

## 白及多糖的提取、纯化技术及结构表征研究进展

唐秀胜<sup>1,2</sup>, 方榕泽<sup>3</sup>, 吴红梅<sup>3</sup>, 高源<sup>4</sup>, 陈秀敏<sup>1</sup>, 陈华国<sup>\*5</sup>

(1. 贵州中医药大学第一附属医院, 贵州 贵阳 550000; 2. 遵义市中医院, 贵州 遵义 563000;  
3. 贵州中医药大学药学院, 贵州 贵阳 550025; 4. 贵州省食品检验检测院, 贵州 贵阳 550001;  
5. 贵州师范大学贵州省山地环境信息系统与生态环境保护重点实验室, 贵州 贵阳 550001)

**摘要:** 中药白及 *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb.f. 是临床上常用的中药材之一, 广泛用于各种出血、疮痍肿毒、皮肤皲裂等, 具有很高的药用价值, 白及多糖是中药白及的主要有效成分。大量研究发现, 白及多糖具有止血、抗炎、抗氧化、黏膜保护和抗肿瘤等多种药理活性。同时, 白及多糖还具备优良的生物相容性、生物可降解性、生物粘附性等特性, 在生物材料及工业领域被广泛应用。近年来, 白及多糖的提取、分离、纯化及结构表征相关研究文献较多。然而, 各提取工艺及纯化方法对白及多糖的提取率和结构特征差异较大。综述了白及多糖的提取方法、纯化方法和结构特征研究进展, 以期对白及多糖的进一步研究和开发提供帮助。

**关键词:** 白及; 多糖; 提取; 纯化; 结构特征; 技术

**中图分类号:** R284.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-3283(2024)09-0041-12

**DOI:** 10.13822/j.cnki.hxsj.2024.0187

**Advances in Extraction, Purification Techniques and Structural Characterization of *Bletilla striata* Polysaccharides** TANG

Xiu-sheng<sup>1,2</sup>, FANG Rong-ze<sup>3</sup>, WU Hong-mei<sup>3</sup>, GAO Yuan<sup>4</sup>, CHEN Xiu-min<sup>1</sup>, CHEN Hua-guo<sup>\*5</sup> (1. The First Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550000, China; 2. Zunyi Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zunyi 563000, China; 3. School of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China; 4. Guizhou Provincial Institute of Food Inspection and Testing, Guiyang 550001, China; 5. Key Laboratory for Information System of Mountainous Areas and Protection of Ecological Environment, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China)

**Abstract:** *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb.f., a traditional Chinese medicinal herb, has been widely used in clinical practice for treating a variety of conditions, including hemorrhages, ulcers, carbuncles, toxic swellings, and skin fissures, showing significantly medicinal value. *Bletilla striata* polysaccharides are recognized as the herb's main active components. Extensive research has revealed that *Bletilla striata* polysaccharides exhibit a range of pharmacological activities, such as hemostasis, anti-inflammation, antioxidant properties, mucosal protection, and anti-tumor effects. Furthermore, *Bletilla striata* polysaccharides possess excellent biocompatibility, biodegradability, and bioadhesive properties, leading to their widespread application in the fields of biomaterials and industry. In recent years, there has been a considerable amount of research literature on the extraction, separation, purification, and structural characterization of *Bletilla striata* polysaccharides. However, the extraction processes and purification methods vary significantly in terms of the extraction yield and structural characteristics of *Bletilla striata* polysaccharides. The advancements in extraction methods, purification techniques, and structural characterization studies of *Bletilla striata* polysaccharides was summarized, aiming to provide assistance for further research and development.

**Key words:** *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb.f.; polysaccharides; extraction; purification; structure characteristic; technology

白及属 *Bletilla* Rechb.f. 植物系兰科多年生宿根草本植物, 全世界约有 6 种, 在朝鲜半岛和日本均有分布, 我国产 4 种, 分布于长江流域及各省, 药用资源丰富<sup>[1]</sup>, 包括小白及 *Bletilla formosana*

(Hayata) Schltr.、黄花白及 *Bletilla ochracea* Schltr.、华白及 *Bletilla sinensis* (Rolfe) Schltr. 及白及 *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb.f.。其中白及为《中国药典》(2020 版一部) 收载品种, 具有收敛

收稿日期: 2024-03-21; 网络首发日期: 2024-06-27

基金项目: 贵州省科技计划项目(黔科合支撑[2020]4Y075 号); 遵义市科技计划项目(遵市科合 HZ 字[2022]433 号)。

作者简介: 唐秀胜(1991-), 男, 土家族, 贵州遵义人, 硕士, 主管中药师, 主要研究方向为中药及民族药质量控制研究。

通讯作者: 陈华国, E-mail: 445068127@qq.com。

引用本文: 唐秀胜, 方榕泽, 吴红梅, 等. 白及多糖的提取、纯化技术及结构表征研究进展[J]. 化学试剂, 2024, 46(9): 41-52。

止血、消肿生肌功效,临床上广泛用于各种出血、疮痈肿毒、皮肤皲裂等<sup>[2]</sup>,白及植物及药材见图 1。白及多糖(*Bletilla striata* polysaccharide, BSP)是中药白及中主要有效成分。现代研究表明, BSP 具有止血、抗肿瘤、抗炎、抗氧化、黏膜保护和免疫调节等多种药理作用<sup>[3-6]</sup>,同时在生物材料及医药领域被广泛应用<sup>[7,8]</sup>。由于 BSP 具备优良的生物相容性、生物可降解性、结构易修饰性以及生物粘附性等特性,这使得其应用范围不断被拓展和深入,市场需求量不断上升。然而多数研究者只关注 BSP 的药理作用及临床应用, BSP 的提取、分离、纯化及结构表征等研究还相对甚少,

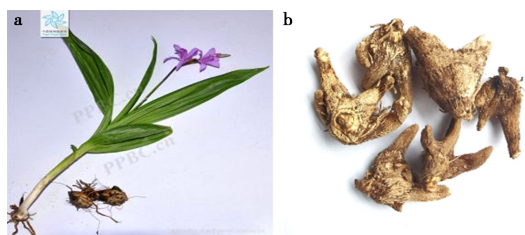


图 1 白及植物(a)和白及药材(b)

Fig.1 *Bletilla striata* plant (a) and *Bletilla striata* rhizome (b)

表 1 BSP 提取方法的优缺点

Tab.1 Advantages and disadvantages of extraction methods for BSP

| 序号 | 提取方法 | 优点                  | 缺点                    | 改进措施                    |
|----|------|---------------------|-----------------------|-------------------------|
| 1  | SE   | 设备简便、操作便捷;投资低、污染少   | 提取时间较长,料液比较大,提取温度较高   | 辅助超声、微波、酶等方式            |
| 2  | UAE  | 提取时间短,非热效应,溶剂消耗低    | 超声功率需要精确控制,环境噪音大      | 优化提取参数、优化超声提取设备         |
| 3  | MAE  | 提取时间短、加热速度快、提取效率高   | 多糖结构可能改变,温度控制困难、设备成本高 | 优化提取参数,温度监控,选择合适的微波提取设备 |
| 4  | IAE  | 提取温度低,可有效避免热敏感成分的破坏 | 设备要求高,或需要自己组装,操作不方便   | 优化提取设备                  |
| 5  | AE   | 操作过程便捷,设备要求简单       | 强碱环境可能导致多糖分子中的糖苷键断裂   | 辅助超声、微波、酶等方式            |
| 6  | EAE  | 条件温和、效率高、选择性好、无毒环保  | 酶成本高、酶活性受限制、酶的稳定性差    | 优化酶的选择,控制提取条件,酶的预处理     |
| 7  | CE   | 提取优势互补,提取效率高        | 设备成本高、操作繁琐            | 优化提取参数,改进设备             |

### 1.1 溶剂提取

SE 技术主要是以水为溶剂提取 BSP,其中采用浸渍、水煎煮、回流提取和连续提取较为常见, SE 技术在实验室中被广泛使用,主要由于其设备需求简便,操作过程便捷,以及显著的成本效益。此外, SE 技术还具有投资低、污染少和快速见成效的优点。由于 BSP 是一种水溶性多糖,在实验室及工业生产中主要采用水提醇沉的方式进行提取和初步纯化,采用均匀设计法,试验考察因素可选择多糖提取的料液比、提取时间、提取温度、提取次数等。罗玲丽等<sup>[15]</sup>以不同料液比、提取温度

一定程度上限制了 BSP 的开发和应用。本文通过综述国内外近 10 年文献,以传统提取技术对比新型提取技术视角首先对 BSP 的提取进行归纳与总结,并分析各提取方法的优缺点,其次总结各提取方法、纯化方法及结构特征解析的特点,最后对 BSP 的提取、分离及结构表征的进一步研究提出展望。

## 1 BSP 的提取技术

不同的提取技术会影响 BSP 的得率,分子量和化学结构,选择合适的提取方式尤为重要<sup>[9]</sup>。当前 BSP 的提取方法主要有溶剂提取 (Solvent Extraction, SE)、超声辅助提取 (Ultrasonic-Assisted Extraction, UAE)、微波辅助提取 (Microwave-Assisted Extraction, MAE)、红外辅助提取法 (Infrared-Assisted Extraction, IAE)<sup>[10]</sup>,此外还有碱提取 (Alkaline Extraction, AE)<sup>[11]</sup>、酶提取 (Enzyme-Assisted Extraction, EAE)<sup>[12]</sup>以及协同提取 (Collaborative Extraction, CE)<sup>[13,14]</sup>,各提取方法的优缺点比较见表 1。

和提取时间作为考察条件,采用水提醇沉法提取 BSP,当料液比为 1:35 (g/mL),提取温度 80 ℃,提取时间 4 h,此时 BSP 得率为 25.97%,得到 BSP 最佳提取工艺。董建新等<sup>[16]</sup>采用 BBD (Box-Behnken Design) 响应面法,分别对回流提取工艺和醇沉工艺进行优化,最终得出在提取时间为 3 h,提取温度为 100 ℃,料液比例为 1:34 (g/mL);在乙醇浓度为 85%,醇胶比例 8:1 (g/g),醇沉时间 6 h, BSP 的提取率为 26.44%,此时回流提取工艺为最佳。总结分析发现, SE 技术存在提取时间较长、料液比较大、提取温度较高等缺点。但 SE 技

术操作简单、成本低,适于大规模生产。然而利用 BSP 易溶于水的特性,采用 SE 技术结合 UAE、MAE、EAE 等新技术提取 BSP 是当前研究的主流。

## 1.2 超声辅助提取

UAE 技术主要是基于空化、热力和机械效应,用于高效且迅速地从中药材中分离出有效成分。这种方法在提取 BSP 时表现出高效、快速、温和的显著优势,这有助于保持多糖的生物活性和结构的完整性。同时,UAE 技术还能减少溶剂消耗,降低生产成本。通过调整超声波的频率、功率和提取时间等关键参数,可以精确调控提取过程,从而优化多糖的提取效率和纯度。吴诗惠等<sup>[17]</sup>优化 BSP 超声波提取工艺,当料液比 1:25 (g/mL)、超声温度 80 ℃、超声时间 10 min,各产地药材中 BSP 的含量最高为 60.81%,此时 BSP 提取效果最佳。何晓梅<sup>[18]</sup>采用单因素试验和正交试验提取 BSP,最终确定最优提取条件为:超声时间 50 min,超声温度 60 ℃,超声功率 400 W,料液比 1:50 (g/mL),提取 2 次,BSP 得率为 (26.023±0.076)%。韩丹等<sup>[19]</sup>以多糖含量为指标,采用水提法、碱水提法、纤维素酶解法、超声波法进行提取;采用分光光度法测定多糖含量,得到以超声提取 BSP 含量最高,并以正交设计优化超声提取条件,当料液比为 1:20 (g/mL),提取温度 80 ℃,提取时间 10 min,此时 BSP 提取率为 49.90%。综上可知,采用 UAE 技术提取 BSP,提取时间较短、提取温度较低、料液比更小,该技术提取 BSP 具有显著优势,但也存在声波的频率、功率、时间等参数需要精确控制、有环境噪音等缺点。通过不断的技术改进和参数优化,可以进一步提高 UAE 技术在 BSP 提取中的应用效果。

## 1.3 微波辅助提取

MAE 技术主要利用微波的穿透性、体加热、选择性加热和加速传质等特点,实现对中药有效成分的快速、高效、选择性提取。微波加热可以导致细胞内部压力增加,超过细胞壁的承受能力,从而导致细胞壁破裂,这有助于释放细胞内的活性成分,使其更容易被溶剂提取,一定程度上能增加中药有效成分的提取率。MAE 技术提取 BSP 可以对微波功率 (W)、料液比 (g/mL)、微波时间 (S) 等常见参数进行考察和优化。宋志姣等<sup>[20]</sup>以粗多糖提取率为指标,在单因素实验的基础上进行正交试验,探讨微波额定功率百分比、浸提温度、微波时间、浸提时间对粗多糖提取率的影响,

当微波额定功率>40%时,多糖得率显著下降,这可能是由于微波不断增强,部分多糖结构破坏,同时杂质溶出增多导致。另外,有研究者继续采用响应曲面优化微波时间、微波功率、液料比 3 个因素对 BSP 提取的影响,确定微波辅助提取最佳工艺,可以提取出约 95% 的 BSP<sup>[21]</sup>。杨晓杰等<sup>[22]</sup>以 BSP 提取率为考察指标,采用正交试验优化提取工艺,对比微波辅助提取与传统水提取 BSP 得率,试验得出微波辅助提取率明显高于传统水提。总结分析发现,采用 MAE 技术提取 BSP 具有方便快捷、提取时间短、效率高等优点。但存在局部受热明显,可能导致多糖结构变化或降解,大型微波提取设备昂贵等问题需要进一步优化。

## 1.4 红外辅助提取

IAE 提取技术是利用红外波长介于 0.76 ~ 1 000 μm 之间,频率范围介于  $4 \times 10^{14} \sim 3 \times 10^{11}$  Hz 之间的特性,通过吸收电磁波从而使物料内能增加,提高多糖提取效率<sup>[23]</sup>。在中药有效成分的提取过程中,红外是很好的加热源,还是理想的分子振动器,具有高渗透性,且在操作上安全。李春雪<sup>[24]</sup>和 Qu 等<sup>[25]</sup>采用 IAE 技术提取 BSP,通过 Box-behken 响应面法对温度、时间、料液比进行优化,得到最佳提取工艺为:提取温度 75 ℃,提取时间 2.5 h,液料比 1:53 (g/mL),BSP 的平均提取率为 (43.95±0.26)%。IAE 技术提取 BSP 具有提取温度低,可以有效避免多糖结构的破坏,更好地保留多糖的生物活性。但由于受提取设备及其他因素的限制,当前用于 BSP 的提取研究较少,红外光谱通常用于多糖中单糖组成种类和浓度定性分析。

## 1.5 碱提取

多糖是由多个单糖通过糖苷键连接而成的大分子化合物。在提取过程中,碱性溶液可以破坏植物细胞壁的结构,有助于多糖的释放,特别是对于那些含有糖醛酸等酸性基团的多糖,碱性条件有利于这些酸性多糖的浸出,因为碱可以中和酸性基团,减少多糖分子间的相互作用,从而促进多糖的溶解和提取<sup>[26]</sup>。采用 0.2 mol/L 的 NaOH 碱性溶液提取多糖 (BSPS),在 95 ℃ 下提取 4 h,重复提取 3 次,通过乙醇沉淀,除蛋白及小分子杂质,BSPS 提取率为 62.5%<sup>[11]</sup>。然而,强碱性条件可导致多糖分子中的糖苷键断裂<sup>[27]</sup>,以及 BSP 本身黏度较大在碱性环境中黏性会进一步增加<sup>[28]</sup>。因此,在实际应用中采用碱提法提取 BSP 的研究



比较少。在提取多糖时需要权衡提取效率和多糖结构完整性之间的关系,以及多糖自身的特性选择最合适的提取方法。

### 1.6 酶提取

中药中的有效成分通常被植物细胞壁包裹,细胞壁主要由纤维素、半纤维素、果胶质和木质素等构成,EAE 技术是利用特定的生物酶(如纤维素酶、半纤维素酶、果胶酶等)分解这些结构,从而破坏细胞壁,使得有效成分更容易释放到提取介质中<sup>[29]</sup>。同时,生物酶作为高效催化剂,能作用于植物细胞,增加细胞通透性,促进胞内物质渗漏。相关研究表明,酶辅助可以提高多糖的提取效率和生物活性<sup>[30]</sup>。有研究指出,酶法提取物中的化学成分种类比纯水提取和醇提取丰富,采用纯水、70%乙醇提取为对照,酸性蛋白酶、果胶酶、纤维素酶对白及块茎进行相继酶解,通过 HPLC 分析各提取物的成分,得出酶法提取化学成分种类更多,提取效率更高<sup>[31]</sup>。酶提取植物多糖是一种新兴的提取方法,其中酶的添加量、酶解温度、酶解时间、环境的 pH 值对提取率影响极大。朱富成等<sup>[32]</sup>采用果胶酶辅助法提取 BSP,通过响应面分析法优化提取工艺,分别考察酶解时间、酶解温度、酶添加量对 BSP 提取率的影响,在最优条件下,BSP 提取率达到 64.8%。周美等<sup>[33]</sup>利用响应面法优化酶添加量、酶解温度、pH 值、酶解时间提取 BSP,试验得出 BSP 提取率预测值为 58.32%。有学者采用 2% 纤维素酶和 1.5% 木瓜蛋白酶组成复合酶提取 BSP,此时 BSP 得率为  $(24.57 \pm 0.56)\%$ <sup>[34]</sup>。在酶法提取中酶的添加方式也会影响多糖的提取率,魏玉等<sup>[35]</sup>通过正交试验优化提取工艺,以纤维素酶、果胶酶、木瓜蛋白酶采用分步加酶法对比水提、碱水提、超声提以及同步加酶法提取 BSP,试验发现分步加酶法提取率最高,其次为同步加酶法。综上所述,采用 EAE 技术提取 BSP 表现出高效性、工艺参数的可优化性、提取条件的多样性,提取率得到显著提高。分步加酶法通过将几种酶在适宜的条件下分步配合使用,提取效率较同步复合酶提取、水提、碱提取高。然而,酶反应时间、酶解温度、酶解 pH 值、底物的浓度等提取条件对 BSP 的提取率影响较大,如何控制以上提取参数用于规模化提取,需要进一步研究。

### 1.7 协同提取

CE 技术通常是指将两种或多种提取技术结

合起来,利用各自的优势,通过相互作用提高中药有效成分的提取效率,协同提取过程中,可以通过优化提取条件(如温度、pH、时间、酶浓度等)来提高提取率,同时减少对热敏感成分的破坏。当前 CE 技术被广泛用于水芹菜多糖、艾叶多糖、铁皮石斛多糖等的提取<sup>[36-38]</sup>。文献报道,单独超声波提取法和单独微波提取法提取多糖的得率仅为超声-微波协同提取法的 46.28% 和 87.96%<sup>[39]</sup>。采用超声-闪式提取 BSP 为常规回流提取的 1.7 倍<sup>[40]</sup>。韩伟等<sup>[41]</sup>采用表面活性剂协同微波法对 BSP 进行提取,在此工艺条件下,BSP 的得率为  $(32.48 \pm 0.18)\%$ 。综上所述,CE 技术较传统工艺在提取率上有较大提升,与采用单一提取方法比较提取效率提升明显,CE 技术虽操作相对复杂,但提取效率高,可实现各提取方法优势互补,具有一定的开发研究前景。

## 2 BSP 的纯化技术

多糖(Polysaccharides)又称多聚糖,由 10 个以上的单糖分子通过糖苷键聚合而成,其相对分子质量较大,多糖是一类大分子化合物并广泛存在于植物中<sup>[42]</sup>。多糖类化合物在提取分离过程中存在较多杂质,例如蛋白质、油脂及色素等,在临床应用及工业生产中常需要进一步分离纯化,通过纯化过程,可以获得具有特定疗效的均一多糖,便于质量控制和标准化,旨在提高其生物活性。BSP 的纯化过程首先是除去杂质,其次是进一步分离纯化获得均一多糖,BSP 的提取、纯化流程图见图 2。

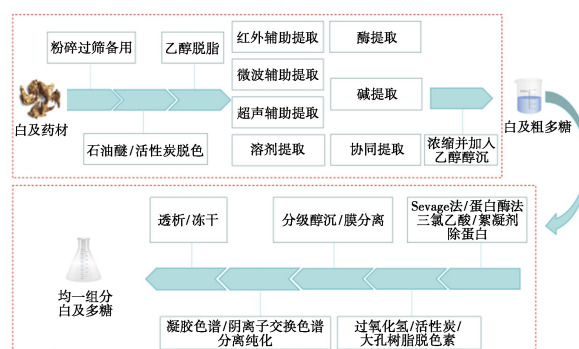


图 2 BSP 提取、纯化流程图

Fig.2 Technical roadmap for the extraction and purification of BSP

### 2.1 除蛋白质

在除蛋白过程中,由于蛋白质的分子量大、结构复杂,在除去蛋白质的过程中如何避免多糖的

损失是当前研究的热点。BSP 中除蛋白的方法常用 Seville 法、蛋白酶法、三氯乙酸法、絮凝剂法等方法去除<sup>[13,42]</sup>。Seville 法在 BSP 中除蛋白使用最广泛,该方法具有操作简便,可以快速地进行蛋白质的沉淀和分离,不需要特殊的设备,只需要常见的实验室试剂和离心机即可进行。关丽等<sup>[43]</sup>采用响应面法研究 BSP 除蛋白工艺,当脱蛋白次数为 5 次,Seville 试剂为 10 mL,振荡时间 6 min 时,BSP 的保留率为 30.61%,所得 BSP 具有典型的糖类特征吸收峰,电镜结果显示结构致密,分子间的交联作用强。然而,Seville 法中氯仿是一种有毒的有机溶剂,同时在去除蛋白质的过程中,可能会有部分多糖与蛋白质一同沉淀,导致多糖损失。研究发现通过植物蛋白酶除蛋白效果明显,雷燕妮等<sup>[44]</sup>通过调整提取液浓度为 0.004 mg/mL,加入 3%(w/v) 植物蛋白酶,于 45 °C 下搅拌酶解 3 h,该法除去蛋白的效果优于 Seville 法,该方法除蛋白条件温和,可以减少对多糖结构和功能的破坏。同时有研究者建议酶-Seville 法联用除蛋白,可以得到较好品质的多糖组分<sup>[20]</sup>。有研究者发现絮凝剂也可以除去植物蛋白,采用絮凝剂 ZTC-II 对白及粗多糖进行纯化,絮凝温度为 48 °C,絮凝剂 ZTC-II 组分 B 用量为 0.77 mL/g,组分 A 和 B 用量比为 0.34:1,絮凝时间为 1.5 h,浓缩比为 1:12 (g/mL),在此条件下脱蛋白率为 (51.43±0.12)%<sup>[45]</sup>。有研究结果表明,采用三氯乙酸法除去 BSP 中的蛋白,多糖的损失率为 0.015%,脱蛋白率为 75.86%<sup>[46]</sup>,但该方法对多糖降解的程度以及对多糖活性及结构等的影响尚不清楚。对比研究发现,Seville 法是一种对 BSP 结构及活性保留较好的除蛋白方法。陈浩莹等<sup>[47]</sup>分别考察三氯乙酸(TCA)法、TCA+正丁醇法、大孔树脂 AB-8 吸附法、木瓜蛋白酶法、Seville 法和三相分离法对碱提白及粗多糖(BSP-A)中蛋白的脱除效果,该项研究发现,Seville 法、木瓜蛋白酶法和三相分离法对碱提 BSP-A 的回收率达到 84% 及以上,脱蛋白方法反应相对温和,BSP-A 损失较低,但蛋白脱除率较低;TCA+正丁醇法对 BSP-A 中蛋白脱除率高达 90.31%,然而对 BSP-A 回收率低,该方法还改变了单糖组成、Zeta 电位和抗氧化活性。木瓜蛋白酶法和 Seville 法则能较好地保留 BSP 的抗氧化活性。相对来说,Seville 法是一种对 BSP 结构和活性保留较好的脱蛋白方法。

## 2.2 脱色素

多糖在提取纯化过程中有大量的色素存在,

除去色素是一个重要的步骤,有助于提高多糖的纯度。过氧化氢( $H_2O_2$ )是一种常用的氧化剂,在植物多糖的纯化过程中,可用于脱除多糖中的色素。车向前等<sup>[48]</sup>采用  $L_9(3^4)$  正交试验,以  $H_2O_2$  的体积分数、脱色温度、脱色时间、pH 值为试验因素,考核指标为脱色素率和多糖保留率。试验结果表明,在  $H_2O_2$  体积分数为 6%、脱色温度为 50 °C、pH 值为 7、脱色时间为 90 min 条件下,BSP 脱色率为 66.80%,多糖保留率为 68.60%。以  $H_2O_2$  脱色具有速度快,处理样品量大等特点。有研究者探讨活性炭对 BSP 中的植物色素脱除工艺,以活性炭为脱色剂,对活性炭用量、脱色温度、脱色液 pH 值、脱色时间 4 个因素进行考察,设计  $L_9(3^4)$  正交试验,当活性炭用量为 1%,脱色温度为 40 °C,pH 值为 5,脱色时间为 30 min 时,此条件下 BSP 的脱色率为 91.3%,多糖保留率为 80.6%<sup>[49]</sup>,活性炭脱色素具有较高的脱色率,但如何避免脱色后活性炭残留以及提高多糖的保留率是该技术的关键点。树脂是一种多孔性高分子材料,基于其吸附作用的特性常用于去除多糖中的色素。车向前等<sup>[50]</sup>考察 WH706-CLL 树脂对 BSP 提取液的脱色效果,在流速为 1 mL/min,温度为 50 °C,提取液的质量浓度为 1 mg/mL,pH 值为 6,此条件下,WH706-CLL 树脂的脱色率为 93.7%,多糖保留率为 87.3%。总结不难发现,采用大孔树脂去除 BSP 中的色素是一种较好的脱色方法。

## 2.3 分离纯化

为进一步研究 BSP 的单糖组成、平均分子量、糖苷键构型及特征,除去杂质后,还需要进一步分离纯化,获得均一 BSP 组分。BSP 常用的分离纯化方法是分级醇沉法、膜分离法、阴离子交换色谱法及凝胶色谱法。分级醇沉法是一种用于提取和纯化多糖的常用方法。这种方法通过使用不同浓度的乙醇来沉淀多糖,从而实现对多糖的分级和纯化。在分级醇沉中,多糖溶液会按照预定的醇浓度逐步增加,每一步中较高浓度的醇会导致多糖的沉淀,然后通过离心等方法分离出沉淀物,最终得到不同纯度的多糖组分。王自凡<sup>[51]</sup>将水提醇沉得到的白及粗多糖样品加无水乙醇至溶液乙醇体积浓度为 30%~70%,4 °C 静置过夜,收集沉淀得到 3 种多糖组分:BSP-30、BSP-50、BSP-70,3 种分级多糖均为中性多糖。分级醇沉对 BSP 糖苷键类型和多糖的构型没有影响。膜分离

法是一种采用选择性渗透膜作为分离媒介,依靠化学位差或外部能量作为推动力的分离工艺技术,可以实现对多糖的分离纯化。张丽华等<sup>[52]</sup>采用陶瓷膜分离纯化 BSP,当温度为 47 ℃、料液比为 6:1 (mg/mL)、膜压为  $2 \times 10^5$  Pa,此条件下 BSP 的回收率达 78.44%。在实际生产中,膜分离技术要根据多糖的孔径进行分离,具有较强的选择滤过性,同时分离过程中多糖有一定的损失。阴离子交换色谱法是一种利用阴离子交换剂进行分离的色谱技术,在这种方法中,固定相是带有正电荷的离子交换树脂或凝胶,而流动相通常是含有一定浓度的盐类或缓冲液的水溶液。凝胶色谱法是一种根据分子大小或分子量来分离混合物中各组分的色谱技术,在这种方法中,固定相是由多孔凝胶颗粒组成的,而流动相通常是水或含有一定浓度盐的缓冲液,采用色谱法分离纯化 BSP 主要用于分离残存的蛋白质、核酸和其他带电的大分子物质。Zhai 等<sup>[53]</sup>使用热水提取法从白及中提取多糖,并使用 DEAE-52 纤维素柱进行分离,得到 4 个多糖组分(BSP-1~4)。高笛等<sup>[54]</sup>通过响应面法对 BSP 的水提醇沉工艺进行探究,提取粗

多糖继续使用 DEAE-650 柱和 Sepharose-6B 柱进行分离纯化,终得到中性多糖组分 BSP-B。冯正平等<sup>[55]</sup>利用纤维素阴离子琼脂糖凝胶柱层析(DEAE-Sepharose Fast Flow)对白及碱提多糖进行提取、分离和纯化,运用 IR、HPLC、GC-MS 技术分析其成分,得到 5 种分子量不同的 BSPS-I ~ V,其分子量分别为 355.8、174.3、52.8、174、59.9,分离纯化得到单糖组分较为丰富。色谱分离纯化技术在 BSP 实际研究应用中最为广泛。

### 3 BSP 的结构特征分析

研究中药中化学成分的结构表征对于揭示中药的药效物质基础、深化药性理论及推动新药研发等具有关键作用。BSP 是一种从中药白及中提取的水溶性多糖,主要由葡萄糖和甘露糖通过  $\beta$ -糖苷键形成的甘葡聚糖。对于其结构表征通常包括多糖纯度分析、相对分子质量测定、单糖组成关系分析、糖链结构的分析等。尽管 BSP 的结构解析已取得显著的研究进展,但 BSP 的高级结构及生物活性有待进一步探索,BSP 的结构信息如表 2 所示。

表 2 BSP 化学组成及结构特征<sup>注</sup>

Tab.2 Chemical composition and structural characteristics of BSP

| 多糖名称     | 组成比例                            | 构型及糖苷键                                                                                                                                                                                                                                           | 相对分子量/kDa | 文献   |
|----------|---------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|------|
| BSPS-I   | BSPS-I、III Glc                  |                                                                                                                                                                                                                                                  | 355.8     |      |
| BSPS-II  | BSPS-II; Glc-Man(4.22:1.05)     |                                                                                                                                                                                                                                                  | 174.3     |      |
| BSPS-III | BSPS-IV; Fuc-Xyl-Man-Glc-Gal    | $\alpha$ -糖苷键                                                                                                                                                                                                                                    | 52.8      | [55] |
| BSPS-IV  | (1.59:0.70:0.38:1.22:1.93)      | $\beta$ -糖苷键                                                                                                                                                                                                                                     | 174       |      |
| BSPS-V   | BSPS-V; Rha-Fuc-Xyl-Man-Glc-Gal |                                                                                                                                                                                                                                                  | 59.9      |      |
|          | (1.16:1.93:0.28:0.21:1.17:1.50) |                                                                                                                                                                                                                                                  |           |      |
| BR4      | Glc-Man(3.00:4.80)              | $\beta$ -糖苷键                                                                                                                                                                                                                                     | 99.6      | [56] |
| BSP      | Glc-Man(2.55:7.45)              | —                                                                                                                                                                                                                                                | 170       | [57] |
| —        | Glc-Man(1.00:3.50)              | $\beta$ -糖苷键                                                                                                                                                                                                                                     | 460,390   | [58] |
| pBSP     | Glc-Man(1.00:1.34)              | (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Manp、(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-Glcp 和 (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Manp                                                                                                                                | 327.6     | [59] |
| FBP      | Glc-Man(1.00:2.70)              | $\beta$ -糖苷键                                                                                                                                                                                                                                     | 6.79      | [60] |
| BSP-1    | Glc-Man(1.00:8.00)              | $\beta$ -糖苷键                                                                                                                                                                                                                                     | 472       | [61] |
| BSP      | Glc-Man(2.49:7.51)              | $\rightarrow$ 4)-Manp-(1 $\rightarrow$ 和 $\rightarrow$ 4)-Glcp-(1 $\rightarrow$<br>$\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ [4]- $\alpha$ -D-Manp-(1] <sub>2</sub> $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-2ace-<br>Manp-(1 $\rightarrow$ 链状葡甘聚糖 | 58.46     | [62] |
| BSP-4    | Glc-Man(1.00:1.26)              | $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ [4]- $\beta$ -D-Glcp-                                                                                                                                                     | 23        | [63] |
| BSAP     | Glc-Xyl-Man(2.39:1.00:0.21)     | —                                                                                                                                                                                                                                                | 22.9      | [64] |
| LMW-BSP  | Glc-Man(1.00:1.26)              | $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ [4]- $\beta$ -D-Glcp-(1] <sub>2</sub> $\rightarrow$ 4)-<br>$\beta$ -D-Manp-( $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$                                           | 23        | [65] |
| pFSP     | Glc-Gal-Man(1.00:2.03:3.45)     | (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-Glcp、(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Manp、(1 $\rightarrow$ 3,6)- $\beta$ -D-Manp、<br>(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Galp                                                                                       | 91        | [66] |
| G-BSP    | Glc-Man(1.00:4.80)              | —                                                                                                                                                                                                                                                | 178       | [67] |
| —        | Glc-Man(1.00:6.00)              | $\beta$ -糖苷键                                                                                                                                                                                                                                     | 620       | [68] |



续表

| 多糖名称  | 组成比例                        | 构型及糖苷键                                                                                                                        | 相对分子量/kDa | 文献   |
|-------|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|------|
| BSP   | Glc-Man(1.00:3.50)          | $\beta$ -糖苷键                                                                                                                  | 20        | [69] |
| BSPb  | Glc-Man(3.00:1.00)          | $\alpha$ -糖苷键、 $\beta$ -糖苷键                                                                                                   | 260       | [70] |
| BSPF2 | Man-Glc-Gal(9.40:2.60:1.00) | 主链:(1 $\rightarrow$ 4)-Man 和(1 $\rightarrow$ 4)-Glc<br>侧链:(1 $\rightarrow$ 6)-Gal 和(1 $\rightarrow$ 4)-Man                    | 235       | [71] |
| BSP-1 | BSP-1;Glc-Man(1.00:4.00)    | $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Glcp(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Manp(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Manp(1 $\rightarrow$ 4)- | 83.54     | [72] |
| BSP-2 | BSP-2;Glc-Man(1.00:3.00)    | $\beta$ -D-Manp(1 $\rightarrow$                                                                                               | 12.60     |      |

注:“—”表示未测定;Glc-葡萄糖;Man-甘露糖;Fuc-岩藻糖;Xyl-木糖;Gal-半乳糖;Rha-鼠李糖。

3.1 BSP 的纯度分析

多糖的纯度分析是研究其结构特征的重要环节,当前常用苯酚-硫酸法对多糖样品中总糖含量进行测定,紫外(UV)分析是否有残存的蛋白及核酸等杂质以及采用考马斯亮蓝法对多糖样品中蛋白含量进行测定,元素分析仪分析 N 元素和 H 元素含量,凯氏定氮法测定样品中的氮含量,间羟基联苯法对多糖样品中糖醛酸含量进行测定。研究表明,采取破壁粹碎辅助水提醇沉的方法提取白及粗多糖,通过 Sevag 法除蛋白、反复透析冻干等步骤进行分离纯化,苯酚-硫酸比色法显示其纯度均大于 99%<sup>[73]</sup>。冯正平等<sup>[55]</sup>采用纤维素阴离子琼脂糖凝胶柱层析(DEAE-Sephacrose Fast Flow)以蒸馏水及 0.05、0.1、0.3、0.5 mol/L NaCl 溶液连续洗脱进行纯化得到 BSPS-I ~ V,利用苯酚-硫酸法测定总糖含量百分比,硫酸-间羟基联苯法测定糖醛酸的含量,BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白质含量,5 种组分中均检测到总糖和糖醛酸,其中 BSPS-III 总糖含量最高为 63.26%,BSPS-IV 含量最低为 49.28%,BSPS-V 中糖醛酸含量最高为 6.76%,BSPS-IV 含量最低为 5.07%。同时 BSPS-I、BSPS-IV、BSPS-V 含有一定量的蛋白质,而 BSPS-II 和 BSPS-III 不含蛋白质。台琪瑞等<sup>[56]</sup>探讨了 BSP 的分离纯化、结构特征,并研究其理化性质,用 95%的乙醇进行沉淀,Sevage 法除去蛋白得到 BR<sub>1</sub>,继续采用 DE-252 阴离子交换纤维素柱、Sephadex G-100 柱分离纯化得到 BR<sub>4</sub>,元素分析结果显示,BR<sub>4</sub> 未见 N 元素,H 元素含量为 7%,C 元素含量为 41.4%,凝胶渗透色谱分析为单一对称峰,表明 BR<sub>4</sub> 为均一多糖。综上分析,不同分离纯化方法 BSP 的纯度均有一定的差异。

3.2 BSP 的相对分子量测定

相对分子质量是多糖重要物理特征之一,BSP 相对分子量测定常采用高效液相色谱联用蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)、高效尺寸排除色谱联用多角度激光散射法(HPSEC-MALLS)、凝

胶渗透色谱法(HPGPC)、高效体积排阻色谱法(HPSEC)等来测定<sup>[13]</sup>。Wang 等<sup>[57]</sup>从白及块茎粉末中提取粗多糖,经过 DEAE-52 柱色谱和 Sephadex G-150 柱色谱法进行纯化得到 BSP,通过 HPLC-ELSD 测得 BSP 的平均分子量约为 1.7 $\times$ 10<sup>5</sup> Da。孔令姍等<sup>[74]</sup>通过 Sephadex G-200 和 Sephadex G-25 凝胶柱进一步分离纯化水提醇沉粗多糖,采用 HPSEC-MALLS 法对纯化后白及多糖进行结构分析和分子量测定,得到白及多糖的重均分子量  $M_w = 9.545 \times 10^4$  g/mol,数均分子量  $M_n = 7.297 \times 10^4$  g/mol。通过破壁粹碎辅助水提醇沉提取白及粗多糖,采用 Sevag 法除蛋白,反复透析冻干等步骤进行分离纯化,HPGPC 分析得到 3 种多糖的分子量分别为 128.34、9.97 和 9.26 kDa<sup>[73]</sup>。以白及块茎为材料,经超声提取、乙醇沉淀、Sevag 法脱蛋白、超滤处理和 SephadexG-200 凝胶柱层析进行分离纯化,采用 HPGPC 测定相对分子质量为 460 和 390 kDa<sup>[58]</sup>。Xu 等<sup>[59]</sup>使用水提醇沉的方法提取 BSP,并通过 DEAE-Sephacrose Fast Flow 凝胶柱进一步纯化,最终获得纯化多糖(pBSP),采用 HPGPC 测定 pBSP 的分子量为 327.6 kDa。通过优化发酵条件,一种低聚合度的发酵多糖(FBP)从白及中分离得到,HPGPC 测得 FBP 平均分子量为 6.79 kDa<sup>[60]</sup>。王川等<sup>[75]</sup>以 HPSEC 测得 BSP 的分子量为 23.54 kD。目前从白及中分离得到的均一多糖分子量范围一般为 6.79~620 kDa 不等,BSP 的提取方法、分离纯化方法、单糖组成、糖苷键连接方式都可能与分子量的差异有关。

3.3 BSP 的单糖组成

单糖是组成多糖大分子的基本单元,单糖组成分析是研究多糖的理化性质和结构解析的重要步骤。当前常用的分析方法有薄板层析法(TLC)、气相色谱法(GC)、毛细管电泳法(CE)、高效液相色谱法(HPLC)、离子色谱法(IC)、气相色谱-质谱法(GS-MS)。BSP 主要由葡萄糖、甘露

糖、半乳糖、木糖、岩藻糖、鼠李糖组成,其中葡萄糖、甘露糖最为常见。从白及中加热回流提取粗多糖 BR<sub>1</sub> 并进行脱蛋白及纯化得到 BR<sub>4</sub>, TLC 层析显示, BR<sub>4</sub> 含有葡萄糖和甘露糖, 相对含量为 3:4.8<sup>[56]</sup>。陈思思等<sup>[61]</sup>从白及块茎中分离纯化 BSP, 粗提物经过 DEAE-cellulose 柱色谱分离和 SephadexG-200 柱色谱纯化后得 BSP-1, GC 分析发现, BSP-1 的结构组成为甘露糖与葡萄糖, 物质的量比为 8:1, 表明 BSP-1 为甘葡聚糖。刘福强等<sup>[58]</sup>采用超声提取、乙醇沉淀、Sevage 法除蛋白, 并通过超滤处理和 SephadexG-200 凝胶柱进一步分离纯化, 经 PMP 衍生化, HPLC 分析, 得到 BSP 主要由  $\beta$ -1,4-甘露糖和  $\beta$ -1,4-葡萄糖组成, 比例为 3.5:1。一种从白及块茎提取分离纯化得到的多糖 pBSP 和白及须根多糖 pFSP, 结构解析发现, 通过 IC 进行单糖组成分析, 得到 pBSP 由葡萄糖和甘露糖组成, 物质的量比例为 1.00:1.34; pFSP 由半乳糖、葡萄糖、甘露糖组成, 物质的量比例为 2.03:1.00:3.45<sup>[59]</sup>。采用白及碱提多糖纯化得到 5 种分子量不同的多糖 BSPS-I ~ V, 结构解析发现, BSPS-I、III: 葡萄糖; BSPS-II: 甘露糖-葡萄糖 (1.05:4.22); BSPS-IV: 岩藻糖-木糖-甘露糖-葡萄糖-半乳糖 (1.59:0.70:0.38:1.22:1.93); BSPS-V: 鼠李糖-岩藻糖-木糖-甘露糖-葡萄糖-半乳糖 (1.16:1.93:0.28:0.21:1.17:1.50)。Wang 等<sup>[57]</sup>从白及块茎中提取分离纯化得到 BSP, 结构分析发现 BSP 由甘露糖和葡萄糖组成, 物质的量比为 7.45:2.55。Wang 等<sup>[60]</sup>采用 *Bacillus licheniformis* BJ2022 发酵, 成功制备了低聚合度的 FBP, 结构解析主要由葡萄糖和甘露糖组成, 物质的量比为 1:2.7。一种从黄花白及中提取的多糖 BOP, 采用 GS-MS 分析单糖组成, BOP 由葡萄糖和甘露糖组成, 比例为 2.12:7.88<sup>[76]</sup>。BSP 的单糖组成及物质的量比例受提取方法、纯化方式及品种的影响差异较大。

### 3.4 BSP 的糖链结构

目前 BSP 的糖链结构主要是对单糖的类型、排列顺序以及单糖之间的连接方式进行一级结构研究。通过甲基化反应、Smith 降解法、酸水解法和高碘酸氧化法等, 确定 BSP 中单糖组成、糖苷键类型和比例、糖苷键位置以及支链多糖的分支数目。同时可采用红外光谱 (IR)、核磁共振 (NMR)、气相色谱 (GC) 和质谱 (MS) 等物理分析方法, 不仅适用于确定白及多糖糖苷键类型和构

型, 还能确认多糖链上的取代基类型。王布雷<sup>[62]</sup>利用热水浸提法从白及中提取白及粗多糖, 经 DEAE-52 纤维素柱和 Sephadex G-100 凝胶柱纯化得 BSP, 采用 IC、HPGPC、FT-IR、甲基化、GC-MS 和 NMR 进行结构特征分析, BSP 含有 2 种糖苷键,  $\rightarrow 4$ )-Manp-(1 $\rightarrow$ 和 $\rightarrow 4$ )-Glc p-(1 $\rightarrow$ , 分析结果与单糖组成结果相同, NMR 图谱解析, BSP 结构为  $\rightarrow 4$ )- $\beta$ -D-Glc p-(1 $\rightarrow$ [4)- $\alpha$ -D-Manp-(1]2 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-2ace-Manp-(1 $\rightarrow$ 链状葡甘聚糖。一种从白及块茎中分离纯化得到多糖 BSP-1, 通过 DEAE-cellulose 柱色谱、SephadexG-200 柱色谱纯化后得到组分 BSP-1, 进行单糖组成、酸水解和乙酰化衍生, 采用 GC-MS 分析, 得到 BSP-1 由葡萄糖和甘露糖组成, 主链由  $\beta$ -1,4 甘露糖, 侧链由末端连接的葡萄糖组成<sup>[61]</sup>。陈姿燕<sup>[77]</sup>研究从白及块茎中提取纯多糖 pBSP, 结构特征研究发现, 经高碘酸氧化及 Smith 降解, NMR 解析发现, pBSP 的主链由 (1 $\rightarrow$ 4)-连接的  $\beta$ -D-Manp、(1 $\rightarrow$ 4)-连接的  $\alpha$ -D-Glc p 和 (1 $\rightarrow$ 3)-连接的  $\beta$ -D-Manp 组成, 没有分支链, 同时从白及须根分离纯化的新型中性多糖 pFSP, 结构解析表明, pFSP 含有一条 (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-Glc p、(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Manp 和 (1 $\rightarrow$ 3,6)- $\beta$ -D-Manp 残基构成的主链, 和两条  $\beta$ -D-Manp 和 (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Galp 残基构成的支链。一种在 4℃ 的低温条件下水提和分级沉淀提取白及多糖 BSP-4, 经高碘酸钠氧化, BSP-4 中含有 1 $\rightarrow$ 2 或 1 $\rightarrow$ 2,6 或 1 $\rightarrow$ 4 或 1 $\rightarrow$ 4,6 糖苷键, Smith 降解及甲基化后 GS-MS 分析, BSP-4 中得到 (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-Glc p, 占比为 50.15%; (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-Manp, 占比为 22.61%; (1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-Manp, 占比为 25.72%; (1 $\rightarrow$ )- $\beta$ -D-Manp, 占比为 1.52%。一维核磁 (1D-NMR) 表明 BSP-4 中含有 4 种类型的糖苷键, 二维核磁 (2D-NMR) 表明 BSP-4 中末端甘露糖 D 是连接在残留 C 上, BSP-4 主链的连接顺序为:  $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ [4)- $\beta$ -D-Glc p-(1]2 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ <sup>[63]</sup>。同时采用热水提取、碱辅助提取、沸水提取和超声辅助提取白及多糖 (BSPs-H、BSPs-A、BSPs-B、BSPs-U) 结构表征及活性研究发现在分子量、单糖组成、糖苷键组成、晶体内部结构、表面形态、粘度和抗氧化活性等方面均存在显著差异, 其中 BSPs-A 抗氧化活性最强<sup>[78]</sup>。对于 BSP 的高级结构, 研究者通过 Congo Red 染色法分析结果表明 BSP 具有三重螺旋结构<sup>[25]</sup>。葡萄糖和甘露糖是构成 BSP



的主要糖单元,BSP 中的糖苷键包括  $\alpha$ -糖苷键和  $\beta$ -糖苷键,且连接方式多样。此外,还包含其他类型的(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Galp 残基构成的支链,进一步增

加了 BSP 的多样性和复杂性。同时提取方法对其结构特征和生物活性有重要影响,BSP 化学结构见图 3。

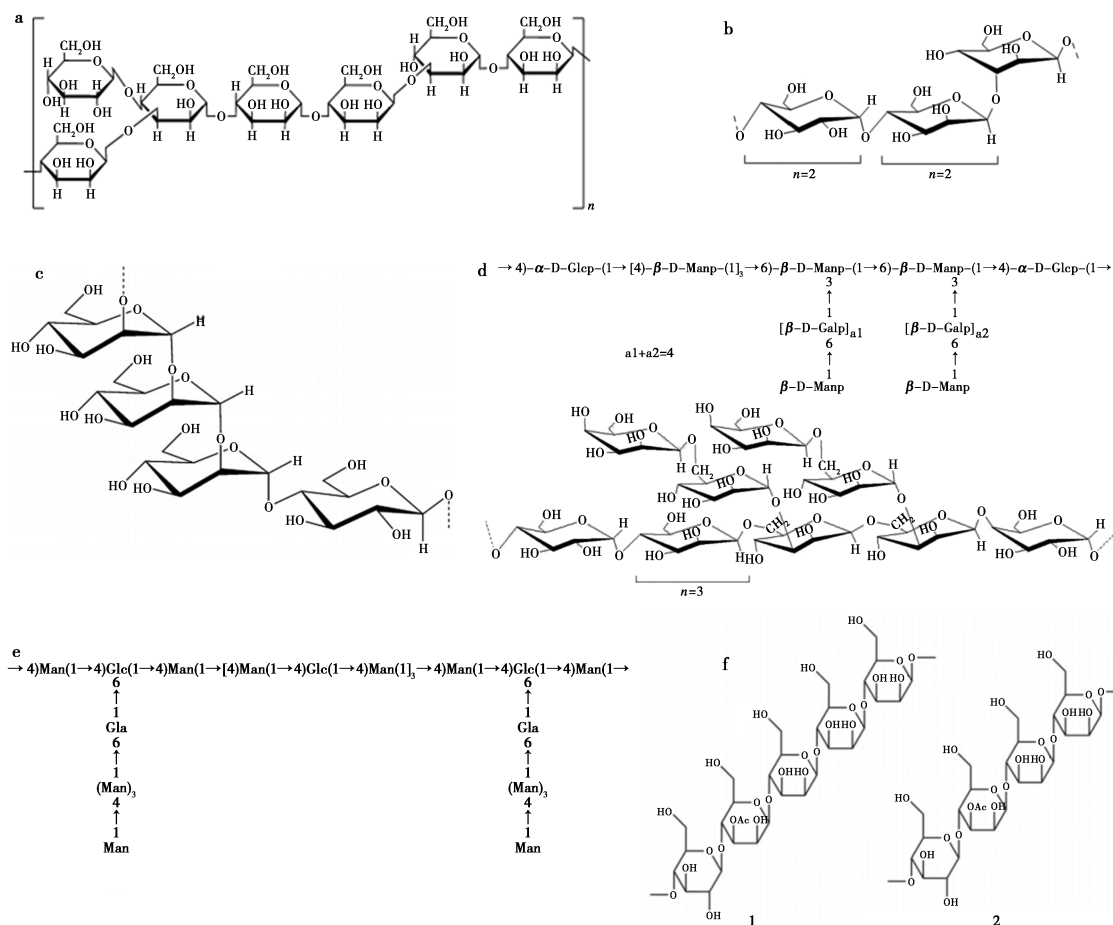


图 3 白及多糖 (BSP) 化学结构<sup>[79]</sup> (a)、白及多糖 (pBSP) 化学结构<sup>[59]</sup> (b)、白及多糖 (BSPb) 化学结构<sup>[70]</sup> (c)、白及多糖 (pFSP) 化学结构<sup>[77]</sup> (d)、白及多糖 (BSPF2) 化学结构<sup>[71]</sup> (e) 和白及多糖 (BSP-1) 和白及多糖 (BSP-2) 化学结构<sup>[72]</sup> (f)

**Fig.3** Chemical structure of *Blatilla striata* polysaccharides (BSP)<sup>[79]</sup> (a); Chemical structure of *Blatilla striata* polysaccharides (pBSP)<sup>[59]</sup> (b); Chemical structure of *Blatilla striata* polysaccharides (BSPb)<sup>[70]</sup> (c); Chemical structure of *Blatilla striata* polysaccharides (pFSP)<sup>[77]</sup> (d); Chemical structure of *Blatilla striata* polysaccharides (BSPF2)<sup>[71]</sup> (e); Chemical structures of *Blatilla striata* polysaccharides (BSP-1 and BSP-2)<sup>[72]</sup> (f)

#### 4 前景与展望

研究中药中有效化学成分的提取、分离及结构表征是当前推进中药现代化的重要措施,对于明确提取工艺流程,探讨药效物质基础,提高临床应用具有重要意义。鉴于 BSP 易溶于水的特性,当前的提取分离技术主要采用水提醇沉法,同时辅助使用超声波、微波、红外、生物酶及多方法协同提取,可以一定程度上缩短提取时间、降低提取温度、同时提高 BSP 的提取率。但受提取方式、物料颗粒的粉碎细度、料液比、提取时间、提取温度等因素的影响,各方法的提取率差

异较大,高效提取和大规模应用难以有效结合。BSP 的分离纯化研究方面,主要采用过氧化氢、活性炭、大孔树脂脱色素;采用 Sevage 法、蛋白酶法、三氯乙酸、絮凝剂等方法除蛋白;采用分级醇沉法、膜分离法、离子交换色谱法及凝胶色谱法进行分离纯化得到均一多糖。仍存在多糖损失增加、多糖得率减少或结构损坏等情况。在结构表征方面,主要是对 BSP 进行纯度分析、相对分子质量测定、单糖组成关系、糖链结构等一级结构特征分析。

随着技术的发展,未来对 BSP 提取、分离、

纯化及结构表征应聚焦在以下几个方面:1)当前常用的 SE、UAE、MAE、IAE、AE、EAE、CE 技术均有各自的优缺点。然而,UAE、MAE、IAE、AE、EAE、CE 技术较 SE 技术提取效率高,今后可进一步结合离子液体、低共熔溶剂、超临界流体萃取及加速溶剂萃取方式研究 BSP 提取,开发更高效、更环保且不破坏多糖结构的提取方式;2) BSP 的纯化技术可将 Sevage 法、大孔树脂、分级醇沉、膜分离与柱层析有效结合,提高分离纯化效果,以获得纯度较高的 BSP;3)在得到 BSP 的单糖组成、相对分子量、糖苷键类型、糖苷键连接方式等一级结构相关信息后,以计算机与多种分析方法融合,应用 X-射线衍射法(X-ray diffraction,XRD)获得 BSP 的空间排列信息,建立 BSP 的分子和晶体结构模型;圆二色谱(circular dichroism,CD)分析 BSP 分子的构象变化及平衡结构;原子力光谱(Atomic Force Microscopy,AFM)在纳米尺度上进一步对 BSP 的高级结构进行解析,同时进一步明确 BSP 的结构-活性关系。拓展 BSP 在临床应用、生物医药及工业生产的使用。

#### 参考文献:

- [1]中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志[M].北京:科学出版社,1999:46.
- [2]国家药典委员会.中华人民共和国药典[M].一部.北京:中国医药科技出版社,2020:155.
- [3]王坤堂,王逸伦,崔元璐,等.白及多糖药理作用及在中药现代制剂领域的研究进展[J].中成药,2023,45(7):2 281-2 287.
- [4]LIU Y, WU J, HUANG L, et al. Synergistic effects of antitumor efficacy via mixed nano-size micelles of multifunctional *Bletilla striata* polysaccharide-based copolymer and D- $\alpha$ -tocopheryl polyethylene glycol succinate[J]. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2020, 154: 499-510.
- [5]ZHAO Y, WANG Q, YAN S, et al. *Bletilla striata* polysaccharide promotes diabetic wound healing through inhibition of the NLRP3 Inflammasome[J]. *Front. Pharmacol.*, 2021, 12: 659 215.
- [6]NIU X, YU J, HUANG Q, et al. Immunoenhancement activity of *Bletilla striata* polysaccharide through MAPK and NF- $\kappa$ B signalling pathways in vivo and in vitro[J]. *Autoimmunity*, 2022, 55(8): 650-660.
- [7]马子豪,马婕,吕金盈,等.白及多糖在新型递药系统和生物材料中的应用进展[J].中国中药杂志,2021,46(18):4 666-4 673.
- [8]CHEN T, GUO X, HUANG Y, et al. *Bletilla striata* polysaccharide-waterborne polyurethane hydrogel as a wound dressing[J]. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 2023, 34(9): 1 157-1 170.
- [9]祝贝贝.白芨多糖分离纯化、化学性质及生物活性研究进展[J].食品与发酵工业,2023,49(10):343-350.
- [10]JI X, YIN M, NIE H, et al. A review of isolation, chemical properties, and bioactivities of polysaccharides from *Bletilla striata*[J]. *Biomed. Res. Int.*, 2020, 19: 5 391 379.
- [11]王维.白及碱提多糖理化性质及相关药理作用的探究[D].西安:陕西师范大学,2015.
- [12]ZHU Z, LIANG T, DAI G, et al. Extraction, structural-activity relationships, bioactivities, and application prospects of *Bletilla striata* polysaccharides as ingredients for functional products: A review[J]. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2023, 245: 125 407.
- [13]沈晓静,秦宇,华宗,等.白及多糖的提取纯化、结构鉴定及生物活性的研究进展[J].中华中医药学刊,2024,42(5):225-232.
- [14]孔伟华,徐建波,崔琦,等.白及化学成分、药理作用和白及多糖提取工艺的研究进展[J].中医药信息,2021,38(9):69-78.
- [15]罗玲丽,匡勇斌,喻渐,等.白及多糖提取工艺及抑菌活性检测[J].吉首大学学报(自然科学版),2022,43(5):37-42;63.
- [16]董建新,俞涵,姜伟,等.响应面法优化白及多糖的提取和醇沉工艺[J].基因组学与应用生物学,2019,38(8):3 681-3 689.
- [17]吴诗惠,王剑波,开拓,等.白及多糖超声提取工艺及其抗氧化活性研究[J].世界中医药,2020,15(17):2 556-2 560.
- [18]何晓梅.白及多糖超声波辅助提取工艺优化及体外抗氧化活性[J].皖西学院学报,2017,33(2):1-5.
- [19]韩丹,王艳萍,毕亚静,等.白芨多糖提取方法的优选及其理化性质研究[J].药学实践杂志,2013,31(1):35-37.
- [20]宋志姣,汤丹,李悦,等.小白及多糖提取、脱蛋白工艺及抗氧化性研究[J].天然产物研究与开发,2019,31(8):1 317-1 325.
- [21]杨晓丽,刘里,丁梦娜,等.响应曲面法优化微波样品制备仪提取白及多糖工艺[J].曲靖师范学院学报,2021,40(6):24-30.
- [22]杨晓杰,王瑶,张晶,等.三种药用植物多糖的提取工艺研究[J].黑龙江畜牧兽医,2017,(13):202-205.
- [23]汪洋,陈丽竹,段昊天,等.红外辅助提取-HPLC 法

- 测定卷柏中穗花杉双黄酮的含量[J].中国临床药理学杂志,2018,27(3):164-166.
- [24]李春雪.多孔性白及胶的制备与表征及其胃滞留性能初步研究[D].成都:成都中医药大学,2016.
- [25]QU Y,LI C,ZHANG C,et al.Optimization of infrared-assisted extraction of *Bletilla striata* polysaccharides based on response surface methodology and their antioxidant activities[J].*Carbohydr. Polym.*, 2016, 148: 345-353.
- [26]王靓怡,胡海燕,李雪,等.植物多糖提取方法和提取动力学研究进展[J].化工科技,2022,30(3):65-68.
- [27]朱峻霄,林亚蒙,杨野,等.白及多糖在生物医药材料领域中的应用研究进展[J].中药材,2018,41(4):1011-1014.
- [28]商晋.白芨多糖提取工艺的研究进展及其在食品中的应用[J].现代食品,2018,1:124-127.
- [29]张艳,黄宝银,刘雪松,等.生物酶法提取中草药活性成分研究进展[J].中国兽药杂志,2021,55(3):69-74.
- [30]NADAR S S,RAO P,RATHOD V K.Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: A review[J].*Food. Res. Int.*, 2018, 108:309-330.
- [31]吴威,赵天明,张振,等.白芨中天然化合物的酶解法提取[J].江苏农业科学,2017,45(17):175-178.
- [32]朱富成,罗书岚,郑宣,等.大别山白及多糖酶法辅助提取及活性研究[J].天然产物研究与开发,2020,32(8):1 389-1 395;1 323.
- [33]周美,万科,马风伟,等.响应面法优化白及多糖酶解工艺及其抗氧化、免疫活性研究[J].食品研究与开发,2020,41(10):128-135.
- [34]袁治浩.白及多糖的酶法提取及其特性研究[D].贵阳:贵州大学,2023.
- [35]魏玉,马鸿祥,石延榜,等.分步加酶法优化白及多糖提取工艺[J].广东化工,2021,48(8):100-103;111.
- [36]张腊梅,黄红琴,李敏,等.超声酶法辅助提取水芹菜多糖工艺优化及生物学活性研究[J].化学试剂,2022,44(8):1 170-1 177.
- [37]陈卫,谷彩花,叶兆伟,等.大别山艾叶多糖提取工艺优化及其吸湿保湿、抗氧化性能研究[J].化学试剂,2024,46(2):67-73.
- [38]王林青,宁灿灿,李蕊,等.铁皮石斛多糖超声-微波协同提取条件优化及其抗氧化活性[J].食品研究与开发,2023,44(11):13-20.
- [39]蔡锦源,熊建文,黄燕芬,等.白及多糖的超声-微波协同提取工艺及其抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2016,37(22):274-278;284.
- [40]贾福怀,涂宏建,王俊,等.超声-闪式协同提取白及须根多糖工艺优化及其抗肿瘤活性[J].食品工业科技,2019,40(20):188-195;208.
- [41]韩伟,彭茹洁,赵少甫.PB 试验-响应面优化白及多糖的提取工艺研究[J].徐州工程学院学报(自然科学版),2018,33(4):19-26.
- [42]李翠丽,王炜,张英,等.中药多糖提取、分离纯化方法的研究进展[J].中国药房,2016,27(19):2 700-2 702;2 703.
- [43]关丽,李小宁,陈烁帆,等.响应面法研究白及多糖脱蛋白工艺及其性质[J].化工科技,2022,30(6):10-15.
- [44]雷燕妮,张小斌,李多伟,等.白芨多糖提取纯化新工艺的研究[J].陕西农业科学,2020,66(8):27-31.
- [45]彭茹洁,赵少甫,王承潇,等.Plackett-Burman 试验联用满意度函数-响应面法优化白及多糖絮凝纯化工艺[J].南京工业大学学报(自然科学版),2019,41(1):57-63.
- [46]韩欣,王文苹,隋宏,等.白芨多糖的提取与除蛋白研究[J].宁夏医科大学学报,2013,35(5):536-538.
- [47]陈浩莹,王斌,李金鹏,等.碱提白芨粗多糖脱蛋白方法比较及抗氧化活性[J].精细化工,2023,40(2):290-296.
- [48]车向前,常明泉,陈芳,等.H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对白及多糖脱色工艺研究[J].实用药物与临床,2018,21(1):70-73.
- [49]车向前,常明泉,陈林,等.正交试验法优选白及多糖活性炭脱色工艺[J].中国药师,2017,20(8):1 370-1 373.
- [50]车向前,常明泉,陈芳,等.WH706-CLL 树脂对白及多糖脱色工艺的研究[J].中国现代中药,2017,19(9):1 301-1 304.
- [51]王自凡.白芨胶分级制备工艺及其功效研究[D].贵阳:贵州大学,2023.
- [52]张丽华,叶世莉,刘思美,等.白及多糖的超滤陶瓷膜分离工艺研究[J].陕西中医药大学学报,2022,45(6):34-39.
- [53]ZHAI W,WEI E,LI R,et al.Characterization and evaluation of the pro-coagulant and immunomodulatory activities of polysaccharides from *Bletilla striata*[J].*ACS Omega*, 2021,6(1):656-665.
- [54]高笛,罗成,周凯,等.响应面法优化白及多糖提取工艺[J].海峡药学,2024,36(1):30-35.
- [55]冯正平,王维,王冬阁,等.白及碱提多糖的提取分离及纯化研究[J].中药材,2019,42(4):858-861.
- [56]台琪瑞,殷秀惠.白及多糖的提取与分析[J].中国药



- 业, 2014, **22**: 35-36.
- [57] WANG B, ZHANG H, CHEN L, et al. Extraction, purification, and determination of the gastroprotective activity of glucomannan from *Bletilla striata* [J]. *Carbohydr. Polym.*, 2020, **246**: 116 620.
- [58] 刘福强, 王艳萍, 韩丹, 等. 白及多糖的提取及其相对分子质量测定和结构研究 [J]. *中成药*, 2013, **35**(10): 2 291-2 293.
- [59] XU J, CHEN Z, LIU P, et al. Structural characterization of a pure polysaccharide from *Bletilla striata* tubers and its protective effect against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced injury fibroblast cells [J]. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2021, **193**(B): 2 281-2 289.
- [60] WANG Q, HU H, XIONG L, et al. Structural characterization and prebiotic activity of *Bletilla striata* polysaccharide prepared by one-step fermentation with *Bacillus Licheniformis* BJ2022 [J]. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2024, **258**(1): 128 822.
- [61] 陈思思, 吴蓓, 谭婷, 等. 白及多糖 BSP-1 的分离纯化、结构表征及抗肿瘤活性研究 [J]. *中草药*, 2019, **50**(8): 1 921-1 926.
- [62] 王布雷. 白及多糖水凝胶促皮肤伤口愈合作用研究 [D]. 西安: 陕西师范大学, 2022.
- [63] 刘超. 白及多糖结构特性及其对肝癌细胞的抑制机理研究 [D]. 天津: 天津科技大学, 2023.
- [64] LIU C, LIU A J. Structural characterization of an alcohol-soluble polysaccharide from *Bletilla striata* and antitumor activities in vivo and in vitro [J]. *Chem. Biodivers.*, 2022, **19**(12): e202 200 635.
- [65] LIU C, DAI K Y, JI H Y, et al. Structural characterization of a low molecular weight *Bletilla striata* polysaccharide and antitumor activity on H<sub>22</sub> tumor-bearing mice [J]. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2022, **205**: 553-562.
- [66] CHEN Z, ZHAO Y, ZHANG M, et al. Structural characterization and antioxidant activity of a new polysaccharide from *Bletilla striata* fibrous roots [J]. *Carbohydr. Polym.*, 2020, **227**: 115 362.
- [67] 朱峻霄. pH 敏感-两亲性白及多糖纳米颗粒的分子设计及其在肿瘤靶向给药的应用研究 [D]. 昆明: 昆明理工大学, 2020.
- [68] 韩丹. 白及多糖的提取分离、分子量测定及结构研究 [D]. 延吉: 延边大学, 2013.
- [69] ZHANG M, SUN L, ZHAO W, et al. Cholesteryl-modification of a glucomannan from *Bletilla striata* and its hydrogel properties [J]. *Molecules*, 2014, **19**(7): 9 089-9 100.
- [70] WANG Y, LIU D, CHEN S, et al. A new glucomannan from *Bletilla striata*: Structural and anti-fibrosis effects [J]. *Fitoterapia*, 2014, **92**: 72-78.
- [71] PENG Q, LI M, XUE F, et al. Structure and immunobiological activity of a new polysaccharide from *Bletilla striata* [J]. *Carbohydr. Polym.*, 2014, **107**: 119-123.
- [72] WANG Y, HAN S, LI R, et al. Structural characterization and immunological activity of polysaccharides from the tuber of *Bletilla striata* [J]. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2019, **122**: 628-635.
- [73] 肖唯. 白及多糖的分离纯化及其在炎症治疗方面的应用 [D]. 武汉: 中南民族大学, 2021.
- [74] 孔令嫻, 俞苓, 胡国胜, 等. 白及多糖的分子量测定及其吸湿保湿性评价 [J]. *日用化学工业*, 2015, **45**(2): 94-98.
- [75] 王川, 张燕, 李楠, 等. HPSEC-ELSD 法同时测定白及多糖的分子量和含量 [J]. *中国药房*, 2018, **29**(9): 1 198-1 201.
- [76] 王尚萍. 黄花白及多糖结构解析及其抗肿瘤活性研究 [D]. 西安: 陕西师范大学, 2017.
- [77] 陈姿燕. 白及源多糖的分离纯化、结构解析以及抗氧化活性研究 [D]. 上海: 上海交通大学, 2020.
- [78] CHEN H, ZENG J, WANG B, et al. Structural characterization and antioxidant activities of *Bletilla striata* polysaccharide extracted by different methods [J]. *Carbohydr. Polym.*, 2021, **266**: 118 149.
- [79] WANG Y, LIU J, LI Q, et al. Two natural glucomannan polymers, from *Konjac* and *Bletilla*, as bioactive materials for pharmaceutical applications [J]. *Biotechnol. Lett.*, 2015, **37**(1): 1-8.