

普洱茶多糖不同纯化组分的理化性质与体外抗氧化、抗肿瘤活性关系分析

吴以龙, 税再坤, 王 燕, 刘振浩, 王宣军, 字成庭

Relationship between Changes in Physicochemical Properties with Antioxidant and Antitumor Activity Changes *in Vitro* of Different Purified Fractions of Pu-erh Tea Polysaccharides

WU Yilong, SHUI Zaikun, WANG Yan, LIU Zhenhao, WANG Xuanjun, and ZI Chengting

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024030432>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

桑黄菌丝体多糖的分离纯化及抗氧化、抗肿瘤活性分析

Fractionation, Purification and Antioxidant, Antitumor Activity of Polysaccharides from *Phellinus igniarius* Mycelia

食品工业科技. 2023, 44(11): 127-135 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022090180>

板栗种仁多糖的提取纯化及体外抗肿瘤活性筛选

Extraction, Purification and *in Vitro* Antitumor Screening of Polysaccharides from Chestnut Kernel

食品工业科技. 2020, 41(22): 134-141,149 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020020113>

硫酸化修饰对小球藻胞内多糖抗氧化及抗肿瘤活性的影响

Effect of Sulfation Modification on Antioxidation and Antitumor Activity of Intracellular Polysaccharide from *Chlorella vulgaris*

食品工业科技. 2023, 44(7): 82-88 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022060015>

半枝莲总黄酮提取工艺优化及抗氧化、抗肿瘤活性评价

Optimization of Extraction Process and Evaluation of Antioxidant and Antitumor Activities of Total Flavonoids from *Scutellaria barbata*

食品工业科技. 2023, 44(23): 194-202 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023020199>

纤维素酶和果胶酶提取对甘草渣多糖抗氧化和抗肿瘤性能的影响

Effects of Cellulase and Pectinase Extraction on the Antioxidant and Antitumor Activities of Licorice Residue Polysaccharide

食品工业科技. 2020, 41(9): 309-313,319 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.09.050>

梯度醇沉雨生红球藻渣多糖的理化性质及体外抗氧化活性研究

Physicochemical Properties and *in Vitro* Antioxidant Activity of Gradient Ethanol Precipitation Polysaccharides from *Haematococcus pluvialis* Residue

食品工业科技. 2025, 46(6): 75-84 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024030431>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

吴以龙, 税再坤, 王燕, 等. 普洱茶多糖不同纯化组分的理化性质与体外抗氧化、抗肿瘤活性关系分析 [J]. 食品工业科技, 2025, 46(12): 20–29. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024030432

WU Yilong, SHUI Zaikun, WANG Yan, et al. Relationship between Changes in Physicochemical Properties with Antioxidant and Antitumor Activity Changes *in Vitro* of Different Purified Fractions of Pu-erh Tea Polysaccharides[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(12): 20–29. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024030432

· 研究与探讨 ·

普洱茶多糖不同纯化组分的理化性质与体外 抗氧化、抗肿瘤活性关系分析

吴以龙^{1,2}, 税再坤^{1,2}, 王 燕², 刘振浩², 王宣军², 字成庭^{1,2,*}

(1. 云南农业大学理学院农业化学研究中心, 云南昆明 650201;

2. 云南农业大学食品科学技术学院普洱茶学教育部重点实验室, 云南昆明 650201)

摘要: 为了探究普洱茶多糖 (Pu-erh tea polysaccharides, PTPS) 不同纯化组分的理化性质对体外抗氧化、抗肿瘤活性的影响, 本研究以普洱生茶为原料, 对 PTPS 进行分离和纯化, 分析 PTPS 不同组分理化性质的变化规律, 研究各组分的体外抗氧化活性和抗肿瘤活性, 并进一步通过相关性分析探究不同纯化组分理化性质变化与抗氧化、抗肿瘤活性变化的相关性。结果表明, 纯化后得到的 5 个组分 (PTPS 1~5) 理化性质差异明显, 随着洗脱液 NaCl 浓度的升高, PTPS 1~5 的均一度和总糖含量表现出先升高后降低的规律性, 而粒径和多分散性指数呈现出相反的规律, 表现为先降低后升高; 蛋白含量、糖醛酸含量和酯化程度表现出总体升高的趋势; 平均分子量和 Zeta 电位无明显规律性。理化性质不同导致 PTPS 的体外抗氧化和抗肿瘤活性存在差异, Pearson 相关性分析结果表明不同纯化组分的抗氧化活性与均一度、平均分子量、总糖含量、糖醛酸含量、酯化程度和多分散性指数值密切相关, 而抗肿瘤活性主要与总糖含量、糖醛酸含量和酯化程度存在相关性。本研究结果可为 PTPS 在生物活性多糖和功能食品领域的应用提供理论支持。

关键词: 普洱茶多糖, 纯化, 理化性质, 抗氧化, 抗肿瘤

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2025)12-0020-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024030432

本文网刊:



Relationship between Changes in Physicochemical Properties with Antioxidant and Antitumor Activity Changes *in Vitro* of Different Purified Fractions of Pu-erh Tea Polysaccharides

WU Yilong^{1,2}, SHUI Zaikun^{1,2}, WANG Yan², LIU Zhenhao², WANG Xuanjun², ZI Chengting^{1,2,*}

(1. Research Center for Agricultural Chemistry, College of Science, Yunnan Agricultural University,
Kunming 650201, China;

2. Key Laboratory of Pu-erh Tea Science, Ministry of Education, College of Food Science and Technology, Yunnan
Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: To investigate the effects of changes in physicochemical properties on the *in vitro* antioxidant and antitumor activities of different purified fractions of Pu-erh tea polysaccharides (PTPS), PTPS were isolated and purified using Pu-erh raw tea as the raw material, the patterns of changes in the physicochemical properties of different fractions of PTPS were analyzed, the *in vitro* antioxidant and antitumor activities of the fractions were studied, and the correlation between changes in the physicochemical properties and changes in the antioxidant and antitumor activities of different purified fractions was

收稿日期: 2024-03-28

基金项目: 国家自然科学基金地区项目 (31960075); 云南省农业联合专项重点项目 (202101BD070001-028)。

作者简介: 吴以龙 (1998-), 男, 博士研究生, 研究方向: 食品功能成分及功效研究, E-mail: yna_wuyi@126.com。

* 通信作者: 字成庭 (1986-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 茶叶功能因子开发与利用, E-mail: zichengting@126.com。

investigated through correlation analysis. Results showed that the physicochemical properties of the five fractions (PTPS 1~5) obtained after purification varied significantly. The mean degree and total sugar content of PTPS 1~5 were observed to increase and then decrease as the concentration of NaCl in the eluent was increased, whereas the particle size and polydispersity index were found to exhibit the opposite pattern, manifesting as a decrease followed by an increase. The protein content, uronic acid content, and esterification degree were shown to have an overall increasing trend, while the average molecular weight and Zeta potential were not found to display obvious regularity. Differences in the physicochemical properties of PTPS were found to lead to differences in antioxidant and antitumor activities *in vitro*. The results of Pearson correlation analysis showed that the indicators of the physicochemical properties of the different purified fractions were closely correlated with the average degree, the average molecular weight, the total sugar content, the uronic acid content, the esterification degree, and polydispersity index value, while the antitumor activities were mainly correlated with the total sugar content, the uronic acid content, and the esterification degree. The results of this study may provide theoretical support for the application of PTPS in the field of bioactive polysaccharides and functional foods.

Key words: Pu-erh tea polysaccharides; purification; physicochemical properties; antioxidant; antitumor

茶是一种广受欢迎的饮料,由于其营养价值和健康的益处,5000 多年来一直被用于饮食^[1-2]。普洱茶产自云南西南部,以云南特有的大叶种(*Camellia sinensis* var. *assamica* (Mast.) Kitamura)茶鲜叶经过萎凋、杀青、揉捻、晒干制成晒青毛茶,即普洱生茶^[3]。普洱生茶经过渥堆发酵后得到普洱熟茶^[4]。普洱茶内含物质丰富,如茶多酚、茶多糖、茶褐素、生物碱(咖啡因和茶碱)、氨基酸(L-茶氨酸和 γ -氨基丁酸)和蛋白质等,因而具有广泛的生物活性^[5]。关于普洱茶组分的生物学效应研究大多集中在茶多酚或茶褐素方面^[6-9]。相比之下,普洱茶多糖(Pu-erh tea polysaccharides, PTPS)纯化难度较大并且较少受到关注。

分离纯化是天然多糖研究中重要的环节,其目的是富集多糖物质或分离多糖组分^[10-11]。已有部分研究报道了 PTPS 的纯化方法^[12-14],并证明了 PTPS 具有抗氧化、降血糖、降血脂和调节肠道微生物菌群等多种生物活性^[15-18]。最近的研究表明,茶多糖的抗氧化作用与分子量、单糖组成、糖醛酸含量、蛋白质含量、化学结构和空间构象等理化性质和结构特性有关^[19]。然而,由于 PTPS 分离和纯化困难,难以获得均一的多糖和确定的结构,纯化过程中得到的组分通常具有不同的理化性质,对于不同纯化组分的理化性质与其生物活性的相关性尚不明确。

基于上述问题,本研究以普洱生茶为原料,对 PTPS 进行分离和纯化,分析 PTPS 不同组分的理化性质变化规律,并研究各组分的抗氧化活性和抗肿瘤活性。在此基础上,通过相关性分析探究 PTPS 理化性质与生物活性的关系,以期明确 PTPS 不同组分对体外抗氧化、抗肿瘤活性的影响,加深对 PTPS 结构组成与生物活性关系的认识,促进 PTPS 的开发和在功能食品领域的应用。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

普洱茶 由临沧茶区大叶种(*Camellia sinensis* var. *assamica* (Mast.) Kitamura)鲜叶(2022 年 3 月

收茶)经临沧永泉茶厂加工制成的普洱生茶; D101 大孔吸附树脂、DEAE-52 纤维素离子交换柱填料、MTT 噻唑蓝(纯度>98%) 北京索莱宝科技有限公司;透析袋(截留分子量 1 kDa) 美国光谱医学公司;不同分子量葡聚糖标准品(1、5、12、50、410 和 670 kDa) 美国 Supelco 公司;间羟基联苯(纯度>98%) 上海 Adamas 试剂有限公司;DMSO、ABTS、DPPH、水杨酸、邻苯三酚、铁氰化钾 美国 Aladdin 公司;RPMI1640 培养基、胎牛血清、青-链霉素混合液 大连美仑生物技术有限公司;MDA-MB-231 人乳腺癌细胞、NCI-H1975 人肺腺癌细胞、HepG2 人肝癌细胞、Hela 人宫颈癌细胞、HCT116 人结肠癌细胞 中国科学院上海细胞库;所有分离纯化用有机溶剂均为国产分析纯。

FD-1A-50T 冷冻干燥机 北京博医康实验仪器有限公司;BSA224S 微量分析天平 北京赛多利斯科学仪器有限公司;UV2700 紫外分光光度计 日本 Shimadzu 公司;Agilent 1260 高效液相色谱仪(High performance liquid chromatography, HPLC)、Agilent 1260 Infinity II 示差折光检测器 中国安捷伦科技有限公司;NanoBrook 动态光散射纳米粒度分析仪 美国 Brookhaven 仪器有限公司;Leica DMi1 莱卡倒置显微镜 北京万泰恒通国际科贸有限公司;Countess 自动细胞计数仪 美国 Invitrogen 公司;FlexStation 3.0 多功能酶标仪 美国 Molecular Devices 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 PTPS 的提取和分离纯化 普洱茶粉碎过筛(60 目)并用 85% 乙醇浸泡脱脂后烘干,称取 998.5 g 普洱茶粉末于浸提器中,加入蒸馏水(w/v=1:15),85 ℃ 浸泡提取 2 h,收集滤液,重复提取 2 次,合并滤液并减压浓缩至原体积的 1/9 得到水提物。加入 3 倍体积的 95% 乙醇使乙醇浓度达到 70% 以上,静置沉淀 4 h(4 ℃),离心(4000 r/min, 15 min, 4 ℃)收集得到沉淀物并用 50 ℃ 热水复溶后离心(4000 r/min, 10 min, 25 ℃)去除不溶物,使用 Sevage 试剂

(氯仿:正丁醇=4:1, v/v)除蛋白5次后冷冻干燥得到普洱茶粗多糖。参考杨新河等^[12]的方法,调整粗多糖水溶液的浓度为4 mg/mL,加入D101大孔吸附树脂材料(料液比=1:2, m:m),置于摇床中(150 r/min, 5 h, 55 ℃)进行静态吸附脱色并冻干得到脱色多糖。采用DEAE-52纤维素离子交换柱层析(2.5×60 cm)对脱色多糖进一步纯化,即分别用0、0.1、0.3、0.5、2 mol/L NaCl溶液进行梯度洗脱(1 mL/min), 20 mL每管收集洗脱液,采用苯酚-硫酸法监测每管的吸光值,绘制洗脱曲线。根据洗脱曲线合并洗脱液,经浓缩、透析(1 kDa)脱盐及冷冻干燥处理得到纯化后的PTPS。

1.2.2 PTPS的理化性质分析

1.2.2.1 均一度和分子量分布的测定 在配备示差折光检测器的HPLC系统上用高效凝胶渗透色谱法分析样品的均一度和分子量分布。色谱柱:Shodex SUGAR KS-805凝胶色谱柱(8×300 mm, 10 μm);柱温:45 ℃;检测器温度:40 ℃;流动相:超纯水;流速:0.8 mL/min;进样量:10 μL;样品浓度:2 mg/mL。在HPLC化学工作站上采用峰面积归一化法分析样品的均一度。以系列不同分子量葡聚糖标准品(1、5、12、50、410和670 kDa)的对数值(lg Mw)为纵坐标,以色谱峰的保留时间(t)为横坐标,建立标准曲线,根据标准曲线方程计算样品的分子量。

1.2.2.2 总糖含量的测定 以葡萄糖为标准品,采用苯酚-硫酸法^[20]测定样品的总糖含量,得线性回归方程: $y=3.4419x+0.0698$, $R^2=0.9992$ 。

1.2.2.3 蛋白含量的测定 以牛血清白蛋白为标准品,采用Bradford法^[21]测定样品的蛋白含量,得线性回归方程: $y=9.0543x+0.07$, $R^2=0.9993$ 。

1.2.2.4 糖醛酸含量的测定 以半乳糖醛酸为标准品,采用间羟基联苯比色法^[22]测定样品的总糖醛酸含量,得线性回归方程: $y=3.9x+0.0632$, $R^2=0.9984$ 。

1.2.2.5 酯化程度的测定 参考Chen等^[23]的方法,采用化学滴定法测定样品的酯化程度。将干燥的样品(10.00 mg)用200 μL乙醇润湿并溶于10 mL去离子水中。样品完全溶解后,加入1滴酚酞,用0.5 mol/L NaOH滴定样品,并将结果记录为 V_1 。然后,加入1 mL 0.5 mol/L NaOH,剧烈振摇样品,并静置15 min;加入1 mL 0.5 mol/L HCl,振摇样品直至粉红色消失。加入1滴酚酞,用0.5 mol/L NaOH滴定溶液至剧烈振摇后持续呈淡粉色(终点)。将该滴定体积记录为皂化滴定度(V_2),按式(1)计算样品的酯化程度。

$$\text{酯化程度}(\%) = \frac{V_2}{V_1 + V_2} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

式中: V_1 为第1次用0.5 mol/L NaOH滴定样品时的滴定体积, mL; V_2 为第2次用0.5 mol/L NaOH滴定样品时的滴定体积, mL。

1.2.2.6 紫外-可见光谱分析 将样品配制成质量浓度为0.5 mg/mL的多糖水溶液,在190~700 nm下进行紫外-可见光谱扫描,记录光谱图。

1.2.2.7 粒径和Zeta电位的测定 参考Yang等^[24]的方法,样品的粒径和Zeta电位分别通过动态光散射和相位光散射技术在Omni多角度粒径和高灵敏度Zeta电位分析仪上进行分析。将样品用去离子水配制成1 mg/mL,使用0.22 μm的过滤膜过滤样品溶液以避免多重散射效应。在25 ℃条件下90°固定散射角测量,粒径分布的检测范围为0~1 μm, pH7.0。

1.2.3 PTPS的体外抗氧化活性分析

1.2.3.1 ABTS⁺自由基清除活性 参考孙晓燕等^[25]的方法。将7 mmol/L ABTS与2.45 mmol/L过硫酸钾溶液等体积混匀,避光静置14 h得到测定液。取50 μL样品溶液(0.0、0.5、1.0、1.5和2.0 mg/mL)到2 mL测定液中混匀。避光静置10 min, 734 nm读取吸光值,按式(2)计算ABTS⁺自由基清除率,以 V_C 作为阳性对照。

$$\text{ABTS}^+ \text{自由基清除率}(\%) = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100 \quad \text{式(2)}$$

式中: A_0 为50 μL H_2O 与2 mL ABTS测定液的吸光值; A_1 为50 μL样品溶液与2 mL ABTS测定液的吸光值; A_2 为50 μL样品溶液与2 mL PBS缓冲液的吸光值。

1.2.3.2 DPPH自由基清除活性 参考陈丽叶等^[26]的方法。取500 μL样品溶液(0.0、0.5、1.0、1.5和2.0 mg/mL)到500 μL无水乙醇和125 μL 0.02% DPPH混合液中混匀。避光反应25 min, 510 nm处测定吸光值。按式(3)计算DPPH自由基清除率,以 V_C 作为阳性对照。

$$\text{DPPH自由基清除率}(\%) = \frac{A_1 + A_2 - A_0}{A_2} \times 100 \quad \text{式(3)}$$

式中: A_0 为500 μL样品溶液与500 μL无水乙醇和125 μL 0.02% DPPH混合液的吸光值; A_1 为500 μL样品溶液与625 μL无水乙醇的吸光值; A_2 为500 μL H_2O 与500 μL无水乙醇和125 μL 0.02% DPPH混合液的吸光值。

1.2.3.3 羟基自由基清除活性 参考陈丽叶等^[26]的方法。取500 μL样品溶液(0.0、0.5、1.0、1.5和2.0 mg/mL)到500 μL 9 mmol/L $FeSO_4$ 和500 μL水杨酸-50%乙醇(9 mmol/L)混合液中混匀。加入500 μL 0.03% H_2O_2 混匀, 37 ℃水浴1 h。室温静置10 min, 510 nm处测定吸光值。按式(4)计算羟基自由基清除率,以 V_C 作为阳性对照。

$$\text{羟基自由基清除率}(\%) = \frac{A_1 - (A_0 - A_2)}{A_1} \times 100 \quad \text{式(4)}$$

式中: A_0 为 500 μL 样品溶液与 500 μL 9 mmol/L FeSO_4 和 500 μL 水杨酸-50% 乙醇(9 mmol/L)混合液的吸光值; A_1 为 500 μL H_2O 与 500 μL 9 mmol/L FeSO_4 和 500 μL 水杨酸-50% 乙醇(9 mmol/L)混合液的吸光值; A_2 为 500 μL 样品溶液与 500 μL 9 mmol/L FeSO_4 和 500 μL 50% 乙醇溶液的吸光值。

1.2.3.4 超氧阴离子自由基清除活性 参考胡彦波等^[27]的方法。取 500 μL 样品溶液(0.0、0.5、1.0、1.5 和 2.0 mg/mL)与 2 mL Tris-HCl 缓冲液(pH8.0)混匀,室温水浴 20 min。加入 200 μL 2.5 mmol/L 邻苯三酚,静置 3 min 后加入 5 mL 2 mol/L HCl 混匀,325 nm 处测定吸光值。按式(5)计算超氧阴离子自由基清除率,以 V_C 作为阳性对照。

$$\text{超氧阴离子自由基清除率}(\%) = \frac{A_1 - A_0}{A_1} \times 100 \quad \text{式(5)}$$

式中: A_0 为 500 μL 样品溶液与 2 mL Tris-HCl 缓冲液的吸光值; A_1 为 500 μL H_2O 与 2 mL Tris-HCl 缓冲液的吸光值。

1.2.3.5 还原力测定 参考胡彦波等^[27]的方法。取 500 μL 样品溶液(0.0、0.5、1.0、1.5 和 2.0 mg/mL)、500 μL PBS 缓冲溶液(pH6.6)和 500 μL 1% $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 溶液混匀。50 $^\circ\text{C}$ 水浴 20 min 后加入 500 μL 10% 三氯乙酸混匀。取 500 μL 混合溶液加入 500 μL H_2O 和 100 μL 0.1% FeCl_3 , 室温静置 10 min, 700 nm 处测定吸光值。以 V_C 作为阳性对照,通过比较样品和 V_C 的吸光度,判断多糖的还原能力。

1.2.4 PTPS 的体外抗肿瘤活性分析 收集处于对数生长期的 MDA-MB-231(人乳腺癌)、NCI-H1975(人肺腺癌)、HepG2(人肝癌)、Hela(人宫颈癌)和 HCT 116(人结肠癌)细胞,计数后用 RPMI 1640 完全培养基(含 10% 胎牛血清和 1% 青-链霉素)将细胞调整为 1×10^5 个/mL 的密度,每孔 200 μL 接种于 96 孔细胞板中,置于 5% CO_2 培养箱 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 16 h。待细胞贴壁后,弃去上清液,用 PBS 清洗细胞。空白对照组加入 200 μL RPMI 1640 培养基(含 1% 青-链霉素);实验组给予 200 μL 用 RPMI 1640 培养基(含 1% 青-链霉素)配制的样品溶液(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。继续培养 24 h 后,每孔加入 20 μL MTT,置于 5% CO_2 培养箱(37 $^\circ\text{C}$)避光孵育 4 h。弃去上清,每孔加入 150 μL DMSO,振荡 10 min,490 nm 处测定吸光值。按式(6)计算样品在体外对肿瘤细胞的抑制率。

$$\text{细胞抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{A - C}{B - C}\right) \times 100 \quad \text{式(6)}$$

式中: A 为不同浓度样品的吸光值; B 为空白对照组的吸光值; C 为不接种细胞调零组的吸光值。

1.2.5 综合抗氧化及抗肿瘤能力 参考文献[28-29]方法。综合抗氧化能力以 ABTS⁺自由基、DPPH 自由基、羟基自由基、超氧阴离子自由基清除率和还原力进行评价,综合抗肿瘤能力以对 MDA-MB-231(人乳腺癌)、NCI-H1975(人肺腺癌)、HepG2(人肝癌)、Hela(人宫颈癌)和 HCT 116(人结肠癌)细胞的抑制率进行评价,评价采用模糊数学中的隶属函数法和权重法,权重系数为 1/5。按式(7)计算隶属函数值。

$$R = \frac{X_i - X_{\min}}{X_{\max} - X_{\min}} \quad \text{式(7)}$$

式中: R 为函数值; X_i 为指标测定值; $X_{\max}$ 为所有测定样品某一指标的最大值; $X_{\min}$ 为所有测定样品某一指标的最小值。

1.3 数据处理

所有实验均重复 3 次,实验数据以平均值 $\pm$ 标准偏差表示,采用 SPSS 26.0 进行统计学处理, Duncan 多重比较进行事后检验, $P < 0.05$ 表示差异显著。使用 Origin 2021 和 GraphPad Prism 8.0 软件进行图形处理。

2 结果与分析

2.1 PTPS 分离纯化结果

如图 1 所示,PTPS 经 D101 大孔吸附树脂脱色和 DEAE-52 离子交换色谱柱层析(洗脱曲线见图 2)分离纯化得到 5 个组分,命名为 PTPS 1~5。在连续地离子交换色谱柱层析纯化过程中,得到的 5 个 PTPS 冻干物的表观性状不一致,PTPS 1 表现为微黄的细碎粉末,PTPS 2~5 表现为类似棉花的絮状物,并且淡黄色逐渐加深,表明 PTPS 1~5 的内在组成与理化性质可能会不相同,从而也可能会导致其生物活性不同。



图 1 PTPS 的提取和分离纯化流程

Fig.1 Extraction, separation and purification process of PTPS

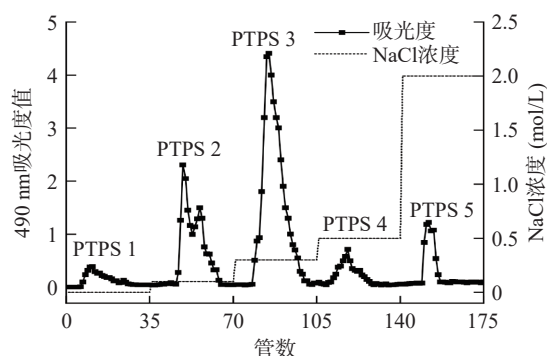


图2 DEAE-52 纤维素离子交换柱层析洗脱曲线

Fig.2 Elution curves of DEAE-52 cellulose ion exchange column chromatography

2.2 PTPS 的理化性质分析结果

2.2.1 均一度和分子量分布 如图 3 所示, PTPS 1~5 的高效凝胶渗透色谱图显示均含有一个保留时间在 7.8~8.2 min 的主峰, 说明 PTPS 1~5 含有一个分子量分布类似的多糖。PTPS 1~5 的均一度见表 1, PTPS 1~3 的均一度逐渐升高, PTPS 3~5 的均一度逐渐降低, 说明 PTPS 1~5 的均一度表现出先升高后减小的规律性。其中, PTPS 3 的均一度最高

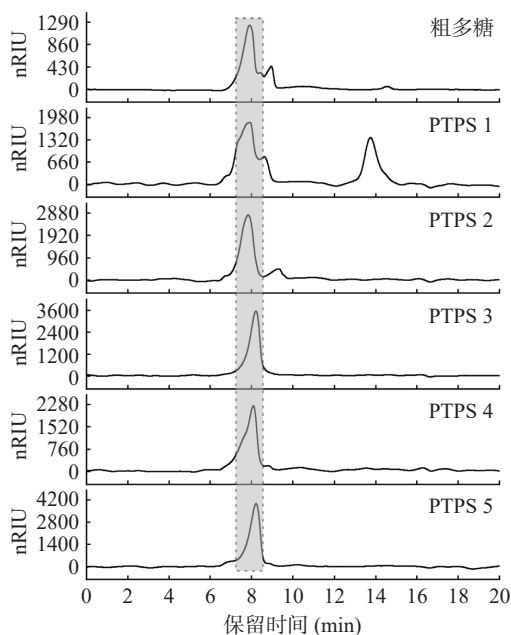


图3 PTPS 1~5 的高效凝胶渗透色谱图

Fig.3 High performance gel permeation chromatogram of PTPS 1~5

(97.55%), 并且 HPGPC 图谱显示 PTPS 3 为窄的对称峰, 这表明 PTPS 3 为均一的多糖(图 3)。研究表明, 分子量的不同会影响多糖的生物活性和实际应用^[30]。根据系列葡聚糖标准品的色谱峰保留时间(t)和 $\lg Mw$ 之间的标准曲线方程 $\lg Mw = -0.6247t + 10.741$ ($R^2 = 0.9952$), 计算了 PTPS 1~5 主峰的分子量(表 1)。各 PTPS 组分之间主峰的分子量差异显著 ($P < 0.05$), 分子量最小的是 PTPS 3 (406.33 kDa), PTPS 2 的分子量最大 (697.19 kDa)。

2.2.2 总糖、蛋白和糖醛酸含量 如表 1 所示, PTPS 1~3 的总糖含量差异显著 ($P < 0.05$), 并且与其均一度结果类似, PTPS 3 的均一度和总糖含量最高 (86.74%)。蛋白含量测定结果(表 1)显示 5 个 PTPS 组分均含有蛋白质。之前的研究表明含少量蛋白质的多糖样品对抗氧化活性无明显影响^[27]。糖醛酸含量最高的是 PTPS 4 (28.41%), PTPS 5 的糖醛酸含量 (27.81%) 与 PTPS 3 (26.87%) 和 PTPS 4 (28.41%) 无显著性差异 ($P > 0.05$), 说明当 NaCl 洗脱液的浓度超过 0.3 mol/L 时 PTPS 中带有糖醛酸基团数目无明显变化。

2.2.3 酯化程度 研究表明, 以果胶为代表的多糖结构中糖醛酸的 C-6 处容易发生甲酯化, 并与多糖的生物活性有关^[31]。糖醛酸含量测定结果显示 PTPS 1~5 中均含有糖醛酸基团, 因此本研究进一步检测了 PTPS 1~5 的酯化程度。如表 1 所示, PTPS 1~5 均属于低酯化多糖(酯化程度 $< 50\%$)。多糖的酯化程度决定了多糖在溶液中的线性电荷密度, 而多糖的线性电荷密度会影响多糖在溶液体系中的链构象等高级结构, 从而影响功能活性^[32]。酯化程度相对较高的是 PTPS 3、PTPS 4 和 PTPS 5, 大约在 29.17%~33.02% 范围内, 这与糖醛酸含量结果基本一致。

2.2.4 紫外-可见光谱 如图 4 所示, PTPS 1~5 的紫外-可见光谱在 260~280 nm 处均有蛋白质的吸收峰, 吸收峰强度逐渐升高, 这与蛋白质含量测定结果基本一致。在 500~700 nm 处无明显的色素吸收峰, 说明 PTPS 1~5 不含小分子色素。

2.2.5 粒径和 Zeta 电位 粒径和 Zeta 电位在一定程度上反映多糖的溶液性质, 粒径大小与多糖生物活性有一定的关联, 而电位则反映多糖溶液的稳定性^[33]。本研究利用动态光散射和相位光散射技术, 测量了 PTPS 1~5 的粒径大小和 Zeta 电位, 结果见

表 1 PTPS 1~5 的理化性质

Table 1 Physical and chemical properties of PTPS 1~5

样品编号	均一度(%)	平均分子量*(kDa)	总糖含量(%)	蛋白含量(%)	糖醛酸含量(%)	酯化程度(%)
PTPS 1	51.24±0.17 ^c	629.50±0.74 ^b	61.17±1.45 ^c	3.79±0.29 ^c	5.25±0.79 ^d	4.50±1.61 ^d
PTPS 2	79.11±0.09 ^d	697.19±0.82 ^a	72.98±2.03 ^b	3.98±0.48 ^c	17.98±0.64 ^c	24.33±0.66 ^c
PTPS 3	97.55±0.03 ^a	406.33±0.28 ^d	86.74±1.39 ^a	4.31±0.86 ^c	26.87±0.84 ^b	33.02±1.52 ^a
PTPS 4	86.29±0.03 ^b	491.77±0.88 ^c	48.19±1.31 ^d	5.96±0.81 ^b	28.41±0.21 ^a	31.67±0.35 ^a
PTPS 5	85.12±0.13 ^c	407.11±0.48 ^d	46.64±1.80 ^d	13.33±0.41 ^a	27.81±0.44 ^{ab}	29.17±0.75 ^b

注: 同列不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 表 2 同; “*”以主峰分子量表示。

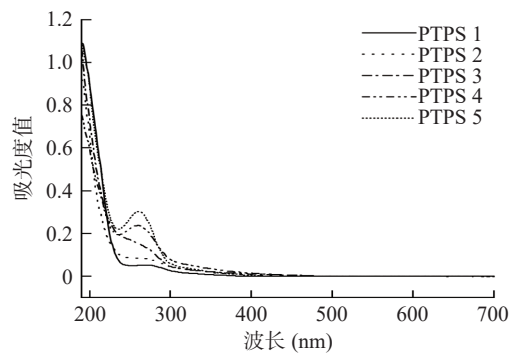


图 4 PTPS 1~5 的紫外-可见吸收光谱
Fig.4 UV-Vis absorption spectras of PTPS 1~5

图 5 和图 6。PTPS 1~5 的粒径大小表现为 PTPS 5>PTPS 1>PTPS 4>PTPS 2>PTPS 3。通常认为,颗粒尺寸的大小可能与化合物分子量或颗粒间的相互作用

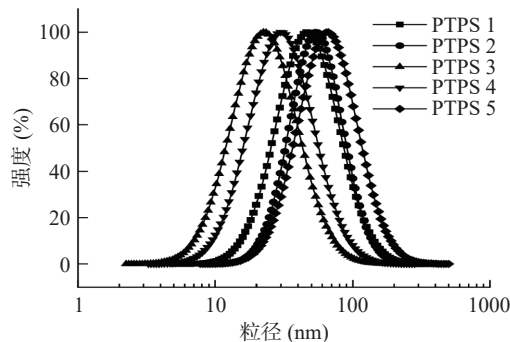


图 5 PTPS 1~5 在中性水溶液中的粒径分布
Fig.5 Particle size distribution of PTPS 1~5 in neutral aqueous solution

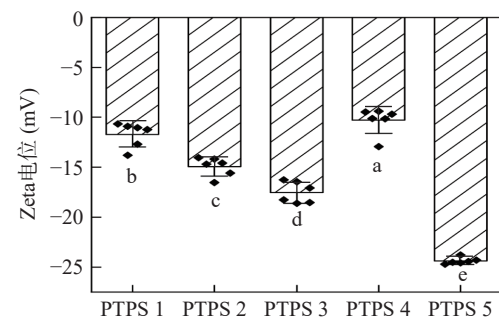
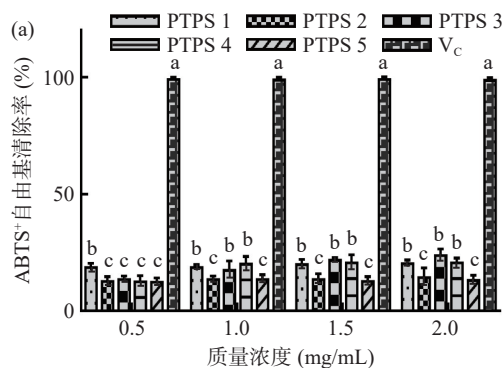


图 6 PTPS 1~5 的 Zeta 电位

Fig.6 Zeta potential of PTPS 1~5

注: 小写字母标注不同表示不同纯化组分之间差异显著 ($P<0.05$)。



用有关^[34]。通过多分散性指数(Polymer dispersity index, PDI)可以表征样品粒径分布宽度, PTPS 1~5 的 PDI 测量结果见表 2。结合均一度分析的结果, 均一度最高的 PTPS 3 多糖分子种类比较均匀, 不易发生聚集, 因而粒径最小(137.10 nm)。这一结果与 PDI 值测量结果一致, PTPS 3 的 PDI 值最小(0.15)。Zeta 电位显示在中性水溶液中最稳定的是 PTPS 5, Zeta 电位值为-24.40 mV; 最不稳定的是 PTPS 4, Zeta 电位值为-10.29 mV(表 2)。

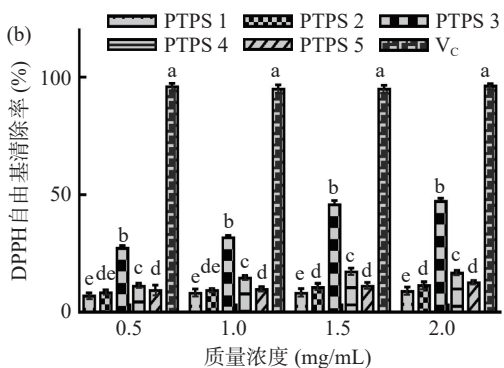
表 2 PTPS 1~5 水溶液分散体系稳定性指标

Table 2 Stability index of aqueous solution dispersion system of PTPS 1~5

样品编号	粒径(nm)	PDI	Zeta电位(mV)
PTPS 1	236.55±1.11 ^b	0.34±0.01 ^a	-11.72±1.14 ^b
PTPS 2	173.88±0.37 ^c	0.32±0.04 ^{ab}	-14.95±0.87 ^c
PTPS 3	137.10±0.37 ^d	0.15±0.01 ^d	-17.54±0.98 ^d
PTPS 4	178.34±21.55 ^c	0.23±0.00 ^c	-10.29±1.21 ^a
PTPS 5	289.71±0.79 ^a	0.28±0.02 ^b	-24.40±0.30 ^e

2.3 PTPS 的体外抗氧化活性分析

PTPS 1~5 的 5 种体外抗氧化活性实验结果如图 7 所示。PTPS 1~5 的 ABTS⁺ 自由基清除率整体偏低(约为 13%~25%)(图 7a)。PTPS 2 和 PTPS 5 的 ABTS⁺ 自由基清除能力在实验设计的浓度范围内较 PTPS 1、PTPS 3 和 PTPS 4 低($P<0.05$)。如图 7b 所示, PTPS 1~5 的 DPPH 自由基清除率呈剂量依赖性, 其中 PTPS 3 的 DPPH 自由基清除率显著高于其他组分($P<0.05$), 在 2.0 mg/mL 质量浓度下, 清除率达到 47.59%。由图 7c 可知, PTPS 1~5 整体表现出较强的羟基自由基清除能力且呈浓度梯度升高。在相同质量浓度下, PTPS 3 的羟基自由基清除能力均显著高于其他组分($P<0.05$)。在最高实验浓度下, PTPS 3 的羟基自由基清除率达到 53.45%。如图 7d 所示, 在不同质量浓度范围下, PTPS 3 与 PTPS 5 的超氧阴离子自由基清除能力最强。对于还原力的测定, 与阳性对照组(V_C)相比, PTPS 1~5 均表现出较低的还原力($P<0.05$)(图 7e)。综上, PTPS 1~5 在 0.5~2.0 mg/mL 浓度范围内均表现出呈剂量依赖性的体外抗氧化活性, 且在清除 ABTS⁺、DPPH、羟基、超氧阴离子自由基以及还原能力方面表现出不同活性。



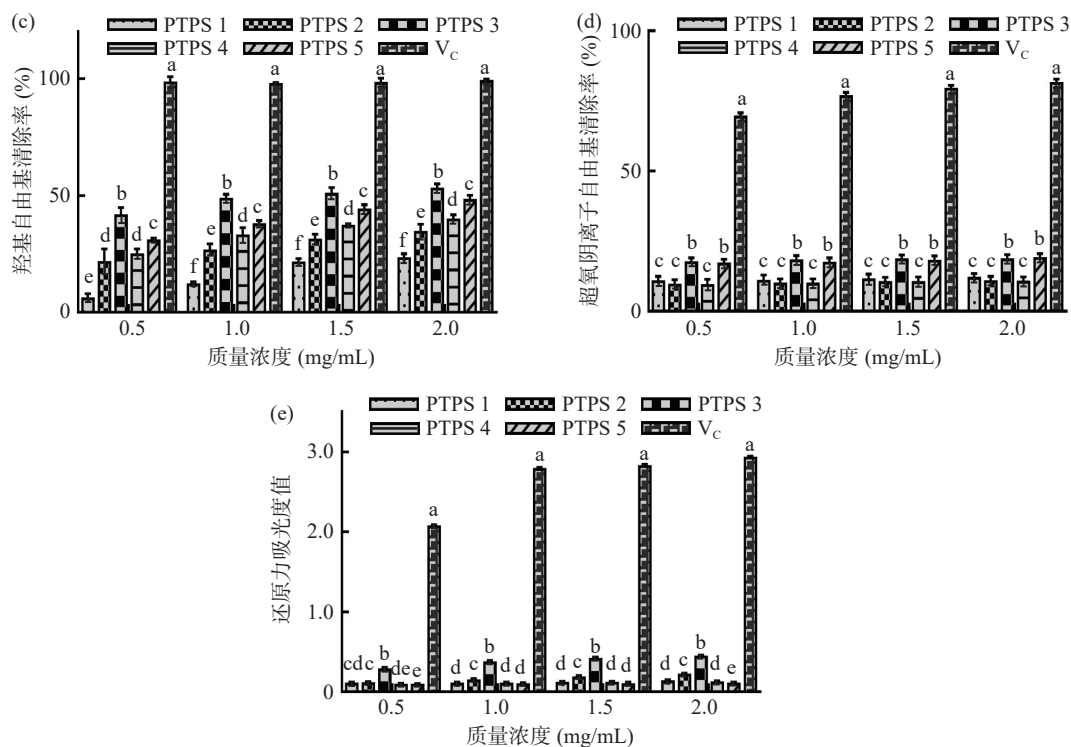


图7 PTPS 1~5 的 ABTS⁺(a)、DPPH(b)、羟基(c)、超氧阴离子(d)自由基清除能力以及还原力(e)

Fig.7 ABTS⁺ (a), DPPH (b), hydroxyl (c), superoxide anion (d) radical scavenging ability and reducing power (e) of PTPS 1~5

注: 相同质量浓度下小写字母标注不同表示不同纯化组分之间差异显著($P < 0.05$), 图 8 同。

为了较全面地反映 PTPS 1~5 的抗氧化能力大小, 运用隶属函数值法, 综合 5 个方面的抗氧化指标, 各指标的权重系数为 1/5, 用隶属函数平均值对 PTPS 1~5 的体外抗氧化能力进行了综合评价。如表 3 所示, 基于隶属函数平均值的抗氧化能力大小顺序为: PTPS 3>PTPS 5>PTPS 4>PTPS 2>PTPS 1。经方差分析, PTPS 不同纯化组分之间的综合抗氧化

表 3 PTPS 1~5 抗氧化能力隶属函数值

Table 3 Membership function values of antioxidant capacity of PTPS 1~5

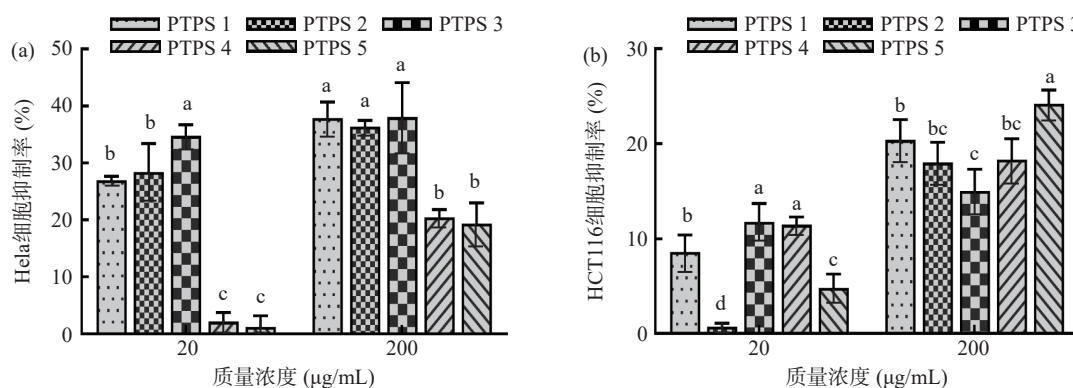
样品浓度(mg/mL)	PTPS 1	PTPS 2	PTPS 3	PTPS 4	PTPS 5
0.5	0.0204	0.0406	0.1725	0.0513	0.0847
1	0.0156	0.0402	0.1944	0.0791	0.0857
1.5	0.0205	0.0392	0.2303	0.0817	0.0883
2	0.0224	0.0462	0.2372	0.0799	0.0978
平均值	0.0197	0.0415	0.2086	0.0730	0.0891
排序	5	4	1	3	2

能力存在显著差异($P < 0.05$), 需进一步对多糖的理化性质与抗氧化能力进行相关性分析。

2.4 PTPS 的体外抗肿瘤活性分析

本研究采用 MTT 法, 比较了 PTPS 1~5 在体外对 Hela、HCT116、HepG2、MDA-MB-231 和 NCI-H1975 五种癌细胞作用的差异, 结果如图 8 所示。PTPS 1~5 的低浓度处理组(20 $\mu\text{g/mL}$)对五种癌细胞的抑制率普遍偏低, 但高浓度处理组(200 $\mu\text{g/mL}$)均有升高, 说明 PTPS 1~5 对五种癌细胞的抑制作用呈剂量依赖性。

与综合抗氧化能力评价方式类似, 以不同纯化组分分别对 5 种癌细胞的抑制率为指标, 计算 PTPS 1~5 的综合抗肿瘤能力。如表 4 所示, 综合抗肿瘤能力大小顺序为: PTPS 1>PTPS 3>PTPS 5>PTPS 2>PTPS 4。方差分析表明 PTPS 不同纯化组分之间的综合抗肿瘤能力存在显著差异($P < 0.05$), 表明不同理



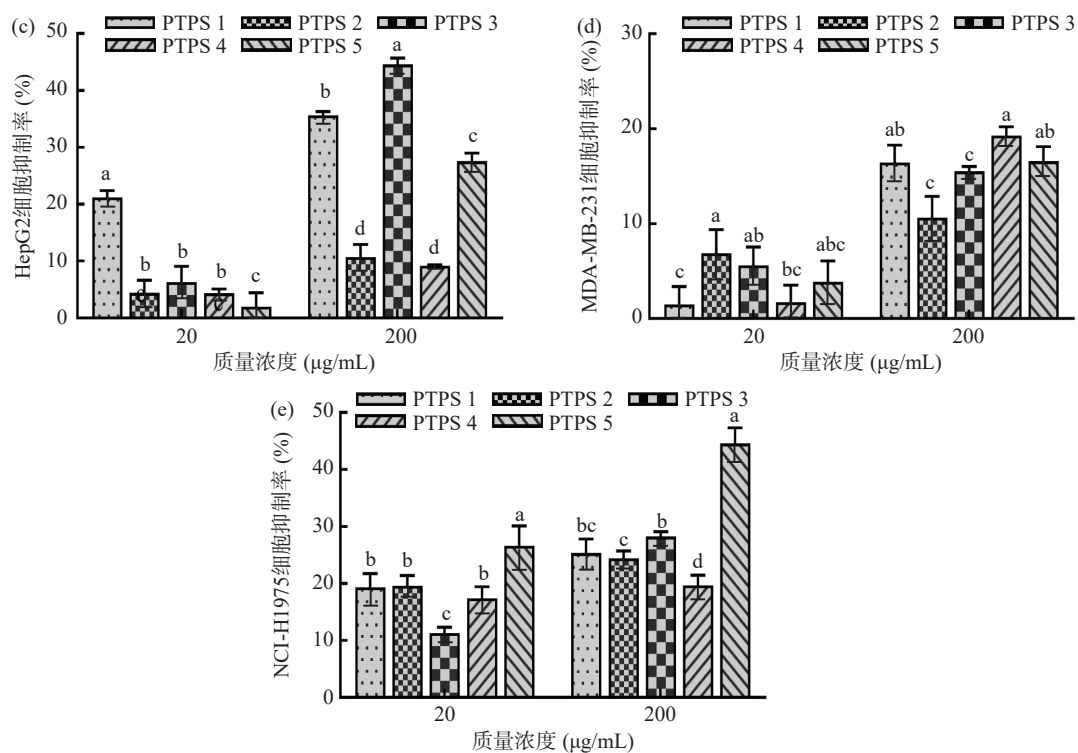


图 8 PTPS 1~5 对 Hela(a)、HCT116(b)、HepG2(c)、MDA-MB-231(d)和 NCI-H1975(e)细胞增殖的影响
Fig.8 Effects of PTPS 1~5 on the proliferation of Hela (a), HCT116 (b), HepG2 (c), MDA-MB-231 (d) and NCI-H1975 (e) cells

表 4 PTPS 1~5 抗肿瘤能力隶属函数值

样品浓度(µg/mL)	PTPS 1	PTPS 2	PTPS 3	PTPS 4	PTPS 5
20	0.6011	0.4951	0.5963	0.3136	0.3613
200	0.6433	0.2936	0.5820	0.2840	0.6407
平均值	0.6222	0.3943	0.5891	0.2988	0.5010
排序	1	4	2	5	3

化性质的多糖具有不同的体外抗肿瘤活性,并且可能与多糖的理化性质有关。

2.5 PTPS 的理化性质与抗氧化、抗肿瘤活性变化的相关性分析

为进一步确定不同纯化组分间 PTPS 的理化性质变化与抗氧化、抗肿瘤活性变化的相关关系,对 PTPS 理化性质指标(均一度、平均分子量、总糖含量、蛋白含量、糖醛酸含量、酯化程度、粒径、多分散性指数和 Zeta 电位)与抗氧化活性、抗肿瘤活性指标进行了 Pearson 相关性分析。其中,体外抗氧化与抗肿瘤活性指标的量化采用综合抗氧化和抗肿瘤能力的隶属函数值来表示,隶属函数值越大,表明其综合能力越强。

由图 9 可知,PTPS 的理化性质指标与抗氧化和抗肿瘤活性存在一定相关性。对于体外抗氧化活性,多糖的均一度与综合抗氧化能力存在高度显著正相关($P<0.001$),相关系数为 0.79;总糖含量与综合抗氧化能力存在显著正相关($P<0.05$),相关系数为 0.54。类似地,糖醛酸含量和酯化程度与综合抗氧化能力也存在显著正相关($P<0.05$, $P<0.01$),相关系数

分别为 0.62 和 0.67。这可能是因为糖醛酸含量和酯化程度越高,多糖的供电子或供氢能力越强,抗氧化活性越高^[35]。此外,平均分子量和 PDI 值与综合抗氧化能力存在极显著负相关($P<0.01$, $P<0.001$),相关系数分别为-0.74 和-0.90。Cao^[36] 以及 Liang 等^[37] 在之前的研究中也发现了类似的结果,说明多糖的分子量和 PDI 值越小,其抗氧化活性越好。与体外抗氧化活性相比,PTPS 的理化性质指标与体外抗肿瘤活性的相关性较低。总糖含量与综合抗肿瘤活性存在显著正相关($P<0.05$),相关系数为 0.51。与抗氧化活性相反,糖醛酸含量和酯化程度与综合抗肿瘤能力存在显著负相关($P<0.05$),相关系数分别为-0.53 和-0.54。综上,PTPS 的抗氧化活性与多糖的均一



图 9 PTPS 不同纯化组分理化性质变化与抗氧化、抗肿瘤变化相关性分析的热图

Fig.9 Heatmap of correlation analysis between changes in physicochemical properties and changes in antioxidant and antitumour activities of different purified fractions of PTPS
注: *显著相关($P<0.05$); **极显著相关($P<0.01$); ***高度显著相关($P<0.001$)。

度、平均分子量、总糖含量、糖醛酸含量、酯化程度和 PDI 值密切相关,而抗肿瘤活性主要与总糖含量、糖醛酸含量和酯化程度存在相关性。其中,均一度和 PDI 值对抗氧化活性的影响最大,可能是多糖在水溶液中的分子间相互作用影响了多糖的均一度和分散性,进而影响了多糖的抗氧化活性。综合影响抗氧化和抗肿瘤活性的相关指标,可以发现多糖的总糖含量、糖醛酸含量和酯化程度是影响多糖生物活性的重要指标。

3 结论

本研究对 PTPS 进行了分离纯化,得到 PTPS 1~5 五个组分,分析了不同纯化组分理化性质的变化规律和体外抗氧化、抗肿瘤活性变化关系。各组分的理化性质差异明显,随着洗脱液 NaCl 浓度的升高,PTPS 1~5 的均一度和总糖含量表现出先升高后降低的规律性,而粒径和多分散性指数呈现出相反的规律,表现为先降低后升高,蛋白含量、糖醛酸含量和酯化程度表现出总体升高的趋势,平均分子量和 Zeta 电位无明显规律性。理化性质不同导致 PTPS 的体外抗氧化和抗肿瘤活性存在差异, Pearson 相关性分析结果表明不同纯化组分的抗氧化活性与多糖的均一度、平均分子量、总糖含量、糖醛酸含量、酯化程度和 PDI 值密切相关,而抗肿瘤活性主要与总糖含量、糖醛酸含量和酯化程度存在相关性。综合影响抗氧化和抗肿瘤活性的相关指标,可以发现多糖的总糖含量、糖醛酸含量和酯化程度是影响多糖生物活性的主要指标。综上,本研究探讨了理化性质变化对体外抗氧化、抗肿瘤活性的影响,而多糖的理化性质是由其本身的化学组成和结构决定的,重点将 PTPS 纯化过程中不同组分的理化性质与体外抗氧化、抗肿瘤活性联系起来,将有可能进一步了解 PTPS 的构效关系,并通过调控纯化过程中的不同参数,获得功能特异的 PTPS,推动 PTPS 的广泛应用。

© The Author(s) 2025. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

[1] RANA A, RANA S, KUMAR S. Phytotherapy with active tea constituents: A review[J]. *Environmental Chemistry Letters*, 2021, 19: 2031–2041.

[2] HU Shanshan, LUO Liyong, ZENG Liang. Tea combats circadian rhythm disorder syndrome via the gut-liver-brain axis: Potential mechanisms speculated[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2023, 63(24): 7126–7147.

[3] LIU Junyu, HE Dong, XING Yifan, et al. Effects of bioactive components of Pu-erh tea on gut microbiomes and health: A review[J]. *Food Chemistry*, 2021, 353: 129439.

[4] ZHU Yuchen, LUO Yinghua, WANG Pengpu, et al. Simultaneous determination of free amino acids in Pu-erh tea and their changes during fermentation[J]. *Food Chemistry*, 2016, 194: 643–649.

[5] WONG M, SIRISENA S, NG K. Phytochemical profile of differently processed tea: A review[J]. *Journal of Food Science*, 2022, 87(5): 1925–1942.

[6] 陈亭亭, 王永勇, 黄逢阳, 等. 茶褐素的制备、理化表征及功效研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2023, 44(11): 217–224. [CHEN Tingting, WANG Yongyong, HUANG Fengyang, et al. Preparation, physicochemical characterization and functional activity of theabrownins: A review[J]. *Food Research and Development*, 2023, 44(11): 217–224.]

[7] 周先容, 赵欣, 龙兴瑶, 等. 不同年份生普洱茶多酚体外抗氧化效果及对小鼠酒精性胃损伤的保护作用比较[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(12): 300–308. [ZHOU Xianrong, ZHAO Xin, LONG Xingyao, et al. Comparison of antioxidative effects of polyphenols from raw puer tea *in vitro* and their protective effects on alcoholic gastric injury in mice[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(12): 300–308.]

[8] 山波, 龚加顺, 王秋萍, 等. 菌方普洱熟茶水提物和茶褐素的组成及其降脂作用[J]. *食品科学*, 2023, 44(8): 257–267. [SHAN Bo, GONG Jiashun, WANG Qiuping, et al. Compositions and lipid-lowering effects of water extract and theabrownin from ripe Pu-erh tea prepared by controlled fermentation[J]. *Food Science*, 2023, 44(8): 257–267.]

[9] 雷舒雯, 谢桂华, 张智芳, 等. 茶褐素对 D-半乳糖致衰老小鼠脑组织代谢组学的影响[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(5): 43–52. [LEI Shuwen, XIE Guihua, ZHANG Zhifang, et al. Effects of theabrownin on brain metabolites in D-galactose-induced aging in mice[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2023, 44(5): 43–52.]

[10] TANG Wei, LIU Dan, YIN Junyi, et al. Consecutive and progressive purification of food-derived natural polysaccharide: Based on material, extraction process and crude polysaccharide[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2020, 99: 76–87.

[11] WANG Yuxiao, YIN Junyi, ZHANG Ting, et al. Utilizing relative ordered structure theory to guide polysaccharide purification for structural characterization[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 115: 106603.

[12] 杨新河, 黄建安, 刘仲华, 等. 树脂对普洱茶多糖的纯化与分离[J]. *食品科学*, 2015, 36(2): 19–24. [YANG Xinhe, HUANG Jian'an, LIU Zhonghua, et al. Purification and separation of Pu-erh tea polysaccharide by resin[J]. *Food Science*, 2015, 36(2): 19–24.]

[13] 丁世环, 张嘉杨, 鲁群岷. 普洱茶茶渣中茶多糖的超声波辅助提取及其抗氧化性[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(18): 187–192, 200. [DING Shihuan, ZHANG Jiayang, LU Qunmin. Ultrasonic assisted extraction and antioxidant activity of tea polysaccharides from Pu'er tea residue[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(18): 187–192, 200.]

[14] 杨决, 刘仲华, 黄建安, 等. 普洱茶多糖分离及纯化[J]. *食品研究与开发*, 2010, 31(11): 1–4. [YANG Yang, LIU Zhonghua, HUANG Jian'an, et al. Isolation and purification techniques of polysaccharides extracted from Pu'er tea[J]. *Food Research and Development*, 2010, 31(11): 1–4.]

[15] 许凌凌, 程旺开, 周小楠. 普洱茶多糖对健康小鼠短链脂肪酸代谢与肠道菌群组成的调节作用[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(21): 115–122. [XU Lingling, CHENG Wangkai, ZHOU Xiaonan. Regulatory effect of Pu-erh tea polysaccharide on short-chain fatty acid metabolism and gut microbiota in mice[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(21): 115–122.]

[16] 藏传刚, 任珊, 刘宇超, 等. 玉米须多糖与普洱茶多糖降血

- 糖、降血脂作用研究[J]. *中国医学创新*, 2021, 18(16): 29–34.
- [ZANG Chuangang, REN Shan, LIU Yuchao, et al. The hypoglycemic and hyperlipidemic effects of stigma-maydis polysaccharides and Pu-erh tea polysaccharides[J]. *Medical Innovation of China*, 2021, 18(16): 29–34.]
- [17] XU Ping, WU Jing, ZHANG Yi, et al. Physicochemical characterization of puerh tea polysaccharides and their antioxidant and α -glycosidase inhibition[J]. *Journal of Functional Foods*, 2014, 6: 545–554.
- [18] MAO Limin, SHAO Shuhong, SUN Shili, et al. Purification, physicochemical characterization, and bioactivities of polysaccharides from Pu-erh tea[J]. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2014, 2(12): 1007–1014.
- [19] ZHU Jiangxiong, ZHOU Hui, ZHANG Junyao, et al. Valorization of polysaccharides obtained from dark tea: Preparation, physicochemical, antioxidant, and hypoglycemic properties[J]. *Foods*, 2021, 10(10): 2276.
- [20] DUBOIS M, GILLES K A, HAMILTON J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. *Analytical Chemistry*, 1956, 28(3): 350–356.
- [21] 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*, 72: 248–254.
- [22] BLUMENKRANTZ N, ASBOE-HANSEN G. New method for quantitative determination of uronic acids[J]. *Analytical Biochemistry*, 1973, 54(2): 484–489.
- [23] CHEN Xiaowen, QI Yijun, ZHU Chuanhe, et al. Effect of ultrasound on the properties and antioxidant activity of hawthorn pectin[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 131: 273–281.
- [24] YANG Liu, ZI Chengting, LI Yanlang, et al. An in-depth investigation of molecular interaction in zeaxanthin/corn silk glycan complexes and its positive role in hypoglycemic activity[J]. *Food Chemistry*, 2024, 438: 137986.
- [25] 孙晓燕, 郭慧, 余君彤, 等. 自溶对双孢菇多糖体外抗氧化和抗肿瘤活性的影响[J]. *食品科学*, 2022, 43(17): 74–83. [SUN Xiaoyan, GUO Hui, YU Juntong, et al. Autolysis alters the *in vitro* antioxidant and antitumor activities of agaricus bisporus polysaccharides[J]. *Food Science*, 2022, 43(17): 74–83.]
- [26] 陈丽叶, 常希光, 冯晓光, 等. 山药多糖的体外抗氧化活性[J]. *食品科学*, 2021, 42(19): 122–128. [CHEN Liye, CHANG Xiguang, FENG Xiaoguang, et al. *In vitro* antioxidant activity of Chinese Yam polysaccharides[J]. *Food Science*, 2021, 42(19): 122–128.]
- [27] 胡彦波, 翟丽媛, 刘扬, 等. 薇菜多糖的分离纯化及体外抗氧化活性[J]. *食品科学*, 2022, 43(1): 59–66. [HU Yanbo, ZHAI Liyuan, LIU Yang, et al. Isolation, purification and antioxidant activity of polysaccharides from *osmunda japonica*[J]. *Food Science*, 2022, 43(1): 59–66.]
- [28] 朱雨馨, 王文斌, 王佳婧, 等. 富锗木耳菌丝体不同溶剂提取物的体外抗氧化能力[J]. *食品工业科技*, 2024, 45(8): 21–28.
- [ZHU Yuxin, WANG Wenbin, WANG Jiajing, et al. Antioxidant capacity of different solvent extracts from ge-riched *auricularia auricula mycelium in vitro*[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2024, 45(8): 21–28.]
- [29] 崔泰花, 赵熙成, 戴雪纯, 等. 桔梗不同极性溶剂提取物抗氧化活性及成分分析[J]. *食品科技*, 2019, 44(12): 241–246, 252.
- [CUI Taihua, ZHAO Xicheng, DAI Xuechun, et al. Research on composition and antioxidant activities of different solvent extracts from *Platycodon grandiflorum*[J]. *Food Science and Technology*, 2019, 44(12): 241–264, 252.]
- [30] HUANG Fei, LIU Yang, ZHANG Ruifen, et al. Structural characterization and *in vitro* gastrointestinal digestion and fermentation of litchi polysaccharide[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 140: 965–972.
- [31] WANG Nifei, ZHANG Xiaojun, WANG Shaowei, et al. Structural characterisation and immunomodulatory activity of polysaccharides from white asparagus skin[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 227: 115314.
- [32] GILSENAN P M, RICHARDSON R K, MORRIS E R. Thermally reversible acid-induced gelation of low-methoxy pectin[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2000, 41(4): 339–349.
- [33] 崔欣. 石花菜多糖的提取纯化、理化性质和生物活性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2019: 39–40. [CUI Xin. Extraction, isolation, purification, physicochemical properties and bioactivity of polysaccharides from *gelidium mamansii*[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2019: 39–40.]
- [34] 邵丽君, 琚飞龙, 钟杨, 等. 过氧化氢和活性炭脱色对百蕊草多糖结构及应用特性影响的比较分析[J]. *食品科学*, 2023, 44(4): 146–151. [SHAO Lijun, JU Feilong, ZHONG Yang, et al. Effect of activated carbon or hydrogen peroxide decolorization on the structure and application properties of polysaccharides from the *sium chinense turcz*[J]. *Food Science*, 2023, 44(4): 146–151.]
- [35] YANG Jingjuan, ZHANG Xi, DAI Jinfeng, et al. Effect of fermentation modification on the physicochemical characteristics and anti-aging related activities of *Polygonatum kingianum* polysaccharides[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 235: 123661.
- [36] CAO Hui. Polysaccharides from Chinese tea: Recent advance on bioactivity and function[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 62: 76–79.
- [37] LIANG Jie, ZHAO Yonglei, YANG Furui, et al. Preparation and structure-activity relationship of highly active black garlic polysaccharides[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 220: 601–612.