

滇黄精中多糖的分离与抗氧化活性研究

王 婧¹, 陶爱恩^{1*}, 杨 燕², 杨建波³, 晏仁义^{1,4}, 段宝忠^{1*}

1. 大理大学药学院, 云南 大理 671000

2. 云南省科学技术院, 云南 昆明 650051

3. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050

4. 天津益倍生物科技集团有限公司, 天津 300132

摘要: 目的 分离纯化滇黄精 *Polygonatum kingianum* 中的均一多糖, 并阐释其理化性质和抗氧化活性。方法 通过水提醇沉、分级醇沉得滇黄精总多糖 (PKS) 的 50% 和 70% 醇沉部位, 再经 DEAE-琼脂糖凝胶 FF 离子交换柱和 Sephadex G-100 柱色谱法分离纯化得到均一多糖, 并利用柱前衍生化 HPLC、高效凝胶渗透色谱法和红外光谱法分别对其单糖组成、相对分子质量和结构进行研究; 同时采用总还原力实验、1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) 和羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 清除法对其抗氧化活性进行评价。结果 从 50% 和 70% 醇沉部位分离纯化得到 3 个均一多糖 (PKS-1、PKS-2 和 PKS-3), 其单糖组成均含有 D-甘露糖、D-半乳糖醛酸、D-葡萄糖醛酸、D-半乳糖、D-阿拉伯糖和 L-岩藻糖, 其中 PKS-1 及 PKS-3 还分别含有 D-核糖和 L-鼠李糖; 相对分子质量分别为 85 017.83、266 084.76 和 474 799.22; PKS、PKS-1 和 PKS-2 的总还原能力、 $\cdot\text{OH}$ 及 DPPH 自由基的清除能力为 $\text{PKS} > \text{PKS-2} > \text{PKS-1}$ 。结论 从滇黄精 50% 和 70% 醇沉部位分离到 3 个均一多糖, 均为含有 β 构型的吡喃环酸性多糖, 其单糖组成相似, PKS、PKS-1 和 PKS-2 均有一定的抗氧化活性, 为滇黄精抗氧化活性成分的研究及抗衰老药物和功能性食品的开发利用奠定了科学基础。

关键词: 滇黄精; D-甘露糖; D-半乳糖醛酸; D-葡萄糖醛酸; D-半乳糖; D-阿拉伯糖; L-岩藻糖; 理化性质; 抗氧化

中图分类号: R286.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)16-4789-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.16.004

Separation, physicochemical properties and anti-oxidant activities of three polysaccharides from *Polygonatum kingianum*

WANG Jing¹, TAO Ai-en¹, YANG Yan², YANG Jian-bo³, YAN Ren-yi^{1,4}, DUAN Bao-zhong¹

1. College of Pharmaceutical Science, Dali University, Dali 671000, China

2. Yunnan Provincial Academy of Science and Technology, Kunming 650051, China

3. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

4. Tianjin Ubasio Biotechnology Group Co., Ltd., Tianjin 300132, China

Abstract: Objective To investigate the physicochemical properties and antioxidant activities of homogeneous polysaccharides isolated from *Polygonatum kingianum*. **Methods** The polysaccharides (PKS) were extracted with hot water, followed by precipitating with 50% and 70% alcohol precipitation site. Three homogeneous polysaccharides were purified by DEAE-Sepharose fast flow ion column and Sephadex G-100 gel column chromatography from PKS. The monosaccharide composition and molecular ratio, molecular weight and structural analysis of homogeneous polysaccharides were detected by pre-column derivatization HPLC, HPGPC-ELSD chromatograms and infrared spectroscopic, respectively. The antioxidant activities of polysaccharides were evaluated by the reducing power, DPPH free radical and hydroxyl radical scavenging ability. **Results** Three homogeneous polysaccharides (PKS-1, PKS-2, PKS-3) were obtained from 50% and 70% alcohol precipitation site. Their monosaccharide composition was mainly D-mannose, D-GalA, D-GlcA, D-galactose, D-arabinose and L-fucose, and

收稿日期: 2021-03-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31460086); 云南省重大科技专项 (202002AA100007); 大理大学创新团队项目 (ZKLX2019318); 云南省院士专家工作站; 云南省青年拔尖人才支持计划 (段宝忠)

作者简介: 王 婧, 硕士研究生, 研究方向为中药资源与鉴定。E-mail: jwang@yntcm.ac.cn

*通信作者: 陶爱恩, 研究方向为中药资源。Tel: (0872)2257401 E-mail: 2515073996@qq.com

段宝忠, 博士, 教授, 研究方向为中药资源与鉴定。Tel: (0872)2257401 E-mail: bzduan@126.com

with a small amount of *D*-ribose, *L*-rhamnose in PKS-1 and PKS-3, respectively. The molecular weight of PKS-1, PKS-2, PKS-3 was 85 017.83, 266 084.76, and 474 799.22, respectively. The order of antioxidant activities was as follows: PKS>PKS-2>PKS-1. **Conclusion** Three polysaccharides were obtained from PKS with pyranoid rings, β type of anomeric carbon configuration and similar monosaccharide composition. Antioxidant activity test showed that PKS, PKS-1 and PKS-2 exhibited some antioxidant activity in a dose-dependent manner. This research may provide the theoretical basis for scientists researching antioxidant components, searching for anti-aging drugs and developing functional food from *P. kingianum*.

Key words: *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl.; *D*-mannose; *D*-GalA; *D*-GlcA; *D*-galactose; *D*-arabinose; *L*-fucose; physicochemical characteristic; antioxidation

滇黄精 *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl. 为药食同源大宗药材, 是中国药典收载的黄精基原植物之一^[1], 习称大黄精, 历代养生学家以及道家视之为补养强壮食品, 具有极高的药用和食用价值^[2]。已有研究表明滇黄精主要含有多糖、皂苷、黄酮类等化学成分, 其中以多糖所占比例最高^[3-5], 是其主要活性成分之一^[3,6]。现代研究表明, 多种植物多糖均可通过抗脂质过氧化和清除自由基, 调节端粒酶活性和机体的糖、脂质代谢, 以及神经-内分泌功能等多种途径来发挥抗衰老作用^[7]。由于衰老是机体各器官、组织功能随年龄增长而发生退行性变化的过程^[8], 过量的自由基如 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) 自由基、超氧阴离子及羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 是引起机体衰老的主要因素^[9-10]。目前, 从天然产物中寻找高效、低毒的清除体内自由基的抗氧化剂已成为现代医药、保健行业研究的热点^[11-12]。鉴于植物多糖是一类高效、低毒的天然抗氧化剂^[13-14], 且滇黄精资源丰富, 在营养保健、养生、老年疾病预防等领域广泛应用, 虽然有关黄精多糖抗氧化研究的报道较多^[15-17], 但这些研究对象为黄精总多糖, 且所研究植物为多花黄精 *P. cyrtoneura* Hua. 或黄精 *P. sibiricum* Red.。目前有关滇黄精中多糖分离纯化的研究, 仅见吴群绒等^[18]、Li 等^[19]分离得到 2 个均一多糖, 滇黄精中其他均一多糖的分离纯化及抗氧化活性的相关研究尚未见报道, 极大制约了相关药物产品和功能性食品的开发。因此, 本研究通过水提醇沉、分级醇沉、DEAE-琼脂糖凝胶 FF (DEAE-Sepharose Fast Flow) 离子交换柱和 Sephadex G-100 柱色谱法制备、纯化滇黄精总多糖 50% 和 70% 醇沉部位, 并利用柱前衍生化 HPLC、高效凝胶渗透色谱法和红外光谱法分别对其单糖组成、相对分子质量和结构进行研究; 同时采用总还原力实验、DPPH 和 $\cdot\text{OH}$ 清除法对其抗氧化活性进行评价, 以期为滇黄精抗衰老药物和

功能性食品的开发利用提供科学参考。

1 仪器、试剂及材料

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪 (G1322A 在线脱气机、G1311B 四元梯度泵、G7129A 进样器、G1316A 柱温箱、G4260B 型蒸发光散射检测器和 ChemStation 色谱工作站); Nexus 傅里叶变换红外光谱仪 (Thermo Nicolet); UV-5500 型紫外可见分光光度计 (上海元析仪器有限公司); HW-3 红外烘干箱 (天津市光学仪器厂); FW-4A 型粉末压片机 (天津市拓普仪器有限公司); AL204 型电子天平 (梅特勒-托利多仪器上海有限公司); Sigma 3-15 台式高速离心机 (德国 Sigma 公司); FD-1C-80 型冷冻干燥机 (北京博医康实验仪器有限公司)。

1.2 试剂

对照品右旋糖酐系列 D0 (批号 140637-201203)、D1 (批号 140638-201203)、D2 (批号 140639201203)、D3 (批号 140640-201203)、D4 (批号 140641201203)、D5 (批号 140642-201203)、D6 (批号 140643201203)、D7 (批号 140644201203)、D8 (批号 140645201203)、D2000 (批号 140646-201203), 相对分子质量 (M_w) 分别为 180、2500、4600、7100、10 000、21 400、41 100、84 400、133 800、2 000 000, 购于中国食品药品检定研究院; *D*-葡萄糖 (171106)、*D*-甘露糖 (170921)、*D*-盐酸氨基葡萄糖 (171210)、*D*-半乳糖 (批号 171206)、*L*-鼠李糖 (171024)、*L*-岩藻糖 (批号 170813)、*D*-葡萄糖醛酸 (170730)、*D*-木糖 (170912)、*D*-半乳糖醛酸 (170903)、*D*-核糖 (171103)、*D*-阿拉伯糖 (171219), 以上单糖质量分数 $\geq 98\%$, 均购于上海融禾医药科技有限公司; 牛血清白蛋白 (质量分数 $\geq 96\%$, 批号 9048-46-8, 麦克林); DPPH (东京化成工业株式会社); 3-甲基-1-苯基-5-吡唑啉酮 (PMP, 阿拉丁有限公司); 维生素 C (VC) 和三

氟乙酸 (TFA) 购于国药集团化学试剂有限公司; 其他试剂均为分析纯。

1.3 材料

玻璃色谱柱 (50 cm×2 cm), 上海夏美生化科技发展有限公司; 干型透析袋 MD34-3.5 (截留相对分子质量 3500), 北京瑞达恒辉科技发展有限公司; 滇黄精购于云南省大理市, 经大理大学药学院段宝忠教授鉴定为百合科植物滇黄精 *P. kingianum* Coll. et Hemsl. 的干燥茎, 凭证标本 (YNDL2017110201) 存放于大理大学中药标本馆。

2 方法

2.1 滇黄精均一多糖的分离与纯化

称取干燥滇黄精粉末适量置于圆底烧瓶中, 按料液比 1:4 加入石油醚-丙酮 (体积比 1:1) 加热回流脱脂 2 次, 每次 2 h, 挥干溶剂后, 加入 80%乙醇 (料液比 1:4), 加热回流 1 h, 趁热抽滤, 除去小分子单糖, 残渣用 80%热乙醇洗涤 3 次, 60 °C 烘干。称取滇黄精粉末 (0.65 kg), 以水为提取溶剂 (料液比 1:10) 在沸水浴中煎煮 40 min, 重复提取 3 次后, 滤过, 合并滤液, 60 °C 减压浓缩至小体积后, 缓慢加入 95%乙醇, 使得醇沉后终浓度为 90%, 离心, 得到沉淀物 A; 上清液浓缩, 醇沉, 使醇沉后终浓度为 95%, 得沉淀物 B; 合并沉淀物 A、B, 得滇黄精总多糖 (PKS)。将 PKS 分别采用 70%、50%乙醇醇沉, 得醇沉物 C (19.17 g) 和 D (22.62 g); C 和 D 复溶, 加入等体积的 Sevag 试剂 (正丁醇-氯仿, 1:5) 脱蛋白, 重复多次。然后用透析袋除小分子, 依次过 DEAE-琼脂糖凝胶 FF 柱和 Sephadex G-100 柱, 用蒸馏水, 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mol/L 的 NaCl 溶液进行梯度洗脱, 利用苯酚-硫酸法监测洗脱效果, 高效凝胶色谱 (HPGPC-ELSD) 检测纯度, 收集洗脱液, 透析除盐, 冷冻干燥, 从 C 部位得到多糖 PKS-1 (3.36 g), D 部位得到 PKS-2 (2.64 g)、PKS-3 (0.17 g)。

2.2 纯度检测

采用 HPGPC-ELSD 分析。色谱条件: 色谱柱 Shodex OHpak SB-804 HQ, 流动相为纯净水, 体积流量 0.6 mL/min, 柱温 30.0 °C, 进样量 10 μ L; 气压 0.3 MPa, 雾化温度 45 °C, 蒸发温度 110 °C。

2.3 M_w 测定

取已知 M_w 的右旋糖酐系列对照品 D0、D1、D2、D3、D4、D5、D6、D7、D8, D2000 适量,

精密称定, 加流动相溶液溶解至约 1 mg/mL, 混匀, 滤过, 作为窄标校正溶液, 按“2.2”项下色谱条件测定, 以保留时间为横坐标, $\lg M_w$ 值为纵坐标绘制标准曲线。

2.4 理化性质研究

滇黄精多糖的溶解性、斐林试剂反应、Molish 反应、沉淀反应、双缩脲反应、茚三酮反应等常规理化性质参照文献进行^[20]。

2.5 杂质检查

分别取滇黄精多糖配制质量浓度为 0.1 mg/mL 的水溶液, 进行紫外光谱 (UV) 扫描分析, 波长扫描范围为 190~700 nm。

2.6 红外光谱 (IR) 结构表征

取 PKS-1~3 各 1 mg 至玛瑙研钵中, 加入溴化钾粉末 200 mg 作为分散剂, 研磨均匀, 取适量细粉平铺于模具中, 以 20 MPa 压力压制 1 min, 取出, 对光检视, 以样片均匀、半透光为佳, 作为供试品。将制备好的供试品置于红外光谱仪中扫描; 光谱扫描范围 4000~400 cm^{-1} , 扫描 32 次, 分辨率为 4 cm^{-1} , 扫描时扣除 H_2O 和 CO_2 的背景。

2.7 黄精多糖的单糖组成及物质的量分析

2.7.1 HPLC 色谱条件 Agilent Zorbax-SB C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙睛 (A) -0.025 mol/L 磷酸盐缓冲溶液 (B); 梯度洗脱: 0~10 min, 15%~17% A; 10~18.5 min, 17%~22.5% A; 18.5~20 min, 22.5%~23.5% A; 20~32 min, 23.5%~30% A; 体积流量 0.8 mL/min; 柱温 35 °C; 检测波长 250 nm; 进样量 20 μ L。

2.7.2 对照品溶液的制备 精密称取各单糖对照品适量, 用蒸馏水配制成各单糖质量浓度为 0.5 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.7.3 样品酸水解溶液的制备 精密称取 PKS-1~3 各 5 mg, 置 5 mL 安瓿瓶中, 精密加入 2 mL 4 mol/L 三氟乙酸 (TFA) 溶液, 封口后置 110 °C 条件下水解 7 h, 取出, 放冷, 水浴蒸干, 残渣加入甲醇 1 mL, 烘干, 重复多次, 至 TFA 除尽; 加适量热水使沉淀溶解, 转移到 1 mL 量瓶中, 放冷, 定容, 摇匀, 得样品的酸水解溶液。

2.7.4 衍生化供试品溶液制备 分别精密吸取上述对照品和样品酸水解溶液 400 μ L, 置于 5 mL 的安瓿瓶中, 各精密加入 200 μ L 0.6 mol/L NaOH

和 0.5 mol/L PMP 溶液, 置 70 °C 条件下反应 60 min。取出, 放冷, 精密加入 200 μ L 0.6 mol/L HCl 溶液, 混匀。加入等体积的三氯甲烷, 混匀, 离心 10 min (4000 r/min), 去掉三氯甲烷层, 重复多次至三氯甲烷层无色, 即得对照品和样品的衍生化供试品。

2.7.5 单糖组成的物质的量分析 取混合对照品储备液, 分别配制质量浓度为 0.01、0.025、0.05、0.1、0.2、0.5 mg/mL 的系列溶液, 按“2.7.3”项下方法进行衍生化处理, 分别进样 20 μ L 测定。以对照品浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 并计算各对照品的组成比例。11 种单糖的回归方程及线性范围分别为 D -核糖: $Y=6\,498.2X-9.762\,8$, $0.196\,0\sim 9.800\,0\,\mu\text{g}$, $r=0.999\,7$; D -甘露糖: $Y=2\,690.1X+77.15$, $0.224\,0\sim 11.200\,0\,\mu\text{g}$, $r=0.999\,8$; L -鼠李糖: $Y=5\,912.3X+27.8$, $0.228\,0\sim 11.400\,0\,\mu\text{g}$, $r=0.999\,7$; D -半乳糖醛酸: $Y=367.57X+61.36$, $0.196\,0\sim 9.800\,0\,\mu\text{g}$, $r=0.999\,5$; D -盐酸氨基葡萄糖: $Y=1\,937.3X+14.204$, $0.240\,4\sim 12.020\,0\,\mu\text{g}$, $r=0.999\,7$; D -葡萄糖醛酸: $Y=883.43X+34.9$, $0.196\,0\sim 9.800\,0\,\mu\text{g}$, $r=0.999\,5$; D -半乳糖: $Y=1\,495.3X+142.72$, $0.196\,0\sim 9.800\,0\,\mu\text{g}$, $r=0.999\,5$; D -葡萄糖: $Y=4817X+161.23$, $0.200\,8\sim 10.040\,0\,\mu\text{g}$, $r=0.999\,6$; D -木糖: $Y=1\,992.2X+199.3$, $0.222\,0\sim 11.100\,0\,\mu\text{g}$, $r=0.999\,5$; D -阿拉伯糖: $Y=6\,077.4X+150.68$, $0.206\,0\sim 10.300\,0\,\mu\text{g}$, $r=0.999\,8$; L -岩藻糖: $Y=1\,061.8X+274.92$, $0.248\,0\sim 12.400\,0\,\mu\text{g}$, $r=0.999\,5$ 。

2.8 抗氧化活性评价

2.8.1 总还原力的测定 配制不同质量浓度 (0.2、1、2、3、4 mg/mL) PKS、PKS-1 和 PKS-2 溶液, 取上述溶液 2.0 mL, 分别加 0.2 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 6.6) 和 1% 铁氰化钾溶液 2.0 mL, 振荡混匀, 50 °C 水浴 20 min, 冷却后加入 10% 三氯乙酸溶液 2.0 mL, 混匀, 离心 10 min (3000 r/min), 取上清液 2 mL, 加入 2.0 mL 蒸馏水和 0.5 mL 0.1% 三氯化铁溶液, 混匀, 静置 15 min, 在波长 700 nm 测吸光度 (A) 值, 以蒸馏水作空白组, VC 为阳性对照, 比较不同样品的总还原能力^[21-22]。

$$\text{总还原力} = A_1 - A_2$$

A_1 为反应后样品 A 值, A_2 为样品本底 A 值

2.8.2 DPPH 自由基清除能力的测定 配制不同质量浓度 (0.2、1、2、3、4、8 mg/mL) PKS、PKS-1 和 PKS-2 溶液, 取上述溶液 2.0 mL, 加 0.1 mmol/L DPPH 无水乙醇溶液 2.0 mL, 混匀, 静置 30 min, 在 517 nm 测定 A 值, 以蒸馏水作空白组, VC 作阳性对照组, 按公式计算 DPPH 自由基的清除率^[21-22]。

$$\text{清除率} = 1 - (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / A_{\text{对照组}}$$

2.8.3 羟基自由基清除能力的测定 配制不同质量浓度 (0.2、1、2、3、4、8 mg/mL) PKS、PKS-1 和 PKS-2 供试品溶液, 精密吸取上述溶液 2.0 mL, 依次加入 2 mL 5 mmol/L FeSO_4 、5 mmol/L 水杨酸和 5 mmol/L H_2O_2 溶液, 摇匀, 37 °C 静置 30 min, 在 510 nm 处测定 A 值, 以蒸馏水作空白组, VC 作阳性对照组, 按“2.8.2”项公式计算羟基自由基的清除率^[21-22]。

3 结果与分析

3.1 样品分离及纯度分析

分别对滇黄精多糖 70% 醇沉物 (部位 C) 和 50% 醇沉物 (部位 D), 采用 DEAE-琼脂糖凝胶 FF 和 Sephadex G-100 色谱分离纯化, 用蒸馏水和不同浓度 NaCl 溶液依次洗脱, 采用苯酚-硫酸法检测多糖洗脱效果, 绘制洗脱曲线并收集同一洗脱液浓度下组分。70% 醇沉物 (部位 C) 的 HPGPC-ELSD 色谱图及洗脱曲线见图 1-a、b, 由图 1-a 可见, 部位 C 为 2 个均一多糖组成; 当 NaCl 浓度分别为 0.1、0.3 mol/L 时, 洗脱曲线有 2 个峰, 洗脱峰的峰形对称, 分别收集 2 个不同浓度洗脱液下的样品 (S1、S2), 采用 HPGPC-ELSD 检测 S1 和 S2, 其色谱图见图 1-e、g, 可见二者峰形对称, 其中 S1 的保留时间为 13.1 min, S2 的保留时间为 10.1 min, 表明为 2 个均一多糖, 分别命名为 PKS-1、PKS-3。50% 醇沉物 (部位 D) 的 HPGPC-ELSD 色谱图及洗脱曲线见图 1-c、d, 由图可见, 当 NaCl 浓度分别为 0.1、0.2 mol/L 时, 洗脱曲线有 2 个峰, 分别收集 2 个不同浓度洗脱液下的样品 (S3、S4), 采用 HPGPC-ELSD 检测 S3 和 S4, 其色谱图见图 1-f、g, 可见二者峰形对称, 表明为均一多糖, 其中 S3、S4 的保留时间分别为 11.3、10.1 min。比较发现 S4 与 S2 的保留时间一致, 提示可能为同一个化合物, 分别取 S4 及 S2 样品 1 mg 混合, 经 HPGPC-ELSD 检测得 1 个对称峰, 表明二者为同一化合物, 命名为 PKS-3; S3 命名为 PKS-2。

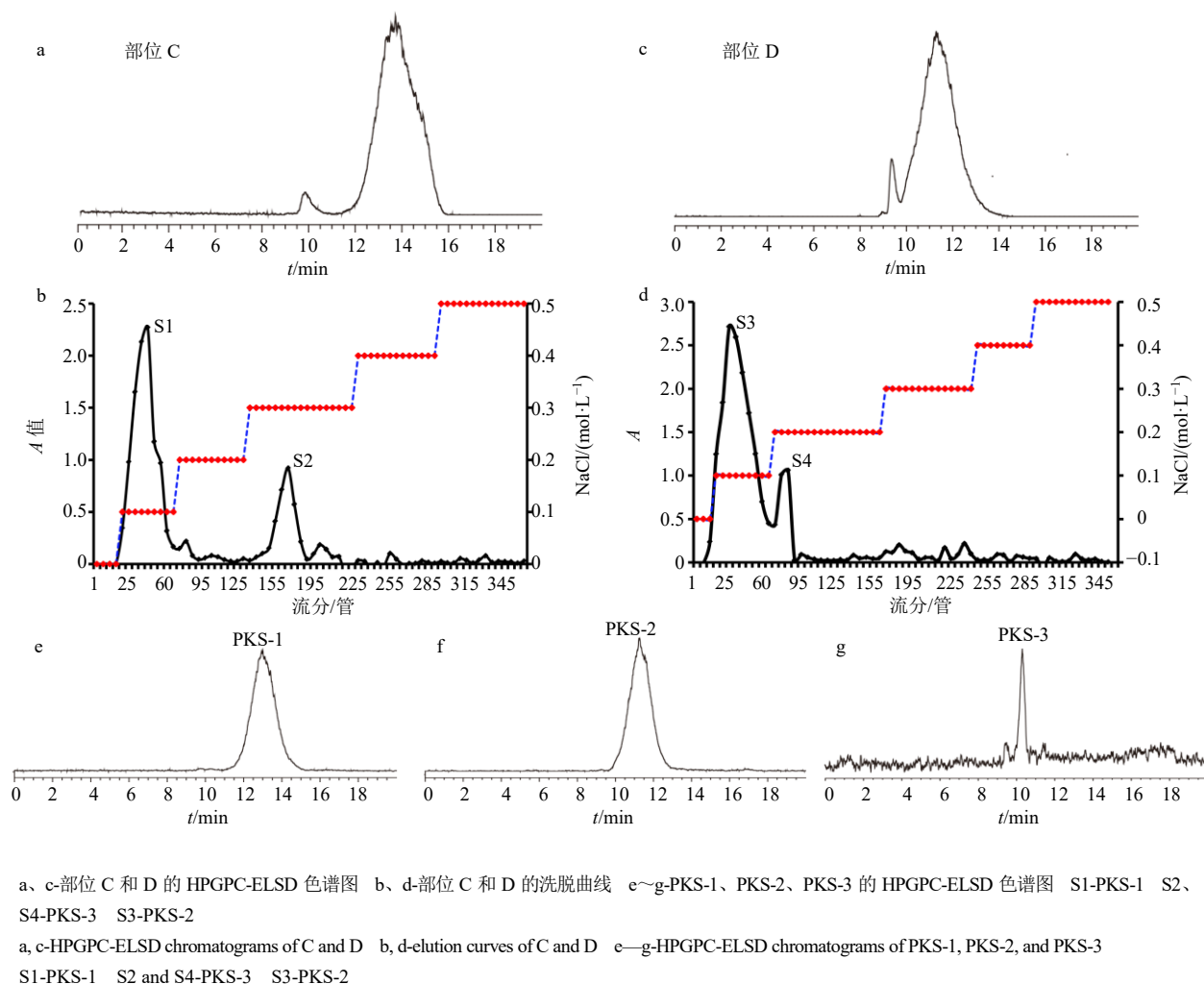


图1 滇黄精多糖的 HPGPC-ELSD 色谱图

Fig. 1 HPGPC-ELSD chromatograms and gradient elution of polysaccharide of *P. kingianum*

因此,从 C 部分和 D 部位共分离得到 3 个均一多糖。

3.2 M_w 的测定

以已测定 M_w 的葡聚糖对照品保留时间为横坐标 (X), $\lg M_w$ 为纵坐标 (Y), 得葡聚糖对照品回归方程为 $Y = -0.2549X + 8.2176$, $R^2 = 0.9949$ 。计算 3 个均一多糖的 M_w 。PKS-1、PKS-2、PKS-3 的 M_w 分别为 85 017.83、266 084.76、474 799.22。

3.3 理化性质

PKS-1、PKS-2、PKS-3 均为白色絮状物,溶于水,难溶于乙醇、氯仿、石油醚等溶剂。3 个均一多糖的 Molish 反应均为阳性,表明为糖类物质;斐林试剂反应为阴性,表明不含游离还原性单糖;沉淀反应、双缩脲反应、茚三酮反应均为阴性,表明不含蛋白质。

3.4 杂质检查

紫外光谱扫描显示 PKS 在 272 nm 有吸收峰,表明含有蛋白质或核酸等杂质,PKS-1、PKS-2、PKS-3 仅在 200 nm 处有末端吸收,为多糖的特征吸收;在 272 nm 附近无吸收峰,表明蛋白质、核酸等杂质已脱除干净。

3.5 IR 光谱分析

3 个均一多糖红外光谱见图 2,可见三者均具有明显的多糖特征峰;在 3400 cm^{-1} 附近均具有强而宽的 O-H 伸缩振动吸收峰;PKS-1~3 中羧基的 C=O 伸缩振动吸收峰分别位于 1729、1730、 1739 cm^{-1} 处,表明均含有糖醛酸结构^[23];3 个多糖分别在 951、953、 953 cm^{-1} 处有吸收,提示由吡喃糖环醚键 (-C-O-C-) 的非对称伸缩振动引起;此外,吸收峰 874、890、 890 cm^{-1} 表明 3 个多糖均具有 β 糖苷键 ($C_1\text{-H}$ 的弯曲振动)。因

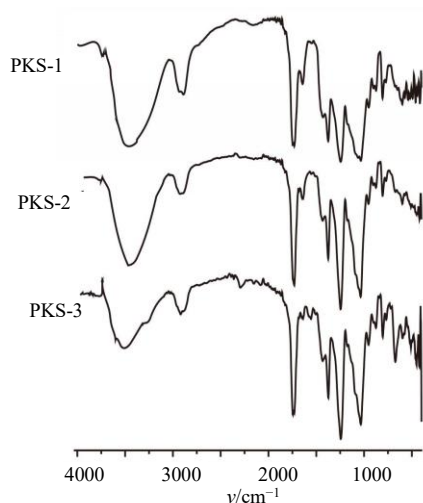


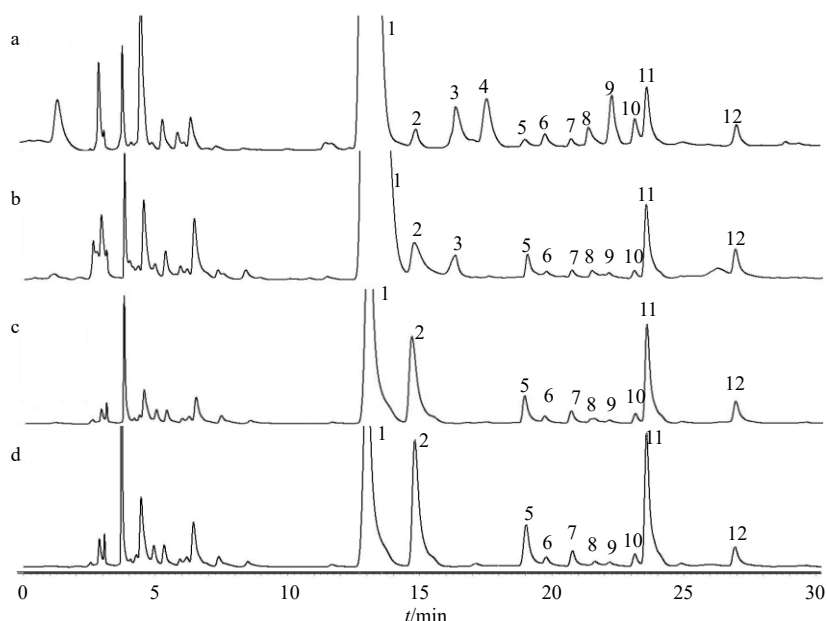
图 2 滇黄精多糖的 IR 光谱

Fig. 2 Infrared spectroscopic of polysaccharides from *P. kingianum*

此, 通过红外光谱可知, PKS-1~3 为酸性多糖, 具有 β 吡喃糖苷键构型。

3.6 单糖组成及物质的量比分析

单糖混合对照品溶液与 PKS-1~3 水解产物的 PMP 衍生色谱图见图 3。经与对照品保留时间比较, 可见 PKS-1 单糖组成主要为 *D*-甘露糖、*D*-核糖、*D*-半乳糖醛酸、*D*-盐酸氨基葡萄糖、*D*-葡萄糖醛酸、*D*-半乳糖、*D*-葡萄糖、*D*-木糖、*D*-阿拉伯糖、*L*-岩藻糖, 其物质的量比为 111.3 : 32.2 : 55.5 : 35.7 : 67.4 : 15.0 : 3.4 : 0.1 : 70.7 : 173.7; PKS-2 单糖组成为 *D*-甘露糖、*D*-半乳糖醛酸、*D*-盐酸氨基葡萄糖、*D*-葡萄糖醛酸、*D*-半乳糖、*D*-葡萄糖、*D*-木糖、*D*-阿拉伯糖、*L*-岩藻糖, 物质的量比为 118.7 : 29.9 : 13.7 : 41.6 : 7.3 : 2.3 : 8.9 : 43.2 : 75.5; PKS-3 单糖组成为 *D*-甘露糖、*L*-鼠李糖、*D*-半乳糖醛



a-对照品 b-PKS-1 c-PKS-2 d-PKS-3 1-PMP 2-*D*-甘露糖 3-*D*-核糖 4-*L*-鼠李糖 5-*D*-半乳糖醛酸 6-*D*-盐酸氨基葡萄糖 7-*D*-葡萄糖醛酸 8-*D*-半乳糖 9-*D*-葡萄糖 10-*D*-木糖 11-*D*-阿拉伯糖 12-*L*-岩藻糖
a-references b-PKS-1 c-PKS-2 d-PKS-3 1-PMP 2-*D*-mannose 3-*D*-ribose 4-*L*-rhamnose 5-*D*-galacturonic acid 6-*D*-glucosamine hydrochloride 7-*D*-glucuronic acid 8-*D*-galactose 9-*D*-glucose 10-*D*-xylose 11-*D*-arabinose 12-*L*-fucose

图 3 PKS-1~3 及对照品 PMP-HPLC 色谱图

Fig. 3 PMP-HPLC chromatograms of PKS-1—3 and reference compounds

酸、*D*-盐酸氨基葡萄糖、*D*-葡萄糖醛酸、*D*-半乳糖、*D*-葡萄糖、*D*-木糖、*D*-阿拉伯糖、*L*-岩藻糖, 其物质的量比为 82.4 : 1.0 : 21.8 : 8.4 : 25.0 : 3.7 : 1.0 : 4.4 : 28.9 : 23.9。

3.7 抗氧化活性评价

由于 PKS-3 得率较低, 未能收集到足够样品用于抗氧化能力测试。PKS、PKS-1 和 PKS-2 的总还原能力、 $\cdot\text{OH}$ 及 DPPH 自由基的清除能力如图 4

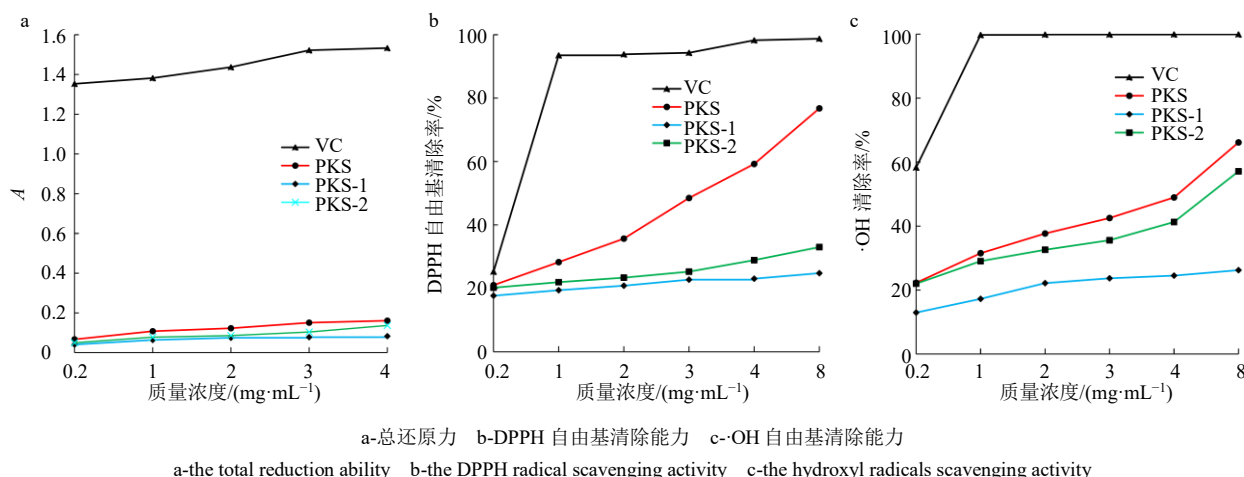


图4 滇黄精多糖对抗氧化能力

Fig. 4 Anti-oxidant capacity of polysaccharide of *P. kingianum*

所示。由图中可见, PKS、PKS-1 和 PKS-2 均具有一定的还原能力, 在 0.2~8.0 mg/mL, 3 个多糖对 DPPH 自由基和·OH 自由基清除的能力, 随着质量浓度的增加, 清除率也随之增加, 呈明显量效关系; 在清除 DPPH 自由基能力方面, 当质量浓度小于 1 mg/mL 时, PKS 和 PKS-1、PKS-2 的自由基清除能力差别不显著; 当质量浓度大于 1 mg/mL 时, PKS 对 DPPH 自由基的清除能力明显优于 PKS-1、PKS-2, 并且差别逐渐增大; 此外, 在质量浓度在 0.2~8.0 mg/mL 时, 3 个多糖的总还原能力、·OH 及 DPPH 自由基的清除能力, 抗氧化能力均为 PKS>PKS-2>PKS-1。

4 讨论

本研究采用分级沉淀法结合柱色谱分离方法, 从 PKS 的 50%、70%醇沉部位分离得到 3 个均一多糖 (PKS-1~3), 研究表明 3 个均一多糖的相对分子质量分别为 85 017.83、266 084.76 和 474 799.22。UV 光谱结果表明, 3 个均一多糖中的蛋白质、核酸等杂质已被有效去除; IR 光谱表明, PKS-1~3 为酸性多糖, 具有 β 吡喃糖苷键构型。PMP-HPLC 衍生化结果表明, 3 个均一多糖的单糖组成均含有 D-甘露糖、D-半乳糖醛酸、D-葡萄糖醛酸、D-半乳糖、D-阿拉伯糖和 L-岩藻糖, 其中 PKS-1 及 PKS-3 还分别含有 D-核糖和 L-鼠李糖, 且单糖组成物质的量比有一定差异。总还原力、DPPH 和羟自由基清除力研究显示, 滇黄精 PKS 和均一多糖 PKS-1、PKS-2 均具有一定的抗氧化活性, 3 个多糖的总还原能力、·OH 自由基及 DPPH 自由基的清除能力均为 PKS>PKS-2>PKS-1。其中总多糖

PKS 的抗氧化活性较均一多糖强, 这一结论与有关学者对仙人掌多糖的相关研究结果一致^[24]。其原因可能是 PKS1 和 PKS2 为从 90%的醇沉物中分离得到, 而总多糖 PKS 还包括了 95%的醇沉物, 总多糖的抗氧化活性可能为多种成分协同作用的结果, 这一推测亦被其它学者证实^[25]。本研究为滇黄精抗氧化活性成分的研究及抗衰老药物和功能性食品的开发利用奠定了科学基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 四部. 2015: 306.
- [2] 段宝忠, 张晓灿, 杜泽飞, 等. 滇黄精资源现状及可持续利用探讨 [J]. 大理大学学报, 2017, 2(10): 10-14.
- [3] 陶爱恩, 张晓灿, 杜泽飞, 等. 黄精属植物中黄酮类化合物及其药理活性研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49(9): 2163-2171.
- [4] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物(Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.
- [5] 陶爱恩, 杜泽飞, 赵飞亚, 等. 基于多糖组成和含量的 3 种基原黄精质量比较和识别研究 [J]. 中草药, 2019, 50(10): 2467-2473.
- [6] 王彩步, 段宝忠. 云南不同种植基地滇黄精中多糖含量测定分析 [J]. 大理大学学报, 2018, 3(2): 14-17.
- [7] 毛宇奇, 张建鹏. 植物多糖抗衰老作用的研究进展 [J]. 生物技术通讯, 2014, 25(4): 588-590.
- [8] Turnheim K. When drug therapy gets old: Pharmacokinetics and pharmacodynamics in the elderly [J]. *Exp Gerontol*, 2003, 38(8): 843-853.
- [9] 赵燕燕, 刘新霞, 陈春生, 等. 机体衰老时体内指标变化 [J]. 中国老年学杂志, 2010, 30(19): 2855-2857.

- [10] 才真, 王春革. 天然药物抗氧化、抗衰老的研究进展 [J]. 医学综述, 2014, 20(16): 2994-2995.
- [11] 赵紫伟. 衰老及抗衰老药物信号通路及发展前景 [J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2018, 25(6): 26.
- [12] 陈志蓉. 抗衰老药物的研究进展 [J]. 海峡药学, 2008, 20(1): 8-11.
- [13] 郑瑞生, 封辉, 戴聪杰, 等. 植物中抗氧化活性成分研究进展 [J]. 中国农学通报, 2010, 26(9): 85-90.
- [14] 狄莹, 石碧. 植物多酚在化妆品中的应用 [J]. 日用化学工业, 1998, 28(3): 23-29.
- [15] 柳威, 林懋怡, 刘晋杰, 等. 滇黄精研究进展及黄精研究现状 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(14): 226-234.
- [16] 李丽, 田丽娜, 任振兴, 等. 黄精多糖的结构分析及功能活性研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(15): 231-234.
- [17] 石娟, 赵煜, 雷杨, 等. 黄精粗多糖抗疲劳抗氧化作用的研究 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(6): 1409-1410.
- [18] 吴群绒, 胡盛, 杨光忠, 等. 滇黄精多糖 I 的分离纯化及结构研究 [J]. 林产化学与工业, 2005, 25(2): 80-82.
- [19] Li R S, Tao A E, Yang R M, *et al.* Structural characterization, hypoglycemic effects and antidiabetic mechanism of a novel polysaccharides from *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 131: 110687.
- [20] 高英, 叶小利, 李学刚, 等. 黄精多糖的提取及其对 α -葡萄糖苷酶抑制作用 [J]. 中成药, 2010, 32(12): 2133-2137.
- [21] 宣丽. 软枣猕猴桃多糖的结构初探及抗氧化活性、免疫活性的研究 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2013.
- [22] Chen Y X, Liu X Y, Xiao Z, *et al.* Antioxidant activities of polysaccharides obtained from *Chlorella pyrenoidosa* via different ethanol concentrations [J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 91: 505-509.
- [23] Jiang C X, Li X, Jiao Y P, *et al.* Optimization for ultrasound-assisted extraction of polysaccharides with antioxidant activity *in vitro* from the aerial root of *Ficus microcarpa* [J]. *Carbohydr Polym*, 2014, 110: 10-17.
- [24] Zhong X K, Jin X, Lai F Y, *et al.* Chemical analysis and antioxidant activities *in vitro* of polysaccharide extracted from *Opuntia Ficus indica* Mill. cultivated in China [J]. *Carbohydr Polym*, 2010, 82(3): 722-727.
- [25] Trombetta D, Puglia C, Perri D, *et al.* Effect of polysaccharides from *Opuntia ficus-indica* (L.) *Cladodes* on the healing of dermal wounds in the rat [J]. *Phytomedicine*, 2006, 13(5): 352-358.

[责任编辑 时圣明]