

引用格式:潘峰,杨楠,陀海燕,等.超声辅助提取白及须根多糖的分离、结构表征及其抗氧化与心肌细胞保护活性研究[J].贵州师范大学学报(自然科学版),2026,44(3):122-132.[Pan Feng, Yang Nan, Tuo Haiyan, et al. Isolation, structural characterization, antioxidant and myocardial cell protective activities of polysaccharides from *Bletilla striata* fibrous roots via ultrasound-assisted extraction[J]. Journal of Guizhou Normal University (Natural Sciences), 2026, 44(3): 122-132.]

超声辅助提取白及须根多糖的分离、结构表征 及其抗氧化与心肌细胞保护活性研究

潘峰^{1,3}, 杨楠¹, 陀海燕², 史舸捷^{1,3}, 杨贤跃¹, 刘云^{1,4}, 黄雯霞¹, 谢飞燕¹, 王铭珍^{1,3}

(1. 遵义医科大学 贵州省教育厅药物肿瘤防治重点实验室, 贵州 遵义 563000; 2. 遵义职业技术学院 现代农业系, 喀斯特地区特色生物资源保护与开发利用重点实验室, 贵州 遵义 563006; 3. 遵义医科大学 生命科学研究院, 贵州 遵义 563000; 4. 遵义医科大学附属医院 法医鉴定中心, 贵州 遵义 563000)

摘要:白及须根常被废弃但富含活性成分, 研究以白及须根为材料, 通过超声辅助水提醇沉法提取多糖, 采用 DEAE-52 纤维素阴离子交换柱和葡聚糖凝胶 G-150 柱进行分离纯化。纯化后的多糖经 UV 和 HPGPC-ELSD 分析, 确认其均一性并测定分子量, 同时通过 FT-IR、PMP-HPLC、NMR 及 SEM 对其结构进行表征。最后, 通过 DPPH 和 ABTS 自由基清除实验评价其抗氧化活性, 并以阿霉素(DOX)诱导的大鼠胚胎心肌细胞 H9c2(2-1) 损伤模型评价其心肌细胞保护活性。结果表明, 多糖得率达 3.05%, 并纯化得到均一酸性杂多糖 BsP-R2-2, 其分子量为 2.1×10^4 Da。该多糖由甘露糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖和岩藻糖组成(摩尔比 10.00:1.03:4.46:15.92:1.84), 主链以 α -糖苷键构型为主, 同时含有少量 β -糖苷键, 扫描电镜呈多孔片状形态。活性研究表明 BsP-R2-2 在 6.00 mg/mL 时对 ABTS 和 DPPH 自由基清除率分别达 32.09% 和 23.25%, 在阿霉素诱导的 H9c2(2-1) 心肌细胞损伤模型中, 4.00 mg/mL 时保护率达到 26.95%, 并均呈现剂量依赖性。研究为白及须根的资源化利用提供了科学依据, 并为开发新型心肌细胞保护剂提供潜在的自然候选物质。

关键词:白及须根多糖; 分离纯化; 结构表征; 抗氧化; 心肌细胞保护

中图分类号: R932 文献标识码: A 文章编号: 1004—5570(2026)03—0122—11

DOI: 10.16614/j.gznunj.zrb.2026.03.015

Isolation, structural characterization, antioxidant and myocardial cell protective activities of polysaccharides from *Bletilla striata* fibrous roots via ultrasound-assisted extraction

Pan Feng^{1,3}, Yang Nan¹, Tuo Haiyan², Shi Gejie^{1,3}, Yang Xianyue¹,
Liu Yun^{1,4}, Huang Wenxia¹, Xie Feiyan¹, Wang Mingzhen^{1,3}

(1. The Key Lab of Guizhou Provincial Department of Education for Medical Prevention and Treatment of Tumor, Zunyi Medical

收稿日期: 2025-06-11

基金项目: 贵州省基础研究计划(自然科学类)项目(黔科合基础-ZK[2023]一般524, 黔科合基础-重点[2025]50号); 遵义市科技计划项目(遵市科合支撑 ZYZYKF[2024]4号); 贵州省科技计划项目(黔科平台人才[2019]-035); 遵义医科大学大学生创新创业训练计划(S202510661728, S202510661741)

作者简介: 潘峰(1989-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 药用植物资源开发与利用, E-mail: fpan2015@foxmail.com.

University, Zunyi, Guizhou 563000, China; 2. Key Laboratory of Conservation, Development and Utilization of Karst Characteristic Biological Resources, Department of Modern Agriculture, Zunyi Vocational and Technical College, Zunyi, Guizhou 563006, China;

3. Life Sciences Institute, Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou 563000, China; 4. Center of Forensic Expertise, Affiliated hospital of Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou 563000, China)

Abstract: The fibrous roots of *Bletilla striata*, often overlooked, harbor valuable active compounds. These roots were utilized to extract polysaccharides by employing ultrasonic-assisted water extraction and alcohol precipitation methods. Subsequently, the polysaccharides underwent purification through DEAE-52 cellulose anion exchange and Sephadex G-150 columns. Post-purification, UV and HPGPC-ELSD analyses confirmed homogeneity and determined a molecular weight. Structural elucidation utilized FT-IR, PMP-HPLC, NMR, and SEM techniques. Antioxidant properties were assessed via DPPH and ABTS free radical scavenging assays, while cardiomyocyte protective effects were evaluated by using a doxorubicin-induced rat embryonic cardiomyocyte H9c2(2-1) injury model. Results indicated a polysaccharide yield of 3.05%, yielding a homogeneous acidic heteropolysaccharide, BsP-R2-2, with a molecular weight of 2.1×10^4 Da. BsP-R2-2 comprised mannose, galacturonic acid, glucose, galactose, and fucose (molar ratio 10.00:1.03:4.46:15.92:1.84), primarily linked by α -glycosidic bonds with a minor presence of β -glycosidic bonds. Scanning electron microscopy revealed a porous flake morphology. Activity assays demonstrated that at 6.00 mg/mL, BsP-R2-2 exhibited ABTS and DPPH free radical scavenging rates of 32.09% and 23.25%, respectively. In the doxorubicin-induced H9c2(2-1) cardiomyocyte injury model, a 4.00 mg/mL concentration yielded a 26.95% protection rate, with all activities displaying dose-dependent behavior. In summary, this investigation lays a foundation for the exploitation of *B. striata* fibrous roots, presenting potential natural agents for novel cardiomyocyte protection strategies.

Keywords: polysaccharides from fibrous roots of *Bletilla striata*; separation and purification; structural characterization; antioxidation; cardiomyocyte protection

0 引言

白及为兰科植物白及属白及 *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f. 的块茎, 收载于《中国药典》2025版, 具有收敛止血、消肿生肌的功效, 主要用于吐血、咯血、外伤出血、疮疡肿毒及皮肤皲裂等症^[1]。该药材主产于我国秦岭以南的贵州、云南、湖北、广东等地, 适宜在温暖、阴凉湿润的环境中生长^[2-3]。目前白及主要利用块茎入药, 而占地下部分23%的须根被废弃, 造成资源浪费。研究表明, 白及须根水溶性物质得率达11%~15%^[4], 其醇提物的抗菌活性甚至优于块茎, 并具有抗氧化、抗肿瘤等活性, 开发潜力显著^[5]。

多糖是由10个以上单糖通过糖苷键连接形成的高分子聚合物, 具有安全性高、生物活性广泛等优势^[6-10]。白及多糖(*B. striata* polysaccharide, BSP)被认为是白及的主要活性成分^[11], 具有良好的保

湿性、抗氧化性和生物相容性, 在化妆品和医药领域应用广泛^[12-14]。目前关于白及块茎多糖的研究较多, 而须根多糖的研究报道较少。Chen等^[15]从白及须根中分离得到一种新多糖(pFSP), 该多糖能显著清除DPPH和超氧自由基, 该研究不仅为须根资源的开发利用提供了重要基础, 也凸显了白及须根多糖的研究价值。

阿霉素(Doxorubicin, DOX)是临床上广泛使用的抗癌药物, 但其可导致严重的心脏毒性, 引发心律失常、心力衰竭甚至死亡^[16-17]。目前唯一获批用于预防DOX心肌毒性的药物右丙亚胺, 虽然一定程度上推动了DOX的临床应用, 但因其剂量偏大且存在其他毒副作用, 导致其使用受限^[18]。迄今为止, 针对DOX所致心肌损伤的防治仍缺乏理想的解决方案。

本课题组在前期研究中发现, 白及多糖具有抗DOX心肌保护活性, 但不同组分的活性存在明显差异。为筛选活性更强的白及多糖组分, 同时评价

须根多糖的抗 DOX 心肌保护作用,本研究采用超声辅助水提醇沉法提取白及须根多糖,通过分离纯化、结构表征和活性评价等系统研究,以期对白及须根资源的开发利用奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 主要材料与试剂

白及全株采集贵州省遵义市正安县(地理坐标:28.559 2°N,107.461 0°E),并由课题组潘峰博士完成鉴定,确认为 *B. striata* (Thunb.) Reichb. f.。AB-8 型大孔吸附树脂购于广州伟伯科技有限公司;DEAE-52 纤维素、Sephadex G-150 凝胶均购于合肥博美生物科技有限责任公司;H9c2(2-1)细胞购于武汉尚恩生物科技有限公司;甘露糖、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖购于南京杜莱生物科技有限公司;1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)和氘代水(D₂O,纯度>99.8%)购自安耐吉化学有限公司;磺酰罗丹明 B 由上海阿拉丁试剂提供;阿霉素购买自上海士锋生物科技有限公司(纯度99.5%);2,2-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(ABTS)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)和抗坏血酸(维生素 C, Vc)购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;DMEM 培养基购自 Gibco, Thermo Fisher Scientific(美国);小牛血清购自上海道鹏生物科技有限公司;95%乙醇、氢氧化钠、三氟乙酸、碳酸钠、硫酸、苯酚、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼、2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸等试剂均为国产分析纯。

1.2 主要仪器

DLK-5010 型快速低温冷却循环机(宁波新芝生物科技股份有限公司);SHZ-D III 型循环式真空泵(上海力辰邦西仪器科技有限公司);WGL-230B 型电热鼓风干燥箱和 FW177 型中药粉碎机(均购自天津市泰斯特仪器厂);SG8200HC 型超声清洗仪(上海市冠特超声仪器有限公司);HH-6 型恒温水浴锅(上海市浦东物理光学仪器厂);JE3002 型电子天平(上海浦春计量仪器有限公司);HDL-40B 型台式离心机(常州市鸿科仪器厂);Telstar Lyo Quest 冷冻干燥机(泰事达科技公司);LC-20A 高效液相色谱仪(岛津公司);N-1300 型旋转蒸发器(上海爱朗仪器有限公司);SU8010 型扫描电子显微镜(日本日立公司);Spectra Max i3x 多功能酶标仪(美谷分子仪器有限公司);OLYMPUS CKX53 倒置式显微镜(日本奥林巴斯公司);安捷伦 400 M

核磁共振波谱仪(美国 Agilent 公司)。

1.3 白及须根粗多糖的提取与分离

将白及须根从白及块茎上分离洗净,置于烘箱中烘干、粉碎过 60 目筛,所得白及须根粉末以料液比 1:30,以 95%乙醇为脱脂溶剂,加入锥形瓶,密封后进行浸泡并直接放入超声仪冰浴超声脱脂 4 h,过滤,以上过程重复 3 次。将过滤所得滤渣样品烘干去其残存乙醇,再按料液比 1:30,以纯水为提取溶剂,在 80 °C 下加热超声辅助提取 3 次,每次 4 h,过滤,得到多糖提取液并将其浓缩至 1 L 以下,加入浓缩液 4 倍量 95%乙醇溶液,静置并收集沉淀,得到白及须根粗多糖,干燥称重。

AB-8 大孔树脂预处理后静态除杂,过滤收集水溶液。粗多糖经 DEAE-52 纤维素柱(6.5 cm × 10 cm),0.1、0.2、0.3、0.4、1 mol/mL 的 NaCl 梯度洗脱,每管 10 mL 进行收集,硫酸-苯酚法测定吸光度(490 nm)并绘制洗脱曲线。取主要多糖馏分,经 Sephadex G-150 凝胶柱(25 mm × 25 mm)进一步纯化,用蒸馏水以 0.30 mL/min 流速洗脱(5 mL/管收集),再次用苯酚-硫酸法测定 490 nm 吸光度并绘制洗脱曲线。收集主峰多糖组分,浓缩、透析、冻干。

1.4 白及须根多糖的结构特征分析

1.4.1 纯度与平均相对分子量分析

将提取分离得到的白及须根多糖样品配置成 1.0 mg/mL,0.45 μm 水系滤膜过滤于液相小瓶。选用岛津 LC-20A HPLC 高效液相系统的 TSK-gel GMP Wxl 凝胶(7.80 mm ID × 30.00 cm)色谱柱及 ELSD 检测器,以去离子水为流动相,流速 0.5 mL/min,以普通氮气为载体,通气压力维持在 350 ~ 400 kPa 之间,漂移管温度 115 °C,每针进样 5 μL,利用高效液相凝胶渗透色谱蒸发光散射检测器法(High-performance gel-permeation chromatography combined with evaporative light scattering detector, HPGPC-ELSD)色谱法进行纯度和平均相对分子量分析。根据色谱峰数目和峰形或主峰所占比例判断所分的样品纯度。同时,选用 T-系列葡聚糖(T-5, T-10, T-40, T-70 和 T-500)作为标准多糖,以相同条件进行 HPGPC-ELSD 分析,以标准多糖相对分子质量对数和保留时间对数绘制标准曲线,根据样品出峰保留时间计算多糖的平均相对分子质量。

1.4.2 UV 扫描分析

取 1.0 mg/mL 的白及须根多糖溶液 20 μL 于 96 孔板中,在 200 ~ 800 nm 区间进行紫外扫描。

1.4.3 单糖组分分析

采用1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮柱前衍生高效液相色谱法(PMP-HPLC)测定白及须根多糖的单糖组成。具体步骤见参考文献[19]。首先,取2 mg多糖样品,用3 mol/L的三氟乙酸1 mL溶解,氮气密封,90 °C加热6 h,冷却后加入甲醇共蒸馏去除三氟乙酸。将酸解后的多糖与甘露糖、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖等标准单糖溶解于0.6 mol/L NaOH中,加入PMP溶液70 °C进行衍生化,随后加入等体积0.6 mol/L HCl中和后,用三氯甲烷进行萃取,重复3次,收集水层,过0.22 μm滤膜待用。将多糖水解样品和标准多糖样品分别于安捷伦1100高效液相色谱系统(安捷伦,美国)进行分析。色谱条件为:色谱柱为Supersil AQ-C18 column(250 mm × 4.60 mm, 5 μm,大连依利特分析仪器有限公司),流动相为17%的乙腈和83% PBS(0.05 mol/L, pH 7.2, v/v)等度洗脱,流速为1 mL/min,检测波长245 nm,柱温为35 °C,进样体积10 μL。

1.4.4 FT-IR 光谱特征分析

称取白及须根均一多糖样品粉末2 mg,用KBr法压片,于4 000 ~ 400 cm⁻¹的红外区间用Varian 1000系列傅里叶变换红外分光光度计进行扫描。

1.4.5 NMR 特征分析

取部分分离纯化出的白及须根多糖约25 mg,加入0.5 mL D₂O溶解,在室温条件下,使用400 M核磁共振谱仪进行¹H NMR和¹³C NMR谱图采集,并采用MestReNova[®]软件(Mestrelab Research Inc.)对谱图进行处理与分析。

1.4.6 扫描电镜形态分析

取少量多糖样品粉末,减压条件下喷镀一薄层金原子(Au),用扫描电子显微镜(SEM)在3 kV的加速电压下放大1 000倍和5 000倍成像并拍照。

1.5 抗氧化活性测定

1.5.1 DPPH 自由基清除活性

将分离得到的多糖组分(BsP-R2-2)溶解于水,配制成6.00 mg/mL的母液,然后进行等梯度稀释,获得6.00、3.00、1.50、0.63、0.32、0.16 mg/mL不同浓度待测溶液。取60 μL各浓度多糖溶液加入96孔酶标板中,随后加入200 μL体积比百分数为0.004% DPPH乙醇溶液,充分混匀后37 °C避光反应5 min。反应完成后,于520 nm处检测吸光度(Spectra Max i3x多功能酶标仪)。用等体积水代替样品作为阴性对照,用乙醇代替DPPH溶液作为空白对照,同时以Vc(维生素C)作为标准抗氧化

剂参照。所有测定均重复3次。DPPH自由基清除率的计算公式: DPPH自由基清除活性(%) = $(A_{\text{control}} - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}})) / (A_{\text{control}}) \times 100\%$,其中 A_{control} 为阴性对照, A_{blank} 为空白对照, A_{sample} 为样品测量值

1.5.2 ABTS 自由基清除活性

采用ABTS法测定多糖样品的抗氧化能力。取6.00、3.00、1.50、0.63、0.32、0.16 mg/mL不同浓度待测溶液(60 μL)加入96孔酶标板中,再加入200 μL ABTS工作液,混匀后于37 °C避光反应5 min。反应完毕后,在734 nm波长下测定吸光度(Spectra Max i3x多功能酶标仪)。以水代替样品阴性对照,以乙醇代替ABTS工作液做空白对照。同时以Vc作为标准抗氧化剂参照。ABTS自由基清除率计算公式: ABTS自由基清除活性(%) = $1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / A_{\text{control}} \times 100\%$,式中 A_{control} 为阴性对照, A_{blank} 为空白对照, A_{sample} 为样品测量值。

1.6 白及须根多糖抗阿霉素心肌细胞保护活性分析

本研究采用H9c2(2-1)细胞系作为实验模型,细胞常规培养于含10%胎牛血清(FBS)和1%青霉素-链霉素(P/S)的DMEM培养基中,置于37 °C、5% CO₂及95%空气的恒温培养箱。实验时将细胞以 7.7×10^3 细胞/孔的密度接种于96孔板,随后进行分组处理:实验组加入含40 μg/mL阿霉素(DOX)及不同浓度(2.00 mg/mL或4.00 mg/mL)多糖溶液的培养基;阴性对照组以PBS缓冲液替代DOX和BsP-R2-2;阳性对照组仅加入40 μg/mL DOX并以PBS替代多糖。药物处理24 h后,采用SRB法检测细胞活性:先后用10%三氯乙酸固定细胞(4 °C, 1 h)、纯水洗涤5次、SRB染液染色10 min,再经1%冰乙酸洗涤5次后,用10 mmol/L Tris碱溶解结合染料,通过OLYMPUS CKX53倒置式显微镜拍照,观察细胞数量和形态,最后酶标仪530 nm波长测定吸光度值以评估细胞存活率。按照如下公式计算其抗阿霉素诱导的心肌细胞毒性的作用强弱:抗阿霉素心肌细胞存活率(%) = $(A_{\text{sample}} - A_{\text{DOX}}) / (A_{\text{control}} - A_{\text{DOX}}) \times 100$,式中, A_{sample} 为DOX和不同浓度多糖共同处理后的吸光度值; A_{DOX} 为DOX处理后的吸光度值; A_{control} 为空白对照。

1.7 统计分析

实验数据通过Excel完成初步整理与计算;组间差异显著性分析使用SPSS 19.0软件;NMR谱图处理采用MestReNova软件完成。在抗心肌细胞毒性实验中,DOX阳性对照组与不同浓度多糖处

理组间的比较采用独立样本 t 检验。所有活性数据均以均值 \pm 标准差 (Mean \pm SD) 形式呈现, 统计学显著性阈值设为 $p < 0.01$, 并在图表中以双星号 (**) 标识达到该显著性水平的差异。

2 结果与分析

2.1 白及须根粗多糖的提取分离及均一性分析

新鲜白及须根初始重量为 2 000 g, 经烘干处理后测得干重为 264 g, 计算得出其折干率为 13.2%。同时, 从白及须根中提取得到的粗多糖湿重为 122.61 g, 烘干后重量为 8.06 g, 经计算其多糖得率为 3.05%。

多糖组分的分离纯化过程采用 DEAE-52 纤维素柱层析法进行。如图 1(A) 所示, 分离过程中观察到 2 个明显的多糖组分: 收集 5 ~ 14 管洗脱液后, 经浓缩、透析及冷冻干燥处理, 获得组分 BsP-R1; 收集 17 ~ 41 管洗脱液经相同处理步骤后, 得到组分 BsP-R2。鉴于 BsP-R2 在色谱图中显示出

较高的峰面积, 表明其为样品中的主要成分, 因此选择该组分进行进一步纯化。

BsP-R2 的次级分离通过葡聚糖凝胶色谱柱完成, 见图 1(B), 分离结果显示 2 个特征峰: 收集 8 ~ 15 管得到次级组分 BsP-R2-1, 收集 22 ~ 37 管获得 BsP-R2-2。考虑到 BsP-R2-1 的色谱峰面积较小且含量较低, 后续试验仅保留主要组分 BsP-R2-2 用于后续分析测试。

白及须根多糖 BsP-R2-2 的 HPGPC-ELSD 色谱图如图 1(C) 所示, 其色谱峰形对称且杂质峰极少, 主峰占比超过 90%, 表明该多糖组分均一性好。根据葡聚糖标准品建立的分子量标准曲线 $\ln(Mw) = -18.815\ln(RT) + 62.888 (R^2 = 0.9745)$, 计算得到 BsP-R2-2 的平均分子量为 2.1×10^4 Da。UV 光谱分析结果显示, 该多糖在 260 nm 和 280 nm 处未出现特征吸收峰, 证实其核酸和蛋白质等杂质含量极低。综合结果表明, 通过超声辅助提取纯化获得的白及须根多糖 BsP-R2-2 具有良好的纯度。

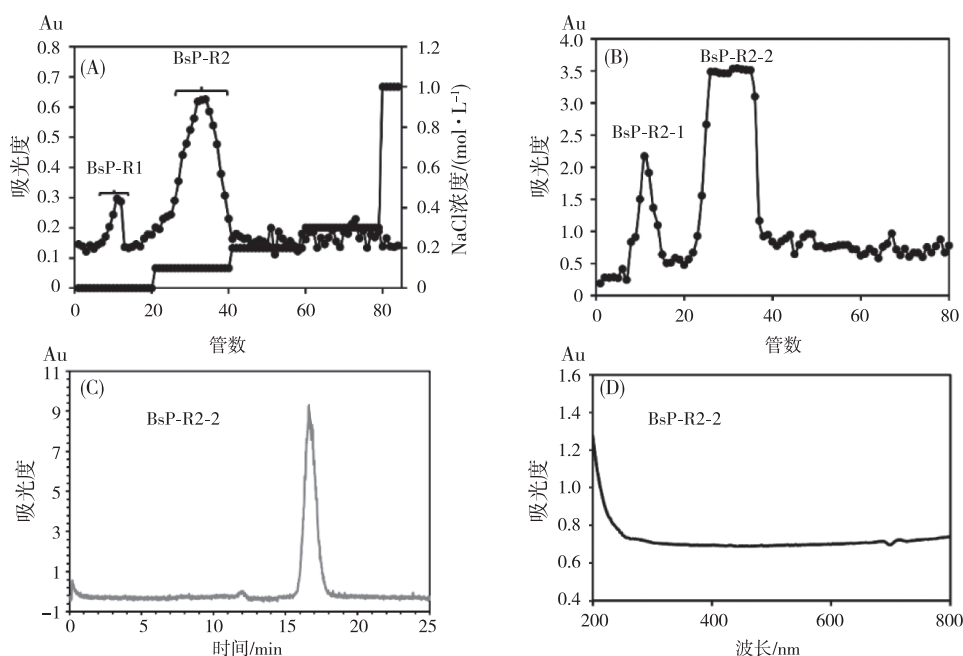


图 1 白及须根多糖分离纯化及均一性分析

Fig. 1 Separation, purification, homogeneity and purity analysis of polysaccharides from fibrous roots of *B. striata*

备注: A 为 DEAE-52 纤维素柱洗脱图; B 为 Sephadex G-150 洗脱图; C 为 HPGPC-ELSD 色谱图;

D 为 BsP-R2-2 多糖的 UV-Vis 光谱图。

2.2 白及须根多糖 BsPs-R2-2 的结构特征分析

2.2.1 单糖组分分析

通过高效液相色谱 (HPLC) 分析白及须根多糖 BsP-R2-2 的单糖组成, 发现其色谱图在 12.5 ~ 22 min 范围内存在 6 个特征峰, 见图 2(B), 与单糖

标准品图 2(A) 比对后鉴定为甘露糖 (Man)、半乳糖醛酸 (GalA)、葡萄糖 (Glc)、半乳糖 (Gal) 和岩藻糖 (Fuc), 其中半乳糖含量最高, 各单糖的摩尔比为 Man: GalA: Glc: Gal: Fuc = 10.00: 4.46: 1.03: 15.92: 1.84 (表 1)。值得注意的是, 16 min 处检出

的一显著峰在现有标准品中无对应组分,提示可能存在未知结构单糖。该多糖含3%的半乳糖醛酸,表明为酸性多糖,其组成与文献报道^[11-12,15]的白及多糖(主要含D-甘露糖、葡萄糖和D-半乳糖)存在明显差异,初步表明BsP-R2-2可能是一种新型多糖,后续将通过质谱分析等技术进一步解析该未知组分,以阐明其精细构成。

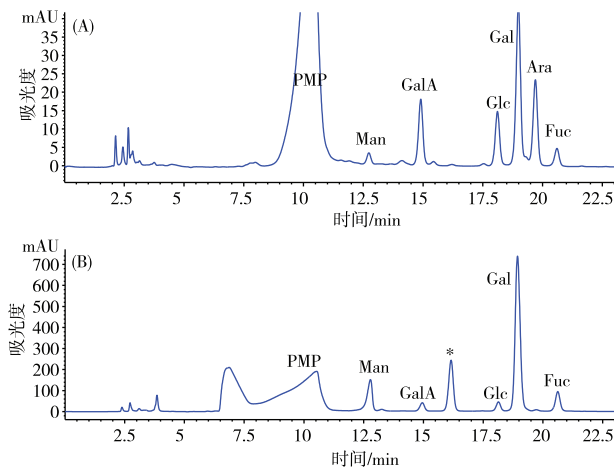


图2 白及须根多糖BsP-R2-2及单糖标准品的HPLC-DAD色谱图

Fig. 2 HPLC-DAD chromatography of the polysaccharide BsP-R2-2 from *B. striata* fibrous roots and monosaccharide standard

注:甘露糖(Man)、半乳糖醛酸(GalA)、葡萄糖(Glc)、半乳糖(Gal)、阿拉伯糖(Ara)、岩藻糖(Fuc); *表示未确定组分。

表1 白及须根多糖BsP-R2-2单糖组成成分的摩尔比

Tab. 1 The molar ratio of monosaccharide components in the polysaccharide BsP-R2-2 from *B. striata* fibrous roots

	甘露糖	半乳糖 醛酸	葡萄糖	半乳糖	岩藻糖
BsP-R2-2	10.00	4.46	1.03	15.92	1.84

2.2.2 FT-IR 光谱特征分析

白及须根多糖的FT-IR光谱图如图3所示,在 3400 cm^{-1} 区域的波段是O-H伸缩振动的吸收峰,约 2900 cm^{-1} 处的弱信号代表C-H不对称伸缩振动的吸收峰^[20]。出现在 $1640\sim 1780\text{ cm}^{-1}$ 区域的波段是羧基产物的C=O伸缩振动的吸收峰^[20]。在 1381 cm^{-1} 处的特征吸收峰为C-H键弯曲(变角)振动引起^[21],与前面 3400 cm^{-1} 左右的吸收峰一起为多糖类化合物的特征吸收峰,同时也再次验证所得样品为多糖物质。出现在 $1000\sim 1200\text{ cm}^{-1}$ 区域的 1073.63 cm^{-1} 和 1132.49 cm^{-1} 处的吸收信号归因于C-O基团的弯曲或拉伸振动^[22]。在

880 cm^{-1} 的特征吸收峰吸收表明糖残基存在吡喃糖环,也表明存在 β -异头氢碳残基^[23]。在 806 cm^{-1} 处的吸收信号可能归因于甘露糖 α -异头氢碳残基^[22],这与单糖组成成分结果相对应。综上,FT-IR结果表明BsP-R2-2是一种同时具有 β -构型和 α -构型的典型酸性多糖。

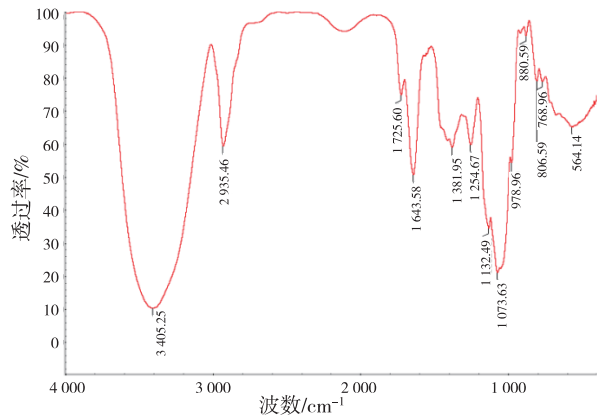


图3 白及须根多糖BsP-R2-2傅里叶变换-红外光谱(FT-IR)图谱

Fig. 3 The Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy of the polysaccharide BsP-R2-2 from *B. striata* fibrous roots

2.2.3 ¹H-NMR 和¹³C NMR 谱图特征分析

利用¹H-NMR技术对BsP-R2-2进行进一步分析,其氢谱如图4(A)所示。在该多糖的异头氢指纹区共检出8个异头氢信号,化学位移分别为 $\delta 5.30$ 、 $\delta 5.22$ 、 $\delta 5.19$ 、 $\delta 5.05$ 、 $\delta 4.98$ 、 $\delta 4.95$ 、 $\delta 4.50$ 、 $\delta 4.48$ 和 4.45 。根据文献报道,化学位移在 $4.4\sim 5.0$ 范围内的信号归属于 β -糖苷键异头氢, $\delta 5.0\sim 5.4$ 范围内的信号则对应 α -糖苷键异头氢^[24],而 $\delta 3.4\sim 4.2$ 范围的信号为糖环C2-C6位上的氢。上述分析结果表明,白及须根多糖BsP-R2-2是一种同时含有 α -和 β -糖苷键构型的杂多糖。

BsP-R2-2的¹³C NMR谱图如图4(B)所示。其中,¹³C异头碳信号出现在低场的 $\delta 90\sim 110$ 区间,而C-2、C-3、C-4和C-5的信号位于 $\delta 70\sim 75$ 区间,C-6的信号通常在高场约 $\delta 60$ 处^[25]。在BsP-R2-2的¹³C NMR谱图中,可以观察到多个异头碳信号,但碳信号的信息相比氢信号更为有限,部分信号可能因重叠或未被检测到。通常情况下, α -构型的异头碳信号区出现在 $\delta 98\sim 103$,而 β -构型的异头碳信号对应于 $\delta 103\sim 106$ 区间^[24,26]。 $\delta 102.88$ 、 $\delta 95.86$ 、 $\delta 94.21$ 和 $\delta 93.90$ 处的异头碳信号被归属为 α -吡喃糖的信号。然而,未检测到 β -吡喃糖的信号,可能是由于其信号较弱,同时也表明BsP-R2-2主要

以 α -吡喃糖形式存在。

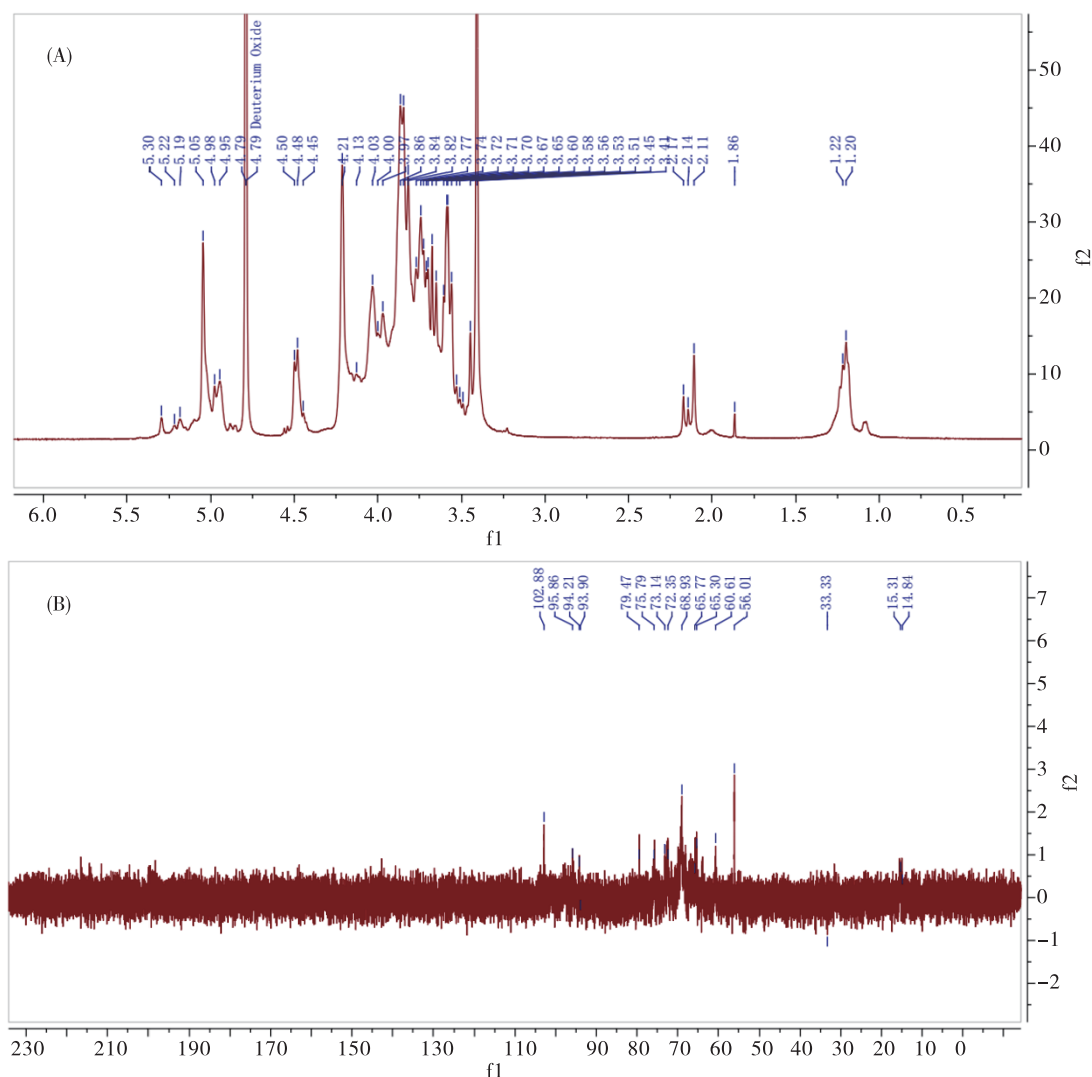


图 4 白及须根多糖 BsP-R2-2 的¹H NMR 和¹³C NMR 图谱

Fig. 4 ¹H NMR and ¹³C NMR spectra of *B. striata* fibrous roots polysaccharide BsP-R2-2

2.2.4 多糖扫描电镜形态

扫描电子显微镜 (SEM) 系统表征了白及须根多糖 BsP-R2-2 的表面形态特征 (图 5)。在不同放大倍率下, 该多糖展现出独特的微观形貌。在 1 000 × 放大倍率下观察, BsP-R2-2 主要以不规则片状结构聚集, 粒径分布较宽, 且部分较大片层结构呈现不规则多孔形貌。进一步提高至 5 000 倍率, 清晰可见片层表面具有明显的粗糙特征, 分布有凹陷结构, 边缘处存在开放式不规则孔洞, 其边缘呈现弧形特征, 暗示该多糖可能通过特定的自组装方式形成复杂的空间结构。这一多孔且粗糙的微观形貌表明 BsP-R2-2 可能具备优异的活性物质吸附与缓释性能, 其结构特征可能与分子构象及链间相互作用密切相关。

2.3 抗氧化活性

为系统评价白及须根多糖 BsP-R2-2 的体外抗氧化活性, 本研究采用 2 种经典自由基清除实验体系 (ABTS 和 DPPH) 进行测定, 结果如图 6 所示。在 ABTS 自由基清除实验中, BsP-R2-2 表现出剂量依赖性的清除效应。实验数据显示, 当多糖浓度从 0.16 mg/mL 升高至 6.00 mg/mL 时, 其清除率呈现逐步增强趋势。特别值得注意的是, 在 6.00 mg/mL 特征浓度点时, 清除活性达到 $(32.09 \pm 6.19)\%$, 这一数值暗示该多糖可能具有一定的电子转移能力。通过对浓度-效应曲线的分析发现, 虽然在较高浓度区间 (3 ~ 6 mg/mL) 清除效率的提升趋于平缓, 但其整体清除趋势仍符合典型抗氧化剂的剂量-效应特征。在 DPPH 自由基清除体系的评价

中,BsP-R2-2 在最高测试浓度(6.00 mg/mL)下的清除率为(23.25 ± 2.41)%。与阳性对照抗坏血酸(Vc)相比,BsP-R2-2 的清除效率相对较低,这种差异可能源于以下结构特性:作为一种高分子多糖化合物,BsP-R2-2 的空间位阻效应可能限制了其

活性基团与自由基的接触效率;同时,其分子链中可供氢原子的活性羟基相对密度可能低于小分子抗氧化剂。综合2项实验结果,可以判断BsP-R2-2 具有中等偏弱的自由基清除能力。

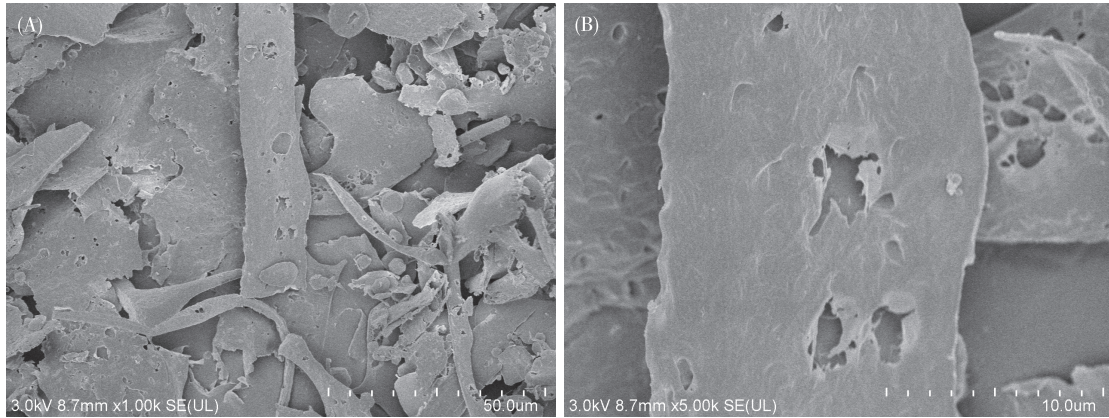


图5 白及须根多糖BsP-R2-2放大1000倍(A)和5000倍(B)扫描电镜照片

Fig.5 Scanning electron microscopy (SEM) images of the polysaccharide BsP-R2-2 from *B. striata* fibrous roots at 1000x (A) and 5000x (B) magnification

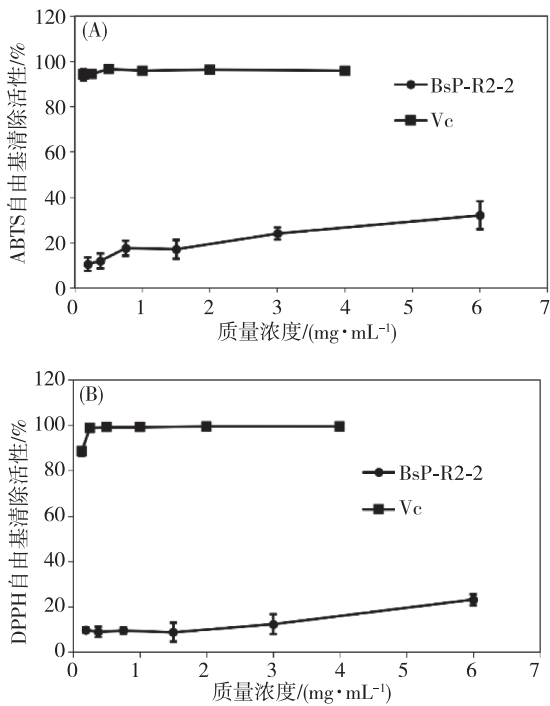


图6 白及须根多糖BsP-R2-2的ABTS自由基清除活性(A)和DPPH自由基清除活性

Fig.6 The ABTS radical scavenging activity (A) and DPPH radical scavenging activity (B) of the polysaccharide BsP-R2-2 from *B. striata* fibrous roots

2.4 抗阿霉素心肌细胞保护活性

为探究白及须根多糖(BsP-R2-2)对阿霉素(DOX)引起的心肌细胞毒性的保护作用,本研究采用H9c2(2-1)心肌细胞模型,并通过磺酰罗丹明B(SRB)染色观察细胞存活情况。如图7所示,实验分为空白对照组(未加DOX)、DOX阳性组(仅加DOX)以及不同浓度BsP-R2-2干预组。空白对照组细胞生长状态良好,细胞密度保持在90%以上,证实实验体系稳定性高,适合该种细胞生长;而加入DOX后,细胞大量死亡,表明DOX成功诱导心肌细胞毒性。相比之下,在DOX损伤模型中同时加入2.00 mg/mL BsP-R2-2处理后,细胞数量显著增加,提示多糖对DOX的细胞毒性具有一定拮抗作用,而进一步提高浓度至4.00 mg/mL时,细胞存活数量进一步增加,表明BsP-R2-2的保护活性呈现剂量增强趋势。

此外,通过SRB染色法测定吸光度,并进行定量分析(图8),结果显示,相较于DOX阳性组,2.00 mg/mL BsP-R2-2处理后,抗DOX心肌细胞毒性率达到(13.84 ± 0.31)%,而4.00 mg/mL处理组的毒性率进一步显著提升至(26.95 ± 1.63)%($P < 0.01$)。这一数据进一步验证了BsP-R2-2对DOX心脏毒性的保护作用,且随多糖浓度增加,其保护效应显著增强,呈现明显的剂量依赖性。结合形态学观察与定量分析,可初步认为白及须根多糖

可以减轻 DOX 诱导的心肌细胞损伤,其具体分子机理仍需深入研究。

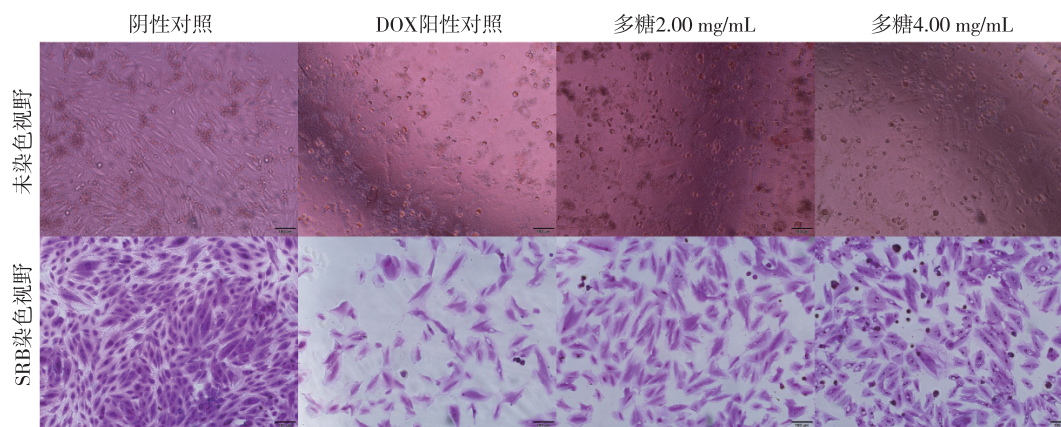


图7 H9c2(2-1)细胞BsP-R2-2 24 h后SRB染色前、后图

Fig. 7 H9c2(2-1) cells before and after SRB staining 24 hours after BsP-R2-2 treatment

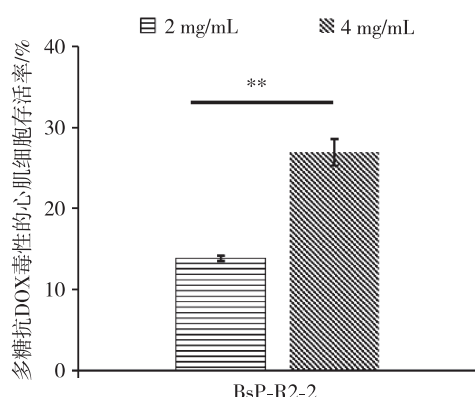


图8 不同浓度BsP-R2-2抗阿霉素心肌细胞毒性的活性

Fig. 8 The activity of BsP-R2-2 against DOX-induced cardiomyocyte cell toxicity at different concentrations

注: **, $P < 0.01$ 。

3 讨论

对白及非药用部位须根多糖成分开展了系统研究,通过超声辅助提取结合多种分离纯化手段获得主要均一多糖BsP-R2-2。结构表征表明该多糖为含半乳糖醛酸的酸性多糖,其单糖组成中以半乳糖含量最高,并含有岩藻糖,同时具有以 α/β 混合糖苷构型为主的 α/β 混合糖苷构型。值得注意的是,已有研究表明白及块茎多糖主要为 β -构型中性葡甘聚糖,其半乳糖含量通常低于5%^[11,27-28],而前期已报道的须根多糖pFSP则以半乳糖、葡萄糖和甘露糖以摩尔比2.03:1.00:3.45组成组成^[15]。这些发现共同提示,白及须根多糖在单糖组成和构型特征上显著区别于块茎多糖(主链结构均为葡甘聚糖),此外,白及须根多糖可能普遍存在高含量半

乳糖及结构多样性,这一现象值得深入探究。

在功能方面,白及多糖通常具有广泛的生理活性,如抗氧化,抗炎,促进伤口愈合等^[27,29]。生物体内过多的活性氧或自由基通常会导致DNA,蛋白质等生物大分子结构遭到严重损伤,从而导致细胞结构和功能发生明显改变,导致一系列疾病的发生^[30-31]。本研究中,BsP-R2-2与其他白及多糖一样,仍展现出一定的抗氧化活性。这提示白及多糖或可通过抗氧化展现保护机体的作用。

此外,阿霉素(DOX)作为一种高效广谱的萘环类抗肿瘤药物^[32],却具有严重的心脏毒性^[33]。寻找更安全有效的新型心肌保护成分至关重要。为此,本文研究了纯化的多糖BsP-R2-2在DOX诱导的心肌细胞损伤中的保护作用。虽然因多糖纯化量不足仅设置了2个浓度梯度,但实验结果仍明确显示白及须根多糖(BsP-R2-2)对DOX诱导的H9c2(2-1)心肌细胞毒性具有剂量依赖性保护作用,其保护效应可能与直接清除自由基、抑制凋亡或调节相关信号通路有关。未来研究应进一步验证BsP-R2-2在动物模型和临床前研究中的有效性,并深入分析其心肌细胞保护的作用机制,探索其与其他心脏保护剂的协同作用,这为开发新型心脏保护策略提供了潜在候选物质,也为白及须根的应用提供新的应用领域。

4 结论

从白及须根中分离得到一个均一酸性杂多糖BsP-R2-2,该多糖平均相对分子质量为 2.1×10^4 Da,由甘露糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖和岩藻

糖(摩尔比 10.00:1.03:4.46:15.92:1.84)组成,主要呈现 α -糖苷键构型并伴有较少 β -糖苷键;电镜观察显示其具有不规则片状多孔结构,表面存在凹陷及开放孔洞。功能研究表明,该多糖不仅具有抗氧化活性,还能显著减轻阿霉素诱导的心肌细胞毒性。这些发现不仅为白及须根的资源利用提供了科学依据,也为开发新型心肌细胞保护剂提供了潜在天然候选物质。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国药典:一部[M].北京:中国医药科技出版社,2025.
- [2] 曹琦,王学平.药用白及的生物学特性及其保护[J].安徽农业科学,2015,43(18):175-176.
- [3] 石晶,罗毅波,宋希强.我国白及市场调查与分析[J].中国园艺文摘,2010,26(8):48-50.
- [4] Jiang Fusheng, Li Weiping, Huang Yanfen, et al. Antioxidant, antityrosinase and antitumor activity comparison: the potential utilization of fibrous root part of *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e58004.
- [5] Yang Nan, Li Sanhua, Zhang Yong, et al. Evaluation of volatile components from the tuber, fibrous roots, bud, stem and leaf tissues of *Bletilla striata* for its anti-colon cancer activity[J]. Physiology and Molecular Biology of Plants, 2024, 30(4): 619-631.
- [6] 高在雯,余枝娟,张建勇.黄芪多糖减轻哮喘小鼠气道炎症和气道重塑的作用机制[J].遵义医科大学学报, 2025, 48(5): 461-470.
- [7] 杨楠,阮国永,王朝玉,等.利用大孔吸附树脂同时清除云实根粗多糖色素和蛋白成分的研究[J].贵州师范大学学报(自然科学版), 2023, 41(5): 107-113.
- [8] 周石洋,高元婷,王芙蓉,等.洋葱多糖提取及其口服液的制备研究[J].贵州师范大学学报(自然科学版), 2023, 41(2): 41-46.
- [9] 史培崢,肖珊珊,张新江,等.黄芪多糖靶向 ID1/Akt 蛋白抑制胃癌细胞增殖迁移能力的影响[J].中国实验方剂学杂志, 2025, 31(15): 96-105.
- [10] Yu Yue, Shen Mingyue, Song Qianqian, et al. Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: a review [J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 183: 91-101.
- [11] Ji Xiaolong, Yin Mingsong, Nie Hui, et al. A review of isolation, chemical properties, and bioactivities of polysaccharides from *Bletilla striata* [J]. BioMed Research International, 2020, 2020(1): 5391379.
- [12] Kong Lingshan, Yu Ling, Feng Tao, et al. Physicochemical characterization of the polysaccharide from *Bletilla striata*: effect of drying method [J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 125: 1-8.
- [13] 郭婷婷,朱峻霄,杨野,等.白及多糖作为纳米药物递送系统的分子设计及其应用进展[J].中国医药工业杂志, 2019, 50(9): 958-967.
- [14] 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.
- [15] Chen Ziyang, Zhao Yan, Zhang Mengke, et al. Structural characterization and antioxidant activity of a new polysaccharide from *Bletilla striata* fibrous roots [J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 227: 115362.
- [16] Bisht A, Avinash D, Sahu K K, et al. A comprehensive review on doxorubicin: mechanisms, toxicity, clinical trials, combination therapies and nanoformulations in breast cancer [J]. Drug Delivery and Translational Research, 2025, 15(1): 102-133.
- [17] 李白雪,赵俊峰,张松,等.基于肝 X 受体介导 NF- κ B/AVP-AQP2 复合通路的温阳消饮方抗阿霉素诱导慢性心力衰竭小鼠多靶向作用机制[J/OL].中国实验方剂学杂志, (2025-02-24) [2025-06-02]. <https://doi.org/10.13422/j.cnki.sjyfx.20250.13>.
- [18] 郭婉婕,官海静,马爱霞.右丙亚胺预防乳腺癌患者蒽环类药物化疗所致心脏毒性的效果和经济性系统综述[J].中国新药杂志, 2017, 26(11): 1328-1334.
- [19] Pan Feng, Su Tianjiao, Liu Yang, et al. Extraction, purification and antioxidation of a polysaccharide from *Fritillaria unibracteata* var. *wabuensis* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 112: 1073-1083.
- [20] Wang Yuanfeng, Mao Fangfang, Wei Xinlin. Characterization and antioxidant activities of polysaccharides from leaves, flowers and seeds of green tea [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 88(1): 146-153.
- [21] Mun G A, Nurkeeva Z S, Dergunov S A, et al. Studies on graft copolymerization of 2-hydroxyethyl acrylate onto chitosan [J]. Reactive and Functional Polymers, 2008, 68(1): 389-395.
- [22] Muhidinov Z K, Bobokalonov J T, Ismoilov I B, et al. Characterization of two types of polysaccharides from *Eremurus hissaricus* roots growing in Tajikistan [J]. Food Hydrocolloids, 2020, 105: 105768.
- [23] Wiercigroch E, Szafraniec E, Czamara K, et al. Raman and infrared spectroscopy of carbohydrates: a review [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2017, 185: 317-335.
- [24] Yao Haoyingye, Wang Junqiao, Yin Junyi, et al. A review of NMR analysis in polysaccharide structure and conformation: progress, challenge and perspective [J]. Food Re-

- search International,2021,143:110290.
- [25] Su Yue, Li Hongxuan, Hu Ziyu, et al. Research on degradation of polysaccharides during *Hericium erinaceus* fermentation[J]. *Lwt*,2023,173:114276.
- [26] Cui S W. Food carbohydrates: chemistry, physical properties, and applications[M]. Boca Raton: CRC press, 2005.
- [27] Zhu Zemei, Liang Tingting, Dai Guona, et al. Extraction, structural-activity relationships, bioactivities, and application prospects of *Bletilla striata* polysaccharides as ingredients for functional products: a review[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*,2023,245:125407.
- [28] Pan Feng, Yang Nan, Ruan Guoyong, et al. Comparative analysis of structural characteristics and cardiomyocyte protective effects of glucomannan extracted from *Bletilla striata* using varied methods[J]. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*,2024,33(8):686-704.
- [29] Chen Haoying, Zeng Jinsong, Wang Bin, et al. Structural characterization and antioxidant activities of *Bletilla striata* polysaccharide extracted by different methods[J]. *Carbohydrate Polymers*,2021,266:118149.
- [30] Pan Feng, Su Tianjiao, Cai Shimei, et al. Fungal endophyte-derived *Fritillaria unibracteata* var. wabuensis: diversity, antioxidant capacities in vitro and relations to phenolic, flavonoid or saponin compounds[J]. *Scientific Reports*,2017,7(1):42008.
- [31] 林靖莹, 黄姝玲, 孟鹏, 等. 牡蛎多糖制备工艺研究及体外抗氧化活性评价[J]. *福建师范大学学报(自然科学版)*,2023,39(3):70-77.
- [32] Sriharan S, Sivalingam N. A comprehensive review on time-tested anticancer drug doxorubicin[J]. *Life Sciences*,2021,278:119527.
- [33] Pugazhendhi A, Edison T N J I, Velmurugan B K, et al. Toxicity of Doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems[J]. *Life Sciences*,2018,200:26-30.

责任编辑:彭惠蓉

(上接第121页)

- [17] Zheng Shunzhe, Li Meng, Xu Wenqian, et al. Dual-targeted nanoparticulate drug delivery systems for enhancing triple-negative breast cancer treatment[J]. *Journal of Controlled Release*,2024,371:371-385.
- [18] 陈立弟. 铁皮石斛多糖的提取、抗氧化活性及其多糖/介孔二氧化硅纳米粒的制备研究[D]. 深圳: 深圳大学,2017.
- [19] 王晶, 刘晓盼, 刘明江, 等. 白术多糖介孔二氧化硅的制备及其对小鼠巨噬细胞吞噬能力的影响[J]. *畜牧与兽医*,2022,54(4):107-112.
- [20] 唐静, 张付利, 决利利, 等. 黄豆苷元介孔二氧化硅纳米粒缓释片制备及口服药动学研究[J]. *中草药*,2024,55(14):4700-4710.
- [21] 曾丽, 陈赛红, 赵佳梅, 等. 太子参参须多糖对 RAW264.7 细胞免疫调节作用的研究[J]. *中国预防兽医学报*,2023,45(1):79-87.
- [22] 陈雅丽, 冯文慧, 剧柠, 等. 单、双脂肪酸酯与吐温 80 复配亲水亲油平衡值对搅打稀奶油品质的影响[J]. *食品科学*,2024,45(13):1-7.
- [23] 韩晓云, 郑丹, 张雪瑶, 等. 寒地桑叶多糖化学组成及其生物活性分析[J]. *食品科学*,2024,45(15):59-66.
- [24] Rafique R, Khan K M, Chigurupati S, et al. Synthesis, in vitro α -amylase inhibitory, and radicals (DPPH & ABTS) scavenging potentials of new N-sulfonohydrazide substituted indazoles[J]. *Bioorganic Chemistry*, 2020, 94: 103410.
- [25] 杨一, 刘京, 孙巍, 等. 羟基红花黄色素 A 对自发性高血压大鼠肾损伤的保护作用[J]. *东北师大学报(自然科学版)*,2024,56(3):104-110.
- [26] 宋志强, 钱叶, 丁祥, 等. 黄边灵芝多糖的结构鉴定及免疫活性的研究[J]. *贵州师范大学学报(自然科学版)*,2020,38(6):19-27.
- [27] Derrick T, Carlee E. A, Min Xue, et al. Mesoporous silica nanoparticle nanocarriers: biofunctionality and biocompatibility[J]. *Accounts of Chemical Research*,2013,46(3):792-801.
- [28] Gu Bin, Zhao Qin, Ao Yiran. Advances in immunomodulatory mesoporous silica nanoparticles for inflammatory and cancer therapies[J]. *Biomolecules*,2024,14(9):1057.

责任编辑:彭惠蓉