

白及多糖 BSP-1 的分离纯化、结构表征及抗肿瘤活性研究

陈思思¹, 吴蓓², 谭婷¹, 谢赛赛¹, 杨世林¹, 冯育林¹, 温泉^{1*}

1. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西中医药大学, 江西 南昌 330006

2. 南昌市食品药品检验所, 江西 南昌 330029

摘要: **目的** 从白及 *Bletilla striata* 块茎中分离纯化多糖 BSP-1, 并对其结构和抗肿瘤活性进行研究。**方法** 将提取的粗多糖经 DEAE-cellulose 柱色谱分离得到 3 个多糖组分 BP-1、BP-2、BP-3。BP-1 通过 SephadexG-200 柱色谱纯化后得到组分 BSP-1。采用 HPGPC、IR、GC、GC-MS、甲基化及 ¹H-、¹³C-NMR 等方法对该多糖的结构进行表征, 并考察 BSP-1 抗肿瘤活性。**结果** 测得 BSP-1 相对分子质量为 4.72×10^5 , 由葡萄糖和甘露糖组成。主链由 β -1,4 甘露糖, 侧链由末端连接的葡萄糖组成, 其物质的量比为 8 : 1。体外肿瘤细胞活性实验表明, BSP-1 能抑制肝癌 HepG2 细胞的增殖。BSP-1 体内可显著抑制裸鼠的瘤质量, 抑制率为 66.42%。**结论** BSP-1 的结构确定为进一步阐明和开发白及中多糖类成分提供了一定的参考。

关键词: 白及; 多糖; 分离纯化; 结构表征; 抗肿瘤

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)08-1921-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.08.022

Isolation, purification and structural characterization of *Bletilla striata* polysaccharides and its antitumor activity

CHEN Si-si¹, WU Bei², TAN Ting¹, XIE Sai-sai¹, YANG Shi-lin¹, FENG Yu-lin¹, WEN Quan¹

1. National Engineering Center of Solid Preparation of Chinese Materia Medica Manufacturing Technology, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China

2. Nanchang Institute for Food and Drug Inspection, Nanchang 330029, China

Abstract: Objective *Bletilla striata* polysaccharide (BSP-1) extracted from the stem tubers of *B. striata* was purified to study the structural properties and antitumor activity. **Methods** The crude polysaccharide was fractionated by DEAE-cellulose column chromatography, and three fractions were obtained including BP-1, BP-2, and BP-3, respectively, BP-1 was further purified by SephadexG-200 column chromatography, and a sub-fraction named BSP-1 was obtained. Subsequently, HPGPC, IR spectroscopy, gas chromatography (GC), GC coupled to mass spectrometry (GC-MS) and methylation analysis, and ¹H- and ¹³C-NMR were employed to characterize the structural properties of the polysaccharide fractions. Moreover, the anticancer activity was investigated *in vivo*. **Results** The results showed that the molecular weight of BSP-1 were 4.72×10^5 . BSP-1 was consisted of mannose (Man) and glucose (Glc) residues. The backbone of BSP-1 was composed of β -1,4-linked Man and Glc residues at the end with a molar ratio of 8 : 1. BSP-1 could inhibit the tumor proliferation of HepG2-bearing mice. The tumor weight of mice was significantly inhibited by BSP-1 with inhibitory rate of 66.42%. **Conclusion** Structural characterization of BSP-1 provides the significant reference for the further development and elucidation of polysaccharides from *B. striata* as new drugs.

Key words: *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f.; polysaccharide; isolation and purification; structural characterization; antitumor activity

白及 *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f. 为兰科 西南及甘肃、陕西等地^[1], 夏、秋两季采挖^[2]。《本草逢原》中记载, 白及性涩而收, 得秋金之气, 故称“白根”“地螺丝”“羊角七”, 分布在华东、中南、 能入肺止血、生肌治疮^[3]。其药用成分主要为具有

收稿日期: 2018-10-22

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (81603274); 江西省卫计委中医药科研计划 (2017A291); 江西省卫计委科技计划项目 (20183009); 江西中医药大学博士启动金项目 (2016BS002)

作者简介: 陈思思 (1991—), 硕士, 研究方向为中药活性成分。Tel: (0791)87119633 E-mail: 975438209@qq.com

*通信作者 温泉 (1987—), 男, 博士, 讲师, 研究方向为中药药效物质。Tel: (0791)87119652 E-mail: qwen12@fudan.edu.cn

胶质性的多糖^[4]。白及多糖具有特殊的黏性及广泛的药理活性,如抗菌、促进伤口愈合、抗溃疡、止血等^[5-6]。文献报道^[7],多糖除通过直接作用于肿瘤细胞外,也可以通过免疫激活来达到抑制肿瘤的作用,是潜在的抗肿瘤药物制剂^[8-10]。因此,寻找高活性的多糖仍然是多糖研究的一大重点。

白及多糖的化学组成为甘葡聚糖^[11-12],但目前对其精确结构尚未阐明,对其抗肿瘤研究较少,为了开发和合理利用这种丰富资源,本研究从白及中分离纯化得到均一多糖 BSP-1,为了阐明其发挥活性的物质基础,采用光谱、色谱及核磁共振等方法分析其结构,对 BSP-1 抑制体外肝癌 HepG2 细胞的增殖及体内小鼠瘤质量进行研究,进一步研探讨其抗肿瘤机制,为临床应用奠定基础。

1 仪器与材料

1.1 材料

白及 *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f. 购于贵州白及 GAP 种植基地,产地贵州正安县,经南昌市食品药品检验所吴蓓主任药师鉴定为兰科白及属白及的干燥块茎。

HepG2 细胞购于(南京恩晶生物有限责任公司);S₁₈₀ 细胞株(中药固体制剂中心药理实验室);环磷酸胺(批号 17011525,江苏盛迪医药有限公司);MTT、DMSO(北京索莱宝公司)。昆明小鼠(清洁级),雌性,体质量 18~22 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,动物许可证号 SCXK(京)2004-0008。

1.2 试剂

L-鼠李糖(批号 111683-201502,质量分数 99.8%)、L-阿拉伯糖(批号 150624-201506,质量分数 99.8%)、D-木糖(批号 111508-20150,质量分数 99.9%)、D-甘露糖(批号 140651-201504,质量分数 99.4%)、D-无水葡萄糖(批号 110833-201501,质量分数 99.9%)、D-半乳糖(批号 100226-201506,质量分数 99.9%)、右旋糖酐相对分子质量标准套装(批号 14063-646-201203,相对分子质量范围 2 700~300 600),中国食品药品检定研究院;碘甲烷(分析纯),北京化学试剂公司;DEAE-52 阴离子树脂,Sephadex G-200 凝胶,上海源叶生物化学试剂有限公司;其余试剂均为分析纯。

1.3 仪器

GC-MS-QP 2010 型气质联用仪(日本 Shimadzu 公司);EQUINOX 55 型傅里叶红外光谱仪(德国

Bruker 公司);高效液相色谱仪(配置 RID-20A 示差折光检测器,Shimadzu 公司);色谱柱为 TSKgel G4000PWXL (300 mm×7.8 mm,日本 TOSOH 公司);UV-2550 型紫外分光光度计(Shimadzu 公司);AVANCE III500 型核磁共振波谱仪(瑞士 Bruker 公司);TGL6B 型高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);3 000 透析袋(上海源叶生物科技有限公司);十万分之一分析天平(Satorius 公司)。

2 方法

2.1 BSP-1 的分离与纯化

取干燥白及块茎,粉碎后过 20 目筛,加 10 倍量的石油醚回流脱脂 4 h。干燥后残渣加 30 倍水,提取 3 次,每次提取 2 h。合并提取液,浓缩,乙醇沉淀,冷冻干燥,得到白及粗多糖。加 20% Sevag 试剂(二氯甲烷与正丁醇体积比为 4:1)除去游离蛋白质,反复多次,直至无明显的蛋白质产生为止。称取脱蛋白后的多糖过 DEAE-Cellulose 柱依次用蒸馏水和 0.1、0.3 mol/L 的 NaCl 溶液梯度洗脱,隔管检测吸光度(A_{490})值(苯酚-硫酸法),合并单一峰,洗脱得到 3 个多糖组分 BP-1、BP-2、BP-3。BP-1 经 Sephadex G-200 凝胶色谱柱纯化,以 0.1 mol/L NaCl 溶液等度洗脱,透析,冷冻干燥得到白色絮状多糖 BSP-1。

2.2 白及多糖的分析鉴定

2.2.1 BSP-1 的质量分数(M_w)测定 根据文献报道^[13-15],糖含量和蛋白质含量的测定分别依据苯酚-硫酸法、Bradford 法和凯氏定氮法进行。

2.2.2 BSP-1 的相对分子质量测定 色谱条件:TSK-GelG4000PWXL 色谱柱(300 mm×7.5 mm),流动相为硝酸钠溶液(0.1 mol/L),标准品及样品质量浓度均为 2 mg/mL,进样量 20 μ L,体积流量 0.8 mL/min,柱箱温度和检测器温度均为 40 $^{\circ}$ C。

先将右旋糖酐标准品 5 250、13 050、36 800、64 650 和 135 350 按相对分子质量由小到大顺序依次进样,然后对样品进样,测定保留时间。以相对分子质量对数($\lg M_w$)对保留时间(t_R)绘制标准曲线,根据线性回归方程计算样品的 M_w 。

2.2.3 BSP-1 的红外光谱(IR)分析 称取样品 BSP-1 3.0 mg,与适量干燥的 KBr 粉末研磨均匀,压片,于 4 000~400 cm^{-1} 波数内进行扫描。

2.2.4 BSP-1 单糖组成测定 取 5 mg BSP-1,加入 3 mL 2 mol/L 的三氟乙酸(TFA),密封,100 $^{\circ}$ C 油浴 6 h,减压抽干。按照 Lehrfeld^[16]的方法通过气相

色谱。色谱条件：HP-5MS 柱（30.0 m×0.25 mm，0.25 μm），载气为高纯度氮气（>99.999%），进样口温度 280 ℃；程序升温条件为：140 ℃→180 ℃（2 ℃/min）→185 ℃（1 ℃/min，保持 3 min）→188 ℃（1 ℃/min，保持 5 min）→192 ℃（1 ℃/min，保持 2 min）→200 ℃（2 ℃/min）→250 ℃（5 ℃/min，4 min）；分流方式进样，分流比为 20：1。

2.2.5 BSP-1 的甲基化测定

（1）甲基化实验：取 BSP-1 样品 5.0 mg，用 DMSO 溶解后，加入 NaH 在冰浴中超声反应，并加入碘甲烷，通过 IR 确定甲基化程度，甲基化完全后，按上述单糖组成进行酸水解和乙酰化衍生，采用气相色谱-质谱联用仪（GC-MS）进行分析。

（2）质谱条件：连接处温度 280 ℃；EI 离子源，电子能量 70 eV，离子温度 230 ℃；扫描方式：选择离子检测；溶剂切除 2.5 min；NIST08 谱库。取上层清液 1 μL 进行 GC-MS 检测。

2.2.6 BSP-1 的核磁共振 NMR BSP-1 20 mg 溶于 0.5 mL D₂O 中，25 ℃ 下进行 ¹H-、¹³C-NMR 分析，¹H-NMR 分析频率为 600 MHz，¹³C-NMR 分析频率为 150 MHz。

2.3 抗肿瘤活性考察

2.3.1 BSP-1 对 HepG2 细胞增殖抑制活性实验 将 HepG2 细胞在 37 ℃、5% CO₂ 条件下，用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液培养。调整肿瘤细胞浓度至 1×10⁵ 个/mL，稀释为每孔 1×10⁴ 个细胞。实验组 BSP-1 质量浓度（800、400、200、100、50、25、12.5 mg/L），每个样本质量浓度设定平行的 3 个孔，培养板混匀后培养 48、72 h。参考文献方法^[17]，进行 MTT 实验。用酶标仪于 570 nm 波长处测定各孔的吸光度 A₅₇₀ 值，以溶剂处理细胞为对照组，按公式计算 BSP-1 的细胞增殖抑制率。

$$\text{增殖抑制率} = 1 - A_{570 \text{ 实验}} / A_{570 \text{ 对照}}$$

2.3.2 BSP-1 体内抗肿瘤作用 分别将接种好的 S₁₈₀ 荷瘤小鼠，随机分为阴性对照组、阳性对照组、BSP-1 组，每组 10 只，连续 ig 给药 10 d，阴性对照组 ig 蒸馏水 0.02 mL/g；阳性对照组为环磷酰胺 15 mg/kg，隔天 ip 给药，给药 5 d；BSP-1 组为 30 mg/kg，给药 10 d。末次给药 24 h 后，处死动物，分离腋下肿瘤并称定质量，按公式计算抑瘤率。

$$\text{抑瘤率} = 1 - \text{给药组平均瘤质量} / \text{对照组平均瘤质量}$$

2.3.3 BSP-1 对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠免疫功能的影响 取“2.3.2”项下各组荷瘤小鼠胸腺和脾脏，称定质量，

分别计算胸腺指数和脾脏指数。

$$\text{胸腺指数} = \text{胸腺质量} / \text{体质量} \times 10$$

$$\text{脾脏指数} = \text{脾脏质量} / \text{体质量} \times 10$$

3 结果与分析

3.1 BSP-1 的分离纯化

经脱脂、热水提取、醇沉、Sevag 法脱蛋白制得白及粗多糖，得率为 20.4%。粗多糖呈灰白色蓬松状，易溶于水。粗多糖经 DEAE-cellulose 柱色谱分离得到 3 个组分 BP1、BP2、BP3，见图 1。由于洗脱得到的 BP2、BP3 组分含量较少，本实验仅对 BP-1 组分进行进一步纯化。BP-1 进一步经 Sephadex G-200 柱纯化（图 2），得到组分 BSP-1，得率为 4.89%。

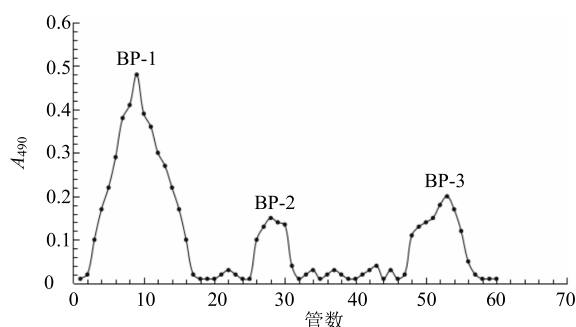


图 1 白及粗多糖经 DEAE-cellulose 柱的分离图

Fig. 1 Elution curve of *Bletilla striata* crude polysaccharide on DEAE-cellulose column

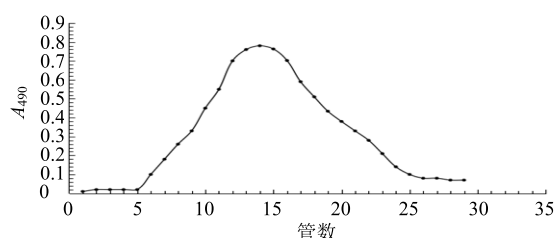


图 2 BP-1 经 Sephadex G-200 柱色谱的分离图

Fig. 2 Elution profile of BP-1 on Sephadex G-200 column

3.2 糖含量与蛋白质含量测定

苯酚-硫酸法测得 BSP-1 的糖质量分数为 92.8%。依据 Bradford 法测得 BSP-1 的蛋白质质量分数为 3.85%，凯氏定氮法测得 BSP-1 总氮量为 4.25%。BSP-1 纯度较高，蛋白量很低。结果见图 3。

3.3 BSP-1 的 M_w 测定

根据右旋糖酐 M_w（2700~300 600）t_R 及 lgM_w，得到线性回归方程 lgM_w=-0.933 5 t_R+20.531，r²=0.999 0。BSP-1 出峰时间为 10.484 min，代入线性方程，M_w 为 4.72×10⁵。

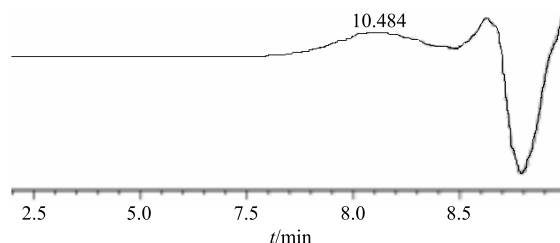


图 3 BSP-1 的高效凝胶色谱图
Fig. 3 HPGPC chromatogram of BSP-1

3.4 IR 测试结果

BSP-1 的 IR 图谱 (图 4) 中, 有多糖特征吸收峰。3 600~3 200 cm^{-1} 处有强宽峰, 是由于羟基形成的吸收峰; 2 931 cm^{-1} 处有中强吸收, 表示有糖类 $-\text{CH}_2$ 或 $-\text{CH}_3$ 的 C-H 伸缩振动; 1 612 cm^{-1} 处的峰是糖分子中结合水的吸收峰; 877 cm^{-1} 处有弱吸收, 表明有 β -D-型吡喃甘露糖存在; 这些与气相色谱的结果一致。

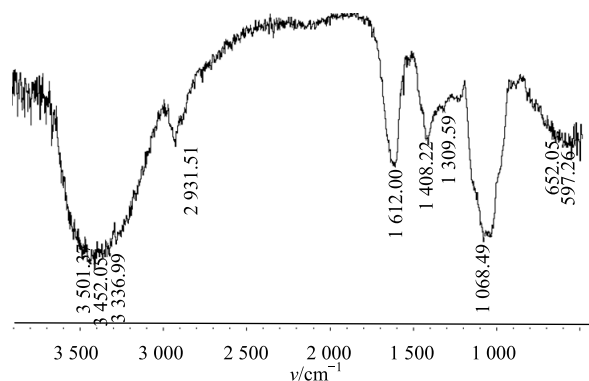


图 4 BSP-1 的 IR 扫描图
Fig. 4 IR scanning spectrum of BSP-1

3.5 白及多糖的单糖组成

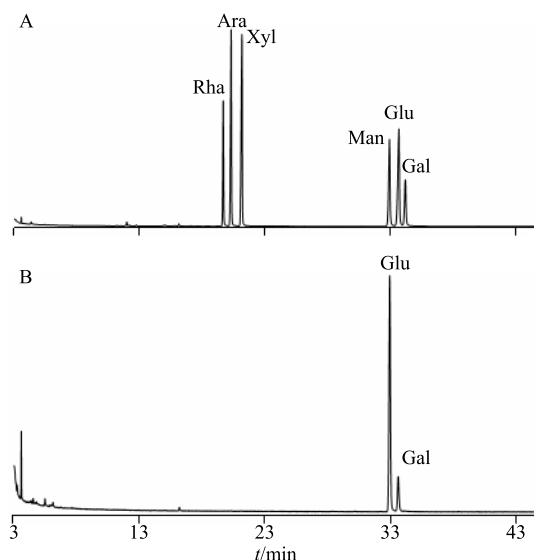
标准品与样品按“2.2.4”项的方法进行衍生, 然后进行气相色谱 (GC) 分析 (图 5)。将样品的图谱与标准图谱进行对照, 根据保留时间推断其衍生物类型。

样品衍生后进行 GC 分析, 结果见图 5-B。BPS-1 由甘露糖 (Man) 和葡萄糖 (Glc) 组成, 其物质的量比为 8:1, 说明 BSP-1 为甘葡聚糖。

3.6 BSP-1 的甲基化分析

BSP-1 经 NaH 进行脱氢、碘甲烷进行甲基化、完全酸水解及乙酰化后, GC-MS 给出 2 个主要峰, 说明 BPS-1 主要具有 2 种连接方式。结果见表 1。

图 6 中结合标准图谱及 GC 分析结果对各峰分别进行归属, 1、2 号峰相应的质谱图见图 6-P1、P2。



A-单糖对照品混合溶液 B-BSP-1 的单糖组成图
A-monosaccharide reference substance mixed solution B-monosaccharide composition of BSP-1

图 5 混合对照品溶液和 BSP-1 的单糖组成 GC 分析
Fig. 5 Monosaccharide composition analysis of mixed standard and BSP-1 by GC

表 1 BSP-1 的甲基化分析结果
Table 1 Analysis of BSP-1 methylation

峰号	t_R/min	连接方式	相对质量分数 (峰面积)	主要离子碎片
1	22.856	β -1,4	51.76	43, 58, 87, 117, 129, 189, 233
2	23.201	β -1,3,4	36.23	43, 71, 87, 127, 129, 173, 189

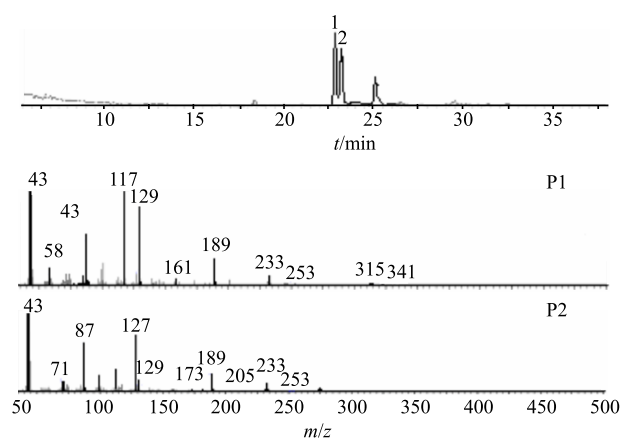


图 6 BSP-1 甲基化 TIC 图及部分甲基化的质谱图
Fig. 6 TIC chromatogram of methylated BSP-1 and mass spectra of partially methylated BSP-1

并计算该链接方式占总连接方式的百分比。甲基化的 BSP-1 中, Man 含量很高, 占总糖含量的 81.8%,

比为 8:1, 这与糖组成分析结果一致。Man 的糖环构型为吡喃型, 这与 IR 所得结果一致。根据质谱库及裂解碎片 (图 6), 确定 BSP-1 主链由 β -1,4 连接的甘露糖组成, 分支点位于甘露糖的 3 位, 侧链由末端连接的甘露糖和少量葡萄糖残基组成。

3.7 BSP-1 的核磁共振谱

β -型吡喃糖的异头碳上质子的化学位移通常低于 5.0, 氢谱中 δ 4.5~5.5 异头区域中主要有 δ 4.25、 δ 4.73 2 个主要信号 (图 7), 表明 BSP-1 以 β -构型为主。其中 δ 4.73 推测 BSP-1 含 β 糖苷键, 与 IR 中 877 cm^{-1} 处有弱吸收, 表明有 β -D-型吡喃甘露糖存在相吻合。

由 ^{13}C -NMR 可以辨认异头碳类型, $\delta_{\text{C}} 90\sim 110$ 是异头碳的共振范围^[18], 其中大于 $\delta_{\text{C}} 100$ 的为 β 型异头碳, 图 8 中显示有 2 个主要的信号, 分别为 $\delta_{\text{C}} 103.5$ 、 101.0 , 说明 BSP-1 含有 β 构型的单糖组成, 归属于 β -D-Man 的异头碳, 此与 IR 结论一致。

出现在 $\delta_{\text{C}} 76\sim 85$ 区域的化学位移, 表明 C-2、3、4 某个碳上发生了取代。 $\delta_{\text{C}} 76.8$ 表示 β -D-Man

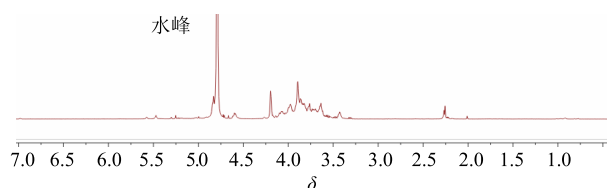


图 7 BSP-1 的 ^1H -NMR 谱
Fig. 7 ^1H -NMR spectrum of BSP-1

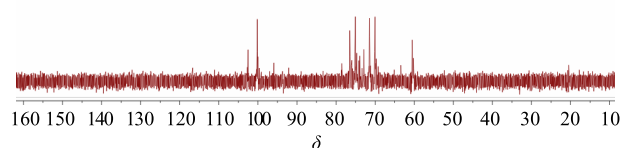


图 8 BSP-1 的 ^{13}C -NMR 谱
Fig. 8 ^{13}C -NMR spectrum of BSP-1

发生氧取代, 这也验证了甲基化的分析结果, 即 BSP-1 具有 1,4-连接片段。

3.8 BSP-1 对 HepG2 细胞增殖抑制作用

由图 9 可知, 在 200 mg/L 时, BSP-1 对 HepG2 细胞增殖抑制率最高, 48、72 h 抑制率分别为 24.8%、32.7%, 说明 BSP-1 对 HepG2 细胞增殖有一定抑制作用。

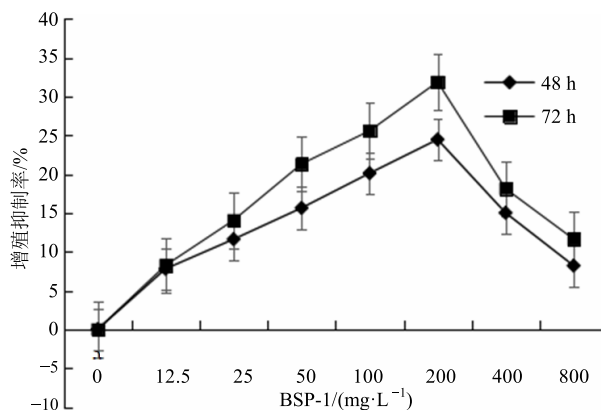


图 9 BSP-1 对 HepG2 细胞增殖抑制率
Fig. 9 Inhibition rate of BSP-1 on HepG2 cells

3.9 BSP-1 对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠免疫功能的影响

BSP-1 对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠实验结果显示 BSP-1 可显著抑制裸鼠的瘤质量, 抑制率为 66.42%, 且体质量有所上升, 而环磷酰胺组体质量有所下降。结果见表 2。

与阴性对照组相比, BSP-1 可明显升高荷瘤小鼠的脾脏指数、胸腺指数。而环磷酰胺却明显降低脾脏指数和胸腺指数 (表 3)。说明环磷酰胺化疗药物可引起荷瘤小鼠脾脏和胸腺细胞死亡, 从而导致萎缩。提示 BSP-1 发挥抗癌作用的同时可能刺激其胸腺及脾脏, 产生更多的免疫细胞, 提高小鼠的免疫功能。

4 讨论

多糖在自然界中分布很广, 以前多被认为仅提

表 2 BSP-1 对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠肿瘤生长的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 2 BSP-1 tumor inhibition rate in S₁₈₀ loading mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	体质量/g		瘤质量/g	抑瘤率/%
		给药前	给药后		
BSP-1	30	20.7±2.88	26.1±4.22	0.61±0.21**	66.42
环磷酰胺	15	21.2±1.21	20.1±3.34	0.49±0.15**	73.07
阴性对照	—	22.1±0.97	25.6±2.09	1.82±0.29	—

与阴性对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs negative control group

表3 BSP-1对S₁₈₀荷瘤小鼠免疫功能的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)Table 3 Effects of BSP-1 on immune function of S₁₈₀ bearing mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量(mg·kg ⁻¹)	脾脏指数	胸腺指数
BSP-1	30	9.36 ± 1.45*	3.16 ± 1.01*
环磷酸胺	15	6.82 ± 1.38*	2.15 ± 1.22*
阴性对照	—	7.76 ± 1.41	2.89 ± 1.08

与阴性对照组比较: * $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs negative control group

供动植物储藏的养分。近年来,随着研究的深入,发现某些多糖具有特殊的生物活性,像人体中的肝素有抗凝血作用,肺炎球菌细胞壁中的多糖有抗原作用。天然多糖在临床应用中不良反应小,目前不少多糖已应用于临床治疗肿瘤,在多个领域内显示出良好的应用前景^[19],但许多多糖的结构特征并未明确^[20]。前期研究发现白及具有抗癌活性^[21],为此,本研究对白及活性均一多糖展开了研究,对白及多糖结构进行了较为清晰的表征,同时对白及多糖BSP-1的抗肿瘤活性及机制进行了初步研究。

本研究显示,石油醚可以很好地除去白及多糖提取过程中的脂溶性成分,采用DEAE-cellulose柱色谱、SephadexG-200凝胶柱分离,洗脱曲线稳定,从中得到BSP-1多糖。HPGPC表明BSP-1为相对分子质量相对均一的多糖组分,相对分子质量为 4.72×10^5 ,多糖含量为92.8%;进一步的理化和光谱分析,表明BSP-1的结构组成为甘露糖与葡萄糖物质的量比为8:1,为典型的甘葡聚糖,连接方式主链为 β -1,4-甘露糖连接,分支点位于甘露糖的3位,侧链由末端连接的甘露糖和少量葡萄糖残基组成。

白及具有提高免疫力,修复机体损伤的作用^[22]。通过考察BSP-1体外对HepG2细胞增殖的抑制活性,进一步研究其小鼠体内抗肿瘤作用,发现BSP-1可显著抑制裸鼠的瘤质量,抑瘤率为66.42%,同时明显提高荷瘤小鼠的脾脏和胸腺指数,这将其开发成抗肿瘤药物提供理论依据。

参考文献

- [1] 俞杭苏,史珍珍,吕迪,等.白及须根与块茎的多糖成分比较研究[J].云南中医学院学报,2015,38(2): 29-32.
- [2] 赵永伟,王艳宏.白及多糖的研究进展[J].中国中医药科技,2015,22(4): 479-481.
- [3] 吕洪乐,张同华,李倩.白及多糖药理作用的研究进展[J].中国药房,2015,26(28): 4014-4016.
- [4] 李春雪,曾锐,钱妍,等.多孔性白及胶的制备及

辅料特性初步研究[J].中草药,2017,48(20): 4245-4252.

- [5] 雷震,常明泉,陈黎,等.白及的临床应用研究进展[J].中国药师,2013,16(8): 1240-1242.
- [6] Qian J, Vossoughi D, Woitaschek D, et al. Combined transarterial chemoembolization and arterial administration of *Bletilla striata* in treatment of liver tumor in rats [J]. *World J Gastroenterol*, 2003, 9(12): 2676-2680.
- [7] 王程成,崔莉,张振海,等.口服中药多糖调节肿瘤免疫应答研究思路[J].中国中药杂志,2016,41(10): 1965-1971.
- [8] 李珊珊,金银萍,姚春林,等.人参多糖的结构与活性研究进展[J].中国中药杂志,2014,39(24): 4709-4715.
- [9] 张蕾,高文远,满淑丽.黄芪中有效成分药理活性的研究进展[J].中国中药杂志,2012,37(2): 3203-3207.
- [10] Feeeeeira I C, Heleno S A, Reis F S, et al. Chemical features of *Ganoderma* polysaccharides with antioxidant, antitumor and antimicrobial activities [J]. *Phytochemistry*, 2015, 114: 38-55.
- [11] 芮海云,吴国荣,陈景耀,等.白芨中性杂多糖的分离纯化与结构解析[J].安徽农业大学学报,2004,31(1): 30-33.
- [12] 王博,徐莎,黄琳娟,等.白芨多糖BSPI-A的分离纯化及结构研究[J].食品科学,2010,31(37): 120-123.
- [13] 魏绍云,齐惠玲,王继轮,等.苯酚-硫酸法测定白及多糖[J].天津化工,2000,14(3): 35-36.
- [14] 俞晓玉,王树威,白晓燕,等.粮食中蛋白质含量的测定[J].广东化工,2017,44(4): 114-115.
- [15] 韩婷,史国华,李素哲,等.壳聚糖中蛋白质含量测定方法的研究[J].中国医疗器械杂志,2016,40(2): 122-124.
- [16] Lehrfeld J. Simultaneous gas-liquid chromatographic determination of aldonic acids and aldoses [J]. *Anal Chem*, 1985, 57: 346-347.
- [17] 张秀娟,杨姗姗.半枝莲多糖体内抗肿瘤及其免疫调节作用的实验研究[J].亚太传统医药,2008,4(2): 54-56.
- [18] 陈冠,赵振宇,傅予,等.苦豆子多糖的结构表征及其对CT26抗肿瘤活性研究[J].中草药,2017,48(6): 1103-1107.
- [19] Zhang X, Yu L, Bi H, et al. Total fractionation and characterization of the water-soluble polysaccharides isolated from *Panax ginseng* C. A. Meyer [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2009, 77(3): 544-552.
- [20] Park J E, Woo K W, Choi S U, et al. Two new cytotoxic spirostane-steroidal saponins from the roots of *Bletilla striata* [J]. *Helv Chim Acta*, 2014, 97(1): 56-63.
- [21] 谭西,周欣,陈国华.植物多糖功效关系研究进展[J].中国药理学杂志,2017,42(21): 4104-4109.
- [22] Pang S Q, Wang G Q, Wu S, et al. Effects of polysaccharides from *Bletillae Rhizoma* on the protection in rats during deep second-degree burn wound healing [J]. *J Chin Med Mater*, 2013, 36(11): 1819-1823.