

不同来源多花黄精多糖的结构特性 及抗氧化活性比较

程亚楠¹, 张金华², 田胜兰¹, 杨超然¹, 司靖宇¹, 黄丽莉³, 胡晓波¹, 余强^{1*}

(1. 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 江西南昌 330047)

(2. 大理药业股份有限公司, 云南大理 671000) (3. 江西省林业科学院, 江西南昌 330013)

摘要:以5种不同来源多花黄精为原料,通过水提醇沉法制备黄精多糖,利用离子色谱、高效凝胶渗透色谱、傅里叶红外变换光谱、X-射线衍射仪和扫描电镜等技术研究其结构性质,并评价其抗氧化活性。结果表明,5种多花黄精的多糖含量在7.63%~16.78%质量分数范围内,相互间有显著性差异($P<0.05$),且产自江西铜鼓的黄精多糖含量最高(16.78%);5种多花黄精多糖均为杂多糖,单糖组成以果糖为主。红外光谱表明5种多花黄精多糖均具有典型糖类吸收峰,含有 α -糖苷键和 β -糖苷键;其微观形貌主要呈不规则片状或多孔片状结构。抗氧化活性实验显示,5种多花黄精多糖具有一定抗氧化能力,在2~10 mg/mL的浓度范围内对1,1-二苯基-2-苦基肼自由基和羟自由基清除能力呈一定的剂量依赖性,其中江西铜鼓多花黄精多糖的抗氧化活性最好。该研究反映了不同来源多花黄精多糖的结构特性和自由基清除能力差异,可为多花黄精的良种选育和资源利用提供科学依据。

关键词:多花黄精; 多糖; 结构特性; 抗氧化活性

文章编号: 1673-9078(2023)07-145-153

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.7.0898

Structural Characteristics and Antioxidant Activities of *Polygonatum cyrtonema* Hua Polysaccharides with Different Origins

CHENG Ya'nan¹, ZHANG Jinhua², TIAN Shenglan¹, YANG Chaoran¹, SI Jingyu¹, HUANG Lili³, HU Xiaobo¹, YU Qiang^{1*}

(1.State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China) (2.Dali Pharmaceutical Co. Ltd., Dali 671000, China) (3.Jiangxi Academy of Forestry Sciences, Nanchang 330013, China)

Abstract: The "water extraction and alcohol precipitation" method was utilized to prepare *Polygonatum cyrtonema* polysaccharides (PCPs) derived from *Polygonatum cyrtonema* Hua (PCH) plants grown in five different areas. Comprehensive characterization of the structural features of each PCP was conducted using ion chromatography, high-performance gel-permeation chromatography (HP-GPC), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), X-ray diffractometry (XRD), and scanning electron microscopy (SEM). Additionally, the antioxidant activity of each PCP was evaluated. The analyses revealed that the PCP contents varied among the five PCHs, ranging from 7.63% to 16.78%, with statistically significant differences observed in PCP content between the PCHs ($P<0.05$). Notably, the PCH sourced from Tonggu County (Jiangxi Province) exhibited the highest PCP content (16.78%). All PCPs identified in the study were heteropolysaccharides, with fructose dominating their monosaccharide composition. FTIR spectra of all PCPs displayed characteristic carbohydrate absorption peaks, indicative of α - and β -glycosidic bonds. The micromorphology of PCPs exhibited irregular or porous sheet-like structures. The antioxidant activity assays demonstrated that all five PCPs exhibited varying degrees of antioxidant activity. In the concentration range of 2~10 mg/mL, they exhibited

引文格式:

程亚楠,张金华,田胜兰,等.不同来源多花黄精多糖的结构特性及抗氧化活性比较[J].现代食品科技,2023,39(7):145-153.

CHENG Yanan, ZHANG Jinhua, TIAN Shenglan, et al. Structural characteristics and antioxidant activities of *Polygonatum cyrtonema* Hua polysaccharides with different origins [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(7): 145-153.

收稿日期: 2022-07-17

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31972066); 广东省重点研发计划项目(2022B020202003)

作者简介: 程亚楠(1997-),女,硕士研究生,研究方向:食品科学与工程, E-mail: 1962516991@qq.com

通讯作者: 余强(1986-),男,博士,教授,研究方向:食品功能组分的活性及机制、功能食品研究与开发, E-mail: yuqiang8612@163.com

dose-dependent scavenging activities for DPPH and hydroxyl radicals, with the PCP derived from Tonggu County demonstrated the highest antioxidant activity. By revealing the distinct structural characteristics and radical scavenging activities of PCPs from different origins, this study provides a scientific foundation for the breeding and utilization of PCH.

Key words: *Polygonatum cyrtonema* Hua; polysaccharides; structural characteristics; antioxidant activity

黄精 (*Polygonatum rhizoma*) 系百合科黄精属多年生草本植物, 是我国药食同源的传统中草药^[1]。2020年版中国药典中收录的黄精药材为三种基源植物[滇黄精 (*Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl.)、黄精 (*Polygonatum sibiricum* Red) 和多花黄精 (*Polygonatum cyrtonema* Hua)] 的干燥根茎^[2]。多花黄精又名姜形黄精, 具有补气养阴、健脾、润肺、益肾的功效^[3-5]。多花黄精中可分离得到多糖^[6-8]、皂苷^[9,10]、生物碱^[11]和黄酮^[12,13]等多种功能性成分。其中, 多糖作为主要功能性成分, 具有抗氧化、抗炎、抑菌、降血糖血脂、保护肾脏、抗癌、抗疲劳和免疫调节等药理作用^[14-21]。

多糖的结构特性一般通过单糖组成、糖苷链构型及连接方式、支链构型等进行表征, 黄精多糖的结构分析主要表现在单糖组成和糖苷链构型方面。Wang 等^[22]研究发现黄精中分离纯化的多糖纯化组分由半乳糖、鼠李糖、甘露糖、葡萄糖和木糖按照不同比例组成, 且以 β -吡喃糖残基构型存在。张庭廷等^[23]报道安徽九华山黄精多糖为杂多糖, 单糖组成主要是果糖和葡萄糖, 且相对分子质量为 8.9 ku, IR 分析表明该多糖存在 β -吡喃糖苷键结构。Wang 等^[24]研究发现多花黄精多糖主要由葡萄糖和甘露糖组成, 分别具有吡喃糖环结构和呋喃糖环结构; X-射线衍射表明, 多糖由结晶区和非结晶区组成; 而且两种多糖表现出不同程度的抗氧化活性。在 2020 版中国药典中, 多糖是黄精的质量控制指标, 黄精多糖也因其功能活性和食用价值被广泛关注。产地、栽培模式和生境等均对黄精中的多糖含量有影响。但目前关于不同来源多花黄精 (*Polygonatum cyrtonema* Hua, PCH) 的多糖结构特征和活性比较的报道较少。因此, 评价和比较不同来源的多花黄精多糖的化学结构和生物活性对筛选优良多花黄精种质资源和探究多花黄精多糖的构效关系具有重要意义。

江西铜鼓生态资源丰富, 气候温润, 土壤疏松肥沃, 森林覆盖率达 87.4%, 是黄精的天然分布区, 被誉为“中国黄精之乡”。铜鼓黄精中多花黄精为优质品种, 资源蕴藏量很大。安徽九华是十大黄精产地之一, 湖南怀化和江西安福也具有一定的黄精种植规模。因此本研究以五种多花黄精 (原采集地分别为铜鼓、九华、怀化和安福) 为原料, 采用传统的水提醇沉法制备多糖, 并通过单糖组成分析、傅里叶变换红外光

谱 (Fourier Infrared Transform Spectroscopy, FI-TR)、X-射线衍射谱图 (X-ray Diffraction Spectra, XRD) 和扫描电镜 (Scanning Electron Microscope, SEM) 分析等实验手段评价比较不同来源黄精多糖的结构特征, 在此基础上进行 1,1-二苯基-2-苦基肼自由基 (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl Radicals, DPPH) 清除和羟基自由基清除等体外抗氧化活性研究, 旨在探究不同来源多花黄精多糖的多样性以及为多花黄精的品质甄别、资源开发提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黄精由江西省林业科学院提供; 硫酸、正丁醇和硫酸亚铁 (均为分析纯), 西陇科学股份有限公司; L-抗坏血酸和蒽酮 (均为分析纯), 上海源叶生物科技有限公司; 三氯甲烷 (分析纯), 国药集团化学试剂有限公司; 所有单糖标准品, 包括岩藻糖、鼠李糖、果糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖、半乳糖醛酸 (均为色谱纯), 上海源叶生物科技有限公司; 木瓜蛋白酶 (酶活 5.0×10^4 U/g), 南宁市庞博生物工程公司; 过氧化氢 (分析纯), 天津玉福泰化学试剂有限公司; 水杨酸 (分析纯), 阿拉丁生物技术有限公司; 1,1-二苯基-2-苦基肼 (DPPH, 纯度 $\geq 98\%$), 北京索莱宝科技有限公司; 其他化学试剂均为分析纯。

表 1 样品信息

Table 1 Information of samples

样品	编号	原采集地
铜鼓多花黄精	T-PCH	江西铜鼓
九华多花黄精	J-PCH	安徽九华山
怀化多花黄精	H-PCH	湖南怀化
安福宽叶多花黄精	A-PCH-W	江西安福
安福窄叶多花黄精	A-PCH-N	江西安福

1.2 仪器与设备

Nicolet 5700 傅里叶变换红外光谱仪, 美国 Thermo Electron 公司; D8 Advance X 射线衍射仪, 德国 Bruker 公司; TGL 216G 高速台式离心机, 上海安亭科学仪器厂; TU-1810DAPC 紫外分光光度计, 北京普析仪器公司; RV 10 digital 旋转蒸发仪, 上海

沛升仪器设备有限公司; DHG-9140A 型电热恒温鼓风干燥箱, 上海精宏实验设备有限公司; JSM 6701F 扫描电子显微镜, 日本电子株式会社; ICS 5000 离子色谱仪(配有脉冲安培检测器), 美国赛默飞公司; Agilent 1260 高效凝胶渗透色谱仪, 美国安捷伦科技公司。

1.3 方法

1.3.1 原料处理

多花黄精洗净, 在沸水中烫 2~3 min 并切片, 在 60 °C 下烘干, 粉碎过 100 目筛, 粉末贮存于干燥器备用。

1.3.2 多花黄精中多糖含量数据测定

采用药典中的蒽酮-硫酸法测定黄精多糖含量^[25], 以无水葡萄糖为标准品, 浓度为横坐标吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线。

1.3.3 多花黄精多糖提取工艺流程

黄精粉末→脱脂、脱色素→热水浸提→离心过滤→旋蒸浓缩→醇沉过夜→复溶→除蛋白→蒸馏水透析→冷冻干燥→多花黄精多糖

1.3.4 多花黄精多糖的制备

多花黄精多糖提取参照文献^[26]并稍做修改: 称取 100.00 g 的多花黄精粉末, 加入 5 倍体积石油醚, 50 °C 回流 1 h, 过滤后并加入 $\varphi=85\%$ 的乙醇 1.0 L 搅拌浸泡 12 h。离心后, 合并沉淀物并挥干乙醇, 得到预处理过的样品粉末。称取 20.00 g 预处理过的粉末, 加入 400 mL 蒸馏水, 于 80 °C 水浴中搅拌提取 2 h, 离心收集上清液, 重复提取 1 次, 合并上清液; 将上清液浓缩至原体积的 1/4, 放冷后加入 $\varphi=95\%$ 乙醇(乙醇最终体积分数为 80%)进行醇沉, 静置过夜, 4 800 r/min 离心 10 min 并收集沉淀, 80 °C 水浴复溶, 再真空浓缩除去溶液中残留的乙醇。调节浓缩液 pH 值至 6.5, 然后加入 2% (m/m) 木瓜蛋白酶(55 °C 水浴 1 h)。之后用 1/5 体积的 Seville 试剂(三氯甲烷:正丁醇=4:1, V/V)震荡除蛋白质, 重复 5 次, 真空浓缩后, 装入透析(截留量 3 500 u), 蒸馏水透析 48 h, 最后将透析液浓缩并冷冻干燥, 即得到多花黄精多糖(Polygonatum Cyrtonema Polysaccharides, PCP)。

1.3.5 单糖组成数据分析

通过配备有脉冲安培检测器(PAD)的高性能阴离子交换色谱测定多花黄精多糖的单糖组成, 然后通过使用 Chromeleon 6.8 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts) 收集和处理数据。分别称取 5.00 mg 五种多花黄精多糖样品于具塞试管中, 在冰浴条件下加入 0.5 mL 2 mol/L H_2SO_4 , 并磁力搅拌 0.5 h 至多糖完全溶解。溶解后放至室温并加入 2.5 mL 超纯水, 在 105 °C 硅油浴条件下磁力搅拌 1 h。油浴结束后, 冷却

至常温。定容至 50 mL 容量瓶中, 再稀释到合适的倍数, 过膜(0.22 μm)后上机进样分析。

1.3.6 多糖分子量分布数据分析

用含有 0.02% (m/V) NaN_3 的超纯水配制样品浓度为 1.00 mg/mL 的多花黄精多糖溶液, 完全溶解后经 0.22 μm 滤膜过滤, 通过配置示差检测器和紫外检测器的 Agilent 1260 HPLC 高效液相色谱仪(HPGPC)分析多花黄精多糖分子量分布^[27]。采用各葡聚糖标准品(分子量: 10、40、70、500、2 000 ku)和葡萄糖绘制标准曲线。

色谱条件: 色谱柱为 Ultrahydrogel TM 1000 凝胶柱(7.8 mm×300 mm), 流动相为含有 0.02% (m/V) NaN_3 的超纯水, 流速为 0.6 mL/min, 进样量为 20 μL , 检测温度和柱温均为 35 °C。

1.3.7 傅里叶变换红外光谱数据分析(FT-IR)

准确称取多花黄精多糖冻干样 2.00 mg, 与 KBr 按照 1:100 (m/m) 充分混合并研磨成粉末状, 通过真空压机压片处理后立即置于光路中进行扫描, 扫描范围为 400~4 000 cm^{-1} , 扫描次数为 64, 分辨率为 4 cm^{-1} 。

1.3.8 X-射线衍射数据分析

利用 X-射线衍射仪在 30 kV 和 20 mA 的工作电压和工作电流下测定不同品种多花黄精多糖的结晶状态^[28], 扫描角度 $2\theta=2\sim 60^\circ$, 扫描步长为 0.02°, 获得黄精多糖的 XRD 衍射数据。

1.3.9 扫描电子显微镜数据分析

取适量多花黄精多糖样品, 采用离子溅射法镀金, 置于扫描电镜中进行 200 倍、1 000 倍放大观察, 得到电镜谱图。

1.3.10 多花黄精多糖体外抗氧化数据分析

1.3.10.1 DPPH 自由基清除能力测定

参考文献^[29]方法并进行适当改进, 去离子水配制不同浓度的多花黄精多糖溶液(2、4、6、8、10 mg/mL), 分别移取不同浓度多糖溶液 100 μL 于 96 孔板中, 加入 100 μL 0.1 mmol/L DPPH-95%乙醇溶液(避光, 现配现用), 摇匀后暗处放置, 在 37 °C 恒温箱中避光反应 30 min, 测定 517 nm 处的吸光度 A_1 。以去离子水代替多糖溶液为空白组, 多糖溶液代替 DPPH-95%乙醇溶液为对照组, 分别测定吸光值 A_0 和 A_i , Vc (L-抗坏血酸)作为阳性对照, 平行测定 3 次, 求平均值。按照公式(1)计算黄精多糖 DPPH 自由基清除率。

$$C_1 = \left(1 - \frac{A_i - A_1}{A_0}\right) \times 100\% \quad (1)$$

式中:

C_1 ——DPPH 自由基清除率, %;

A_0 ——为空白组的吸光值;

A_1 ——为样品的吸光值;
 A_i ——为对照组的吸光值。

1.3.10.2 羟自由基清除能力测定

采用水杨酸法测定样品的羟基自由基清除能力^[24], 配制不同浓度多花黄精多糖水溶液 (2、4、6、8、10 mg/mL) 和同等浓度的 Vc 溶液做阳性对照, 准确移取不同浓度多糖水溶液 100 μ L 于 96 孔板中, 分别加入 100 μ L 预先配制的 5 mmol/L FeSO_4 溶液、5 mmol/L 水杨酸溶液和 5 mmol/L 过氧化氢溶液, 充分混匀后, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中孵育 30 min, 并测定 510 nm 处的吸光值 A_2 。以去离子水代替多糖溶液作为空白组, 去离子水代替 H_2O_2 溶液作为对照组, 分别测定吸光值 A 和 A_j 。Vc 作为阳性对照, 平行测定 3 次, 求平均值。按照公式 (2) 计算黄精多糖羟自由基清除率。

$$C_2 = \left(1 - \frac{A_2 - A_i}{A}\right) \times 100\% \quad (2)$$

式中:

C_2 ——羟自由基清除率, %;
A——为空白组的吸光值;
 A_2 ——为样品的吸光值;
 A_j ——为对照组的吸光值。

1.3.11 数据处理与分析

所有实验均重复 3 次, 采用 Origin 9 软件制图, 利用 SPSS 23 统计软件对所测定的数据进行处理和分析。

2 结果与讨论

2.1 多花黄精多糖含量分析

黄精多糖是黄精中主要活性成分之一, 其含量在

药典中作为黄精的质量考察指标, 且根据药典要求, 黄精多糖含量 $\geq 7\%$ 为质量合格。通过测定, 得到线性回归方程: $y = 38.878x + 0.143$, $R^2 = 0.998$, 表明在 0.003 3~0.019 8 mg/mL 范围内线性关系良好。表 2 显示, 不同种源多花黄精多糖含量均达到药典要求, 在 7.63%~16.78% 质量分数范围之间。五种多花黄精多糖含量之间的差异具有显著性 ($P < 0.05$), 且不同产地黄精的多糖含量由大到小排序依次是铜鼓、安福、怀化和九华, 由此可知产地对相同品种黄精多糖含量有显著影响^[30]。在品种和产地相同的情况下, 安福宽叶多花黄精多糖含量比窄叶多花黄精多糖含量高 3.60%, 且具有显著差异 ($P < 0.05$)。本实验结果与钱华丽等^[31]的研究相似, 结果发现不同产地黄精药用部位多糖含量在质量分数为 7.48%~15.23% 范围内。以上结果表明, 五种多花黄精中多糖含量具有显著性差异 ($P < 0.05$), 且产自江西铜鼓的多花黄精质量相对较好。

表 2 不同来源多花黄精多糖含量比较

Table 2 Comparison of polysaccharide content in different

Polygonatum cyrtoneuma

黄精样品	多糖含量/%
T-PCH	16.78 $\pm$ 0.32 ^a
J-PCH	7.63 $\pm$ 0.17 ^e
H-PCH	8.32 $\pm$ 0.11 ^d
A-PCH-W	13.23 $\pm$ 0.03 ^b
A-PCH-N	9.63 $\pm$ 0.05 ^c

注: 同一列不同的小写字母代表彼此之间的显著差异 ($P < 0.05$)。表 4 同。

2.2 多花黄精多糖单糖组成

表 3 不同来源多花黄精多糖中单糖组成的相对摩尔百分比

Table 3 Relative molar percentages of monosaccharide composition in polysaccharides of *Polygonatum cyrtoneuma*

多糖样品	岩藻糖/%	阿拉伯糖/%	半乳糖/%	葡萄糖/%	甘露糖/%	果糖/%	半乳糖醛酸/%	葡萄糖醛酸/%
T-PCP	ND	1.08	0.67	2.35	0.93	94.97	ND	ND
J-PCP	6.67	5.60	0.96	4.25	7.92	74.01	ND	0.59
H-PCP	5.81	8.37	2.09	4.07	9.06	70.48	0.13	ND
A-PCP-W	8.79	1.94	ND	4.40	0.90	83.54	ND	0.44
A-PCP-N	6.79	3.39	0.11	3.75	1.52	84.23	ND	0.21

注: ND 表示没有检测到。摩尔百分比是指同一样品中不同单糖的相对摩尔百分比。

五种不同来源多花黄精多糖的单糖组成结果如表 3 所示, 在五种多花黄精多糖中发现了 8 种单糖, 包括岩藻糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖、果糖、半乳糖醛酸和葡萄糖醛酸^[32,33], 其中果糖含量较高, 两种糖醛酸含量较少。从表 3 中可以看出, 铜鼓多花黄精多糖主要由五种单糖组成 (果糖、葡萄糖、

阿拉伯糖、半乳糖和甘露糖); 而九华多花黄精多糖中主要包含果糖 (74.01%)、甘露糖 (7.92%) 和岩藻糖 (6.67%); 怀化多花黄精多糖中果糖含量在五种多糖中最少 (70.48%), 而甘露糖和阿拉伯糖含量相对较高, 由此可知不同产地多花黄精多糖的单糖组成有差异, 这可能是产地的地理位置、土壤质地和气候条件

的不同导致的。同时产自安福的两种多花黄精多糖中果糖含量较高且单糖组成相似,主要由果糖、岩藻糖、葡萄糖和阿拉伯糖组成,但宽叶多花黄精多糖中未检测出半乳糖,这可能是叶子形态导致的差异。Zhang等^[34]从干燥的多花黄精根茎中分离纯化得到的均一组分 DPC1,单糖组成主要包含果糖和葡萄糖,其中果糖占比 96.30%,这与本实验结果相似。吴伟菁等^[35]也总结说明从生多花黄精根茎中提取得到的多糖是以中性多糖为主的果聚糖。由此可知,不同来源多花黄精多糖的单糖组成和含量有差异,这可能导致多糖具有不同的结构特征和生物活性。

2.3 多花黄精多糖分子量分布

分子量是多糖结构解析重要参数之一,对多糖溶解度、粘度等理化性质有重要影响。通过 HPGPC 分析五种多花黄精多糖的分子量,洗脱后均出现了多个明显峰(图 1),说明本实验获得的五种多花黄精多糖均为杂多糖。从图 1 可以看出,五种多花黄精多糖的主要洗脱峰时间相似,分别为 16.69、16.89、16.93、16.76、16.62 min,分子量(M_w)在 2.71~1 788.15 ku 之间,其中占比最高组分的在 3.00 ku 左右。值得注意的是,与其他四种多糖相比,怀化多花黄精多糖只出现了 2 个峰;产自江西安福的两种多花黄精多糖分子量分布结果大致相似,而宽叶多花黄精多糖的分子量相对较小,这可能是叶子形态导致的差异。以上结果表明,提取得到的五种多花黄精多糖组分不均一,均为杂多糖,这与单糖组成结果一致。

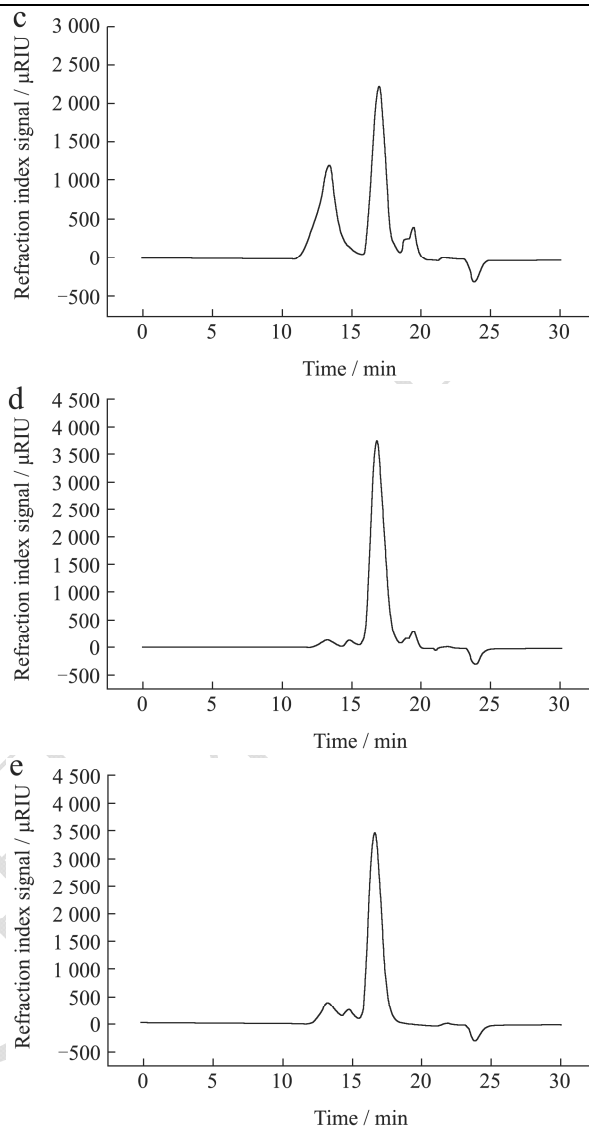
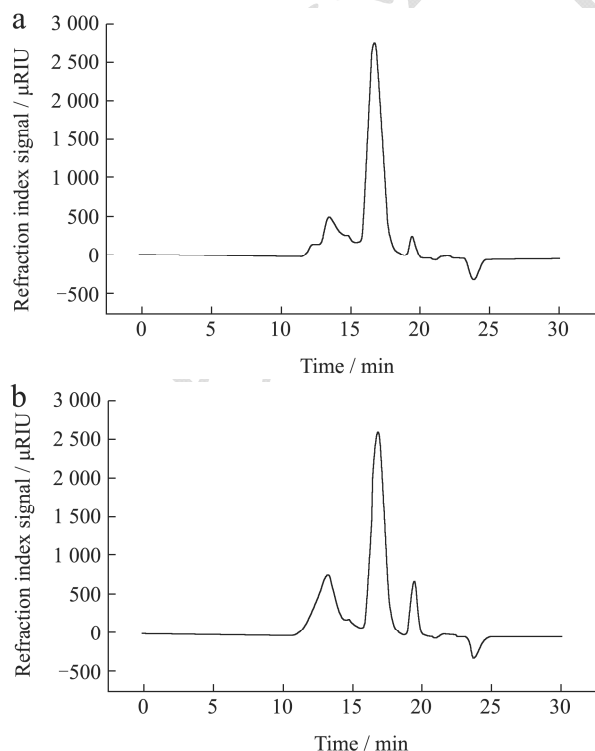


图 1 不同来源多花黄精多糖的分子量分布图

Fig.1 Molecular weight distribution map of different polysaccharides from *Polygonatum cyrtoneura*

注: a 为铜鼓多花黄精多糖; b 为九华多花黄精多糖; c 为怀化多花黄精多糖; d 为安福宽叶多花黄精多糖; e 为安福窄叶多花黄精多糖。

2.4 傅里叶红外光谱分析

如图 2 所示,在 400 cm^{-1} ~ $4\,000\text{ cm}^{-1}$ 范围内的 FT-IR 光谱显示了 5 种多花黄精多糖样品的官能团。在 $3\,359.44\text{ cm}^{-1}$ 处出现较宽且大的拉伸峰,这归因于 O-H 的伸缩振动^[36],是典型多糖类特征峰; $2\,942.90\text{ cm}^{-1}$ 处出现的峰值,为较弱的 C-H 伸缩振动和变角振动吸收峰; $1\,739.51\text{ cm}^{-1}$ 附近的吸收峰是由酯化羧基(COO-R)的拉伸振动引起的^[8]; $1\,261.24\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰是 C-O 糖苷键的振动峰^[37],这两个峰表明存在 O-乙酰基。 $1\,600.65\text{ cm}^{-1}$ 波长处出现的吸收峰代表羧酸中 C=O 的伸缩振动,表明含有糖醛酸。波数

1 124.31 cm^{-1} 和 1 018.25 cm^{-1} 处的两个峰是吡喃环上 C-O-C 糖苷键的伸缩振动引起的。位于 929.54 cm^{-1} 的吸收峰可归因于果糖的 β -糖苷键^[8], 在 813.83 cm^{-1} 附近的吸收峰, 表明存在 α -糖苷键^[38]。5 种多花黄精多糖红外谱图大体上相同, 峰强度有些许差别; 均具有典型多糖类特征吸收峰, 均含有 α -糖苷键和 β -糖苷键且含有果聚糖, 这与单糖组成结果类似。

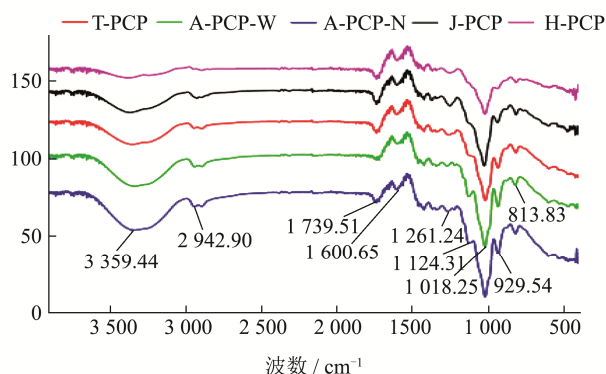


图2 不同来源多花黄精多糖的傅里叶红外光谱图

Fig.2 FT-IR spectra of different polysaccharides from *Polygonatum cyrtonema*

2.5 多花黄精多糖 X-射线衍射分析

X-射线衍射主要用来测定物质的结晶状态, 是分析高聚物以及化合物结构的重要手段。多糖结晶状态决定了柔韧性、溶解性等物理性质。图3为XRD图谱, 从图中可以看出5种多花黄精多糖的X-射线衍射谱图大致相似, 2θ 在 $4\sim 60^\circ$ 范围内没有较为明显的衍射吸收峰, 仅有极少的小衍射峰存在, 并且在衍射

角为 $10\sim 20^\circ$ 范围出现了相对明显的宽衍射峰, 这表明5种多花黄精多糖均以晶态和非晶态的方式存在^[38]。

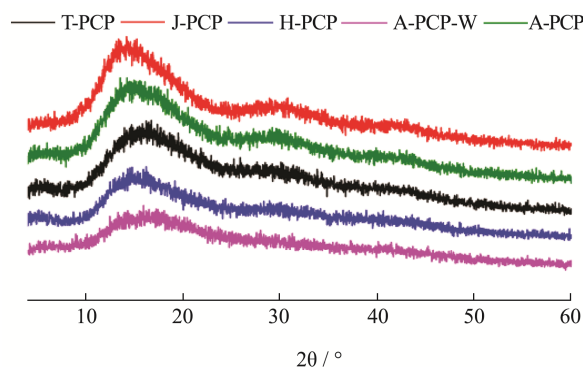


图3 不同来源多花黄精多糖样品 XRD 图

Fig.3 XRD images of different polysaccharides from *Polygonatum cyrtonema*

2.6 扫描电镜观察结果

通过扫描电镜观察发现, 多花黄精多糖微观形貌主要有不规则的薄片结构和多网孔的片状结构, 这与雍潘^[38]和刘基等^[39]对多花黄精多糖的研究一致。如图4所示, 铜鼓多花黄精多糖分布散乱, 呈不规则片状结构, 表面粗糙有突起; 九华多花黄精多糖为无孔的片状结构, 表面较为光滑; 怀化多花黄精多糖为多网孔片状结构, 表面粗糙且有圆形颗粒; 安福宽叶多花黄精多糖为粗糙的片状结构, 分布散乱无规则; 安福窄叶多花黄精多糖同样是不规则的片状结构, 但表面较为光滑。不同来源的多花黄精多糖微观形貌存在差异, 这种差异可能导致多糖生物活性的不同。

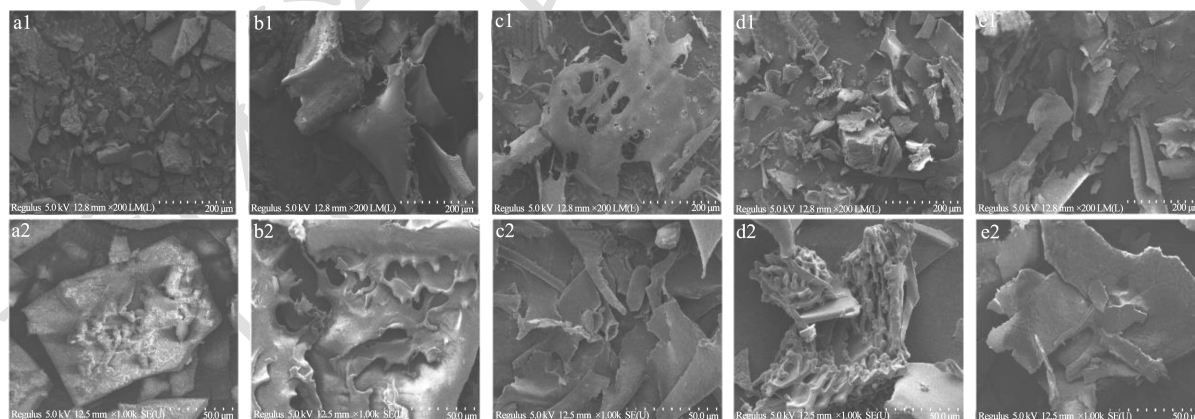


图4 不同来源多花黄精多糖的扫描电子显微镜图

Fig.4 SEM images of different polysaccharides from *Polygonatum cyrtonema*

注: a 为铜鼓多花黄精多糖; b 为九华多花黄精多糖; c 为怀化多花黄精多糖; d 为安福宽叶多花黄精多糖; e 为安福窄叶多花黄精多糖。1 为 200 $\times$, 2 为 1000 $\times$ 。

2.7 多花黄精多糖抗氧化活性分析

2.7.1 DPPH 自由基清除率测定

多糖可以作为电子供体能够与 DPPH 自由基反

应, 并将其转化为更稳定的产物, 从而能够终止自由基链式反应。由图5可知, 阳性对照 Vc 在 $2\sim 10\text{ mg/mL}$ 质量浓度范围内对 DPPH 自由基的清除能力明显大于多花黄精多糖。多花黄精多糖对 DPPH 自由基的清除

率与质量浓度呈明显的剂量依赖关系,即在2~10 mg/mL 质量浓度范围内,随着多糖质量浓度的增加,其清除 DPPH 自由基的能力逐渐增强。从图 5 可以看到,质量浓度为 2 mg/mL 时 5 种多花黄精多糖的 DPPH 自由基清除率均低于 30%,从质量浓度为 4 mg/mL 开始对 DPPH 自由基清除作用的上升幅度明显增强。当质量浓度为 10 mg/mL 时,5 种多花黄精多糖清除能力达到最大值,且存在显著差异 ($P<0.05$) (表 3),清除率由大到小依次为: 68.20% (T-PCP)、49.73% (J-PCP)、44.63% (H-PCP)、35.72% (A-PCP-N)、31.01% (A-PCP-W)。其中铜鼓多花黄精多糖对 DPPH 自由基的清除效果显著高于其他多糖,这可能是由于其结构松散且为碎片状,暴露了更多的基团增大了与自由基接触的比表面积,从而促进了与自由基的反应。另外,从表 5 可知产自安福的宽叶多花黄精多糖对 DPPH 自由基的清除能力比窄叶多花黄精多糖低 4.71%,存在显著差异 ($P<0.05$),这种差异可能归因于窄叶多花黄精多糖的薄片状结构。上述结果与何晓梅等^[40]的研究结果相似,他们发现不同产地黄精粗多糖对 DPPH 自由基有不同程度的清除作用,同样与浓度呈一定的量效关系。

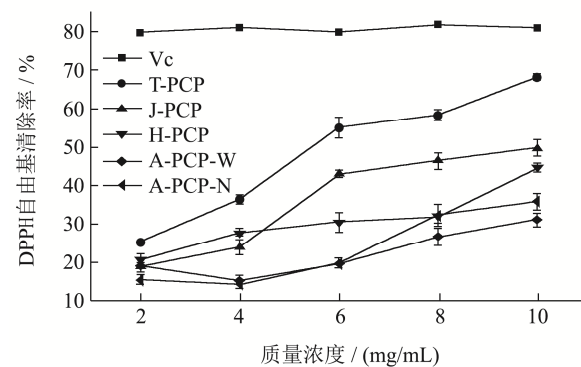


图 5 多花黄精多糖和 Vc 对 DPPH 自由基清除作用

Fig.5 The scavenging effect of *Polygonatum cyrtonema* polysaccharide and ascorbic acid on DPPH free radicals

2.7.2 羟自由基清除能力测定

多花黄精多糖和 Vc 对羟自由基的清除作用如图 6 所示,阳性对照 Vc 对羟自由基的清除能力明显强于多花黄精多糖,当其质量浓度为 2 mg/mL 时,对羟自由基的清除率达到 100%。多花黄精多糖在 2~10 mg/mL 质量浓度范围内对羟自由基有一定的清除能力,且与浓度有量效关系,即随着质量浓度的增加而增强,但相较于 DPPH 自由基清除率变化幅度较小。不同来源的多花黄精多糖对羟自由基的清除率在 1.39%~61.05% 的范围内,且彼此间差异较大。当质量浓度从 2 mg/mL 上升到 6 mg/mL 时,5 种多花黄精多糖对羟自由基清除作用明显上升。当多花黄精多糖质

量浓度为 10 mg/mL 时,羟自由基清除能力依次为: T-PCP (61.05%) > H-PCP (27.41%) > A-PCP-N (30.32%) > J-PCP (27.41%) > A-PCP-W (10.10%)。且 5 种多糖的最大羟自由基清除能力间存在显著差异 ($P<0.05$) (表 4)。安福窄叶多花黄精多糖的羟自由基清除能力比宽叶多花黄精多糖高 20.22%,这种差异可能是由于分子量、单糖组成的不同。同样地,王飞凤^[41]测定 4 种纯化后的黄精多糖对羟自由基的清除效果,结果发现 4 种多糖的最高羟自由基清除率一样存在显著差异,而最高清除率为 46.75%。本实验中产自江西铜鼓多花黄精多糖对羟自由基的清除效果最好,与 DPPH 自由基清除能力结果一致,这可能与铜鼓多花黄精多糖的不规则且表面粗糙的碎片状结构有关。

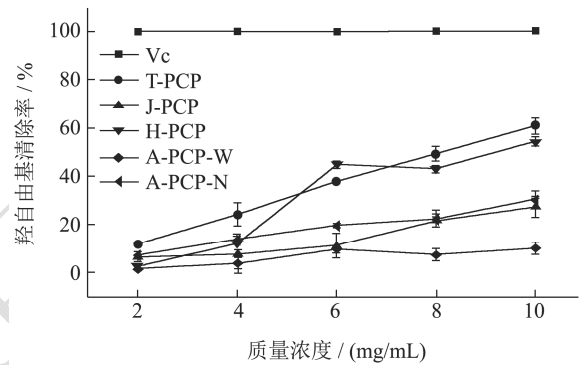


图 6 多花黄精多糖和 Vc 对羟自由基清除作用

Fig.6 The scavenging effect of *Polygonatum cyrtonema* polysaccharides and ascorbic acid on hydroxyl radical

表 4 不同多花黄精多糖的抗氧化能力 (质量浓度为 10 mg/mL)

Table 4 The antioxidant capacity of polysaccharides from *Polygonatum cyrtonema* polysaccharides (mass concentration of 10 mg/mL)

黄精多糖样品	DPPH 自由基清除率/%	羟自由基清除率/%
T-PCP	68.20±0.71 ^a	61.05±3.77 ^a
J-PCP	49.73±2.27 ^b	27.41±4.22 ^c
H-PCP	44.63±1.11 ^c	54.65±1.79 ^b
A-PCP-W	31.01±1.86 ^e	10.10±2.32 ^d
A-PCP-N	35.72±2.23 ^d	30.32±3.63 ^c

3 结论

本文采用药典中的蒽酮-硫酸法测定 5 种多花黄精的多糖含量以检验质量,然后通过水提醇沉法制备得到粗多糖,并比较分析其结构性质和抗氧化活性。结果发现 5 种多花黄精的多糖含量均达到药典要求 ($\geq 7\%$),相互间有显著性差异 ($P<0.05$),其中江西铜鼓多花黄精的多糖含量最高,质量较好。通过单糖组成分析得出,5 种多花黄精多糖均以果糖为主,单糖的种类和含量不同。分子量分布的结果表明不同

来源多花黄精多糖具有多个洗脱峰,分子量(M_w)在2.71~1788.15 ku范围内,说明均为杂多糖。5种多花黄精多糖的红外谱图相似,峰强度有些许差异,均具有多糖类物质的特征吸收峰,含有 α -糖苷键和 β -糖苷键,且含有果聚糖。XRD和SEM结果说明均含有晶态和非晶态组分,且微观形貌主要呈不规则片状或多网孔片状结构。此外,5种多花黄精多糖在2~10 mg/mL质量浓度范围内对DPPH自由基和羟自由基的清除能力呈一定的剂量依赖性。当质量浓度为10 mg/mL时,5种多花黄精多糖对自由基的清除能力具有显著性差异($P<0.05$),且江西铜鼓多花黄精多糖的抗氧化作用最好,这可能与其结构包括单糖组成、分子量的不同和微观结构相关。本实验有助于更好地了解不同来源多花黄精多糖的特性,可为多花黄精优良种质资源的筛选、质量控制以及合理利用提供科学依据。然而,多花黄精多糖的结构-活性关系仍有待探索。在接下来的实验中,将提高江西铜鼓多花黄精多糖的纯度,进一步分析分子量、单糖组成、支化度、糖苷键类型和构象等结构特性与生物活性的相关性,探究并量化多糖的构效关系。

参考文献

- [1] 唐兰芳,王锋,苏小军,等.低共熔溶剂提取对黄精多糖性质及抗氧化活性的影响[J].食品与发酵工业,2021,47(11):151-157.
- [2] 陈宇,周芸涓,李丹,等.黄精的现代药理作用研究进展[J].中药材,2021,44(1):240-244.
- [3] 周忠光,宫铭海,李东辉,等.黄精多糖药理作用及机制的研究进展[J].辽宁中医药大学学报(自然科学版),2021,23(12):1-4.
- [4] Chen D H, Han Z G, Si J P. Huangjing (*Polygonati rhizoma*) is an emerging crop with great potential to fight chronic and hidden hunger [J]. Science China, 2021, 64(9): 1564-1566.
- [5] 周忠瑜,杜泽飞,蒲婷婷,等.基于化学计量学的多花黄精多糖部分酸水解产物PMP-HPLC指纹图谱构建[J].食品工业科技,2022,43(13):284-290.
- [6] 包智影,张智,杜亚飞,等.微生物法提取黄精多糖及体外降脂功能评价[J].中南林业科技大学学报(自然科学版),2021,41(5):142-151.
- [7] Sun T T, Zhang H, Li Y, et al. Physicochemical properties and immunological activities of polysaccharides from both crude and wine-processed *Polygonatum sibiricum* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 143(15): 255-264.
- [8] Zhao P, Li X, Wang Y, et al. Comparative studies on characterization, saccharide mapping and antiglycation activity of polysaccharides from different *Polygonatum* ssp [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2020: 186: 113243.
- [9] 包瑞敏,张智,杜亚飞,等.黄精总皂苷提取工艺优化及其对 α -淀粉酶及 α -葡萄糖苷酶抑制活性[J].食品工业科技,2020,41(16):163-168,175.
- [10] 单春苗,王晨凯,施圆圆,等.多花黄精甾体皂苷生物合成途径分析及关键酶基因研究[J].中国中药杂志,2020,45(12):2847-2857.
- [11] 程子洋,柯仲成,吴永祥.多花黄精内生真菌 *Aspergillus ochraceus* 的代谢产物研究[J].中草药,2019,22:5424-5428.
- [12] 斯金平,朱玉贤.黄精-一种潜力巨大且不占农田的新兴优质杂粮[J].中国科学:生命科学,2021,51(11):1477-1484.
- [13] Dong S Q, Wang X F, Li W H, et al. Phytochemical constituents and chemotaxonomic study of *Polygonatum prattii* Baker [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2021: 97: 104278.
- [14] 陈杨杨,胡慧玲,奉关妹,等.多花黄精炮制前后对游泳力竭小鼠抗疲劳抗氧化的影响[J].中药药理与临床,2021,37(2):92-96.
- [15] He L L, Y B, Yao C Y, et al. Oligosaccharides from *Polygonatum cyrtoneuma* Hua: Structural characterization and treatment of LPS-induced peritonitis in mice [J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 255: 117392.
- [16] Li L, K T, Liao B Y, et al. Antioxidant and antimicrobial potential of polysaccharides sequentially extracted from *Polygonatum cyrtoneuma* Hua [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 114: 317-323.
- [17] 涂明峰.黄精多糖分离纯化、生物活性研究及颗粒剂的制备[D].宜春:宜春学院,2020.
- [18] Han C, Sun T, Liu Y, et al. Protective effect of *Polygonatum sibiricum* polysaccharides on gentamicin-induced acute kidney injury in rats via inhibiting *p38 MAPK/ATF2* pathway [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 151: 595-601.
- [19] Li L, Thakur K, Cao Y Y, et al. Anticancerous potential of polysaccharides sequentially extracted from *Polygonatum cyrtoneuma* Hua in human cervical cancer Hela cells [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 148(1): 843-850.
- [20] 杨明琛,袁梦欣,陆维,等.黄精多糖体外消化特性及对II型糖尿病小鼠肠道菌群的调节作用[J].现代食品科技,2021,37(8):14-21.
- [21] 万晓莹,刘振丽,宋志前,等.黄精炮制前后多糖的相对分子

- 质量分布和免疫活性比较[J].中国实验方剂学杂志,2021, 27(15):83-90.
- [22] Wang Y, Liu N, Xue X, et al. Purification, structural characterization and *in vivo* immunoregulatory activity of a novel polysaccharide from *Polygonatum sibiricum* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 160: 688-694.
- [23] 张庭廷,胡威,汪好芬,等.九华山黄精多糖的分离纯化及化学表征[J].食品科学,2011,32(10):48-51.
- [24] Wang F, Jiang Y, Jin S, et al. Structure characterization and bioactivity of neutral polysaccharides from different sources of *Polygonatum* Mill [J]. Biopolymers, 2022, 23: e23490.
- [25] 国家药典委员会.中国药典[M].北京:中国医药科技出版社,2020.
- [26] Zhao P, Li X, Wang Y, et al. Characterisation and saccharide mapping of polysaccharides from four common *Polygonatum* spp [J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 233: 115836.
- [27] 徐柔.秋葵多糖基本结构和流变学特征及高压均质对其结构的影响[D].南昌:南昌大学,2019.
- [28] Chen J J, Huang H R, Chen Y, et al. Effects of fermentation on the structural characteristics and *in vitro* binding capacity of soluble dietary fiber from tea residues [J]. LWT - Food Science and Technology, 2020, 131(1): 109818.
- [29] 周东月,关敬,付博,等.黄精多糖提取工艺优化及体外抗氧化研究[J].安徽农业科学,2021,49(13):180-183.
- [30] 王雪芹,黄勇,叶方,等.黄精多糖的含量影响因素及其抗糖尿病作用研究进展[J].中南药学,2021,19(8): 1690-1694.
- [31] 钱华丽,赵琪,徐哲,等.不同产地黄精的皂苷和多糖含量[J]. 贵州农业科学,2022,50(3):96-102.
- [32] 杜泽飞.黄精的化学成分、炮制与结构修饰研究及黄精属植物系统发育分析[D].大理:大理大学,2020:34-35
- [33] 田先娇,罗雪维,杨新周,等.不同炮制方式对黄精有效成分含量的影响[J].化学试剂,2021,43(6):790-794.
- [34] Zhang J Y, Chen H L, Luo L, et al. Structures of fructan and galactan from *Polygonatum cyrtonema* and their utilization by probiotic bacteria [J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 267(1): 118219.
- [35] 吴伟菁,陈家凤,赵海军,等.加工方式对黄精多糖的结构和活性影响的研究进展[J].食品工业科技,2022,43(17):482-493.
- [36] Zhang H, Cai X T, Tian Q H. Microwave assisted degradation of polysaccharide from *Polygonatum sibiricum* and antioxidant activity [J]. Journal of Food Science, 2019, 84(4): 754-761.
- [37] 王丽波,高婧宇,李腾飞,等.硒化蒲公英多糖的制备、结构表征及益生菌促增殖活性[J].食品科学,2021, 42(7):169-175.
- [38] 雍潘.多花黄精的多糖提取、纯化、结构解析及活性研究[D].成都:西南民族大学,2019.
- [39] 刘基.黄精糖聚物的提取、分离纯化和结构鉴定[D].广州:广东药科大学,2021.
- [40] 何晓梅,李超,李永忠,等.不同产地黄精多糖含量测定及其体外抗氧化活性研究[J].皖西学院学报(自然科学版),2018, 34(5):89-92.
- [41] 王飞凤.黄精中性多糖的分离纯化、结构鉴定及其体外活性研究[D].杭州:浙江理工大学,2021.