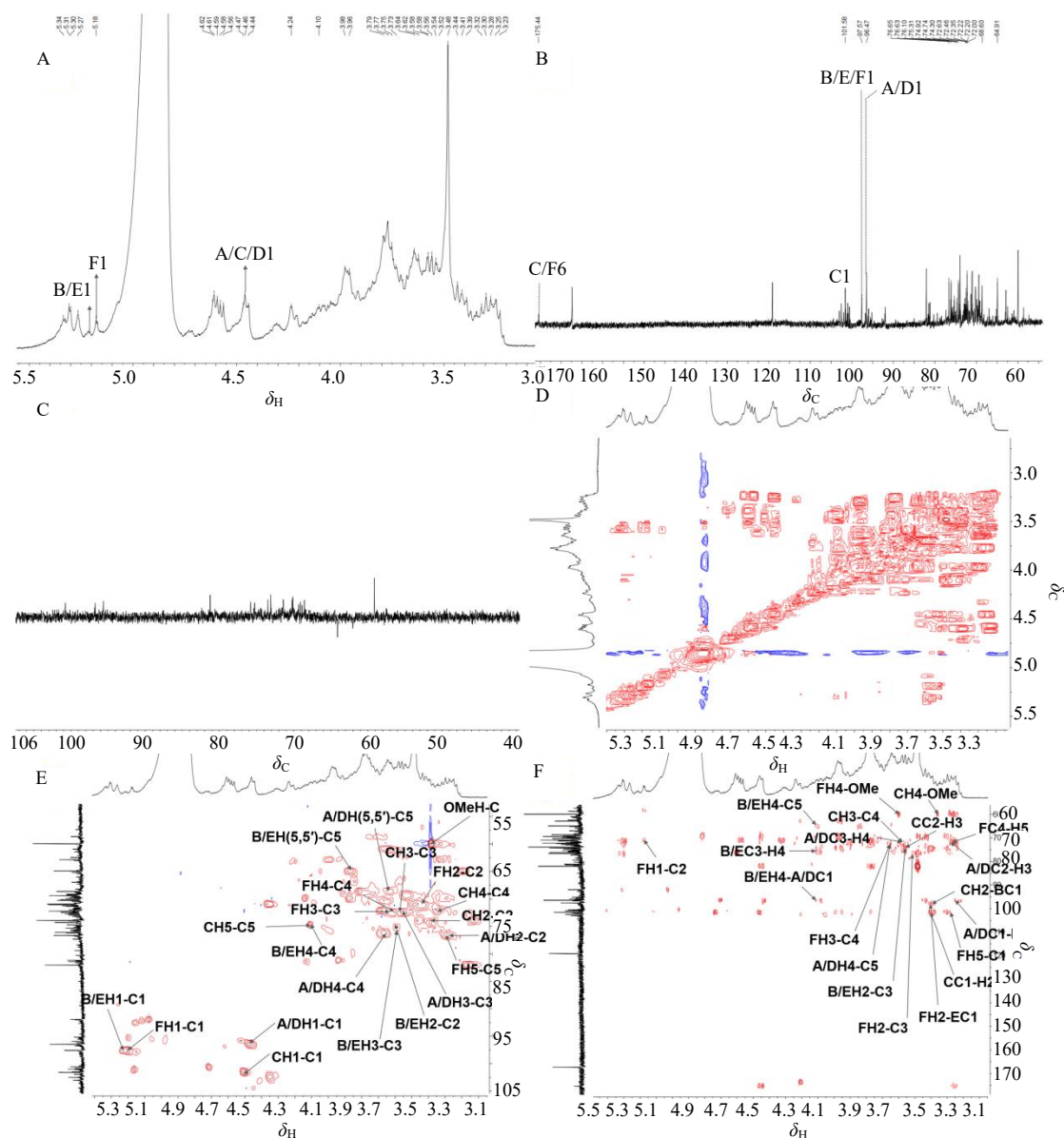


图 7 寡糖组分 DP3 的核磁共振分析

Fig. 7 NMR analysis of oligosaccharide component DP3

表 3 DP3 组分的化学位移信息

Table 3 Chemical shift information of DP3 component

糖残基	氢/碳	δ					
		1	2	3	4	5	5'/6
A: t- β -D-Xylp	H	4.46	3.27	3.55	3.63	3.65	3.64
	C	96.59	76.51	72.17	72.54	68.52	
B: $\rightarrow$ 1)- β -D-Araf-(4 $\rightarrow$	H	5.20	3.53	3.60	4.11	3.86	3.85
	C	97.60	74.45	75.11	74.72	64.69	
C: $\rightarrow$ 1)- β -D-GlcAp-(2 $\rightarrow$	H	4.47	3.39	3.56	3.36	4.11	
	C	101.58	74.45	72.52	72.19	74.89	175.32
D: t- β -D-Xylp	H	4.46	3.27	3.55	3.63	3.65	3.64
	C	96.59	76.51	72.17	72.54	68.52	
E: $\rightarrow$ 1)- β -D-Araf-(4 $\rightarrow$	H	5.20	3.53	3.60	4.11	3.86	3.85
	C	97.60	74.45	75.11	74.72	64.69	
F: $\rightarrow$ 1)- α -D-GalAp-(2 $\rightarrow$	H	5.18	3.41	3.65	3.67	3.27	
	C	97.60	70.81	76.26	75.91	76.62	175.58

C-H4 与 -OCH₃-C (δ 3.36/59.40)、F-H4 与 -OCH₃-C (δ 3.67/59.40) 均存在相关信号, 这表明结构中存在 2 种甲基化糖醛酸残基 $\rightarrow$ 2)- β -D-GlcAp-4-OMe-(1 $\rightarrow$ 和 $\rightarrow$ 2)- α -D-GalAp-4-OMe-(1 $\rightarrow$ 。综上推断 DP3 为 2 种结构共存的混合物, 其主要结构为: β -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-Araf-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-GlcAp-4-OMe-(1 $\rightarrow$ 和 β -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-Araf-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-GalAp-4-OMe-(1 $\rightarrow$ 。

DP5 的核磁共振谱图如图 8 所示, 数据见表 4。在 ¹H-NMR 谱的低场区 δ 4.4~5.4 存在 10 组糖端基氢信号, 结合 HSQC 谱中对应的端基碳化学位移, 归属如下: A1 (δ 5.31; 97.91) [27]、B1 (δ 4.63; 101.28) [35]、C1 (δ 4.64; 101.28) [28]、D1 (δ 4.63; 101.14) [28-29]、E1 (δ 5.34; 97.90) [27]、F1 (δ 5.31; 97.91) [27]、G1 (δ 4.63; 101.28) [28]、H1 (δ 4.64; 101.28) [35]、I1 (δ 4.63; 101.14) [29]、J1 (δ 4.48; 101.69) [37]。推测这些信号对应于 DP5 在溶液中存在的 2 种主要构象, 分别标记为残基 A~E 与残基 F~J。HMBC 相关信号系统揭示了糖链的连接顺序: 残基 A/F 的 H1 与残基 B/G 的 C2 之间存在相关信号 (δ 5.32/76.84), 证实存在 α -D-GlcAp-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Xylp 连接; 残基 B/G 的 H1 与残基 C/H 的 C4 在 δ 4.63/76.12 处存在相关峰, 表明存在 $\rightarrow$ 2)- β -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 连接方式; 残基 C/H 的 H1 与残基 D/I 的 C4 在 δ 4.64/76.23 处存在相关信号峰, 表明存在 $\rightarrow$ 4)- β -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 连接; 残基 E/J 的 H4 与残基 D/I 的 C1 之间存在相关信号 (δ 3.83/101.14 及

δ 4.08/101.14), 表明末端糖残基通过 $\rightarrow$ 4)- β -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 4)-GlcAp 连接。此外, HSQC 谱中检测到 -OCH₃ 的相关信号 (δ 3.54/59.71)。在 HMBC 谱中, 观察到 -OCH₃-H 与 A/F-C2 (δ 80.83)、-OCH₃-H 与 E-C3 (δ 81.36)、-OCH₃-H 与 J-C3 (δ 81.47) 之间的相关信号, 证实结构中存在 α -D-GlcAp-2-OMe 与 GlcAp-3-OMe (α/β 构型) 的甲基化修饰。综上推断 DP5 的结构为: α -D-GlcAp-2-OMe-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-GlcAp-3-OMe-(1 $\rightarrow$ 以及 α -D-GlcAp-2-OMe-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-GlcAp-3-OMe-(1 $\rightarrow$ 。由于 DP5 在溶液状态下存在构象不稳定性, 2 种构型可发生相互转化, 处于动态平衡。

综合对比分析, 发现它们具有以下 3 个显著的结构特征: (1) 单糖组成以糖醛酸与戊糖为主, 其中 D-葡萄糖醛酸 (GlcAp) 和 D-木糖 (Xylp) 为核心单糖, 并含有 L-阿拉伯糖 (Araf); (2) 所有分离得到的寡糖均含有葡萄糖醛酸 (GlcAp) 或半乳糖醛酸 (GalAp), 且这些糖醛酸的 2-位或 3-位羟基常发生甲基化 (-OMe) 修饰; (3) 寡糖呈现出特征性的糖苷键连接模式: GlcAp $\rightarrow$ Xylp 以 (1 $\rightarrow$ 2) 连接为主, Xylp $\rightarrow$ Xylp 或 Xylp $\rightarrow$ Araf 主要为 (1 $\rightarrow$ 4) 连接, 而 Araf $\rightarrow$ GlcAp 则为 (1 $\rightarrow$ 2) 连接。

需要指出的是, 在 UHPLC-UV 单糖组成分析实验中检测到多种单糖, 可能部分来源于夏枯草中其他共存多糖的降解产物, 或是在剧烈水解条件下由单糖异构化等副反应生成的产物。这些组分在后

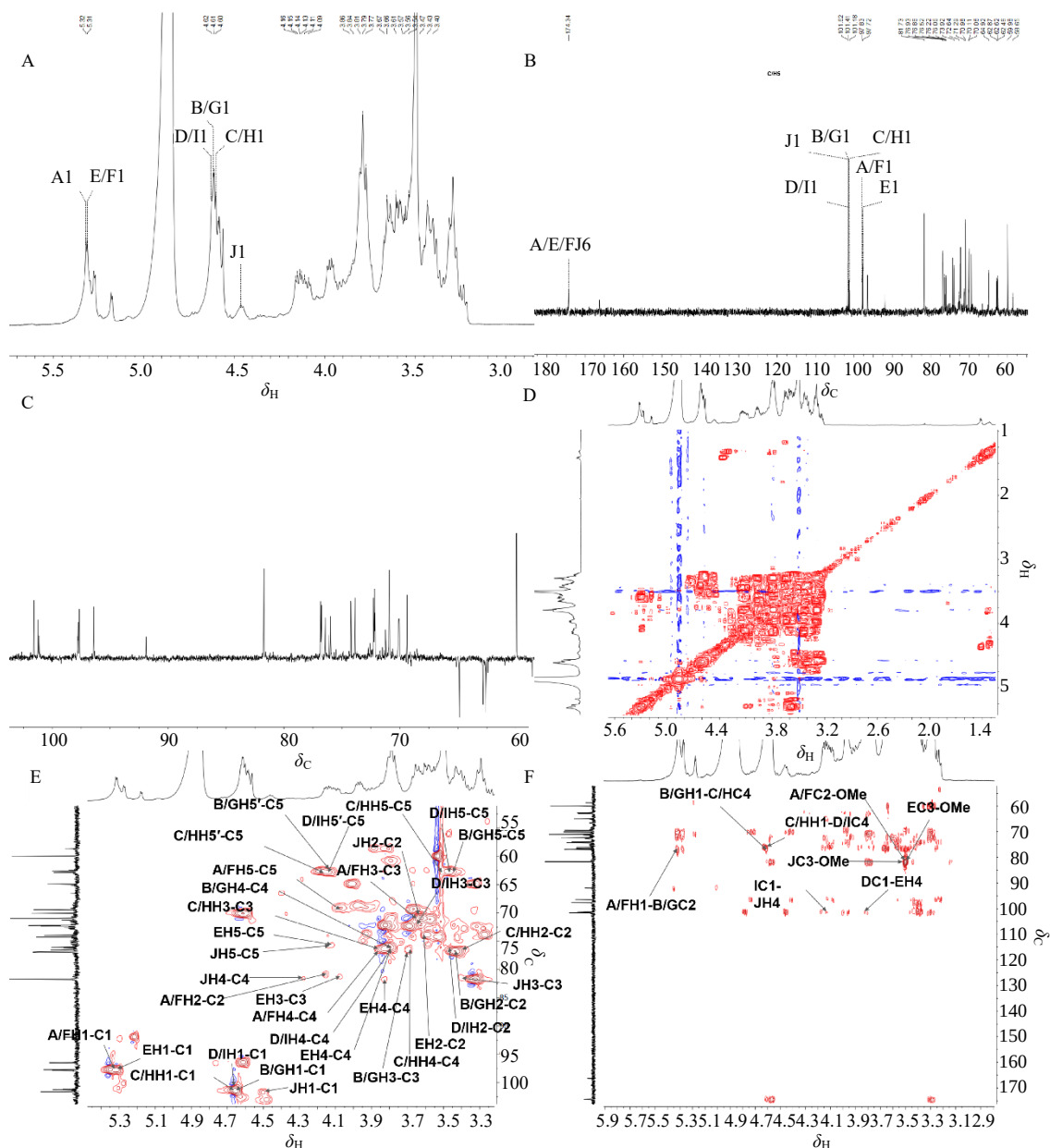


图 8 寡糖组分 DP5 的核磁共振分析

Fig. 8 NMR analysis of oligosaccharide component DP5

续基于高分辨技术的结构解析中，由于信号强度不足或被主体信号掩盖，未能被明确指认为寡糖主链或关键结构单元。因此，本研究所得 DP2、DP3 及 DP5 组分，可能为含有多种亲水性相近、聚合度相似的寡糖混合物，确认的主体结构主要反映的是寡糖组分中丰度最高、信号最突出的组分特征。

3.5 DPPH 自由基清除活性测定

如图 9 所示，所有样品均展现出一定程度的 DPPH 自由基清除能力。在极低质量浓度（0.005 mg/mL）下，PVPs、ZTW-100、F1-F4 以及 DP2、DP3、DP5 的清除率均已超过 40.0%，提示这些组

分即使在微量条件下仍具备显著的抗氧化潜力。除 DP2 外，其他样品在 0.005~0.1 mg/mL 质量浓度内对 DPPH 自由基的清除能力均表现出良好的剂量相关性。DP2 在检测浓度范围内，清除率稳定在 71%~77%，也具有较强的抗氧化能力，未表现出剂量相关性，可能是其作为二糖，相对分子质量较小、分子结构中的自由基反应位点有限等原因，在更低浓度下已经达到反应饱和，在达到一定清除效率后，即使增加浓度也无法进一步提升清除能力。进一步通过拟合非线性曲线，计算半数抑制浓度（median inhibition concentration, IC₅₀）评估其活性强度，

表 4 DP5 组分的化学位移信息
Table 4 Chemical shift information of DP5 component

糖残基	氢/碳	δ					
		1	2	3	4	5	5/6
A: t- α -D-GlcAp	H	5.31	4.16	3.64	3.83	4.10	
	C	97.91	80.83	70.91	76.06	70.41	174.19
B: $\rightarrow$ 1)- β -D-Xylp-(2 $\rightarrow$	H	4.63	3.43	3.69	3.80	3.41	4.14
	C	101.28	76.84	76.23	77.07	62.95	
C: $\rightarrow$ 1)- β -D-Xylp-(4 $\rightarrow$	H	4.64	3.43	3.87	3.69	3.52	4.13
	C	101.28	76.94	76.51	76.12	62.49	
D: $\rightarrow$ 1)- β -D-Xylp-(4 $\rightarrow$	H	4.63	3.44	3.66	3.79	4.16	3.47
	C	101.14	76.08	72.63	76.23	62.65	
E: $\rightarrow$ 1)- α -D-GlcAp-(4 $\rightarrow$	H	5.34	3.61	4.08	3.83	4.12	
	C	97.90	73.72	81.36	81.68	75.8	174.20
F: t- α -D-GlcAp	H	5.31	4.16	3.64	3.83	4.10	
	C	97.91	80.83	70.91	76.06	70.41	174.19
G: $\rightarrow$ 1)- β -D-Xylp-(2 $\rightarrow$	H	4.63	3.43	3.69	3.80	3.41	4.14
	C	101.28	76.84	76.23	77.07	62.95	
H: $\rightarrow$ 1)- β -D-Xylp-(4 $\rightarrow$	H	4.64	3.43	3.87	3.69	3.52	4.13
	C	101.28	76.94	76.51	76.12	62.49	
I: $\rightarrow$ 1)- β -D-Xylp-(4 $\rightarrow$	H	4.63	3.44	3.66	3.79	4.16	3.47
	C	101.14	76.08	72.63	76.23	62.65	
J: $\rightarrow$ 1)- β -D-GlcAp-(4 $\rightarrow$	H	4.48	3.63	3.40	4.08	4.14	
	C	101.69	70.20	81.47	81.26	74.25	174.46

DP2、DP3 和 DP5 的 IC_{50} 值分别为 2.9、128.7、0.36 $\mu\text{g/mL}$ ，其中 DP5 的活性最为突出，其 IC_{50} 值显著低于其他组分，稍弱于阳性对照 VC (0.11 $\mu\text{g/mL}$)。而与文献报道的其他植物来源寡糖相比，DP5 的 IC_{50} 远低于地参寡糖 LLP-1 ($IC_{50}=0.045\ 7\ \text{mg/mL}$)^[39]和甘草地上部分寡糖 ($IC_{50}=0.220\ 2\ \text{mg/mL}$)^[40]，表明 DP5 寡糖组分具有极强的 DPPH 自由基清除能力。

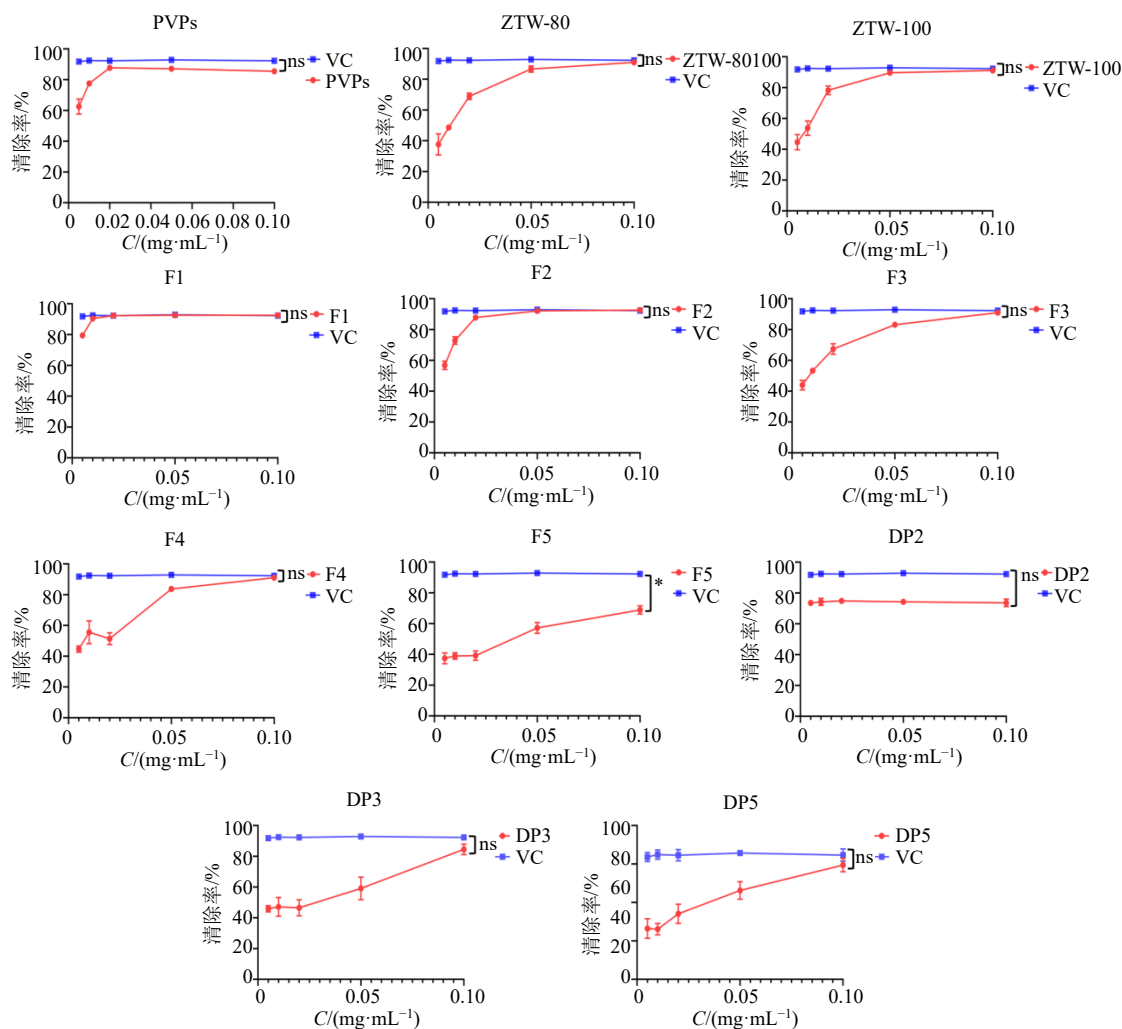
当质量浓度升高至 0.1 mg/mL 时，各样品清除活性达到最大，趋于平台期。此时，清除活性分别为 ZTW-80: (90.96 $\pm$ 0.97)%、ZTW-100: (91.17 $\pm$ 0.30)%、F1: (92.53 $\pm$ 0.57)%、F2: (92.65 $\pm$ 0.40)%、F3: (90.95 $\pm$ 0.18)%、F4: (91.02 $\pm$ 0.83)%、DP3: (84.55 $\pm$ 4.02)%、DP5: (89.73 $\pm$ 1.94)%，它们的抗氧化活性与阳性对照 VC 相比无显著差异。以上结果表明，夏枯草不同条件下酸水解产物在较高浓度下可达到与 VC 相当的强效抗氧化水平，尤其 DP5 在极低浓度下即表现出卓越的活性。

3.6 体外肠道菌群丰富度调控研究

体外培养小鼠肠道菌群干预实验结果显示(图 10、表 5)，与 24 h 空白对照组相比，各供试样品(ZTW-80、ZTW-100、F1~F5、DP2、DP3、DP5)在给药 24 h 后对肠道菌群结构均表现出不同程度的调节作用，且其作用模式呈现明显的差异。

门水平菌群差异结果显示(图 10-A)，F1 和 DP3 能显著提升拟杆菌门的相对表达量(F1: 上调约 2.03 倍， $P<0.001$ ；DP3: 上调 1.71 倍， $P<0.05$)，提示这些寡糖组分在体外条件下具有选择性促进有益菌群生长的潜力。而 ZTW-80 和 ZTW-100 使变形菌门丰度显著上调(ZTW-80: 上调 9.33 倍， $P<0.01$ ；ZTW-100: 上调 33.7 倍， $P<0.001$)。F2~F5、DP2、DP3 及 DP5 使放线菌门丰度显著下调(以 DP5 为例，下调至空白组的 0.09 倍， $P<0.001$)。提示这些组分可能对部分条件致病菌具有潜在的抑制作用，具体作用需结合属水平变化共同分析。

同时，DP2 是唯一使厚壁菌门丰度上调的组分



与阳性对照 VC 相比: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ the positive control VC

图 9 夏枯草多糖、酸水解产物 (ZTW-80、ZTW-100、F1~F5) 及寡糖组分 (DP2、DP3、DP5) 的体外 DPPH 自由基清除活性测定 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 *In vitro* DPPH radical scavenging activity of PVPs, acid-hydrolyzed fractions (ZTW-80, ZTW-100, F1—F5), and purified oligosaccharides (DP2, DP3, DP5) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

(上调约 2.00 倍)。这些不同组分对菌群门类结构的差异化影响,说明夏枯草多糖及其水解产物的肠道菌群调节作用与其化学结构和类型密切相关。

属水平菌群差异结果显示(图 10-B), ZTW-80、ZTW-100 和 F1 在给药 24 h 后,显著上调有益菌双歧杆菌属(分别升高至 62.6、39.4、20.9 倍, $P < 0.001$)和艾克曼菌属(分别升高至 2 146、2 878、313 倍, $P < 0.001$)。鉴于艾克曼菌在代谢和免疫调节中的重要作用^[41], F1 在体外对其显著的促增殖作用提示其可能作为潜在的益生元候选物,值得进一步体内研究。此外, F2、F5 和 DP2 表现出对乳杆菌属的显著促生长作用(分别升高至 371、261、641 倍, $P < 0.001$),进一步印证了不同寡糖组分对特定

益生菌属的选择性调控能力。

4 讨论

本研究采用水提醇沉、Savag 法除蛋白提取夏枯草总多糖,结合不同条件下 TFA 酸水解及 HILIC 分离纯化,最终成功制备出夏枯草寡糖组分 DP2、DP3 和 DP5。综合利用 HILIC/IM-QTOF-HDMS^E、UHPLC-UV 及 NMR 等技术对其进行了结构鉴定。

然而,受限于当前分离纯化与分析方法的固有局限性,最终得到是含多种亲水性和聚合度相似的寡糖混合物,而非单一寡糖结构。首先, HILIC 半制备色谱对亲水性相近、聚合度相似的寡糖混合物分离能力有限,可能有多种亲水性和聚合度相似的寡糖在 HILIC Amide 制备柱上共洗脱,最终被一同

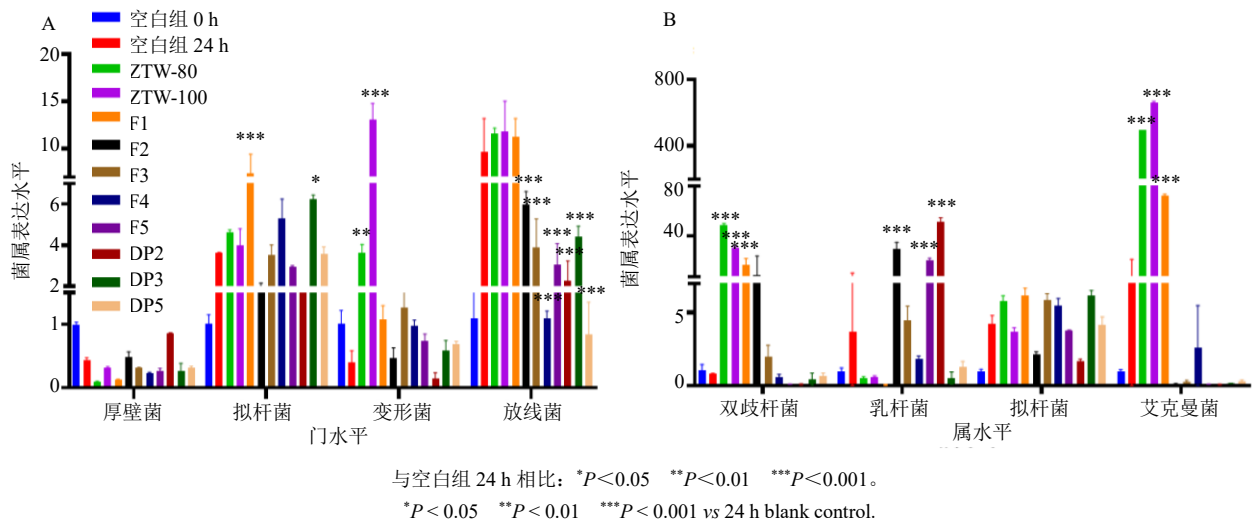


图 10 ZTW-80、ZTW-100、F1-F5 及 DP2、DP3、DP5 对体外培养小鼠肠道菌群门 (A) 与属 (B) 水平相对丰度的调控作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 10 Regulatory effects of ZTW-80, ZTW-100, F1-F5 and DP2, DP3, DP5 on the relative abundance of *in vitro*-cultured mouse gut microbiota at the phylum (A) and genus (B) levels ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 5 菌群表达水平

Table 5 Expression levels of gut microbiota

组别	门水平				属水平			
	厚壁菌	拟杆菌	变形菌	放线菌	双歧杆菌	乳杆菌	拟杆菌	艾克曼菌
空白组 0 h	0.96	0.97	1.00	1.77	1.02	0.84	1.05	1.02
	1.03	0.88	1.23	0.70	1.46	0.96	0.89	0.91
	1.01	1.17	0.82	0.81	0.67	1.23	1.08	1.08
空白组 24 h	0.47	3.62	0.46	13.64	0.77	0.02	3.76	0.23
	0.38	3.63	0.54	8.60	0.74	0.11	4.17	0.24
	0.43	3.66	0.18	6.95	0.83	0.10	4.84	0.23
ZTW-80	0.10	4.53	4.09	11.05	49.54	0.59	5.45	493.79
	0.08	4.74	3.52	12.25	47.58	0.49	6.21	493.35
	0.09	4.63	3.31	11.39	49.30	0.35	5.67	493.77
ZTW-100	0.33	3.45	11.56	15.13	29.83	0.48	3.70	660.60
	0.32	3.55	14.85	8.65	30.76	0.54	3.46	668.82
	0.30	4.92	13.01	11.67	31.58	0.67	3.98	656.47
F1	0.13	5.06	0.84	11.19	10.1	0.02	6.72	71.06
	0.12	8.22	1.14	13.27	18.37	0.01	6.11	73.53
	0.13	8.86	1.26	9.51	20.43	0.09	5.71	71.45
F2	0.57	1.90	0.45	5.47	0.10	27.94	1.92	0.11
	0.47	2.18	0.32	6.70	0.26	35.32	2.22	0.15
	0.39	1.93	0.64	5.72	0.06	25.83	2.24	0.11
F3	0.31	3.06	1.15	2.96	1.06	4.85	5.41	0.18
	0.30	3.98	1.62	3.29	2.57	5.22	6.12	0.24
	0.32	3.62	1.05	5.48	2.26	3.40	6.15	0.36
F4	0.23	4.63	0.89	1.08	0.64	1.97	5.89	1.81
	0.21	4.87	1.01	1.22	0.34	1.92	4.96	5.79
	0.24	6.38	1.05	0.98	0.72	1.63	5.63	0.19

表 5 (续)

组别	门水平				属水平			
	厚壁菌	拟杆菌	变形菌	放线菌	双歧杆菌	乳杆菌	拟杆菌	艾克曼菌
F5	0.30	3.01	0.69	3.17	0.08	19.28	3.77	0.10
	0.28	2.95	0.86	4.03	0.08	20.69	3.80	0.09
	0.23	2.91	0.65	2.02	0.11	21.72	3.72	0.07
DP2	0.86	1.32	0.13	1.63	0.08	54.94	1.73	0.05
	0.87	1.63	0.07	3.37	0.03	50.50	1.53	0.10
	0.86	1.90	0.24	1.86	0.12	48.50	1.77	0.06
DP3	0.14	6.14	0.41	4.82	0.92	0.90	6.42	0.15
	0.34	6.12	0.61	4.57	0.28	0.04	5.87	0.17
	0.33	6.47	0.73	3.79	0.16	0.57	6.37	0.16
DP5	0.31	3.77	0.73	0.76	0.44	1.40	3.57	0.24
	0.34	3.78	0.63	0.40	0.83	0.89	4.43	0.24
	0.29	3.17	0.69	1.39	0.73	1.59	4.53	0.37

收集到目标馏分中。其次, PMP 柱前衍生化单糖组成分析方法在衍生效率、色谱分离及水解条件等方面存在固有局限, 其结果难以精确反映混合物中各单糖的真实组成和比例。此外, 核磁及质谱等精细结构解析技术对混合物中低丰度组分的分辨能力有限, 所报道的结构信息主要反映的是丰度最高、信号最强的主体结构特征, 难以全面表征混合物中可能存在的微量组分或副反应产物。鉴于此, 本研究中对于 DP2、DP3 及 DP5 的分析及后续的推论, 为各组分中优势主体结构的解析结果。

它们表现出的结构特征与通常由葡萄糖和果糖构成的贮藏型寡糖(如菊粉型或棉子糖型寡糖家族)存在明显差异^[42]。相比之下, 糖醛酸及其甲基化衍生物在果胶、半纤维素等结构多糖中则极为常见。这表明, 这些寡糖更可能是半纤维素(如木葡聚糖或葡萄糖醛酸木聚糖)的降解产物, 而非贮藏性碳水化合物。其结构特征与葡萄糖醛酸木聚糖相似, 两者均具有由 β -(1→4)连接木糖残基构成的主链, 且侧链被葡萄糖醛酸或其 4-*O*-甲基化衍生物取代, 这正是葡萄糖醛酸木聚糖的标志性组成^[43-45]。DP5 的结构含有多个木糖残基, 并在 2 端均带有甲基化葡萄糖醛酸取代, 符合这一基本模式。然而, 部分甲基化位点与连接方式呈现独特性。因此, 有理由推测这些寡糖片段可能代表一类特殊的木聚糖变体, 这一成果提示它们可能含有源于夏枯草中细胞壁半纤维素的结构多糖。

通过 DPPH 自由基清除实验和体外肠道菌群丰富度调控研究, 发现不同的寡糖组分表现出差异化

的抗氧化及调节肠道菌群能力。其中, DP5 的抗氧化活性显著优于 DP2 和 DP3, 这可能与其主要结构特征密切相关。首先, 不同聚合度的寡糖组分, 其抗氧化应激活性往往存在差异。DP5 相较于 DP2 和 DP3 具有较高的聚合度, 这通常意味着更多的还原性末端和糖醛酸残基, 这些基团是自由基清除反应中的主要活性位点。其次, DP5 的主要结构中含有 2 个甲基化糖醛酸(2-OMe-GlcAp 和 3-OMe-GlcAp), 甲基化可以增强 C-2/C-3 位的电子云密度, 从而提升其作为氢供体的能力, 增强自由基清除效率。糖醛酸残基在多糖的抗氧化活性中发挥着重要作用, 因为羧基可以螯合金属离子或作为自由基清除剂^[46]。此外, DP5 的线性五糖骨架包含多个 β -(1→4)-Xylp 连接。 β -(1→4)糖苷键通常赋予寡糖链更伸展的构象, 这种构象有利于自由基接近并与活性位点发生有效接触。相比之下, DP2 虽然也含有甲氧基, 但其相对分子质量较小, 电子缓冲能力有限; 而 DP3 的三糖结构可能因空间位阻或缺乏特定的甲基化修饰, 限制了其电子转移效率。综上, 高聚合度与特定位置的甲基化修饰可能是 DP5 发挥超强抗氧化活性的结构基础。

而肠道微生物通过识别和代谢不同碳水化合物来获得能量和生长, 研究表明多糖的来源、单糖组成、相对分子质量和化学结构(如糖苷键类型、支链和功能基团)共同决定了其理化性质和生物活性, 进而影响其在肠道中的发酵模式和与模式识别受体(pattern recognition receptors, PRR)的结合特异性^[47]。因此这些结构差异同样使得不同寡糖组分

对肠道菌群产生选择性调节作用,但其具体机制有待深入研究。

值得注意的是,粗提物 ZTW-80 和 ZTW-100 在促进部分有益菌增殖的同时,也上调了变形菌门的丰度,提示复杂成分可能存在非特异性效应;而纯化后的寡糖组分(DP2、DP3、DP5)则表现出更为特异的菌群调节模式,这进一步佐证了对活性寡糖进行分离纯化的必要性。同时,上述结果主要基于体外厌氧共培养实验,肠道菌群在体内受到宿主代谢、免疫等多重因素的调控,其生态关系远比体外模型复杂。后续研究可通过 16S rRNA 基因测序全面评估菌群结构变化,结合短链脂肪酸等代谢产物检测,并开展体内动物实验,以深入阐明夏枯草寡糖调节肠道菌群的具体机制及其潜在功效。

这些寡糖组分兼具显著的抗氧化活性与调节肠道菌群、促进益生菌增殖的功能,在食品、保健食品及医药产品领域展现出良好的应用前景与发展价值,为后续深入探索夏枯草药用寡糖资源及开发相关产品奠定了坚实的理论基础。然而,当前针对夏枯草寡糖的研究仍处于初步探索阶段,本研究所观察到的抗氧化活性及肠道菌群调节效应,可能是多种寡糖分子共同作用的结果,而非单一结构的固有活性。这一混合物属性在一定程度上限制了对构效关系的精确解读。后续研究需进一步优化分离纯化条件(如手性色谱或酶解法),获得绝对单一构型的寡糖单体,并结合分子对接及构象分析等手段,深入阐明其结构与活性的内在关联。同时建立共享数据库,以推动数据共享与跨平台合作,为夏枯草寡糖深入开发研究提供扎实的理论基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 廖余琼, 张妮, 刘翰飞, 等. 黔产硬毛夏枯草中 1 个新的松香烷型二萜化合物及其抗神经炎活性研究 [J]. 中草药, 2025, 56(16): 5723-5730.
- [2] 王颖, 王一硕, 杜紫薇, 等. 夏枯草不同部位化学成分、药理作用研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. 中华中医药学刊, 2024, 42(6): 199-210.
- [3] 周亚敏. 夏枯草多糖制备工艺、结构表征及其生物活性研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2017.
- [4] Zhou S Y, Huang G L, Huang H L. Extraction, derivatization and antioxidant activities of onion polysaccharide [J]. *Food Chem*, 2022, 388: 133000.
- [5] Chen R Z, Liu Z Q, Zhao J M, *et al.* Antioxidant and immunobiological activity of water-soluble polysaccharide fractions purified from *Acanthopanax senticosu* [J]. *Food Chem*, 2011, 127(2): 434-440.
- [6] Kalita P, Ahmed A B, Sen S, *et al.* A comprehensive review on polysaccharides with hypolipidemic activity: Occurrence, chemistry and molecular mechanism [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 206: 681-698.
- [7] Xue H K, Zhang P Q, Zhang C, *et al.* Research progress in the preparation, structural characterization, and biological activities of polysaccharides from traditional Chinese medicine [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 262: 129923.
- [8] Sun H, Wang M Y, Huang J Q, *et al.* Characterization and identification of the wide-polarity multicomponents from *Prunella vulgaris* by offline two-dimensional liquid chromatography and hydrophilic interaction chromatography coupled to ion mobility-quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2024, 1732: 465233.
- [9] Chen R X, Xu J X, Wu W H, *et al.* Structure-immunomodulatory activity relationships of dietary polysaccharides [J]. *Curr Res Food Sci*, 2022, 5: 1330-1341.
- [10] 刘影, 刘涛, 赵晓军, 等. 地黄寡糖对二型糖尿病大鼠糖脂代谢及肝脏超微结构的影响 [J]. 中国现代应用药学, 2014, 31(11): 1312-1316.
- [11] 高云佳, 姜勇, 戴昉, 等. 肉苁蓉润肠通便的药效物质研究 [J]. 中国现代中药, 2015, 17(4): 307-310.
- [12] Bai R B, Zhang Y J, Jia X S, *et al.* Isolation, characterization and immunomodulatory activity of oligosaccharides from *Codonopsis pilosula* [J]. *J Funct Foods*, 2020, 72: 104070.
- [13] Vimalraj S, Govindarajan D, Sudhakar S, *et al.* Chitosan derived chito-oligosaccharides promote osteoblast differentiation and offer anti-osteoporotic potential: Molecular and morphological evidence from a zebrafish model [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 259: 129250.
- [14] Ma X Q, Zheng Z C, Wang Q, *et al.* The modulation effect of *Lotus (Nelumbo nucifera Gaertn.)* seeds oligosaccharides with different structures on intestinal flora and action mode of growth effects on *Bifidobacterium in vivo and in vitro* [J]. *Food Chem*, 2023, 419: 136057.
- [15] 张玄娥, 周尊海. 从心血管结局看降糖药物治疗的新进展 [J]. 中国全科医学, 2021, 24(18): 2251-2259.
- [16] 张蕙竹, 陶立, 刘睿, 等. 西洋参低聚糖的制备及其体外功能活性分析 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(17): 272-280.
- [17] 刘雪, 任晨瑜, 刘新, 等. 羊栖菜褐藻糖胶寡糖组分分析及抗凝血活性 [J]. 食品科学, 2022, 43(12): 260-266.

- [18] Liu L P, Feng J, Jiang S Q, *et al.* Anti-inflammatory and intestinal microbiota modulation properties of *Ganoderma lucidum* β -D-glucans with different molecular weight in an ulcerative colitis model [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 251: 126351.
- [19] Zhang Y Y, Zhuang D, Wang H Y, *et al.* Preparation, characterization, and bioactivity evaluation of oligosaccharides from *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC [J]. *Carbohydr Polym*, 2022, 277: 118854.
- [20] Yang Z M, Hu J, Zhao M Y. Isolation and quantitative determination of inulin-type oligosaccharides in roots of *Morinda officinalis* [J]. *Carbohydr Polym*, 2011, 83(4): 1997-2004.
- [21] Zhang D W, Wang C S, Hou X, *et al.* Structural characterization and osteoprotective effects of a polysaccharide purified from *Achyranthes bidentata* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 139: 1063-1073.
- [22] Xu Y X, Dong Q, Qiu H, *et al.* A homogalacturonan from the *Radix* of *Platycodon grandiflorum* and the anti-angiogenesis activity of poly-/ oligogalacturonic acids derived therefrom [J]. *Carbohydr Res*, 2011, 346(13): 1930-1936.
- [23] 汪琪琪, 毛宁峰, 张志刚, 等. 基于体外发酵模型的连朴饮及黄连-厚朴药对对人体肠道菌群影响的研究 [J]. *时珍国医国药*, 2022, 33(12): 2902-2904.
- [24] Liu J, Wang H D, Yang F F, *et al.* Multi-level fingerprinting and cardiomyocyte protection evaluation for comparing polysaccharides from six *Panax* herbal medicines [J]. *Carbohydr Polym*, 2022, 277: 118867.
- [25] 陈明龙, 覃桂, 张兴明, 等. 基于文献计量学的夏枯草植物学特性、种植管理及药理作用研究进展 [J]. *中草药*, 2025, 56(16): 6017-6029.
- [26] Xia Y G, Li X, Yu L S, *et al.* Structural-fingerprinting of polysaccharides to discern *Panax* species by means of gas-liquid chromatography and mass spectrometry [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 151: 932-943.
- [27] Wang B B, Song Q Z, Zhao F K, *et al.* Isolation and characterization of dextran produced by *Lactobacillus sakei* L3 from *Hubei sausage* [J]. *Carbohydr Polym*, 2019, 223: 115111.
- [28] Pastell H, Virkki L, Harju E, *et al.* Presence of 1 $\rightarrow$ 3-linked 2-O- β -D-xylopyranosyl- α -L-arabinofuranosyl side chains in cereal Arabinoxylans [J]. *Carbohydr Res*, 2009, 344(18): 2480-2488.
- [29] Pastell H, Tuomainen P, Virkki L, *et al.* Step-wise enzymatic preparation and structural characterization of singly and doubly substituted Arabinoxyloligosaccharides with non-reducing end terminal branches [J]. *Carbohydr Res*, 2008, 343(18): 3049-3057.
- [30] Knirel Y A, Shashkov A S, Senchenkova S N, *et al.* Structure of the O-polysaccharide of *Aeromonas hydrophila* O: 34; a case of random O-acetylation of 6-deoxy-L-talose [J]. *Carbohydr Res*, 2002, 337(15): 1381-1386.
- [31] Fan Y J, Lin M C, Luo A S, *et al.* Characterization and antitumor activity of a polysaccharide from *Sarcodia ceylonensis* [J]. *Molecules*, 2014, 19(8): 10863-10876.
- [32] Stone J K, Heiss C, Wang Z R, *et al.* Structural characterization of polysaccharides expressed by *Burkholderia oklahomensis* E0147 [J]. *Carbohydr Res*, 2014, 386: 68-72.
- [33] Jamróz M K, Paradowska K, Zawada K, *et al.* ^1H and ^{13}C NMR-based sugar profiling with chemometric analysis and antioxidant activity of herb honeys and honeys [J]. *J Sci Food Agric*, 2014, 94(2): 246-255.
- [34] Säwén E, Huttunen E, Zhang X, *et al.* Structural analysis of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* ST1 solely by NMR spectroscopy [J]. *J Biomol NMR*, 2010, 47(2): 125-134.
- [35] Xiao X, Wen J Y, Wang Y Y, *et al.* NMR and ESI-MS spectrometry characterization of autohydrolysis xylo-oligosaccharides separated by gel permeation chromatography [J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 195: 303-310.
- [36] Glushka J N, Terrell M, York W S, *et al.* Primary structure of the 2-O-methyl- α -L-fucose-containing side chain of the pectic polysaccharide, rhamnogalacturonan II [J]. *Carbohydr Res*, 2003, 338(4): 341-352.
- [37] Wang H X, Zhao J, Li D M, *et al.* Structural investigation of a uronic acid-containing polysaccharide from abalone by graded acid hydrolysis followed by PMP-HPLC-MSⁿ and NMR analysis [J]. *Carbohydr Res*, 2015, 402: 95-101.
- [38] Zhang X H, Liu L N, Lin C W. Structural features, antioxidant and immunological activity of a new polysaccharide (SP1) from sisal residue [J]. *Int J Biol Macromol*, 2013, 59: 184-191.
- [39] 尹康宁, 赵兴旺, 汪婧, 等. 地参寡糖提取、组成解析及抗氧化活性研究 [J]. *饲料研究*, 2025, 48(23): 109-115.
- [40] 于冰莉, 方永晟, 庞昕昕, 等. 甘草地上部分寡糖富集纯化及其抗衰老活性研究 [J]. *中国现代中药*, 2021, 23(11): 1889-1896.
- [41] Wang X Z, Li X, Zhang L Y, *et al.* Recent progress in plant-derived polysaccharides with prebiotic potential for intestinal health by targeting gut microbiota: A review [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2024, 64(33): 12242-12271.

- [42] Guo H, Yao R, Fan J, *et al.* Research progress on extraction, isolation, structural identification and analytical methods of oligosaccharides from Chinese herbal medicine [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2025, 45(3): 361-391.
- [43] Feng L, Yin J Y, Nie S P, *et al.* Enzymatic purification and structure characterization of glucuronoxylan from water extract of *Cassia obtusifolia* seeds [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 107(Pt B): 1438-1446.
- [44] Liu D, Tang W, Xin Y, *et al.* Isolation and structure characterization of glucuronoxylans from *Dolichos lablab* L. hull [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 182: 1026-1036.
- [45] 吴嵩民, 赵先海, 解巧丽, 等. 葡萄糖醛酸木聚糖生物合成研究进展 [J]. 华南农业大学学报, 2015, 36(4): 1-10.
- [46] He P F, Zhang A Q, Zhang F M, *et al.* Structure and bioactivity of a polysaccharide containing uronic acid from *Polyporus umbellatus* Sclerotia [J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 152: 222-230.
- [47] Moon J H, Kim K, Kim Y, *et al.* Rational bioengineering of polysaccharide in designing of microbiome modulation [J]. *Trends Biotechnol*, 2026, 44(4): 940-956.

[责任编辑 王文倩]