DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20251114002
引用格式: 李柏阳, 韩舒晨, 张正海, 等. 黑海棠果多糖提取工艺优化及抗氧化活性评价[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(9): 165–173.
LI BY, HAN SC, ZHANG ZH, *et al*. Optimization of extraction process and antioxidant activity evaluation of from black *Crabapple* polysaccharides [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(9): 165–173. (in Chinese with English abstract).

黑海棠果多糖提取工艺优化及抗氧化活性评价

李柏阳, 韩舒晨, 张正海, 李国巍, 姬妍茹*, 石 杰*, 潘 静, 杨庆丽, 吕文庆

(黑龙江省科学院大庆分院, 大庆 163000)

摘 要: 目的 探究黑海棠果多糖(black *Crabapple* polysaccharides, BCP)的高效提取方法及其生物活性。**方法** 以黑海棠果为原料, 采用单因素实验结合响应面法优化 BCP 的提取条件, 高效液相色谱技术分析其单糖组成, 同时以 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, DPPH)自由基、2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐阳离子[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate acid) diammonium salt cation, $ABTS^+$]自由基及羟基自由基清除率为指标评价其体外抗氧化活性。**结果** BCP 的最优提取工艺为液料比 20:1 (mL:g)、提取温度 72 ℃、提取时间 45 min, 此条件下多糖得率达(19.98±0.25)%; BCP 由葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖等 8 种单糖组成, 证实其为酸性杂多糖; 抗氧化实验表明, BCP 对 DPPH 自由基、$ABTS^+$自由基及羟基自由基的清除能力呈浓度依赖性, 质量浓度 1.0 mg/mL 时对 3 种自由基的抑制率分别为(84.70±0.38)%、(71.20±0.91)%、(92.40±0.51)%, 提示其具有较好的体外抗氧化活性。**结论** 本研究优化了 BCP 的提取工艺并证明其具有良好的抗氧化性, 为推动黑海棠果资源的高值化开发提供理论参考。

关键词: 黑海棠果; 多糖; 提取工艺; 结构特征; 抗氧化活性

Optimization of extraction process and antioxidant activity evaluation of black *Crabapple* polysaccharides

LI Bai-Yang, HAN Shu-Chen, ZHANG Zheng-Hai, LI Guo-Wei, JI Yan-Ru*, SHI Jie*, PAN Jing, YANG Qing-Li, LV Wen-Qing

(*Daqing Branch of Heilongjiang Academy of Sciences*, *Daqing* 163000, *China*)

ABSTRACT: Objective To explore the efficient extraction method and biological activity of black *Crabapple* polysaccharides (BCP). **Methods** Using black *Crabapple* as the raw material, the extraction conditions of BCP were optimized through single-factor experiments combined with response surface methodology. The monosaccharide composition was analyzed by high performance liquid chromatography, and its *in vitro* antioxidant activity was evaluated based on the scavenging rates of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) radicals, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate acid)diammonium salt cation ($ABTS^+$) radicals and hydroxyl

收稿日期: 2025-11-14
基金项目: 黑龙江省省属科研院所科研业务费项目(CZBZ202409002); 大庆市指导性科技计划项目(zd-2025-075)
第一作者: 李柏阳(1997—), 男, 硕士, 助理研究员, 主要研究方向为农产品加工。E-mail: 1427364419@qq.com
***通信作者:** 姬妍茹(1971—), 女, 硕士, 研究员, 主要研究方向为食品生物技术。E-mail: jyr309@126.com
石杰(1984—), 女, 硕士, 副研究员, 主要研究方向为农产品加工。E-mail: 253842350@qq.com

radicals. **Results** The optimal extraction process for BCP was a liquid-to-solid ratio of 20:1 (mL:g), extraction temperature of 72 ℃ and extraction time of 45 min, yielding a polysaccharide recovery rate of (19.98±0.25)%. BCP consisted of 8 kinds of monosaccharides, including glucose, galactose and arabinose, confirming its identity as an acidic heteropolysaccharide. Antioxidant experiments demonstrated that BCP exhibited concentration-dependent scavenging capabilities against DPPH radicals, $ABTS^+$ radicals and hydroxyl radicals. At a mass concentration of 1.0 mg/mL, the inhibition rates for these 3 kinds of radicals were (84.70±0.38)%, (71.20±0.91)% and (92.40±0.51)% respectively, indicating its favorable *in vitro* antioxidant activity. **Conclusion** This study optimizes the extraction process of BCP and proves its excellent antioxidant properties, providing a theoretical reference for promoting the high-value development of black *Crabapple*.

KEY WORDS: black *Crabapple*; polysaccharides; extraction process; structural characteristics; antioxidant activity

0 引 言

海棠(*Malus prunifolia*)为蔷薇科苹果属植物, 广泛种植于中国华北、西北、东北及长江以南地区[1−2]。其果实小巧, 呈椭圆形或圆形, 果皮与果肉均呈现淡红色, 口感酸甜适中, 深受消费者青睐[3]。鲜海棠果虽营养丰富, 却易损坏、腐烂且贮藏期短, 例如在 20~22 ℃条件下仅可贮存不足 3 d, 在 0~2 ℃条件下也只能保存 9~12 d[3]。鲜果的销售受季节性采摘和较高运输成本的限制, 加工为黑海棠果成为延长其货架期及挖掘其潜在价值的有效途径。

黑海棠果是以鲜海棠果为原料, 经变温熟成技术加工而成, 该过程中果实的化学成分有所改变, 尤以挥发性香气成分与碳水化合物组成变化更加显著。采用固相微萃取-气相色谱-质谱技术分析发现, 鲜海棠果的主要挥发性成分为烃类和酯类[4]; 而加工为黑海棠果后, 烃类与醇类物质含量下降, 醛类与酮类化合物含量上升, 导致其原有的花果香、水果香减弱, 清香及花香气更为突出[5]。海棠果富含多酚类化合物[6], 包括没食子酸、原儿茶酸、绿原酸等多种酚酸, 以及槲皮素、杨梅素等黄酮类物质[7−8]。李国巍等[9]优化了黑海棠果多酚的提取工艺, 证明其多酚具有较强的抗氧化活性, 并鉴定出绿原酸、根皮苷、原儿茶酸等 12 种主要单体酚。多糖作为海棠果的主要成分, 在变温熟成过程中同样发生显著变化[10]。

多糖是由 10 个以上单糖分子通过糖苷键连接形成的直链或支链聚合糖, 具有抗肿瘤、抑菌和调节肠道菌群结构等多种生理功能[11], 且在清除羟基自由基和超氧阴离子自由基方面表现出较强的能力[12]。目前已发现玉米[13]、人参[14]和咖啡[15]中的多糖均具有良好的抗氧化功能, 海棠果多糖的抗氧化活性也已被证实[16], 加工成黑海棠果后, 其多糖的抗氧化活性是否会发生改变值得去研究。

超声波辅助提取技术是一种新型天然产物提取方法, 其核心原理是利用超声波产生的空化效应, 通过强烈的机械作用力破坏物料细胞结构, 减小颗粒粒径, 增强溶剂穿透能力, 从而实现对目标成分的高效快速提取[17]。与传统提取方法相比, 该方法具有能耗低、提取效率高、操作简便等显著优势。多糖的活性与其化学性质, 如单糖组成、分子结构等密切相关, 而这些性质往往受到提取条件的直接影响[18]。因此, 为实现对黑海棠果多糖更高效率的提取, 对其进行超声波辅助提取工艺条件系统优化具有重要意义。在工艺优化过程中, 响应面法作为一种结合统计学与数学模型的优化工具, 能够系统分析多个因素及其交互作用对提取效果的影响, 在减少实验次数的同时提升结果的准确性与可靠性, 已广泛应用于多糖等活性成分的提取工艺优化中。

本研究以黑化处理后的海棠果为原料, 采用响应面法优化黑海棠果多糖超声辅助提取工艺, 结合高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)技术解析多糖的单糖组成, 并通过自由基清除实验评估其抗氧化活性。研究结果旨在深化对黑海棠果功能活性的理解, 为推动海棠果深加工技术研发与产业链延伸提供理论依据和技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

选用果皮呈红色且香气浓郁的成熟海棠果(黑龙江省科学院大庆分院大同区高台子镇试验基地)。

苯酚、浓硫酸、三氯乙酸(纯度 99%)、无水乙醇、过硫酸钾、过氧化氢(H_2O_2)、硫酸亚铁($FeSO_4$)、水杨酸、铁氰化钾、三氯化铁、乙腈、磷酸二氢钠、抗坏血酸(vitamin C, VC)、磷酸氢二钠(分析纯, 河南惠泽生物工程有限公司); 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, DPPH)、1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone, PMP)、2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐阳离子[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt cation, $ABTS^+$](分析纯, 北京索莱宝科技有限公司); 甲醇、盐酸(HCl)、氢氧化钠(NaoH)、盐酸、氯仿、磷酸钠(分析纯, 上海毕得医药科技股份有限公司); S-8 大孔树脂、

DEAE-52 离子纤维素(上海源叶生物科技有限公司); 葡萄糖标准品、甘露糖、氨基葡萄糖、核糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖、岩藻糖(均为单糖标准品, 纯度≥98%, 日本 Shodex 公司)。

1.2　仪器与设备

HZ-1000 型变频式恒温恒湿实验箱(东莞市力显仪器科技有限公司); ME204E/02 型电子分析天平(精度为 0.0001 g, 梅特勒-托利多仪器上海有限公司); JP-100S 型超声波清洗机(深圳市洁盟清洗设备有限公司); Master-DUF 型实验室超纯水机(上海和泰仪器有限公司); CT15RT 台式高速冷冻离心机(上海天美生化仪器设备工程有限公司); VRT-20 型旋转蒸发器(上海贤德实验仪器有限公司); Epoch 酶标仪(美国 BioTek 公司); HH-4D 型电热恒温水浴锅(上海比朗仪器有限公司); TQ-2 型提取罐(北京三玺科技有限公司); RID-20 示差折光检测器、C-20 高效液相色谱、Shim-pack GIST 型 C_{18} 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)(日本 Shimadzu 岛津公司)。

1.3　方　法

1.3.1　黑海棠果的制备

采用以下程序制备黑海棠果: 将新鲜海棠果清洗后, 置于密封耐高温塑料袋中, 加入 13%的蔗糖并充分混匀。随后, 将样品放入变频式恒温恒湿实验箱, 按照表 1 所示的分 6 个阶段程序共运行 7 d, 直至果实转变为黑褐色。将处理后的果实转入烘干箱, 干燥至水分含量约为 30%, 即得成品黑海棠果。成品于 4 ℃条件下密封保存, 备用。

表 1　黑海棠果变温发酵工艺参数

Table 1　Parameters of temperature-variable fermentation process for black *Crabapple*

不同阶段	温度/℃	运行时间/h
1	22~95	4
2	95	5
3	85	15
4	80	48
5	75	48
6	65	48

1.3.2　黑海棠果粗多糖提取

准确称取 10.0 g 的黑海棠果样品, 设定超声功率为 300 W。分别按不同液料比、提取温度与提取时间, 提取水溶性粗多糖。使用 Sevage 法沉淀蛋白质, 离心后, 上清液进一步用乙醇处理进行多糖沉淀。S-8 大孔树脂静态吸附脱色除去类黑精, 冻干后得黑海棠果粗多糖。

1.3.3　黑海棠果多糖得率测定

采用苯酚-硫酸法作为多糖得率的测定方法[19]。黑海棠果粗多糖得率按公式(1)计算。

$$W/\%=\frac{m_1}{m_2}\times 100\% \tag{1}$$

式中: W 为黑海棠果粗多糖的得率, %; m_1 为提取后得到的黑海棠果粗多糖的质量, g; m_2 为初始称取的黑海棠果的质量, g。

1.3.4　单因素实验

精确称取黑海棠果 10.0 g 并设置超声功率 300 W, 以预实验为依据, 选取液料比 20:1 (mL:g), 提取温度 70 ℃, 提取时间 45 min 作为实验初始条件, 分别探究不同液料比[10:1、20:1、30:1、40:1、50:1 (mL:g)]、提取温度(40、50、60、70、80 ℃)和提取时间(15、30、45、60、75 min)对黑海棠果粗多糖得率的影响。

1.3.5　响应面实验

根据单因素实验的结果, 选取液料比(A)、提取温度(B)、提取时间(C)为自变量, 以多糖得率为响应值 Y, 采用软件 Design-Expert 13.0 进行响应面法优化设计, 各因素水平见表 2。

表 2　响应面实验设计因素水平表

Table 2　Factors and levels table of response surface experimental design

水平	实验因素		
	A(液料比)(mL:g)	B(提取温度)/℃	C(提取时间)/min
–1	10:1	60	30
0	20:1	70	45
1	30:1	80	60

1.3.6　黑海棠果多糖单糖组成

黑海棠果多糖的单糖组成采用 HPLC 法测定。

(1)多糖水解液前处理

称取多糖样品于 20 mL 的钳口瓶中, 加入 5 mL 的 2 mol/L 三氯乙酸, 以 10 L/min 的流速向瓶内充入氮气 1 min 后密封管口, 置于 120 ℃条件下水解 2 h; 冷却后, 取 1 mL 样品加入 1 mL 甲醇混匀, 于 70 ℃水浴环境下通氮气吹干, 重复加甲醇并用氮气吹干 2 次, 以彻底去除三氯乙酸; 加入 1 mL 0.3 mol/L NaOH 溶液充分溶解残渣, 即得到多糖水解液, 适当稀释后备用。

(2)衍生化处理

分别移取 400 μL 混合单糖标准液与 400 μL 上述多糖水解液, 各自置于 5 mL 具塞试管中, 向 2 支试管内分别加入 400 μL PMP 甲醇溶液, 漩涡混匀; 于 70 ℃水浴中反应 2 h; 取出放置冷却至室温; 再各自加入 400 μL 0.3 mol/L 的 HCl 中和至 pH 6~7 后加 1200 μL 蒸馏水混匀, 向试管中加入与水相体积相等的氯仿, 涡旋混匀并充分振摇后静置分层, 弃去下层氯仿相, 如此萃取 2 次。将上层水相通过 0.45 μm 水系微孔滤膜过滤。

(3) HPLC 检测条件

采用 C_{18} 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相由 A

相(100 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH=6.4)与 B 相(乙腈)组成, 采用梯度洗脱, 检测波长设定为 245 nm, 柱温控制在 30 ℃, 流速 1 mL/min, 进样体积为 20 μL。

1.3.7 抗氧化活性测定

(1) DPPH 自由基清除率测定

参照 DZIGBOR 等[20]方法进行测定。分别配制质量浓度为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mg/mL 黑海棠果多糖溶液; 将 2 mL 不同质量浓度多糖溶液与 2 mL 浓度为 0.2 mmol/L DPPH 甲醇溶液均匀混合, 在37 ℃避光反应30 min; 以VC为阳性对照, 在波长 517 nm 处测定吸光度, 按照公式(2)计算 DPPH 自由基清除率。

$$\text{DPPH 自由基清除率/\%}=[1-(A_1-A_2)/A_0]\times 100\% \quad (2)$$

式中: A_0、A_1、A_2 分别为空白、样品、溶剂的吸光度值。

(2) $ABTS^+$自由基清除率测定

参照 DONOSO-BUSTAMANTE 等[21]进行测定。取 5 mL 7.4 mmol/L $ABTS^+$溶液与等体积等浓度的过硫酸钾溶液混合, 避光静置 16 h, 作为 $ABTS^+$工作液; 使用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS, pH=7.4)将其稀释至在 734 nm 波长下吸光度为 0.7±0.1, 作为测定工作液。随后取 0.4 mL 不同浓度多糖样品溶液, 加入 4.0 mL $ABTS^+$工作液, 25 ℃避光反应 6 min 后, 测定 734 nm 处吸光度值。以 VC 作为阳性对照。根据公式(3)计算 $ABTS^+$自由基清除率。

$$ABTS^+\text{自由基清除率/\%}=(A_3-A_4)/A_3\times 100\% \quad (3)$$

式中: A_3、A_4 分别为空白、样品吸光度值。

(3)羟基自由基清除率的测定

参照刘丹等[22]方法进行测定。取 2 mL 不同浓度多糖样品, 加入 9 mmol/L $FeSO_4$ 溶液 2 mL, 再加入 9 mmol/L 乙醇水杨酸溶液 2 mL, 最后加入 8.8 mmol/L H_2O_2 溶液 2 mL 启动反应, 混匀后于 37 ℃水浴放置 30 min, 于 520 nm 处测定吸光度值, 以 VC 作为阳性对照, 按照公式(4)计算羟基自由基清除率。

$$\text{羟基自由基清除率/\%}=[1-(A_5-A_6)/A_7]\times 100\% \quad (4)$$

式中: A_7、A_5、A_6 分别为空白组、样品组、试样空白组吸光度值。

1.4 数据处理

所有实验均重复 3 次, 用 IBM SPSS Statistics 27 统计软件的方差分析方法进行显著性分析, $P<0.05$ 代表该差异具有统计学意义, 采用 Origin 2022 绘图。

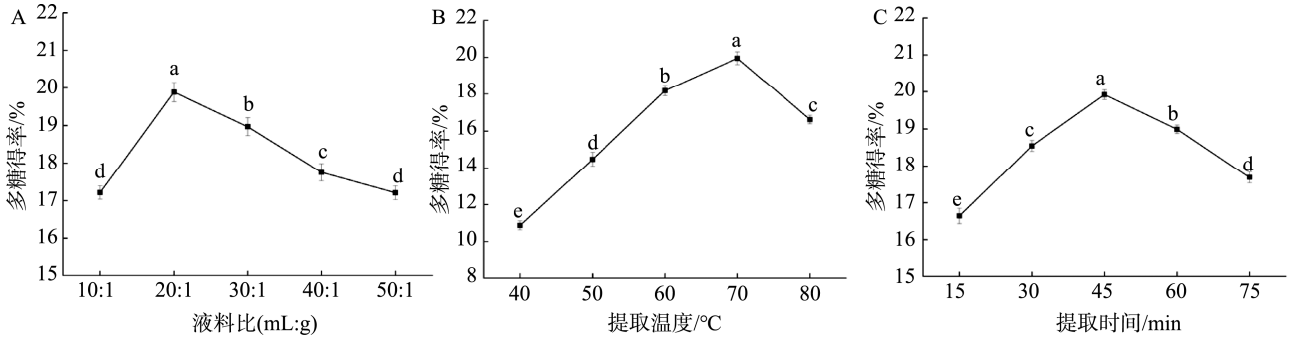
2 结果与分析

2.1 单因素实验结果分析

如图 1A 所示, 当液料比为 10:1 (mL:g)至 20:1 (mL:g)时, 黑海棠果多糖得率呈先升高的趋势, 原因可能是低浓度的多糖在溶液中的黏度较低, 利于多糖的溶解和扩散[23]。当液料比为 20:1 (mL:g)时, 多糖得率达峰值(19.89±0.26)%。但进一步增大液料比, 多糖得率开始下降并逐渐趋于稳定。这一规律与其他研究结果一致, 例如当液料比为超过 55:1 (mL:g)时, 天麻多糖的得率同样呈下降趋势[24]。分析可知, 当液料比超过特定阈值后, 溶剂与原料间的扩散距离延长, 二者的有效碰撞面积减小, 最终导致多糖得率降低[25]。因此, 确定最佳液料比为 20:1 (mL:g)。

不同提取温度下多糖的得率如图 1B 所示。当温度由 40 ℃升高至 70 ℃时, 多糖得率显著增加($P<0.05$), 在 70 ℃时黑海棠多糖得率最高为(19.95±0.15)%。这是由于随着温度升高, 多糖在水中的溶解度逐渐增加, 分子运动速率增加, 加速了溶质与溶剂之间的相互作用, 促进多糖的释放[26]。本研究中, 随着提取温度从 40 ℃升高到 70 ℃, 多糖的得率从(10.87±0.25)%增加到(19.95±0.15)%。类似的, 随着温度从35 ℃升高到45 ℃, 黑蒜多糖随着温度升高多糖得率显著增高, 超过 45 ℃后多糖得率显著下降[27]。这可能是过高的温度会导致多糖降解和糖苷键裂解, 破坏多糖结构并降低得率[28]。因此, 确定最佳提取温度为 70 ℃。

提取时间也是影响提取效率的重要因素。由图 1C 可知, 随着提取时间 15~75 min 时, 黑海棠果多糖得率呈现



注: 不同字母表示具有显著性差异($P<0.05$)。

图 1 不同因素对黑海棠果多糖得率的影响

Fig.1 Effects of different factors on the yield of black *Crabapple* polysaccharides

出先上升后逐渐降低趋势, 在 45 min 处达到峰值, 此时得率为(19.92±0.13)%。这可能是由于在提取初始阶段, 超声波作用可促使大量细胞壁破裂, 为多糖快速溶出提供了有利条件, 这一规律在其他多糖提取研究中也得到验证, 例如螺旋藻多糖得率随提取时间从 5 min 延长至 45 min, 由 8.2%提升至 12.2%, 进一步说明多糖的释放主要集中在提取前期[29]。而当超声时间超过 45 min 后, 延长提取时间反而会导致多糖得率降低。推测原因在于, 强超声环境下, 超出阈值的作用时间可能破坏多糖的部分结构, 进而造成得率下降[30]。因此, 确定最佳提取时间为 45 min。

2.2　响应面实验结果分析

2.2.1　回归方程的建立

根据单因素实验结果, 最佳提取条件为液料比为 20:1 (mL:g)、提取温度 70 ℃、提取时间 45 min。根据表 3 的结果进行多元回归分析, 拟合得到二阶多项式方程:

Y=20.03–0.0212A+0.1750B+0.0988C–0.12AB–0.3325AC + 0.02BC–1.08A^2–0.4358B^2–1.46C^2, 其中 Y 为多糖得率, A、B、C 分别为液料比、提取温度和提取时间。

表 3　响应面实验结果

Table 3　Results of the response surface experiment

实验号	因素			黑海棠果多糖得率/%
	A(液料比)(mL:g)	*B*(提取温度)/℃	*C*(提取时间)/min	
1	0	0	0	20.13±1.02
2	–1	0	–1	17.98±0.13
3	1	0	1	17.68±0.87
4	0	0	0	20.08±0.45
5	1	0	–1	17.23±0.31
6	0	1	1	18.20±1.06
7	0	–1	1	17.90±0.33
8	–1	1	0	18.86±0.25
9	0	0	0	19.96±0.18
10	1	–1	0	18.42±0.84
11	0	0	0	19.90±0.35
12	1	1	0	18.62±0.11
13	0	–1	–1	18.12±0.28
14	–1	–1	0	18.18±0.84
15	–1	0	1	17.10±1.02
16	0	1	–1	18.34±1.58
17	0	0	0	20.10±0.84

2.2.2　回归模型方差分析

由表 4 的方差分析结果可知, 该模型的失拟项 P>0.05, 且模型整体 F 为 219.74 (P<0.05), 表明模型无显著失拟, 可有效预测黑海棠果多糖得率。决定系数 R^2=0.9965, 说明其可以解释 99.65%的总变异。调整决定系数 R^2_{Adj}=0.9919, 则进一步证实模型预测值与实验值的的拟合程度较高、可靠性强。

表 4　回归模型及方差分析

Table 4　Regression models and variance analysis

变异来源	平方和	自由度	均方	*F*	*P*	显著性
模型	16.8200	9	1.8700	219.74	<0.0001	**
A	0.0036	1	0.0036	0.43	0.5354	
B	0.2450	1	0.2450	28.80	0.0010	**
C	0.0780	1	0.0780	9.17	0.0192	*
AB	0.0576	1	0.0576	6.77	0.0353	*
AC	0.4422	1	0.4422	51.99	0.0002	**
BC	0.0016	1	0.0016	0.19	0.6776	
A^2	4.9000	1	4.9000	575.48	<0.0001	**
B^2	0.7995	1	0.7995	93.99	<0.0001	**
C^2	8.9500	1	8.9500	1052.58	<0.0001	**
残差	0.0595	7	0.0085			
失拟项	0.0204	3	0.0068	0.6961	0.6011	
纯误差	0.0391	4	0.0098			
总差	16.8800	16	R^2=0.9965	R^2_{Adj}=0.9919		

注: *表示差异显著(P<0.05); **表示差异极显著(P<0.01)。

一次项中, 液料比(A)对黑海棠果多糖得率的影响不显著(P>0.05), 提取时间(C)的影响显著(P<0.05), 提取温度(B)的影响极显著(P<0.01)。通过比较各因子的 F, 各因素对多糖得率的影响强度从大到小依次为: 提取温度(B)>提取时间(C)>液料比(A)。在交互作用方面, 液料比(A)与提取温度(B)的交互作用对多糖得率影响显著(P<0.05), 而液料比(A)与提取时间(C)的交互作用影响极显著(P<0.01)。

2.2.3　响应面交互作用分析

各因素间交互作用对多糖得率影响的等高线及响应面如图 2 所示, 其中响应面坡度越陡, 代表 2 个因素对多糖得率的影响作用越显著。由图 2 可见, 随着交互作用的增强, 多糖得率呈现先上升后下降的变化趋势; 液料比(A)与提取温度(B)、液料比(A)与提取时间(C)对应的响应面坡度较陡, 表明这 2 组因素的交互作用显著; 而提取温度(B)与提取时间(C)的响应面则呈现缓慢上升后逐渐下降的平缓趋势, 说明二者交互作用不显著, 该结果与表 4 中方差分析结论一致。利用 Design-Expert 13.0 软件分析, 得出本实验对黑海棠果多糖的最佳提取工艺条件为: 液料比 19.73:1 (mL:g)、提取温度 72.04 ℃、提取时间 44.48 min, 此时预测多糖得率为 19.72%。

2.2.4　最佳工艺参数验证

为了验证预测结果的准确性同时结合能耗考虑和操作的便利性, 调整提取条件为: 液料比 20:1 (mL:g)、提取温度 72 ℃、提取时间 45 min。在此条件下, 多糖的实际得率达到(19.98±0.25)%, 预测结果与实际值直接无显著性差异(P>0.05), 表明模型可靠、准确。

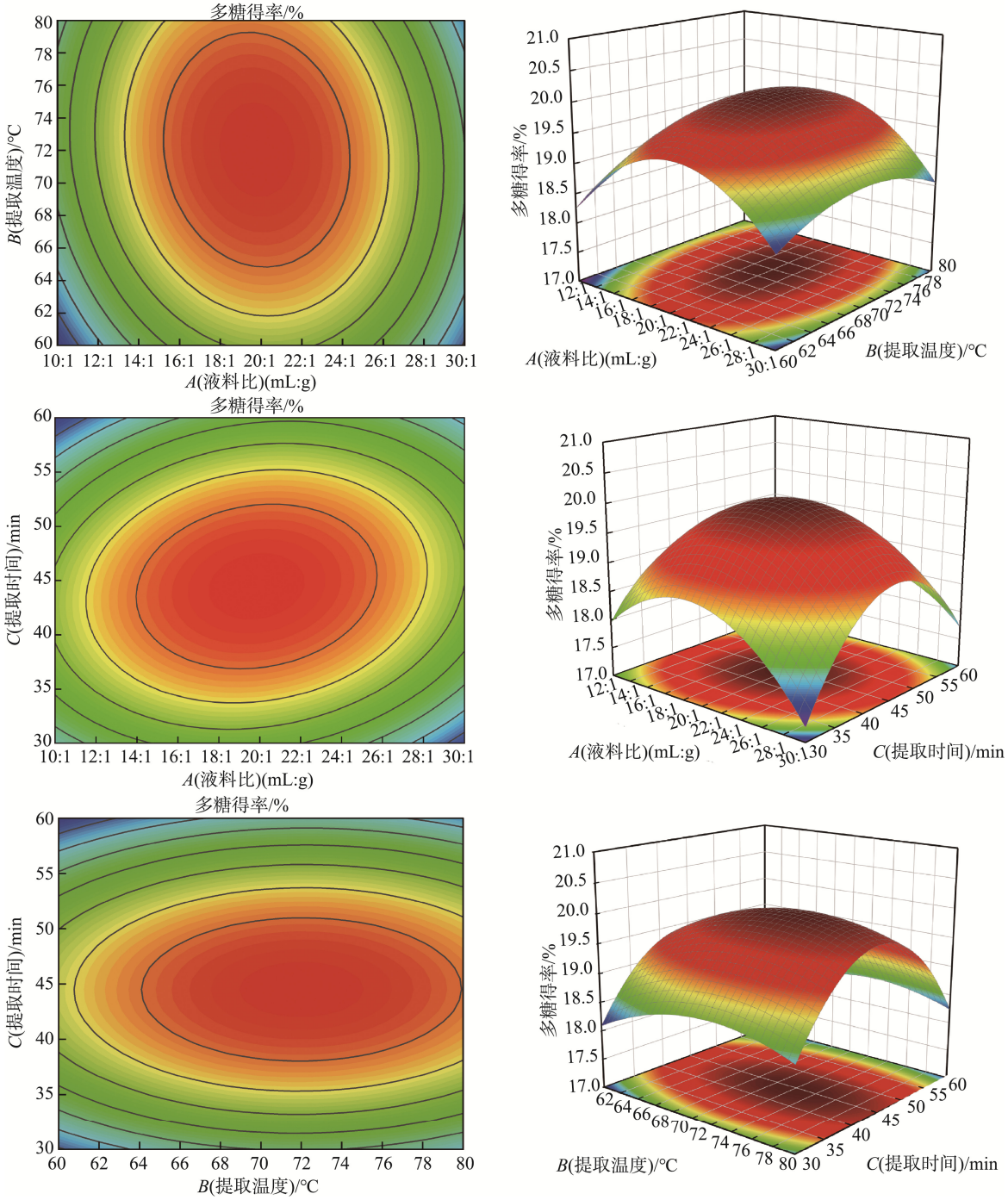


图 2 各因素交互作用对黑海棠果多糖得率等高线及响应面图

Fig.2 Contour and response surface plots illustrating the interactive effects of various factors on the extraction yield of black *Crabapple* polysaccharides

2.3 黑海棠果多糖的单糖组成分析

通过 HPLC 对黑海棠果多糖中单糖组分进行测定，检测结果见表 5 和图 3~4。黑海棠果多糖主要由 8 种单糖组成，分别为葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖、半乳糖醛酸、鼠李糖、岩藻糖、甘露糖、葡萄糖醛酸。其中相对含量排在前 3 位的分别为葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖，占总成分的 96.7%。多糖中含有葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸等酸性单糖组分，提示该多糖可能具有酸性多糖的特征。结合其单糖组成，可初步推断其为一种以葡萄糖为主、可能含有酸性链段的中性杂多糖，与蒋文明等[31]研究结果一致。但其不同之处在于，并未检测出木糖与氨基半乳糖，猜测由于二者经加工后受热降解导致的。

表 5　黑海棠果单糖检测结果

Table 5　Detection results of monosaccharides in black *Crabapple*

序号	峰名称	保留时间/min	峰面积/(mAU×min)	峰高/mAU	相对峰面积/%	相对峰高/%	相对含量/(μg/g)
1	甘露糖	10.963	0.317	1.884	0.18	0.50	360.0243
2	鼠李糖	14.097	1.859	6.557	1.08	1.73	2926.7819
3	葡萄糖醛酸	14.813	0.126	0.487	0.07	0.13	362.1871
4	半乳糖醛酸	17.210	2.917	10.315	1.69	2.72	4258.8658
5	葡萄糖	22.083	143.367	313.245	83.21	82.75	209982.8112
6	半乳糖	25.367	13.789	26.725	8.00	7.06	15613.3934
7	阿拉伯糖	27.223	9.459	18.182	5.49	4.80	10346.9690
8	岩藻糖	30.000	0.373	0.737	0.22	0.19	551.8056

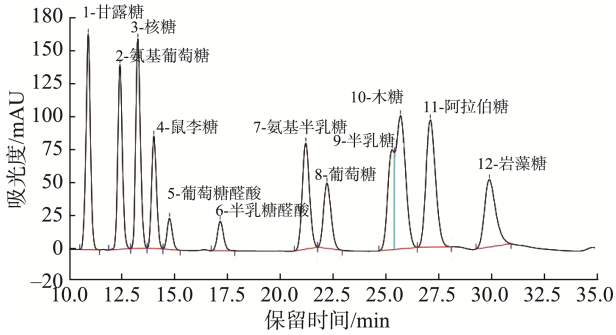


图 3　单糖对照品 HPLC 分析色谱图

Fig.3　HPLC analysis chromatogram of monosaccharide reference standards

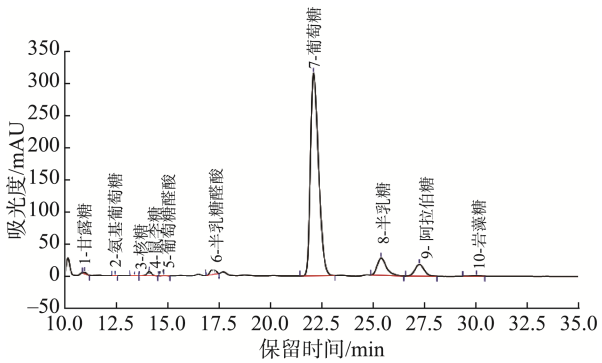


图 4　黑海棠果多糖 HPLC 分析色谱图

Fig.4　HPLC analysis chromatogram of black *Crabapple* polysaccharides

2.4　抗氧化活性分析

机体在新陈代谢过程中会持续产生自由基, 长期积累的自由基会引发氧化损伤, 进而对机体造成伤害并诱发疾病[32]。为了准确了解黑海棠果多糖的抗氧化活性, 本研究结合 DPPH 自由基、ABTS⁺自由基及羟基自由基清除结果进行全面分析。如图 5 所示多糖对羟基自由基、DPPH 自由基和 ABTS⁺自由基清除能力具有剂量依赖性, 并且在较高质量浓度下更为明显。具体表现为: 在实验设定的 0.2~1.0 mg/mL 质量浓度范围内, 黑海棠果多糖对 3 种自由基的清除能力均随自身质量浓度提高而增强, 但达到特定质量浓度后呈现不同变化趋势, 其中 DPPH 自由基清除率在质量浓度超过 0.8 mg/mL 后进入平台期、抗氧化能力趋于稳定, ABTS⁺自由基清除率随质量浓度增加持续上升但整体增速较平缓, 羟基自由基清除率则在整个质量浓度区间内保持稳定上升。当黑海棠果多糖质量浓度达到 1.0 mg/mL 时, 3 种自由基清除效果呈现明显差异, 其中羟基自由基清除率最高, 达(92.40±0.51)%且高于其余 2 种自由基。羟基自由基是氧化损伤能力最强的自由基, 其作用机制是与生物大分子结合引发损伤, 而黑海棠果多糖可能通过提供大量氢原子与羟基自由基结合形成非活性产物, 进而终止自由基链式反应[33]; DPPH 自由基清除率次之, 其清除率为(84.70±0.38)%。DPPH 自由基作为性质稳定的含氮自由基, 其清除机制是与抗氧化物质结合形成 $DPPH_2$, 使 517 nm 处吸收峰强度下降。ABTS⁺自由基清除率相对较低, 为(71.20±0.91)%, 该自由基的清除依赖抗氧化物质中羟基、羧基提供电子使其转化为稳定形式。所有检测结果表明, VC 阳性对照对这 3 种自由基的清除活性始终最高, 但 1.0 mg/mL 的黑海棠果多糖的羟基自由基清除能力与 0.4 mg/mL 的 VC 相当。整体而言, 黑海棠果多糖对 3 种自由基均具有清除能力, 且整体表现为羟基自由基>DPPH 自由基>ABTS⁺自由基的清除活性顺序, 尤其在抵御强氧化性的羟基自由基方面优势显著。

多糖中高糖醛酸含量会增加其自由基清除能力[34], 部分研究还报道了富含半乳糖和阿拉伯糖的多糖表现出相对较高的抗氧化活性[35]。例如, LIN 等[36]研究发现半乳糖含量与金针菇多糖的抗氧化活性呈正相关。因此, 黑海棠果多糖展现出的自由基清除活性可能与其特殊的单糖组成有关。尽管糖醛酸含量不高, 但其中丰富的半乳糖和阿拉伯糖, 以及它们所形成的特定糖苷键连接方式与空间结构, 可能共同促进了其提供氢原子或电子的能力, 从而发挥抗氧化作用。推测其活性机制可能更依赖于中性糖的特定结构域。

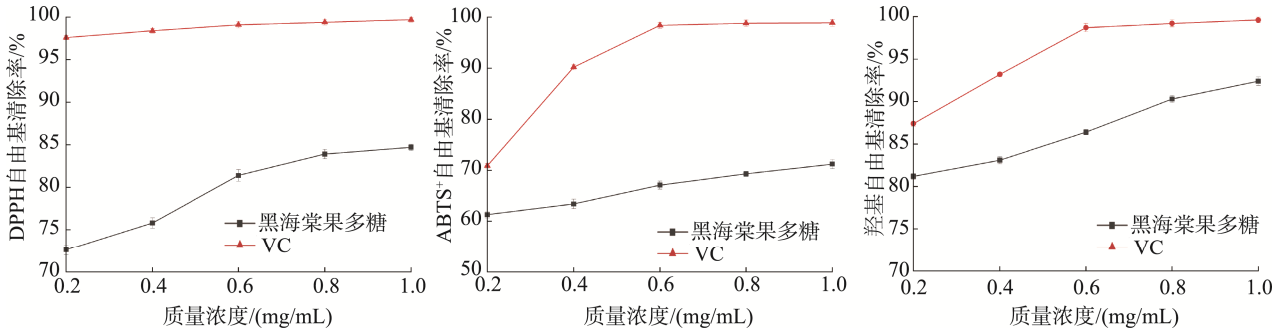


图 5 不同浓度黑海棠果多糖对自由基清除率的影响

Fig.5 Effects of different concentrations of black *Crabapple* polysaccharides on the free radical scavenging rate

3 结 论

本研究以液料比、提取温度、提取时间 3 个因素进行单因素及响应面实验优化黑海棠果多糖提取工艺，最终确定工艺为：液料比 20:1 (mL:g)、提取温度 72 ℃、提取时间 45 min，得到多糖得率为(19.98±0.25)%；对多糖单糖组成分析表明：黑海棠果多糖主要由 8 种单糖组成，其中葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖占比最高，证实黑海棠果多糖为含有酸性链段的中性杂多糖；黑海棠果多糖对 DPPH 自由基、$ABTS^{+}$自由基、羟基自由基均具有良好的清除能力，说明黑海棠果多糖具有一定的抗氧化能力。黑海棠果多糖与鲜海棠果多糖在单糖组成上存在差异，主要体现在 *D*-木糖、葡萄糖醛酸、岩藻糖等组分不同，产地气候(海拔、温湿度)及加工工艺是主要的影响因素；尽管存在这一差别，两者的多糖结构仍高度相似，且黑海棠果多糖展现出更强的抗氧化能力[37]。

综上所述，通过实验获得黑海棠果多糖的最佳提取工艺，初步阐明了黑海棠果多糖的化学性质及在抗氧化能力上具有较高的潜能，当前研究尚处于实验室阶段，未来需开展体内活性评价与工艺放大探索。该项研究结果为推动海棠果深加工技术研发与产业链延伸提供更加充分的科学依据。

参考文献

[1] ABUDUAINI M, LI J, RUAN JH, *et al*. Bioassay-guided preparation of antioxidant, anti-inflammatory active fraction from crabapples [*Malus prunifolia* (Willd.) Borkh.] [J]. Food Chemistry, 2023, 406: 135091.

[2] ZHAI XY, WANG X, WANG XY, *et al*. An efficient method using ultrasound to accelerate aging in crabapple (*Malus asiatica*) vinegar produced from fresh fruit and its influencing mechanism investigation [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2021, 72: 105464.

[3] MO J, RASHWAN AK, OSMAN AI, *et al*. Potential of chinese bayberry (*Myrica rubra Sieb.* et Zucc.) fruit, kernel, and pomace as promising functional ingredients for the development of food products: A comprehensive review [J]. Food and Bioprocess Technology, 2024, 17(11): 3506–3524.

[4] ZENG X, LI H, JIANG W, *et al*. Phytochemical compositions, health-promoting properties and food applications of crabapples: A review [J]. Food Chemistry, 2022, 386: 132789.

[5] 李柏阳, 李国巍, 姬妍茹, 等. 基于 SPME-GC-MS 技术分析黑海棠果加工前后挥发性香气成分[J]. 中国食品添加剂, 2025, 36(1): 136–143.
LI BY, LI GW, JI YR, *et al*. Analysis of volatile aroma components of *Begonia crabapple* fruit before and after processing based on SPME-GC-MS technology [J]. China Food Additives, 2025, 36(1): 136–143.

[6] JI X, HOU C, GUO X. The fruit *Malus prunifolia* (*Malus micromalus* Mak.): A minireview of current knowledge of fruit composition and health benefits [J]. Journal of Chemistry, 2020, 2020: 1–8.

[7] ARNOLD M, GRAMZA-MICHALOWSKA A. Recent development on the chemical composition and phenolic extraction methods of apple (*Malus domestica*)—a review [J]. Food and Bioprocess Technology, 2023, 17(9): 2519–2560.

[8] MARIA-JOHN KM, ENKHTAIVAN G, KIM JJ, *et al*. Metabolic variation and antioxidant potential of *Malus prunifolia* (wild apple) compared with high flavon-3-ol containing fruits (apple, grapes) and beverage (black tea) [J]. Food Chemistry, 2014, 163: 46–50.

[9] 李国巍, 石雨, 张正海, 等. 黑海棠果多酚提取工艺优化及抗氧化活性分析[J]. 中国食品添加剂, 2024, 35(12): 13–30.
LI GW, SHI Y, ZHANG ZH, *et al*. Optimization of extraction process and antioxidant activity analysis of polyphenols from *Malus hupehensis* [J]. China Food Additives, 2024, 35(12): 13–30.

[10] 姬妍茹, 李国巍, 张正海, 等. 黑海棠果加工过程中主要成分变化研究[J]. 农产品加工, 2024(19): 15–18.
JI YR, LI GW, ZHANG ZH, *et al*. Study on the changes of main components in begonia crabapple fruit during processing [J]. Agricultural Products Processing, 2024(19): 15–18.

[11] CHEN YJ, SUI X, WANG Y, *et al*. Preparation, structural characterization, biological activity, and nutritional applications of oligosaccharides [J]. Food Chemistry X, 2024, 22: 101289.

[12] VIEIRA TF, CORREA RCG, PERALTA RA, *et al*. An overview of structural aspects and health beneficial effects of antioxidant oligosaccharides [J]. Current Pharmaceutical Design, 2020, 26(16): 1759–1777.

[13] YAO SW, WEN XX, HUANG RQ, *et al*. Protection of feruloylated oligosaccharides from corn bran against oxidative stress in PC 12 cells [J].

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(3): 668–674.

[14] ZHAO B, WANG X, LIU H, *et al*. Structural characterization and antioxidant activity of oligosaccharides from *Panax ginseng* C. A. Meyer [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 150: 737–745.

[15] TRIPATHI S, MURTHY PS. Coffee oligosaccharides and their role in health and wellness [J]. Food Research International, 2023, 173(Pt 1): 113288.

[16] 刘晓伟, 崔淼, 王萌蕾, 等. 观赏海棠果抗氧化肽制备及其对油脂抗氧化作用研究[J]. 粮食与油脂, 2024, 37(5): 43–48, 83.
LIU XW, CUI M, WANG ML, *et al*. Preparation of antioxidant peptides from ornamental crabapple fruits and their antioxidant effects on oils [J]. Cereals & Oils, 2024, 37(5): 43–48, 83.

[17] DONG S, WU Y, LUO Y, *et al*. Study on the extraction technology and antioxidant capacity of rhodymenia intricata polysaccharides [J]. Foods, 2024, 13(23): 3964.

[18] NAI J, ZHANG C, SHAO H, *et al*. Extraction, structure, pharmacological activities and drug carrier applications of angelica sinensis polysaccharide [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 183: 2337–2353.

[19] 李胜恒. 不同工艺提取肉苁蓉多糖物质及抗氧化活性研究[J]. 中国调味品, 2025, 50(7): 218–222.
LI SH. Study on the extraction of polysaccharides from cistanche and their antioxidant activities by different processes [J]. China Condiment, 2025, 50(7): 218–222.

[20] DZIGBOR A, NEGLO D, DZAH CS, *et al*. Total phenolic content, phytochemical screening, antioxidant and antimicrobial activities of borassus flabellifer and borassus aethiopum fruits [J]. Food Chemistry Advances, 2025, 7: 100937.

[21] DONOSO-BUSTAMANTE V, OSORIO E, ARIAS-SANTÉ MF, *et al*. Antioxidant activity of sinapic acid anilides: DPPH, ABTS, FRAP, electrochemical and theoretical analysis [J]. LWT-Food Science and Technology, 2025, 222: 117656.

[22] 刘丹, 任洪飞, 逄梦玉, 等. 灵芝多糖的分离纯化、结构表征和抗氧化活性研究[J]. 粮食与油脂, 2025, 38(3): 81–86, 101.
LIU D, REN HF, YUN MY, *et al*. Purification, structural characterization and antioxidant activity of ganoderma lucidum polysaccharides [J]. Cereals & Oils, 2025, 38(3): 81–86, 101.

[23] XU Y, ZHANG L, BAILINA Y, *et al*. Effects of ultrasound and/or heating on the extraction of pectin from grapefruit peel [J]. Journal of Food Engineering, 2014, 126: 72–81.

[24] DU C, LIU X, ALGADI H, *et al*. Polysaccharide extraction optimization, monosaccharide composition, and antioxidant activity analysis of different varieties of gastrodia elata B_l aerial parts [J]. Biomass Conversion and Biorefinery, 2023, 14(23): 29353–29365.

[25] CHEN C, ZHAO Z, MA S, *et al*. Optimization of ultrasonic-assisted extraction, refinement and characterization of water-soluble polysaccharide from dictyosphaerium sp. and evaluation of antioxidant activity *in vitro* [J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2019, 14(2): 963–977.

[26] TESVICHIAN S, SANGTANOO P, SRIMONGKOL P, *et al*. Sulfated polysaccharides from *Caulerpa lentillifera*: Optimizing the process of extraction, structural characteristics, antioxidant capabilities, and anti-glycation properties [J]. Heliyon, 2024, 10(2): e24444.

[27] 是建华. 黑蒜多糖提取工艺优化及其抗疲劳作用研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(21): 303–312.
SHI JH. Optimization of extraction process of black garlic polysaccharides and its anti-fatigue effect research [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(21): 303–312.

[28] KURD F, SAMAVATI V. Water soluble polysaccharides from spirulina platensis: Extraction and *in vitro* anti-cancer activity [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 74: 498–506.

[29] WANG Y, XIONG X, HUANG G. Ultrasound-assisted extraction and analysis of maidenhairtree polysaccharides [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2023, 95: 106395.

[30] YUAN Q, ZHANG J, XIAO C, *et al*. Structural characterization of a low-molecular-weight polysaccharide from angelica pubescens *Maxim. f. biserrata* Shan et Yuan root and evaluation of its antioxidant activity [J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 236: 116047.

[31] 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. Study on extraction, structure characterization and biological activity of polysaccharides from *Malus hupehensis* [J]. China Food Additives, 2023, 34(7): 81–89.

[32] JIA D, LIAO G, YE B, *et al*. Changes in fruit quality, phenolic compounds, and antioxidant activity of kiwifruit (*Actinidia eriantha*) during on-vine ripening [J]. LWT-Food Science and Technology, 2024, 206: 116564.

[33] YI J, LI X, WANG S, *et al*. Steam explosion pretreatment of achyranthis bidentatae radix: Modified polysaccharide and its antioxidant activities [J]. Food Chemistry, 2022, 375: 131746.

[34] CAPEK P, MACHOVA E, TURJAN J. Scavenging and antioxidant activities of immunomodulating polysaccharides isolated from *Salvia officinalis* L [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2009, 44(1): 75–80.

[35] WANG M, ZHU P, JIANG C, *et al*. Preliminary characterization, antioxidant activity *in vitro* and hepatoprotective effect on acute alcohol-induced liver injury in mice of polysaccharides from the peduncles of hovenia dulcis [J]. Food and Chemical Toxicology, 2012, 50(9): 2964–2970.

[36] LIN L, CUI F, ZHANG J, *et al*. Antioxidative and renoprotective effects of residue polysaccharides from flammulina velutipes [J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 146: 388–395.

[37] 部金玉. 北美海棠果多糖提取制备及生物活性研究[D]. 沈阳: 辽宁大学, 2024.
BU JY. Research on the extraction and preparation of polysaccharides from North American hydrangea fruit and their biological activities [D]. Shenyang: Liaoning University, 2024.

(责任编辑: 安香玉　蔡世佳)