DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2016.06.012

·学生园地·

复合酶法提取玄参多糖的优化工艺及其抗氧化活性研究*

丁平刚[1▲]　董雪琦[1▲]　郭莹莹[1▲]　王　艳[1▲]　王建安[2△]

([1] 济宁医学院,[2] 济宁医学院药学院,日照 276826)

摘　要　目的　优选复合酶法提取玄参多糖的最佳酶配比工艺条件,并对玄参多糖体外抗氧化活性进行初步研究。**方法**　以玄参多糖得率为考察指标,在单因素基础上,采用正交实验设计优化果胶酶、纤维素酶、半纤维素酶和木瓜蛋白酶的用量,并在最佳酶配比下,考察料液比、pH 值、提取时间、酶作用温度的最佳提取工艺;利用 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH·)法测定玄参多糖抗氧化活性。**结果**　复合酶最佳配比为:果胶酶 1.50%、纤维素酶 1.20%、木瓜蛋白酶 0.90%、半纤维素酶 0.09%,最佳提取条件为:料液比为 1:30(g/ml)、pH 值为 7.0、反应时间为 60min、温度 40℃。在此条件下,玄参多糖含量达到 8.98%。玄参多糖对 DPPH·清除作用在 0.5~2.5mg/ml 浓度范围内呈较强的量效关系。**结论**　酶辅助提取方法显著提高了玄参多糖的提取率,可为玄参多糖的提取、分离奠定了良好的基础。

关键词　玄参多糖;提取;复合酶;正交试验;抗氧化活性

中图分类号:R284.1　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1000-9760(2016)12-426-07

Study on complex enzymes assisted extraction and antioxidant activity of polysaccharides from Scrophularia ningpoensis

DING Pinggang[1], *DONG Xueqi*[1], *GUO Yingying*[1], *WANG Yan*[1], *WANG Jian'an*[2]

([1] *Jining Medical University*; [2] *School of Pharmaceutical Sciences, Jining Medical University, Rizhao*, 276800, *China*)

Abstract: ***Objective***　To explore the best compound enzymes ratio, the optimal extraction technology on the Scrophularia ningpoensis polysaccharides (SNP) from S. ningpoensis Hemsl., and preliminary antioxidant activities of SNP. ***Methods***　Using extraction rate of polysaccharide as index, the orthogonal design based on single factor test was employed to further optimize the proportion of various enzymes (pectinase, cellulose, papain, hemicellulase) and the effects of extraction conditions (ratio of water to raw material, pH, extraction time, extraction temperature). In vitro the antioxidant activity of polysaccharide was determined by DPPH free radical scavenging method. ***Results***　The optimal amounts of complex enzymes were: pectinase of 1.50%, cellulose of 1.20%, papain of 0.90% and hemicellulase of 0.09%. The results showed that the highest polysaccharides yield of 8.98% was achieved with extraction time of 60 min, extraction temperature of 40℃, pH value of 7.0, liquid/material ratio of 30:1 ml/g. SNP using complex enzyme had significant antioxidant activity, and the DPPH radical-scavenging rate assumed a rise trend along with the increase of polysaccharide concentration in the range of 0.5-2.5mg/ml. ***Conclusion***　The findings showed that the complex enzyme-assisted extraction improved the yield of SHP and provided the basis for extraction and separation of SNP from Scrophularia ningpoensis.

Keywords: Scrophularia ningpoensis polysaccharides; Extraction; Comlex enzymes; Orthogonal experiment method; Antioxidant activity

* [基金项目]山东省医药卫生科技发展计划项目(2013WS0333);济宁医学院科技计划项目(JYZ013KJ007)

△ [通信作者]王建安,E-mail:anansen@163.com

▲ 丁平刚,董雪琦,郭莹莹,王艳,济宁医学院 2013 级中药学本科生

玄参为玄参科植物玄参(Scrophularia ningpoensis Hemsl.)的块根,为我国传统中药,主含环烯醚萜类、苯丙素苷类及黄酮类、挥发油、糖类等化学成分[1],具有清热凉血,泻火解毒,滋阴等功效。现代研究表明,多糖有免疫调节、抗疲劳等多种生理药理作用[2-3],具有较高的开发利用价值。多糖常采用热水提取[4]、超声波提取[5]、微波提取[6]和酶法[7-9]等方法提取。酶法具有提取条件温和,能充分释放植物细胞里的活性物质的优点,已被广泛应用于多种植物有效成分的提取。

本文选取果胶酶、纤维素酶、木瓜蛋白酶、半纤维素酶用于玄参多糖的提取,采用正交试验优化对复合酶提取玄参多糖的工艺,对获得的玄参多糖的进行体外抗氧化活性测定,为该多糖的应用提供基础研究。

1　实验材料与仪器

1.1　试剂

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH·)(西安沃尔森生物技术有限公司);葡萄糖标准品(南京春秋生物工程有限公司);果胶酶(20000 U/g)、纤维素酶(20000 U/g)、半纤维素酶(100000 U/g)(山东隆大生物工程有限公司);木瓜蛋白酶(100000 U/g)(南京春秋生物工程有限公司); DM130 大孔树脂(山东鲁抗医药立科药业有限公司);无水乙醇、丙酮 、三氯甲烷、正丁醇、蒽酮等均为分析纯。

1.2　药品

药材于 2015 年 11 月采于济宁医学院药学院中药材种植园,并由王建安老师鉴定为玄参科地黄属玄参,将玄参根切片放置室内去除杂质后进行“发汗”处理,待药材横切面变为黑色时置于烘箱,于 45 ℃干燥至恒重,粉碎,过 80 目筛,置于干燥器中备用。

1.3　仪器

UV-2450 紫外分光光度计(Shimadzu 公司); GZX-9246MBE 型电热鼓风干燥箱(上海博讯实业有限公司); SCIENTZ-18N 冷冻干燥机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

2　实验方法

2.1　标准曲线的绘制

称取在 105 ℃条件下干燥至恒重的葡萄糖标准品 0.05 g,配制成 0.05 mg/ml 的葡萄糖标准溶液,精密吸取葡萄糖标准溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 ml,分别置于 5 支 25ml 具塞试管中,全部以蒸馏水补至 2.0 ml,用一支空白管吸取 2.0 ml 蒸馏水。吸取蒽酮-硫酸试液 8 ml 加至各试管中,摇匀。每管做 3 组平行以保证实验准确性。将上述试管移至沸水浴中加热 10 min 后,冷却。室温至冷后用紫外分光光度计在 625 nm 波长处测定其吸光度。以吸光度 y 对标准品溶液的浓度 x 绘制标准曲线并进行线性回归,得到回归方程为 y = 0.0221x + 0.06,R2 = 0.9996。结果见图 1。

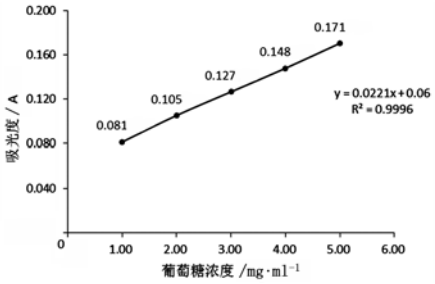

图 1　葡萄糖标准曲线

2.2　脱色脱脂

将玄参根粉末和丙酮按 1∶3的比例混匀后放置在振荡器上持续震荡 24h,脱脂、脱色素。

2.3　大孔树脂预处理

称取一定量的大孔树脂 DM130,先以无水乙醇浸泡 24h 后上层析柱,以蒸馏水冲洗至无乙醇味道为止。再用 5% 的 HCL 浸泡 2 ~ 4h,用蒸馏水洗至中性。最后用 2% 的 NaOH 浸泡 2 ~ 4h,再用蒸馏水冲洗至中性,备用待上样。

2.4　玄参多糖的提取

称定 10.01 g 玄参粉末,加入一定 pH 值的缓冲液和适量的酶液,混匀密封后至恒温箱内,酶解一段时间后 100 ℃水浴 10 min 灭活,抽滤、浓缩。粗多糖浓缩液与无水乙醇按 1∶4的比例进行醇沉,于 4 ℃过夜。移去上清,以少量蒸馏水溶解沉淀后用 DM130 型号的大孔树脂除色素[10],收集多糖液浓缩,冷冻干燥得玄参粗多糖。

2.5　玄参多糖提取率的测定

精密称定上述玄参粗多糖 5.0 mg 于 100 ml 容量瓶中,加水稀释至刻度。取该供试品溶液 2.0 ml 置于 10 ml 具塞刻度试管中,按“2.1” 项下方法,于波长 625 nm 处测定吸光度,计算玄参粗多糖含量。

2.6　复合酶法提取玄参多糖中酶用量的单因素试

验

取 10.00 g 玄参粗粉,固定料液比 1∶10 g/ml、pH 值 4.5、时间 60 min、温度 50.0 ℃的提取条件,以果胶酶、纤维素酶、木瓜蛋白酶和半纤维素酶 4 种酶的百分用量为考察因素,以玄参多糖得率为考察指标,进行单因素试验。

2.7 正交试验设计复合酶用量配比对玄参多糖提取的影响

在单因素实验的基础上,选用果胶酶、纤维素酶、木瓜蛋白酶和半纤维素酶 4 种酶,考察其最佳用量配比。采用实验设计软件 Minitab15,进行 L9(34)正交试验,实验设计方案见表 1。

表 1 复合酶用量配比正交试验设计

序号	果胶酶	纤维素酶	木瓜蛋白酶	半纤维素酶
1	1.00%	0.90%	0.60%	0.09%
2	1.00%	1.20%	0.90%	0.12%
3	1.00%	1.50%	1.20%	0.15%
4	1.50%	0.90%	0.90%	0.15%
5	1.50%	1.20%	1.20%	0.09%
6	1.50%	1.50%	0.60%	0.12%
7	2.00%	0.90%	1.20%	0.12%
8	2.00%	1.20%	0.60%	0.15%
9	2.00%	1.50%	0.90%	0.09%

2.8 复合酶最佳酶解条件下提取工艺的单因素实验

根据最佳复合酶用量配比试验结果,以料液比、pH 值、酶提时间和温度作为考察因素,以葡萄糖计多糖得率为考察指标,进行单因素试验。

2.9 正交试验优化复合酶条件下玄参多糖的提取工艺

在最佳复合酶用量配比试验结果以及单因素实验的基础上,考察料液比、pH 值、酶提时间和温度 4 个因素对玄参多糖得率的影响,实验采用 Minitab15 正交设计软件,进行 L9(34)正交试验。实验设计见表 2。

表 2 复合酶最佳酶解条件正交试验设计

序号	料液比	溶剂 pH	提取时间/min	温度/℃
1	1∶10	5.0	30	40.0
2	1∶10	6.0	60	50.0
3	1∶10	7.0	90	60.0
4	1∶20	5.0	60	60.0
5	1∶20	6.0	90	40.0
6	1∶20	7.0	30	50.0
7	1∶30	5.0	90	50.0
8	1∶30	6.0	30	60.0
9	1∶30	7.0	60	40.0

2.10 玄参粗多糖脱蛋白

称定适量玄参粗多糖溶解,采用 Sevage 法除蛋白,并在 260 ~ 280 nm 进行紫外扫描以确定其中蛋白是否除净。

2.11 玄参多糖抗氧化活性研究

吸取浓度为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mg/ml 的待测溶液 5.0 ml,分别加入 8.62×10^{-5} mol/l DPPH 溶液 5.0 ml,摇匀,静置 30 min。以无水乙醇调零,测定 515nm 处的吸光度(OD 样品)。同时,测定样品溶液 5.0 ml 与无水乙醇 5.0 ml 混合液在 515 nm 处的吸光度(OD 标准),再测定 DPPH 溶液与无水乙醇 5.0 ml 在 515 nm 处的吸光度(OD 空白)。样品重复测定 3 次,计算平均值,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计算其清除率(E)。公式如下:

$$E(\%) = (1 - \frac{OD_{样品} - OD_{对照}}{OD_{空白}}) \times 100\%$$

3 结果与分析

3.1 复合酶最佳配比的确定

3.1.1 果胶酶对玄参多糖提取率的影响 果胶酶使用量为 0.5% ~ 1.5% 时,多糖得率呈上升趋势,而后随着果胶酶使用量的增加,多糖得率却呈下降趋势,这可能是因为底物与酶已经达到了饱和,即使再增加酶量也不会增加多糖的渗出,而再增加酶量却会导致其他物质的析出,从而导致多糖含量下降。见图 2。

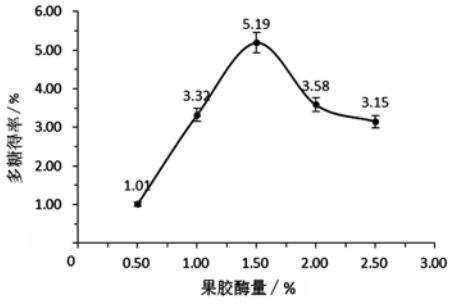

图 2 果胶酶对玄参多糖提取率的影响

3.1.2 纤维素酶对玄参多糖提取率的影响 与果胶酶的情况相类似,纤维素酶用量在 0.6% ~ 1.2% 时也表现为上升趋势,但当酶量继续增加时,糖提取率下降。在实验条件下,纤维素酶量在 1.2% 时玄参多糖得率为 4.29%。见图 3。

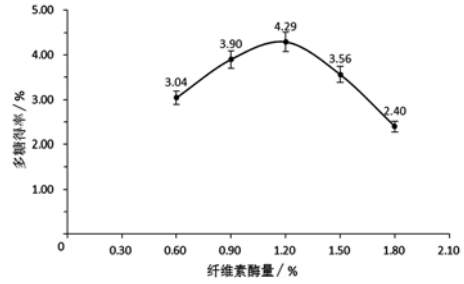

图 3　纤维素酶对玄参多糖提取率的影响

3.1.3　木瓜蛋白酶对玄参多糖提取率的影响　木瓜蛋白酶量在 0.15% ~0.90% 时多糖提取率一直增加,当酶用量为 0.9% 时达到最高,而在用量继续增加为 1.2% 时多糖含量下降,糖提取率达到 3.28%。见图 4。

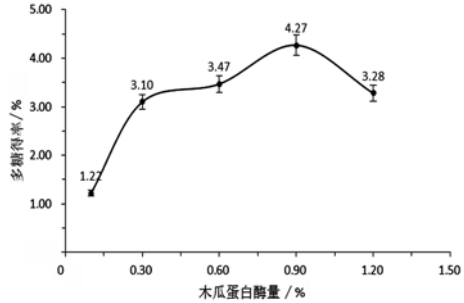

图 4　木瓜蛋白酶对玄参多糖提取率的影响

3.1.4　半纤维素酶对玄参多糖提取率的影响　半纤维素是植物细胞壁的主要成分之一,约占细胞壁成分的 10% ~30%[11]。因而利用半纤维素酶降解半纤维素,从而使植物细胞壁变得较为松弛,对植物细胞内成分的提取具有积极的意义。本实验发现,在半纤维酶用量 0.6% ~1.2% 时,多糖得率呈现增加的趋势,在 1.2% 时达到最高,为 5.27%,而随后下降。见图 5。

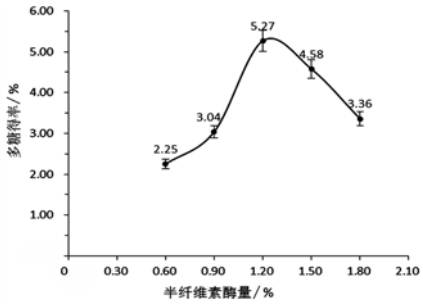

图 5　半纤维素酶对玄参多糖提取率的影响

3.1.5　正交设计复合酶用量配比对玄参多糖提取率的影响　果胶酶、纤维素酶、半纤维素酶以及木瓜蛋白酶协同作用,一方面可以促进植物植物细胞壁中的果胶、纤维素组合蛋白、半纤维素组合蛋白的降解[11],从而大大促进胞内有效成分的溶出;另一方面可快速降解果胶及各类造成浑浊的物质,使提取液澄清,易于后续的滤过等试验。

复合酶对多糖提取得率的影响依次为 D > B > C > A,最佳配比组合为 $A_2B_2C_2D_1$,其配比为:果胶酶 1.50%、纤维素酶 1.20%、木瓜蛋白酶 0.90%、半纤维素酶 0.09%,具体结果见表 3。纤维素酶、半纤维素酶、木瓜蛋白酶用量 3 个因素对考察指标均有显著性影响($P < 0.05$),而果胶酶对考察指标无显著性影响,具体结果见表 4。以正交试验得出的最佳工艺参数,取同一批次样品进行 3 次验证试验,提取率为 5.30%,表明经正交优化得到的复合酶用量配比稳定可靠。

表 3　复合酶对玄参多糖提取率的影响

序号	因素				多糖得率/%
	A 果胶酶	B 纤维素酶	C 木瓜蛋白酶	D 半纤维素酶	
1	1.00%	0.90%	0.60%	0.09%	4.03
2	1.00%	1.20%	0.90%	0.12%	3.87
3	1.00%	1.50%	1.20%	0.15%	3.66
4	1.50%	0.90%	0.90%	0.15%	4.25
5	1.50%	1.20%	1.20%	0.09%	5.21
6	1.50%	1.50%	0.60%	0.12%	2.24
7	2.00%	0.90%	1.20%	0.12%	2.87
8	2.00%	1.20%	0.60%	0.15%	3.97
9	2.00%	1.50%	0.90%	0.09%	4.47
K_1	3.853	3.717	3.413	4.570	
K_2	3.900	4.350	4.197	2.993	
K_3	3.770	3.457	3.913	3.960	
R	0.130	0.893	0.784	1.577	
因素主次	D > B > C > A				
最优方案	$A_2B_2C_2D_1$				

表 4　正交试验各因素的方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	P
果胶酶	0.026	2	1.000	19.000	>0.05
纤维素酶	1.267	2	48.731	19.000	<0.05
木瓜蛋白酶	0.944	2	36.308	19.000	<0.05
半纤维素酶	3.792	2	145.846	19.000	<0.05
误差	0.03	2			

表 5　验证性试验结果

试验组	多糖得率/%	RSD/%
1	5.30	
2	5.26	0.76
3	5.34	

3.2　正交设计玄参多糖提取条件

3.2.1　料液比对复合酶法提取玄参多糖的影响　实验发现,随料液比的增加,玄参多糖提取率逐渐增大,当料液比达到 1∶20(g/ml)时多糖的提取得率达到最大值,之后出现了下降趋势。这可能是因为随着料液比的增多,反应体系中的水分增加,从而降低了反应底物的浓度,酶与底物充分接触,使得玄参多糖的提取得率逐渐增大,但随着反应体系中水分的增加,酶的浓度也相应下降,因而多糖得率出现了下降的趋势,因此料液比为 1∶20 g/ml 为玄参多糖提取的最佳比值。见图 6。

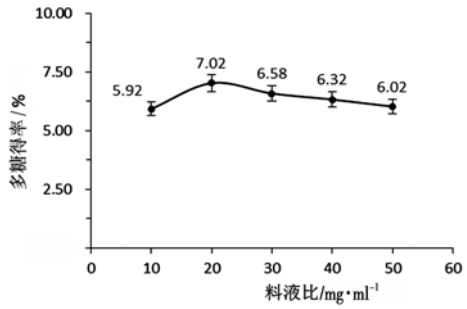

图 6　料液比对复合酶提取玄参多糖的影响

3.2.2　溶剂 PH 对复合酶提取玄参多糖的影响　适宜的 pH 值可以维持了酶活性中心的最佳构象,促进酶与底物结合。同时 pH 值还会影响酶的催化速度,pH 值的不同,使得酶与底物的亲和力不同,催化速度也就不同[12]。实验过程中随着 pH 值的升高,多糖的提取得率逐渐增大,而当提取的多糖达到溶解平衡和酶的催化速度开始减弱时,多糖的提取得率又出现为下降趋势。见图 7。

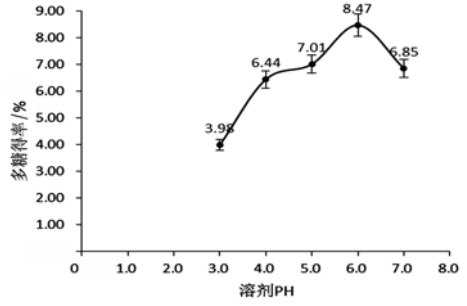

图 7　溶剂 PH 对复合酶提取玄参多糖的影响

3.2.3　酶解时间对复合酶提取玄参多糖的影响　本实验发现酶解时间与多糖得率有密切关系。酶解时间太短,则酶解不充分,当溶解达到平衡时,即使延长酶促反应时间也不能显著增加多糖提取得率。实验过程中随着提取时间的延长,多糖的提取率呈上升趋势,在 60 min 左右提取得率达到较高值,随后再延长提取时间,提取率反而有下降的趋势,这可能是因为提取时间过长能而导致了其他物质溶出过多而导致多糖得率下降。见图 8。

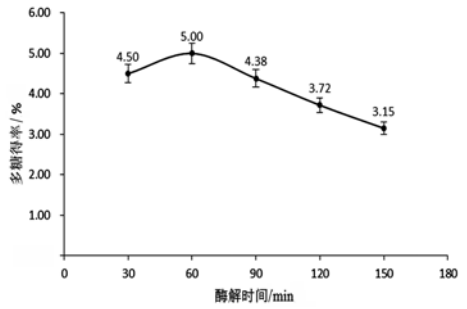

图 8　酶解时间对复合酶提取玄参多糖的影响

3.2.4　温度对复合酶提取玄参多糖的影响　酶解时的温度对酶活性有较大影响,而且对溶解度和植物组织细胞都有影响[12]。实验发现随着酶解温度的升高,玄参多糖的提取得率逐渐增大,当组织细胞内外浓度达到平衡和提取的多糖达到溶解平衡后,多糖的提取得率开始出现下降的趋势,同时温度升高,酶活力减弱,也使得多糖提取得率下降。见图 9。

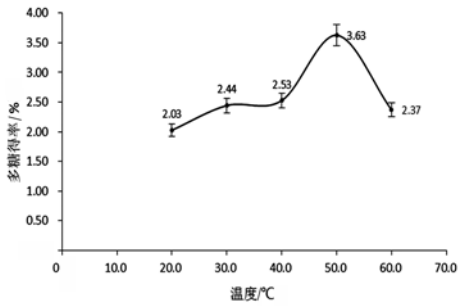

图 9　温度对复合酶提取玄参多糖的影响

3.2.5　复合酶最佳酶解条件下的提取工艺对玄参多糖得率的影响　由实验可知,单因素试验中各因素对提取效果的影响次序依次为 A > C > B > D,并由此得出最优组合为 $A_3B_3C_2D_1$,即料液比为 1∶30 g/ml、pH 值为 7.0、提取时间 60 min、提取温度为 40 ℃,具体结果见表 6。料液比、酶解时间对玄参多糖提取率的影响具有较显著差异($P < 0.01$),溶

剂 pH 对玄参多糖提取影响显著($P<0.05$),而酶解温度对玄参多糖提取无显著影响($P>0.05$),结果如表 7 所示。以此正交试验得出的最佳工艺参数,取同一批次样品进行 3 验证性实验,提取率为 8.98%,高于正交实验的任何一组数据,这表明优化得到的复合酶最佳酶解条件下提取工艺稳定可靠。见表 8。

表 6　复合酶酶解条件下的提取工艺对玄参多糖得率的影响

序号	因素				多糖得率/%
	A 料液比/g·ml^{-1}	B 溶剂 pH	C 酶解时间/min	D 温度/℃	
1	1∶10	5.0	30	40.0	6.63
2	1∶10	6.0	60	50.0	7.05
3	1∶10	7.0	90	60.0	6.63
4	1∶20	5.0	60	60.0	7.75
5	1∶20	6.0	90	40.0	7.45
6	1∶20	7.0	30	50.0	7.81
7	1∶30	5.0	90	50.0	8.03
8	1∶30	6.0	30	60.0	8.56
9	1∶30	7.0	60	40.0	8.95
K_1	6.770	7.470	7.667	7.677	
K_2	7.670	7.687	7.917	7.630	
K_3	8.513	7.797	7.370	7.647	
R	1.743	0.327	0.547	0.047	
因素主次	A > C > B > D				
最优方案	$A_3B_3C_2D_1$				

表 7　正交试验各因素的方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	P
料液比/g·ml^{-1}	4.560	2	1520.000	19.000	<0.05
溶剂 pH	0.166	2	55.333	19.000	<0.05
酶解时间/min	0.449	2	149.667	19.000	<0.05
温度/℃	0.003	2	1.000	19.000	>0.05
误差	0.00	2			

表 8　验证性试验结果

试验组	多糖得率/%	RSD/%
1	8.94	
2	8.96	0.5265
3	9.03	

3.3　抗氧化活性测定

实验发现,玄参多糖含量在 0.50 ~ 2.50 mg/ml 时,DPPH 的清除率与多糖含量有良好的线性关系,且随着多糖含量的增加,DPPH 清除率逐渐增加,由此可知玄参多糖具有一定的抗氧化能力。以 DPPH 的清除率对多糖含量 x 进行线性回归,得到回归方程为 $y = 14.492x + 38.502$, $R^2 = 0.97787$。见图 10。

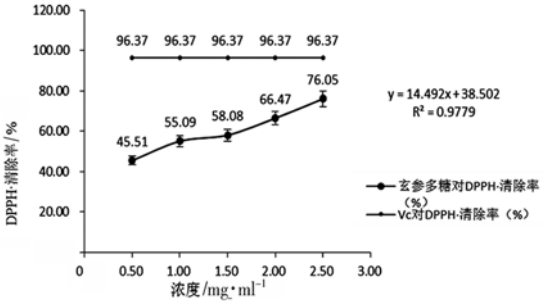

图 10　不同浓度的多糖对 DPPH 的清除率

4　结论

多糖是由糖苷键结合而成的一类大分子生命活性物质,不同的多糖的组成及含量对与多糖的活性影响较大[13]。采用单因素和正交实验相结合的方法,确定影响中药活性物质的提取条件,在某种程度上大大优化提取工艺[14]。本文根据单因素试验,得出复合酶的最佳配比;并在该最佳配比下,可以优化了玄参多糖的最佳提取工艺条件,即复合酶用量分别为果胶酶 1.50%、纤维素酶 1.20%、木瓜蛋白酶 0.90%、半纤维素酶 0.09%;在该配比下,最佳提取方案为:料液比 1∶30 g/ml、pH7.0、提取时间 60 min、温度 40 ℃。在此条件下,玄参多糖提取率高达 8.98%,较常规方法有大幅度提高(普通水提的方法多糖得率为 4.3%)。

通过体外抗氧化实验发现,玄参多糖对 DPPH·具有较强的清除作用,并与浓度呈一定量效关系。上述实验结果可靠,为今后的工业化生产和进一步研究玄参多糖提供了参考与理论依据。

参考文献:

[1] 胡瑛瑛,黄真. 玄参的化学成分及药理作用研究进展[J]. 浙江中医药大学学报,2008,32(2):268-270. DOI:10.3969/j.issn.1005-5509.2008.02.076.

[2] 王谢忠. 蓖麻多糖免疫药理作用的研究[D]. 兰州:甘肃农业大学,2006.

[3] 唐洁. 植物多糖生物活性功能的研究进展[J]. 食品研究与开发,2006,27(5):130-132. DOI:10.3969/j.issn.1005-6521.2006.05.051.

[4] 李义,李红霞,陈星,等. 山药水溶性粗多糖提取工艺的研究[J]. 饲料工业,2005,26(16):45-47. DOI:10.3969/j.issn.1001-991X.2005.16.012.

[5] 范三红,李静,王亚云,等. 超声波辅助复合酶提取菊糖工艺优化[J]. 食品科学,2015,36(4):23-28. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201504005.

[6] Amutha Gnana Arasi MA, Gopal Rao M, Bagyalakshmi

J. Optimization of microwave-assisted extraction of polysaccharide from Psidium guajava L. fruits[J]. Int J Biol Macromol, 2016, 91: 227-232. DOI: 10. 1016/j. ijbiomac. 2016. 05. 039.

[7] Zhang J, Jia S, Liu Y, et al. Optimization of enzyme-assisted extraction of the Lycium barbarum polysaccharides using response surface methodology[J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 86(2): 1089-1092. DOI: 10. 1016/j. carbpol. 2011. 06. 027.

[8] You Q, Yin X, Zhao Y. Enzyme assisted extraction of polysaccharides from the fruit of Cornus officinalis[J]. Carbohydr Polym, 2013, 98(1): 607-610. DOI: 10. 1016/j. carbpol. 2013. 06. 036.

[9] 董丽辉,范三微,凌庆枝,等. 酶法提取亮菌多糖的研究[J]. 中国酿造,2012,31(4):51-54. DOI:10. 3969/j. issn. 0254-5071. 2012. 04. 014.

[10] 王秋霜,应铁进,陈栋,等. 豆腐皮废甜浆中大豆低聚糖的树脂脱色研究[J]. 食品科学,2010,31(13): 105-109.

[11] Jocelyn K. C. Rose. Annual Plant Reviews, The Plant Cell Wall[M]. UK. USA. Canada: Wiley-Blackwell Publishing. CRC Press. 2003:266-289.

[12] 王镜岩,朱圣庚,徐长法. 生物化学教程[M]. 北京: 高等教育出版社,2008:1-718.

[13] 王媛媛,张晖,杨俊松,等. 柱前衍生化高效液相色谱法分析9种多糖中的单糖组成[J]. 济宁医学院学报,2016,39(4):241-244. DOI:10. 3969/j. issn. 1000-9760. 2016. 04. 004.

[14] 聂其婷,徐曼,吴昊,等. 正交试验法优选泽兰迷迭香酸超声提取工艺[J]. 济宁医学院学报,2016,39(1): 73-76. DOI:10. 3969/j. issn. 1000-9760. 2016. 01. 017.

(收稿日期 2016-10-09)

(上接第 425 页)

[24] El-Hag-Aly MA, Nashy MR. Double edge closure: a novel technique for reducing post-thoracotomy pain. A randomized control study[J]. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2015, 21(5): 630-635. DOI: 10. 1093/icvts/ivv218.

[25] 蒋毅,叶怀华,赵宏,等. 肋骨骨膜内缝合关胸术和普迪思线在开胸手术中的应用[J]. 广东医学,2015,36(1):104-105.

[26] 马敏杰,胡文滕,蔡谦谦,等. 不关肋间的改良关胸方法在开胸手术中的应用[J]. 现代肿瘤医学,2016,24(13): 2045-2047. DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-4992. 2016. 13. 010.

[27] El-Hag-Aly MA. eReply re: eComment. Double edge closure for reducing post-thoracotomy pain: is it the best[J]. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2015, 21(5): 635-636. DOI:10. 1093/icvts/ivv283.

[28] Ibrahim M, Menna C, Andreetti C, et al. Does a Multimodal No-Compression Suture Technique of the Intercostal Space Reduce Chronic Postthoracotomy Pain A Prospective Randomized Study[J]. Journal of Thoracic Oncology, 2016, 11(9): 1460-1468. DOI: 10. 1016/j. jtho. 2016. 05. 023.

[29] 苏畅,董天剑,赵琦,等. 改进肋骨牵开方法对开胸手术后疼痛的影响[J]. 临床误诊误治,2015,28(5): 97-99. DOI:10. 3969/j. issn. 1002-3429. 2015. 05. 032.

[30] JiangY, ZhaoH, SongJD, et al. Efficacy and safety analysis of modified intercostal nerves protection technique in the application of esophageal cancer surgery[J]. Int J Clin Exp Med, 2016, 9(7):14734-14738.

[31] Kejriwal NK, Newman MA. Use of a single silastic chest drain following thoracotomy: initial evaluation[J]. ANZ J Surg, 2005, 75(8): 710-712. DOI: 10. 1111/j. 1445-2197. 2005. 03479. x.

[32] Tanaka M, Sagawa M, Usuda K, et al. Postoperative drainage with one chest tube is appropriate for pulmonary lobectomy: a randomized trial[J]. Tohoku J Exp Med, 2014, 232(1): 55-61. DOI: 10. 1620/tjem. 232. 55.

[33] Wildgaard K, Ringsted TK, Ravn J, et al. Late sensory changes following chest drain insertion during thoracotomy[J]. Acta Anaesthesiol Scand, 2013, 57(6): 776-783. DOI:10. 1111/aas. 12077.

[34] Okur E, Baysungur V, Tezel C, et al. Comparison of the single or double chest tube applications after pulmonary lobectomies[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2009, 35(1): 32-35. DOI:10. 1016/j. ejcts. 2008. 09. 009.

[35] 姜竹,赵松,李向楠,等. 胸外科术后胸腔引流管拔除对胸痛的影响[J]. 中国老年学杂志,2013,33(20): 5186-5187. DOI:10. 3969/j. issn. 1005-9202. 2013. 20. 130.

[36] 师恒伟,余德旺,袁培云,等. 经胸手术改良放置胸腔引流管 150 例分析[J]. 中国实用医刊,2008,35(11): 93-94. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1674-4756. 2008. 11. 063.

[37] Ng CS, Lau KK, Gonzalez-Rivas D, et al. Evolution in surgical approach and techniques for lung cancer[J]. Thorax, 2013, 68(7): 681. DOI: 10. 1136/thoraxjnl-2012-203157.

(收稿日期 2016-09-09)