

山芹菜多糖的分离纯化、结构分析及抗氧化活性比较

石曾卉¹, 刘丽阳¹, 洪慧丽¹, 勾东霞¹, 刘多^{1,2*}

(1. 长春大学食品科学与工程学院, 吉林长春 130000) (2. 长春师范大学生命科学学院, 吉林长春 130000)

摘要: 对山芹菜粗多糖(WOSP)进行提取, 分离纯化得到酸性多糖(WOSP-A)和中性多糖(WOSP-N), 并对不同多糖组分的基本化学性质、糖链基本结构组成及体外抗氧化活性进行分析。结果表明, 水提醇沉法提取山芹菜多糖得率为6.78%, 离子交换层析法分离WOSP-A和WOSP-N得率分别为51.34%和2.55%。单糖组成分析表明, WOSP是GalA(11.36%)、Gal(41.50%)和Ara(38.08%)为主组成的杂多糖, 结合红外光谱及酶水解结果推测WOSP-A是由GalA(46.99%)、Gal(26.56%)和Ara(19.94%)为主要的同聚半乳糖醛酸(Homogalacturonan, HG)和I型阿拉伯半乳糖(Type IArabic galactans, AG-I)果胶结构域构成, WOSP-N是由Gal(55.32%)和Ara(30.69%)为主的II型阿拉伯半乳糖(Type IIArabic galactans AG-II)果胶结构域构成。比较山芹菜三种多糖的抗氧化活性, WOSP的抗氧化活性强于WOSP-A和WOSP-N, WOSP对DPPH·清除能力和对O₂·清除能力较好, 当多糖浓度为10 mg/mL时, 分别达到96.42%和86.70%。综上所述, 山芹菜中分离纯化得到的WOSP、WOSP-A和WOSP-N均含有的O-H和C-H官能团, 且具有一定的体外抗氧化活性。该研究将为东北地区的山野菜开发利用提供理论参考依据。

关键词: 山芹菜; 多糖; 分离纯化; 结构分析; 抗氧化活性

文章编号: 1673-9078(2022)10-124-132

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.10.1270

Isolation, Purification, Structure Analysis and Comparison of Antioxidant

Activity of the Polysaccharides from *Ostericum sieboldii*

SHI Zenghui¹, LIU Liyang¹, HONG Huili¹, GOU Dongxia¹, LIU Duo^{1,2*}

(1. College of Food Science and Engineering, Changchun University, Changchun 130000, China)

(2. College of Life Sciences, Changchun Normal University, Changchun 130000, China)

Abstract: The crude polysaccharide of *Ostericum sieboldii* (WOSP) was extracted, separated and purified to obtain acidic polysaccharide (WOSP-A) and neutral polysaccharide (WOSP-N). The basic chemical properties, basic structural characteristics of the sugar chains, and *in vitro* antioxidant activities of different polysaccharide components were analyzed. Results showed that the yield of WOSP obtained by water extraction and alcohol precipitation was 6.78%, and the yields of WOSP-A and WOSP-N obtained via separation by ion exchange chromatography were 51.34% and 2.55%, respectively. Monosaccharide composition analysis showed that WOSP was a heteropolysaccharide mainly composed of GalA (11.36%), Gal (41.50%) and Ara (38.08%). Based on both the infrared spectroscopy results and enzymatic hydrolysis results, it was speculated that WOSP-A was a pectin composed of homogalacturonan (HG) and type I arabic galactans (AG-I) domains containing mainly GalA (46.99%), Gal (26.56%) and Ara (19.94%), whilst WOSP-N was a pectin composed of type II arabic galactans (AG-II) domains containing mainly Gal (55.32%) and Ara (30.69%). The comparison of the antioxidant activities of the three polysaccharides from *O. sieboldii* revealed that the antioxidant activity of WOSP was higher than those of WOSP-A and WOSP-N, and WOSP had higher scavenging abilities for DPPH· and O₂·⁻, (which could reach 96.42% and 86.70% at a polysaccharide concentration of 10 mg/mL). In conclusion, WOSP, WOSP-A and WOSP-N from *O. sieboldii* all had O-H and C-H functional groups, and possessed certain *in vitro* antioxidant activities.

引文格式:

石曾卉,刘丽阳,洪慧丽,等.山芹菜多糖的分离纯化、结构分析及抗氧化活性比较[J].现代食品科技,2022,38(10):124-132

SHI Zenghui, LIU Liyang, HONG Huili, et al. Isolation, purification, structure analysis and comparison of antioxidant activity of the polysaccharides from *Ostericum sieboldii* [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(10): 124-132

收稿日期: 2021-11-12

基金项目: 吉林省自然科学基金项目(YDZJ202101ZYTS077)

作者简介: 石曾卉(1997-),女,硕士研究生,研究方向:功能性碳水化合物, E-mail: 826704943@qq.com

通讯作者: 刘多(1968-),男,博士,教授,研究方向:功能性碳水化合物, E-mail: ccrenping@cc.cebbs.com

This study will provide a theoretical reference for the development and utilization of wild vegetables in the Northeast China.

Key words: *Ostercicum sieboldii*, polysaccharides, structural analysis, separation and purification, antioxidant activity

山芹菜[*Ostercicum sieboldii* (Miq.) Nakai]是伞形科、山芹属的多年生草本植物,也称短果茴芹、大叶芹、山芹等,有两种变种,分别为狭叶山芹和毛山芹。山芹菜在我国主要分布于吉林、辽宁、黑龙江等海拔150~1 400 m的针阔叶混交林地区^[1],其幼苗在春季常被采摘食用,有良好的风味,是长白山地区代表性的山野菜之一。从外观来看,山芹菜主根短、分枝较多,整体颜色呈黄褐色至棕褐色;茎相较家芹而言细、且沟纹深,多为二年生或多年生草本植物^[2]。花期为八月到九月,果期为九月到十月。古代中药书中记载,山芹菜可以清热解毒、滋阴养颜、治疗风湿痹痛、腰膝酸痛和感冒头痛等^[3],具有一定的保健功能。此外有研究表明,山芹菜含有许多的生物活性化合物,具有高于普通蔬菜水果的生物活性^[4]。

植物多糖是植物体内很重要的一类生物大分子,为醛糖或酮糖通过糖苷键连接而成的天然高分子多聚物,与机体免疫功能的调节、细胞与细胞之间的识别、细胞间物质的运输和癌症的诊断与治疗等密切相关,也是有效维持和保证生物体生命活动能够正常运转的基本物质,目前已被广泛应用于食品和药品等多种领域^[5,6],近年来成为国内外研究的热点之一。目前对植物多糖提取方法的研究已较为成熟,但是由于多糖分子量大,结构解析复杂,因此对其精细结构分析研究较少^[7-10]。目前研究表明,针对山芹菜的研究主要包括山芹菜多糖的提取和含量测定,以及山芹菜挥发性成分的生物活性^[11,12]。而对山芹菜多糖的分离纯化及结构解析未见报道。本文在对山芹菜中的多糖进行提取的基础上,进一步对其组分进行分离纯化,并测定了各个多糖组分的主要化学成分、基本结构和体外抗氧化活性,旨在为山芹菜在医药和食品等方面的应用提供参考,为东北地区山野菜的深度开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

山芹菜,购于吉林省长白山地区;苯酚、硫酸,分析纯,北京化工厂有限责任公司;DEAE纤维素,上海源叶生物科技有限公司;乙腈,色谱纯,北京化工厂有限责任公司;甲醇,色谱纯,北京化工厂有限责任公司;氯化钠,色谱纯;其他试剂均为分析纯。

1.2 实验仪器与设备

BM312-B 旋转蒸发器、3K15 台式高速离心机,上海亚荣生化仪器厂;LC-10AT 高效液相色谱仪,日本岛津公司;Nicolet is 5 傅里叶红外光谱仪,赛默飞世尔科技公司。

1.3 实验方法

1.3.1 山芹菜多糖的提取及分离纯化

1.3.1.1 多糖提取

通过水提醇沉法提取山芹菜中的植物多糖。称取一定量的新鲜山芹菜,在料液比 1:20 (g/mL)、提取时间 4 h、提取温度 100 °C 的条件下进行提取,过滤滤渣得到山芹菜粗多糖提取液。用旋转蒸发器将粗多糖液浓缩后,在 4 °C 下用 $\phi=70\%$ 乙醇醇沉 24 h,4 000 r/min 离心 20 min 收集沉淀,在 60 °C 水浴下不停地搅拌烘干除去乙醇,加 dH₂O 溶解冷冻干燥,得到山芹菜多糖 (WOSP)。

1.3.1.2 多糖分离纯化

离子交换层析法分离纯化 WOSP。将 2 g WOSP 用 100 mL dH₂O 充分溶解后缓慢加入 DEAE 离子交换层析柱中,待其完全进入后用 dH₂O 为流动相洗脱山芹菜中性多糖 (WOSP-N),洗脱完全后将流动相替换为 0~0.5 mol/L NaCl 洗脱山芹菜酸性多糖 (WOSP-A)。将洗脱完全后的 WOSP-N、WOSP-A 溶液用旋转蒸发器浓缩体积,透析后冷冻干燥得到固体。

1.3.1.3 多糖分子量测定

高效凝胶渗透色谱法 (HPGPC) 测定 WOSP-A 和 WOSP-N 的分子量。使用分子量为 5 000、12 000、25 000 和 50 000 u 的葡聚糖作为标准品,以保留时间为横坐标 $x(t_R)$ 和葡聚糖标准品分子量的对数为纵坐标 $y(\lg M)$ 作图,得到回归曲线方程:

$$y = -0.1948x + 0.9662 \quad (R^2 = 0.9945)$$

根据标准曲线计算多糖的分子量。

HPGPC 分析方法:采用高效液相系统 (CTO-20 A 泵和 RID-10 A 检测器),TSK-gel G-3000 PWXL 色谱柱 (4.6×150 mm),流动相为 0.2 mol/L NaCl 水溶液,体积流量为 1.0 mL/min,柱温 35 °C,进样体积 20 μ L,采用示差检测器检测。

1.3.2 山芹菜多糖基本化学组成测定

1.3.2.1 总糖含量测定

依据苯酚-硫酸法^[13]并进行适当改良,分别测定

WOSP、WOSP-A 和 WOSP-N 中总糖含量。配制浓度为 0.1 mg/mL 的多糖溶液, 吸取 10 μ L 糖溶液于 2.5 mL EP 管中, 加 dH_2O 至 1 mL, 然后加入 50 μ L $w=6\%$ 的苯酚和 250 μ L 浓硫酸, 立刻震荡摇匀, 置于沸水浴中反应 15 min。反应完毕后迅速冷却, 使用酶标仪检测反应液在 490 nm 的 OD 值。以葡萄糖标准品的总糖含量为横坐标 x (mg) 和不同浓度下葡萄糖标准品吸光度为纵坐标 y (OD 值) 作图, 得到多糖的回归曲线方程:

$$y=0.0102x+0.0243 \quad (R^2=0.9979)$$

根据标准曲线计算样品中的总糖含量。

1.3.2.2 糖醛酸含量测定

依据间羟基联苯法^[14]并进行适当改良, 分别测定 WOSP、WOSP-A 和 WOSP-N 中糖醛酸含量。配制浓度为 0.1 mg/mL 的山芹菜多糖溶液, 吸取 60 μ L 糖溶液于 2.5 mL EP 管中, 加蒸馏水至 1 mL 后加入 250 μ L 浓硫酸和 4 μ L 间羟基联苯, 100 $^{\circ}$ C 水浴反应 20 min, 冷却后加入 4 μ L 氨基磺酸反应 15 min。反应完毕后使用酶标仪检测反应液在 525 nm 的 OD 值。以半乳糖醛酸标准品的糖醛酸含量为横坐标 x (mg) 和不同浓度下糖醛酸标准品吸光度为纵坐标 y (OD 值) 作图, 得到多糖的回归曲线方程:

$$y=0.0142x-0.0037 \quad (R^2=0.9988)$$

根据标准曲线计算样品中的糖醛酸含量。

1.3.2.3 蛋白质含量测定

依据考马斯亮蓝法^[15]并进行适当改良, 分别测定 WOSP、WOSP-A 和 WOSP-N 中蛋白质含量。配制浓度为 0.05 mg/mL 的山芹菜多糖溶液, 吸取 100 μ L 糖溶液于 5 mL EP 管中, 加蒸馏水至 1 mL, 然后加入 2.5 mL 的考马斯亮蓝溶液, 立刻震荡摇匀, 反应 5 min。反应完毕后用酶标仪检测反应液在 590 nm 的 OD 值。以牛血清蛋白标准品的蛋白质含量为横坐标 x (mg) 和不同浓度下牛血清蛋白标准品吸光度为纵坐标 y (OD 值) 作图, 得到多糖的回归曲线方程:

$$y=0.0209x+0.358 \quad (R^2=0.9952)$$

根据标准曲线计算样品中的蛋白质含量。

1.3.3 山芹菜多糖单糖组成测定

首先对 WOSP、WOSP-A 和 WOSP-N 进行衍生化反应: 称取 1 mg 多糖样品置于酸水解小瓶中, 加入 1 mL 的 2 mol/L 盐酸甲醇溶液, 充 N_2 密封后, 置于 80 $^{\circ}$ C 金属浴中水解 10 h 后用空气泵吹干, 再加入 1 mL 的 2 mol/L 三氟乙酸溶液, 于 120 $^{\circ}$ C 金属浴中水解 1 h 后用空气泵吹干除去三氟乙酸。混合标准品由甘露糖 (Man)、葡萄糖醛酸 (GlcA)、鼠李糖 (Rha)、半乳糖醛酸 (GalA)、葡萄糖 (Glc)、半乳糖 (Gal)、木糖 (Xyl)、阿拉伯糖 (Ara)、岩藻糖 (Fuc) 各 0.1 mg

组成, 得到标准品混合液, 置于酸水解小瓶中备用。

向完全酸水解后得到的干燥样品和混合标准品中加入 500 μ L 的 0.3 mol/L NaOH 溶液, 使样品充分溶解, 再加入 500 μ L 的 PMP (1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮)-甲醇溶液进行混合, 取 200 μ L 混合液于 1.5 mL EP 管中。将样品和标准品在 70 $^{\circ}$ C 条件下水浴反应 0.5 h, 分别加入 100 μ L 的 0.3 mol/L HCl 溶液, 充分混匀后加入 700 μ L CH_3Cl , 充分振荡后, 萃取得到剩余的 PMP-甲醇试剂, 弃去 CH_3Cl 层, 保留水层, 重复操作萃取三次。0.22 μ m 有机滤膜过滤, 然后进行检测。

高效液相色谱法(HPLC)分析方法: 采用 Shimadzu HPLC 系统 (CTO-20A 泵和 SPD-20AVD 紫外光检测器), DIKMA Inertsil ODS-3 色谱柱 (4.6 \times 150 mm), 流动相为 PBS (0.2 mol/L, pH 值 7.0)-乙腈 19.2:80.8 (V/V), 体积流量为 1.0 mL/min, 进样量为 20 μ L, 检测波长为 245 nm。

1.3.4 山芹菜多糖红外光谱测定

在干燥条件下将 1 mg 样品与 180 mg 无水溴化钾混合压制成片, 使用傅里叶红外光谱仪测定在 4 000~500 cm^{-1} 的波长范围内多糖的 FT-IR 光谱。

1.3.5 WOSP-A 和 WOSP-N 酶解实验

选择阿拉伯聚糖酶 (α -1,5-Arabinanase)、半乳糖酶 (β -1,4-Galactanase) 和半乳糖醛酸酶 (Endo-polygalacturonase) 对 WOSP-A 和 WOSP-N 进行酶解。配制 0.2 mol/L 的醋酸-醋酸钠缓冲液并调节 pH 值 (半乳糖醛酸酶 pH 值为 5.0, 阿拉伯聚糖酶和半乳糖酶 pH 值为 4.0, 混合添加时 pH 值为 4.5), 取 400 μ L 缓冲液溶解 1 mg 样品后加入 1 μ L 酶溶液, 40 $^{\circ}$ C 反应 12~24 h 后, 98 $^{\circ}$ C 反应 5 min 将酶灭活, 再用 0.22 μ m 水系滤膜过滤。

HPGPC 法测定酶解后多糖的分子量, 测定方法同 1.3.1.3。通过酶解前后分子量对比, 进一步明确 WOSP-A 和 WOSP-N 中糖苷键组成。

1.3.6 山芹菜多糖体外抗氧化性质测定

通过对 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH \cdot)、超氧阴离子自由基 ($O_2^{\cdot-}$)、羟自由基 (\cdot OH) 清除能力和对铁离子 (Fe^{3+}) 还原能力^[16,17]测定 WOSP、WOSP-A 和 WOSP-N 三种多糖的体外抗氧化能力。

配制 0.5、1、2、5 和 10 mg/mL 5 个梯度的三种多糖样品溶液, dH_2O 为空白对照, Vc 为阳性对照, 每个样品测定 3 次取其平均值。

1.3.6.1 清除 DPPH \cdot 能力测定

取 0.6 mL 不同浓度的三种多糖样品溶液, 分别加入 2.4 mL 的 0.1 mmol/L DPPH, 充分混匀后避光反应 30 min, 在 517 nm 处测定混合溶液 OD 值 A_1 , 同时测

定 dH_2O 的 OD 值 A_0 , 将无水乙醇代替 DPPH 测得 OD 值为 A_2 。DPPH-清除率 (记为 F_1 , %) 计算公式如下:

$$F_1 = (1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}) \times 100\% \quad (1)$$

1.3.6.2 清除 O_2^- 能力测定

取 50 μL 不同浓度的三种多糖样品溶液, 加入 50 μL 的 300 $\mu mol/L$ NBT(氯化硝基四氮唑蓝)、50 μL 的 936 $\mu mol/L$ NADH (还原型辅酶 I)、50 μL 的 120 $\mu mol/L$ PMS (吩嗪硫酸甲脂), 充分混匀后避光反应 30 min, 在 517 nm 处测定混合溶液 OD 值 B_1 , 同时测定 dH_2O 的 OD 值 B_0 作为空白对照, 将 dH_2O 代替 PMS 测得 OD 值 B_2 。 O_2^- 清除率 (记为 F_2 , %) 计算公式如下:

$$F_2 = (1 - \frac{B_1 - B_2}{B_0}) \times 100\% \quad (2)$$

1.3.6.3 清除 $\cdot OH$ 能力测定

取 500 μL 不同浓度的三种多糖样品溶液, 加入 1 mL $FeSO_4$ 、1 mL 水杨酸、1 mL H_2O_2 (过氧化氢), 充分混匀后避光反应 30 min, 在 510 nm 处测定混合溶液的 OD 值 C_1 , 同时测定 dH_2O 的 OD 值 C_0 作为空白对照, 将 dH_2O 代替 H_2O_2 测得 OD 值 C_2 。 $\cdot OH$ 清除率 (记为 F_3 , %) 计算公式如下:

$$F_3 = (1 - \frac{C_1 - C_2}{C_0}) \times 100\% \quad (3)$$

1.3.6.4 Fe^{3+} 还原能力测定

取 1 mL 不同浓度的三种多糖样品溶液, 加入 2.5 mL 的 0.2 mol/L PBS (pH 值 6.6)、2.5 mL 1% 铁氰化钾溶液, 充分混匀后于 50 $^{\circ}C$ 下恒温水浴 20 min, 迅速冰浴冷却, 加入 1 mL 的 10wt% TCA (三氯乙酸) 溶液混合均匀后, 离心取 1.5 mL 上清液加入 1.5 mL dH_2O 、1.5 mL 0.1wt% 的 $FeCl_3$ 溶液, 振荡后静置 10 min, 在 700 nm 处测定吸光度值 D_1 , 空白对照测得吸光度值 D_0 。 Fe^{3+} 还原能力 (记为 H , %) 计算公式如下:

$$H = \frac{D_1 - D_0}{D_0} \times 100\% \quad (4)$$

1.3.7 数据处理

所有数据采用 SPSS Statistics 24 统计分析软件进行差异显著性分析, 采用 Origin 2018 64Bit 软件。

2 结果与分析

2.1 山芹菜多糖的提取及分离纯化

采用水提醇沉法获得 WOSP 得率为 6.78%, 经 DEAE 纤维素离子柱层析分离后的 WOSP-A 和 WOSP-N 得率分别为 51.34% 和 2.55%。WOSP 线性梯

度洗脱结果如图 1a 所示: WOSP-N 被 dH_2O 洗脱下来, WOSP-A 随着 NaCl 浓度的增加而逐渐被洗脱下来, 并在 0.24 mol/L 的 NaCl 溶液处有较为明显的洗脱峰。进一步分析其分子量分布, WOSP-A 分子量主要分布在 14.21 ku 左右 (图 1b), WOSP-N 分子量主要分布在 169.36 ku 左右 (图 1c)。

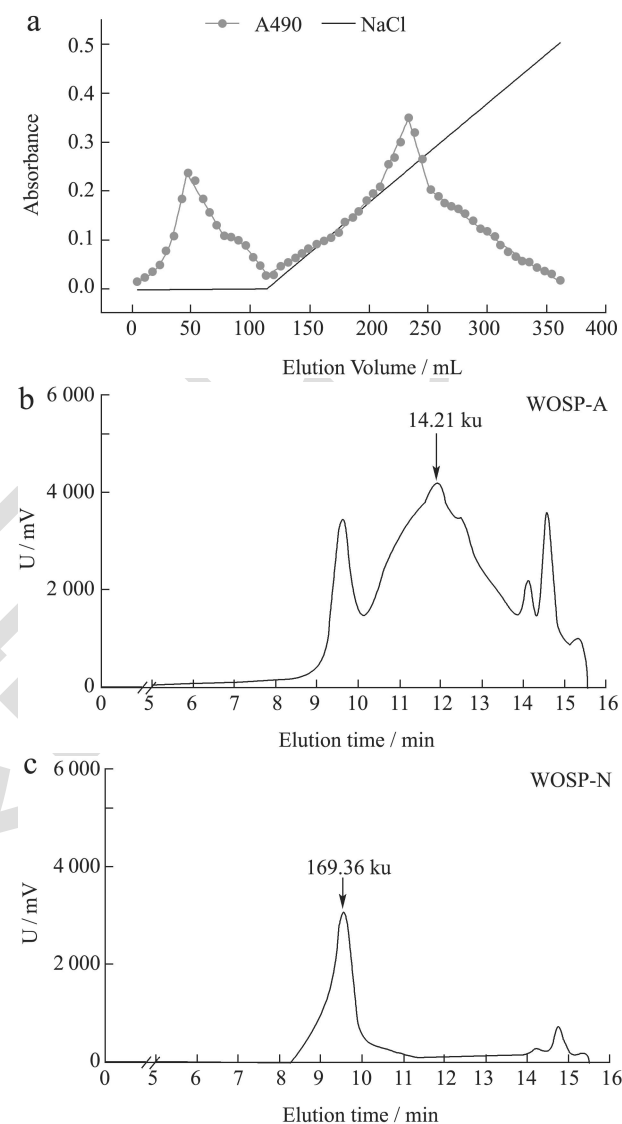


图 1 山芹菜多糖的梯度洗脱图和分子量分布图

Fig.1 Gradient elution and molecular weight distribution of polysaccharides from WOSP

注: a: WOSP 的梯度洗脱图; b: WOSP-A 分子量测定; c: WOSP-N 分子量测定。

2.2 山芹菜多糖基本化学组成分析

三种多糖的总糖、蛋白质和糖醛酸含量测定结果如表 1 所示。它们的总糖及蛋白质含量几乎无差异。WOSP-A 糖醛酸质量分数为 35.38%, 明显高于 WOSP 和 WOSP-N。可能是由于酸性多糖中含有半乳糖醛酸和葡萄糖醛酸等酸性单糖, 因此 WOSP-A 中糖醛酸含

量明显高于 WOSP 和 WOSP-N。

表 1 WOSP、WOSP-A 和 WOSP-N 的总糖、蛋白质和糖醛酸含量

Table 1 The total sugar, protein and uronic acid content of polysaccharides from WOSP, WOSP-A and WOSP-N

组成	WOSP/%	WOSP-A/%	WOSP-N/%
总糖	42.96±1.52	43.57±1.09	48.40±2.45
蛋白	11.60±0.36	7.54±0.12	10.65±0.36
糖醛酸	16.71±2.01	35.38±2.36	-

2.3 山芹菜多糖单糖组成分析

三种多糖与九种标准混合样品比对分析结果如表 2 所示。在 WOSP 中，主要单糖组分及物质的摩尔比为 GalA:Gal:Ara=11.36:41.50:38.08。进一步纯化后的两个多糖组分的单糖组成存在一定差异，WOSP-A 中主要单糖组分及物质的摩尔比为 GalA:Gal:Ara=46.99:26.56:19.94，其中糖醛酸所占比例较高，与苯酚-硫酸法所检测的糖醛酸含量检测结果相符合，推测 WOSP-A 是主要含有 GalA 的聚半乳糖醛酸 (Homogalacturonan, HG) 果胶和以 Gal 和 Ara 为主的阿拉伯半乳聚糖 (Type I Arabic Galactans, AG) 果胶^[18-20]；WOSP-N 中主要单糖组分及物质的摩尔比为 Gal:Ara=55.32:30.69，GalA 含量较低，推测 WOSP-N 是主要含有 Gal 和 Ara 的 AG 型果胶。

表 2 WOSP、WOSP-A 和 WOSP-N 单糖组成表

Table 2 Monosaccharide composition of WOSP, WOSP-A and WOSP-N

	单糖组成/(mol%)					
	Man	Rha	GalA	Glc	Gal	Ara
WOSP	1.88	3.14	11.36	4.05	41.50	38.08
WOSP-A	-	2.86	46.99	3.64	26.56	19.94
WOSP-N	-	5.36	4.43	4.20	55.32	30.69

2.4 山芹菜多糖红外光谱分析

三种多糖的红外光谱测定结果如图 2 所示。参考相关文献进行分析^[21-23]。它们的光谱图含有的特征吸收峰大致相同。在 3 374.72 cm⁻¹、1 261.38 cm⁻¹ 附近的吸收峰为多糖 O-H 伸缩振动特征峰；2 953.93 cm⁻¹ 附近的吸收峰为多糖类物质 C-H 伸缩振动所产生的，说明可能存在饱和和碳氢键的伸缩振动，这是糖类物质的特征吸收峰；1 738.98 cm⁻¹ 附近的特征吸收峰为酯基 C=O 的伸缩振动峰，表明在 WOSP-A 中含有糖醛酸；1 424.16 cm⁻¹ 处的吸收峰可能为 C-H 键的变角振动和反对称伸缩振动所产生的；1 074.42 cm⁻¹ 附近的特征吸收峰为 C-O-C 碳水化合物骨架的伸缩振动峰，表明在 WOSP、WOSP-A 和 WOSP-N 组分中均存在有吡喃糖环；在

802.24 cm⁻¹ 附近显示为 α-糖苷键，在 WOSP 和 WOSP-N 组分中单糖之间可能存在 α-糖苷键的连接方式。

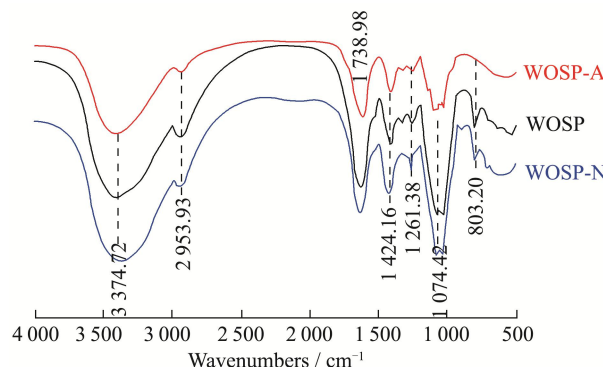
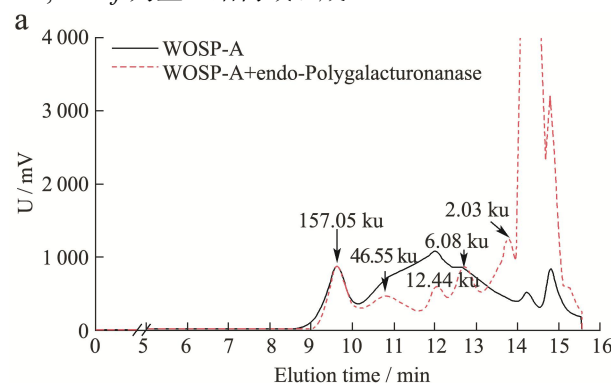


图 2 WOSP、WOSP-A 和 WOSP-N 的红外光谱图

Fig.2 FT-IR spectra of polysaccharide fractions from WOSP, WOSP-A and WOSP-N

2.5 WOSP-A 和 WOSP-N 酶解结果分析

为了进一步明确两种多糖的糖苷键连接方式^[24]，根据它们的单糖组成结果，分别向两种多糖加入不同的酶进行分析。由单糖结果可知，WOSP-A 中主要含有 GalA、Gal 和 Ara，因此向 WOSP-A 中以不同组合添加能够水解 α-1,4-半乳糖醛酸糖苷键的内切-半乳糖醛酸酶 (Endo-polygalacturonase)、水解 β-1,4-半乳糖糖苷键的 β-1,4-半乳糖酶 (β-1,4-Galactanase) 和水解 α-1,5-阿拉伯糖糖苷键的内切-α-1,5-阿拉伯聚糖酶 (α-1,5-Arabinanase)，结果如图 3 所示。当添加单一酶 (图 3a、b、c) 后，WOSP-A 的分子量发生变化，将三种酶同时作用于 WOSP-A (图 3d)，其分子量明显降低。说明三种酶将 WOSP-A 中的 α-1,4-半乳糖醛酸糖苷键、β-1,4 半乳糖糖苷键和 α-1,5 阿拉伯糖糖苷键破坏，使其分子量变小，当组合三种酶水解 WOSP-A 时，糖苷键破坏更为彻底，基本将其降解成分子量较低的寡糖片段。因此，WOSP-A 含有 α-1,4-半乳糖醛酸、β-1,4-半乳糖和 α-1,5-阿拉伯糖。结合单糖及红外分析结果，推测 WOSP-A 主要由 HG 型果胶 (以 α-1,4-GalA 为主) 和 AG-I 型果胶 (以 β-1,4-Galp 和 α-1,5-Araf 为主) 结构域组成。



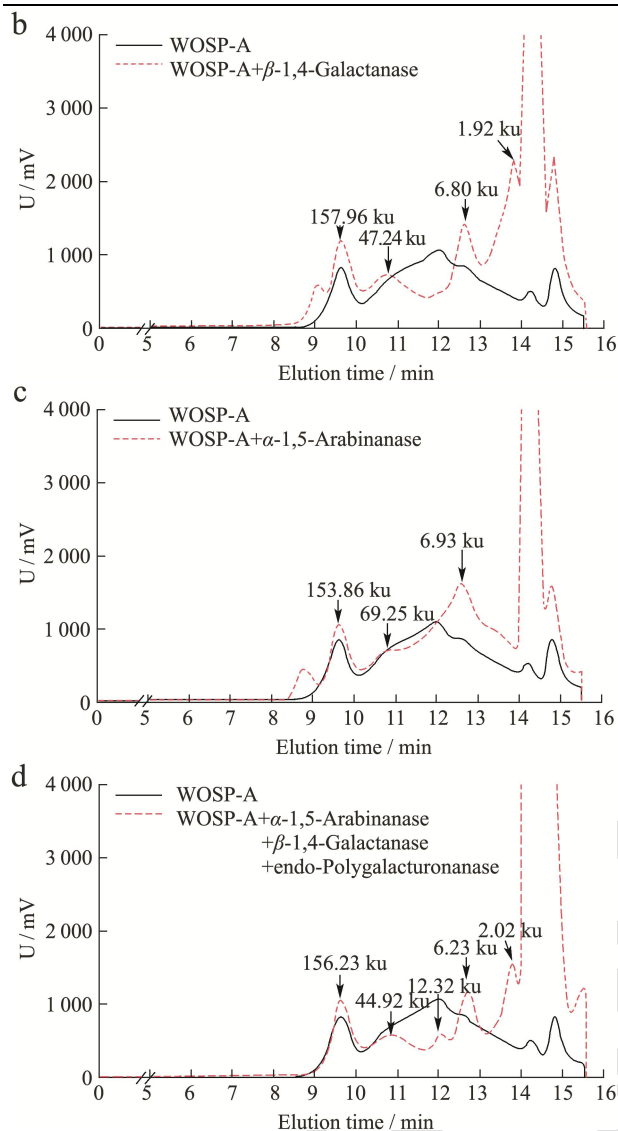


图3 WOSP-A 酶解后分子量分布图

Fig.3 Molecular weight distribution of WOSP-A after enzymatic hydrolysis

注：a：添加半乳糖醛酸酶；b：添加半乳糖酶；c：添加阿拉伯聚糖酶；d：添加半乳糖醛酸酶、半乳糖酶和阿拉伯聚糖酶。

由单糖结果可知，WOSP-N 中 GalA 的含量较低，因此不再添加内切-半乳糖醛酸酶。仅向 WOSP-N 中以单独或组合方式添加 β -1,4-Galactanase 和 α -1,5-Arabinanase，结果如图 4 所示。对于 WOSP-N 而言，添加能够降解 AG-I 型果胶的 β -1,4-Galactanase 和 α -1,5-Arabinanase 后，WOSP-N 的分子量均未发生明显变化，说明 WOSP-N 不含有 AG-I 型果胶。由于以 Ara 和 Gal 为主的 AG 型果胶主要包括 AG-I 型和 AG-II 型，结合单糖及红外分析结果，推测 WOSP-N 主要是由 AG-II 型果胶 (β -1,3/6-Galp 和 α -1,3-Araf) 结构域组成。

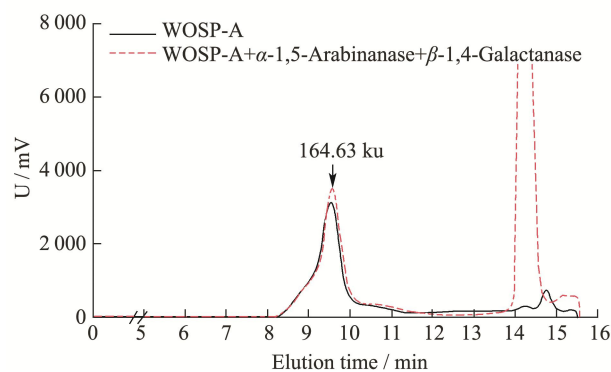


图4 组合添加半乳糖酶和阿拉伯聚糖酶水解 WOSP-N 前后分子量变化图

Fig.4 Molecular weight distribution of WOSP-N after enzymatic hydrolysis by β -1,4-Galactanase and α -1,5-Arabinanase

2.6 山芹菜多糖体外抗氧化能力分析

三种多糖的体外抗氧化活性实验结果如图 5、6、7 和 8 所示。WOSP 的 DPPH·清除力明显高于 WOSP-A 和 WOSP-N (图 5)，当质量浓度达到 1 mg/mL 时，清除率达到 50%左右，且随浓度增加呈现明显上升趋势，当质量浓度达到 10 mg/mL 时，自由基清除能力与 Vc 的清除能力相当；WOSP-A 和 WOSP-N 质量浓度低于 5 mg/mL 时，清除 DPPH·能力较低；质量浓度高于 5 mg/mL 时，清除 DPPH·能力明显上升。研究表明，多糖中的单糖以糖苷键形式连接，其中含有游离醛基或酮基的单糖具有还原性，它们可以提供氢，氢可以与自由基结合来终止自由基反应，抗氧化活性可能与分子大小和构象有关^[25,26]，WOSP-A 对 DPPH·的清除能力高于 WOSP-N，说明随着分子量的升高，多糖清除 DPPH·的能力逐渐下降。朱晓冉等^[27]探究不同分子量黑木耳多糖的抗氧化能力时发现，小分子量的黑木耳多糖清除 DPPH·的能力更强。WOSP 对 DPPH·的清除能力明显高于 WOSP-A 和 WOSP-N，当多糖溶解于水后呈现不同链构象，会影响其生物活性，具体关系还有待进一步探究。从结果来看，推测山芹菜抗氧化能力是酸性糖和中性糖在协同发挥作用。

三种多糖对 $O_2\cdot^-$ 的清除能力呈现一定的浓度依赖性，随着浓度的增加，多糖对 $O_2\cdot^-$ 的清除率逐渐增强，其中 WOSP 的清除能力比 WOSP-A 和 WOSP-N 强，当溶度达到 10 mg/mL 时，清除 $O_2\cdot^-$ 能力与 Vc 相当 (图 6)。 $O_2\cdot^-$ 是基态氧接受电子后形成的，容易在体内产生且发生转化^[28]，因此评价 $O_2\cdot^-$ 清除能力十分有必要。多糖能够催化 $O_2\cdot^-$ 与氢离子结合，因此不同分子量可能是影响 $O_2\cdot^-$ 清除能力的原因之一，Wu 等^[29]

研究坛紫菜多糖发现抗氧化活性大小与分子量呈负相关。通过比较多糖的分子量大小可知，其中 WOSP-N 的分子量大于 WOSP-A，因此抗氧化活性较低。而 WOSP 中包含 WOSP-A 和 WOSP-N，具有更多的醌酮类强电基团，因而具有更强的清除 O_2^- 能力。

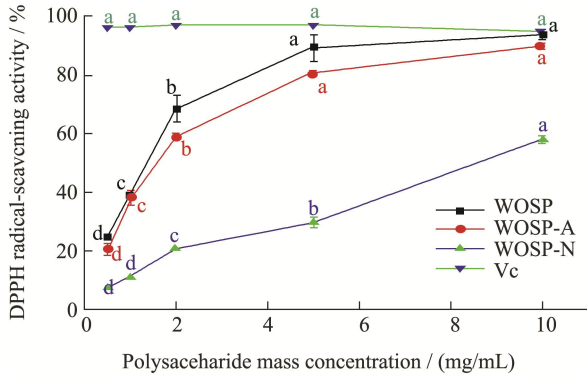


图 5 WOSP、WOSP-A 和 WOSP-N 的 DPPH 的清除能力

Fig.5 DPPH free radical scavenging ability of WOSP, WOSP-A and WOSP-N

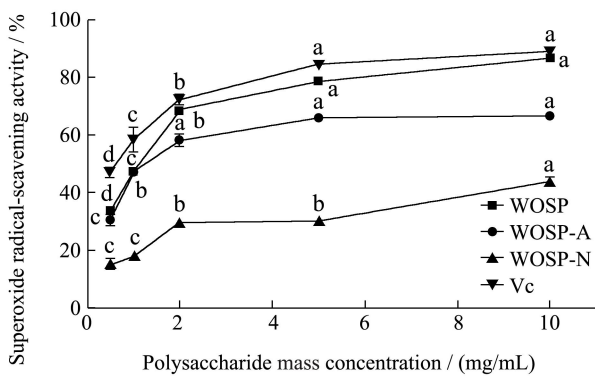


图 6 WOSP、WOSP-A 和 WOSP-N 的 O_2^- 的清除能力

Fig.6 Superoxide anion free radical scavenging ability of WOSP, WOSP-A and WOSP-N

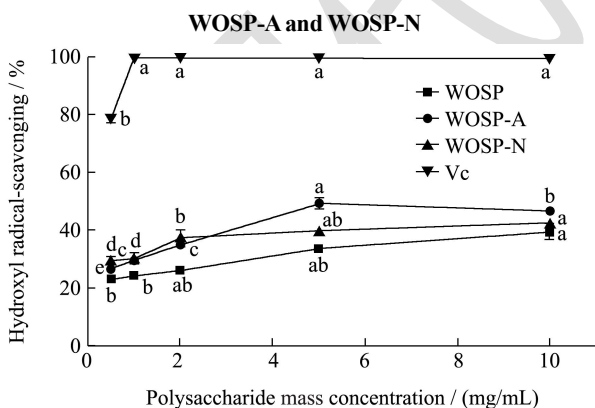


图 7 WOSP、WOSP-A 和 WOSP-N 的 $\cdot OH$ 的清除能力

Fig.7 Scavenging ability of hydroxyl radicals of WOSP, WOSP-A and WOSP-N

三种多糖对 $\cdot OH$ 清除能力随着浓度的增加而增加，呈现一定的浓度依赖性，但三者之间对 $\cdot OH$ 的清除能力无明显差异，均不如 Vc (图 7)。 $\cdot OH$ 氧化能力强，会造成多糖解聚、核酸断裂等，与衰老作用等

有关。国内外已将抗氧化检测用于抗衰老等保健食品的评价^[30,31]。 $\cdot OH$ 清除能力与多糖中总糖含量相关，而三种多糖总糖含量接近，因此其 $\cdot OH$ 清除能力接近。研究显示抗氧化活性也与某些特定的单糖及衍生物相关，如岩藻糖、鼠李糖和糖醛酸含量高时多糖清除 $\cdot OH$ 能力较强^[32]，而本研究中三种多糖的单糖组成中岩藻糖和鼠李糖的含量极低，因此整体而言 $\cdot OH$ 清除能力较低，其中 WOSP-A 糖醛酸含量高，所以在三种多糖中的 $\cdot OH$ 清除能力相对较好。

三种多糖对 Fe^{3+} 的还原能力结果如图 8 所示。WOSP 具有一定的 Fe^{3+} 还原能力，且呈现出明显的浓度依赖性；而 WOSP-A、WOSP-N 对 Fe^{3+} 的还原能力较弱，且不随浓度变化呈现出明显的变化趋势。研究表明，多糖可以与产生活性氧所必须金属离子形成络合物^[33,34]，因此多糖可以抑制活性氧自由基的产生，从而达到抗氧化目的，其抗氧化能力与单糖中的 Ara 和 Glc 等有关^[35]，而 WOSP 中含有较多的 Ara，所以表现出较强的 Fe^{3+} 还原能力，此外也有研究表明，大分子量的多糖不容易结合活性位点^[27]，因此 WOSP-N 的还原能力较弱。

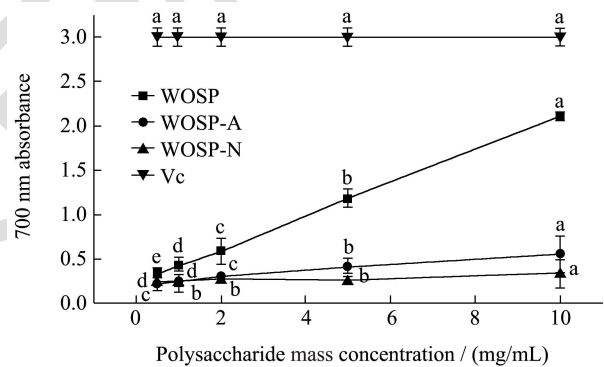


图 8 WOSP、WOSP-A 和 WOSP-N 对 Fe^{3+} 的还原能力图

Fig.8 Reduction capacity of polysaccharide from WOSP, WOSP-A and WOSP-N to iron

通过以上四种抗氧化测定结果对比可知，四种方法下多糖的抗氧化能力均有浓度依赖性。研究结果与双参多糖、紫菜多糖、罗汉果多糖、山药多糖的抗氧化结果相似^[36,37]，均在一定多糖浓度范围内，其抗氧化能力与浓度呈现正相关。WOSP 的抗氧化活性整体而言要强于 WOSP-A、WOSP-N，在这四种方法中，对 DPPH 清除能力和对 O_2^- 清除能力较好，因为 WOSP-N 中 GalA 含量低，其抗氧化活性不如 WOSP，而目前有研究表明其抗氧化能力依赖于氢的供体能力^[38]，但具体机制研究尚未明确。

3 结论

本文采水提醇沉法从山芹菜中提取 WOSP，用

DEAE 离子交换柱层析法对 WOSP 分离纯化得到 WOSP-A 及 WOSP-N, 得率分别为 51.34%和 2.55%, 通过 HPGPC 法测定两个级分的分子量主要分布在 14.21 ku 左右和 169.36 ku 左右。结合红外、单糖及酶解分析结果说明, 三种多糖均含有多糖的特征吸收峰, WOSP 和 WOSP-A 中 GalA、Gal 和 Ara 的含量较高, WOSP-A 中 GalA 所占比例达到 46.99%, WOSP-N 中 Gal 和 Ara 的含量较高, GalA (4.43%) 含量较低, 与 WOSP-A 结果存在差异。推测 WOSP-A 是以 GalA、Gal 和 Ara 为主的 HG 型和 AG-I 型果胶结构域构成, WOSP-N 是以 Gal 和 Ara 为主的 AG-II 型果胶结构域构成。以 Vc 为阳性对照, 比较三种多糖组分对 DPPH·、O₂⁻、·OH 的清除能力及对 Fe³⁺的还原能力, WOSP 的抗氧化活性强于 WOSP-A 和 WOSP-N, 四种方法中对 DPPH·清除能力和对 O₂⁻清除能力较好, 在 WOSP 浓度为 10 mg/mL 时, 清除率分别达到 96.42%和 86.69%, 推测可能是由于 WOSP 包含 WOSP-A 和 WOSP-N, 它们之间存在协同作用, 另外产生这种差异也可能与多糖的糖苷键类型等因素有关^[39], 具体机制有待进一步研究。本文结果为山芹菜的深度开发利用提供了理论研究基础, 为东北地区山野菜的精深加工提供新策略。

参考文献

- [1] 于文海,王绍礼,李俊.大叶芹特性及丰产栽培技术[J].农业与技术,2007,2(1):122-124
- [2] 韦瑾,高玉珍,周静,等.中国伞形科药用植物资源信息的收集及整理[J].中国中药杂志,2019,44(24):5329-5335
- [3] Ercisli S. Chemical composition of fruits in some rose (*Rosa* spp.) species [J]. Food Chemistry, 2007, 104: 1379-1384
- [4] 蒋新龙.山芹菜叶黄酮的提取工艺研究[J].中国酿造,2007, 11(176):37-39
- [5] 孟庆龙,金沙,刘雅婧,等.植物多糖药理功效研究进展[J].食品工业科技,2020,41(11):335-341
- [6] Yue Yu, Mingyue Shen, Qianqian Song, et al. Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: A review [J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 183(12): 91-101
- [7] 马文英,季一顺.植物多糖的提取纯化、结构鉴定以及生物活性研究进展[J].粮食科技与经济,2019,44(7):77-80
- [8] Miao Jingnan, Wang Shi, Junqing Zhang, et al. Response surface methodology for the fermentation of polysaccharides from *Auricularia auricula* using *Trichoderma viride* and their antioxidant activities [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 155: 393-402
- [9] 傅晶依,王思琪,丁修庆,等.大豆多糖的提取、分离纯化与功能的研究进展[J].食品研究与开发,2020,41(13):213-218
- [10] 赵玉红,马捷,李佳启,等.老山芹不同溶剂提取物的活性成分及其促进细胞生长活性[J].现代食品科技,2018,34(6):39-45
- [11] 单琳,耿维,费滕,等.几种野生芹菜营养成分分析[J].林业科技,2019,44(3):42-46
- [12] Liu Z L, Chu S S, Jiang G H. Insecticidal activity and composition of essential oil of *Ostericum sieboldii* (Apiaceae) against *Sitophilus zeamais* and *Tribolium castaneum* [J]. Records of Natural Products, 2011, 5(2): 74-81
- [13] Masuko Tatsuya, Minami Akio, Iwasaki Norimasa, et al. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format [J]. Analytical biochemistry, 2005, 339(1): 69-72
- [14] 白也明.刺五加多糖的分离纯化和结构研究[D].长春:东北师范大学,2015
- [15] 张雄,肖志勇,黄群,等.猴头菇多糖和蛋白质闪式联合提取工艺优化及结构鉴定[J].食品与机械,2019,35(10):117-121, 183
- [16] 路蕴,邹晓川.无花果叶多糖提取及抗氧化活性研究[J].中国食品添加剂,2021,32(7):81-87
- [17] 高涛,唐华丽,罗振宇,等.川明参粗多糖初级结构解析及其体外抗氧化活性[J].中国食品学报,2021,21(8):275-282
- [18] 王思琪,胡彦波,翟丽媛,等.豆渣可溶性多糖的分离纯化及结构解析[J].食品科学,2021,42(10):52-57
- [19] 易建勇,毕金峰,刘璇,等.果胶结构域精细结构研究进展[J].食品科学,2020,41(7):292-299
- [20] R G Ovodova, S V Popov, O A Bushneva, et al. Branching of the galacturonan backbone of comaruman, a pectin from the marsh cinquefoil *Comarum palustre* L [J]. Biochemistry (Moscow), 2006, 71(5): 538-542
- [21] 丁修庆,胡彦波,王晓红,等.超声波辅助提取长白樺木根多糖工艺优化及性质分析[J].食品科技,2021,46(3):155-161
- [22] ZHANG Yu, GU Ming, WANG Kaiping, et al. Structure, chain conformation and antitumor activity of a novel polysaccharide from *Lentinus edodes* [J]. Fitoterapia, 2010, 81(8): 1163-1170
- [23] WANG Zhaomei, PENG Xiao, Kam Len Daniel Lee, et al. Structural characterisation and immunomodulatory property of an acidic polysaccharide from mycelial culture of *Cordyceps sinensis* fungus Cs-HK1 [J]. Food Chemistry, 2010, 125(2): 637-643
- [24] 景永帅,马云凤,李明松,等.植物多糖结构解析方法研究进展[J].食品工业科技,2022,43(3):411-421

- [25] Liu Y, Huang Gl, Hu Jc. Extraction, characterisation and antioxidant activity of polysaccharides from Chinese watermelon [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 111: 1304-1307
- [26] Su Y, Li L. Structural characterization and antioxidant activity of polysaccharide from four auriculariales [J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 229: 105407
- [27] 朱晓冉,徐颖,李德海,等.酸碱性 and 分子量对木耳多糖抗氧化活性及相关性的影响[J].现代食品科技,2018,34(3):59-67
- [28] 赵芷芊,王敏,张志清.植物多糖的提取及抗氧化功效的研究进展[J].食品工业科技,2018,39(13):337-342
- [29] Wu Y, Huo Y, Xu L, et al Purification, characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Porphyra haitanensis* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 165: 2116-2125
- [30] 罗祖友,吴季勤,吴谋成.植物多糖的抗氧化与抗病毒活性[J].湖北民族学院学报:自然科学版,2007,1:77-81
- [31] 郑晶泉.抗氧化剂抗氧化实验研究进展[J].国外医学卫生学分册,2000,27(1):37-38
- [32] Zhang Q, Yu J, Zhang L, et al. Extraction, characterization and biological activity of polysaccharides from *Sophora flavescens* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 93: 459-467
- [33] Huang, Gangliang, Xinya Mei, et al. The antioxidant activities of natural polysaccharides [J]. Current Drug Targets, 2017, 11: 1296-1300
- [34] Volpi N, Tarugi P. Influence of chondroitin sulfate charge density, sulfate group position, and molecular mass on Cu²⁺-mediated oxidation of human low-density lipoproteins: effect of normal human plasma-derived chondroitin sulfate [J]. Journal of Biochemistry, 1999, 125(2): 297-304
- [35] TiffanyChien-Ting Lo, Cheng Allen Chang, Kong-Hwa Chiu, et al. Correlation evaluation of antioxidant properties on the monosaccharide components and glycosyl linkages of polysaccharide with different measuring methods [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 86(1): 320-327
- [36] 李彩艺.双参均一多糖的分离纯化、结构表征和抗氧化活性研究[D].大理:大理大学,2020
- [37] 朱娇娇,周安婕,丁怡,等.3种天然植物多糖的抗氧化与降血糖活性研究[J].粮食与油脂,2018,31(8):96-100
- [38] Wang J, Guo H, Zhang J, et al. Sulfated modification, characterization and structure-antioxidant relationships of *Artemisia sphaero-cephala* polysaccharides [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 81(4): 897-905
- [39] 刘玉婷,李井雷.多糖体外抗氧化活性研究进展[J].食品研究与开发,2019,40(6):214-219