

制黄精多糖的结构表征及其抗氧化活性研究

龚欢¹, 覃宝怡^{1#}, 施松善¹, 张婷婷¹, 王辉俊^{1,2*}, 王顺春^{1,2*}

1. 上海中医药大学中药研究所, 上海 201203
2. 中药标准化教育部重点实验室, 上海 201203

摘要: 目的 从制黄精中提取制黄精粗多糖 (*Polygonatum cyrtonema* polysaccharides, PSP), 分离得到制黄精部位多糖, 对其结构特征和抗氧化活性进行研究。方法 采用水提醇沉法得到 PSP, 再经 DEAE-Sephrose Fast Flow 凝胶色谱柱分离得到制黄精部位多糖, 并通过高效凝胶过滤法 (high performance gel permeation chromatography, HPGPC)、离子色谱仪和近红外光谱 (fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR) 等方法对多糖的相对分子质量、单糖组成和结构特征进行研究; 采用 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl, DPPH) 自由基清除法、2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸 [2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS] 自由基清除法、羟自由基清除法和 Fe³⁺还原力测定法对多糖的体外抗氧化活性进行评价。结果 从 PSP 中分离得到 3 个制黄精部位多糖 (PSP-W、PSP-1 和 PSP-2), 各部位多糖的得率分别为 12.55%、4.22% 和 14.60%。HPGPC 测定 3 个部位多糖相对分子质量分别为 4.903×10^4 、 1.127×10^4 和 2.575×10^4 。PSP-W 的主要单糖组成为阿拉伯糖、葡萄糖、半乳糖和甘露糖, PSP-1 和 PSP-2 的主要单糖组成为阿拉伯糖、鼠李糖、半乳糖和半乳糖醛酸。FT-IR 光谱表明 3 个部位多糖含有 β -糖苷键且具有吡喃环。抗氧化研究表明, PSP-W、PSP-1 和 PSP-2 均具有抗氧化活性, 并且存在明显的浓度相关性, 其中 PSP-1 的抗氧化活性最强。结论 从 PSP 中分离得到 3 个制黄精部位多糖, 均具有一定的抗氧化活性, 可作为潜在天然抗氧化剂。为制黄精抗氧化活性机制深入研究以及制黄精多糖相关药物、食品和保健品等开发利用提供研究基础。

关键词: 制黄精; 多糖; 结构特征; 抗氧化活性; β -糖苷键

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)16-5418-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.16.005

Structural characteristics and antioxidant activity of processed *Polygonatum cyrtonema* polysaccharides

GONG Huan¹, QIN Baoyi¹, SHI Songshan¹, ZHANG Tingting¹, WANG Huijun^{1,2}, WANG Shunchun^{1,2}

1. Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China
2. Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines, Ministry of Education, Shanghai 201203, China

Abstract: Objective The crude polysaccharide (PSP) was extracted from processed *Polygonatum cyrtonema* and isolated to obtain polysaccharide fractions and their structural characteristics and antioxidant activity were investigated. **Methods** The crude polysaccharide was extracted by water-extraction and alcohol-precipitation method, then isolated by DEAE-Sephrose Fast Flow gel chromatography column to obtain polysaccharide fractions. The relative molecular weight, monosaccharide composition, and structural characterization of polysaccharide fractions were investigated by HPGPC, ion chromatograph, and FT-IR. DPPH free radicals scavenging, ABTS free radicals scavenging, hydroxyl free radicals scavenging, and Fe³⁺ reducing power assay were used to evaluate their *in vitro* antioxidant activities. **Results** Three polysaccharide fractions (PSP-W, PSP-1, and PSP-2) were isolated from PSP, with yields of 12.55%, 4.22%, and 14.6%, respectively. The molecular weights of the three polysaccharide fractions were determined by HPGPC to be 4.903×10^4 , 1.127×10^4 and 2.575×10^4 , respectively. The monosaccharide composition of PSP-W was

收稿日期: 2024-03-18

基金项目: 国家重大新药创新专项 (2019ZX09735001-004); 国家自然科学基金资助项目 (82274078)

作者简介: 龚欢, 博士研究生, 研究方向为多糖化学和生物学。E-mail: gonghuan610@163.com

#共同第一作者: 覃宝怡, 硕士研究生, 研究方向为多糖化学和生物学。E-mail: qbychy@outlook.com

*通信作者: 王辉俊, 男, 博士, 研究员, 从事中药多糖化学和生物学研究。E-mail: wanghj@shutcm.edu.cn

王顺春, 男, 博士, 研究员, 从事糖化学和糖生物学研究。E-mail: shunchunwang@126.com

arabinose, glucose, galactose, and mannose, and the monosaccharide composition of PSP-1 and PSP-2 was arabinose, galactose, galacturonic acid, and rhamnose. FT-IR spectra showed that the three polysaccharide fractions contained β -glycosidic bonds and had pyran rings. The results of antioxidant studies showed that PSP-W, PSP-1, and PSP-2 all possessed positive antioxidant activity and showed a significant concentration dependence, with PSP-1 having the strongest antioxidant activity. **Conclusion** Three polysaccharide fractions were isolated from processed *P. cyrtonema* crude polysaccharides, all of which possessed antioxidant activity and could be used as potential natural antioxidants. This study provides a research basis for the in-depth study of the mechanism of antioxidant activity of processed *P. cyrtonema* and the development and utilization of processed *P. cyrtonema* polysaccharide-related drugs, foods and health products.

Key words: processed *Polygonatum cyrtonema*; polysaccharide; structural characteristics; antioxidant activity; β -glycosidic bonds

活性氧是有氧代谢的副产物,包括羟基自由基、超氧阴离子和过氧化氢等,活性氧的形成和清除失衡可对机体蛋白质、脂质和 DNA 造成有害影响,从而引起多种疾病^[1]。通过适当地补充抗氧化剂可以一定程度上预防疾病,减少机体氧化损伤。目前常用的合成抗氧化剂有丁基化羟基苯甲醚(butylated hydroxyanisole, BHA)、丁基化羟基甲苯(butylated hydroxytoluene, BHT)、叔丁基对苯二酚(tert-butylhydroquinone, TBHQ)、没食子酸丙酯(propyl gallate, PG)和没食子酸辛酯(octyl gallate, OG)等,但据报道 BHA、TBHQ 和 PG 可能形成分子复合物,对 DNA 双螺旋结构造成损害,其他合成抗氧化剂也具有潜在的毒性,可能造成肝损伤和致癌^[2]。因此,寻找高效安全的天然抗氧化剂成为了人们迫切的需求。

目前已有多个研究表明多糖具有显著的抗氧化活性, Yang 等^[3]在大枣中分离得到的 4 种多糖组分,均具有清除 2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS] 自由基能力以及还原能力,且具有剂量相关性。Xiang 等^[4]对硒化蕈蕈多糖进行体外抗氧化活性测定实验,发现纯化得到 2 个组分表现出有效的自由基清除能力。多糖可以通过增加谷胱甘肽抗氧化歧化酶的活性和降低丙二醛的浓度、增强超氧化物歧化酶对自由基的清除作用等作用机制来发挥抗氧化作用^[5]。黄精的主要化学成分包括多糖、皂苷、黄酮、氨基酸以及生物碱等成分,其中多糖在黄精中含量最高,是黄精发挥药理作用的主要活性成分,也是《中国药典》2020 年版规定的质量控制指标^[6]。现代药理研究表明,黄精多糖的生物活性包括抗氧化^[7-8]、降血糖^[9]、抗炎^[10]、抗肿瘤^[11-12]以及免疫调节^[13]等,活性多样。由于黄精具有刺激性,一般通过蒸制使其刺激性明显降低。有研究发现黄精经过蒸制后麻舌感逐渐减少,甜味由轻微变浓,并且

蒸制过程改变了黄精的结构性质,提高了其药理活性^[14-15]。本研究以制黄精为原料,分离纯化得到制黄精部位多糖,对其结构特征及抗氧化活性进行评价,旨在为制黄精多糖的深入研究和在医药、食品等领域的广泛应用提供参考。

1 材料与仪器

1.1 仪器

LC-6M 型离心机(上海离心机械研究所),冷冻干燥机(美国 Labconco 公司), BOX 998 酶标仪(美国 BioTek 公司), ICS5000 型离子色谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),傅里叶变换红外光谱仪(美国 PerkinElmer 公司), Agilent 1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司)。

1.2 材料

制黄精(将鲜黄精洗净,置于烘箱烘干,烘干温度 55~60 °C。烘干后,再除去杂质,洗净,置于中药润药灭菌柜蒸制 2 h,蒸制温度 100~105 °C。取出放凉后切厚片,即得)购自广东一方制药有限公司,产地为湖南省平江县,经上海中医药大学中药研究所吴立宏研究员鉴定为百合科植物多花黄精 *Polygonatum cyrtonema* Hua. 的干燥根茎; 95%乙醇、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)、ABTS、过硫酸钾、铁氰化钾、三氯乙酸、氯化铁、硫酸亚铁、过氧化氢、水杨酸、维生素 C(批号 P2580691, V_C) 购自上海泰坦科技股份有限公司; 单糖标准品甘露糖(Man, 质量分数 \geq 98%)、鼠李糖(Rha, 质量分数 \geq 98%)、半乳糖醛酸(GalA, 质量分数 \geq 97%)、半乳糖(Gal, 质量分数 \geq 99%)、葡萄糖(Glc, 质量分数 \geq 99%)、葡萄糖醛酸(GlcA, 质量分数 \geq 98%)、阿拉伯糖(Ara, 质量分数 \geq 98%)、木糖(Xyl, 质量分数 \geq 99%)、岩藻糖(Fuc, 质量分数 \geq 98%)、盐酸氨基葡萄糖(GlcN, 质量分数 \geq 98%)、果糖(Fru, 质量分数 \geq 99%)、核糖(Rib, 质量分数 \geq 99%)、氨

基半乳糖盐酸盐 (GalN, 质量分数 $\geq 98\%$)、古罗糖醛酸 (GulA, 质量分数 $\geq 98\%$)、甘露糖醛酸 (ManA, 质量分数 $\geq 98\%$), 均购自博睿糖生物技术有限公司; 氢氧化钠、氯化钠、硫酸、苯酚、二甲基亚砜 (DMSO)、醋酸、乙酸酐、三氯甲烷、无水硫酸钠、三氟乙酸 (TFA) 购自国药集团化学试剂有限公司。所有试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 提取制黄精粗多糖

采用水提醇沉法提取制黄精粗多糖。称取制黄精 9.8 kg, 加入 95%乙醇水 49 L (药材与乙醇水的比例为 1:5) 回流脱脂 2 h, 滤过, 再加入 70%乙醇水 49 L 回流脱脂 2 h, 滤过, 挥干药材中的乙醇。在药材中分别加入 98 L 的水 (药材与水的比例为 1:10) 提取 3 次, 第 1 次提取 4 h, 其余 2 次各提取 3 h, 合并 3 次水提取液, 减压浓缩。在浓缩液中不断搅拌并缓慢加入 4 倍体积的 95%乙醇水, 醇沉静置 24 h, 3 600 r/min 离心 10 min 得沉淀。最后在沉淀中加入少量蒸馏水溶解, 加热挥干乙醇, 冷冻干燥, 得制黄精粗多糖 (PSP)。

2.2 粗多糖的分离

称取 PSP 7.0 g, 用 100 mL 蒸馏水溶解, 经 DEAE-Sepharose Fast Flow 凝胶色谱柱色谱, 分别以水及 0.1、0.2 mol/L 的氯化钠溶液进行梯度洗脱。利用苯酚-硫酸法在 490 nm 处测定洗脱液吸光度 (A) 值, 收集洗脱液并绘制洗脱曲线。洗脱液浓缩后以流动水透析 48 h, 冷冻干燥, 得到 3 个制黄精部位多糖 (PSP-W、PSP-1 和 PSP-2)。

2.3 制黄精部位多糖的化学组成测定

2.3.1 总糖含量测定 参考张倩茹等^[16]的方法并稍作修改, 以葡萄糖为标准品, 采用苯酚-硫酸法测定制黄精部位多糖的总糖含量。分别配制不同质量浓度 (0、0.020、0.035、0.050、0.065、0.080、0.100 mg/mL) 的葡萄糖标准溶液和 0.1 mg/mL 的多糖样品溶液。分别精密移取 400 μ L 不同质量浓度的葡萄糖标准溶液于试管中, 依次加入 200 μ L 6%苯酚溶液和 1.0 mL 浓硫酸, 混合均匀。室温放置 30 min 后于 490 nm 处测定各标准溶液的 A 值, 以葡萄糖浓度为横坐标 (X), A 值为纵坐标 (Y), 绘制葡萄糖标准曲线。分别精密移取 400 μ L 多糖样品溶液于试管中, 各管参照标准曲线同法操作, 根据标准曲线计算制黄精部位多糖的总糖含量。

2.3.2 蛋白质含量测定 参考谢先梅等^[17]的方法

并稍作修改, 以牛血清白蛋白为标准品, 采用 BCA 法测定制黄精部位多糖的蛋白质含量。按照试剂盒说明配制 BCA 工作液, 并配制不同浓度的蛋白质标准溶液和 1 mg/mL 的多糖样品溶液。在 96 孔板中分别加入 25 μ L 蛋白质标准溶液与多糖样品溶液, 再加入 200 μ L 的 BCA 工作液, 震荡 30 s, 于烘箱中在 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 取出冷却至室温后于 562 nm 处测其 A 。以蛋白质标准溶液浓度为横坐标 (X), A 值为纵坐标 (Y), 绘制蛋白质标准曲线, 并根据标准曲线计算制黄精部位多糖的蛋白质含量。

2.4 制黄精部位多糖的初级结构表征

2.4.1 相对分子质量的测定 根据之前的文献方法^[18]并稍作修改, 以不同相对分子质量的葡聚糖为标准品, 采用高效凝胶过滤法 (high performance gel permeation chromatography, HPGPC) 检测制黄精部位多糖的相对分子质量。流动相为 0.2 mol/L 的氯化钠溶液, 体积流量为 0.8 mL/min, 柱温为 40 $^{\circ}$ C, 检测器为示差检测器, 色谱柱为 Shodex KS-804 和 KS-802 串联, 进样体积为 20 μ L。以不同相对分子质量的 Dextran P-系列标准葡聚糖标准品制作标准曲线, 根据多糖样品溶液的洗脱时间与标准曲线对照, 用 Agilent GPC 软件计算其相对分子质量。

2.4.2 单糖组成分析 根据之前的文献方法^[19-20]并稍作修改, 采用离子色谱仪对制黄精部位多糖进行单糖组成分析。精密称取 5 mg 多糖样品置于安瓿中, 加入 3 mol/L 的 TFA 溶液 2 mL, 封口后置于烘箱中在 120 $^{\circ}$ C 水解反应 3 h, 准确吸取酸水解溶液转移至管中氮吹吹干。加入 5 mL 去离子水, 混合均匀后精密吸取 200 μ L 加入 800 μ L 去离子水, 离心 5 min, 取上清液进离子色谱仪分析。测定条件: 色谱柱为 Dionex CarbopacTM PA20 (150 mm \times 3 mm, 6 μ m), 流动相 A 为水, B 为 15 mmol/L NaOH 水溶液, 流动相 C 为 15 mmol/L NaOH 和 100 mmol/L NaAc, 体积流量为 0.3 mL/min, 进样量为 25 μ L, 柱温为 30 $^{\circ}$ C, 洗脱梯度: 0~20 min, 98.8% A、1.2% B; 20.1~30 min, 50% A、50% B; 30.1~46 min, 100% C; 46.1~50 min, 100% B; 50.1~80 min, 98.8% A、1.2% B, 检测器为电化学检测器。根据绝对定量方法, 使用单糖标准品进行定量。

2.4.3 UV 光谱分析 分别配制 0.1 mg/mL 的各部位多糖样品溶液, 用紫外可见分光光度计在 200~600 nm 波长进行扫描。

2.4.4 FT-IR 光谱分析 分别取各部位多糖 2 mg,

采用 KBr 压片法在 $400\sim 4\,000\text{ cm}^{-1}$ 测定多糖红外吸收光谱。

2.5 制黄精部位多糖的体外抗氧化活性测定

2.5.1 DPPH 自由基清除活性测定

参考储启明等^[21]的方法并进行修改,精密称取 9.858 mg 的 DPPH 用无水乙醇溶解,定容至 100 mL。分别准确配制 0.25、0.5、1.0、2.0、4.0 mg/mL 质量浓度梯度的 PSP-W、PSP-1 和 PSP-2 的多糖样品溶液,取 100 μL 样品溶液于 96 孔板中,加入 100 μL 的 DPPH-乙醇溶液,混合均匀,室温避光反应 30 min。以无水乙醇为空白对照, V_C 为阳性对照,测定 517 nm 处 A 值,重复 3 次。按照以下公式计算 DPPH 自由基清除率。

$$\text{DPPH 自由基清除率} = (A_0 - A_1 + A_B) / A_0$$

A_1 为样品在溶液体系中反应后在 517 nm 处 A 值, A_B 为无水乙醇代替 DPPH 溶液在溶液体系中反应后在 517 nm 处 A 值, A_0 为无水乙醇代替样品在溶液体系中反应后在 517 nm 处 A 值

2.5.2 ABTS 自由基清除活性测定

参考 Li 等^[22]的方法并进行修改,将 10.0 mL 7.4 mmol/L 的 ABTS 溶液与 10.0 mL 2.6 mmol/L 的 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_7$ 溶液混合均匀后室温避光反应 12~16 h,用蒸馏水稀释,使其在 734 nm 处 A 值为 0.70 ± 0.02 ,得 ABTS 工作液。分别准确配制 0.25、0.5、1.0、2.0、4.0 mg/mL 浓度梯度的多糖样品溶液,将 50 μL 样品溶液和 950 μL 的 ABTS 工作液混合均匀,避光反应 6 min。以蒸馏水为空白对照, V_C 为阳性对照,测定 734 nm 处 A 值,重复 3 次。按照以下公式计算 ABTS 自由基清除率。

$$\text{ABTS 自由基清除率} = (A_D - A_S + A_W) / A_D$$

A_S 为样品在溶液体系中反应后在 734 nm 处 A 值, A_W 为蒸馏水代替 ABTS 工作液在溶液体系中反应后在 734 nm 处 A 值, A_D 为蒸馏水代替样品在溶液体系中反应后在 734 nm 处 A 值

2.5.3 羟基自由基清除活性测定

参考周文文等^[23]的方法并进行修改,分别准确配制 0.25、0.5、1.0、2.0、4.0 mg/mL 质量浓度梯度的多糖样品溶液,取 200 μL 样品溶液,依次加入 200 μL 9 mmol/L 的硫酸亚铁溶液和 200 μL 8.8 mmol/L 的过氧化氢溶液混合均匀,置于烘箱 37 $^\circ\text{C}$ 恒温加热 10 min。反应完毕后加入 200 μL 9 mmol/L 的水杨酸-乙醇溶液,于 37 $^\circ\text{C}$ 恒温加热 30 min。以蒸馏水为空白对照, V_C 为阳性对照,测定 510 nm 处 A ,重复 3 次。按照以下公式计算羟基自由基清除率。

$$\text{羟基自由基清除率} = (A_L - A_H + A_F) / A_L$$

A_H 为样品在溶液体系中反应后在 510 nm 处 A 值, A_F 为蒸馏

水代替硫酸亚铁溶液、过氧化氢溶液和水杨酸-乙醇溶液在溶液体系中反应后在 510 nm 处 A 值, A_L 为蒸馏水代替样品在溶液体系中反应后在 510 nm 处 A 值。

2.5.4 Fe^{3+} 还原能力的测定

参考孙婷婷等^[24]的方法并进行修改,分别准确配制 0.25、0.5、1.0、2.0、4.0 mg/mL 浓度梯度的多糖样品溶液,取 500 μL 样品溶液,加入 60 μL 1% 铁氰化钾溶液,于 50 $^\circ\text{C}$ 水浴中反应 20 min。反应完毕后依次加入 60 μL 10% 三氯乙酸溶液和 60 μL 0.1% 氯化铁溶液混合均匀。取 400 μL 反应后的溶液加入蒸馏水稀释至 1 mL,以蒸馏水为空白对照, V_C 为阳性对照,测定 700 nm 处 A 值,重复 3 次。

3 结果与分析

3.1 多糖的得率与化学组成含量

通过水提醇沉法从制黄精中提取得到 PSP,得率为 5.60%。经 DEAE-Sepharose Fast Flow 阴离子交换色谱进行初步分离,得到 PSP-W、PSP-1 和 PSP-2 共 3 个部位多糖,各部位多糖的得率分别为 12.55%、4.22% 和 14.60%。PSP 的洗脱曲线见图 1。测定各部位多糖的总糖和蛋白质含量,标准曲线见图 2。PSP-W、PSP-1 和 PSP-2 的得率和化学组成含量见表 1。测定结果表明,PSP-W、PSP-1 和 PSP-2 的总糖含量分别为 61.35%、18.68% 和 29.14%,蛋白质含量分别为 0.86%、15.61% 和 6.35%。

3.2 相对分子质量

根据标准曲线用 Agilent GPC 软件计算 PSP-W、PSP-1 和 PSP-2 的相对分子质量。如图 3 所示,PSP-W 的相对分子质量为 4.903×10^4 ,PSP-1 的相对分子质量为 1.127×10^4 ,PSP-2 的相对分子

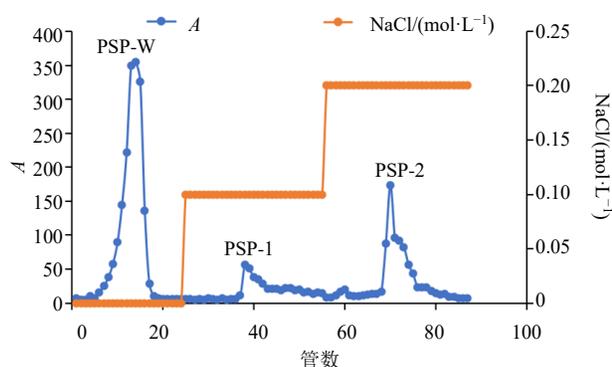


图 1 DEAE-Sepharose Fast Flow 柱色谱分离 PSP 的洗脱曲线

Fig. 1 Elute curve of PSP on DEAE-Sepharose Fast Flow column

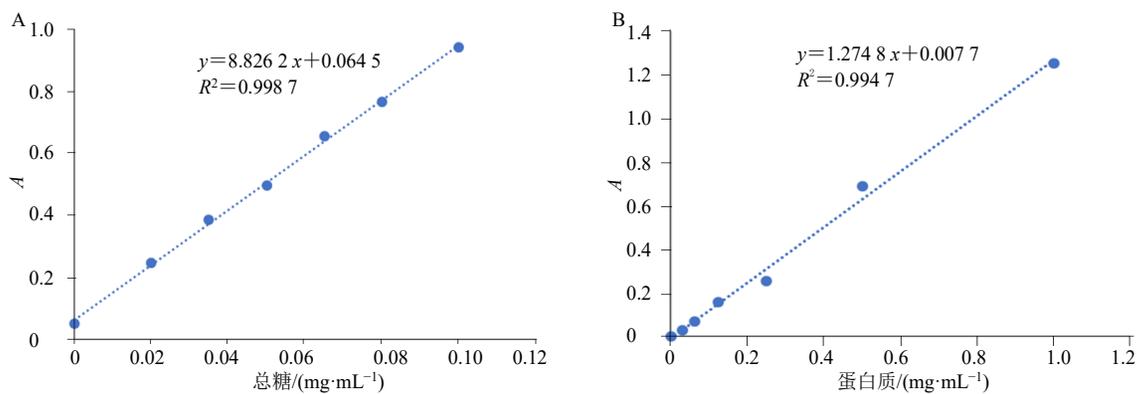


图2 PSP-W、PSP-1、PSP-2 总糖含量测定 (A)、蛋白质含量测定 (B) 的标准曲线

Fig. 2 Standard curve for determination of total sugar content (A) and protein content (B) of PSP-W, PSP-1 and PSP-2

表1 PSP-W、PSP-1、PSP-2 得率及化学组成

Table 1 Yield and chemical composition of PSP-W, PSP-1 and PSP-2

多糖	得率/%	总糖/%	蛋白质/%
PSP-W	12.55	64.35	0.86
PSP-1	4.22	18.68	15.61
PSP-2	14.60	29.14	6.35

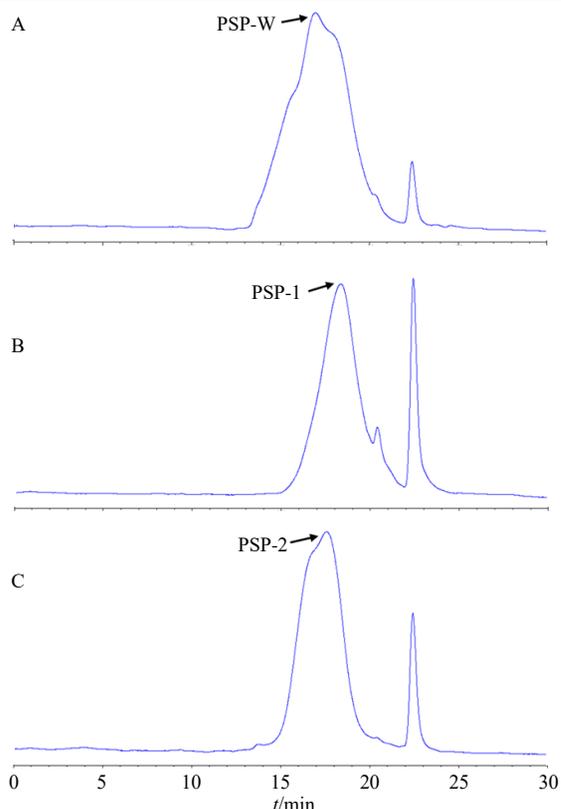


图3 PSP-W (A)、PSP-1 (B)、PSP-2 (C) 的相对分子质量的 HPLC

Fig. 3 HPLC chromatograms of relative molecular weight of PSP-W (A), PSP-1 (B) and PSP-2 (C)

质量为 2.575×10^4 。3 个制黄精部位多糖相对分子质量大小排序为 PSP-W > PSP-2 > PSP-1。

3.3 单糖组成分析

单糖混标和制黄精部位多糖的离子色谱图如图 4 所示, 显示制黄精各部位多糖均为杂多糖。由表 2 可知, PSP-W 主要含有阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖和甘露糖, 物质的量百分比分别为 3.9%、66.5%、5.1%和 20.9%, 半乳糖是其主要的单糖成分。PSP-1 主要含有鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖和半乳糖醛酸, 物质的量百分比分别为 2.9%、7.7%、36.4%、49.2%。PSP-2 单糖组成中鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖和半乳糖醛酸含量较高, 物质的量百分比分别为 6.7%、9.5%、44.8%、37.3%。综上, PSP-W 是 1 种中性多糖, PSP-1 和 PSP-2 均为酸性多糖, 3 个制黄精部位多糖均有较高含量的半乳糖。

3.4 UV 光谱分析

制黄精部位多糖的 UV 谱图如图 5 所示, 在 280 nm 处有小的紫外吸收峰, 说明经 DEAE-Sephrose Fast Flow 阴离子交换色谱初步分离后的部位多糖可能含有少量的蛋白质, 与蛋白质含量测定结果一致。

3.5 FT-IR 光谱分析

制黄精部位多糖的 FT-IR 谱图如图 6 所示, 3 个多糖谱图具有一定的相似性, 谱图中具有 $3\ 600 \sim 3\ 000$ 、 $3\ 000 \sim 2\ 800$ 、 $1\ 400 \sim 1\ 200$ 、 $1\ 200 \sim 700\ \text{cm}^{-1}$ 的多糖特征吸收峰^[25]。 $3\ 300\ \text{cm}^{-1}$ 附近宽而强烈的峰由 O-H 伸缩振动引起, $2\ 900$ 、 $1\ 400 \sim 1\ 200\ \text{cm}^{-1}$ 附近的峰对应于 C-H 的伸缩振动和变角振动^[26-28]。 $1\ 735 \sim 1\ 600\ \text{cm}^{-1}$ 附近的特征吸收峰是由 -COOH 中的 C=O 伸缩振动引起的, 提示该部位多糖中存在微量糖醛酸^[25,29]。 $1\ 045 \sim 1\ 000$ 、 $898 \sim 884\ \text{cm}^{-1}$ 的特征

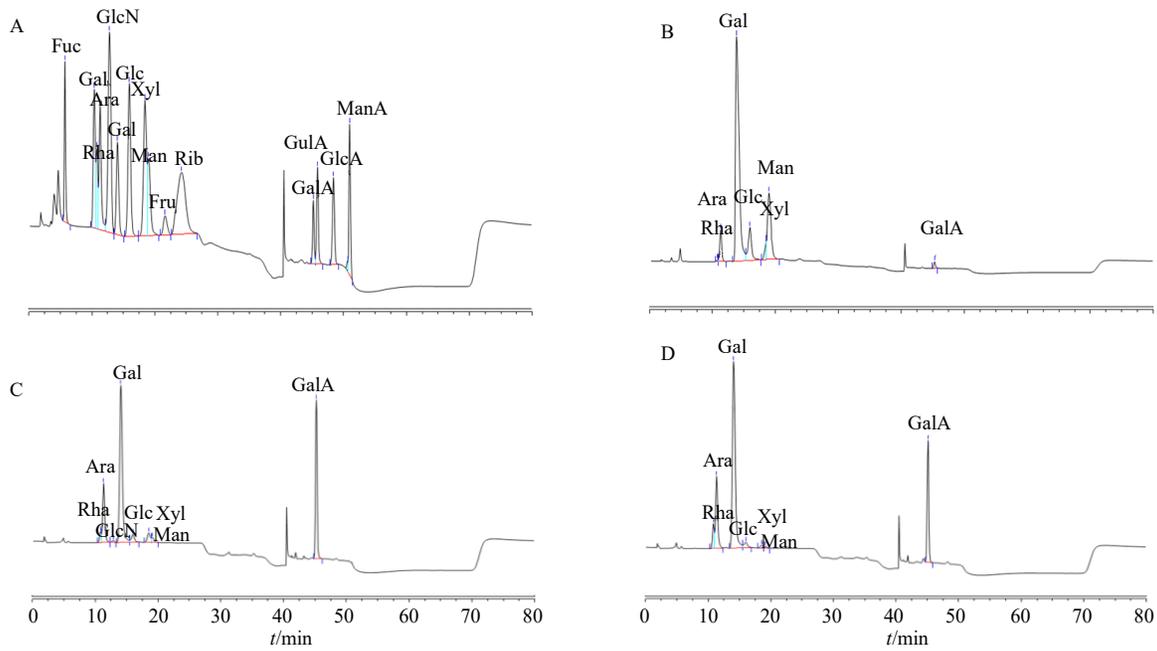


图4 单糖标准品 (A) 及 PSP-W (B)、PSP-1 (C)、PSP-2 (D) 的离子色谱图
 Fig. 4 IC spectra of monosaccharide standards (A), PSP-W (B), PSP-1 (C) and PSP-2 (D)

表2 PSP-W、PSP-1、PSP-2 的单糖组成

Table 2 Monosaccharide composition of PSP-W, PSP-1 and PSP-2

单糖	物质的量百分比/%							
	Rha	Ara	GlcN	Gal	Glc	Xyl	Man	GalA
PSP-W	0.3	3.9	-	66.5	5.1	1.3	20.9	1.8
PSP-1	2.9	7.7	0.1	36.4	1.1	1.5	1.1	49.2
PSP-2	6.7	9.5	-	44.8	0.8	0.4	0.4	37.3

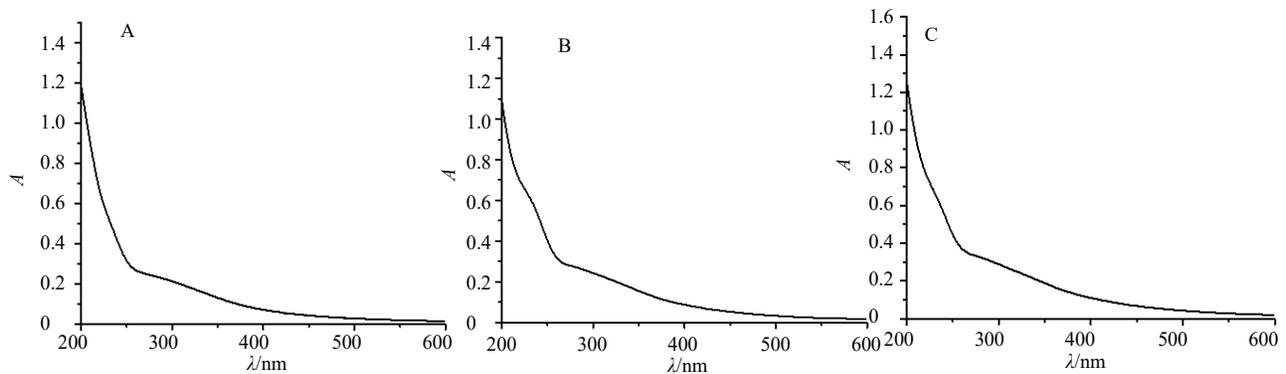


图5 PSP-W (A)、PSP-1 (B) 和 PSP-2 (C) 的 UV 光谱图
 Fig. 5 UV spectra of PSP-W (A), PSP-1 (B) and PSP-2 (C)

吸收峰的存在表明多糖中含有吡喃糖环内酯键和 β-糖苷键^[30-31]。综上，PSP-W、PSP-1 和 PSP-2 是含有 β-糖苷键和吡喃环的中性或酸性多糖。

3.6 体外抗氧化活性

3.6.1 DPPH 自由基清除活性测定 DPPH-乙醇溶液呈紫色，在 517 nm 处有最大吸收。当具有供氢

能力的自由基清除物质与 DPPH 自由基结合时，DPPH 的吸收波长会发生蓝移，使 517 nm 处 A 值减小^[32]。如图 7-A 结果表明，PSP-W、PSP-1 和 PSP-2 对 DPPH 自由基均有一定的清除能力，在 0.25~4 mg/mL 内，清除率随多糖质量浓度的升高而增加，呈一定的量效关系。当多糖质量浓度小于 1 mg/mL

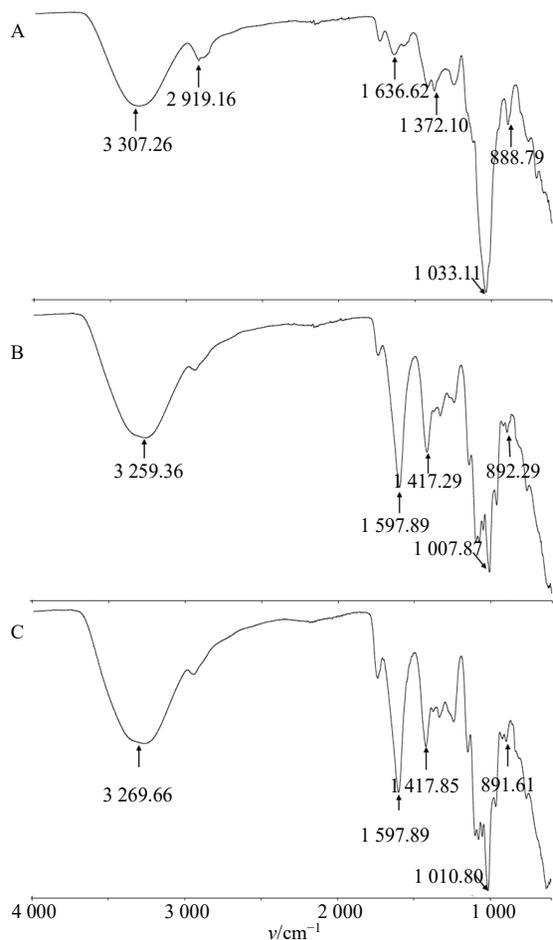


图6 PSP-W (A)、PSP-1 (B) 和 PSP-2 (C) 的 FT-IR 光谱图
Fig. 6 FT-IR spectra of PSP-W (A), PSP-1 (B) and PSP-2 (C)

时, PSP-2 的清除能力略强于 PSP-1, 但在高质量浓度时, PSP-1 的清除能力略优于 PSP-2。总的来说, DPPH 自由基清除能力的变化趋势为 PSP-1 > PSP-2 > PSP-W。当质量浓度为 4 mg/mL 时, PSP-W、PSP-1 和 PSP-2 的自由基清除能力分别为 53%、84%、81%, 表明初步分离的制黄精部位多糖具有显著的 DPPH 自由基清除能力, 是一种天然的抗氧化剂。

3.6.2 ABTS 自由基清除活性测定 ABTS 自由基与氧化剂反应氧化成绿色, 在 734 nm 处有最大吸收。当具有抗氧化活性的物质与 ABTS 自由基结合时, 会引起颜色变化, 导致 734 nm 处的 A 值减小^[33]。图 7-B 结果表明, PSP-1 在测定质量浓度范围内对 ABTS 自由基有显著的清除能力, 且清除率随多糖质量浓度的升高而增加, 具有明显的质量浓度相关性。在 0.25~4 mg/mL, PSP-W、PSP-1 和 PSP-2 对 ABTS 阳离子自由基的清除率呈良好的线性关系。PSP-W 的清除率为 10%~19%, PSP-1 为 13%~66%, PSP-2 为 12%~37%。综上, PSP-1 清除 ABTS 自由基的能力最强, 其次是 PSP-2 和 PSP-W。

3.6.3 羟基自由基清除活性测定 反应体系中产生羟基自由基的原理是 Fenton 反应, 在反应体系中加入水杨酸可迅速捕获羟基自由基, 生成紫色化合物, 在 510 nm 处有最大吸收^[34]。如图 7-C 所示, PSP-W、PSP-1 和 PSP-2 对羟基自由基的清除率在

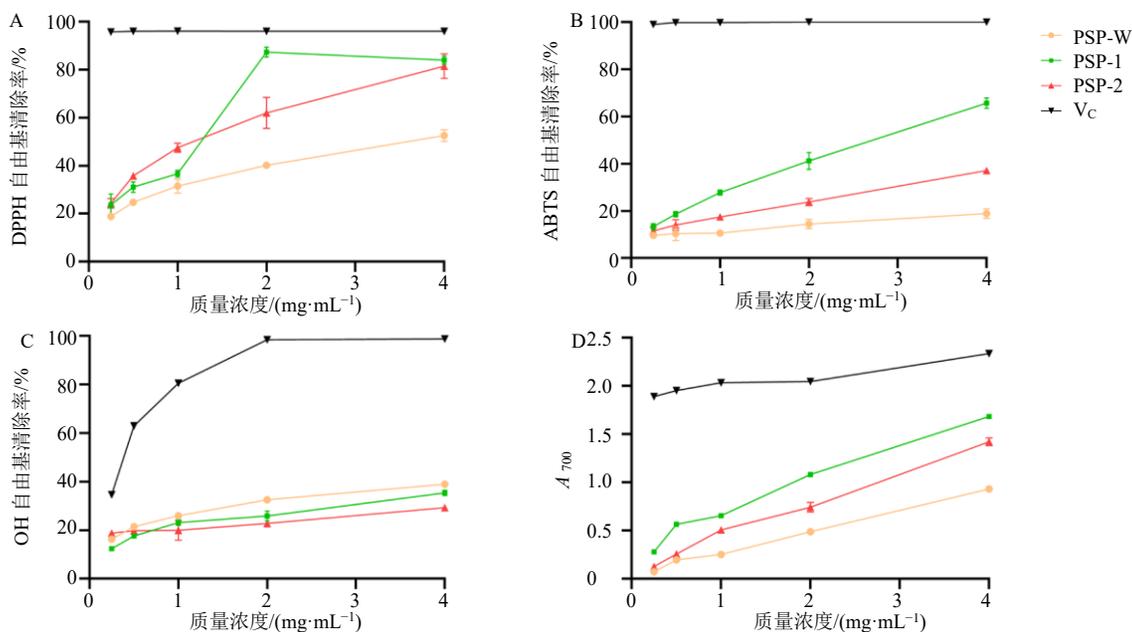


图7 PSP-W、PSP-1 和 PSP-2 的体外抗氧化活性
Fig. 7 *In vitro* antioxidant activity of PSP-W, PSP-1 and PSP-2

0.25 mg/mL 时分别为 16%、12%和 19%，在 4 mg/mL 时分别为 39%、35%和 29%，表明制黄精部位多糖在相同质量浓度下对羟基自由基的清除率差异并不明显，但对羟基自由基的清除作用具有浓度相关性，且这种作用随多糖质量浓度的升高而增强。

3.6.4 Fe³⁺还原力测定 具有抗氧化活性的化合物可将 Fe³⁺还原成 Fe²⁺，生成物在 700 nm 处有最大吸收^[35]。因此，化合物的还原能力也可以体现其抗氧化潜力。通过测定 PSP-W、PSP-1、PSP-2 和 V_C 在不同质量浓度下的还原力。图 7-D 结果表明，在测定浓度范围内制黄精部位多糖的还原力随着质量浓度的升高而增加。各部位多糖 Fe³⁺还原力的变化趋势为 PSP-1 > PSP-2 > PSP-W，但还原力明显低于 V_C。

4 讨论

多糖是由 10 个以上的单糖通过糖苷键结合而成的高分子碳水化合物，是一类分子结构复杂、体积较大的化合物。本研究根据多糖极性、易溶于水、在高体积分数乙醇中溶解度降低的特点，采用水提醇沉法从制黄精中提取 PSP。该方法具有操作简便、成本低廉、实验条件易于控制等优点，已被广泛应用于天然产物的提取实验中^[36-38]。考虑到 PSP 中仍存在核酸、色素和其他杂质，以 DEAE-Sephrose 为固定相，不同浓度的氯化钠溶液为流动相进行洗脱。不同浓度的氯化钠溶液中的离子会与 DEAE-Sephrose 上的离子进行交换，从而去除残留的色素和核酸等杂质，得到高纯度的部位多糖^[39]。

多糖的结构与其生物活性密切相关。本研究测定了制黄精部位多糖中总糖和蛋白质含量，并采用多种技术对其主要结构进行了分析。HPGPC 是基于不同相对分子质量的多糖在凝胶柱上的洗脱保留时间成一定关系的特性，用已知相对分子质量的多糖绘制标准曲线，再根据样品的保留时间与标准曲线进行对照，从而计算得到相对分子质量分布^[40]。本研究采用 HPGPC 检测各部位多糖的相对分子质量，其排序为 PSP-W > PSP-2 > PSP-1。单糖组成分析结果表明，PSP-W 主要由阿拉伯糖、葡萄糖、甘露糖和半乳糖组成；PSP-1 和 PSP-2 主要由鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖和半乳糖醛酸组成。半乳糖在各部位多糖中所占比例较高，这与之前的报道相似^[41]。FT-IR 谱图表明制黄精部位多糖具有明显的多糖特征峰，提示吡喃环和 β-糖苷键存在的吸收峰表明制

黄精部位多糖中的吡喃糖是通过 β-糖苷键连接的。张帆等^[42]对 PSP-0~PSP-9 的红外光谱分析结果也表明，PSP 中一般含有一定量的糖醛酸，并提示存在吡喃糖和 β-糖苷键。

通过 DPPH、ABTS、羟基自由基清除实验和 Fe³⁺还原力实验对 PSP-W、PSP-1 和 PSP-2 的抗氧化活性进行了综合评价。体外抗氧化实验表明，PSP-1 的抗氧化活性最好，对 DPPH 和 ABTS 自由基的清除率分别为 84%和 65%。PSP-2 的抗氧化活性次之，PSP-W 的抗氧化活性最低。实验结果表明，多糖中蛋白质的含量与抗氧化活性成正比，表明制黄精多糖的生物活性可能受到多糖混合物的影响。推测多糖和蛋白质可能发生共轭后作为一个整体发挥抗氧化作用，或者多糖中的蛋白质单独作为自由基的部分清除剂。PSP-1 和 PSP-2 中半乳糖醛酸含量高于 PSP-W，推测半乳糖醛酸的存在影响了多糖的抗氧化活性。刘贵阁等^[43]研究了 RBP 的体外抗氧化活性，结果表明 RBP-80S 的高抗氧化活性是由于糖醛酸含量较高所致。PSP-W、PSP-1 和 PSP-2 的相对分子质量大小与其抗氧化活性成反比，表明相对分子质量越低的多糖抗氧化活性越高，这与已报道的文献结果一致^[44-45]。这一结果可能是由于低相对分子质量的多糖具有较高的还原末端含量，可以接受更多的自由基^[46]。有报道称，多糖的抗氧化活性与其单糖组成相关，但单糖组成和比例对活性的影响模式尚未明确^[47]。本研究中抗氧化活性较高的 PSP-1 和 PSP-2 单糖主要由鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖和半乳糖醛酸组成，而抗氧化活性较低的 PSP-W 单糖则由阿拉伯糖、葡萄糖、甘露糖和半乳糖组成。推测甘露糖含量低或不含甘露糖的多糖可能具有更高的抗氧化活性，这与鲁文洁等^[48]之前的报道一致。综上，PSP-W、PSP-1 和 PSP-2 都具有抗氧化活性，并且在一定浓度范围内具有浓度依赖性。PSP-1 的抗氧化活性最好，其抗氧化效果与其蛋白质含量、半乳糖醛酸含量、相对分子质量和单糖组成密切相关。

结构是多糖发挥抗氧化作用的基础，进一步研究多糖的高级结构，对阐明制黄精多糖的抗氧化作用机理具有重要意义。目前对制黄精多糖的研究多为基础研究，局限于体外细胞实验，缺乏系统的体内药效学研究和临床应用，其分子作用机制尚未完全阐明，限制了对制黄精多糖的深入研究。目前，本课题组前期已经对黄精的分离纯化、结构解析、

药理活性以及构效关系等进行综述,明确了黄精多糖的提取方法和基本结构,总结了黄精多糖具有的多种生物活性,并表明其结构与生物活性具有明显的相关性,为制黄精多糖的结构表征和活性研究提供参考^[49]。同时,课题组对于制黄精多糖的抗结肠炎活性也进行了相关研究,研究结果表明制黄精均一多糖可以通过降低葡聚糖硫酸钠诱导结肠炎小鼠的炎症因子和炎症介质的水平来调节肠道炎症,修复紧密连接蛋白的肠道屏障,并通过调节肠道菌群以缓解结肠炎的症状^[50]。因此,课题组现有的研究结果为制黄精多糖的分离纯化、结构鉴定、生物活性等提供了可靠的理论和研究基础。虽然目前研究仍处于发展阶段,但对于阐明其生物活性及其作用机制,以及制黄精相关新药的开发和临床应用都具有重要意义。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Raguraman V, Stanley A L, Jyotsna J, et al. Sulfated polysaccharide from *Sargassum tenerrimum* attenuates oxidative stress induced reactive oxygen species production in *in vitro* and in zebrafish model [J]. *Carbohydr Polym*, 2019, 203: 441-449.
- [2] Gulcin İ. Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview [J]. *Arch Toxicol*, 2020, 94(3): 651-715.
- [3] Yang Y M, Qiu Z C, Li L Y, et al. Structural characterization and antioxidant activities of one neutral polysaccharide and three acid polysaccharides from *Ziziphus jujuba* cv. Hamidazao: A comparison [J]. *Carbohydr Polym*, 2021, 261: 117879.
- [4] Xiang A N, Li W T, Zhao Y N, et al. Purification, characterization and antioxidant activity of selenium-containing polysaccharides from pennycress (*Thlaspi arvense* L.) [J]. *Carbohydr Res*, 2022, 512: 108498.
- [5] Yang H, Hua J L, Wang C. Anti-oxidation and anti-aging activity of polysaccharide from *Malus micromalus* Makino fruit wine [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 121: 1203-1212.
- [6] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 319.
- [7] Ma W J, Wei S S, Peng W J, et al. Antioxidant effect of *Polygonatum sibiricum* polysaccharides in *D*-galactose-induced heart aging mice [J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 6688855.
- [8] 王若男, 厉荣玉, 郑鹏, 等. 黄精多糖微生物发酵提取、表征及其抗氧化活性分析 [J]. *中国食品添加剂*, 2022, 33(9): 54-62.
- [9] 曾立, 向荣, 张运良, 等. 黄精多糖对糖尿病小鼠的降血糖作用及机制 [J]. *中成药*, 2022, 44(9): 2989-2994.
- [10] Han C Y, Sun T T, Liu Y W, et al. Protective effect of *Polygonatum sibiricum* polysaccharides on gentamicin-induced acute kidney injury in rats via inhibiting p38 MAPK/ATF2 pathway [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 151: 595-601.
- [11] 吕品田, 段昕波. 黄精多糖对 MFC 胃癌荷瘤小鼠抑瘤及免疫调节作用 [J]. *中成药*, 2020, 42(8): 2169-2172.
- [12] Long T T, Liu Z J, Shang J C, et al. *Polygonatum sibiricum* polysaccharides play anti-cancer effect through TLR4-MAPK/NF- κ B signaling pathways [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 111: 813-821.
- [13] 杜青, 陈林, 贺炜, 等. 黄精多糖对 RAW 264.7 细胞活性及炎症因子 TNF- α 、IL-6、iNOS 表达的影响 [J]. *中成药*, 2022, 44(8): 2676-2679.
- [14] Li Q Y, Zeng J, Gong P X, et al. Effect of steaming process on the structural characteristics and antioxidant activities of polysaccharides from *Polygonatum sibiricum* rhizomes [J]. *Glycoconj J*, 2021, 38(5): 561-572.
- [15] Bian Z J, Li C T, Peng D Y, et al. Use of steaming process to improve biochemical activity of *Polygonatum sibiricum* polysaccharides against *D*-galactose-induced memory impairment in mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(19): 11220.
- [16] 张倩茹, 凌蕾, 何芋岐, 等. 苯酚硫酸法测定苗药艾纳香中多糖含量 [J]. *中国民族民间医药*, 2019, 28(14): 30-32.
- [17] 谢先梅, 李超, 孙颖, 等. 丹皮酚通过抑制 p38 MAPK/N-SMase2 通路减少脂多糖诱导的 THP-1 细胞外分泌体分泌 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2019, 27(1): 11-17.
- [18] Wang H J, Shi S S, Bao B, et al. Structure characterization of an arabinogalactan from green tea and its anti-diabetic effect [J]. *Carbohydr Polym*, 2015, 124: 98-108.
- [19] Li Q, Geng X J, Zhu L, et al. Structural characterization and antioxidant properties of a novel polysaccharide isolated from Jiuzao *in vitro* and *in vivo* [J]. *Food Res Int*, 2022, 162(Pt A): 111940.
- [20] 魏霞, 王星星, 方勤勤, 等. 基于肠道菌群探究一贯煎多糖的结构及改善小鼠肝纤维化作用 [J]. *中草药*, 2024, 55(4): 1110-1123.
- [21] 储启明, 魏洪玲, 田叙晨, 等. 金花葵多糖提取工艺优化及结构表征和抗氧化性研究 [J]. *食品工业科技*, 2023, 44(8): 236-243.
- [22] Li L, Thakur K, Liao B Y, et al. Antioxidant and antimicrobial potential of polysaccharides sequentially extracted from *Polygonatum cyrtoneuma* Hua [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 114: 317-323.
- [23] 周文文, 刘晖, 徐志佳, 等. 酸枣仁不同极性部位成分含量与抗氧化活性及其相关性分析 [J]. *食品工业科技*, 2023, 44(16): 288-296.

- [24] 孙婷婷, 刘洋, 魏明, 等. 黄精酒制前后水溶性多糖抗氧化活性研究 [J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(2): 78-84.
- [25] 杨艳君, 李畅, 陈菲菲, 等. 淫羊藿多糖组成分析及其免疫调节作用研究 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(16): 4358-4364.
- [26] Long X S, Hu X, Xiang H, *et al.* Structural characterization and hypolipidemic activity of *Gracilaria lemaneiformis* polysaccharide and its degradation products [J]. *Food Chem X*, 2022, 14: 100314.
- [27] Li P P, Bai J L, Zhang X J, *et al.* Structure and anticoagulant activity of a galactofuranose-containing sulfated polysaccharide from the green seaweed, *Codium isthmocladum* [J]. *Molecules*, 2022, 27(22): 8012.
- [28] He P, Zhang M, Zhao M, *et al.* A novel polysaccharide from *Chuanminshen violaceum* and its protective effect against myocardial injury [J]. *Front Nutr*, 2022, 9: 961182.
- [29] Zhang W, Li L Y, Ma Y, *et al.* Structural characterization and hypoglycemic activity of a novel pumpkin peel polysaccharide-chromium (III) complex [J]. *Foods*, 2022, 11(13): 1821.
- [30] Li M, Zhang H N, Hu X Y, *et al.* Isolation of a new polysaccharide from dandelion leaves and evaluation of its antioxidant, antibacterial, and anticancer activities [J]. *Molecules*, 2022, 27(21): 7641.
- [31] Zhang X, Liu T T, Wang X, *et al.* Structural characterization, antioxidant activity and anti-inflammatory of the phosphorylated polysaccharide from *Pholiota nameko* [J]. *Front Nutr*, 2022, 9: 976552.
- [32] Zhang J J, Tan W Q, Zhao P Z, *et al.* Facile synthesis, characterization, antioxidant activity, and antibacterial activity of carboxymethyl inulin salt derivatives [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 199: 138-149.
- [33] Li M P, Zhao X Y, Xu M J. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of essential oil from *Allium tenuissimum* L. flowers [J]. *Foods*, 2022, 11(23): 3876.
- [34] Chen F, Huang G L, Yang Z Y, *et al.* Antioxidant activity of *Momordica charantia* polysaccharide and its derivatives [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 138: 673-680.
- [35] Hu H B, Li H M, Han M H, *et al.* Chemical modification and antioxidant activity of the polysaccharide from *Acanthopanax leucorrhizus* [J]. *Carbohydr Res*, 2020, 487: 107890.
- [36] 闫旭宇, 李玲. 水提醇沉法提取薏米多糖及其对羟自由基的清除作用 [J]. 食品研究与开发, 2019, 40(18): 1-5.
- [37] 杜宝香, 相美容, 付业佩, 等. 北沙参多糖的分离、纯化及其体外免疫活性考察 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(11): 27-31.
- [38] 连紫宛, 李占强, 张海燕, 等. 雪灵芝多糖的分离纯化及免疫活性评价 [J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(4): 572-578.
- [39] 杨茂会, 周欣, 谯政文, 等. 黄精多糖提取、分离纯化及生物活性研究进展 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(12): 407-416.
- [40] 张文晋, 王升, 黄璐琦, 等. 中药多糖质量评控方法探析 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(14): 3489-3496.
- [41] Li X J, Chen Q, Liu G K, *et al.* Chemical elucidation of an Arabinogalactan from rhizome of *Polygonatum sibiricum* with antioxidant activities [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 190: 730-738.
- [42] 张帆, 钟伟华, 吕春秋, 等. 九蒸九制工艺过程中黄精理化品质特征及多糖组分的演变 [J]. 现代食品科技, 2022, 38(9): 171-180.
- [43] 刘贵阁, 钟耀广, 陈冰洁, 等. 不同醇沉米糠多糖的体外抗氧化和降血糖活性研究 [J]. 保鲜与加工, 2023, 23(3): 29-36.
- [44] Liang J, Zhao Y L, Yang F R, *et al.* Preparation and structure-activity relationship of highly active black garlic polysaccharides [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 220: 601-612.
- [45] Cui Y L, Chen Y J, Wang S, *et al.* Purification, structural characterization and antioxidant activities of two neutral polysaccharides from persimmon peel [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 225: 241-254.
- [46] Tian H, Liu H F, Song W K, *et al.* Structure, antioxidant and immunostimulatory activities of the polysaccharides from *Sargassum carpophyllum* [J]. *Algal Res*, 2020, 49: 101853.
- [47] Wang J Q, Hu S Z, Nie S P, *et al.* Reviews on mechanisms of *in vitro* antioxidant activity of polysaccharides [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 5692852.
- [48] 鲁文洁, 陈井太, 宋志前, 等. 黄精酒制前后多糖单糖组成及抗氧化活性对比研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2023, 29(2): 285-291.
- [49] Gong H, Gan X N, Li Y Z, *et al.* Review on the genus *Polygonatum* polysaccharides: Extraction, purification, structural characteristics and bioactivities [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 229: 909-930.
- [50] Gong H, Gan X N, Qin B Y, *et al.* Structural characteristics of steamed *Polygonatum cyrtoneuma* polysaccharide and its bioactivity on colitis *via* improving the intestinal barrier and modifying the gut microbiota [J]. *Carbohydr Polym*, 2024, 327: 121669.

[责任编辑 王文倩]