

芜根多糖的分离纯化、结构表征及抗氧化活性

冯晓宁¹, 周珂葶¹, 宋洋波², 张义全², 吴小红¹, 白文洁¹, 许丹^{1*}

(1. 青海大学医学院公共卫生系, 青海西宁 810016) (2. 青海大学农牧学院, 青海西宁 810016)

摘要: 芜根是高原特有的经济作物, 芜根多糖具有抗氧化、抗疲劳、抗缺氧等生物活性, 为了探究芜根多糖的结构以及检测抗氧化活性, 该文使用水提醇沉法提取粗多糖, 分离纯化得到 BRP-5, 利用高效凝胶渗透色谱、离子色谱仪、扫描电镜、扫描隧道探针显微镜、红外光谱、同步热测量仪对其组成、形态和结构进行分析, 以其清除超氧阴离子自由基、羟自由基、DPPH 自由基能力评估体外抗氧化活性。结果表明, BRP-5 是以半乳糖醛酸为主要单糖的酸性多糖, 重均分子量为 16 670 Da, 表面有裂纹和裂隙, 最大高度 (Ten Point Height, Sz)、根均方高度 (Root Mean Square, Sq)、算术平均高度 (Roughness Average, Sa) 分别为 24.40、2.84、2.01 nm, 可能存在吡喃糖环, 无定型结构。DPPH 自由基和羟自由基清除率在 0.1~1.5 mg·mL⁻¹ 之间呈现剂量依赖性, 半抑制浓度 (50% Inhibiting Concentration, IC₅₀) 分别为 0.96 mg·mL⁻¹ 和低于 0.1 mg·mL⁻¹, 超氧阴离子自由基清除率低于 50%, BRP-5 具有一定的抗氧化活性。研究结果可提高芜根多糖结构的了解, 为相关抗氧化产品的开发提供理论依据。

关键词: 芜根多糖; 水提醇沉法; 结构表征; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2026)02-116-125

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.2.1723

Purification, Structural Characterization, and Antioxidant Activity of

Brassica rapa L. Polysaccharides

FENG Xiaoning¹, ZHOU Keting¹, SONG Yangbo², ZHANG Yiquan², WU Xiaohong¹, BAI Wenjie¹, XU Dan^{1*}

(1. Department of Public Health, Qinghai University Medical College, Xining 810016, China)

(2. College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining 810016, China)

Abstract: *Brassica rapa* L. is an economic crop unique to plateau regions; its polysaccharides possess antioxidant, anti-fatigue, and anti-hypoxic properties. To investigate the structure of *B. rapa* L. polysaccharides and assess their antioxidant activity, crude polysaccharides were extracted using the water extraction and ethanol precipitation method, and BRP-5 was separated and purified. The composition, morphology, and structure of BRP-5 were analyzed using high-performance gel permeation chromatography, ion chromatography, scanning electron microscopy, scanning tunneling microscopy, infrared spectroscopy, and synchronous thermal analysis. The *in vitro* antioxidant activity of BRP-5 was evaluated by measuring its ability to scavenge superoxide, hydroxyl, and DPPH radicals. The results indicated that BRP-5 is an acidic polysaccharide with galacturonic acid as the primary monosaccharide and has a weight-average molecular weight of 16 670 Da. Cracks and fissures were identified on its surface, with the ten-point height (Sz), root-mean-square height (Sq), and roughness average height (Sa) being 24.40, 2.84, and 2.01 nm, respectively. Further analysis revealed that BRP-5 may contain pyranose rings and exhibited an amorphous structure. BRP-5 also exhibited certain antioxidant

引文格式:

冯晓宁, 周珂葶, 宋洋波, 等. 芜根多糖的分离纯化、结构表征及抗氧化活性[J]. 现代食品科技, 2026, 42(2): 116-125.

FENG Xiaoning, ZHOU Keting, SONG Yangbo, et al. Purification, structural characterization, and antioxidant activity of *Brassica rapa* L. polysaccharides [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(2): 116-125.

收稿日期: 2024-11-20; 修回日期: 2024-12-25; 接受日期: 2025-01-08

基金项目: 青海省“昆仑英才高端创新创业人才”项目

作者简介: 冯晓宁 (2000-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 营养与食品卫生学, E-mail: 2784653269@qq.com

通讯作者: 许丹 (1988-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 营养与食品卫生学, E-mail: 2021990014@qhu.edu.cn

properties: scavenging rates of DPPH and hydroxyl radicals showed dose dependence within the range of 0.1~1.5 mg·mL⁻¹, with the 50% inhibiting concentration (IC₅₀) values being 0.96 mg·mL⁻¹ and <0.1 mg·mL⁻¹, respectively; the scavenging rate of superoxide anion radicals was <50%. The findings of this study provide novel insights into the structure of *B. rapa* L. polysaccharides and will aid in the development of related antioxidant products.

Key words: *Brassica rapa* L. polysaccharides; water extraction and ethanol precipitation method; structural characterization; antioxidant activity

芜根 (*Brassica rapa* L.), 十字花科芸薹属植物, 外形与圆萝卜相似, 生长于海拔 3 800 米以上的高寒地区^[1], 主要产地有西藏、青海、新疆等, 是我国西部高原地区特有的经济作物, 深受当地人民青睐。芜根也是一种传统的藏药, 富含蛋白质、类黄酮、多糖、硫代葡萄糖苷、多种矿物质元素、生物碱类、有机酸等生物活性成分^[2-5], 已有研究表明芜根具有抗缺氧^[6,7]、抗氧化、降血糖^[8]、降血脂^[9]、减肥^[10]、抗疲劳^[11]、抑制肿瘤^[12]、调节免疫^[13]、改善肠道菌群^[14,15]等多种生物学功能。芜根生物活性成分的研究成为近年来的热点, 有多项研究表明, 芜根多糖不仅具有抗氧化、抗疲劳作用, 而且可以刺激免疫活性^[2,16,17]。不同的提取方法会对多糖的理化性质、结构和生物活性产生影响, 目前多糖的提取方法主要包括超声波辅助提取法、回流提取法、水提醇沉法和热水浸提法等^[18], 回流提取法对溶剂的损耗较大, 热水浸

提法耗时耗能、效率低。已有的研究关于芜根多糖的提取方法、结构表征及功效综述见表 1。

本研究为了得到分子量相近、极性相同的均一多糖, 本文采用水提醇沉法提取、Sevage 法脱蛋白制备粗多糖, 凝胶过滤色谱进行分离纯化, 得到均一多糖, 使用高效凝胶渗透色谱法 (High Performance Gel Permeation Chromatography, HPGPC) 测定多糖的相对分子质量, 离子交换色谱柱测定单糖组成, 扫描电子显微镜 (Scanning Electron Microscope, SEM) 及扫描隧道探针显微镜 (Scanning Tunneling Microscope, STM) 观察表面形貌和微观形态, 红外光谱检测官能团, 同步热测量仪研究多糖的热性能, 并通过测定其超氧阴离子自由基清除能力、羟自由基 (OH·) 清除能力和 DPPH 自由基清除能力评估芜根多糖的体外抗氧化活性, 以提高对芜根多糖结构与活性的认识, 为拓宽芜根多糖在功能性产品上的开发与应用奠定理论基础。

表 1 芜根多糖的提取方法、结构表征及功效综述				
Table 1 A review of the extraction methods, structural characterization and efficacy of polysaccharides from <i>Brassica rapa</i> L.				
材料来源	提取方法	功效	多糖结构表征	参考文献
西藏拉萨	水提醇沉法	抗氧化	平均分子量 1.59×10^4 Da; 存在 C-H、吡喃糖环; 由阿拉伯糖、鼠李糖、半乳糖和葡萄糖 4 种单糖组成	[17]
新疆焉耆县塔合其乡	水提醇沉法	降血糖	存在 C-H、糖醛酸; 由鼠李糖、木糖、阿拉伯糖、果糖、葡萄糖和核糖 6 种单糖组成	[19]
新疆乌鲁木齐	水提醇沉法	抗氧化	BRP-1-1、BRP-2-1、BRP-2-2 平均分子量分别为 1 510、1 110 和 838 kDa; BRP-1-1 由甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖组成, BRP-2-1 由鼠李糖、半乳糖醛酸、半乳糖和阿拉伯糖组成, BRP-2-2 由鼠李糖和半乳糖醛酸组成	[16]
新疆乌鲁木齐	水提醇沉法	免疫刺激	BRNP-1: 6.9 kDa; BRNP-2: 4.8 kDa 由葡萄糖基残基组成	[2]
新疆阿克苏柯坪县	水提醇沉法	抗 Lewis 肺癌	无	[20]
西藏拉萨曲水县	水提醇沉法	抗急性高原缺氧	无	[21]
青海玉树	超声辅助热水浸提法	抗疲劳	分子量为 70.4 kDa; 存在吡喃糖环; 主要由鼠李糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖组成; 表面为粗糙的片状结构	[22]
西藏拉萨	水提醇沉法	抗缺氧	无	[23]
日本	水提醇沉法	抗肿瘤	平均分子量 100.6 kDa; 含葡萄糖、半乳糖醛酸、半乳糖、阿拉伯糖	[24]

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜芫根购买于青海省玉树藏族自治州,选取无病虫害的成熟期芫根,于2023年10月份采收运回实验室,置于-20℃冷库保存,使用手动切片机将清洗后的芫根切成3 mm厚度的薄片,冷冻干燥机干燥,粉碎后获得芫根干粉,保存备用。

无水乙醇、Sevage试剂、 $11.23\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{H}_2\text{O}_2$ 溶液、 $0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸、蒸馏水、 $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaCl}$ 溶液、 $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaCl}$ 、 $0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaCl}$ 、 $1.0\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaCl}$ 、标准品P5-P800(葡聚糖)溶液($5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)、三氟乙酸(A0356762, ACROS)、质量分数为50%的氢氧化钠溶液、醋酸钠、单糖标准品均购于博睿糖生物技术有限公司; $15\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaOH}$ 溶液、 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaAc}$ 溶液所有试剂均为分析纯,购于博睿糖生物技术有限公司;抑制与产生超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)测定试剂盒、羟自由基($\text{OH}^{\cdot}$)测定试剂盒、DPPH自由基清除能力试剂盒均购于南京建成生物工程研究所。

1.2 仪器与设备

SCIENTZ-30F/A普通型硅油原位冷冻干燥机,宁波新芝生物科技股份有限公司; Multiskan™ FC酶标仪,赛默飞世尔科技(中国)有限公司; Sorvall ST8小型台式离心机,赛默飞世尔科技(中国)有限公司; BSA124S-CW电子天平,德国生命科学集团Sartorius AG; Nexera LC-40系列高效液相色谱仪,岛津企业管理(中国)有限公司; DEAE cellulose-52阴离子交换纤维素填料,英国Whatman™公司; RID-20A示差检测器,岛津企业管理(中国)有限公司; SHODEX示差折光检测器,岛津企业管理(中国)有限公司; MD200-2氮吹仪,杭州奥盛仪器有限公司; ICS-5000离子色谱仪,戴安中国有限公司; TA Q200和STA 449 F3 Phoenix同步热测量仪器,德国耐驰仪器制造有限公司; Nicolet 6700傅里叶红外光谱仪,赛默飞世尔科技(中国)有限公司; JSM-5600LV扫描电子显微镜,日本电子株式会社; CSPM5500扫描隧道探针显微镜,本原纳米仪器有限公司; 752 Pro紫外可见分光光度计,上海棱光技术有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 粗多糖的提取

采取水提醇沉法提取粗多糖。将600 g样品置于提取罐中,按照料液比1:10(m/V)加入蒸馏水,沸

水提取3 h,重复3次。上清液通过滤网除杂,浓缩,按照料液比1:4(m/V)加入无水乙醇,搅拌均匀,在4℃下静置12 h以沉淀粗多糖,将沉淀物重新用蒸馏水溶解,60℃水浴挥去乙醇,加入25%体积的Sevage试剂,将混合溶液置于台式浓缩器中,振摇20、30 min后收集上清液,以上步骤重复3次,而后离心除蛋白,使用 H_2O_2 溶液进行脱色,1 000 Da透析袋流水透析48 h,浓缩后用冷冻干燥机干燥,得到芫根粗多糖。

1.3.2 粗多糖的极性分离与纯化

按照之前文献报道的方法^[25]对粗多糖进行极性分离,具体流程为:DEAE52填料使用 $0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐酸浸泡1 h,之后洗去填料中的杂质物,按照料液比1:5(m/V)加入蒸馏水洗脱至中性。调整流量为 $5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,蒸馏水平衡2 h。用蒸馏水溶解粗多糖,加热,斡旋, $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心,取上清液上样。调整流量为 $15\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的蒸馏水进行洗脱。使用四组溶剂洗脱,四组溶剂分别为:三倍体积的水、 $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaCl}$ 、 $0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaCl}$ 、 $1.0\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaCl}$ 洗脱。苯酚硫酸法进行追踪检测。酶标仪490 nm进行检测。绘制散点图。根据峰形,分别收集,浓缩,3 500 Da透析袋透析,冷冻干燥。得到各个组分,分别命名为:BRP-W、BRP-0.2M、BRP-0.5M、BRP-1.0M。使用离子交换层析法^[26]对粗多糖进行纯化。具体流程为:称取适量待纯化多糖,流动相溶解, $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,上清液上样,流量为 $1.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,进样20 mL。通过全自动凝胶纯化系统进行纯化,结合示差检测器在线检测收集,收集对称峰。将收集液透析,通过旋转蒸发仪进行浓缩,冷冻干燥,得到凝胶柱分离纯化的多糖。

1.3.3 相对分子量与纯度的测定

根据之前文献报道的方法^[27]进行测定。具体流程为:以不同相对分子质量的葡聚糖为标准品,采取高效凝胶渗透色谱法测定纯化后多糖(BRP-5)的相对分子质量。流动相为 $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氯化钠溶液,流量为 $0.8\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温为40℃,检测器为示差检测器RID-20A,色谱柱为BRT105-103-101串联凝胶柱($8\times 300\text{ mm}$),进样体积为25 μL ,分析时间为60 min,以不同相对分子质量的Dextran P-系列标准葡聚糖标准品制作标准曲线,根据多糖样品溶液的洗脱时间与标准曲线对照,用Agilent GPC软件计算其相对分子质量。

1.3.4 单糖组成测定

根据之前文献的报道方法^[28,29]进行测定。用离子

色谱仪 (Ion Chromatograph, IC) 分析纯化后芫根多糖组分 (BRP-5) 的单糖组成。精密称量 5 mg 样品置于安瓿瓶中, 加入 $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TFA 2 mL, 120°C 水解 3 h。准确吸取酸水解溶液转移至管中, 氮吹吹干, 加入 5 mL 去离子水涡旋混匀, 吸取 50 μL 加入 950 μL 去离子水, $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min。取上清液进离子色谱仪分析。测定条件: 色谱柱为 Dionex CarbpacTMPA20 ($3 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$), 流动相 A 为 H_2O , B 为 $15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH, C 为 $15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 和 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaAc, 流量为 $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 进样量为 25 μL , 柱温为 30°C , 检测器为电化学检测器。根据绝对定量方法, 使用单糖标准品对单糖进行定量。

1.3.5 扫描电子显微镜检测

将 BRP-5 用导电胶带粘到样品台上, 将样品台进行喷金处理, 使用扫描电子显微镜在 20 kV 的加速电压条件下, 分别采用 200 倍、500 倍、2 000 倍和 5 000 倍的放大倍数对样品进行观察分析。

1.3.6 扫描隧道探针显微镜检测

多糖样品的制备按照 Wei 等^[30] 的方法并稍加修改。配制 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的母液, 在 50°C 下磁力搅拌 2 h 以降低多糖的聚集性, 然后将母液稀释 500 倍, 重复磁力搅拌过程, 使用 0.22 μm 滤膜过滤滴至硅片上风干 24 h, 扫描隧道探针显微镜测定条件为: 以未滴样的硅片为扫描基地, 对 BRP-5 的微观形态特征进行扫描获得 STM 图像, 扫描频率: 3.00 Hz。

1.3.7 红外光谱检测

采用溴化钾压片法, 将少量 BRP-5 与溴化钾混合用研钵充分研磨至没有颗粒, 用压片机压成透明的薄片, 在 4 cm^{-1} 分辨率下进行扫描测定, 扫描波长为 $400 \sim 4\,000 \text{ cm}^{-1}$, 扫描次数为 3 次。

1.3.8 热特性分析

通过同步热测量仪进行导数热重法 (TG/DTG) 和差示扫描量热法 (DSC) 研究多糖的热性能。将 10 mg 多糖样品放入铝制坩埚中, 并在加热过程中以 $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 的加热程序记录 30 至 800°C (TG/DTG) 和 -50 至 200°C (DSC) 的曲线。

1.3.9 DPPH清除能力测定

样品准备: 将 BRP-5 用纯净水溶解, 分别配成质量浓度为 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0、5.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的多糖溶液, 4°C 保存备用。按照 DPPH 自由基清除能力试剂盒说明书进行操作, 使用分光光度计在 517 nm 处读取吸光度值, 计算各质量浓度多糖的 DPPH 自由基

清除率, 计算公式 (1) 如下:

$$D_1 = \frac{A_0 - (A_2 - A_1)}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

D_1 ——DPPH 自由基清除率, %;

A_0 ——空白组吸光度;

A_1 ——对照组吸光度;

A_2 ——样品组吸光度。

1.3.10 抑制超氧阴离子自由基能力测定

按照抑制与产生超氧阴离子自由基 ($\text{O}_2^{\cdot-}$) 测定试剂盒说明书进行操作, 使用分光光度计在 550 nm 处读取吸光度值, 清除超氧阴离子自由基计算公式 (2) 如下:

$$D_2 = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

D_2 ——超氧阴离子自由基清除率, %;

A_1 ——对照组吸光度;

A_2 ——样品组吸光度。

1.3.11 羟自由基 ($\text{OH}^{\cdot}$) 清除能力测定

按照羟自由基 ($\text{OH}^{\cdot}$) 测定试剂盒说明书进行操作, 使用分光光度计在 550 nm 处读取吸光度值, 羟自由基 ($\text{OH}^{\cdot}$) 清除率计算公式 (3) 如下:

$$D_3 = \frac{A_1 - A_2}{A_1 - A_0} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

D_3 ——羟自由基清除率, %;

A_0 ——空白组吸光度;

A_1 ——对照组吸光度;

A_2 ——样品组吸光度。

1.4 数据处理

采用 PeakFit v 4.12 软件对红外光谱图进行分析, Excel 2016 整理数据, Origin 2022 绘制图表。

2 结果与讨论

2.1 芫根多糖的提取与分离

采用水提醇沉法提取芫根多糖, 得到粗多糖 103.2 g, 得率为 17.20%。用阴离子交换法对芫根粗多糖进行分馏, 并根据所用洗脱液命名为 BRP-W、BRP-0.2M、BRP-0.5M、BRP-1.0 M, 四个组分得率分别为 3.20%、20.60%、2.80%、0.40%, 芫根多糖的极性分离流程见图 1。

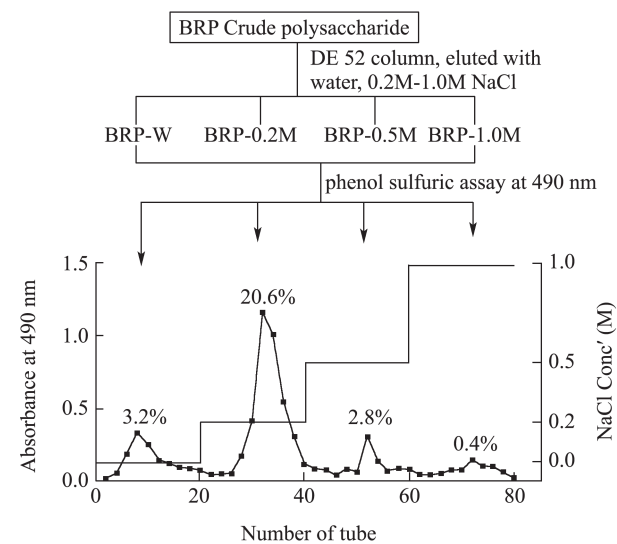


图 1 粗 BRP 的极性分离流程图

Fig.1 Flow diagram of polar separation of crude BRP

2.2 芫根粗多糖的凝胶纯化

使用全自动凝胶纯化系统（BRT-GS）对纯度最高的 BRP-0.2M 进行纯化。根据凝胶纯化色谱图（见图 2）对多糖进行分管收集，分别收集 18.8~25.4、25.4~35、39~44、44~50、50~60 min 的组分，分别命名为 BRP-1、BRP-2、BRP-3、BRP4、BRP-5，得率分别为 1.82%、1.62%、2.79%、3.68%、1.41%。

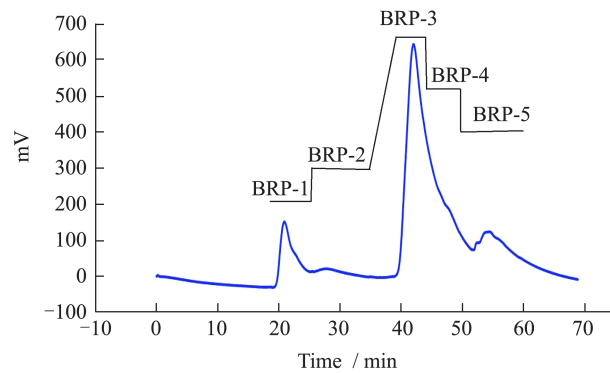


图 2 BRP-0.2M 的凝胶色谱图

Fig.2 Gel chromatogram of BRP-0.2M

2.3 芫根多糖的分子量与纯度测定

HPGPC 测定多糖相对分子质量并验证纯度。BRP-4 和 BRP-5 的 HPGPC 色谱图仅有一个对称峰，表明 BRP-4 和 BRP-5 为均一多糖。得到标准品校正曲线： $\lg M_w = -0.234 \cdot 2RT + 11.885$ ，相关系数 $R^2 = 0.9927$ ； $\lg M_n = -0.234 \cdot 2RT + 11.877$ ，相关系数 $R^2 = 0.992$ 。根据校正曲线方程代入保留时间（见图 3）计算 BRP-3、BRP-4、BRP-5 的分子量及纯度，数据见表 2。聚合物

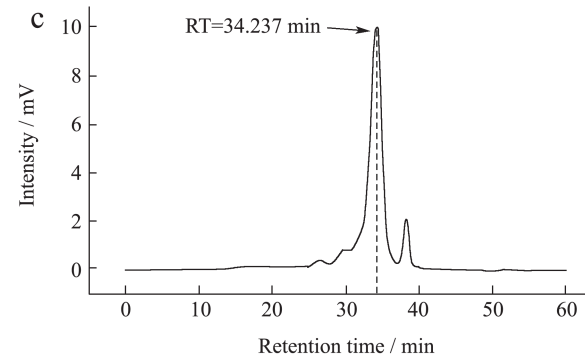
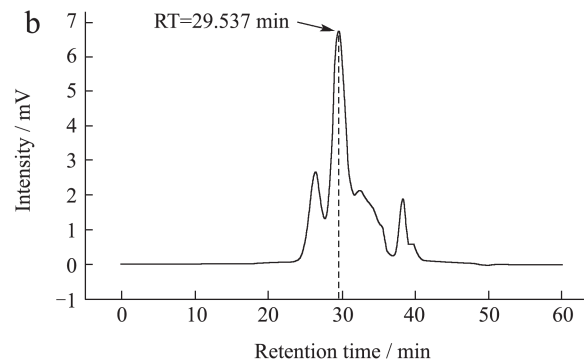
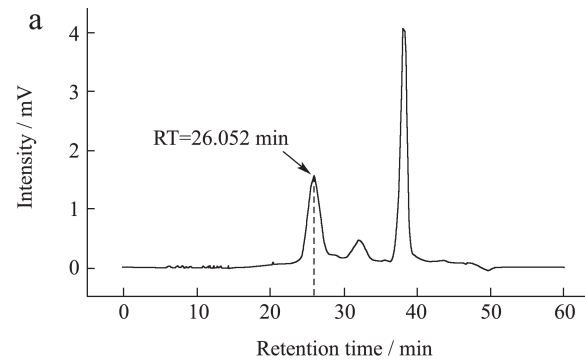
分散性指数（Polymer Dispersity Index, PDI）为重均分子量（Weight-Average Molecular Weight, M_w ）与数均分子量（Number-Average Molecular Weight, M_n ）的比值，用于衡量多糖分子量分布的不均一程度，BRP-3、BRP-4 和 BRP-5 的 PDI 分别为 1.02、1.23 和 1.02，表明分子在水溶液中的不均一程度较低，不会形成大的聚合物^[31]。

表 2 BRP-3、BRP-4、BRP-5 的相对分子质量及纯度

Table 2 Relative molecular weight and purity of BRP-3,

BRP-4 and BRP-5

组分	RT/min	M_w /Da	M_n /Da	PDI	纯度/%
BRP-3	34.237	7 390	7 220	1.02	91.99
BRP-4	33.658	10 090	9 863	1.23	96.43
BRP-5	32.727	16 670	16 289	1.02	99.18



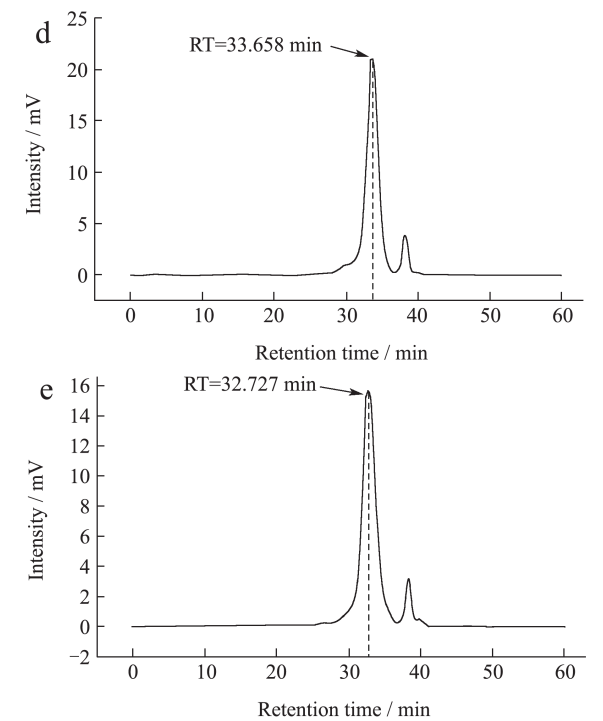


图3 芜根多糖组分的分子量测定

Fig.3 Determination of molecular weight of turnip root polysaccharide fractions

注：(a) BRP-1；(b) BRP-2；(c) BRP-3；(d) BRP4-4；(e) BRP-5。

2.4 BRP-5的单糖组成

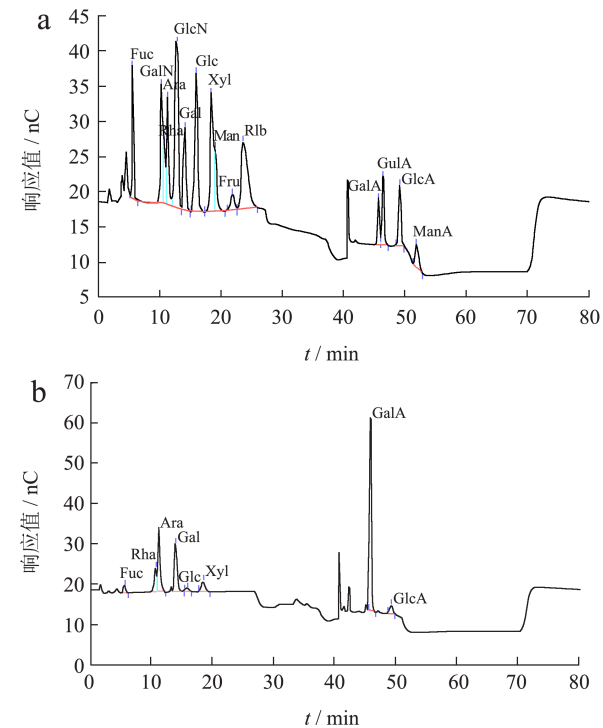


图4 离子色谱图

Fig.4 Ion chromatogram

注：(a) 单糖标准品；(b) BRP-5。

BRP-5 组分纯度较高，采用离子色谱法测定其单糖组成，单糖标准品和 BRP-5 的离子色谱图见图 4，通过与单糖标准品图谱对比，根据出峰时间确定单糖种类，峰面积确定各种单糖的摩尔百分比，具体数据见表 3。表中得出 BRP-5 主要由半乳糖醛酸、半乳糖、阿拉伯糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、木糖、岩藻糖和葡萄糖组成，单糖的摩尔比为 0.704:0.096:0.078:0.071:0.024:0.017:0.008:0.003。结果表明，BRP-5 为酸性多糖，半乳糖醛酸是 BRP-5 中的主要单糖，这与 Xie^[17] 的研究结果不同，可能是芜根的产地与实验方法的不同导致的差异，Wang^[16] 所研究的 BRP-2-1 同样是由鼠李糖、半乳糖醛酸、半乳糖和阿拉伯糖组成，BRP-2-2 由鼠李糖和半乳糖醛酸组成摩尔比为 1.27:54.92。

表 3 BRP-5的单糖检测结果				
Table 3 The monosaccharide detection results of BRP-5				
名称	峰面积	保留时间/ min	摩尔比	含量/ (μg/mg)
岩藻糖	0.387	5.709	0.008	2.07
氨基半乳糖盐酸盐	0	10.392	0.000	0.00
鼠李糖	1.966	10.8	0.071	17.40
阿拉伯糖	6.096	11.3	0.078	17.51
盐酸氨基葡萄糖	0	12.825	0.000	0.00
半乳糖	5.564	14.059	0.096	25.86
葡萄糖	0.313	15.95	0.003	0.77
木糖	1.511	18.45	0.017	3.74
甘露糖	0	19.084	0.000	0.00
果糖	0	21.859	0.000	0.00
核糖	0	23.617	0.000	0.00
半乳糖醛酸	16.256	45.717	0.704	205.05
古罗糖醛酸	0	46.45	0.000	0.00
葡萄糖醛酸	1.063	49.1	0.024	6.95
甘露糖醛酸	0	51.875	0.000	0.00

2.5 扫描电子显微镜（SEM）与扫描隧道探针显微镜（STM）分析

分别在 200、500、2 000 和 5 000 倍的放大倍数下对 BRP-5 进行了扫描电镜分析。图 5 显示，在 200 倍的放大倍数下 BRP-5 呈现不同破碎程度的片状，在 500 倍和 2 000 倍的放大倍数下 BRP-5 紧密的表面有较多凸起，表面形态较为粗糙，在 5 000 倍的放大倍数下可以观察到芜根多糖表面具有不对称的裂纹与裂隙。在赵文瑾^[32]的研究中指出芜根多糖的其中一种组分表面存在孔洞，本研究未观察到的原因可能与提取工艺、醇沉条件等有关。

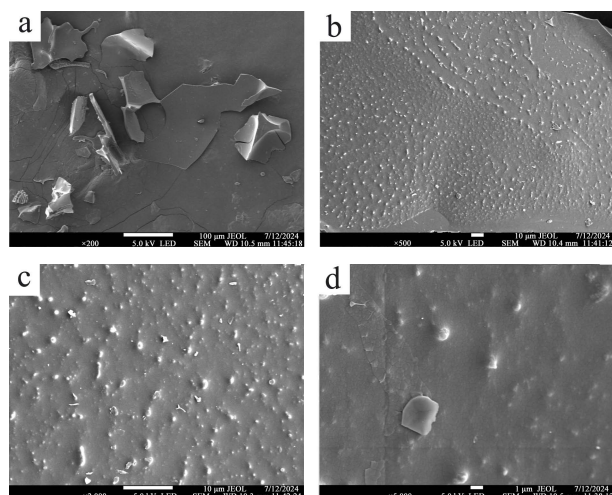


图 5 BRP-5 的放大图

Fig.5 Magnifications of BRP-5

注:(a) 200 倍, (b) 500 倍, (c) 2 000 倍, (d) 5 000 倍。

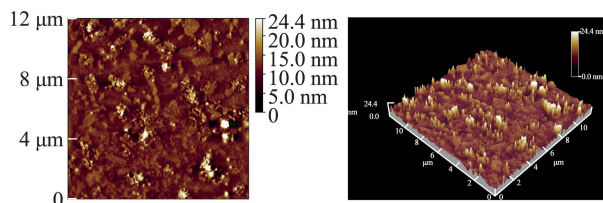


图 6 BRP-5 的 STM 图像

Fig.6 STM image of BRP-5

BRP-5 的 STM 图像尺寸为 $12\ \mu\text{m} \times 12\ \mu\text{m}$, 芫根多糖呈现出大小不均的圆球状, 没有表现出链状分子的构象, 表明芫根多糖溶解于水后出现分子聚集形态。芫根多糖分子峰值高度为 $23.7\ \text{nm}$, BRP-5 的 S_z 、 S_q 和 S_a 分别为 24.40 、 2.84 和 $2.01\ \text{nm}$, 这表明, 芫根多糖的结构是由于分子链的交织以及分子间和分子内氢键的相互作用而产生团聚^[33]。

2.6 红外光谱分析

在红外光谱中, 峰出现的位置及其变化的强度取决于样品中分子化学键所在的化学环境和振动形态。BRP-5 的红外谱图见图 7, 在 $3\ 420\ \text{cm}^{-1}$ 附近产生的宽而强烈的吸收峰是由 O-H 的伸缩振动所致, 说明是在多糖分子内部和分子间引起的羟基的拉伸振动^[34], 在 $2\ 937\ \text{cm}^{-1}$ 附近的较弱吸收峰则是由于 C-H 的伸缩振动, 这两类化学键普遍存在于碳水化合物分子中^[32]。在 $1\ 614\ \text{cm}^{-1}$ 处也存在明显的吸收峰, 有研究认为这可能是由糖醛酸中的羧酸基团或蛋白质中的酰胺 I 带上的 C=O 的伸缩振动引起的^[35], 此外 C-H 的弯曲振动和 C-O 的伸缩振动分别体现在 $1\ 422\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 246\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰^[36], $1\ 017\ \text{cm}^{-1}$ 附近的信号峰

可能归因于 C-OH 和 C-O-C 的伸缩振动, 是吡喃糖环上的特征吸收峰^[34], 这证明芫根多糖中可能存在吡喃糖环^[37]。

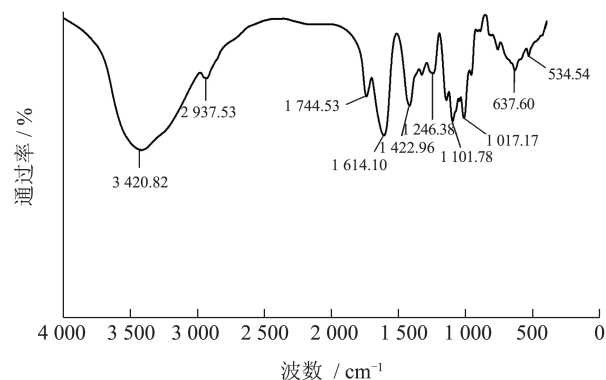


图 7 BRP-5 的红外谱图

Fig.7 Infrared spectrum of BRP-5

2.7 热特性分析结果

采用热重法、导数热重法 (TG-DTG) 和差示扫描量热法 (DSC) 研究了 BRP-5 的热性质, 结果见图 8。图 8 中显示的 TG-DTG 曲线表明, 在 $30\ ^\circ\text{C}$ 至 $800\ ^\circ\text{C}$ 的温度范围内有四次明显的质量损失。第一次质量损失发生在 $78.70\ ^\circ\text{C}$ 至 $215.90\ ^\circ\text{C}$ 之间, 损失率为 10.57% , 这部分的损失可归因于挥发成分的蒸发; 第二次质量损失发生在 $215.90\ ^\circ\text{C}$ 至 $291.90\ ^\circ\text{C}$ 之间, 损失率为 39.31% , 质量损失最大, 这部分可能是多糖结构解聚导致的质量损失; 第三次质量损失发生在 $291.90\ ^\circ\text{C}$ 至 $584.80\ ^\circ\text{C}$ 之间, 损失率为 10.92% , 第四次质量损失在 $584.80\ ^\circ\text{C}$ 至 $800.00\ ^\circ\text{C}$ 之间, 损失率为 4.61% , 这两次的质量损失说明有机物产生了氧化分解; 最终质量剩余 33.93% 。根据图 8 所示的冷却周期, 没有出现结晶峰表明多糖可能完全是无定型结构^[38]。图 9 中第二个加热周期没有明显的玻璃化转化温度, 说明多糖可能在加热过程中结晶, 从而失去了玻璃化转变特性^[33]。

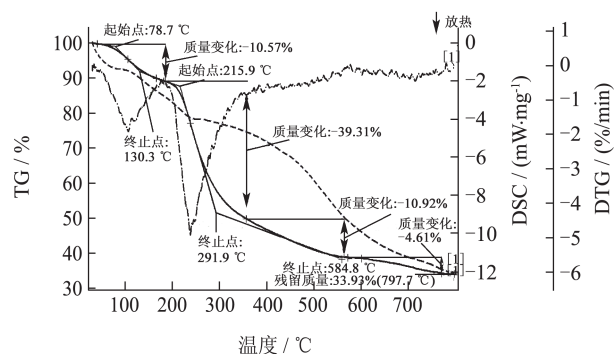


图 8 TG-DTG 曲线 (实线) 和冷却 DSC 曲线 (虚线)

Fig.8 TG-DTG curve and cooling DSC curve

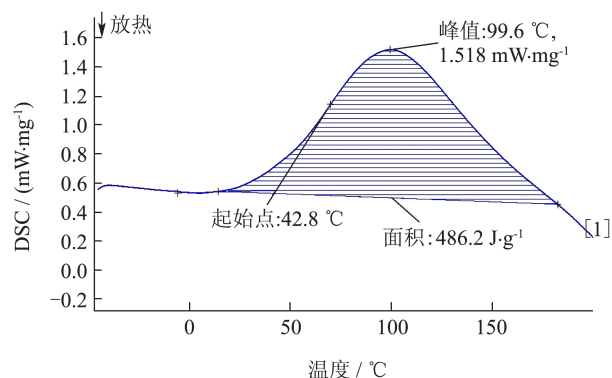


图9 第二条加热 DSC 曲线

Fig.9 The second heating DSC curve

2.8 抗氧化活性分析

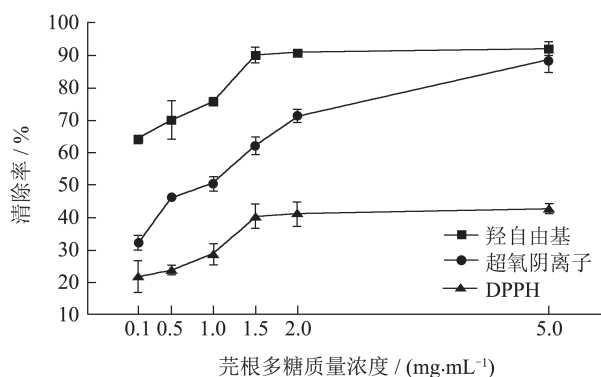


图 10 BRP-5 的体外抗氧化活性

Fig.10 Antioxidant activity of BRP-5 in vitro

芫根多糖的体外抗氧化活性结果如图 10 所示。BRP-5 的 DPPH 自由基清除能力、抑制超氧阴离子自由基能力、羟自由基清除能力均随质量浓度上升而呈现上升趋势，并且羟自由基清除能力>DPPH 自由基清除能力>抑制超氧阴离子自由基能力。在 5.0 mg·mL⁻¹ 的质量浓度下，DPPH 自由基清除能力达到 88.68%，根据公式计算得到其半抑制浓度（50% Inhibiting Concentration, IC₅₀）为 0.96 mg·mL⁻¹。在李亚童^[39]的研究中，芫根多糖的 DPPH 自由基清除能力在 0~1.0 mg·mL⁻¹ 范围内随质量浓度上升而增高，并且在 1.0 mg·mL⁻¹ 的质量浓度时清除率为 74.56%。证明芫根多糖具有良好的供氢能力，从而表现出良好的 DPPH 自由基清除活性。同时 BRP-5 表现出了良好的羟自由基清除能力，在 0.1~1.5 mg·mL⁻¹ 之间羟自由基清除率随质量浓度升高而上升，0.1 mg·mL⁻¹ 的 BRP-5 羟自由基清除率为 64.06%，1.5 mg·mL⁻¹ 时清除率高达 90.04%，而后随质量浓度的上升清除率稳定在 91.00% 左右，其 IC₅₀ 低于 0.1 mg·mL⁻¹，说明羟自由基清除能力较好，IC₅₀ 值小于 10 mg·mL⁻¹ 就足以证明

该物质具有较好的抗氧化活性，所以 BRP-5 的 DPPH 自由基清除能力和羟自由基清除能力较强。相比之下其抑制超氧阴离子能力较差，在 0.1~1.5 mg·mL⁻¹ 之间抑制超氧阴离子能力逐渐上升，抑制率由 21.80% 上升至 40.36%，而后稳定在 41.00% 左右，这可能与多糖的提取方式等因素有关。总体而言，BRP-5 具备一定能力的抗氧化活性且呈现剂量依赖性。

3 结论

本文通过水提醇沉法提取芫根多糖，酶标法对粗多糖进行极性分离，离子交换层析法对芫根多糖进行纯化，得到最终组分 BRP-5。通过高效凝胶渗透色谱法测定其分子量得到 BRP-5 的重均分子量为 16 670 Da，离子色谱仪测单糖组成结果显示 BRP-5 以半乳糖醛酸为主要单糖的酸性多糖，半乳糖醛酸、半乳糖、阿拉伯糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、木糖、岩藻糖和葡萄糖的摩尔比为 0.704:0.096:0.078:0.071:0.024:0.017:0.008:0.003。扫描电子显微镜结果显示 BRP-5 表面具有不对称的裂纹与裂隙，扫描隧道探针显微镜结果显示其 S_z、S_q 和 S_a 分别为 24.40、2.84 和 2.01 nm，红外光谱分析 BRP-5 中可能存在吡喃糖环，热重分析表明 BRP-5 是无定型结构。体外抗氧化活性结果显示 BRP-5 的体外抗氧化活性较强，且在 0.1~1.5 mg·mL⁻¹ 之间呈现一定的剂量依赖性，DPPH 自由基和羟自由基的 IC₅₀ 分别为 0.96 mg·mL⁻¹ 和低于 0.1 mg·mL⁻¹，但抑制超氧阴离子能力较差。以上研究结果可为芫根多糖的深入研究提供参考依据。

参考文献

- [1] WANG C, ZHU H, CHENG Y, et al. Aqueous extract of *Brassica rapa* L.'s impact on modulating exercise-induced fatigue via gut-muscle axis [J]. *Nutrients*, 2023, 15(22): 4737.
- [2] CHEN Z E, WUFUER R, JI J H, et al. Structural characterization and immunostimulatory activity of polysaccharides from *Brassica rapa* L. [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(44): 9685-9692.
- [3] WUFUER R, BAI J, LIU Z, et al. Biological activity of *Brassica rapa* L. polysaccharides on RAW264.7 macrophages and on tumor cells [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2020, 28(7): 115330.
- [4] ZHAO H, SHANG G, YIN N, et al. Multi-omics analysis reveals the mechanism of seed coat color formation in *Brassica rapa* L. [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2022, 135(6): 2083-2099.
- [5] CAO Q, WANG G, PENG Y. A critical review on phytochemical profile and biological effects of turnip (*Brassica rapa* L.) [J]. *Frontiers in Nutrition*, 2021, 8: 721733.
- [6] HUA H, ZHANG W, LI J, et al. Neuroprotection against cerebral ischemia/reperfusion by dietary phytochemical

- extracts from Tibetan turnip (*Brassica rapa* L.) [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2021, 265: 113410.
- [7] HUA H, ZHU H, LIU C, et al. Bioactive compound from the Tibetan turnip (*Brassica rapa* L.) elicited anti-hypoxia effects in OGD/R-injured HT22 cells by activating the PI3K/AKT pathway [J]. Food & Function, 2021, 12(7): 2901-2913.
- [8] CAO W, WANG C, MAYHESUMU X, et al. Isolation, structural elucidation, antioxidant and hypoglycemic activity of polysaccharides of *Brassica rapa* L [J]. Molecules, 2022, 27(9): 3002.
- [9] HUA H, LIU L, ZHU T, et al. Healthy regulation of Tibetan *Brassica rapa* L. polysaccharides on alleviating hyperlipidemia: A rodent study [J]. Food Chemistry: Molecular Sciences, 2023, 6: 100171.
- [10] TANAKA Y, INABA C, SAWA T, et al. *Brassica rapa* L. prevents Western diet-induced obesity in C57BL/6 mice through its binding capacity of cholesterol and fat [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2023, 87(10): 1205-1211.
- [11] ZHU H, YANG Y, LI Z, et al. An integrated network pharmacology and metabolomics approach to reveal the immunomodulatory mechanism of *Brassica rapa* L. (Tibetan Turnip) in fatigue mice [J]. Food & Function, 2022, 13(21): 11097-11110.
- [12] WEI J, CHEN F, LIU Y, et al. Comparative metabolomics revealed the potential antitumor characteristics of four endophytic fungi of *Brassica rapa* L [J]. ACS Omega, 2020, 5(11): 5939-5950.
- [13] GUO W, ZHANG Q, DU Y, et al. Immunomodulatory activity of polysaccharides from *Brassica rapa* by activating Akt/NF- κ B signaling [J]. Chinese Herbal Medicines, 2022, 14(1): 90-96.
- [14] ALOTAIBI B, MOKHTAR F A, EL-MASRY T A, et al. Antimicrobial activity of *Brassica rapa* L. flowers extract on gastrointestinal tract infections and antiulcer potential against indomethacin-induced gastric ulcer in rats supported by metabolomics profiling [J]. Journal of Inflammation Research, 2021, 14: 7411-7430.
- [15] LIU L, LIU C, HUA H, et al. Effect of polysaccharides from Tibetan turnip (*Brassica rapa* L.) on the gut microbiome after *in vitro* fermentation and *in vivo* metabolism [J]. Food & Function, 2022, 13(5): 3063-3076.
- [16] WANG W, WANG X, YE H, et al. Optimization of extraction, characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Brassica rapa* L [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 82: 979-988.
- [17] XIE Y, JIANG S, SU D, et al. Composition analysis and anti-hypoxia activity of polysaccharide from *Brassica rapa* L [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2010, 47(4): 528-533.
- [18] LOVEGROVE A, EDWARDS C H, DE NONI I, et al. Role of polysaccharides in food, digestion, and health [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2017, 57(2): 237-253.
- [19] 艾克拜尔江·阿巴斯,李冠,王静.新疆芜菁多糖降血糖作用的研究[J].新疆农业科学,2011,48(3):471-479.
- [20] 阿依夏古丽·巴卡斯,胡晟,陈莉,等.芜菁酸性多糖BRAP-2体内抗Lewis肺癌活性研究[J].食品安全质量检测学报,2019,10(15): 5111-5116.
- [21] 谭秀娟.芜菁总多糖提取及抗急性高原缺氧作用研究[D].成都:西南交通大学,2019.
- [22] ZHAO W J, ZHANG W Y, LIU L, et al. Fractionation, characterization and anti-fatigue activity of polysaccharides from *Brassica rapa* L [J]. Process Biochemistry, 2021, 106: 163-175.
- [23] 王福清.芜菁多糖的提取及其抗缺氧能力研究[J].中国调味品, 2024,49(6):195-199.
- [24] MATSUI R, ENDO K, SAIKI T, et al. Characterization and anti-tumor activities of polysaccharide isolated from *Brassica rapa* L. via activation of macrophages through TLR2-and TLR4-Dependent pathways [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2024, 752: 8.
- [25] 胡娜.党参多糖/纳米硒复合物的制备及其体外抗肝癌作用研究[D].湖北:湖北中医药大学,2022.
- [26] HUO J, LEI M, ZHOU Y, et al. Structural characterization of two novel polysaccharides from *Gastrodia elata* and their effects on *Akkermansia muciniphila* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 186: 501-509.
- [27] WANG H, SHI S, BAO B, et al. Structure characterization of an arabinogalactan from green tea and its anti-diabetic effect [J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 124: 98-108.
- [28] LI Q, GENG X, ZHU L, et al. Structural characterization and antioxidant properties of a novel polysaccharide isolated from *Jiuzao in vitro* and *in vivo* [J]. Food Research International, 2022, 162(Pt A): 111940.
- [29] 魏霞,王星星,方勤勤,等.基于肠道菌群探究一贯煎多糖的结构及改善小鼠肝纤维化作用[J].中草药,2024,55(4):1110-1123.
- [30] WEI C Y, LI W Q, SHAO S S, et al. Structure and chain conformation of a neutral intracellular heteropolysaccharide from mycelium of *Paecilomyces cicadae* [J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 136: 728-737.
- [31] HWANG H J, KIM S W, CHOI J W, et al. Production and characterization of exopolysaccharides from submerged culture of *Phellinus linteus* KCTC 6190 [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003, 33(2-3): 309-319.
- [32] 赵文瑾.芜菁多糖提取、分离及抗疲劳机理研究[D].无锡:江南大学,2021.
- [33] FENG L, HAN N, HAN Y B, et al. Structural analysis of a soluble polysaccharide GSPA-0.3 from the root of *Panax ginseng* C. A. Meyer and its adjuvant activity with mechanism investigation [J].

- Carbohydrate Polymers, 2024, 326: 121591.
- [34] NIE C, ZHU P, MA S, et al. Purification, characterization and immunomodulatory activity of polysaccharides from stem lettuce [J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 188: 236-242.
- [35] LONG H, GU X, ZHOU N, et al. Physicochemical characterization and bile acid-binding capacity of water-extract polysaccharides fractionated by stepwise ethanol precipitation from *Caulerpa lentillifera* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 150: 654-661.
- [36] RAJAURIA G, RAVINDRAN R, GARCIA-VAQUERO M, et al. Molecular characteristics and antioxidant activity of laminarin extracted from the seaweed species *Laminaria hyperborea*, using hydrothermal-assisted extraction and a multi-step purification procedure [J]. Food Hydrocolloids, 2021, 112: 106332.
- [37] MALINOWSKA E, KLIMASZEWSKA M, STRĄCZEK T, et al. Selenized polysaccharides-Biosynthesis and structural analysis [J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 198: 407-417.
- [38] CAILLOUX J, RAQUEZ J M, LO RE G, et al. Melt-processing of cellulose nanofibril/polylactide bionanocomposites via a sustainable polyethylene glycol-based carrier system [J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 224: 115188.
- [39] 李亚童,阿依夏古丽·巴卡斯,李改茹,等.新疆芜菁酸性多糖分离纯化、抗氧化活性研究及红外表征[J].食品安全质量检测学报,2022,13(4):1050-1057.