

藏柳茶多糖的提取、结构解析及抗氧化活性分析

杨许花^{1,2}, 张竞文¹, 刘红海³, 高丹丹^{1,2*}, 丁功涛², 宋礼⁴, 马姝雯¹

(1. 西北民族大学生命科学与工程学院, 甘肃兰州 730124) (2. 西北民族大学生物医学研究中心, 甘肃兰州 730030) (3. 甘肃烟草工业有限责任公司, 甘肃兰州 730050) (4. 甘南牦牛乳研究院, 甘肃甘南 747000)

摘要: 该研究以藏柳茶为原料, 用聚乙二醇-超声酶法辅助提取其粗多糖, 采用响应面法优化其提取工艺参数。进一步用高效凝胶渗透色谱 (HPGPC)、高效液相色谱 (HPLC)、红外光谱 (FT-IR) 和扫描电镜 (SEM) 对藏柳茶多糖 (SAPs) 的结构进行初步解析, 并考察其抗氧化活性。聚乙二醇-超声酶法辅助提取 SAPs 的最佳工艺参数为: PEG-400 浓度为 30%、酶添加量 2% (m/m)、pH 值 4.0、超声功率 80%、超声时间 2.0 h、超声温度 80 °C。此条件下, 藏柳茶多糖提取率为 10.95%。经 HPLC 分析, SAPs 主要由半乳糖 (13.34%)、葡萄糖 (46.76%)、鼠李糖 (8.78%)、果糖 (2.89%) 和阿拉伯糖 (11.79%) 组成; FT-IR 及 SEM 分析表明, SAPs 是一种 β -糖苷键的吡喃型非晶态多糖结构。此外, SAPs 体外抗氧化活性结果表明其 DPPH·清除能力、·OH 清除能力和 $\text{O}_2\cdot^-$ 清除能力的 IC_{50} 值分别为 0.42、2.08、0.28 mg/mL, 且随着多糖含量的提高, 其自由基清除能力提高, 呈现剂量效应关系。所得提取工艺设计空间稳定可行, 为藏柳茶多糖提取和产品的综合开发利用提供理论技术支持依据。

关键词: 藏柳茶; 多糖; 响应面; 结构解析; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2022)12-318-328

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.12.0171

Extraction, Structure, and Antioxidant Activity Analysis of Polysaccharides from *Sibiraea angustata*

YANG Xuhua^{1,2}, ZHANG Jingwen¹, LIU Honghai³, GAO Dandan^{1,2*}, DING Gongtao², SONG Li⁴, MA Shuwen¹

(1. College of Life Science and Engineering, Northwest Minzu University, Lanzhou 730124, China)

(2. Biomedical Research Center, Northwest Minzu University, Lanzhou 730300, China) (3. Tobacco Industry Company, Lanzhou 730050, China) (4. Gannan Research Institute of Yak Milk, Gannan 747000, China)

Abstract: Crude polysaccharides from *Sibiraea angustata* as the raw material were extracted using the polyethylene glycol-ultrasonic enzymatic method, and the extraction process parameters were optimized using response surface methodology. Furthermore, high-performance gel-permeation chromatography (HPGPC), high-performance liquid chromatography (HPLC), Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR), and scanning electron microscopy (SEM) were used to characterize the structure of *S. angustata* polysaccharides (SAPs) and investigate their antioxidant activity. The optimal process parameters for SAP extraction assisted by the polyethylene glycol-ultrasonic enzymatic method were as follows: 30% PEG-400 concentration, 2% enzyme addition, pH 4.0, 80% ultrasonic power, 2 h ultrasonic treatment duration, and 80 °C ultrasonic treatment temperature. Under these conditions, the extraction rate of polysaccharides was 10.95%. HPLC showed that the SAPs were mainly composed of galactose (13.34%), glucose (46.76%), rhamnose (8.78%), fructose (2.89%), and arabinose (11.79%). FT-IR and SEM revealed that SAPs are pyrenoid amorphous polysaccharide structures with β -glycosidic bonds. In addition, analysis of the *in vitro* antioxidant activity of SAPs showed that the free radical scavenging ability increased with polysaccharide content in a dose-dependent manner. The IC_{50}

引文格式:

杨许花,张竞文,刘红海,等.藏柳茶多糖的提取、结构解析及抗氧化活性分析[J].现代食品科技,2022,38(12):318-328

YANG Xuhua, ZHANG Jingwen, LIU Honghai, et al. Extraction, structure, and antioxidant activity analysis of polysaccharides from *Sibiraea angustata* [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(12): 318-328

收稿日期: 2022-02-19

基金项目: 中央高校基本科研业务费资助项目 (31920220024; 31920210001); 西北民族大学本科生创新项目 (XBMU21139); 中央高校基本科研业务费专项资金资助研究生项目 (Yxm-2021073)

作者简介: 杨许花 (1992-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全与质量控制, E-mail: 1771893459@qq.com

通讯作者: 高丹丹 (1983-), 女, 博士研究生, 教授, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: gaodan0322@163.com

values for DPPH, OH, and O_2^- free radicals were 0.42, 2.08, and 0.28 mg/mL, respectively. The optimized extraction process is stable and feasible, providing a theoretical and technical basis for the extraction of SAPs from *S. angustata* and the comprehensive development and utilization of these products.

Key words: *T. Sibiraea angustata*; polysaccharides; response surface methodology; structure analysis; antioxidant activity

藏柳茶 (*Sibiraea laexigata* (L.) Maxim), 又名窄叶鲜卑花, 隶属蔷薇科鲜卑花属, 常以其嫩叶、枝用作茶饮而成为藏族民间传统珍贵药材, 主要分布于我国青海南部、四川西部、甘肃东南部和云南北部及西藏等高海拔地区^[1]。现代药理学研究表明, 藏柳茶主要有效成分包括三萜类化合物、黄酮以及多糖类, 因柳茶特有的生理活性和天然来源的安全性使其在保健品和功能性食品中具有强大的应用潜力。多糖又称多聚糖, 是一种天然药物成分, 由许多相同或不同的单糖以 α -或 β -糖苷键构成的化合物, 是生物体维持生命活动的主要能源物质^[2]。柳茶多糖 (*Sibiraea angustata* Polysaccharides, SAPs) 作为藏柳茶主要的生物活性物质, 具有清热助消化、调节脂代谢、抗氧化、抗肿瘤及增强机体免疫活性^[3]等药用价值。目前关于藏柳茶的研究主要以水提物为主, 鲜有关于 SAPs 提取工艺优化及结构表征和抗氧化活性的研究报道, 本文首次采用聚乙二醇 (Polyethylene Glycol, PEG)-超声酶法辅助提取 (Ultrasonic-Assisted Enzymatic Extraction, UAEE) 技术优化萃取 SAPs, 该法较常用传统水提醇沉^[4]不仅引入超声波辅助缩短提取时间, PEG 试剂提供-OH 基团以加强多糖的相互作用和酶解双重作用下提高多糖在 PEG 溶液中的溶解度以大大提高多糖提取率。

本研究以采自甘肃太子山国家级自然保护区柳茶为研究材料, 拟在单因素试验的基础上, 采用响应面试验筛选出 PEG-UAEE 辅助提取 SAPs 的最佳工艺参数, 并对单糖组成、结构和抗氧化活性进行分析, 以为柳茶多糖工业化提取和产品的综合开发利用提供理论技术支持依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

藏柳茶: 采于甘肃省太子山国家级自然保护区 (102°43'E, 36°36'N); 果胶酶及纤维素酶, 上海源叶生物科技有限公司; 聚乙二醇, 天津市大茂化学试剂厂; 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH), Sigma 公司; 三氟乙酸及单糖标品, 美国 Sigma 公司。其余均为国产分析纯试剂。

1.2 主要仪器设备

安捷伦 1260 高效液相, 美国 Agilent 公司; 650 红外光谱仪, 天津港东科技股份有限公司; ZEISS EVO18 扫描电镜, 德国卡尔蔡司; Heraeus Multifuge X1R 高速冷冻离心机, 赛默飞世尔科技有限公司; Fisher 酶标仪, 美国 Thermo 公司; LGJ-100F 真空冷冻干燥机, 北京松源华兴科技发展有限公司; ZWYR-2401 恒温培养振荡器, 上海智城分析仪器制造有限公司; SB-500DTY 超声清洗器, 宁波新芝生物科技有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 主要仪器设备

(1) 提取工艺流程

新鲜原料→干燥→粉碎→过 60 目筛→石油醚脱脂、 $\phi=85\%$ 乙醇脱色→称取 3 g 柳茶叶干粉→聚乙二醇、超声酶法辅助提取→离心 (5 000 r/min, 10 min) 取上清液→蒸发浓缩至 1/3→4 倍体积乙醇醇沉→4℃静置 12 h→离心 (8 000 r/min, 5 min)→冷冻干燥→柳茶粗多糖

(2) 多糖除蛋白、脱色操作流程

柳茶粗多糖液 (0.1 g/mL) →3 倍量 Sevage 试剂 (正丁醇: 氯仿=1:5, 1/1) 除蛋白→0.06% (m/m) 活性炭脱色 (40℃水浴 1 h) →振荡混匀 30 min→透析 36 h (分子量 3 500 u) →蒸发浓缩至 1/3→4 倍量乙醇醇沉→离心 (8 000 r/min, 5 min) →淋洗 (无水乙醚、丙酮、无水乙醇多次) →冷冻干燥→精制 SAPs→苯酚-硫酸法测多糖含量。

1.3.2 SAPs 提取率及含量计算

多糖提取率计算如公式 (1) 所示:

$$A = \frac{m}{M} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

A——多糖得率, %;

m——冻干柳茶多糖质量, g;

M——柳茶干粉质量, g。

采用苯酚-硫酸法^[5]测定其多糖含量。以 D-葡萄糖为对照制作标准曲线, 在质量浓度 0.1~0.6 mg/mL 范围内绘制标准曲线, 其回归方程 $y=0.629 1x-0.005 9$, $R^2=0.999 2$, 计算柳茶多糖含量。

1.3.3 PEG 分子量和浓度对 SAPs 提取率的影响

考察不同 PEG 分子量 (200、400、600、800、1 000 u) 和不同 PEG 质量分数 (15%、20%、25%、30%、35%) 对多糖提取率的影响。

1.3.4 单因素条件优化

以 3.0 g 柳茶叶干粉, 液料比 15 mL/g, 纤维素酶:果胶酶=1:2 酶配比为实验基础条件。酶添加量 (1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%, *m/m*); pH 值 (3.0、4.0、5.0、6.0、7.0); 超声功率 (200、250、300、350、400 W); 超声时间 (1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h); 超声温度 (40、50、60、70、80 °C) 对 SAPs 提取率的影响, 平行测定 3 次。

1.3.5 响应面优化

在单因素试验基础上, 以粗多糖得率 (*Y*) 为响应值, 酶添加量 (*A*)、pH (*B*)、超声时间 (*C*)、超声温度 (*D*) 为自变量, 进行四因素三水平 Box-Behnken 响应面设计 (BBD), 因素及水平设计见表 1。响应面水平见下表 3。

表 1 响应面设计因素水平表

因素	水平		
	-1	0	1
A-酶添加量/%	1.5	2.0	2.5
B-pH 值	3	4	5
C-超声时间/h	1.5	2.0	2.5
D-超声温度/°C	60	70	80

1.3.6 精制 SAPs 的纯化

参考宫春宇等^[6]方法, 配制精制 0.1 g/mL SAPs 溶液过 0.45 μm 微孔滤膜后, 依次过 100、30、10 ku 超滤膜进行纯化, 以获得相对分子质量 < 10 ku 的 SAPs 溶液, 并醇沉冻干备用。

1.3.7 分子量分布测定

参考 Wang 等^[7]方法, 配制 1.0 mg/mL 纯化 SAPs, 采用高效凝胶渗透色谱法 (High Performance Gel Permeation Chromatography, HPGPC) 测定 SAPs 分子量。选用 Ultrahydrogel™ Linear Column (300×7.8 mm, 8 μm) 色谱柱; 调节柱温 40 °C、流速 0.8 mL/min 及进样体积为 20 μL; 流动相为 0.1 mol/L NaNO₂ 溶液。使用 Dextran (*M_w*: 1、5、10、21、40、84 ku) 作为校准标准, 得到标准曲线方程为 $\log M_w = -0.649 3x + 6.156 4$ ($R^2 = 0.998 7$), 以计算纯化后 SAPs 样品的相对分子量。

1.3.8 单糖组成分析

1.3.8.1 薄层层析^[8]

展开剂: 正丁醇:异丙醇:乙酸乙酯:醋酸:吡啶:水 = 35:60:100:35:30:30 (*V/V*)。

染色剂: 0.9 mL 苯胺和 1.66 g 邻苯二甲酸混合溶解, 加正丁醇至 100 mL。

取木糖、葡萄糖、阿拉伯糖、果糖、甘露糖、半乳糖、鼠李糖等 7 种标品和多糖水解产物点于薄层析

纸以展开, 取出吹干后均匀喷洒显色剂于 100 °C 烘至斑点显色清晰。

1.3.8.2 HPLC 色谱法分析单糖组成

参考 Liang 等^[9]试验方法, 采用 PMP 柱前衍生高效液相色谱 (HPLC-PMP) 分析 SAPs 的单糖组成。

(1) 多糖水解及衍生化: 精确称取 10.00 mg 粗多糖样品于螺口管中, 加入 2 mol/L 三氟乙酸 (TFA) 溶液 5 mL, 氮封后于 110 °C 水浴水解 5 h; 冷却后用 3 mol/L NaOH 调节 pH 值为 7.0, 超纯水定容至 10 mL 后离心得多糖水解产物。各取 0.2 mL 的 0.5 mol/L 1-苯基-3-甲基-5-吡啶酮 (PMP) / 甲醇溶液和 0.3 mol/L NaOH 加入到 0.2 mL 多糖水解液中, 漩涡混匀后 70 °C 水浴 1 h, 冷却后加 0.3 mol/L HCl 溶液 0.2 mL 和 1 mL 氯仿混匀萃取, 离心取上清液过 0.22 μm 滤膜做单糖组成分析。

(2) 色谱条件: 采用 Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 色谱柱 (4.6×250 mm, 5 μm); 流动相: A 为 0.02 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH 值 6.8), B 为乙腈; 柱温 28 °C, 流速: 0.8 mL/min; 进样量: 5 μL, 检测波长: 250 nm; 洗脱梯度如表 2 所示。

表 2 流动相梯度

时间/min	0	15	45	55	60	70
A/%	84	84	81	81	65	84
B/%	16	16	19	19	35	16

1.3.9 红外光谱分析

取适量纯化冻干 SAPs 粉末, 使用 KBr 压片法研磨均匀压片后对样品在 4 000~400 cm⁻¹ 范围内进行傅立叶红外光谱分析 (FT-IR) 并记录^[10]。

1.3.10 核磁共振氢谱分析

参考 Wang 等^[11]方法, 取 20 mg 纯化冻干 SAPs 完全溶于 0.5 mL D₂O 以制备 (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) 样品, 经 Bruker AVANCE III HD 400 光谱仪在 80 °C 下 300 MHz 运行 1 h 得到 ¹H NMR 光谱。

1.3.11 扫描电镜分析

参考 Nuerxiatia 等^[12]试验方法, 用导电胶将纯化冻干 SAPs 固定在样品台上, 真空喷金处理后在 20.00 kV 下用德国蔡司钨灯丝扫描电镜 (ZEISS EVO18) 进行扫描, 观察不同倍数下的外貌形态。

1.3.12 体外抗氧化活性分析

分别配制浓度为 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL 的 SAPs 待测溶液, 以 Vc 作为阳性对照, 在 517 nm 波长下测定 SAPs 对 DPPH·清除能力^[13]; 在 510 nm 波长下测定 SAPs 对·OH 清除能力^[14]; 在 320 nm 波长下测定 SAPs 对·O₂清除能力^[15]; 每组实验重复测定 3 次, 取平均值。

1.4 统计分析

所有统计分析均采用 SPSS 软件进行差异显著性分析,数据结果均以3次实验数据的平均值±标准误差表示。此外,通过单因素方差分析分析组间差异,然后进行 Duncan 检验。 $p < 0.05$ 和 $p < 0.01$ 被认为具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 PEG 分子量和质量分数对 SAPs 提取率的影响

PEG 试剂可提供较充足的-OH 基团以加强多糖的相互作用而形成氢键,从而提高多糖在 PEG 溶液中的溶解度^[16]。试验以 30% (m/m) PEG 溶液 (PEG-200、PEG-400、PEG-600、PEG-800、PEG-1000) 分别作 SAPs 提取溶剂。由图 1a 可知,提取溶剂选择 PEG-400 水溶液时 SAPs 达最佳得率 9.85%,后随着 PEG 分子量的持续提高,多糖得率出现下降趋势。PEG 分子量不同,对萃取溶剂的扩散系数、粘度和极性产生的影响存在差异,本试验中 PEG-400 较其他分子量更具有较大极性进行传质。

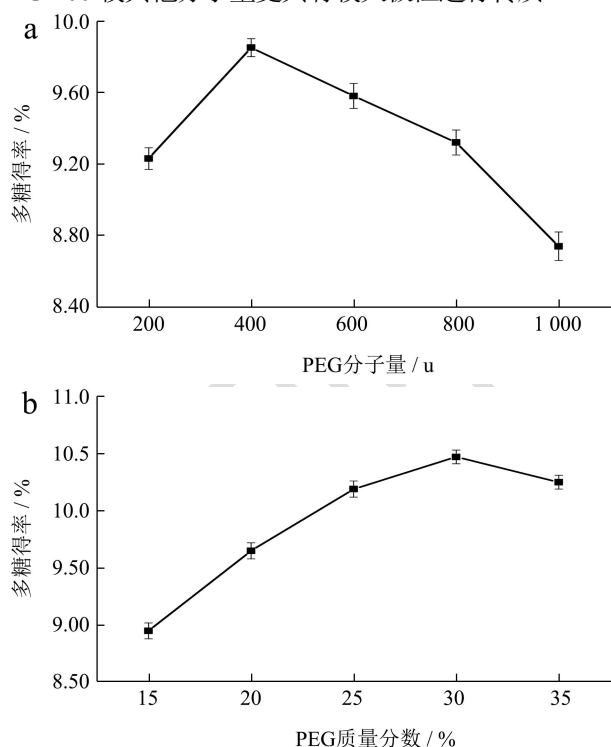


图 1 PEG 分子量 (a)、PEG 质量分数 (b) 对柳茶多糖得率的影响

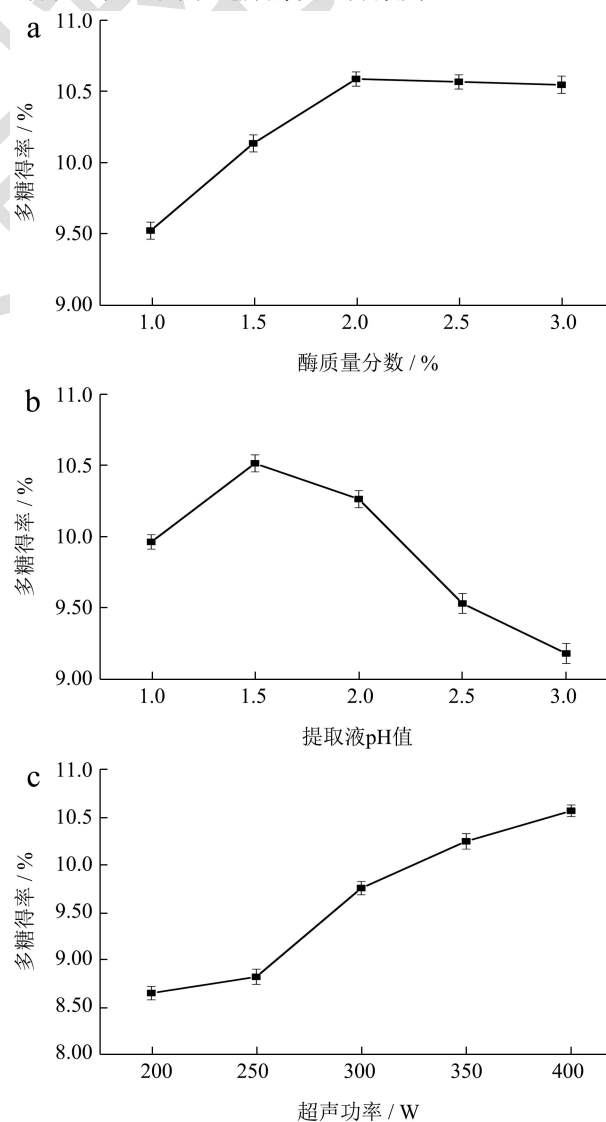
Fig.1 PEG molecular weight (a), PEG concentration (b) on the yield of SAPs

不同质量分数的 PEG 萃取溶剂决定着溶液体系的粘度大小,进而影响多糖得率的高低^[17]。由图 1b 可知,PEG 质量分数在 15%~30%时,柳茶多糖得率呈现明显

的浓度依赖性增加,当质量分数达到 30%时,多糖得率达到最大值 10.47%,当质量分数大于 30%时,多糖得率呈下降趋势。Zhou 等^[18]采用质量分数 30% PEG-400 水溶性溶剂提取石榴皮多糖,得到多糖产量最高达 7.65%,可能是由于溶剂浓度的增加改变了体系的耗散因子,利于多糖的提取效率;当 PEG 浓度多高时导致粘度过高而多糖得率下降。因此,PEG-400 提取 SAPs 的最佳浓度为 30%。

2.2 超声酶法提取

酶浓度的提高可以有效的增加酶与底物的结合面积,以使多糖提取率得到提高^[19]。由图 2a 可知,酶质量分数在 1%~2%时,多糖提取率以剂量效应不断增加,当酶质量分数增加至 2%时,多糖提取率提高 1.06%;当酶质量分数超过 2%后,由于酶的饱和度和底物有限,多糖提取率趋于平稳,这与 Zhang 等^[20]使用相同复合酶提取银杏叶多糖中提取率的趋势相似。在科学、经济性生产原则下选择酶质量分数为 2%。



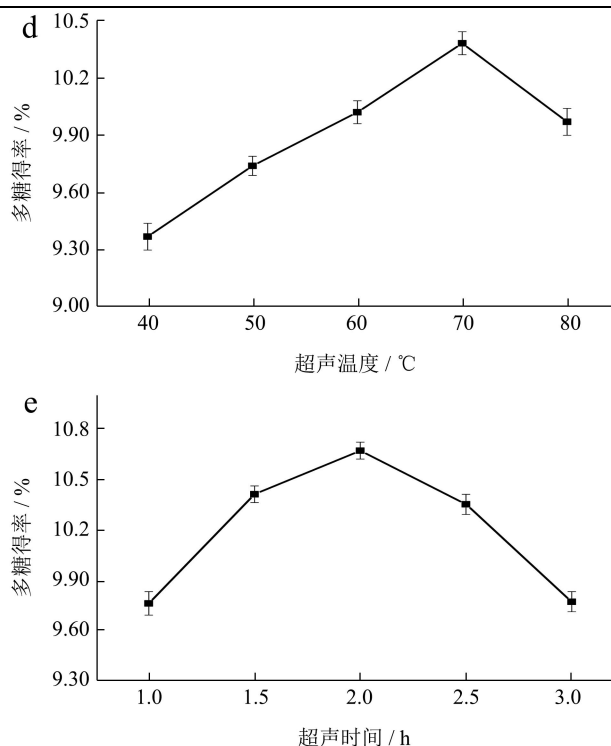


图2 酶添加量(a)、提取液pH值(b)、超声功率(c)、超声温度(d)和超声时间(e)对柳茶多糖得率的影响

Fig.2 Amount of adding enzyme (a), extraction pH (b), Ultrasonic power (c), Ultrasonic temperature (d) and Ultrasound time (e) on the yield of SAPs

提取液 pH 值主要通过影响酶活性或调节多糖碱性来提高多糖得率^[21]。由图 2b 可知, 提取液 pH 值在 3~7 范围内, 多糖的提取率随 pH 值的不断提高呈升后降的现象, 当提取液 pH 值等于 4 时, 多糖的提取率达最佳 10.52%, Zhai 等^[22]研究果胶酶用量为 0.7% 时不同提取液 pH 值对石榴皮多糖产量的影响发现, 多糖产量先随提取液 pH 值的增加而增加, 当 pH 值超过 5 时, 可能由于 SAPs 的主要成分是酸性多糖且试验中果胶酶最佳酶活 pH 值为 3.5, pH 值持续升高使的酸性多糖不能继续溶出且酶活降低。因此, 选择提取液 pH 值为 4 条件下多糖提取率最高。

超声功率的不断提高产生的空化作用会引起高温高压环境使细胞破碎, 多糖被有效释放溶解于萃取剂中, 从而导致多糖得率提高^[23]。如图 1c 可知, 超声功率为 200~400 W 范围内, 多糖提取率随超声功率的增大而不断提高, 当超声功率为 400 W 时, 多糖得率达到最大 10.56%。但随着超声功率不断提高会造成体系压力过大而破坏多糖结构, 使多糖得率趋于平缓。考虑到仪器自身功率限制和实际生产的经济性, 试验超声功率选择为 400 W。

超声温度的升高可使柳茶粉软化以增加果胶酶和纤维素酶的酶解活性, 加强酶对柳茶细胞结构的破坏,

使多糖分子运动加快、接触并溶解于 PEG 萃取剂^[24]。由图 1d 可知, 多糖提取率在 40~70 °C 范围内随着超声温度升高而迅速提高, 在 70 °C 时达到最高值 10.38%, 超声温度升高引起整个反应体系反应速度加快, 加快多糖溶出。温度超过 70 °C 后会加快萃取剂的损耗和多糖结构的破坏, 使得多糖发生水解而得率降低^[25]。综上, 选择 70 °C 为最佳超声温度提取。

超声时间的增加为超声波能提供充足有效作用时间破坏柳茶粉细胞壁, 提高 PEG 萃取剂萃取多糖^[26]。由图 1e 可知, 超声时间在 1.0~2.0 h 范围内, SAPs 得率呈现明显的浓度依赖性增加, 当超声时间达到 2.0 h 时, 多糖得率达到最大值 10.67%, 当时间超过 2.0 h 后, 多糖得率出现明显下降情况。可能因为高温高压状态持续时间过久或萃取液黏度增大, 使超声波引起部分多糖发生水解或受黏度影响溶出率降低。选择超声时间 2.0 h 为最佳超声时间提取。

2.3 响应面优化试验结果

2.3.1 回归模型的建立和方差分析

在单因素实验基础上, 选择影响较显著的单因素: A (酶添加量)、B (pH 值)、C (超声时间) 和 D (超声温度) 为相应因子, Y (粗多糖得率) 为响应值, 采用 Design-Expert 8.0.6 软件对表 1、表 3 中的试验结果进行响应面分析, 得到回归方程:

$$Y=10.88+0.10A+0.033B-0.037C+0.30D+0.070AB+0.11AC-0.087AD+0.11BC+0.15BD+0.015CD-0.60A^2-0.66B^2-0.47C^2-0.71D^2$$

实验方差结果分析如表 4 所示, 显著性检验表明该回归模型的拟合极显著 ($p < 0.0001$), 失拟项 ($p > 0.05$) 不显著; 模型与实际拟合较好 ($R^2=0.9831$, $R^2_{adj}=0.9730$), 综上所述结果均可说明模型拟合度可靠性强, 观察值和预测值之间的相关性良好, 该模型可以用于预测和分析多糖最佳提取工艺^[27]。该方差分析表明, 线性系数 D 和二次系数 (A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2) 对柳茶多糖提取率影响极显著 ($p < 0.0001$), 线性系数 A 具有统计学意义 ($p < 0.05$)。

2.3.2 响应面分析及优化

影响 SAPs 提取率的各因素交互作用 3D 响应面和等高线如图 3 所示。图 3a~3f 分别表示酶添加量与 pH 值、酶添加量与超声时间、酶添加量与超声温度、pH 值与超声时间、pH 值与超声温度和超声时间与超声温度的交互作用。因变量两两相互作用对 SAPs 提取率的影响 3D 响应面图均表现为光滑的弯曲面; 四因素等高线图均表现为椭圆形状, 表明相应变量之间的相互作用非常重要^[28]。

表3 柳茶多糖工艺优化响应面试验结果与分析

Table 3 Response surface test results and analysis of SAPs

试验号	因素				多糖得率/%
	A (酶添加量) /%	B (pH 值)	C (超声时间) /h	D (超声温度) /°C	
1	2.00	5.00	2.50	70.00	9.95±0.19
2	2.00	4.00	1.50	60.00	9.62±0.26
3	2.00	3.00	2.50	70.00	9.65±0.21
4	2.00	3.00	2.00	60.00	9.38±0.14
5	2.00	5.00	1.50	70.00	9.57±0.22
6	2.00	5.00	2.00	80.00	10.02±0.17
7	2.50	4.00	2.00	60.00	9.38±0.16
8	2.00	4.00	2.50	80.00	9.77±0.25
9	2.00	4.00	2.50	60.00	9.24±0.11
10	2.00	3.00	2.00	80.00	9.66±0.24
11	1.50	4.00	2.00	60.00	8.96±0.42
12	1.50	4.00	2.00	80.00	9.85±0.23
13	2.50	5.00	2.00	70.00	9.77±0.18
14	2.50	4.00	2.00	80.00	9.92±0.20
15	1.50	4.00	1.50	70.00	9.87±0.15
16	2.50	3.00	2.00	70.00	9.58±0.12
17	2.00	3.00	1.50	70.00	9.70±0.22
18	1.50	3.00	2.00	70.00	9.57±0.13
19	2.00	4.00	2.00	70.00	10.58±0.15
20	1.50	4.00	2.50	70.00	9.62±0.18
21	2.00	4.00	2.00	70.00	10.95±0.12
22	2.00	4.00	1.50	80.00	10.09±0.35
23	2.50	4.00	2.50	70.00	10.05±0.41
24	2.00	5.00	2.00	60.00	9.15±0.37
25	2.00	4.00	2.00	70.00	10.95±0.11
26	2.00	4.00	2.00	70.00	10.95±0.09
27	2.00	4.00	2.00	70.00	10.95±0.07
28	1.50	5.00	2.00	70.00	9.48±0.13
29	2.50	4.00	1.50	70.00	9.87±0.19

表4 回归方程方差分析及结果

Table 4 Analysis of variance and results of regression equation

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值
模型	7.89	14	0.56	26.13	<0.000 1***
A	0.12	1	0.12	5.75	0.030 9*
B	0.013	1	0.013	0.62	0.444 7
C	0.016	1	0.016	0.75	0.401 6
D	1.07	1	1.07	49.55	<0.000 1***
AB	0.020	1	0.020	0.91	0.356 5
AC	0.046	1	0.046	2.14	0.165 2
AD	0.031	1	0.031	1.42	0.253 1
BC	0.046	1	0.046	2.14	0.165 2

续表 4

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值
BD	0.087	1	0.087	4.04	0.064 2
CD	0.004	1	0.004	0.042	0.841 0
A ²	2.36	1	2.36	109.41	<0.000 1***
B ²	2.81	1	2.81	130.28	<0.000 1***
C ²	1.42	1	1.42	65.91	<0.000 1***
D ²	3.30	1	3.30	152.97	<0.000 1***
残差	0.30	14	0.022		
失拟值	0.19	10	0.019	0.70	0.704 6
纯误差	0.11	4	0.027		
总和	8.19	28			

R²=0.983 1 R²_{Adj}=0.973 0

总之，优化的参数是酶质量分数为 2%，pH 值为 4.0，超声时间为 2.0 h，超声温度为 80 ℃。此时，SAPs 提取率为 10.95%，多糖含量为 71.82%。较石磊^[29]报道水提 SAPs 的多糖含量为 17% 左右，说明 PEG-UAEE 提取存在较明显的提高效果，表明该优化提取条件是可供参考的。

分子量为 1.5×10³ u，且信号峰呈现单一对称；此外，Mw/Mn 值接近 1 并低于已发表其他多糖的相对分子量^[30,31]，表明纯化后 SAPs 的分子量分布均匀且单一。

表 5 SAPs 的相对分子质量分析

Table 5 Relative molecular weight analysis of SAPs

样品	Mn/u	Mw/u	Mw/Mn
SAPs	1440	1519	1.06

2.5 单糖组成分析

2.5.1 薄层层析

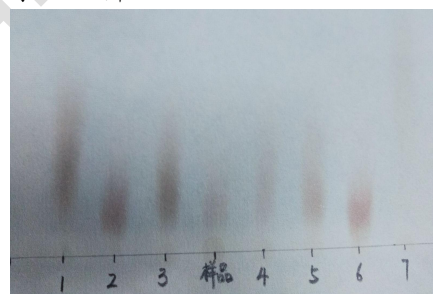


图 4 多糖酸解后的薄层层析图

Fig.4 TLC of the polysaccharide after acid degradation

如图 4，样品水解完全与 1 木糖、2 葡萄糖、3 阿拉伯糖、4 果糖、5 甘露糖、6 半乳糖、7 鼠李糖均呈现均一斑点，进一步可看出样品与葡萄糖、阿拉伯糖、甘露糖和半乳糖的位置接近。为进一步确定样品的单糖组分进行 HPLC 分析。

2.5.2 HPLC 法分析单糖组成

根据 HPLC-PMP 分析，7 种单糖标准品、SAPs 的色谱峰及出峰时间如图 5 所示，对比 5 种单糖标准品的保留时间，得出 SAPs 中较明显的 5 种单糖及占摩尔百分比分别为：半乳糖（13.34%）、葡萄糖（46.76%）、鼠李糖（8.78%）、果糖（2.89%）和阿拉伯糖（11.79%），纯化后 SAPs 单糖含量进一步证明 SAPs 是以半乳糖和葡萄糖为主的酸性杂多糖^[32]。

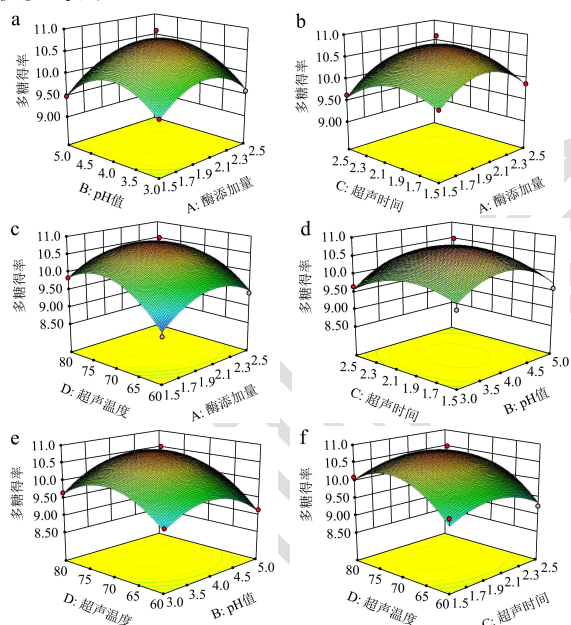


图 3 各因素交互作用对柳茶多糖提取率的影响的响应面图和等高线图

Fig.3 Response and contour diagram of the effects of interactions of various factors on the extraction rate of SAPs

注：a：酶添加量与 pH 值；b：酶添加量与超声时间；c：酶添加量与超声温度；d：pH 值与超声时间；e：pH 值与超声温度；f：超声时间与超声温度。

2.4 相对分子质量分析

采用 HPGPC 法测定超滤纯化后 SAPs 的分子量分布如表 5 所示，根据标准洗脱曲线方程计算出 SAPs

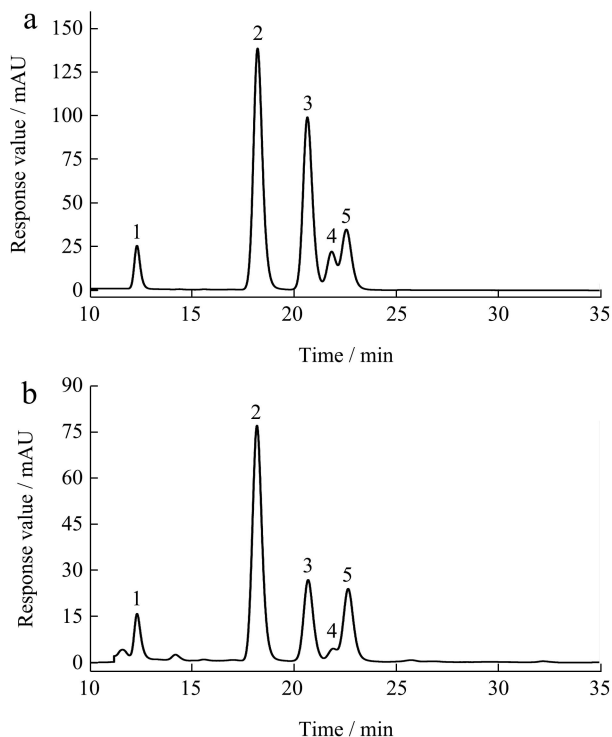


图5 混合对照品 (a) 及柳茶单糖组成 (b) HPLC 图

Fig.5 HPLC chromatogram of monosaccharides of reference substances solution (a) and monosaccharides composition of SAPs (b)

注: PMP; 1 半乳糖; 2 葡萄糖; 3 鼠李糖; 4 果糖; 5 阿拉伯糖。

2.6 红外光谱分析

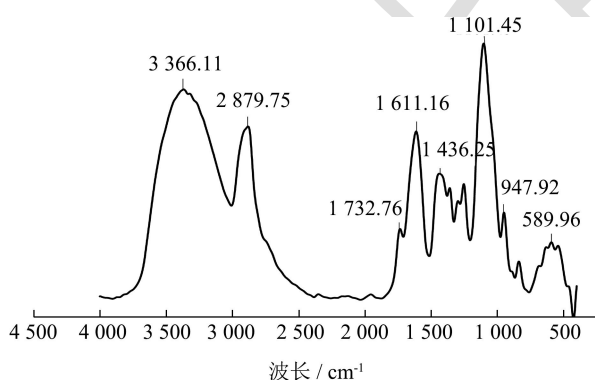


图6 柳茶多糖的红外光谱图

Fig.6 Infrared spectra of SAPs

图6是SAPs的红外光谱图,在3366.11 cm⁻¹处有很宽的宽峰,为O-H的伸缩振动吸收峰;2879.75 cm⁻¹附近为C-H键伸缩振动引起的峰;这两组吸收峰为糖类的特征吸收峰,证明该提取物为多糖^[33]。1732.76 cm⁻¹是糖醛酸中羰基C=O振动,这表明柳茶多糖含有糖醛酸;1611.16 cm⁻¹处吸收峰是由乙酰基的C=O振动引起的;1436.25 cm⁻¹处出现的吸收峰表明多糖主链可能有糖醛酸的存在;1101.45 cm⁻¹是糖环中C-O-C伸缩和

变角振动引起的峰,也表明其含有吡喃糖环;947.92 cm⁻¹附近有较强拉伸峰,表明该多糖存在β型糖苷键^[34]。根据红外光谱图出现的峰值越强,表明多糖含量越高可推断,SAPs是β型吡喃多糖类化合物。

2.7 NMR 光谱分析

多糖的¹H NMR谱图中δ 4.5~5.5范围主要为多糖的糖苷键区域,该区域出现的质子信号表明了多糖的单糖种类数。其中,δ 5.0是区分吡喃糖构型的质子信号的临界值,当第一个碳的质子位移大于δ 5.0时,表明多糖为α-糖苷键否则为β-糖苷键^[32]。纯化SAPs的¹H NMR光谱如图7所示。从图中可以看出,SAPs在δ 4.5~5.5范围内有5个质子信号峰,这与HPLC-PMP结果一致,且第一个碳的质子位移出现在δ 4.2~4.4,表明纯化SAPs中存在β-糖苷键,这与FT-IR分析结果一致。

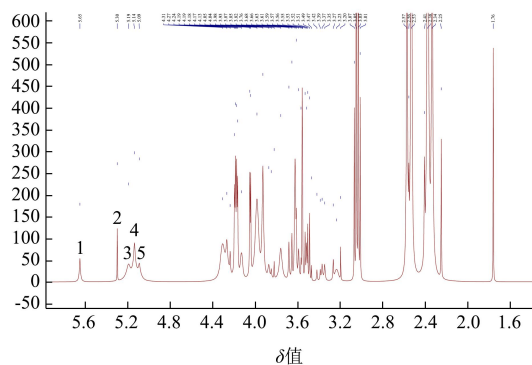


图7 柳茶多糖的¹H NMR图

Fig.7 ¹H NMR spectra of SAPs

2.8 扫描电镜分析

SAPs的微观扫描电镜结构如图8所示,经观察可发现多糖主要由不规则碎片结构组成,伴有较多的细小不规则颗粒且表面较粗糙,结构致密且贴合度较高。由此可证明SAPs具有明显的非晶态结构并较完整的结构形态。

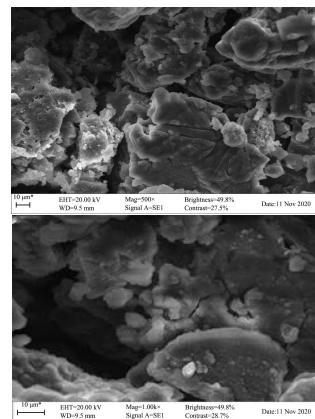


图8 柳茶多糖扫描电镜图

Fig.8 Scanning electron microscopy of SAPs

2.9 抗氧化活性分析

DPPH 是一种稳定的有机氮合成自由基,与抗氧化剂提供的氢原子或电子结合而形成稳定的分子构型^[35]。由图 9a 可知,在 0.0~1.0 mg/mL 范围内,SAPs 和 Vc 的 DPPH·清除能力表现出明显的量效关系,随着质量浓度的增大而逐渐增大。DPPH·清除能力在 SAPs 和 Vc 质量浓度为 0.0~0.2 mg/mL 时均呈明显上升,当多糖质量浓度为 1.0 mg/mL 时,清除能力达到最大值 80.33%,半抑制浓度 IC_{50} 为 0.42 mg/mL;此时 Vc 清除能力也达到最大值 95.12%,半抑制浓度 IC_{50} 为 0.21 mg/mL。表明 SAPs 可作为食品加工和保鲜过程中的天然抗氧化剂。据相关研究表明,多糖的抗氧化活性与物质的分子量、硫酸化程度和糖苷键等存在关系,可通过超声波处理以降低分子量从而提高多糖物质的生物活性。

$\cdot OH$ 极易被氧化为各种有机物或无机物,在机体内可快速造成组织脂质过氧化、核酸断裂和蛋白质分解,从而造成导致组织损伤或细胞功能丧失^[36]。由图 9b 所示,SAPs 和 Vc 对 $\cdot OH$ 清除能力均表现出浓度依赖性,在 0.0~1.0 mg/mL 范围内随着质量浓度的增大而逐渐增大。质量浓度达到 0.4 mg/mL 后,SAPs 对 $\cdot OH$ 自由基清除能力趋势增长较平缓,当质量浓度达到 1 mg/mL 时,多糖对 $\cdot OH$ 清除能力达到最大值 38.40%,半抑制浓度 IC_{50} 为 2.08 mg/mL;此时,Vc 对 $\cdot OH$ 清除能力也达到最高值 70.54%,半抑制浓度 IC_{50} 为 0.51 mg/mL。Wu 等^[37]研究紫菜多糖含有 α 型和 β 型糖苷键结构,且清除 $\cdot OH$ (22.84%, 2 mg/mL) 效率与低浓度 SAPs 抑制 $\cdot OH$ 接近。

$\cdot O_2$ 是由机体内黄嘌呤脱氢酶、纤维二糖氧化酶和醛氧化酶等少数酶作用引起产生的重要自由基^[38]。如图 9c 所示,对 $\cdot O_2$ 清除能力在质量浓度为 0.0~1.0 mg/mL 范围内以明显的浓度依赖性方式增加。SAPs 质量浓度达到 1.0 mg/mL 时,对 $\cdot O_2$ 清除能力达到最大值 85.20%,半抑制浓度 IC_{50} = 0.28 mg/mL;相同质量浓度下,Vc 清除 $\cdot O_2$ 能力高达 102.31%,半抑制浓度 IC_{50} = 0.20 mg/mL。Ma 等^[39]研究发现,当天花粉蛋白多糖浓度达到 1.28 mg/mL 时表现出最大 $\cdot O_2$ 清除活性为 35.33%。研究表明, $\cdot O_2$ 清除作用机制可能是由于醛类或酮类多糖中存在亲电基团。

综上所述,在 0.0~1.0 mg/mL 质量浓度范围内,SAPs 和 Vc 对 $\cdot O_2$ 清除能力均强于对 DPPH·清除能力和 $\cdot OH$ 清除能力,且清除活性较 Vc 差距较小。

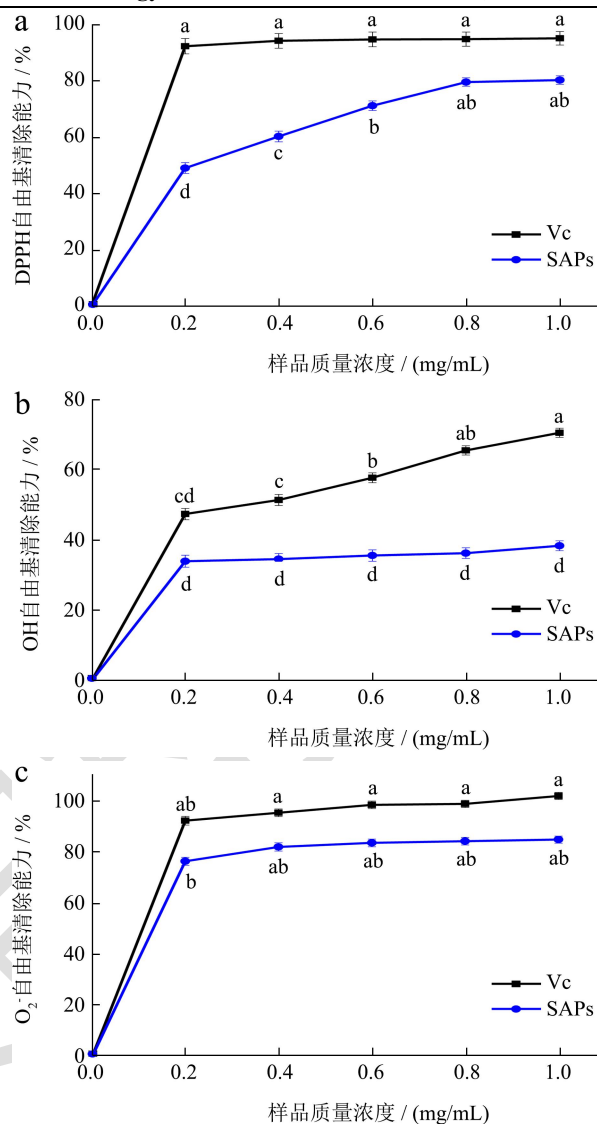


图9 柳茶多糖抗氧化活性

Fig.9 Antioxidative activity of SAPs

注: a: DPPH 自由基清除能力; b: $\cdot OH$ 自由基清除能力;
c: $\cdot O_2$ 自由基清除能力。

3 结论

以藏柳茶为原料,以多糖提取率为评价指标,通过响应面试验优化 PEG-UAEE 提取 SAPs 最佳工艺为:PEG-400 浓度为 30%,复合酶添加量 2%,pH 值 4.0,超声功率 80%,超声时间 2.0 h,超声温度 80 °C 条件得出多糖提取率为 10.95%,多糖含量为 21.82%。由半乳糖、葡萄糖、鼠李糖、果糖和阿拉伯糖组成的酸性杂多糖,摩尔比为 13.34:46.76:8.78:2.89:5.34:11.79;多糖具有完整明显的非晶态结构, β -糖苷键的吡喃型多糖;随着多糖含量的提高,其自由基清除能力剂量效应关系,DPPH·清除能力、 $\cdot OH$ 清除能力和 $\cdot O_2$ 清除能

力的 IC₅₀ 值分别为 0.42、2.08、0.28 mg/mL。本研究可为藏药柳茶的进一步开发和利用提供参考。

参考文献

- [1] 杨帆,赫雪,杨远,等.藏药柳茶水提物降脂效果研究[J].中国民族民间医药,2019,28(18):26-28,45
- [2] 李容,陈华国,周欣.植物多糖免疫调节机制研究进展[J].天然产物研究与开发,2018,30(11):2022-2031
- [3] 陈婷.藏药防治心血管疾病的研究进展[J].中国民族医药杂志,2020,26(1):42-44
- [4] 卫阳飞,宋海,宗盈晓,等.分级醇沉柳茶多糖的含量与单糖组成及抗氧化性研究[J].华西药理学杂志,2018,33(6):489-493
- [5] Ahmad Ajaz, Rehman Muneeb, Wali Adil, et al. Box-Behnken response surface design of polysaccharide extraction from *Rhododendron arboreum* and the evaluation of its antioxidant potential [J]. *Molecules*, 2020, 25(17): 3835
- [6] 宫春宇,徐硕,徐先梅,等.超滤分离制备玉米须粗多糖及其促益生菌增殖活性研究[J].食品与发酵工业,2021,47(17):166-171
- [7] WANG Donghui, FAN Bei, WANG Yan, et al. Optimum extraction, characterization, and antioxidant activities of polysaccharides from flowers of *Dendrobium devonianum* [J]. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2018, 3(1): 34-37
- [8] Hamzaoui Asma, Ghariani Marwa, Sellem Imen, et al. Extraction, characterization and biological properties of polysaccharide derived from green seaweed "*Chaetomorpha linum*" and its potential application in Tunisian beef sausages [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 148: 1156-1168
- [9] LIANG Xiaoxia, GAO Yingying, PAN Yan, et al. Purification, chemical characterization and antioxidant activities of polysaccharides isolated from *Mycena dendrobii* [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2019, 203(1): 45-51
- [10] Jooyandeh Hossein, Noshad Mohammad, Khamirian Rezaamir. Modeling of ultrasound-assisted extraction, characterization and *in vitro* pharmacological potential of polysaccharides from *Vaccinium arctostaphylos* L [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 107: 938-948
- [11] WANG Yufen, HOU Guohua, LI Jinglei, et al. Structure characterization, modification through carboxymethylation and sulfation, and *in vitro* antioxidant and hypoglycemic activities of a polysaccharide from *Lachnum* sp [J]. *Process Biochemistry*, 2018, 72: 177-187
- [12] Nuerxiati Rehebati, Abuduwaili Aytursun, Mutailifu Paiherding, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction, characterization and biological activities of polysaccharides from *Orchis chusua* D. Don (*Salep*) [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 141: 431-443
- [13] WANG Wei, LI Xuwen, CHEN Kai, et al. Extraction optimization, characterization and the antioxidant activities *in vitro* and *in vivo* of polysaccharide from *Pleurotus ferulae* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 160: 380-389
- [14] XIAO Luyao, HAN Shuo, ZHOU Jianzhong, et al. Preparation, characterization and antioxidant activities of derivatives of exopolysaccharide from *Lactobacillus helveticus* MB2-1 [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 145: 1008-1017
- [15] QIAN Lei, LIU Han, LI Tao, et al. Purification, characterization and *in vitro* antioxidant activity of a polysaccharide AAP-3-1 from *Auricularia auricular* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 162: 1453-1464
- [16] ZHANG Lijin, GUO Shanshan, WANG Maoshan, et al. PEG-based ultrasound-assisted enzymatic extraction of polysaccharides from *Ginkgo biloba* leaves [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 80: 644-650
- [17] 李文佳,汪安琪,施瑞城,等.基于聚乙二醇/水体系的菠萝蜜果皮多糖提取及其抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2018, 39(22):150-157
- [18] ZHOU Xinyu, LIU Ruilin, MA Xue, et al. Polyethylene glycol as a novel solvent for extraction of crude polysaccharides from *Pericarpium granati* [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 101: 886-889
- [19] LI Le, LI Xu, DING Chunbang, et al. Ultrasonic-assisted enzymatic extraction and antioxidant activity of polysaccharides from *Setaria viridis* [J]. *Separation Science and Technology*, 2016, 51(11): 1798-1805
- [20] ZHANG Lijin, GUO Shanshan, WANG Maoshan, et al. PEG-based ultrasound-assisted enzymatic extraction of polysaccharides from *Ginkgo biloba* leaves [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 42(2): 644-650
- [21] WANG Libo, LI Tengfei, LIU Fangcheng, et al. Ultrasonic-assisted enzymatic extraction and characterization of polysaccharides from dandelion (*Taraxacum officinale*) leaves [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 126(1): 846-856

- [22] ZHAI Xichuan, ZHU Caiping, LI Yun, et al. Optimization for pectinase-assisted extraction of polysaccharides from *Pomegranate peel* with chemical composition and antioxidant activity [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 109: 244-253
- [23] ZHANG Wenyi, GUO Yahui, CHENG Yuliang, et al. Ultrasonic-assisted enzymatic extraction of *Sparassis crispa* polysaccharides possessing protective ability against H₂O₂-induced oxidative damage in mouse hippocampal HT22 cells [J]. RSC Advances, 2020, 10: 22164-22175
- [24] 顾欣,高涛,刘梦雅,等.梁平柚柚皮多糖的提取、结构解析及抗氧化能力研究[J].食品与发酵工业,2021,47(7):137-145
- [25] Chen Guanqing, Kan Jianquan. Ultrasound-assisted extraction, characterization, and antioxidant activity *in vitro* and *in vivo* of polysaccharides from chestnut rose (*Rosa roxburghii* Tratt) fruit [J]. Journal of Food Science Technology, 2018, 55(3): 1083-1092
- [26] SUN Haiyao, LI Chunying, NI Yujiao, et al. Ultrasonic/microwave-assisted extraction of polysaccharides from *Camptotheca acuminata* fruits and its antitumor activity [J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 206: 557-564
- [27] YUAN Shuai, XU Changyuan, XIA Jie, et al. Extraction of polysaccharides from *Codonopsis pilosula* by fermentation with response surface methodology [J]. Food Science and Nutrition, 2020, 8: 6660-6669
- [28] CHEN Liang, XIN Xiulan, YU Ran, et al. Application of response surface methodology to optimize the extraction of polysaccharides from *Mulberry* leaves by ethanol precipitation [J]. Journal of Biobased Materials and Bioenergy, 2020, 14(8): 739-746
- [29] 石磊.“香巴拉”藏茶中多糖的初步研究[D].甘肃:兰州大学, 2009
- [30] CHEN Xiaoyu, JI Haiyu, ZHANG Chaofeng, et al. Optimization of extraction process from *Taraxacum officinale* polysaccharide and its purification, structural characterization, antioxidant and anti-tumor activity [J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2019, 14(4): 194-206
- [31] ZHANG Wuxia, HU Yihua, ZHAO Jinzhong, et al. Immunoregulation and antioxidant activities of a novel acidic polysaccharide from *Radix paeoniae Alba* [J]. Glycoconjugate Journal, 2020, 37(3): 361-371
- [32] SHANG Xiaolan, LIU Chunyu, DONG Haiyan, et al. Extraction, purification, structural characterization, and antioxidant activity of polysaccharides from *Wheat bran* [J]. Journal of Molecular Structure, 2021, 1233(5): 130096
- [33] Khemakhem Ibtihel, Abdelhedi Ola, Trigui Ines, et al. Structural, antioxidant and antimicrobial activities of polysaccharides extracted from olive leaves [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 106: 425-432
- [34] FAN Yanli, WANG Wwnhang, SONG Wei, et al. Partial characterization and anti-tumor activity of an acidic polysaccharide from *Gracilaria lemaneiformis* [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 88(4): 1313-1318
- [35] 江飞凤,谭晓辉,胡鹏刚,等.超声-微波协同提取柚子皮多糖工艺优化及单糖组成、结构和抗氧化活性分析[J].食品与发酵工业,2021,47(2):196-204
- [36] Rahman Mdmahfuzur, Lamsal Buddhi. Ultrasound-assisted extraction and modification of plant-based proteins: Impact on physicochemical, functional, and nutritional properties [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2021, 20(5): 1541-4337
- [37] WU Yuntao, HUO Yunfeng, XU Lin, et al. Purification, characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Porphyra haitanensis* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 165: 2116-2125
- [38] WU Wei, HUANG Tingrong, XIANG Fu. Polyethylene glycol-based ultrasonic-assisted enzymatic extraction, characterization, and antioxidant activity *in vitro* and *in vivo* of polysaccharides from *Lonicerae japonica* leaves [J]. Food Science and Nutrition, 2019, 7(2): 1-11
- [39] MA Donglai, DU Huiru, WEN Zishuai, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of polysaccharides from trichosanthin and antioxidant activities *in vitro* [J]. 2018 9th International Conference on Information Technology in Medicine and Education (ITME), 2018, 122: 894-899