

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2025.01.018

刘瑜彬, 陈昶安, 苏怡琳, 等. 九蒸九制黄精多糖的结构特征及其抑制氧化应激作用[J]. 粮油食品科技, 2025, 33(1): 174-182.

LIU Y B, CHEN C A, SU Y L, et al. Structural characteristics and inhibiting oxidative stress of nine-steaming-nine-processing *Polygonatum Kingianum* Coll.et hemsl polysaccharides[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2025, 33(1): 174-182.

九蒸九制黄精多糖的结构特征 及其抑制氧化应激作用

刘瑜彬¹, 陈昶安², 苏怡琳², 罗珍¹, 颜瑾¹, 黎攀², 杜冰²✉

(1. 无限极(中国)有限公司, 广东 广州 510665;

2. 华南农业大学 食品学院, 广东 广州 510642)

摘要: 为探讨传统炮制处理的黄精多糖(NPKP)结构特性及其抗氧化作用, 通过单糖组成分析, NPKP 包含鼠李糖(3.5%)、阿拉伯糖(4.6%)、半乳糖(78.2%)、葡萄糖(2.1%)、木糖(1.0%)、甘露糖(1.3%)和半乳糖醛酸(9.4%)。分子量分析结果显示, NPKP 主要含有两类组分, 组分1的重均分子量为196 857 Da, 组分2为13 653 Da。甲基化分析表明, NPKP 主要通过 $\rightarrow 4$)-Glap-(1 \rightarrow 糖苷键连接, 摩尔占比31.8%, 分支度51.7%。结合碘-碘化钾实验, 证实NPKP是一种具有复杂分支结构的多糖。体外细胞试验结果表明, NPKP在显著降低HepG2细胞内活性氧(ROS)水平的同时, 增加了抗氧化酶(超氧化物歧化酶、过氧化氢酶)和抗氧化物谷胱甘肽的表达, 缓解了游离脂肪酸诱导的氧化应激损伤。通过这些作用机制, NPKP展示了显著的抗氧化能力, 为黄精多糖作为天然抗氧化剂的潜在应用提供了基础数据, 为其在缓解氧化应激相关疾病中的应用提供了科学依据。

关键词: 九蒸九制黄精; 黄精多糖; 多糖结构; 氧化应激; 抗氧化

中图分类号: TS201.1 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2025)01-0174-09

网络首发时间: 2024-12-10 13:45:11

网络首发地址: <https://link.cnki.net/urlid/11.3863.TS.20241209.1721.004>

Structural Characteristics and Inhibiting Oxidative Stress of Nine-steaming-nine-processing *Polygonatum Kingianum* Coll.et Hemsl Polysaccharides

LIU Yu-bin¹, CHEN Chang-an², SU Yi-lin², LUO Zhen¹, YAN Jin¹, LI Pan², DU Bing²✉

(1. Infinitus (China) Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong 510665, China;

2. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China)

Abstract: This study investigated the structural characteristics and antioxidant activity of *Polygonatum kingianum* Coll.et Hemsl polysaccharides (NPKP) processed via nine-steaming-nine-drying methods.

收稿日期: 2024-08-25; 修回日期: 2024-09-24; 录用日期: 2024-09-29

基金项目: 广东省重点领域研发计划“发酵食品精准制造关键技术及产业化示范”(2020B020226008)

Supported by: Key-Area Research and Development Program of Guangdong Province “Key Technologies for Precision Manufacturing and Industrialization Demonstration of Fermented Foods” (No. 2020B020226008)

第一作者: 刘瑜彬, 男, 1987年出生, 硕士, 工程师, 研究方向为功能性食品开发, E-mail: Lewis.Liu@infinitus-int.com

通信作者: 杜冰, 男, 1973年出生, 博士, 教授, 研究方向为中草药炮制及活性成分代谢调控、新资源食品开发和应用, E-mail: dubing@scau.edu.cn

Monosaccharide composition analysis revealed that NPKP consists of rhamnose (3.5%), arabinose (4.6%), galactose (78.2%), glucose (2.1%), xylose (1.0%), mannose (1.3%), and galacturonic acid (9.4%). Molecular weight analysis revealed two main components in NPKP, with molecular weights of 196,857 Da and 13,653 Da. Methylation analysis indicated that NPKP is primarily linked by $\rightarrow 4$ -Glap-(1 \rightarrow glycosidic bonds, accounting for 31.8% of the total, with a branching degree of 51.7%. Additionally, iodine-potassium iodide tests confirmed that NPKP is a highly branched polysaccharide. *In vitro* cellular experiments showed that NPKP significantly reduced reactive oxygen species (ROS) levels in HepG2 cells. It also upregulated antioxidant enzymes, including superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione (GSH), alleviating oxidative stress induced by free fatty acids. Through these mechanisms, NPKP exhibited remarkable antioxidant capacity. This study provides a basis data for the application of Polygonatum polysaccharides as natural antioxidants and supports their role in mitigating oxidative stress-related diseases.

Key words: nine-steaming-nine-processing *Polygonatum kingianum* Coll.et Hemsl; *Polygonatum kingianum* Coll. et. Hemsl. polysaccharide; polysaccharide structure; oxidative stress; antioxidant

氧化应激是指当机体内活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 水平超过抗氧化防御系统的能力时, 导致的氧化损伤, 这与多种疾病的发生密切相关, 如心血管疾病、糖尿病和神经退行性疾病^[1], 近年来, 研究发现, ROS 通过诱导脂质过氧化、DNA 损伤及细胞凋亡, 直接推动了氧化失衡和病理过程的发展^[2]。抗氧化剂可以通过清除 ROS 来减少氧化损伤, 从而防止疾病的发生。合成抗氧化剂虽然在食品、药品等领域得到广泛应用^[3], 但其长期使用可能存在毒性、安全性问题, 并且可能无法提供持续的抗氧化保护^[4]。因此, 开发具有高效抗氧化活性且副作用低的天然抗氧化剂具有重要意义。

多糖作为天然植物的活性成分, 因其良好的抗氧化性能引起了广泛关注。多项研究表明, 多糖可以有效清除 ROS, 减轻氧化应激, 进而预防相关疾病^[5]。例如, 灵芝多糖和枸杞多糖等已被证明具有显著的抗氧化效果^[6]。与合成抗氧化剂相比, 天然多糖不仅抗氧化能力强, 且副作用较少, 在健康促进和疾病预防中显示出广泛的应用前景。例如, 某些药用植物中的多糖如枸杞多糖、灵芝多糖等, 已被证明在抗氧化方面具有显著效果^[7]。因此, 寻找新型天然抗氧化剂并探讨其抗氧化机制, 对于开发预防和治疗氧化应激相关疾病的策略具有重要意义。

黄精为百合科植物滇黄精, 不同的黄精在形

态上各有特点, 并且春季和秋季是主要的采挖季节^[8]。黄精的传统炮制加工方式为九蒸九制, 食九蒸九制黄精的相关记录能够追溯到北宋时期^[9]。研究指出, 黄精在蒸制后, 其补脾、润肺、益肾的功能会显著增强, 同时能够去除原有的麻味, 从而避免对咽喉的刺激^[10], 冯婧等^[11]研究发现, 与未炮制的黄精相比, 九蒸九制黄精水提液的抗氧化活性优势明显, 效果更突出。多糖是黄精的主要活性成分, 2020 版的中国药典更是以多糖的含量作为黄精的质量鉴定标准。多糖的结构特征与其抗氧化活性密切相关^[12], 本研究旨在分析九蒸九制黄精多糖 (Nine steaming-nine processing *Polygonatum kingianum* Coll. et. Hemsl. polysaccharide, NPKP) 结构特征并通过游离脂肪酸 (Free fatty acid, FFA) 诱导的 HepG2 模型评价其缓解氧化应激的能力。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

滇黄精购于云南省普洱市思茅区龙潭乡, 经国家中药材产业技术体系岗位科学家、华南农业大学杜冰教授鉴定为 4 年生百合花滇黄精的干燥根茎。

1.2 仪器与设备

氯化钠: 天津市大茂化学试剂厂; 无水乙醇: 重庆北培化学试剂厂; 超氧化物歧化酶 (Superoxide

dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 和谷胱甘肽 (Glutathione, GSH): 南京建成生物工程研究所; 甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、半乳糖、葡萄糖、葡萄糖醛酸、阿拉伯糖、木糖、岩藻糖、盐酸氨基葡萄糖、N-乙酰-D-氨基葡萄糖: 默克 Sigma; DMEM/F12 培养基、磷酸盐缓冲液 (Phosphate-buffered saline, PBS)、胎牛血清、含乙二胺四乙酸 (Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) 胰酶、无 EDTA 胰酶, 1% 双抗: 亿泽丰生物科技 (上海) 有限公司; CCK8 检测试剂盒: 碧云天生物技术有限公司。

旋转蒸发仪 Laborata: 德国 Heidolph; 数显恒温水浴锅 HH-4: 常州市华普达数学仪器有限公司; 离心机 ANKE TDL-5-A: 上海安亭分析仪器有限公司; 酶标仪 Labserv K3: 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; 液相色谱 Vanquish™ Flex: Thermo Scientific; 离子色谱仪 ICS5000: Thermo Fisher; 气相质谱联用仪 6890-5973: Agilent。

1.3 实验方法

1.3.1 样品前处理

黄精块茎去除须根后清洗去皮, 用自动切片器切成 1 cm 的厚片, 并对厚片进行清水蒸制 (100 °C, 3 h), 于 50 °C 烘箱烘制 8 h, 重复 9 次, 即得九蒸九制黄精。黄精按 1: 2 的料液比加水, 在 85 °C 下加热 1.5 h^[12], 得到九蒸九制黄精液。向此液中加入 4 倍体积的无水乙醇, 摇匀后冷藏静置过夜。通过离心分离出沉淀, 用蒸馏水溶解后, 再次使用旋转蒸发仪进行低温减压蒸馏, 以去除乙醇, 最终得到粗多糖溶液。

为了纯化黄精多糖, 我们参考文献[12], 采用 Sevage 试剂进行脱蛋白处理。在冷冻干燥后经苯酚硫酸法 (葡萄糖标准曲线: $y=0.0054x+0.0015$) 所测的该多糖纯度为 75.17%。

1.3.2 碘-碘化钾实验

参考文献[13]的方法, 对 NPKP 进行测定。

1.3.3 单糖组成测定

参考文献[12]的方法, 采用高效阴离子交换色谱 (High-performance ion chromatography, HPIC) 测定单糖组成。

1.3.4 傅里叶变换红外光谱 (FT-IR) 测定

参考文献[12]利用傅里叶变换红外仪测定 NPKP 的红外光谱。

1.3.5 分子量的测定

参考文献[13]对 NPKP 的分子量分布采用高效凝胶渗透色谱 (High performance gel permeation chromatography, HPGPC) 进行测定。

1.3.6 甲基化分析

参考文献[12]的方法, 采用气相色谱-质谱法对甲基化进行分析。分支度计算公式如下:

$$\text{分支度} = \frac{\text{末端残基} + \text{分支残基}}{\text{末端残基} + \text{分支残基} + \text{线性残基}}$$

1.3.7 扫描电子显微镜测定

参考文献[13], 对多糖进行扫描电镜测定。

1.3.8 氧化应激能力测定 HepG2

细胞分为空白组 (NC)、模型组 (Model)、低剂量 NPKP 组 (25 μg/mL, LD) 和高剂量 NPKP 组 (100 μg/mL, HD)。参考文献[12], 本研究采用的 FFA 浓度为 (油酸: 棕榈酸=245 μM: 122.50 μM)。

1.3.8.1 抗氧化酶和抗氧化底物测定 当细胞在 T25 培养瓶中生长至较高密度时, 进行消化, 后将其转移到 6 孔板中, 浓度为每孔 2.5×10^5 个细胞。细胞贴壁 24 h 后, 舍弃旧培养液并用磷酸盐缓冲液清洗细胞。NC 组加入完全培养基, 其余各组每孔加入 2 mL 的 FFA 溶液进行诱导, 24 h 后去除培养基并用 PBS 清洗。接着, NC 组和 Model 组加入完全培养基, 其余各组加入特定浓度的 NPKP 完全培养基, 再培养 24 h。之后, 对细胞进行消化和裂解, 并按试剂盒说明书测定 SOD、CAT、GSH 的含量。

1.3.8.2 细胞内活性氧水平检测 取生长状态良好的细胞, 以每孔 2.5×10^5 个的密度接种于 6 孔培养板内, 在培养箱中培养 24 h, 使其贴壁生长, 舍弃旧培养液, 按照上述操作处理一定的时间。培养完成后, 舍弃培养液, 用无菌 PBS 清洗 2~3 次, 每孔加入 500 μL 无 EDTA 的胰酶, 置于 37 °C 培养箱内消化 2~3 min, 使细胞达到轻轻拍打可呈流沙状脱落状态。随后, 迅速加入相同体积培养液终止消化反应, 使用移液枪吹打培养瓶, 直

至细胞完全脱落,并将细胞悬浊液转移至无菌离心管(Eppendorf tube, EP管)中,以适当的转速和时间进行离心,舍弃上清,再利用DMEM重悬并清洗细胞1~2次。最后清除清液,留保细胞。依据活性氧检测试剂盒说明书,按照1:1 000的比例用无血清DMEM培养基稀释2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(2',7'-Dichlorodihydro fluorescein diacetate, DCFH-DA),制成适合细胞孵育的工作液,向每管细胞样品中加入1 mL工作液。随后置于培养箱内孵育20 min,每隔3~5 min轻轻摇晃,以确保DCFH-DA工作液与细胞充分接触并均匀分布,用无血清DMEM培养基清洗并重悬细胞3次,舍弃上清,加300 μ L无血清培养液重悬细胞上机并分析数据。

1.4 数据处理

采用Microsoft Excel 2021软件处理数据;采用SPSS 28.0软件进行数据统计学分析;使用Origin 2024和Graphpad prism 10.0软件进行图表绘制。

2 结果与分析

2.1 碘-碘化钾分析

NPKP和碘-碘化钾试剂混合后扫描光谱如图1所示。由图可知,经过对NPKP与碘-碘化钾试剂反应液的光谱分析,发现在350 nm波长处存在显著的强吸收峰,而在550 nm波长处则几乎没有吸收现象,这说明NPKP分子结构中很可能包含了复杂的链状架构,其特点在于较长的侧链以及众多的支链^[13]。

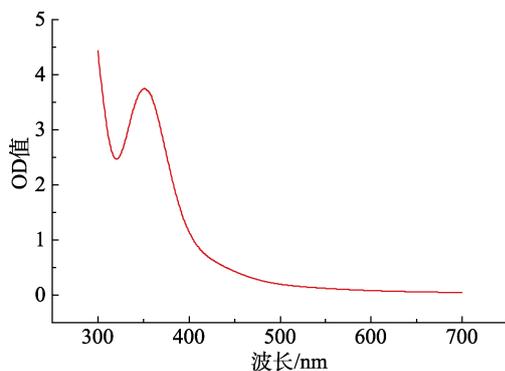


图1 碘-碘化钾实验结果

Fig.1 Results of the iodine-potassium iodide experiment

2.2 单糖组成

如图2所示,单糖组成摩尔比为鼠李糖:阿拉伯糖:半乳糖:葡萄糖:木糖:甘露糖:半乳糖醛酸=3.5%:4.6%:78.2%:2.1%:1%:11.3%:9.4%。半乳糖占比最高,为78.2%,且含有半乳糖醛酸。

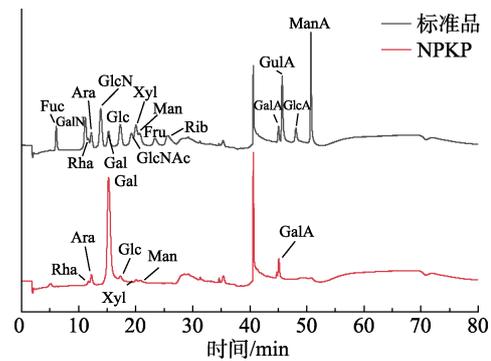


图2 单糖组成色谱图

Fig.2 Chromatogram of monosaccharide composition

2.3 分子量测定结果

NPKP色谱图见图3,具体数值结果见表1。NPKP主要含有两类组分,组分1的重均分子量(Molecular weight, Mw)为196 857 Da,组分2的Mw为13 653 Da。

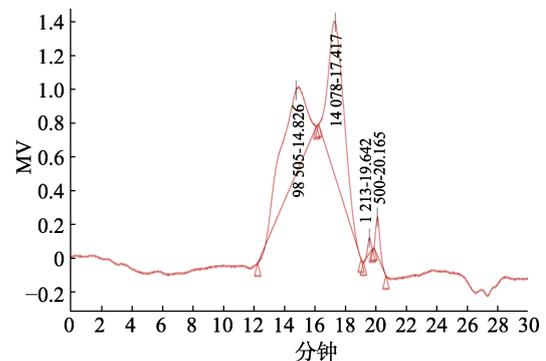


图3 NPKP分子量谱图

Fig.3 Molecular weight profile of NPKP

表1 NPKP分子量分布

Table 1 Molecular weight distribution of NPKP

组分	保留时间/ min	数均分子量 Mn/Da	重均分子量 Mw/Da	多分散性
NPKP1	14.13	115 635	196 857	1.70
NPKP2	17.46	11 765	13 653	1.16

2.4 FT-IR分析

如图4所示,NPKP的FT-IR光谱在4 000~

400 cm^{-1} 范围内展示了多糖的典型吸收峰。其中, 3 400 cm^{-1} 处的吸收峰对应—OH 键的特征, 2 930 cm^{-1} 处的吸收峰则表征了 C—H 键, 这些都是多糖的典型特征吸收峰。NPKP 在 1 635 cm^{-1} 处的峰是由于酰基氨基中 C—O 键的拉伸振动所导致的。在 1 640 cm^{-1} 处的不对称拉伸振动表明存在非酯化羰基 C=O, 是糖醛酸和结合水的特征峰。相比于未炮制前的黄精多糖^[12], NPKP 在 1 253 cm^{-1} 附近多出了相关的吸收峰, 其形成也归因于糖醛酸单元的羧酸部分。除此之外, 在 1 016~1 147 cm^{-1} 范围内的吸收峰表示吡喃糖单位^[14], 在 890 cm^{-1} 的峰值归因 β -D-吡喃糖苷^[15]。

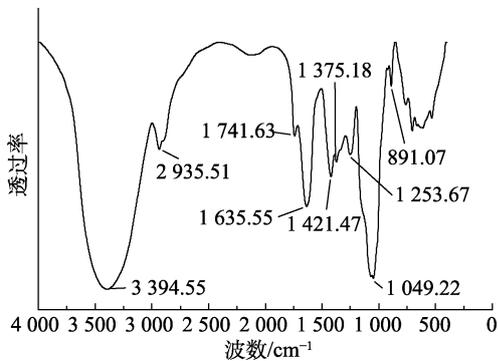


图 4 NPKP 的红外谱图
Fig.4 FT-IR spectrum of NPKP

2.5 甲基化结果分析

NPKP 甲基化后的 GC-MS 谱图以及其质谱图如图 5 所示, 结果如表 2 所示。根据表中的摩尔比可知, 糖苷键摩尔比与 NPKP 的主要糖苷键连接方式为 $\rightarrow 4$)-Galp-(1 \rightarrow (占 31.8% 摩尔分数)。NPKP 的分支度摩尔百分比为 51.7%, 表明其均存在较复杂的分支结构, 结果与 2.1 一致。

2.6 SEM 分析

SEM 通常用于观察多糖的表面形态^[16]。NPKP 的微观结构由 SEM 在 100 倍和 500 倍的放大倍率下测定, 如图 6 所示。NPKP 的表面呈现不同尺寸的致密的片状结构, 表面较光滑。

2.7 NPKP 对 FFA 诱导 HepG2 细胞氧化应激影响

如图 7 所示, 与 NC 组相比, 经 FFA 处理后, HepG2 细胞中的 SOD 含量明显降低。然而, 用不同浓度的 NPKP 处理后, HepG2 细胞中的 SOD

含量呈剂量依赖性增加。与 Model 组相比, HD 组的 SOD 含量增加了 25.2%。与 NC 组相比, 模型组的 CAT 含量在 FFA 诱导后有所下降, 而经过 NPKP 干预后, HepG2 细胞中的 CAT 含量以浓度依赖的方式增加, 显著抑制了 FFA 诱导细胞中 CAT 活性的降低。不过, 低剂量组和模型组的 CAT 含量没有明显差异, 这主要是因为多糖的浓度较低。同样, GSH 含量的变化与上述趋势相近。如图 8 所示, 与 NC 组相比, 经过 FFA 处理后, HepG2 细胞中的 ROS 水平显著升高, 说明 FFA 诱导了明显的氧化应激。然而, 用不同浓度的 NPKP 处理后, HepG2 细胞中的 ROS 水平呈现出剂量依赖性下降的趋势。与 Model 组相比, 高剂量 (HD) NPKP 处理组的 ROS 水平降低了 38.9%。此外, FFA 诱导使模型组的 ROS 水平显著高于 NC 组, 但经过 NPKP 的干预, ROS 水平显著下降, 尤其是在高剂量处理组, 表明 NPKP 对 FFA 诱导的氧化应激具有缓解作用。这些结果表明, NPKP 能够有效抑制 FFA 诱导的 HepG2 细胞氧化应激反应, 呈现出良好的抗氧化活性。

表 2 NPKP 甲基化结果
Table 2 Methylation analysis results of NPKP

RT/min	甲基化糖基	摩尔比	糖苷键
10.70	2, 3, 5-Me ₃ -Araf	0.032	Araf-(1 \rightarrow
12.01	2, 3, 5-Me ₃ -Xylp	0.014	Xylp-(1 \rightarrow
14.52	2-Me ₁ -Rhap	0.017	$\rightarrow 3, 4$)-Rhap-(1 \rightarrow
15.49	2, 3-Me ₂ -Araf	0.046	$\rightarrow 5$)-Araf-(1 \rightarrow
15.70	2, 3-Me ₂ -Xylp	0.043	$\rightarrow 4$)-Xylp-(1 \rightarrow
17.20	2, 3, 4, 6-Me ₄ -GlcP	0.014	GlcP-(1 \rightarrow
18.22	2, 3, 4, 6-Me ₄ -Galp	0.204	Galp-(1 \rightarrow
19.36	2-Me ₁ -Araf	0.138	$\rightarrow 3, 5$)-Araf-(1 \rightarrow
21.56	2, 3, 6-Me ₃ -Galp	0.318	$\rightarrow 4$)-Galp-(1 \rightarrow
21.76	2, 3, 6-Me ₃ -GlcP	0.038	$\rightarrow 4$)-GlcP-(1 \rightarrow
22.11	2, 4, 6-Me ₃ -Galp	0.012	$\rightarrow 3$)-Galp-(1 \rightarrow
22.46	2, 3, 4-Me ₃ -GlcP	0.016	$\rightarrow 6$ -GlcP-(1 \rightarrow
24.04	2, 3, 4-Me ₃ -Galp	0.011	$\rightarrow 6$)-Galp-(1 \rightarrow
24.70	2, 6-Me ₂ -Galp	0.027	$\rightarrow 3, 4$)-Galp-(1 \rightarrow
25.68	2, 3-Me ₂ -Manp	0.012	$\rightarrow 4, 6$)-Manp-(1 \rightarrow
27.49	2, 3-Me ₂ -Galp	0.046	$\rightarrow 4, 6$)-Galp-(1 \rightarrow
28.93	2, 4-Me ₂ -Galp	0.014	$\rightarrow 3, 6$)-Galp-(1 \rightarrow

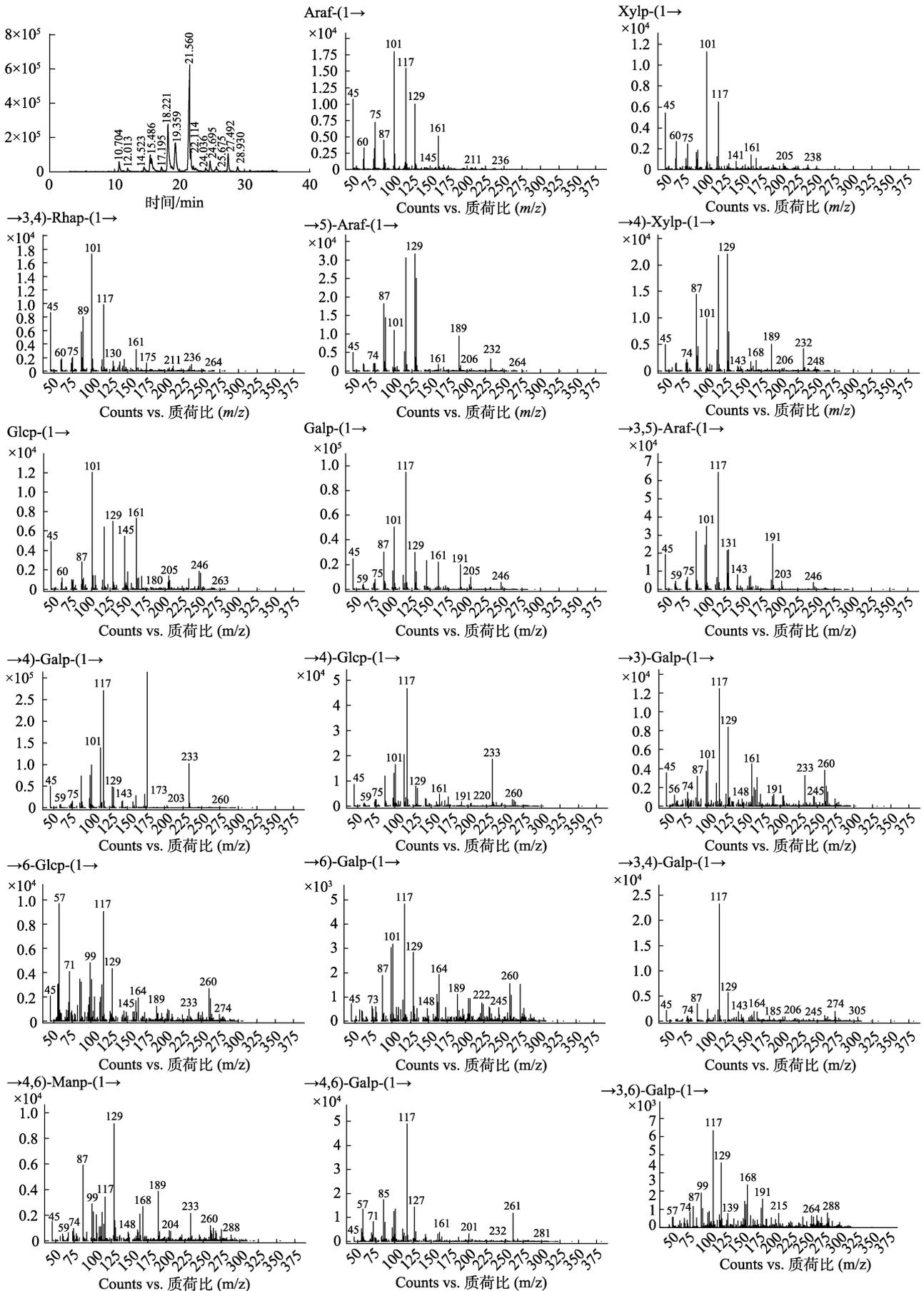
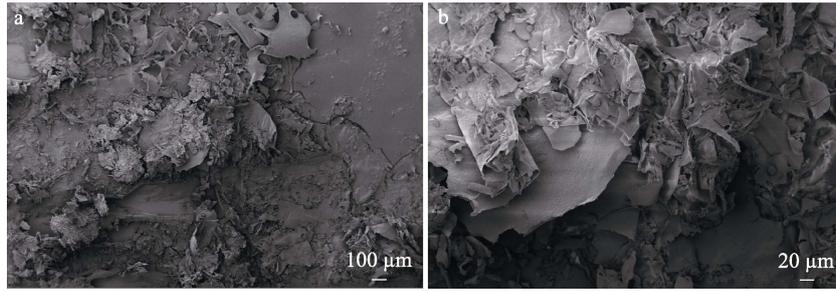


图5 NPKP 甲基化结果

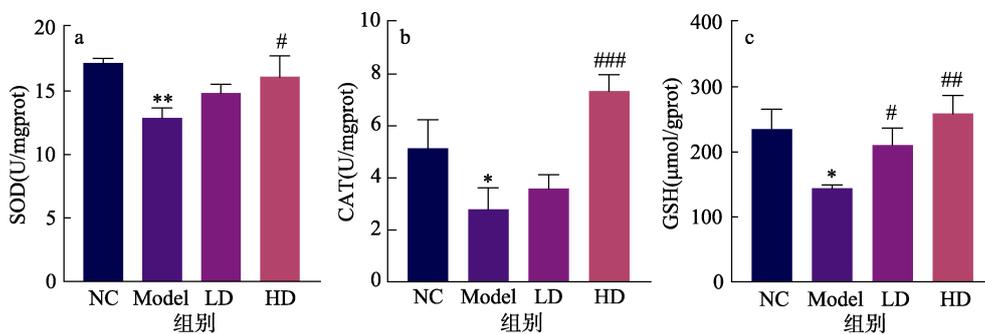
Fig.5 Methylation analysis results of NPKP



注：a、b 分别为九蒸九制黄精粗多糖在电子显微镜下放大 100 和 500 倍的表面形态图。

Notes: a and b represent the surface morphology of Jiuzheng Jiuzhi Polygonatum crude polysaccharide under an electron microscope at 100x and 500x magnification, respectively.

图 6 NPKP 的扫描电镜图
Fig.6 SEM images of NPKP

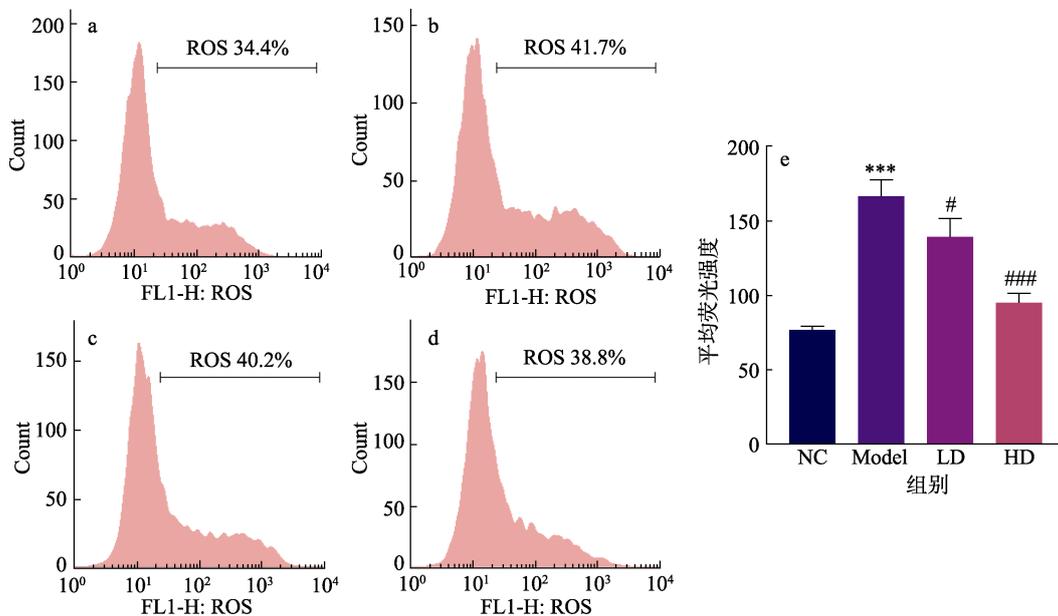


注：与 NC 组相比，* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ ；与 Model 组相比，# $p < 0.05$ 、## $p < 0.01$ 、### $p < 0.001$ 。

Notes: Compared with the NC group, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; compared with the Model group, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$.

图 7 NPKP 对细胞内 SOD (a)、CAT (b) 和 GSH (c) 含量的影响

Fig.7 Effects of NPKP on intracellular levels of SOD (a), CAT (b), and GSH (c)



注：a、b、c、d 分别为 NC 组、Model、LD 组和 HD 组的流式直方图，e 为平均荧光强度统计柱状图。与 NC 组相比，* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ ；与 Model 组相比，# $p < 0.05$ 、## $p < 0.01$ 、### $p < 0.001$ 。

Notes: (a, b, c, d) represent flow cytometric histograms of the NC group, Model group, LD group, and HD group, respectively. (e) shows a bar graph of mean fluorescence intensity. Compared with the NC group, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; compared with the Model group, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$.

图 8 NPKP 对细胞内 ROS 的影响
Fig.8 Effect of NPKP on intracellular levels of ROS

3 讨论

本研究表明,九蒸九制的加工工艺对黄精多糖的结构产生了显著影响。前期研究指出,黄精多糖中含有大量的果糖^[12],然而,果糖在高温环境中容易发生分解,特别是在超过 100 °C 的条件下,其分解速率显著增加^[17]。九蒸九制的炮制过程涉及反复的高温蒸制(>100 °C)和烘干,这种长时间的高温处理可能导致果糖的大量分解,因而在我们研究的 NPKP 中未检测到果糖的存在。相比之下,葡萄糖单糖在高温下的化学稳定性较高^[18],能够在高温条件下保持结构完整。因此,它们在 NPKP 的单糖组成中仍然存在。这解释了为何 NPKP 中检测不到果糖,而其他单糖仍然保留。分子量结果表明,与 HUANG 等^[12]研究的生黄精多糖相比,NPKP 的分子量显著增加,这可能是由于九蒸九制过程中,多糖分子的羟基发生了分子间聚集,导致分子量上升^[19]。特别是在多次反复蒸制的过程中,分子间的相互作用进一步加强,使得多糖分子形成更大的聚集体。此外,多糖结构中可能发生交联反应,特别是羧基和羟基之间的交联,这也可能促进分子量的增加^[19]。在红外光谱的结果中,NPKP 在 1 253 cm⁻¹ 附近出现了新的吸收峰,表明糖醛酸单元的存在,进一步与单糖组成分析的结果一致,表明炮制过程可能诱导了糖醛酸的生成。相比未经蒸制处理的黄精多糖,NPKP 的分支度更高,可能是由于多次高温蒸制引起多糖结构的分解和重组,增加了分支点的形成^[13]。这一结果与 Li 等^[20]的研究一致,其研究指出,蒸煮处理会导致多糖分子的降解和聚集。在本研究中,NPKP 的 SEM 图像呈现出蓬松片状且表面紧密的结构,表明蒸制时间延长可能会促进较小和较大块状结构的聚集。

代谢过程中所产生的化合 ROS 会引发氧化应激并且对细胞有损。抗氧化酶如 SOD 和 CAT,以及 GSH,在中和 ROS 方面起主要作用。研究指出多糖可以通过直接清除自由基、增强抗氧化酶 SOD 和 CAT 等活性、保护和再生 GSH 来减轻氧化应激,展现出显著的抗氧化潜力^[21],细胞实验的结果表明,NPKP 在缓解 FFA 诱导的 HepG2 氧

化应激中表现出显著的抗氧化活性。此前研究已经证明,多糖的抗氧化活性与其结构特征密切相关^[13]。与先前研究中含有高比例果糖的生黄精多糖不同,NPKP 主要由阿拉伯糖和半乳糖组成,其占比较高的糖苷键分别为 $\rightarrow 3, 5$)-Araf-(1 \rightarrow 、 $\rightarrow 4$)-Galp-(1 \rightarrow 和 Galp-(1 \rightarrow 。研究发现,富含阿拉伯糖和半乳糖的多糖物质,因其强大的抗氧化能力而备受瞩目。它们能有效清除自由基,抑制脂质过氧化反应,并提升细胞内抗氧化酶的活性,从而发挥出色的抗氧化效果^[12]。除此之外,高分子量多糖拥有更长的分子链和更多的官能团,这些官能团如羟基、羧基等可以与自由基反应,提供更多的反应位点,从而有效清除自由基^[22],这些研究结果表明,NPKP 能够缓解 FFA 诱导的 HepG2 细胞氧化应激,其抗氧化活性与其结构密切相关。因此,NPKP 是一个潜在的天然抗氧化剂,有望在改善人类健康方面发挥重要作用。这一发现为多糖作为抗氧化剂的研究领域做出了重要贡献。尽管本研究中的体外试验显示了良好的抗氧化活性,但尚未完全反映出活体系统中复杂的生理和代谢过程。因此,有必要进行体内试验,以探索其作为治疗剂的潜力及其具体机制,从而深入了解其可能的应用途径。

4 结论

本研究提取了九蒸九制处理的滇黄精多糖(NPKP),深入分析了其结构特征。结果显示,NPKP 具有复杂的分支结构,主要由半乳糖和阿拉伯糖组成,主要的糖苷键连接方式为 $\rightarrow 4$)-Galp-(1 \rightarrow 。通过游离脂肪酸诱导的 HepG2 细胞模型实验,发现 NPKP 能够显著降低细胞内活性氧水平,提升抗氧化酶的活性,表现出良好的抗氧化应激缓解效果。本研究不仅丰富了对传统九蒸九制炮制工艺下黄精多糖结构的认识,还为其作为天然抗氧化剂的潜在应用提供了科学依据。这对于优化黄精的炮制方法和开发相关功能性产品具有重要意义。然而,黄精多糖的具体抗氧化机制和结构与活性之间的关系仍需进一步研究。未来的工作将聚焦于深入解析 NPKP 的作用机制,为其在医药和保健领域的应用奠定更加坚实的科学基础。

参考文献:

- [1] TANG Q L, HUANG G L. Preparation and antioxidant activities of cuaurbit polysaccharide[J]. Chongqing Normal University, Active Carbohydrate Research Center, Chongqing, 401331, China, 12524, 2018, 117: 362-365.
- [2] HAN X S, LI J J, BRASKY T M, et al. Antioxidant intake and pancreatic cancer risk The vitamins and lifestyle (VITAL) study [J]. Cancer, 2013, 119(7): 1314-1320.
- [3] CHEN Z, CHENG L, HE Y, et al. Extraction, characterization, utilization as wound dressing and drug delivery of Bletilla striata polysaccharide: A review [J]. Chongqing Normal University, Active Carbohydrate Research Center, Chongqing, 401331, China, 12524, 2018, 120: 2076-2085.
- [4] MILISAV I, RIBARIC S, POLJSAK B. Antioxidant Vitamins and Ageing [J]. Sub-cellular biochemistry, 2018, 90: 1-23.
- [5] 徐元庆, 张静, 王哲奇, 等. 岩藻多糖对大鼠氧化应激的缓解作用研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2024, 36(4): 653-9+571.
- XU Y Q, ZHANG J, WANG Z Q, et al. Alleviating effect of fucoidan on oxidative stress in rats [J]. Natural Product Research and Development, 2024, 36(4): 653-659+571.
- [6] WANG S Q, LI G, ZHANG X F, et al. Structural characterization and antioxidant activity of Polygonatum sibiricum polysaccharides [J]. Carbohydrate Polymers, 2022, 291.
- [7] 赵杰, 史素芳, 单铁强, 等. 枸杞多糖通过激活 Nrf2/HO-1 通路保护 HK-2 细胞氧化损伤的作用[J]. 中国实验诊断学, 2024, 28(4): 474-477.
- ZHAO J, SHI S F, SHAN T Q, et al. Lycium barbarum polysaccharides protect against oxidative damage in HK-2 cells by activating Nrf2/HO-1 pathway[J]. Chinese Journal of Experimental Diagnostics, 2024, 28(4): 474-477.
- [8] 国家药典委员会. 中国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- Chinese Pharmacopoeia Commission. Chinese pharmacopoeia[M]. Beijing: The Medicine Science and Technology Press of China, 2020.
- [9] 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.
- ZHANG F, ZHONG W H, LV C Q, et al. Physicochemical characteristics of Polygonatum sibiricum Root and evolution of its polysaccharide components during the nine-steam-nine-bask process[J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(9): 171-180.
- [10] 龚千锋. 中药炮制学 [M]. 中国中医药出版社, 2016.
- GONG Q F. Chinese Medicine Processing[M]. China Traditional Chinese Medicine Press, 2016.
- [11] 冯婧, 胡娟娟, 何先元, 等. 不同炮制方法对渝产黄精体外抗氧化作用的影响[J]. 中国药业, 2020, 29(19): 25-30.
- FENG J, HU J J, HE X Y, et al. Effect of different processing methods on the antioxidant activities *in vitro* of polygonatum cyrtoneema hua in Chongqing[J]. China Pharmaceuticals. 2020, 29(19): 25-30.
- [12] HUANG J, CHEN Y, SU Y, et al. Identification of carbohydrate in *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl and inhibiting oxidative stress[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 261.
- [13] 黄俊源, 袁晚晴, 苏艺, 等. 酶解糖化滇黄精多糖的结构表征及其免疫活性[J]. 现代食品科技, 2024, 40(04): 104-112.
- HUANG J Y, YUAN W Q, SU Y, et al. Enzymatic saccharification of *polygonatum kingianum* coll. et hemsl polysaccharides: structural characterization and immunological activity[J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(4): 104-112.
- [14] JIN-BO B, JI-CHUN G, WANG-JUAN Z, et al. Physicochemical, morpho-structural, and biological characterization of polysaccharides from three Polygonatum spp[J]. RSC Advances, 2021.
- [15] ZUMAN D, CHUN C, QIANG H, et al. Comparative study on the effect of extraction solvent on the physicochemical properties and bioactivity of blackberry fruit polysaccharides[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021.
- [16] ALI M, BAHADUR S, HUSSAIN A, et al. Foliar epidermal micromorphology and its taxonomic significance in Polygonatum (Asparagaceae) using scanning electron microscopy[J]. Microscopy Research And Technique, 2020, 83(11): 1381-1390.
- [17] NOLASCO JUNIOR J, DE MASSAGUER P R. Thermal degradation kinetics of sucrose, glucose and fructose in sugarcane must for bioethanol production[J]. Journal of Food Process Engineering, 2006, 29(5): 462-477.
- [18] JR J, MASSAGUER P. Thermal degradation kinetics of sucrose, glucose and fructose in sugarcane must for bioethanol production [J]. Journal of Food Process Engineering, 2006, 29: 462-477.
- [19] ZHOU T, ZHOU Q, LI E, et al. Effects of nitrogen fertilizer on structure and physicochemical properties of 'super' rice starch [J]. Carbohydr Polym, 2020, 239: 116237.
- [20] LI Q, ZENG J, GONG P, et al. Effect of steaming process on the structural characteristics and antioxidant activities of polysaccharides from Polygonatum sibiricum rhizomes[J]. Glycoconjugate Journal, 2021, 38(5): 561-572.
- [21] CAO M, CAO Z, TIAN J, et al. Structural characterization and *in vitro* antioxidant activity of a novel polysaccharide from summer-autumn tea [J]. Foods, 2024, 13(6).
- [22] LIU Y, HUANG G. Antioxidant effects of polysaccharides from traditional Chinese medicines[J]. Mini Reviews in Medicinal Chemistry, 2017, 18. 
- 备注: 本文的彩色图表可从本刊官网 (<http://lyspkj.ijournal.cn>)、中国知网、万方、维普、超星等数据库下载获取。