

# 拐枣不同部位多糖的结构特征及活性分析

王洁<sup>1</sup>, 毕金峰<sup>1</sup>, 吴群军<sup>2</sup>, 苟敏<sup>1</sup>, 周润生<sup>2</sup>, 陈芹芹<sup>1\*</sup>

(1. 中国农业科学院农产品加工研究所, 农业农村部农产品加工重点实验室, 北京 100193)

(2. 旬阳县太极缘生物科技有限公司, 陕西安康 725700)

**摘要:** 为明确拐枣不同部位多糖的结构及生理活性的差异, 采用水提醇沉法制备了三种拐枣多糖 (HDP)-全果多糖 (HDPW)、籽多糖 (HDPS) 和果梗多糖 (HDPP)。通过紫外-可见光谱、高效尺寸排阻色谱、离子色谱、傅里叶红外光谱和扫描电子显微镜对其结构进行对比, 研究结果表明, 三种 HDP 均为酸性多糖, 由不同摩尔比例的岩藻糖、鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖、半乳糖醛酸和葡萄糖醛酸组成, HDPW、HDPS 和 HDPP 的分子量均有三个色谱峰, 其中 HDPS 的中、低分子量值 ( $45.72 \times 10^4 \sim 165.75 \times 10^4$  u) 要高于 HDPW ( $0.34 \times 10^4 \sim 12.53 \times 10^4$  u) 和 HDPP ( $0.51 \times 10^4 \sim 21.26 \times 10^4$  u), 红外光谱表明 HDPW 及 HDPP 含有  $\alpha$ -糖苷键, 而 HDPS 是一种含有  $\beta$ -糖苷键的多糖。HDP 对 DPPH 自由基、ABTS 自由基和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的半数抑制浓度范围分别为 0.015~0.043 mg/mL、0.47~1.21 mg/mL 和 0.13~9.99 mg/mL, 当 HDPW 和 HDPP 的质量浓度在 0.1 mg/mL 及以上时, 可显著提升胰岛素抵抗 HepG2 细胞 (IR-HepG2) 的葡萄糖消耗率, 较模型组最高可提高 7.66%。较 HDPS 而言, HDPW 和 HDPP 结构相似且显示出了更好的抗氧化及  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性, 更强的 IR-HepG2 葡萄糖摄取促进能力, 研究为拐枣的综合利用提供一定的理论依据和数据支持。

**关键词:** 多糖; 拐枣; 结构特征; 抗氧化;  $\alpha$ -葡萄糖苷酶; HepG2 细胞

文章编号: 1673-9078(2023)09-252-260

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.9.1233

## Structural Features and Activity Analyses of Polysaccharides from Different Parts of *Hovenia dulcis*

WANG Jie<sup>1</sup>, BI Jinfeng<sup>1</sup>, WU Qunjun<sup>2</sup>, GOU Min<sup>1</sup>, ZHOU Runsheng<sup>2</sup>, CHEN Qinqin<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Agro-products Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

(2. Taijiyuan Biotechnology Co. Ltd., Ankang 725700, China)

**Abstract:** To identify structures and differences in physiological activity of polysaccharides from different *Hovenia dulcis* tissues, three populations of *H. dulcis* polysaccharides (HDP), including whole fruit polysaccharides (HDPW), seed polysaccharides (HDPS) and peduncle polysaccharides (HDPP), were prepared using water extraction and alcohol precipitation. Their structures were analyzed using UV-Vis spectroscopy, high-performance size exclusion chromatography, ion exchange chromatography, Fourier transform infrared spectrometry, and scanning electron microscopy. All three HDP preparations comprised the acidic polysaccharides fucose, rhamnose, arabinose, galactose, glucose, mannose, galacturonic acid, and glucuronic acid in different molar ratios. HDPW, HDPS, and HDPP each eluted in size exclusion chromatography with three chromatographic peaks, and the low and medium molecular weight HDPS peaks ( $45.72 \times 10^4 \sim 165.75 \times 10^4$  u) displayed higher molecular weights than those of HDPW ( $0.34 \times 10^4 \sim 12.53 \times 10^4$  u) and HDPP ( $0.51 \times 10^4 \sim 21.26 \times 10^4$  u). Infrared spectra showed that HDPW and HDPP contained  $\alpha$ -glycosidic bonds, while HDPS contained  $\beta$ -glycosidic linked polysaccharides. The respective median inhibitory concentrations of HDP for DPPH free radicals, ABTS free radicals, and  $\alpha$ -glucosidase were 0.015~0.043, 0.47~1.21,

引文格式:

王洁, 毕金峰, 吴群军, 等. 拐枣不同部位多糖的结构特征及活性分析[J]. 现代食品科技, 2023, 39(9): 252-260

WANG Jie, BI Jinfeng, WU Qunjun, et al. Structural features and activity analyses of polysaccharides from different parts of *Hovenia dulcis* [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(9): 252-260

收稿日期: 2022-09-27

基金项目: 陕西省技术创新引导专项 (2022QFY09-08); 中国农业科学院农产品加工研究所创新工程 (CAAS-ASTIP-2022-IFST)

作者简介: 王洁 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 果蔬加工, E-mail: wj17854337138@163.com

通讯作者: 陈芹芹 (1985-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 果蔬加工与品质调控, E-mail: celerylc@163.com

and 0.13~9.99 mg/mL. When the mass/volume concentrations of HDPW and HDPP were 0.1 mg/mL or above, the glucose consumption rate of insulin-resistant HepG2 cells (IR-HepG2) was significantly increased, with the highest increase compared with the model group being 7.66%. Compared with HDPS, HDPW was similar to HDPP in structure, and both showed better antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity and stronger IR-HepG2 glucose uptake promotion ability. This study provides a theoretical basis and data supporting the comprehensive utilization of *H. dulcis*.

**Key words:** polysaccharides; *Hovenia dulcis*; structure characteristics; antioxidation;  $\alpha$ -glucosidase; hepG2 cells

拐枣又称枳椇 (*Hoveniadulcis*), 是一种鼠李科 (Rhamnaceae) 枳椇属植物, 用于中国传统医学已有上千年历史, 其叶子、种子、果梗、树皮和根均可入药, 具有消渴、解酒、护肝等功效<sup>[1]</sup>。拐枣果实产量丰富, 每亩年产量可达 2 000~3 000 kg。拐枣中含有多种生物活性功能成分, 如多糖、黄酮、生物碱等, 其中拐枣多糖作为一种天然的高活性物质, 在拐枣中干重占比高达 10.47%<sup>[2]</sup>。拐枣果梗多糖具有良好的降糖作用, 能够有效抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性<sup>[3-5]</sup>、使大鼠体重增加<sup>[6]</sup>、降低空腹血糖<sup>[7]</sup>。且相比于传统的药物治疗, 多糖具有细胞毒性低、安全性高等优点, 因此成为了治疗糖尿病及其并发症的理想药物。多糖的降血糖特性归因于许多分子机制, 如通过对氧化应激损伤的防御以减少糖尿病及其并发症<sup>[8]</sup>, 调节和延缓主要消化酶  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的活性以降低胃肠道中碳水化合物的吸收率, 对 PI3K/Akt、MAPK 等胰岛素信号通路的激活作用等<sup>[9]</sup>。

拐枣的果实包括果梗及种子, 其中果梗约占果实鲜重的 90%以上<sup>[10]</sup>。目前, 果梗多用于饮料生产, 产品种类较少, 大多只是经过简单粗加工便进入市场, 产品资源附加值较低<sup>[6]</sup>。拐枣籽多用于传统中药, 研究多集中于小分子物质如黄酮的提取及活性分析<sup>[11]</sup>。越来越多的研究发现, 从植物不同部位获得的多糖具有不同的性质<sup>[12]</sup>。辛玥等<sup>[13]</sup>研究发现豇豆多糖的全豆多糖与子叶多糖结构相似, 与种皮多糖差异性较大, 且种皮多糖的抗氧化活性要明显强于其他多糖。Bai 等<sup>[14]</sup>对人参不同部位多糖的提取率及结构与活性差异进行了研究, 结果表明, 不同部位多糖提取率的大小顺序为根>花>叶, 人参花多糖的分子量最低, 抗氧化和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性最佳。然而, 目前对拐枣资源的研究及利用方面多集中在拐枣果梗多糖, 但对于拐枣籽、果梗及全果多糖的提取率、结构、活性的对比还缺乏系统的研究。因此, 本研究对拐枣不同部位 (拐枣籽、果梗及全果) 多糖的结构和生物活性进行比较, 相关结果将为拐枣多糖在降血糖方面的潜在应用及拐枣的全果开发利用提供理论依据, 为提升拐枣资源的附加值提供一条新的途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

拐枣, 由陕西安康旬阳县太极缘生物科技有限公司提供。

HepG2 细胞, 中国医学科学院基础医学细胞资源中心; 无水乙醇、丙酮、乙醚, 国药集团化学试剂有限公司; 四硼酸钠、4-硝基苯- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷 (4-Nitrophenyl- $\alpha$ -D-Glucopyranoside, PNPG)、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶、胰岛素、地塞米松, 上海源叶生物科技有限公司; 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl, DPPH)、2,2'-联氮双 (3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸) 二铵盐 (2,2'-Amino-Bis(2-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid) Ammonium Salt, ABTS), 美国 Sigma-Aldrich 公司; DMEM 培养基、胰酶, 美国 Gibco 公司; 葡萄糖含量试剂盒, 苏州格锐思生物科技有限公司; 以上试剂除特别说明外均是分析纯级。

### 1.2 仪器与设备

CPA-12 电子天平, 德国 Sartorius 公司; DHG-9123A 电热恒温鼓风箱、DK-S26 电热恒温水浴锅, 上海精宏实验设备有限公司; JP-150 高速多功能粉碎机, 永康久品工贸有限公司; 3K15 离心机, 艾本德中国有限公司; VORTEX-5 旋涡混合器, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司; UV-1800 紫外-可见分光光度计, 日本岛津公司; S-570 扫描电子显微镜, 日本日立公司; ICS-3000 离子色谱仪, 美国戴安公司; DAWN HELEOS-II 多角度激光光散射/凝胶色谱联用仪, 美国 Wyatt 公司; TENSOR27 傅里叶红外仪, 德国 Bruker 公司; 雷磁 PHS-3C pH 计, 上海仪电科学仪器股份有限公司; Varioskan Flash 酶标仪, 美国 Thermo Scientific。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 拐枣多糖的提取

水提醇沉法制备拐枣多糖<sup>[4,15]</sup>。将拐枣籽、果梗及全果于 60 °C 下烘干, 再分别用植物粉碎机粉碎,

过 60 目筛。取各部位粉末各 100 g, 加入  $\varphi=95\%$  乙醇 250 r/min 磁力搅拌 24 h, 期间更换乙醇 4 次, 以除去脂肪、色素等小分子物质。抽滤, 弃去上清液, 将残渣置烘箱中 40 °C 干燥。

称取 10 g 预处理的各部位原料, 按照 1:30 的料液比, 90 °C 水浴浸提多糖 3 h, 离心, 获得上清液, 残渣以同样的条件处理一次, 合并上清液, 50 °C 旋蒸浓缩至原体积的 1/3。加入 3% ( $m/V$ ) 的胰酶, 37 °C 震荡 4 h, 以除去游离蛋白质, 酶解完成后, 沸水浴 10 min 灭酶, 冷却至室温, 离心除去沉淀物。向多糖提取液中加入 4 倍体积无水乙醇, 4 °C 静置过夜, 8 000 r/min 离心 10 min, 收集沉淀。沉淀分别用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤, 干燥后得到各部位多糖。

### 1.3.2 多糖成分分析

采用苯酚-硫酸法测定多糖中的总糖含量<sup>[16]</sup>; 糖醛酸含量参照 Peng 等<sup>[17]</sup>的方法, 采用分光光度法, 以半乳糖醛酸作为标准物质测定; 以牛血清白蛋白为标准品, 采用考马斯亮蓝法测定多糖中的蛋白质含量<sup>[18]</sup>; 以没食子酸为标准品, 采用福林酚法测定多糖中的酚类含量<sup>[19]</sup>。

### 1.3.3 分子量分布测定

采用高效尺寸排阻色谱 (HPSEC) 系统分析拐枣多糖的分子量。HPSEC 系统配备有 TSK 凝胶柱 (TSK Gel G4000PWxl, 300×7.8 mm)、激光散射检测器 (DAWN HELEOS II, Wyatt Technology)、紫外检测器 (L-2400, Wyatt Technology) 和示差折光仪 (RI) (OptilabrEX, Wyatt Technology)。10.0 mg 拐枣多糖完全溶解于 0.1 mol/L 氯化钠水溶液中, 之后经 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤。然后将样品 (200  $\mu\text{L}$ ) 注入 TSK 凝胶柱。用 0.1 mol/L 的 NaCl 溶液、流速 0.5 mL/min 洗脱 30 min, 柱温为 35 °C。

### 1.3.4 单糖组成

根据 Zhou 等<sup>[20]</sup>报道的方法, 采用 ICS-3000 离子色谱系统 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) 对拐枣多糖的单糖组成进行了分析, 并进行了适当修改。称取约 10 mg 多糖于水解管中, 准确记录多糖质量。加入 4 mL 2 mol/L 的三氟乙酸, 充氮 1 min 排除空气, 于 120 °C 烘箱中水解 2 h, 冷却后氮吹除去三氟乙酸, 蒸馏水溶解定容至 5 mL。样品稀释一定倍数, 过 0.2  $\mu\text{m}$  滤膜后进样。使用 Carbo Pac PA20 类型的分析柱, 选用 0.25 mol/L 氢氧化钠及 1 mol/L 醋酸钠作为本试验的流动相, 检测器采用脉冲安培检测器。

### 1.3.5 红外光谱

将干燥的多糖样品 (2 mg) 与 KBr 粉末混合研磨后压片, 在 400~4 000  $\text{cm}^{-1}$  范围内, 用 Vector 33 红外

分光光度计进行扫描, 以溴化钾为对照扣除背景<sup>[21]</sup>。

### 1.3.6 抗氧化活性测定

#### 1.3.6.1 DPPH 自由基清除实验

根据 Wang 等<sup>[22]</sup>的方法, 对多糖的 DPPH 自由基清除能力进行测定, 并稍作修改。用  $\varphi=80\%$  甲醇配制浓度为 100  $\mu\text{mol/L}$  的 DPPH 溶液, 将 HDP 溶解在去离子水中以获得各种浓度梯度的多糖溶液, 然后将 80  $\mu\text{L}$  DPPH 溶液加入到 40  $\mu\text{L}$  样品溶液中。混合后于室温下避光反应, 30 min 后用酶标仪在波长 517 nm 下测量吸光值, 每个样品做三个平行。以抗坏血酸作为阳性对照, 根据以下公式计算 DPPH 自由基清除率:

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

式中:

$A_2$ —样品组的吸光度;

$A_1$ —对照组吸光度, 包括 80  $\mu\text{L}$  80% 甲醇溶液和 40  $\mu\text{L}$  样品;

$A_0$ —空白组的吸光度, 包括 80  $\mu\text{L}$  DPPH 和 40  $\mu\text{L}$  去离子水。

#### 1.3.6.2 ABTS 自由基清除实验

使用去离子水制备样品溶液 (0~10 mg/mL)。用移液器吸取 0.1 mL 待测液, 加入 3.6 mL ABTS 溶液完全混合, 室温静置 1 min, 然后测量波长为 734 nm 的反应溶液的吸光度值<sup>[23]</sup>。ABTS 自由基清除率计算如下:

$$S = \frac{A_0 - (A_2 - A_1)}{A_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

$A_2$ —样品组的吸光度;

$A_1$ —对照组吸光度, 包括 3.6 mL 的 80% 甲醇溶液和 0.1 mL 多糖样品;

$A_0$ —空白组的吸光度包括 3.6 mL 的 ABTS 和 0.1 mL 去离子水。

### 1.3.7 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性实验

参考 Jia 等<sup>[24]</sup>的方法测定多糖对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制能力, 并稍作修改。将 40  $\mu\text{L}$  的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶溶液与 40  $\mu\text{L}$  多糖溶液混合均匀, 在 37 °C 恒温培养箱中孵育 15 min, 然后向混合溶液中加入 20  $\mu\text{L}$  PNPG 溶液启动反应, 混匀后于 37 °C 孵育 15 min, 最后向反应液中加入 150  $\mu\text{L}$  碳酸钠溶液停止反应后, 于 405 nm 波长处测定吸光度值。HDP 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制率计算如下:

$$I = \left( 1 - \frac{A_2 - A_1}{A_0} \right) \times 100\% \quad (3)$$

式中:

$A_2$ —样品组的吸光度, 反应物包括 40  $\mu\text{L}$  多糖、40  $\mu\text{L}$

酶和 20  $\mu\text{L}$  PNPG 的混合液;

$A_1$ —对照组的吸光度,是缓冲溶液代替酶溶液后混合物的吸光度值;

$A_0$ —空白组的吸光度,是缓冲溶液代替样品溶液的吸光度值。

### 1.3.8 拐枣多糖样品对 HepG2 胰岛素抵抗细胞葡萄糖摄取的测定

#### 1.3.8.1 拐枣多糖样品对 HepG2 细胞存活率的影响

接种 200  $\mu\text{L}$  HepG2 细胞于 96 孔板中,使细胞密度为每孔  $2 \times 10^4$  个,在  $\text{CO}_2$  培养箱中培养过夜,至细胞密度达到 80% 左右,吸出培养基,每孔加入 200  $\mu\text{L}$  含有多糖样品的培养基,同时设置空白组、对照组,继续培养 24 h,然后用 PBS 洗涤 1 次,每孔加入 200  $\mu\text{L}$  的培养基及 20  $\mu\text{L}$  的 MTT 溶液,继续培养 4 h。去除 MTT 溶液后,在每孔中加入 150  $\mu\text{L}$  二甲亚砜,震荡 10 min 后在 490 nm 处测定各孔的吸光值<sup>[25]</sup>。

$$V = \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}} \times 100\% \quad (4)$$

式中:

$A_{\text{样品}}$ —添加多糖及细胞;

$A_{\text{对照}}$ —添加细胞未添加多糖;

$A_{\text{空白}}$ —未添加多糖和细胞。

#### 1.3.8.2 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型葡萄糖摄取的建立

将 200  $\mu\text{L}$  HepG2 细胞以每孔  $2 \times 10^4$  个的密度接种于 96 孔板上,培养过夜后,移去培养基。PBS 洗涤,分别以终浓度为  $5 \times 10^{-7}$  mol/L 的胰岛素 DMEM 培养液<sup>[25]</sup>、终质量浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的胰岛素和 0.5 mmol/L 的油酸的 DMEM 培养液<sup>[6]</sup>、含有 3  $\mu\text{mol}/\text{L}$  地塞米松<sup>[26]</sup> 的 DMEM 培养液进行诱导培养 48 h,培养结束采用葡萄糖氧化酶-过氧化物酶法,根据葡萄糖试剂盒步骤测定上清液葡萄糖含量,并按公式(5)计算葡萄糖消耗率,选择葡萄糖消耗能力最弱组为胰岛素抵抗模型。

$$R = \frac{C_{\text{空白}} - C_{\text{模型}}}{C_{\text{空白}}} \times 100\% \quad (5)$$

式中:

$R$ —葡萄糖消耗率, %;

$C_{\text{空白}}$ —未添加细胞组的葡萄糖含量, mg/mL;

$C_{\text{模型}}$ —添加细胞及多糖组的葡萄糖含量, mg/mL。

#### 1.3.8.3 葡萄糖消耗率测定

胰岛素抵抗细胞模型建立之后,吸去培养基,用 PBS 洗涤后,吸去各孔培养液,加入含有不同浓度多糖的培养基培养 24 h,结束后吸取上清液采用葡萄糖试剂盒测定葡萄糖含量,并计算葡萄糖消耗率。

#### 1.3.9 数据分析

采用 SPSS 26 软件进行单因素方差分析和邓肯多重比较,  $P < 0.05$  表示差异显著,结果以平均值 $\pm$ 标准偏差表示;使用 Origin 2021 软件作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 多糖提取率及化学组成分析

拐枣不同部位水提多糖 (*Hoveni dulcis* Polysaccharide, HDP) 的得率与化学组成如表 1 所示。全果多糖 (Whole Fruit Polysaccharide of *H. dulcis*, HDPW)、籽多糖 (*H. dulcis* Seed Polysaccharide, HDPS) 和果梗多糖 (*H. dulcis* Peduncles Polysaccharide, HDPP) 的得率分别为 3.83%、2.69%、3.00%,三个部位的得率没有显著性差异。三种多糖的总糖、糖醛酸、蛋白和总酚的质量分数范围分别为 30.98%~33.46%、3.72%~13.75%、9.21%~27.39%、8.02%~14.87%,其中糖醛酸含量,蛋白含量及总酚含量存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。HDPP 的总糖含量及总酚含量最高,分别占比 33.46%和 14.87%,总糖含量与 Liu 等<sup>[27]</sup>报道的 33.34%含量近似,总酚含量低于 Liu 等报道的 27.76%,这可能与拐枣的产地及采收期的不同有关。HDP 中存在蛋白及酚,可能是由于氢键和疏水相互作用以及疏水腔和裂缝的存在会介导多糖与蛋白及酚形成偶联物<sup>[28]</sup>,拐枣多糖倾向于以结合物的形式存在,是由拐枣的原料特性所决定,茶叶、洋甘菊、紫锥花、加拿大飞蓬等植物的多糖存在相似的情况<sup>[29]</sup>。

表 1 拐枣不同部位多糖的提取率及化学组成

Table 1 Yield and chemical composition of polysaccharides from different sources of *H. dulcis*

样品	得率/%	总糖/%	糖醛酸/%	蛋白质/%	总酚/%
HDPW	3.83 $\pm$ 1.46 <sup>a</sup>	30.98 $\pm$ 12.8 <sup>b</sup>	7.33 $\pm$ 0.56 <sup>b</sup>	9.21 $\pm$ 0.60 <sup>c</sup>	13.23 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>
HDPS	2.69 $\pm$ 0.92 <sup>a</sup>	32.10 $\pm$ 0.10 <sup>ab</sup>	13.75 $\pm$ 2.7 <sup>a</sup>	27.39 $\pm$ 0.66 <sup>a</sup>	8.02 $\pm$ 0.22 <sup>c</sup>
HDPP	3.00 $\pm$ 0.99 <sup>a</sup>	33.46 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	3.72 $\pm$ 1.0 <sup>b</sup>	13.78 $\pm$ 1.03 <sup>b</sup>	14.87 $\pm$ 0.52 <sup>a</sup>

注:同行肩标小写字母不同表示差异显著 ( $P < 0.05$ );下表同。表中数据均为质量分数。

### 2.2 分子量及单糖组成

采用高效凝胶排阻色谱测定了不同部位多糖的分

子量,如表 1 所示。三种多糖分子量的色谱峰均出现三个尖峰,三个分子峰分布范围分别为  $476.90 \times 10^4 \sim 865.25 \times 10^4$  u、 $12.53 \times 10^4 \sim 165.75 \times 10^4$  u、 $0.34 \times 10^4 \sim$



$45.72 \times 10^4$  u。HDPS 的中、低分子量值 ( $45.72 \times 10^4 \sim 165.75 \times 10^4$  u) 要高于 HDPW ( $0.34 \times 10^4 \sim 12.53 \times 10^4$  u) 和 HDPP ( $0.51 \times 10^4 \sim 21.26 \times 10^4$  u)。

$M_w/M_n$ , 为多分散性指数, 反映了聚合物摩尔质量分布的宽度。单分散聚合物的多分散性指数值为 1,

较高的  $M_w/M_n$  值表示较宽的摩尔质量分布<sup>[30]</sup>。其中 HDPW、HDPS、HDPP 峰 1~3 的  $M_w/M_n$  范围分布分别为 1.43~2.08、1.23~3.42 和 1.46~2.33。多分散性指数均高于 1, 但其数值较小, 说明拐枣多糖由多分散杂多糖组成, 分子质量分布广泛。

表 2 拐枣不同部位多糖的分子量 ( $M_w$ )、多分散性 ( $M_w/M_n$ ) 和单糖组成 (%)

Table 2 Monosaccharide composition and molar ratio of polysaccharides from different sources of *H. dulcis* (%)

项目	HDPW	HDPS	HDPP	
$M_w \times 10^4$ (u)	Peak1	476.90±6.22 <sup>b</sup>	832.35±7.28 <sup>a</sup>	865.25±33.73 <sup>a</sup>
	Peak2	12.53±0.59 <sup>b</sup>	165.75±6.29 <sup>a</sup>	21.26±0.70 <sup>b</sup>
	Peak3	0.34±0.03 <sup>b</sup>	45.72±1.54 <sup>a</sup>	0.51±0.06 <sup>b</sup>
$M_w/M_n$	Peak1	2.08±0.05 <sup>a</sup>	1.48±0.01 <sup>b</sup>	1.43±0.03 <sup>b</sup>
	Peak2	1.84±0.01 <sup>b</sup>	1.23±0.01 <sup>c</sup>	3.42±0.03 <sup>a</sup>
	Peak3	1.71±0.14 <sup>b</sup>	2.33±0.03 <sup>a</sup>	1.46±0.01 <sup>c</sup>
单糖组成及摩尔比	岩藻糖 (Fuc)	0.30±0.04 <sup>b</sup>	0.85±0.06 <sup>a</sup>	0.47±0.1 <sup>b</sup>
	鼠李糖 (Rha)	4.51±0.11 <sup>b</sup>	3.98±0.06 <sup>c</sup>	7.61±0.28 <sup>a</sup>
	阿拉伯糖 (Ara)	14.03±0.49 <sup>b</sup>	13.41±1.22 <sup>b</sup>	19.90±0.40 <sup>a</sup>
	半乳糖 (Gal)	22.85±0.74 <sup>c</sup>	40.65±2.06 <sup>a</sup>	35.32±0.32 <sup>b</sup>
	葡萄糖 (Glc)	51.66±0.87 <sup>a</sup>	12.00±0.48 <sup>c</sup>	30.77±0.85 <sup>b</sup>
	甘露糖 (Man)	4.53±0.69 <sup>b</sup>	24.16±0.79 <sup>a</sup>	3.04±0.44 <sup>b</sup>
	半乳糖醛酸 (GalA)	1.38±0.15 <sup>b</sup>	0.83±0.13 <sup>b</sup>	2.13±0.26 <sup>a</sup>
	葡萄糖醛酸 (GlcA)	0.77±0.35 <sup>b</sup>	4.14±0.56 <sup>a</sup>	0.78±0.42 <sup>b</sup>

根据离子色谱分析, 三种多糖均为非均一性多糖, 它们主要由岩藻糖、鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖、半乳糖醛酸和葡萄糖醛酸组成, 但是单糖组成摩尔比存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。HDPS 的主要单糖成分为半乳糖、甘露糖、阿拉伯糖, 而 HDPW 和 HDPP 的优势单糖为葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖, 但二者摩尔比不同, 分别为 51.66:22.85:14.03 和 30.77:35.32:19.90。在糖醛酸摩尔比方面, 三种多糖中 HDPS 的半乳糖醛酸和葡萄糖醛酸所占摩尔比值总和最高, 这与糖醛酸指示剂的测定结果趋势相同。

### 2.3 红外光谱

多糖的红外光谱如图 1 所示, 三种多糖的图谱未出现较多的个数变化及明显的位置偏移, 三种多糖均在 3 390、2 931、1 618、1 230  $\text{cm}^{-1}$  等处出现吸收峰。3 390  $\text{cm}^{-1}$  处的强吸收峰, 为多糖羟基的 O-H 伸缩震动, 2 931  $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰, 为多糖 C-H 伸缩震动引起, 1 230  $\text{cm}^{-1}$  处是硫酸基中 S=O 的伸缩震动吸收<sup>[31]</sup>。1 618  $\text{cm}^{-1}$  处的强峰为羧基 ( $\text{COO}^-$ ) 的特征峰, 表明含有糖醛酸<sup>[3]</sup>, 这与糖醛酸测定结果及单糖分析结果相一致。1 200~1 000  $\text{cm}^{-1}$  波数之间的强吸收峰处的谱带显示了 C-O-C 和 C-O-H 键的存在, 表明多糖内含有吡喃糖环<sup>[32]</sup>。1 399  $\text{cm}^{-1}$  处吸收峰是  $-\text{CH}_2$  的变形吸

收峰<sup>[33]</sup>。在 880  $\text{cm}^{-1}$  和 840  $\text{cm}^{-1}$  位置处的吸收峰出现了区别。880  $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰表明 HDPS 含有  $\beta$ -糖苷键连接的吡喃糖, 840  $\text{cm}^{-1}$  处的特征吸收峰表明 HDPP 和 HDPW 含有  $\alpha$ -糖苷键连接的吡喃糖<sup>[34]</sup>。

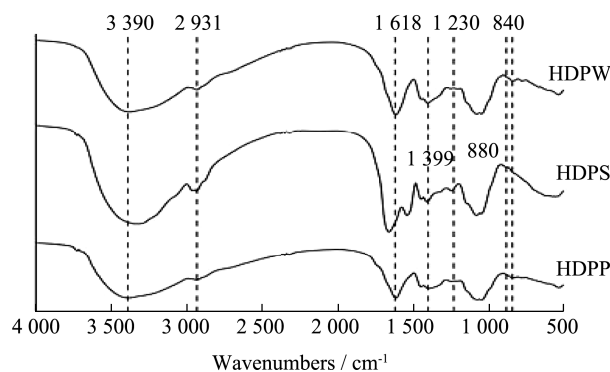


图 1 HDPW、HDPS 和 HDPP 的红外光谱图

Fig.1 FT-IR spectra of HDPW, HDPS and HDPP

### 2.4 抗氧化活性分析

氧化反应与许多疾病密切相关, 如糖尿病及其并发症的发生, 氧化应激能够启动一系列导致胰岛素抵抗和糖尿病的有害通路, 因此通过抗氧化治疗以减轻氧化应激对人体的损伤, 已成为防治糖尿病的有效途径之一。

三种多糖和 Vc 的 DPPH 自由基清除率如图 2a

所示。HDP 均对 DPPH 具有良好的清除能力，且清除效果与多糖的质量浓度呈剂量依赖关系。HDPW、HDPS、HDPP 对 DPPH 自由基的 IC<sub>50</sub> 值分别为 0.016、0.043 和 0.015 mg/mL ( $P < 0.05$ )，3 种拐枣多糖和 Vc 对 DPPH 自由基的清除能力由大到小依次为 Vc > HDPP > HDPW > HDPS。图 2b 为三种多糖对 ABTS<sup>+</sup> 自由基的清除效果。HDPW、HDPS、HDPP 均具有良好的 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除能力，随着拐枣多糖质量浓度增加，ABTS<sup>+</sup> 自由基清除能力均呈上升趋势。HDPW、HDPS、HDPP 和 Vc 对 ABTS<sup>+</sup> 自由基的 IC<sub>50</sub> 值分别为 0.47、1.21、0.49 和 0.10 mg/mL ( $P < 0.05$ )，其中 HDPW 的清除能力最强，但 HDP 都弱于 Vc 的清除能力。

植物多糖的抗氧化活性在很大程度上取决于化学组成、分子量以及分支的程度和大小<sup>[35,36]</sup>。多糖的分子量与其生物活性密切相关<sup>[33]</sup>，低分子量的多糖由于其末端具有较强的还原羟基，往往具有较强的抗氧化活性。从表 2 所示，HDPW、HDPP 的中低分子量低于 HDPS，这意味着分子量可能是影响 HDP 还原能力的因素之一。分子量大的高聚物结构紧凑，分子内氢键的作用更强。分子内氢键的强烈作用削弱了羟基的活性，可能限制了其羟基暴露的机会，这可能是其自由基清除活性降低的原因<sup>[37]</sup>。

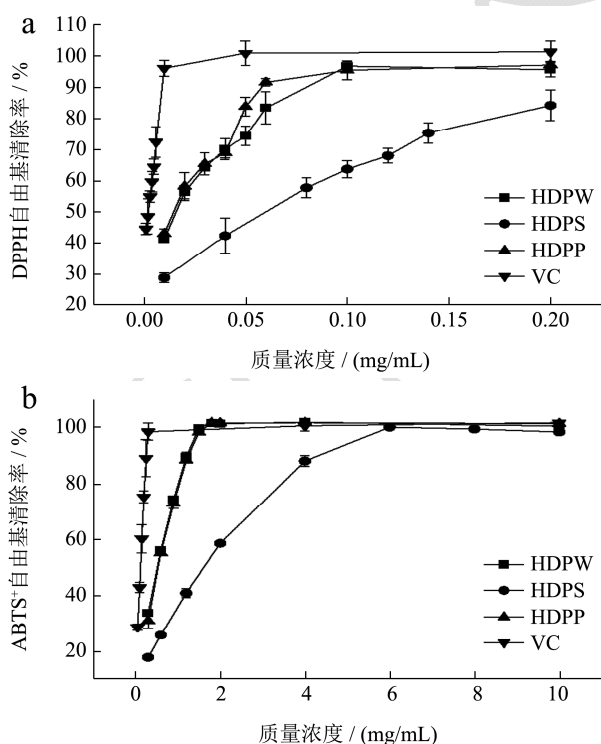


图 2 HDPW、HDPS 和 HDPP 对 DPPH 自由基 (a) 和 ABTS<sup>+</sup> 自由基 (b) 的清除能力

Fig.2 Scavenging activity of DPPH free radical (a) and ABTS<sup>+</sup> free radical (b) of HDPW, HDPS and HDPP

## 2.5 α-葡萄糖苷酶抑制活性

α-葡萄糖苷酶位于小肠中，可以将摄入的淀粉分解为葡萄糖使餐后血糖水平升高，因此，通过抑制 α-葡萄糖苷酶活性调节饮食后的血糖峰值是一个很好的策略。目前，α-葡萄糖苷酶抑制模型已被广泛用于评价药物体外降糖活性<sup>[21]</sup>。图 3 为不同质量浓度的 HDP 对 α-葡萄糖苷酶的抑制活性。HDP 在体外条件下对 α-葡萄糖苷酶具有的剂量依赖性抑制作用。多糖质量浓度为 10.0 mg/mL 时，HDPW、HDPS、HDPP 对 α-葡萄糖苷酶的抑制率最高，分别为 91.77%、51.36% 和 89.02%，IC<sub>50</sub> 值分别为 0.14、9.99 和 0.13 mg/mL，抑制能力从大到小为 HDPP > HDPW > HDPS，这可能是由于 HDPP 和 HDPW 的中低分子量较低。Xu 等<sup>[38]</sup>用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对黑加仑多糖进行了降解，获得了两种更低分子量的多糖，降解后的多糖比原多糖具有更佳的抗氧化、α-淀粉酶和 α-葡萄糖苷酶抑制活性，且分子量越低，活性越高。此外，红外光谱显示 HDPP 和 HDPW 中含有 α-糖苷键而 HDPS 中含有 β-糖苷键，前人研究表明，含有 α-糖苷键的多糖会显示出更好的生物活性，如南方红豆杉的抗肿瘤活性<sup>[39]</sup>，桑黄菌丝体的抗氧化及肿瘤抑制活性<sup>[40]</sup>。

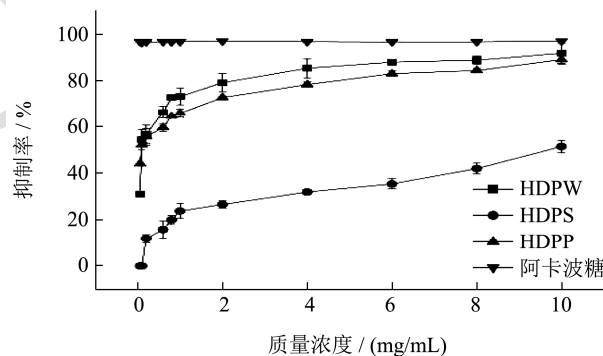


图 3 HDPW、HDPS 和 HDPP 对 α-葡萄糖苷酶的抑制效果

Fig.3 Inhibitory effects of HDPW, HDPS and HDPP on α-glucosidase

## 2.6 拐枣多糖样品对 HepG2 胰岛素抵抗细胞

### 葡萄糖摄取的测定

#### 2.6.1 拐枣多糖样品对 HepG2 细胞存活率的影响

采用 MTT 法检测多糖及盐酸二甲双胍对 HepG2 细胞存活率的影响，结果如图 4 所示。0.05~1 mg/mL 浓度下的多糖样品及二甲双胍均无细胞毒性，当 HDPW 和 HDPP 的质量浓度为 5 mg/mL 时，HepG2 存活率显著降低，分别为 18.57% 和 20.96%。而二甲

双胍组质量浓度为 1 mg/mL 时,细胞的存活率 83.88%,细胞存活率显著降低。因此分别选取 0.05、0.10、0.50 mg/mL 作为低、中、高剂量组进行后续实验。

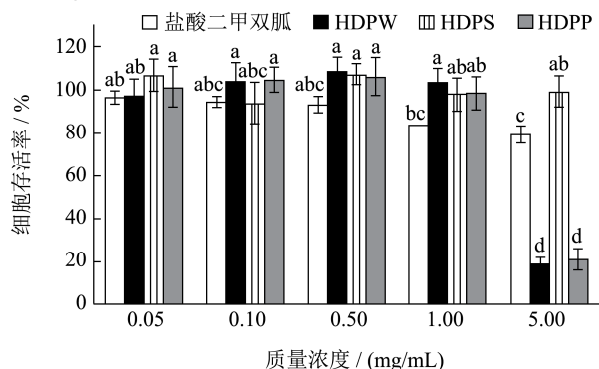


图 4 HDP 对 HepG2 细胞存活率的影响

Fig.4 Effects of HDP on the survival rate of HepG2 cells

### 2.6.2 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型 (IR-HepG2) 的建立

在胰岛素、胰岛素联合油酸、地塞米松的作用下, HepG2 的葡萄糖消耗率较空白组均发生显著降低,葡萄糖消耗率分别减少了 10.42%、7.64%及 14.41% (图 5)。其中地塞米松作为诱导剂时其葡萄糖消耗率降低效果最明显,因此选用地塞米松作为后续 IR-HepG2 细胞实验诱导剂。

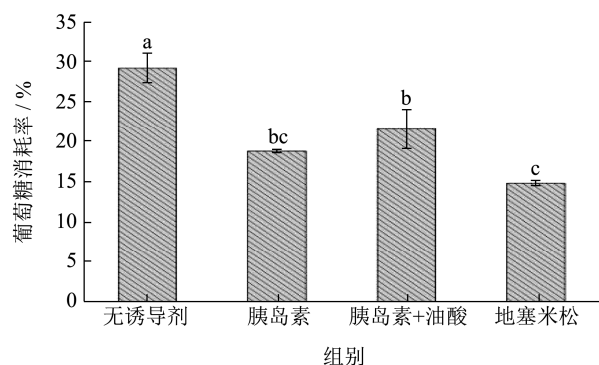


图 5 不同诱导剂诱导构建 IR-HepG2

Fig.5 Construction of IR-HepG2 induced by different inducers

### 2.6.3 葡萄糖消耗量测定

胰岛素抵抗是引发 II 型糖尿病的主要原因,肝细胞作为胰岛素作用的主要靶细胞,发生胰岛素抵抗后主要表现为葡萄糖利用率降低,由此引发空腹高血糖症状。HepG2 细胞具有与正常肝细胞相同的糖代谢功能,且更易培养,被广泛用于筛选糖尿病治疗药物。图 6 为多糖对胰岛素抵抗的治疗效果。加入多糖后,IR-HepG2 细胞葡萄糖吸收率较模型组有所提高。其中 HDPS 的胰岛素抵抗改善效果弱于 HDPW 和 HDPP,中高剂量组的 HDPW 和 HDPP 可显著提高 IR-HepG2 细胞的葡萄糖消耗率。在多糖质量浓度为 0.5 mg/mL 时, HDPW、HDPP 较模型组的葡萄糖吸收率可提高

7.52%、7.66%,但是 HDPS 较模型组没有显著的提高作用。各剂量组内的 HDPW 和 HDPP 的葡萄糖消耗促进能力没有显著性差异。这种降糖活性与它们的结构特征有关,低分子量的 HDPP 和 HDPW 具有较好的胰岛素抵抗改善能力,这可能是低分子量的多糖更容易进入细胞,更容易修复 IR-HepG2 细胞的表面损伤。

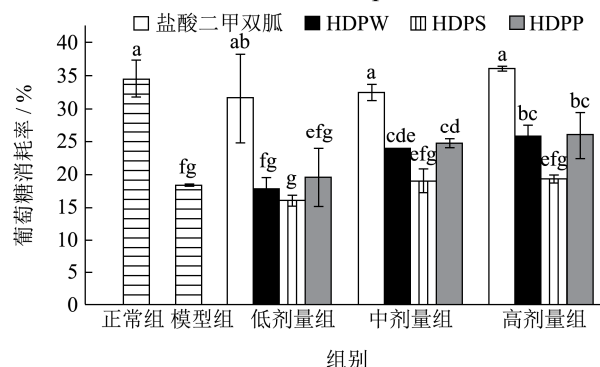


图 6 HDP 对 IR-HepG2 葡萄糖消耗率影响

Fig.6 Effect of HDP on glucose consumption rate of IR-HepG2

## 3 结论

本研究采用水提醇沉法制备了拐枣全果、籽及果梗三种部位的多糖, HDPW、HDPS、HDPP 得率分别为 3.83%、2.69%、3.00%。其中, HDPW 及 HDPP 具有  $\alpha$ -糖苷键结构,而 HDPS 具有  $\beta$ -糖苷键结构。HDPP 和 HDPW 的抗氧化、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性及胰岛素抵抗改善能力明显高于 HDPS。HDPW 具有最佳的 ABTS 清除活性,而在 DPPH 清除、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制及胰岛素抵抗改善能力方面, HDPW 和 HDPP 之间没有显著性差异。由于果梗与籽的分离较为繁琐,所以在工业上可以考虑进行全果综合利用。

## 参考文献

- [1] Hyun T K, Eom S H, Yu C Y, et al. Hoveni dulcis - An Asian traditional herb [J]. Plantamedica, 2010, 76(10): 943-949.
- [2] 汪名春. 枳椇肉质果梗多糖的分离纯化、结构分析及生物活性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2011: 30.
- [3] Liu W, Li F, Wang P, et al. Effects of drying methods on the physicochemical characteristics and bioactivities of polyphenolic-protein-polysaccharide conjugates from *Hovenia dulcis* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 148: 1211-1221.
- [4] Wu D T, Liu W, Xian M L, et al. Polyphenolic-protein-polysaccharide complexes from *Hovenia dulcis*: Insights into extraction methods on their physicochemical properties and *in vitro* bioactivities [J]. Foods, 2020, 9(4): 456.

- [5] Wu D T, He Y, Fu M X, et al. Changes in physicochemical and biological properties of polyphenolic-protein-polysaccharide ternary complexes from *Hovenia dulcis* after in vitro simulated saliva-gastrointestinal digestion [J]. *Foods*, 2021, 10(10): 2322.
- [6] 杨兵.拐枣多糖的分离纯化和结构解析及其降血糖活性研究[D].重庆:西南大学,2020:54,127.
- [7] Yang B, Wu Q, Luo Y, et al. High-pressure ultrasonic-assisted extraction of polysaccharides from *Hovenia dulcis*: Extraction, structure, antioxidant activity and hypoglycemic [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 137(8): 676-687.
- [8] Zhang T, Jayachandran M, Ganesan K, et al. Black truffle aqueous extract attenuates oxidative stress and inflammation in STZ-induced hyperglycemic rats via Nrf2 and NF- $\kappa$ B pathways [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2018, 9: 1257.
- [9] Ganesan K, Xu B. Anti-diabetic effects and mechanisms of dietary polysaccharides [J]. *Molecules*, 2019, 24(14): 2556.
- [10] 向进乐,杜琳,朱文学,等.枳椇果梗营养功能与加工利用[J].中国林副特产,2015,1:98-101.
- [11] Meng Y, Su A, Yuan S, et al. Evaluation of total flavonoids, myricetin, and quercetin from *Hovenia dulcis* Thunb. as inhibitors of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase [J]. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2016, 71(4): 1-6.
- [12] Yuan J, Chen S, Wang L, et al. Preparation of purified fractions for polysaccharides from *Monetaria moneta* Linnaeus and comparison their characteristics and antioxidant activities [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 108: 342-349.
- [13] 辛玥,宋萧萧,王玉箫,等.豇豆不同部位多糖结构特征及抗氧化性能比较[J].食品科学,2022,43(16):61-67.
- [14] Ying L, Mi B, Feng L B, et al. Effects of freeze drying and hot-air drying on the physicochemical properties and bioactivities of polysaccharides from *Lentinula edodes* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 145: 476-483.
- [15] Yang B, Wu Q, Luo Y, et al. Japanese grape (*Hovenia dulcis*) polysaccharides: New insight into extraction, characterization, rheological properties, and bioactivities [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 134: 631-644.
- [16] He M, Hao J, Feng C, et al. Anti-diabetic activity of a sulfated galactoarabinan with unique structural characteristics from *Cladophora oligoclada* (Chlorophyta) [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 278(2): 118933.
- [17] Peng J, Bi J, Yi J, et al. Characteristics of cell wall pectic polysaccharides affect textural properties of instant controlled pressure drop dried carrot chips derived from different tissue zone[J]. *Food Chemistry*, 2019, 293(SEP. 30): 358-367.
- [18] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1-2): 248-254.
- [19] Singleton V O R, Lamuela-raventos R M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent [J]. *Oxidants and Antioxidants*, 1999, 299: 152-178.
- [20] Zhou M, Bi J, Chen J, et al. Impact of pectin characteristics on lipid digestion under simulated gastrointestinal conditions: Comparison of water-soluble pectins extracted from different sources [J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 112: 106350.
- [21] Ren B, Chen C, Li C, et al. Optimization of microwave-assisted extraction of *Sargassum thunbergii* polysaccharides and its antioxidant and hypoglycemic activities [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 173: 192-201.
- [22] Wang Z, Zeng Y, Luo D. Structure elucidation of a non-branched and entangled heteropolysaccharide from *Tremella sanguinea* Peng and its antioxidant activity [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 152: 33-40.
- [23] Jeong J H, Jung H, Lee S R, et al. Anti-oxidant, anti-proliferative and anti-inflammatory activities of the extracts from black raspberry fruits and wine [J]. *Food Chemistry*, 2010, 123(2): 338-344.
- [24] Jia Y, Xue Z, Wang Y, et al. Chemical structure and inhibition on  $\alpha$ -glucosidase of polysaccharides from corn silk by fractional precipitation [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 252: 117185.
- [25] 马永强,韩焯,张凯,等.甜玉米芯多糖对胰岛素抵抗 HepG2 细胞糖代谢功能的影响[J].食品科学,2021,42(17):170-176.
- [26] Xiong R, Wang X L, Wu J M, et al. Polyphenols isolated from lychee seed inhibit Alzheimer's disease-associated Tau through improving insulin resistance via the IRS-1/PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  pathway [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2020, 251: 112548.
- [27] Yang B, Luo Y, Wu Q, et al. *Hovenia dulcis* polysaccharides: Influence of multi-frequency ultrasonic extraction on structure, functional properties, and biological activities [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 148: 1010-1020.
- [28] Zhang M, Wang F, Liu R, et al. Effects of superfine grinding on physicochemical and antioxidant properties of *Lycium*

- barbarum* polysaccharides [J]. LWT - Food Science and Technology, 2014, 58(2): 594-601.
- [29] Yang B, Luo Y, Sang Y, et al. Isolation, purification, structural characterization, and hypoglycemic activity assessment of polysaccharides from *Hovenia dulcis* (Guaizao) [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 208: 1106-1115.
- [30] Yang J S, Mu T H, Ma M M. Extraction, structure, and emulsifying properties of pectin from potato pulp [J]. Food Chemistry, 2018, 244: 197-205.
- [31] Sudharsan S, Subhapradha N, Seedeve P, et al. Antioxidant and anticoagulant activity of sulfated polysaccharide from *Gracilaria debilis* (forsskal) [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 81: 1031-1038.
- [32] Farhadi N. Structural elucidation of a water-soluble polysaccharide isolated from Balangushirazi (*Lallemantia royleana*) seeds [J]. Food Hydrocolloids, 2017, 72: 263-270.
- [33] 徐中香,胡浩,李季楠,等.青稞麸皮阿拉伯木聚糖的提取工艺优化及结构分析[J].食品科学,2018,39(8):191-197.
- [34] 郑岚,马耀宏,孟庆军,等.干巴菌菌丝体多糖的制备及其水解特性[J].食品科学,2019,40(14):312-322.
- [35] Ji X, Hou C, Yan Y, et al. Comparison of structural characterization and antioxidant activity of polysaccharides from jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) fruit [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 149: 1008-1018.
- [36] Li M, Li T, Hu X, et al. Structural, rheological properties and antioxidant activities of polysaccharides from mulberry fruits (*Morus alba* L.) based on different extraction techniques with superfine grinding pretreatment [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 183: 1774-1783.
- [37] Yang Y, Qiu Z, Li L, et al. Structural characterization and antioxidant activities of one neutral polysaccharide and three acid polysaccharides from *Ziziphus jujuba* cv. Hamidazao: A comparison [J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 261: 117879.
- [38] Xu Y, Niu X, Liu N, et al. Characterization, antioxidant and hypoglycemic activities of degraded polysaccharides from blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) fruits [J]. Food Chemistry, 2018, 243: 26-35.
- [39] Wu M, Zhang F, Yu Z, et al. Chemical characterization and *in vitro* antitumor activity of a single-component polysaccharide from *Taxus chinensis* var. *mairei* [J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 133: 294-301.
- [40] Yuan Q, Zhao L, Li Z, et al. Physicochemical analysis, structural elucidation and bioactivities of a high-molecular-weight polysaccharide from *Phellinus igniarius* mycelia [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 120: 1855-1864.