

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240328006

超声辅助提取刺梨果渣多糖及其 抗氧化活性的研究

朱嘉玺[#], 陈正豪[#], 李广将, 邱树毅, 罗 游, 宋昂芯^{*}

(贵州大学酿酒与食品工程学院, 贵阳 550025)

摘 要: **目的** 采用超声辅助提取刺梨果渣多糖(*Rosa roxburghii* tratt pomace polysaccharide, RRTP), 探究不同超声时间(30、45、90 min)对 RRTP 化学组成、官能团、分子量及抗氧化活性的影响。**方法** 通过高效凝胶排阻色谱、高效液相色谱、傅里叶红外光谱等方法探究超声对 RRTP 结构的影响。以还原力及自由基清除率为指标, 对 RRTP 的抗氧化活性进行研究。**结果** RRTP 是由葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、甘露糖、核糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖、岩藻糖组成的酸性多糖。相比传统热水提取, 超声对多糖的单糖组成及官能团的特征吸收无明显影响, 但可有效降解多糖高分子量的组分。短时间超声辅助提取(30 min、45 min)可提高 RRTP 对 DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, 2,2-联苯基-1-苦基肼基) 自由基、ABTS⁺ [2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate), 2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐] 自由基的清除能力以及对 Fe³⁺ 的还原能力, 这是由于分子量降低, 多糖分子中的游离羟基及还原端含量增加, 使得多糖抗氧化活性增强。但随着超声时间的增长(90 min), 多糖抗氧化活性不再上升, 可能是由于多糖的有序螺旋结构发生改变, 供氢能力减弱。**结论** 超声辅助提取工艺可有效提高多糖提取率, 短时间的超声辅助提取可通过降低多糖分子量从而提高其抗氧化活性。本研究可为超声辅助提取技术在刺梨果渣高值化利用中的应用提供理论参考。

关键词: 刺梨果渣; 多糖; 超声辅助提取; 结构特征; 抗氧化活性

Ultrasound-assisted extraction of *Rosa roxburghii* tratt pomace polysaccharide and its antioxidant activity

ZHU Jia-Xi[#], CHEN Zheng-Hao[#], LI Guang-Jiang, QIU Shu-Yi, LUO You, SONG Ang-Xin^{*}

(School of Liquor and Food Engineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

ABSTRACT: Objective To use ultrasound-assisted extraction to extract polysaccharides from *Rosa roxburghii* tratt pomace polysaccharide (RRTP), and investigate the influence of ultrasonic duration (30, 45 and 90 min) on

基金项目: 贵州省基础研究(自然科学)项目(黔科合基础-ZK[2023]一般 092)、贵州省基础研究(自然科学)项目(黔科合基础-ZK[2022]一般 086)、贵州大学大学生创新创业训练计划项目

Fund: Supported by the Guizhou Provincial Basic Research Program (Natural Science) [2023-092], the Guizhou Provincial Basic Research Program (Natural Science) [2022-086], and the Guizhou University College Student Innovation and Entrepreneurship Training Program

[#]朱嘉玺、陈正豪为共同第一作者

[#]ZHU Jia-Xi and CHEN Zheng-Hao are Co-first Authors

***通信作者:** 宋昂芯, 博士, 讲师, 主要研究方向为天然多糖结构鉴定及功能活性。E-mail: axsong@gzu.edu.cn

***Corresponding author:** SONG Ang-Xin, Ph.D, Lecture, School of Liquor and Food Engineering, Guizhou University, No.2708, Huaxi Road, Huaxi District, Guiyan 550025, China. E-mail: axsong@gzu.edu.cn

chemical composition, functional group, molecular weight and antioxidant activity of the polysaccharides.

Methods High-performance gel permeation chromatography, high-performance liquid chromatography and Fourier transform infrared spectroscopy were applied to illustrate the influence of ultrasound on RRTP structures. Antioxidant activity of RRTP was determined based on reducing ability and scavenging ability on free radicals.

Results RRTP was an acidic polysaccharide consisted of glucuronic acid, galacturonic acid, mannose, ribose, rhamnose, glucose, galactose, xylose, arabinose and fucose. Compared to the traditional hot water extraction, ultrasound-assisted extraction did not result in obvious changes in the monosaccharide composition and functional groups of RRTP, while it could effectively degrade the high-molecular weight fractions in RRTP. Ultrasound-assisted extraction with short duration (30 min, 45 min) improved the ability of RRTP to reduce Fe^{3+} and scavenge DPPH radical and ABTS^+ radical. This was because that the lower the molecular weight RRTP had, the more the free hydroxyl groups and reducing ends existed in RRTP, which contributed to the stronger antioxidant activity. However, with the extending of ultrasonic duration (90 min), antioxidant activity of RRTP did not continue to be enhanced. This was probably due to the changes in regular helical conformation of RRTP, thus resulting in the reduced hydrogen donor capability. **Conclusion** Ultrasound-assisted extraction is an efficient method to increase polysaccharide extraction yield. Ultrasound with short extraction duration can improve antioxidant activity of polysaccharide by lowering its molecular weight. This study will provide a theoretical reference for the application of ultrasound-assisted extraction in reutilization of *Rosa roxburghii* trutt pomace.

KEY WORDS: *Rosa roxburghii* trutt pomace; polysaccharide; ultrasound-assisted extraction; structural characterization; antioxidant activity

0 引言

刺梨(*Rosa roxburghii* trutt)又名文先果、送春归,是蔷薇科蔷薇属落叶灌木,原产于云贵高原,主要生长于我国西南地区,特别在贵州地区分布最为广泛。刺梨果实富含黄酮、多糖、维生素等营养物质,传统医学也用于治疗糖尿病、癌症、高血脂和高血压等,是一种典型的药食同源植物^[1]。随着现代药理学的发展,刺梨已被证实具有抗氧化、抗肿瘤、抗诱变及辐射防护等功效^[2-3]。作为贵州省特色大宗资源,截止 2022 年底,刺梨在贵州省种植规模达 1400 km²,刺梨果实年产量达 26.2 万 t^[4]。由于刺梨果实单宁含量较高,口味酸涩,通常不直接食用,大部分作为加工食品流向市场。刺梨果渣是刺梨加工过程中最主要的副产物,贵州省刺梨规模化加工企业每年可产刺梨果渣达 8.8 万 t。仅有少部分果渣经处理后用于肥料生产,多数果渣被工厂作为废弃物丢弃,易造成资源浪费及环境污染。因此对刺梨果渣中含有的生物活性物质进行研究分析,对刺梨果渣的高值化利用及市场开发具有重要作用。

多糖作为刺梨中重要的生物活性成分,具有抗氧化、降血糖等生理功效^[5-6],近年来受到越来越多的关注。本研究前期实验发现刺梨果渣中仍含有不少于 2% (w/w, 干重)的可溶性多糖,但目前有关刺梨果渣多糖(*Rosa roxburghii* trutt pomace polysaccharide, RRTP)的报道十分有限。周笑犁等^[7]研究表明 RRTP 具有抗氧化活性,且经发酵后其抗氧化活性显著提高。该课题组进一步发现 RRTP 可对淀粉

酶产生非竞争性可逆抑制,具有调控血糖的功效^[8]。上述研究表明刺梨果渣中的多糖具有与刺梨多糖类似的生理活性,但 RRTP 的基本结构特征目前未有报道,其结构特征与抗氧化活性之间的关联尚不清楚。本研究采用超声辅助提取 RRTP,对多糖的理化性质及结构特性进行表征,并进一步探究超声辅助提取对 RRTP 结构及其抗氧化活性的影响,以期对刺梨果渣的高值化利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

刺梨果渣,贵农 5 号刺梨果实经榨汁后的副产物,由贵州恒力源天然生物科技有限公司提供。

无水乙醇、浓硫酸、蒽酮、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);单糖标准品、糖醛酸标准品、牛血清蛋白(纯度 $\geq 98\%$,索莱宝生物科技有限公司);1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(5-methyl-2-phenyl-1,2-dihydropyrazol-3-one, PMP)、三氟乙酸(trifluoroacetic acid, TFA)(分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);溴化钾(色谱纯,纯度 $>99.5\%$,上海麦克林生化科技有限公司);葡聚糖标准品(色谱纯,纯度 $>95\%$,Sigma-Aldrich 公司)。

1.2 仪器与设备

FD-1C-50 冷冻干燥机(上海舜制仪器制造有限公司);ME104E 电子分析天平(0.0001 g,梅特勒-托利多仪器上海有限公司);Q2048R 高速冷冻离心机(大龙兴创实验仪器北

京股份有限公司); SCIENTZ-IID 超声波粉碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司); ReadMax 1900 光吸收全波长酶标仪(上海闪谱生物科技有限公司); Waters 1515 高效凝胶色谱系统、XBridgeTM C₁₈ 色谱柱、UltrasphereTM 120 (300 mm×7.8 mm, 6 m)、250 (300 mm×7.8 mm, 6 m)、2000 (300 mm×7.8 mm, 12 m) 凝胶色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 m)(美国 Waters 公司); Agilent 1260 Infinity II 高效液相系统(美国 Agilent 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 RRTP 的制备

根据 CHEN 等^[2]的方法, 略作修改。刺梨果渣冷冻干燥后粉碎, 过 100 目筛, 储存于真空干燥箱中备用。准确称取 20.0 g 刺梨果渣粉, 以蒸馏水为提取溶剂, 按固液比 1:20 (w/w) 进行超声辅助提取。超声条件为: 功率 400 W, 温度不超过 30℃, 不同超声时间(30、45、90 min)。超声结束后离心(8000 r/min, 15 min), 上清液经大孔树脂脱色后, 加入 5 倍体积无水乙醇过夜, 离心后(8000 r/min, 15 min)收集沉淀, 复溶于水, 透析(1000 Da), 冷冻干燥得到不同超声时间的 RRTP-US30、RRTP-US45、RRTP-US90。热水提取 RRTP 按固液比 1:20 (w/w), 在 98℃ 下水浴提取 4 h, 经上述相同醇沉、复溶于水、透析、冷冻干燥步骤后得到热水提取的 RRTP-HW。根据式(1)计算多糖提取物得率。

$$\text{多糖提取物得率}/\% = \frac{M}{M_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中, M 为冷冻干燥后 RRTP 提取物的质量, g; M_0 为刺梨果渣干粉质量, g。

1.3.2 RRTP 的化学组成及水分含量分析

采用蒽酮法以葡萄糖作为标准品, 在 620 nm 处测定样品吸光度, 对样品的总含糖量进行测定。采用 Bradford 法以牛血清蛋白作为标准品, 在 595 nm 处测定样品吸光度, 对样品的蛋白含量进行测定。参考 SUN 等^[9]的方法对样品的水分含量进行测定。精确称取一定量的多糖样品, 记录初始重量(M_1)。将此样品放置于 100℃ 烘箱进行干燥直至样品重量恒定, 记录恒定重量(M_2)。根据式(2)计算多糖样品的含水量。

$$\text{含水量}/\% = \frac{M_1 - M_2}{M_1} \times 100\% \quad (2)$$

1.3.3 RRTP 的分子量测定

采用高校凝胶排阻色谱法(high-performance gel permeation chromatography, HPGPC)对 RRTP 的分子量进行测定^[10]。将一定量多糖溶解于含 0.02% NaN₃ 的 NaNO₃ (0.1 mol/L) 溶液中, 过 0.22 μm 滤膜作为待测样品。色谱柱: UltrasphereTM 120、250、2000 串联, 柱温为 50℃, 流动相为含 0.02% NaN₃ 的 NaNO₃ (0.1 mol/L) 溶液, 流速为 0.6 mL/min。

1.3.4 RRTP 的单糖组分测定

采用 PMP 柱前衍生化高效液相色谱法(high-performance

liquid chromatography, HPLC)对多糖样品的单糖组分进行测定, 参考 FAN 等^[11]的方法, 略作修改。

(1)RRTP 的水解

将 3 mg 多糖样品置于 2 mL 离心管, 加入 1 mL 超纯水溶解, 移至 10 mL 安瓿瓶中, 加入 1 mL 4 mol/L 的 TFA, 混匀, 瓶口用酒精灯熔融, 拉丝密封。密封后的安瓿瓶置于干式恒温器中, 在 110℃ 下酸水解 6 h。酸解后的样品溶液加入 200 μL 甲醇用氮吹仪吹干, 重复 3 次以去除 TFA, 水解产物加入 1 mL 超纯水溶解, 得到多糖样品的水解液。

(2)RRTP 的 PMP 衍生化

取 450 μL 上述多糖水解液置于 5 mL 离心管中, 加入 450 μL 0.3 mol/L NaOH 溶液和 450 μL 0.5 mol/L PMP 甲醇溶液, 在 70℃ 下水浴加热 100 min。反应物冷却至室温后, 用 0.3 mol/L HCl 调节 pH 至中性。加入等体积的三氯甲烷进行萃取, 重复 3 次萃取以去除残留 PMP。收集上层水相, 过 0.22 μm 滤膜作为待测样品。

(3)HPLC 条件

XBridgeTM C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 m), 流速 1 mL/min。流动相 A 为 15% 乙腈的磷酸钾缓冲液(0.05 mol/L, pH 6.9), 流动相 B 为 40% 乙腈的磷酸钾缓冲液(0.05 mol/L, pH 6.9)。

1.3.5 RRTP 的红外光谱

参考 MAO 等^[12]的方法对多糖样品进行傅里叶红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR)扫描, 测定样品的官能团。取 200 mg 溴化钾粉末与 1 mg 多糖样品混合研磨, 研磨后的混合物用压片机压制成片, 在 4000~400 cm⁻¹ 频率范围内进行红外光谱扫描。

1.3.6 RRTP 的抗氧化活性

(1)还原力的测定

参考李珊等^[13]的方法对多糖样品的还原力进行测定。配制一系列不同质量浓度的多糖样品溶液(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 和 3.0 mg/mL), 取 1.0 mL 样品溶液加入 2.5 mL 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH=6.6)和 2.5 mL 1.0% (w/v) 铁氰化钾溶液, 涡旋振荡 10 s 混合均匀后在 50℃ 反应 30 min。反应物快速冷却后加入 2.5 mL 10% (w/v) 三氯乙酸终止反应, 离心后(3500 r/min, 10 min)取 2 mL 上清液与 0.4 mL 1% (w/v) 氯化铁(Fe³⁺)和 2.0 mL 蒸馏水混合, 涡旋振荡 10 s 混合均匀后在室温反应 10 min。以蒸馏水作为空白对照, 在 700 nm 处测定吸光度。以同浓度的维生素 C (vitamin C, VC) 作为阳性对照。

(2)DPPH 自由基清除率的测定

参考蒋文明等^[14]的方法对多糖样品 DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, 2,2-联苯基-1-苦基基) 自由基清除率进行测定。配制一系列不同质量浓度的多糖样品溶液(0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 和 1.2 mg/mL), 取 100 L 样品溶液加入 200 L 0.4 mmol/L DPPH 甲醇溶液, 涡旋振荡 10 s 混合均匀后避光反应 30 min, 在 517 nm 处测定样品吸

光度(A_s); 取 100 L 样品溶液加入 200 L 无水乙醇作为空白, 在 517 nm 处测定吸光度(A_b); 取 100 L 水加入 200 L 0.4 mmol/L DPPH 甲醇溶液作为对照, 在 517 nm 处测定吸光度(A_o)。以同浓度的 VC 作为阳性对照。DPPH 自由基清除率采用式(3)计算:

$$\text{DPPH 自由基清除率}/\% = [1 - \frac{A_s - A_b}{A_o}] \times 100\% \quad (3)$$

(3) ABTS⁺自由基清除率的测定

参考 KUT 等^[15]的方法对多糖样品 ABTS⁺ [2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate), 2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐] 自由基清除率进行测定。将 7 mmol/L ABTS 与 2.45 mmol/L K₂S₂O₈ 按 1:1 (V/V) 混合, 室温避光反应 12~16 h, 用水稀释 ABTS⁺ 自由基液至吸光度达到(0.7±0.02), 得到 ABTS⁺ 自由基溶液备用。配置一系列不同质量浓度的多糖样品溶液(0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 和 0.6 mg/mL), 取 50 L 样品溶液加入 200 L ABTS⁺ 自由基溶液, 涡旋振荡 10 s 混合均匀后避光反应 10 min, 在 734 nm 处测定样品吸光度(A_s'); 取 50 L 水加入 200 L ABTS⁺ 自由基溶液作为空白, 在 517 nm 处测定吸光度(A_b'); 取 50 L 水加入 200 L ABTS⁺ 自由基溶液作为对照, 在 517 nm 处测定吸光度(A_o')。以同浓度的 VC 作为阳性对照。ABTS⁺ 自由基清除率采用式(4)计算:

$$\text{ABTS}^+ \text{ 自由基清除率}/\% = [1 - \frac{A_s' - A_b'}{A_o'}] \times 100\% \quad (4)$$

1.4 数据处理

每组实验重复测定 3 次, 采用 Excel 16.0 及 Origin 10.0 处理数据及作图。

2 结果与分析

2.1 RRTP 的得率、化学组成及其水分含量

RRTP-HW、RRTP-US30、RRTP-US45、RRTP-US90 的得率分别为 2.22%、3.00%、3.70%、3.70%。该结果表明相对热水提取, 超声可显著提高 RRTP 的得率, 其原因是由于热水提取时, 高温无法使得刺梨果渣所含的多糖完全释放, 而超声过程中空化效应产生的高强度剪切力可有效破坏刺梨果渣细胞壁^[16], 使多糖有效释放, 同时超声可增加活性成分在溶液中的溶解^[17]。随着超声时间的增长多糖得率增加, 但当提取时间超过 45 min 后, 多糖得率不再升高, 这可能是因为随着提取时间的延长, 多糖逐步释放并充分溶解到溶质中, 超过一定时间后, 多糖全部释放且不再溶出, 使得多糖得率不再增加^[18]。该结果与文献中采用超声辅助提取菌类多糖的结果一致^[18-19]。由表 1 可知, RRTP-HW 总含糖量最高, 为 77.18%, RRTP-US 样品的总含糖量在 60%以上, 这可能由于超声过程中超声探头的核心温度较高, 导致探头周围部分糖类与蛋白质发生美拉德

反应, 使得总糖含量降低^[20-21]。RRTP-HW 的蛋白含量最低, 为 8.17%, 随着超声时间的延长, RRTP-US 样品中的蛋白含量由 10.33%增加到 15.00%。蛋白含量的增多可能也是导致总糖相对含量降低的原因之一。RRTP 中蛋白含量的增加可能是由于超声导致蛋白质分子的结构和分子量发生改变, 进而提高蛋白质的溶解度, 使得提取液中蛋白质含量增加。此外, RRTP 分子量较高且糖含量远多于蛋白含量, 多糖在醇沉过程中可将蛋白分子包裹在多糖分子内形成较为紧密的聚合体, 而超声过程中空化效应产生的高强度剪切力使得多糖分子量降低(与 2.3 中分子量结果一致), 同时多糖溶液黏度下降, 使得醇沉时多糖分子对蛋白分子的包裹减少, 可检测到的游离蛋白增多^[22]。这与 MAO 等^[12]采用超声降解虫草胞外多糖的结果一致。RRTP-HW 的水分含量为 10.93%, 与 RRTP-HW 相比, RRTP-US 样品中的水分含量显著减少。这可能是由于超声会使得多糖分子之间形成更加致密的结构^[23], 水分子难以进入此结构内部, 从而导致水分含量减少。

表 1 RRTP 的糖含量、蛋白含量及水分含量
Table 1 Total sugar content and protein content of RRTP

样品	总糖含量/%	蛋白含量/%	水分含量/%
RRTP-HW	77.18±3.21 ^a	8.17±0.49 ^b	10.93±0.74 ^a
RRTP-US30	69.23±0.39 ^b	10.33±4.24 ^{ab}	6.42±1.58 ^b
RRTP-US45	63.99±4.81 ^c	11.38±4.38 ^{ab}	6.36±0.70 ^b
RRTP-US90	74.97±0.26 ^a	15.00±5.22 ^a	7.02±1.05 ^b

注: a,b,c 表示差异显著, $P < 0.05$, $n = 3$ 。

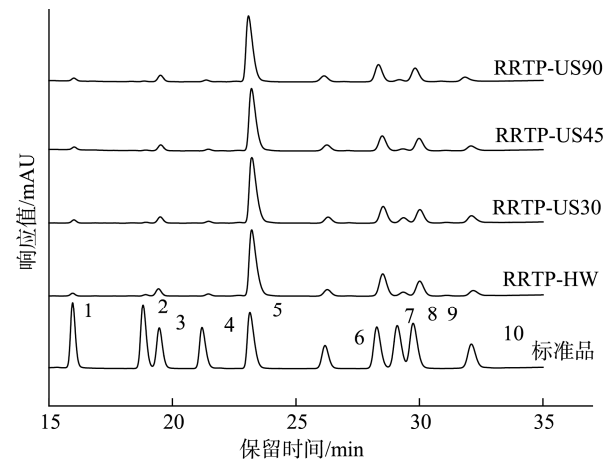
2.2 RRTP 的单糖组成

图 1 为单糖与糖醛酸混合标准品及 RRTP 的 HPLC 色谱图, 多糖的单糖组成及摩尔比列于表 2。由表 2 可知, RRTP-HW、RRTP-US30、RRTP-US45 和 RRTP-US90 均是由 2 种糖醛酸及 8 种中心单糖组成的酸性杂多糖, 分别为葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸和甘露糖、核糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖、岩藻糖。4 种 RRTP 的单糖比例存在差异, 但其摩尔占比趋势基本一致。其中, 半乳糖醛酸含量最高, 其摩尔百分比为 50%左右, 其次为半乳糖(约为 13%~16%)、阿拉伯糖(约为 11%)、鼠李糖(约为 5%)和岩藻糖(约为 3%~5%), 其余单糖组分占比均低于 5%。该结果表明, 超声辅助提取对多糖的单糖组成无明显影响。与 CHEN 等^[2]超声辅助提取的刺梨多糖(主要由葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸 2 种糖醛酸及甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖和木糖 6 种单糖组成)相比, RRTP 的单糖组成更为复杂, 且 RRTP 的糖醛酸占比远高于刺梨多糖(13.51%)。

2.3 RRTP 的分子量

图 2 为 RRTP 的分子量分布图, 多糖的平均分子量及其占比见表 3。RRTP-HW、RRTP-US30、RRTP-US45 和

RRTP-US90 均含有两个不同分子量的多糖组分。组分 1 随着超声时间的增长, 分子量大约从 10^5 Da 降低至 10^4 Da, 其占比由 98.90%降低至 42.16%。组分 2 的分子量大约为 10^3 Da, 其占比随着超声时间的增加从 1.10%上升至 57.84%。该结果表明相对热水提取, 超声可在提取过程中有效降低多糖的分子量。超声过程中产生的空化效应会带来高强度剪切力, 使得多糖链断裂从而降低多糖分子量^[24]。随着超声时间增加, 组分 2 的占比在逐渐增加, 但组分 2 分子量没有明显降低。这说明尽管超声可有效降解高分子量多糖, 但对低分子量多糖没有显著降解效果。这与 SHI 等^[25]采用超声降解豆腐柴多糖结果一致, 随着豆腐柴多糖分子量大约从 10^5 Da 降低至 10^4 Da 后, 超声的降解效果趋于平缓。



注: 标准品为1. 甘露糖; 2. 核糖; 3. 鼠李糖; 4. 葡萄糖醛酸; 5. 半乳糖醛酸; 6. 葡萄糖; 7. 半乳糖; 8. 木糖; 9. 阿拉伯糖; 10. 岩藻糖。

图1 RRTP的HPLC色谱图
Fig.1 HPLC spectras of RRTP

表 2 RRTP 的单糖组成(%) Table 2 Monosaccharide composition of RRTP (%)				
单糖组成	RRTP-HW	RRTP-US30	RRTP-US45	RRTP-US90
甘露糖	2.13	2.53	2.45	2.42
核糖	1.06	0.68	0.56	0.52
鼠李糖	5.42	4.85	5.19	5.40
葡萄糖醛酸	1.55	1.41	1.42	1.41
半乳糖醛酸	49.98	52.43	55.16	54.67
葡萄糖	4.92	4.76	5.22	4.91
半乳糖	16.80	13.13	13.22	14.20
木糖	2.97	4.23	1.75	1.70
阿拉伯糖	11.26	10.57	10.97	11.24
岩藻糖	3.90	5.42	4.05	3.53

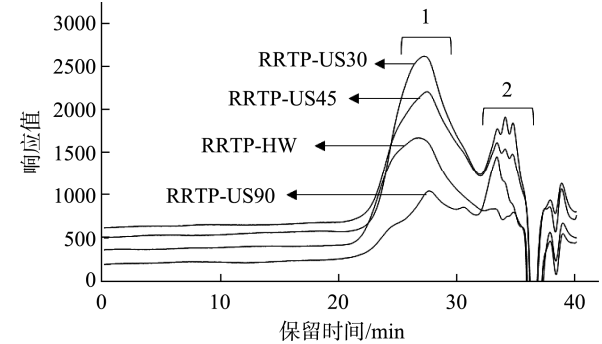


图2 RRTP的HPGPG谱图
Fig.2 HPGPG spectra of RRTP

表 3 RRTP 的分子量 Table 3 Molecular weight of RRTP			
	保留时间/min	重均分子量/Da	百分比/%
RRTP-HW	26.677	1.427×10^5	98.90
	34.373	1.063×10^3	1.10
RRTP-US30	27.158	1.051×10^5	60.54
	33.976	1.369×10^3	39.46
RRTP-US45	27.369	9.188×10^4	58.82
	33.964	1.379×10^3	41.18
RRTP-US90	27.548	8.199×10^4	42.16
	33.568	1.775×10^3	57.84

2.4 RRTP 的红外分析

由图 3 可知, 不同方法提取的 4 种 RRTP 红外吸收峰非常相似, 主要差异为吸收峰的强弱。3428 cm^{-1} 附近出现由于 O-H 伸缩振动产生的宽峰, 表明多糖分子间及分子内存在氢键。2930 cm^{-1} 附近为 C-H 伸缩振动产生的较弱吸收峰。1740 cm^{-1} 和 1620 cm^{-1} 附近均有明显的吸收峰, 这归因于 C=O 双键分别在甲酯化羧基(COOR)中的伸缩振动

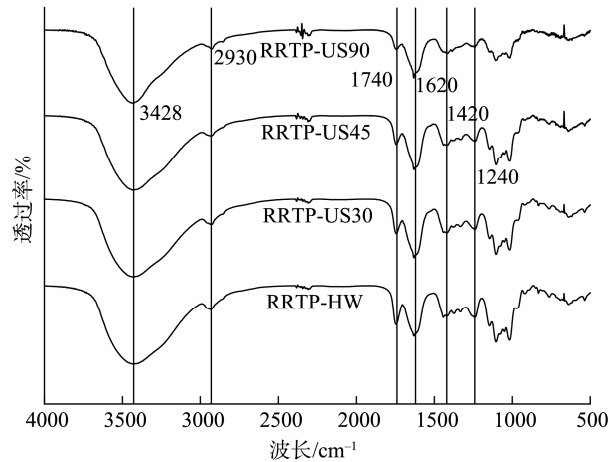


图3 RRTP的FT-IR谱图
Fig.3 FT-IR spectras of RRTP

和游离羧基(COOH)中的不对称伸缩振动^[26],可推测 4 种多糖均含糖醛酸,与单糖组成的结果一致,并且 4 种多糖的羧基均表现出部分甲酯化。以上特征表明 4 种多糖都具有酸性多糖的特征吸收峰,且超声对多糖的特征官能团无明显破坏及影响。 1420 cm^{-1} 和 1240 cm^{-1} 附近出现的吸收峰分别是由 C-H 的弯曲振动和 O-H 键的变形振动产生。在 $1200\sim 1000\text{ cm}^{-1}$ 指纹图谱区的复杂峰形与吡喃环的环振动及 C-O-C、C-O-H 的伸缩振动有关^[27-28]。

2.5 RRTP 的抗氧化分析

三价铁离子可被抗氧化剂提供的电子还原成二价铁离子,在 700 nm 有特征吸收峰,可用来测定抗氧化剂的还原能力。由图 4A 可知,4 种 RRTP 的还原能力存在明显剂量依赖关系,即随着多糖质量浓度升高,还原能力增强,当质量浓度达到 3.0 mg/mL 时,各多糖组分还原能力均达到最强,但由于多糖在水溶液中的溶解度,无法测得 4 种多糖还原能力的最大值。同时,超声辅助提取的 RRTP 还原能力高于热水提取的多糖,但低于 VC,其还原能力的强弱依次为 $\text{VC} > \text{RRTP-US90/RRTP-US45} > \text{RRTP-US30} > \text{RRTP-HW}$ 。在多糖质量浓度为 1.5 mg/mL 时,4 种 RRTP 还原能力均远高于付阳洋等^[29]采用热水提取的无籽刺梨多糖($\text{OD}_{700}=0.185$)。当多糖质量浓度为 1.0 mg/mL 时,RRTP-US90 和 RRTP-US45 还原能力与唐健波等^[30]超声辅

助提取的刺梨多糖还原力相似。此结果表明 RRTP 具有良好还原能力。

DPPH 自由基在溶液中呈现深紫色,当与清除剂结合时,由深紫色逐渐变浅至黄色,在 517 nm 处的吸光值减小,可以用于反映清除剂的自由基清除能力。RRTP 的 DPPH 自由基清除能力随着多糖浓度增加而增强(图 4B),表现出明显的剂量依赖关系。RRTP-US90 和 RRTP-US45 的质量浓度升高到 $0.8\sim 1.2\text{ mg/mL}$ 时,其清除率维持不变,且与 VC 的清除能力(91%)基本保持一致。RRTP-US30 和 RRTP-HW 的质量浓度分别达到 1.0 mg/mL 与 1.2 mg/mL 时,可基本达到与 VC 自由基清除率相当。RRTP 的 DPPH 自由基清除能力的强弱依次为 $\text{RRTP-US90/RRTP-US45} > \text{RRTP-US30} > \text{RRTP-HW}$ 。ABTS⁺自由基溶液呈现绿色,在 734 nm 处有特征吸收峰,当与清除剂结合时,整个体系颜色变淡,也可用于表征清除剂的自由基清除能力。与 DPPH 自由基清除结果类似,RRTP 的 ABTS⁺自由基清除率具有剂量依赖关系(图 4C),且当多糖浓度升高到一定量时,4 种多糖的清除能力可基本达到与 VC 一致,分别为 0.30 mg/mL (RRTP-US90 和 RRTP-US45)、 0.4 mg/mL (RRTP-US30)和 0.6 mg/mL (RRTP-HW)。RRTP ABTS⁺自由基清除能力的强弱依次为 $\text{RRTP-US90/RRTP-US45} > \text{RRTP-US30} > \text{RRTP-HW}$ 。

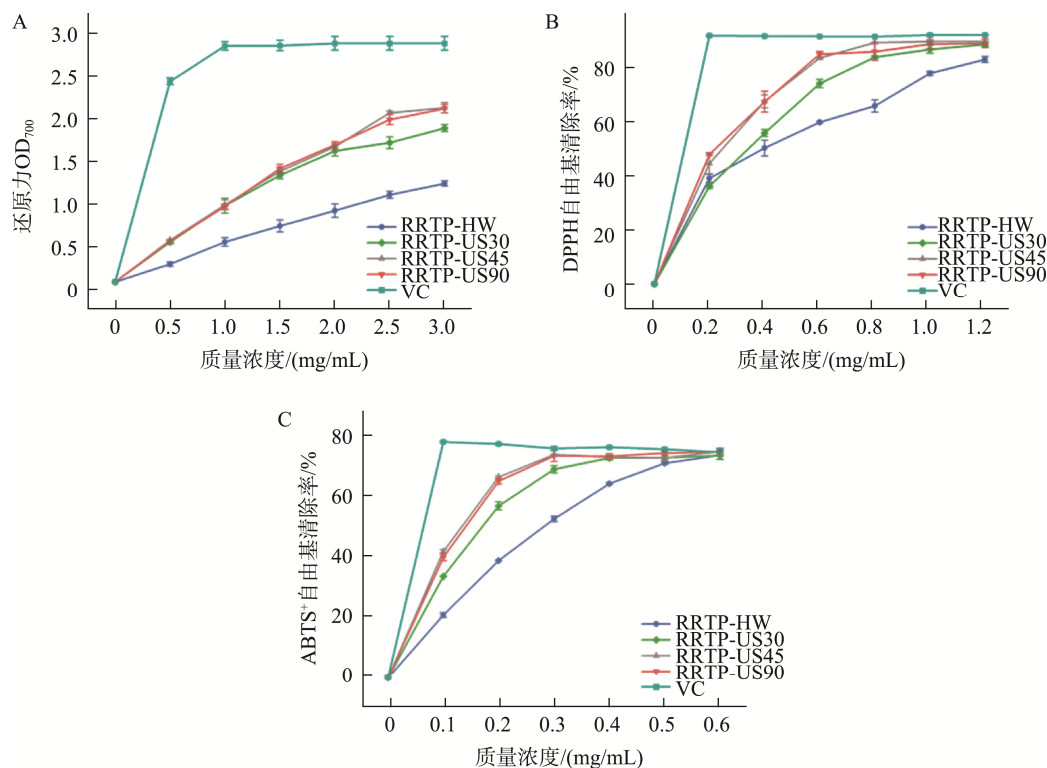


图4 RRTP的抗氧化活性

Fig.4 Antioxidant activity of *Rosa roxburghii* pomace polysaccharides

上述结果表明 RRTP 具有良好抗氧化能力, 同时, 超声辅助提取的 3 个多糖组分的抗氧化能力高于热水提取的多糖组分, 其能力强弱依次为 RRTP-US90>RRTP-US45>RRTP-US30>RRTP-HW。这是由于超声辅助提取的 RRTP 分子量较低, 分子内氢键作用温和, 存在较多的游离羟基^[31], 此外, 在相同质量浓度时, 分子量低的多糖溶液中还原端含量较多^[32], 导致整个溶液中多糖分子的供氢能力增强, 抗氧化能力增强。ZHAO 等^[33]研究也表明相对于分子量较高的甘露聚糖, 分子量较低的甘露聚糖具有更高的 DPPH 自由基和羟基自由基清除率, 具备更好的抗氧化能力。但超声时间增长, 会导致多糖的有序螺旋结构断裂^[34], 而无规则结构增多^[35], 致使多糖供氢能力减弱。因此, 尽管 RRTP-US90 低分子量组分的占比高于 RRTP-US45, 但 RRTP-US90 的还原能力及其对 DPPH 自由基和 ABTS⁺自由基的清除率与 RRTP-US45 基本相同。由此可见, 适当的超声时间可提高多糖抗氧化能力。比较 3 种抗氧化能力, 不同方法提取的 RRTP 对不同基团的作用强弱顺序为 DPPH 自由基清除能力>ABTS⁺自由基清除能力>Fe³⁺的还原能力。Fe³⁺的还原主要依靠还原剂电子的转移, DPPH 自由基的清除主要通过抗氧化剂提供氢, 而 ABTS⁺自由基的清除可通过电子转移也可通过氢转移实现^[36-37]。RRTP 既可作为电子供体也可作为氢供体, 但作为抗氧化剂时, 多糖分子的供氢能力可能更强并更趋向于作为氢供体, 使得其对 DPPH 自由基清除能力最强而对 Fe³⁺的还原能力最弱。

3 讨论与结论

本研究采用超声辅助从刺梨果渣中提取得到不同超声时间下的 3 个多糖组分 RRTP-US30、RRTP-US45 和 RRTP-US90, 与传统热水提取的多糖组分 RRTP-HW 相比, 短时间超声辅助可显著提高多糖的得率, 随着超声时间的延长, 多糖得率趋于平衡。HPLC 与 FT-IR 结果显示 4 个多糖组分的单糖组成及特征吸收峰相似, 仅在单糖和糖醛酸含量上存在差异。分子量结果显示, 随着超声时间的延长, 多糖高分子量组分的分子量显著降低, 且低分子量组分的占比逐渐增多, 但低分子量组分的分子量没有显著改变。上述结果表明超声对多糖的单糖结构及特征结构几乎没有影响, 同时, 超声可有效降解高分子量的多糖组分, 但对低分子量多糖组分没有降解效果。根据 3 个抗氧化能力参数分析发现, 超声辅助提取的多糖组分抗氧化性能优于热水提取的多糖组分, 其抗氧化能力强弱顺序为 RRTP-US90>RRTP-US45>RRTP-US30>RRTP-HW, 造成该现象的原因主要由于超声可使多糖分子量的降低, 多糖分子内游离羟基及还原端含量增多, 多糖供氢能力增加, 抗氧化能力增强。综上所述, 本研究对超声辅助及热水提取的 RRTP 结构进行初步表征, 探究了两种提取方法及不同超声时间下多糖结构及抗氧化性的差异, 为刺梨果渣的高

值化利用提高参考, RRTP 结构及其抗氧化活性间的关联及机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] LI H, FANG W, WANG Z, *et al.* Physicochemical, biological properties, and flavour profile of *Rosaroxburghiitratt*, *Pyracantha fortuneana*, and *Rosa laevigata* Michx fruits: A comprehensive review [J]. Food Chem, 2022, 366: 130509.
- [2] CHEN G, KAN J. Ultrasound-assisted extraction, characterization, and antioxidant activity *in vitro* and *in vivo* of polysaccharides from *Chestnut rose* (*Rosa roxburghii* tratt) fruit [J]. J Food Sci Technol, 2018, 55(3): 1083–1092.
- [3] WANG LT, LV MJ, AN JY, *et al.* Botanical characteristics, phytochemistry and related biological activities of *Rosa roxburghiitratt* fruit, and its potential use in functional foods: A review [J]. Food Funct, 2021, 12(4): 1432–1451.
- [4] 牛涛. 刺梨果渣综合利用研究进展[J]. 现代园艺, 2023, 46(12): 19–20, 23. NIU T. Research progress on comprehensive utilization of *Rosa roxburghiitratt* pomace [J]. Contemp Hortic, 2023, 46(12): 19–20, 23.
- [5] WANG L, CHEN C, ZHANG B, *et al.* Structural characterization of a novel acidic polysaccharide from *Rosa roxburghii* tratt fruit and its α -glucosidase inhibitory activity [J]. Food Funct, 2018, 9(7): 3974–3985.
- [6] CHEN G, KAN J. Characterization of a novel polysaccharide isolated from *Rosa roxburghiitratt* fruit and assessment of its antioxidant *in vitro* and *in vivo* [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 107: 166–174.
- [7] 周笑犁, 卢颖, 朱坤珑. 刺梨果渣多糖的发酵制备工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(14): 24–29. ZHOU XL, LU Y, ZHU KL, *et al.* Optimization of polysaccharide from *Rosa roxburghii* tratt pomace by fermentation and its antioxidant activity [J]. Food Res Dev, 2019, 40(14): 24–29.
- [8] 周笑犁, 阳桥美, 孔艳秋, 等. 刺梨果渣多糖对 α -淀粉酶活性的抑制作用[J]. 食品科技, 2020, 45(10): 207–212. ZHOU X, YANG QM, KONG YQ, *et al.* Inhibitory effect of polysaccharides from *Rosa roxburghiitratt* on activity of α -amylase [J]. Food Sci Technol, 2020, 45(10): 207–212.
- [9] SUN J, WEI Z, XUE C. Preparation and characterization of multifunctional films based on pectin and carboxymethyl chitosan: Forming microchambers for high-moisture fruit preservation [J]. Food Packaging Shelf, 2023, 37: 101073.
- [10] SONG AX, LI L, YIN JY, *et al.* Mechanistic insights into the structure-dependant and strain-specific utilization of wheat arabinoxylan by *Bifidobacterium longum* [J]. Carbohydr Polym, 2020, 249: 116886.
- [11] FAN H, SUN M, LI J, *et al.* Structure characterization and immunomodulatory activity of a polysaccharide from *Saposhnikovia radix* [J]. Int J Biol Macromol, 2023, 233: 123502.
- [12] MAO YH, SONG AX, LI LQ, *et al.* A high-molecular weight exopolysaccharide from the Cs-HK1 fungus: Ultrasonic degradation, characterization and *in vitro* fecal fermentation [J]. Carbohydr Polym, 2020, 246: 116636.
- [13] 李珊, 梁俭, 冯彬, 等. 番石榴多糖的提取工艺优化、纯化及其抗氧化活性测试[J]. 粮食与油脂, 2020, 33(7): 68–73. LI S, LIANG J, FENG B, *et al.* Extraction process optimization, purification and antioxidant activity test of guava polysaccharides [J]. Cere Oils, 2020, 33(7): 68–73.
- [14] 蒋文明, 周石洋. 海棠果多糖提取、结构表征以及生物活性研究[J]. 中国食品添加剂, 2023, 34(7): 81–89. JIANG WM, ZHOU SY. Extraction, structure characterization and

- biological activity of polysaccharides from *Malus prunifolia* [J]. China Food Addit, 2023, 34(7): 81–89.
- [15] KUT K, BARTOSZ G, SOSZUNSKI M, *et al.* Antioxidant properties of hispidulin [J]. Nat Prod Res, 2022, 36(24): 6401–6404.
- [16] HAN CP, LIU QG, JING YQ, *et al.* Ultrasound-assisted aqueous enzymatic extraction of corn germ oil: Analysis of quality and antioxidant activity [J]. J Oleo Sci, 2018, 67(6): 745–754.
- [17] ZHANG ZF, LV GY, HE WQ, *et al.* Effects of extraction methods on the antioxidant activities of polysaccharides obtained from *Flammulina velutipes* [J]. Carbohydr Polym, 2013, 98(2): 1524–1531.
- [18] 苗晶园, 董嘉木, 刘树民, 等. 黑皮鸡枞菌多糖超声辅助提取条件优化及抗氧化活性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(12): 109–116.
- [19] MIAO JN, DONG JM, LIU SM, *et al.* Ultrasonic-assisted extraction condition optimization and antioxidant activity of polysaccharides from *Oudemansiella raphanipes* [J]. J Food Saf Qual, 2023, 14(12): 109–116.
- [19] 吴杨洋, 周妍汝, 刘春燕, 等. 灵芝多糖提取工艺优化及抗氧化活性的研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(14): 4636–4642.
- WU YY, ZHOU YR, LIU CY, *et al.* Study on the optimization of extraction technology and antioxidant activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharides [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(14): 4636–4642.
- [20] VITURAT S, THONGNGAM M, LUMDUBWONG N, *et al.* Ultrasound-assisted formation of chitosan-glucose Maillard reaction products to fabricate nanoparticles with enhanced antioxidant activity [J]. Ultrason Sonochem, 2023, 97: 106466.
- [21] LI K, WANG J, ZHAO P, *et al.* Effect of ultrasound-assisted Maillard reaction on glycosylation of goat whey protein: Structure and functional properties [J]. Food Chem, 2024, 441: 138292.
- [22] SONG AX, MAO YH, SIU KC, *et al.* Bifidogenic effects of *Cordyceps sinensis* fungal exopolysaccharide and konjac glucomannan after ultrasound and acid degradation [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 111: 587–594.
- [23] WANG N, WU L, YANG J, *et al.* Lotus starch/bamboo shoot polysaccharide composite system treated via ultrasound: Pasting, gelling properties and multiscale structure [J]. Food Res Int, 2023, 174(1): 113605.
- [24] CUI R, ZHU F. Ultrasound modified polysaccharides: a review of structure, physicochemical properties, biological activities and food applications [J]. Trends Food Sci Tech, 2021, 107: 491–508.
- [25] SHI Q, ZOU MY, WANG JH, *et al.* Ultrasonic effects on molecular weight degradation, physicochemical and rheological properties of pectin extracted from *Premna microphylla* Turcz [J]. Int J Biol Macromol, 2022, 221: 1065–1076.
- [26] RANG YF, LIU H, CHENG XB, *et al.* Structural characterization of pectic polysaccharides from *Amaranth caudatus* leaves and the promotion effect on hippocampal glucagon-like peptide-1 level [J]. Int J Biol Macromol, 2023, 242(4): 124967.
- [27] YNAG Y, LEI ZX, ZHAO MM, *et al.* Microwave-assisted extraction of an acidic polysaccharide from *Ribes nigrum* L.: Structural characteristics and biological activities [J]. Ind Crop Prod, 2020, 147: 112249.
- [28] 金桂勇, 王云龙, 周当男, 等. 蓝莓果渣多糖的提取分离及抗氧化活性研究[J]. 中国食品添加剂, 2023, 34(7): 18–26.
- JIN GY, WANG YL, ZHOU DN, *et al.* Extraction, purification, structure characterization of polysaccharide from blueberry pomace and its antioxidant activity [J]. China Food Addit, 2023, 34(7): 18–26.
- [29] 付阳洋, 杨敏, 杨陆扬, 等. 响应面优化无籽刺梨多糖提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 食品与发酵科技, 2021, 57(2): 66–72.
- FU YY, YANG M, YANG LY, *et al.* Optimization of extraction process by response surface methodology and antioxidant activity of *Rose sterilis* S.D.Shi polysaccharides [J]. Food Ferment Technol, 2021, 57(2): 66–72.
- [30] 唐健波, 刘嘉, 刘辉, 等. 不同提取方法刺梨多糖抗氧化活性研究[J]. 农业科技与信息, 2016, 28: 51–52.
- TANG JB, LIU J, LIU H, *et al.* Antioxidant activity of *Rosa roxburghii* polysaccharides by different extraction methods [J]. Agric Sci Technol Inf, 2016, 28: 51–52.
- [31] XING RG, LIU S, YU HH, *et al.* Preparation of low-molecular-weight and high-sulfate-content chitosans under microwave radiation and their potential antioxidant activity *in vitro* [J]. Carbohydr Res, 2004, 339(15): 2515–2519.
- [32] QI HM, ZHAO TT, ZHANG QB, *et al.* Antioxidant activity of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* Kjellm (Chlorophyta) [J]. J Appl Phycol, 2005, 17(6): 527–534.
- [33] ZHAO Y, WANG J, FU Q, *et al.* Characterization and antioxidant activity of mannans from *Saccharomyces cerevisiae* with different molecular weight [J]. Molecules, 2022, 27(14): 4439.
- [34] 廖雪勤, 汪楠, 胡荣, 等. 不同超声处理时间对莲藕淀粉理化及结构特性的影响[J]. 食品科学, 2024, 45(6): 183–191.
- LIAO XQ, WANG N, HU R, *et al.* Effect of different ultrasound treatment time on physicochemical and structural properties of lotus root starch [J]. Food Sci, 2024, 45(6): 183–191.
- [35] CHEUNG YC, YIN J, WU JY. Effect of polysaccharide chain conformation on ultrasonic degradation of curdlan in alkaline solution [J]. Carbohydr Polym, 2018, 195: 298–302.
- [36] 刘欣, 李俊杰, 邹启文, 等. 毕节地区刺梨多糖提取工艺优化及产地间多糖含量与抗氧化活性差异研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(2): 297–306.
- LIU X, LI JJ, ZOU QW, *et al.* Optimization of high-efficiency extraction of polysaccharide from *Rosa roxburghii* and study on the difference of polysaccharide content and antioxidant activity among different regions in Bijie [J]. J Food Saf Qual, 2023, 14(2): 297–306.
- [37] FERNANDES RAP, COIMBRA MA. The antioxidant activity of polysaccharides: A structure-function relationship overview [J]. Carbohydr Polym, 2023, 314: 120965.

(责任编辑: 蔡世佳 于梦娇)

作者简介



朱嘉玺, 主要研究方向为植物中有效成分的提取及活性探究。
E-mail: 2169270854@qq.com



陈正豪, 主要研究方向为植物中有效成分的提取及活性探究。
E-mail: gzuczh@163.com



宋昂芯, 博士, 讲师, 主要研究方向为天然多糖结构鉴定及功能活性研究。
E-mail: axsong@gzu.edu.cn