刘旭珍, 卢凯凯, 赵婉英, 等. 磷酸化棉子糖制备及其体外抗氧化性能 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(16): 293−301. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025070259

LIU Xuzhen, LU Kaikai, ZHAO Wanying, et al. Preparation of Phosphorylated Raffinose and Its *in Vitro* Antioxidant Properties[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(16): 293−301. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025070259

· 工艺技术 ·

磷酸化棉子糖制备及其体外抗氧化性能

刘旭珍, 卢凯凯, 赵婉英, 张朝云, 陈燕勤*

（新疆农业大学化学化工学院, 新疆乌鲁木齐 830052）

摘　要: 为提升棉子糖体外抗氧化性能，本研究以温度、时间、pH、改性剂比例为单因素考察其对棉子糖中磷酸根含量的影响，采用响应面试验优化了棉子糖的制备工艺。通过傅里叶红外光谱法（Fourier Transform Infrared Spectroscopy，FT-IR）和核磁共振波谱（Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy，NMR）对磷酸化修饰前后的棉子糖进行结构表征，并对其体外抗氧化活性进行研究。结果显示，磷酸化棉子糖（phosphorylated-棉子糖，P-棉子糖）的最佳制备工艺为：反应体系 pH 为 9、三偏磷酸钠与三聚磷酸钠比例 4∶3、反应温度 77 ℃、反应时间 5.3 h，在该条件下 P-棉子糖中磷酸根含量为 32.14%；表征结果显示，棉子糖被成功磷酸化；活性测试表明，磷酸化修饰对棉子糖的羟自由基清除能力及总抗氧化能力提高显著，相对棉子糖分别提高 27.06%、31.40%。本研究为 P-棉子糖在新型功能性食品及抗氧化剂开发领域提供了理论依据及技术支持。

关键词: 棉子糖, 磷酸化, 响应面法, 结构表征, 抗氧化活性

中图分类号: TS201.2　　**文献标识码:** B　　**文章编号:** 1002−0306(2026)16−0293−09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025070259　　本文网刊:

Preparation of Phosphorylated Raffinose and Its *in Vitro* Antioxidant Properties

LIU Xuzhen, LU Kaikai, ZHAO Wanying, ZHANG Chaoyun, CHEN Yanqin*

（College of Chemistry and Chemical Engineering, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China）

Abstract: To enhance the *in vitro* antioxidant performance of raffinose, this study investigated the effects of temperature, time, pH, and the ratio of modifiers on the phosphate content in raffinose as single factors. The preparation process of raffinose was optimized by response surface methodology. The structures of raffinose before and after phosphorylation modification were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR), and their *in vitro* antioxidant activities were studied. The results showed that the optimal preparation process of phosphorylated raffinose (P-raffinose) was as follows: pH of the reaction system was 9, the ratio of sodium tripolyphosphate to sodium trimetaphosphate was 4∶3, the reaction temperature was 77 ℃, and the reaction time was 5.3 h. Under these conditions, the phosphate content in P-raffinose was 32.14%. Characterization results indicated that raffinose was successfully phosphorylated. Activity tests demonstrated that phosphorylation modification significantly improved the hydroxyl radical scavenging capacity and total antioxidant capacity of raffinose, increasing by 27.06% and 31.40% respectively compared to raffinose. This study provides theoretical basis and technical support for the application of P-raffinose in the development of new functional foods and antioxidants.

Key words: raffinose; phosphorylation; response surface methodology; structural characterization; antioxidant activity

棉子糖是由一分子半乳糖、一分子葡萄糖和一分子果糖组成的低聚糖, 普遍存在于棉籽、大豆、甜菜、卷心菜和一些油料植物的籽仁中, 其中棉籽仁中棉子糖的含量达 4%~5%[1], 但天然棉子糖生物活性

收稿日期: 2025−07−21

基金项目: 新疆维吾尔自治区重点研发专项（2022B02057-1）。

作者简介: 刘旭珍（1998−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 生物与医药, E-mail: 2962208154@qq.com。

*** 通信作者:** 陈燕勤（1975−）, 女, 博士, 教授, 研究方向: 天然产物结构优化与农业废弃物处理, E-mail: xjdxcyq@sohu.com。

较弱[2], 对有益菌增殖效果有限[3], 过量摄入还易引发腹泻[4], 使其在食品领域的应用受到限制。

研究发现, 天然棉子糖分子结构中缺乏如 V_C 结构中的烯二醇、邻二酚羟基等强抗氧化基团, 从而使棉子糖无法像 V_C 一样通过分子内电子转移或共轭效应稳定自由基中间体。在糖类化合物功能化修饰技术体系中, 磷酸化修饰通过引入极性磷酸基团, 将低聚糖分子中羟基上的氢原子置换为磷酸基团, 引起低聚糖分子空间构象改变, 提升低聚糖分子的抗氧化活性[5−7], 因此, 对棉子糖进行磷酸化修饰成为提高棉子糖抗氧化能力的关键突破路径。当前对糖类磷酸化修饰的主要方法包括磷酸盐法[8]、酸法[9] 与磷酰氯法[10] 三大类, 其中因磷酸盐法在安全性、经济成本以及工艺等方面更具优势使其成为低聚糖磷酸化修饰的主要途径[11−12]。例如, 王晓凤等[13] 研究发现与红菊苣寡糖相比, 磷酸化红菊苣寡糖对羟自由基清除率提高了 15.87%; 张亚坤[14] 研究发现磷酸化修饰甘露寡糖可以通过抑制肠道有害菌提高大鼠免疫力; 张元等[15] 研究发现磷酸化壳寡糖具有通过促进小鼠脾淋巴细胞增殖增强小鼠免疫力的益生元效能。

值得注意的是, 当前针对低聚糖改性的相关研究较少, 尤其是在棉子糖磷酸化改性方面, 而研究发现通过磷酸化改性提升低聚糖抗氧化活性的过程, 其性能往往受自身特性及磷酸化浓度等关键参数调控[16−18]。对此, 本文聚焦磷酸盐法, 通过引入亲水性磷酸基团改善棉子糖水溶性并激活生物活性位点, 通过对反应温度、时间、溶液反应体系 pH 及磷酸盐比例等关键参数精准调控, 构建高效、可控、绿色的棉子糖磷酸化修饰体系, 以期为棉子糖磷酸化修饰工艺及产物开发应用提供理论支撑, 并为同类低聚糖功能修饰研究与产业化转化提供案例、奠定基础, 进而推动其在功能型食品、食品添加剂等领域的应用转化, 并助力低聚糖产业的高质量发展。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

棉子糖(≥98%) 陕西晨明生物科技有限公司; 100 Da 透析袋 湖南翊博生物科技有限公司; 无水硫酸钠、三聚磷酸钠、三偏磷酸钠、氢氧化钠、硫酸亚铁、磷酸氢二钠 国药集团化学试剂有限公司; 溴化钾、浓硫酸、浓盐酸、水杨酸、三氯乙酸(TCA) 天津市致远化学试剂有限公司; 铁氰化钾 天津市福晨化学试剂厂; 钼酸铵 天津市光复科技发展有限公司; 抗坏血酸(V_C)、无水乙醇、三氯化铁 天津市鑫铂特化工有限公司; 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH) 上海麦克林生化科技股份有限公司; 所有试剂均为国产分析纯。

AL204-IC 电子天平 梅特勒-托利多仪器有限公司; DHG-9140A 电热恒温鼓风干燥箱 上海齐欣科学仪器有限公司; SY18-1 智能磁力搅拌加热锅 上海司乐仪器有限公司; SHA-C 水浴恒温振荡器 金坛市医疗仪器厂; C1609041 可见分光光度计 上海菁华科技仪器有限公司; JM-16D-40 液晶单频超声波清洗仪器 深圳市洁盟清洗设备有限公司; LGJ-12-80 真空冷冻干燥机 河南兄弟仪器设备有限公司; THY-15 压片机 天津天光光学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 P-棉子糖的制备与条件优化

1.2.1.1 P-棉子糖的制备 参照 Yang 等[19] 的方法, 进行 P-棉子糖的制备。将 0.25 g 的棉子糖、1.25 g 的无水硫酸钠、磷酸化试剂(三偏磷酸钠与三聚磷酸钠)用 25 mL 去离子水充分溶解, 用 0.5 mol/L 的 HCl、NaOH 调节反应体系 pH 为 8, 去离子水透析 48 h, 冷冻干燥得到 P-棉子糖。

1.2.1.2 P-棉子糖取代度的测定 参照 Estela 等[20] 方法, 采用钼蓝比色法测定 P-棉子糖中磷酸根含量。将磷酸二氢钾配制成 10 μg/mL 的磷标准溶液, 分别取磷标准溶液 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5 和 5 mL 置于 25 mL 试管中, 依次加入去离子水至 5 mL, 3 mL 的定磷试剂(1 mL 3 mol/L 硫酸、1 mL 3% 钼酸铵和 1 mL 20% 抗坏血酸的混合溶液), 充分混匀, 45 ℃ 水浴加热 30 min, 静置冷却至室温, 在 660 nm 处测定其吸光值, 以吸光度值为纵轴, 磷酸根质量浓度为横轴, 绘制磷酸根质量浓度的标准曲线, 线性回归方程为: Y=0.0413X−0.0049, R^2=0.9990, 在 0~10 μg/mL 范围内, 磷酸根质量浓度与吸光度值线性关系良好。

取 2 mg P-棉子糖样品, 加入 3 mL 定磷试剂, 用去离子水定容至 50 mL, 45 ℃ 水浴加热 30 min, 在 660 nm 处测定其吸光值并计算样品中磷酸根含量。P-棉子糖中磷酸根含量按公式(1)计算。

$$\text{磷酸根含量}(\%)=\frac{50\times10^{-3}(Y+0.0049)}{0.0413m}\times100 \quad \text{式(1)}$$

式中: m 为样品质量(mg), Y 为吸光度, 50×10^{-3} 为体积换算系数, 0.0049、0.0413 为标准曲线拟合得到的定量系数。

1.2.1.3 单因素实验 将 0.25 g 棉子糖、1.25 g 无水硫酸钠用 25 mL 去离子水充分溶解, 选择反应体系 pH、改性剂比例(三偏磷酸钠与三聚磷酸钠)、温度、时间为单因素进行实验, 每次实验只改变一个因素条件, 选取最佳的单因素条件进行后续实验。其中, 反应体系 pH 选取 7、8、9、10、11, 改性剂比例选取 1∶6、2∶5、3∶4、4∶3、5∶2、6∶1, 反应温度选取 50、60、70、80、90 ℃, 反应时间选取 3、4、5、6、7 h, 通过计算 P-棉子糖的磷酸根含量百分比, 确定棉子糖磷酸化改性的最佳工艺条件。

1.2.1.4 响应面工艺优化 在单因素实验的基础上, 以磷酸根含量百分比为响应值, 使用 Design-Expert 10 软件(Stat-Easelnc, 美国)进行实验设计和统计分

析。基于响应面法（Response Surface Methodology，RSM）中 Box-Behnken Design（BBD）模型的设计原理[21] 及单因素实验结果，选取反应体系 pH（A）、反应时间（B）、反应温度（C）为自变量，在 3 个水平上进行 RSM 试验，使用 Box-Behnken 软件对棉子糖磷酸化修饰条件实验进行优化设计，RSM 试验因素与水平如表 1 所示。

表 1　棉子糖磷酸化改性影响因素的响应曲面法编码及其范围

Table 1　Coding and range of response surface methodology for influencing factors of *Raffinose finose* phosphorylation modification

影响因素	水平编码		
	−1	0	1
A: 反应体系pH	8	9	10
B: 反应时间（h）	4	5	6
C: 反应温度（℃）	70	80	90

1.2.2　结构表征

1.2.2.1　FT-IR 分析　将棉子糖与制备的 P-棉子糖分别与 KBr 以 1∶100 的质量比混合，研磨至粉末状并压成薄片置于红外光谱仪中，并在 4000~500 cm^{-1} 范围内进行光谱分析。

1.2.2.2　NMR 分析　用 99.8% D_2O 分别溶解棉子糖和 P-棉子糖样品，采用 400 MHz 核磁共振谱仪（AVANCEII, Bruker）进行分析，并记录棉子糖、P-棉子糖的 ^{13}C 核磁共振波谱。

1.2.3　P-棉子糖的抗氧化实验

1.2.3.1　DPPH 自由基清除率的测定　参照 Li 等[22] 方法，进行 DPPH 自由基清除实验。配制 0.8、4、10、20、40、60 mg/mL 的棉子糖和 P-棉子糖溶液，取 1.0 mL 样品溶液，加入 1.0 mL 5% 的 DPPH-乙醇溶液充分混匀，室温下避光反应 30 min，在 517 nm 波长处测定吸光度值。A_0 组用等量去离子水代替 DPPH-乙醇溶液，A_C 组用等量去离子水代替样品，阳性对照组用等量 V_C 代替样品。DPPH 自由基清除活性按式（2）计算：

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_S - A_0}{A_C}\right) \times 100 \quad \text{式（2）}$$

式中：A_S 为样品组吸光度，A_0 为空白组吸光度，A_C 为对照组吸光度。

1.2.3.2　羟自由基清除率的测定　参照 Chen 等[23] 方法，进行羟自由基清除实验。配制 0.8、4、10、20、40、60 mg/mL 的棉子糖和 P-棉子糖样品溶液，取 1.0 mL 样品溶液，加入 1.0 mL 9 mol/L 的 Fe_2SO_4 溶液和 9 mol/L 水杨酸-乙醇溶液，最后加入 1.0 mL 8.8 mmol/L H_2O_2 溶液，混匀，37 ℃ 水浴 30 min，冷却至室温，在 510 nm 波长处测定吸光值。A_0 组用等量去离子水代替水杨酸-乙醇溶液，A_C 组用等量去离子水代替样品，阳性对照组用等量 V_C 代替样品。羟自由基清除率按式（3）计算：

$$\text{羟自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_S - A_0}{A_C}\right) \times 100 \quad \text{式（3）}$$

式中：A_S 为样品吸光度，A_0 为空白吸光度，A_C 为对照组吸光度。

1.2.3.3　铁离子还原能力的测定　参照 Chen 等[24] 方法，进行铁离子还原力实验。制 0.8、4、10、20、40、60 mg/mL 的棉子糖和 P-棉子糖样品溶液，取 1.0 mL 样品溶液，加入 1.25 mL 0.2 mol/L（pH6.6）磷酸盐缓冲溶液和 1% $K_3[Fe(CN)_6]$ 溶液，50 ℃ 水浴 30 min，冷却至室温，加入 1.25 mL 10% 的 TCA 溶液，50 r/s 离心 10 min，取 1.25 mL 上清液，加入 1.25 mL 去离子水和 0.25 mL 0.1% $FeCl_3$ 溶液，静置 10 min，在 700 nm 波长处测定吸光度。F_0 组用等量去离子水代替样品，阳性对照组用等量 V_C 代替样品。铁离子还原力按式（4）计算：

$$\text{总还原能力} = F_1 - F_0 \quad \text{式（4）}$$

式中：F_1 为样品吸光度，F_0 为空白吸光度。

1.2.3.4　总抗氧化能力的测定　参照李兰等[25] 方法，进行总抗氧化能力实验。配制 0.8、4、10、20、40、60 mg/mL 的棉子糖和 P-棉子糖溶液，将 0.6 mol/L H_2SO_4，28 mol/L Na_3PO_4 和 4 mol/L 钼酸铵溶液三种溶液按照 1∶1∶1 比例混匀得到工作液，取 1.0 mL 样品溶液，加入 3.0 mL 工作液，95 ℃ 加热 1.5 h，冷却至室温，在 695 nm 波长处测定吸光度。F_0 组用等量去离子水代替样品，阳性对照组用等量 V_C 代替样品。计算方法同 1.2.3.3。

1.3　数据处理

本研究所有实验组及对照组均设置三次平行实验。使用 Microsoft Excel 2010（Microsoft Corporation, USA）和 Origin 2021 软件进行数据分析和作图。采用 Design Expert 10 软件和方差分析（ANOVA）评价实验数据和分析。采用 Tukey's 检验评价显著性差异，P<0.05 定义为显著性差异，P<0.01 定义为极显著性差异，P>0.05 定义为无显著性差异。

2　结果与分析

2.1　单因素实验

反应体系 pH、三偏磷酸钠与三聚磷酸钠比例、反应温度及反应时间对 P-棉子糖中磷酸根含量的影响结果见图 1。图 1 结果显示，各因素对 P-棉子糖中磷酸根含量影响均呈“Λ”变化趋势，都是通过影响底物结构或催化效率呈现出显著的阈值效应[26]。

如图 1a 所示，当反应体系 pH 为 9 时，P-棉子糖磷酸根含量达到 20.13%，反应体系 pH 通过调控催化环境影响反应进程，过碱环境则因磷酸盐形态转化（如三聚磷酸钠水解）削弱协同催化能力，导致磷酸化程度下降[27]，因此，本试验适宜反应体系 pH 初步

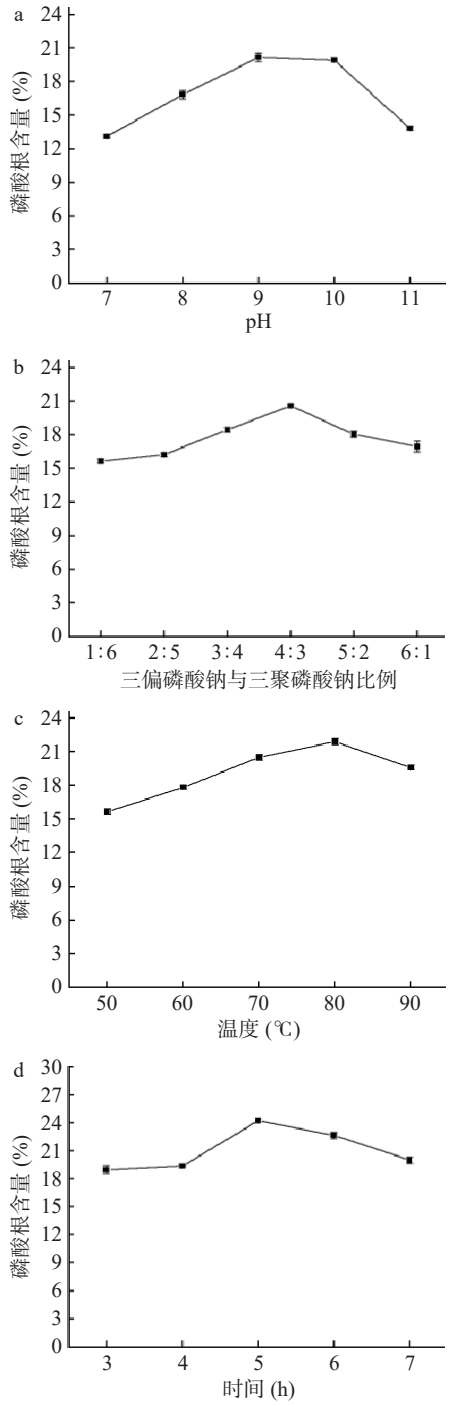


图 1 不同单因素对 P-棉子糖中磷酸根含量的影响

Fig.1 Influence of different factors on the phosphate content in P-raffinose

注: a. 反应体系 pH; b. 三偏磷酸钠与三聚磷酸钠比例; c. 反应温度; d. 反应时间。

定为 9。

如图 1b 所示, 当三偏磷酸钠与三聚磷酸钠比例 4∶3 时, P-棉子糖中磷酸根含量达到 20.57%, 此时三偏磷酸钠与三聚磷酸钠协同催化效应达到最大, 超过该比例后, 过量磷酸盐会引发空间位阻或竞争吸附, 导致磷酸化程度下降[28], 因此, 本试验适宜改性剂比例初步定为 4∶3。

如图 1c 所示, 反应温度 80 ℃ 时, P-棉子糖中磷酸根含量达到 21.88%, 继续升高反应温度棉子糖分子内糖苷键会断裂引起空间构象破坏, 导致磷酸基团结合位点减少[29], 因此, 本试验适宜反应温度初步定为 80 ℃。

如图 1d 所示, 当反应时间 5 h 时 P-棉子糖中磷酸根含量达到 24.2%, 再延长反应时间, 高温持续作用引发棉子糖异构化或降解, 显著降低磷酸化效率[30], 因此, 本试验适宜反应时间初步定为 5 h。

2.2 RSM 设计与分析

不同反应条件下获得的 P-棉子糖中磷酸根含量的响应面试验值和预测值如表 2 所示。P-棉子糖的试验值在 23.7%~33.4% 之间, 基于多元回归分析, 通过 Design Expert 10 软件建立的响应值和三个变量的二次多项式模型如下:

$$Y=32.46-0.1250A+0.8375B-0.8125C+0.4500AB+0.6000AC-0.8250BC-3.62A^2-3.49B^2-2.64C^2$$

其中, Y 为 P-棉子糖的磷酸根含量; A 为反应体系 pH; B 为反应时间; C 为反应温度。

表 2 响应面试验设计及结果

Table 2 Experimental design and results of response surface methodology

实验号	因素			磷酸根含量(%)	
	A pH	B反应时间	C反应温度	试验值	预测值
1	0	0	0	32.20±0.32	32.46
2	0	1	1	27.11±0.92	26.46
3	0	0	0	32.31±0.68	32.46
4	0	−1	1	25.14±0.55	24.68
5	1	−1	0	23.71±0.31	27.43
6	0	0	0	33.45±0.24	32.46
7	0	0	0	31.90±0.29	32.46
8	−1	−1	0	25.41±0.36	28.58
9	0	−1	−1	25.82±0.36	26.3
10	0	0	0	32.49±0.10	32.46
11	−1	0	−1	27.11±0.92	29.18
12	0	1	−1	29.53±0.36	28.00
13	−1	1	0	26.10±0.41	29.35
14	−1	0	1	25.02±0.50	27.51
15	1	0	−1	26.22±0.10	29.1
16	1	1	0	26.19±0.09	29.90
17	1	0	1	26.50±0.12	25.86

模型评估结果见表 3, R^2 为 0.9826 且 R^2_{Adj} 达到 0.9603, 表明该模型具备良好的拟合度。统计学检验进一步证实了模型的可靠性: F 值=44 且 $P<0.0001$, 失拟项 $P=0.3001>0.05$, 说明回归方程具有显著统计学意义且无显著失拟现象; C.V.%=2.33%<10% 及信噪比 17.09>4 的结果, 印证了实验系统的稳定性与方程预测的准确性。

模型的实验实际值与预测值、残差正态概率分布如图 2 所示, 图 2a 显示, 实际值(Actual)和预测值(Predicted)构成的点与参考线的偏离程度小、吻合度高, 表明模型对 P-棉子糖改性工艺条件的精准预测能力, 图 2b 显示, 实际测量值紧密围绕标准化残差曲线分布, 证实了数据拟合的稳定性。此外, 结合表 3 分析发现, 模型显著性检验的 $P<0.05$, 表明模型

表 3　回归模型的方差分析

Table 3　Analysis of variance for the regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	167.44	9	18.6	44	<0.0001	****
A-pH	0.13	1	0.13	0.3	0.6035	
B-反应时间	5.61	1	5.61	13.27	0.0083	**
C-反应温度	5.28	1	5.28	12.49	0.0095	**
AB	0.81	1	0.81	1.92	0.2088	
AC	1.44	1	1.44	3.41	0.1075	
BC	2.72	1	2.72	6.44	0.0388	*
A^2	55.1	1	55.1	130.33	<0.0001	****
B^2	51.36	1	51.36	121.48	<0.0001	****
C^2	29.4	1	29.4	69.54	<0.0001	****
残差	2.96	7	0.42			
失拟项	1.67	3	0.56	1.72	0.3001	不显著
纯误差	1.29	4	0.32			
总相关	170.4	16				
R^2	0.9826					
R^2_{Adj}	0.9603					
预测系数R^2	0.8316					
C.V.%	2.33					
信噪比	17.09					

注：****代表差异达到极其显著水平（P<0.0001）；**表示差异达到极显著水平（P<0.01）；*表示差异达到显著水平（P<0.05）。

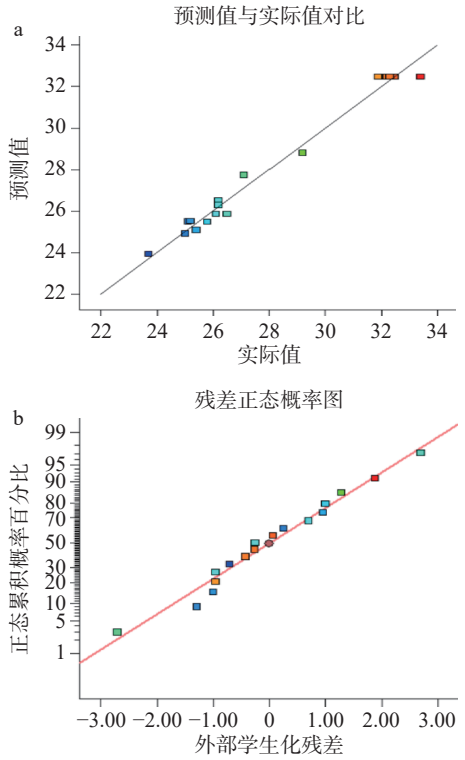


图 2　实验预测值与实际值关系（a）和模型的残差正态概率分布（b）

Fig.2　Relationship plot between experimental predicted values and actual values (a) and normal probability distribution plot of residuals for the model (b)

整体显著；失拟项显著性检验的 P>0.05，说明模型无显著失拟。因此，该二次多项式模型不仅拟合精度高，且统计显著性良好，可有效描述 P-棉子糖中磷酸根含量的量化关系，具备实用价值。

反应体系 pH、反应时间及温度对 P-棉子糖中磷酸根含量影响的交互作用如图 3 所示。图 3 显示，反应体系 pH、反应时间及温度两两交互作用图均为凸面且存在最大值，说明试验范围内 P-棉子糖存在最优制备条件。其中，反应温度与反应时间的响应曲面陡峭且等高线呈椭圆形，说明二者交互作用显著；而反应时间与反应体系 pH、反应温度与反应体系 pH 的响应曲面虽陡峭，但等高线介于椭圆与圆形之间，说明其交互作用不显著。响应面优化结果显示反应体系 pH 为 8.718、温度 77.32 ℃、时间 5.278 h，预测 P-棉子糖中磷酸根含量为 32.46%。结合生产

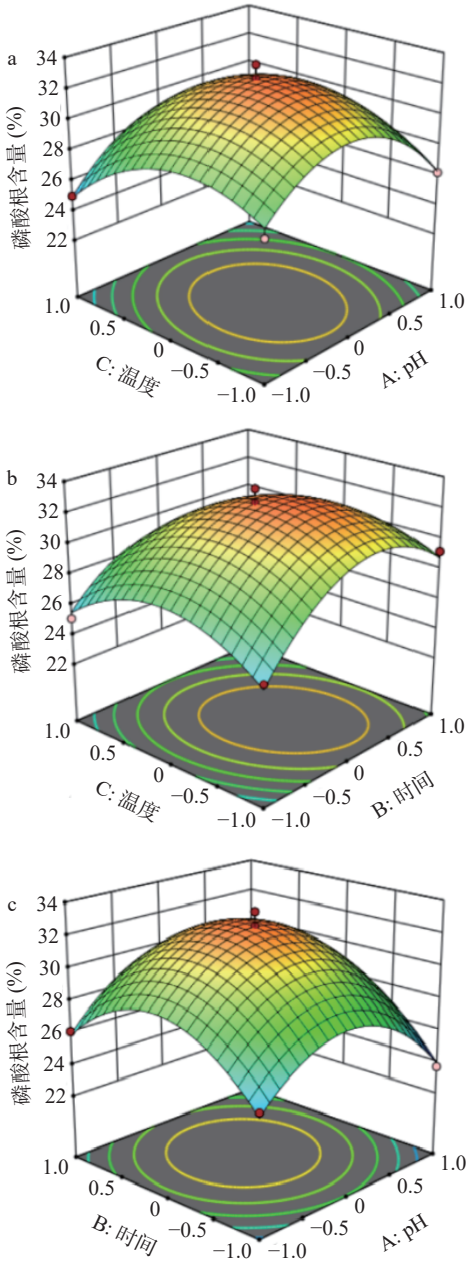


图 3　各因素之间的交互作用对 P-棉子糖中磷酸根含量的影响

Fig.3　Influence of the interaction between various factors on the phosphate content in P-raffinose

注：a 为温度与 pH 的交互作用；b 为温度与时间的交互作用；c 为时间与 pH 的交互作用。

实际修正工艺条件为反应体系 pH9、温度 77 ℃、时间 5.3 h，在此条件下开展三次平行实验，测量值 32.14% 与预测值 32.46% 相对偏差仅 0.99%，验证了模型的准确性与可靠度。

2.3 结构表征

2.3.1 FT-IR 分析 棉子糖和 P-棉子糖的红外吸收光谱如图 4 所示。图 4 为典型的低聚糖吸收峰，P-棉子糖和棉子糖在 3431 cm^{-1} 处均呈现出强吸收特征峰，该吸收峰属于糖分子内或糖分子间氢键作用下的 O–H 伸缩振动峰，在 2800~3000 cm^{-1} 区域内两者均有弱吸收峰且高度重合，该吸收峰是由对应糖环及亚甲基的 C–H 对称或不对称伸缩振动引起，1000~1200 cm^{-1} 区间的糖苷键特征峰簇是由 C–O–C 伸缩与弯曲耦合振动引起，P-棉子糖的红外吸收光谱在此区域虽因磷酸取代发生局部峰形微调，但其振动模式与裂分规律没有发生改变，说明磷酸化修饰前后的棉子糖主要结构没有变化。P-棉子糖在 1658、1276、887 cm^{-1} 处新增特征吸收，其中，1658 cm^{-1} 属于磷酸基团 P=O 伸缩的伴峰，由氢键或取代位阻导致位移引起，1276 cm^{-1} 对应 P=O 不对称伸缩振动是磷酸酯键典型特征峰，887 cm^{-1} 为 P–O 弯曲振动或 P–OH 振动引起是磷酸基团特征峰，1658、1276、887 cm^{-1} 处出现的特征峰表明磷酸化修饰成功[13]。

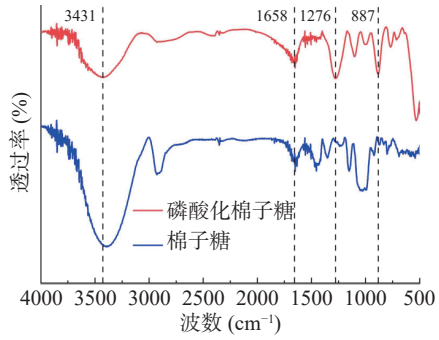


图 4 棉子糖和 P-棉子糖的红外光谱图

Fig.4 Infrared spectra of raffinose and phosphorylated raffinose

2.3.2 NMR 分析 P-棉子糖和棉子糖的 ^{13}C NMR 分析结果如图 5 所示。与棉子糖的 ^{13}C NMR 图 5(a)相比，图 5(b)P-棉子糖的 ^{13}C NMR 谱在 67~77 ppm 和 90~110 ppm 处出现显著变化：其中 67~77 ppm 峰属于磷酸化修饰的伯羟基碳（如 Gal/Glc C-6、Fru C-5）信号，因 C-O-P 键吸电子效应导致化学位移向低场移动；90~110 ppm 峰则是由于棉子糖中葡萄糖或半乳糖的端基碳信号峰（90~110 ppm）向低场移动，表明棉子糖中葡萄糖或半乳糖单元的端基碳（C-1）可能受磷酸化取代的空间位阻影响。P-棉子糖的 ^{13}C NMR 谱中 70~85 ppm 附近的共振信号明显减弱或偏移，说明棉子糖中葡萄糖和半乳糖单元的 C-2、C-3 或 C-4 位置以及果糖单元的 C-3、C-4 位置也可能被磷酸基团取代，P-棉子糖在-4~-26 ppm 区间出现多个特征共振峰，而棉子糖 ^{13}C NMR 在此区间无特征共振峰出现，表明棉子糖中成功引入磷酸基团[31−32]。图 4中 P-棉子糖在 1276 cm^{-1}（P=O 伸缩振动）和 887 cm^{-1}（C-O-P 特征吸收）处呈现的磷酸酯键与磷酸基团特征峰，与图 5(b)中 P-棉子糖相较于棉子糖所出现的碳信号位移及分布变化相吻合。此变化符合磷酸化低聚糖因 C-6 位空间位阻较小而优先发生取代、致使 C-6 信号（约 60 ppm 附近）位移的规律，证明棉子糖已成功磷酸化修饰，且取代最可能发生于半乳糖或葡萄糖单元的 C-6 位以及果糖单元的 C-5 位[33−34]。

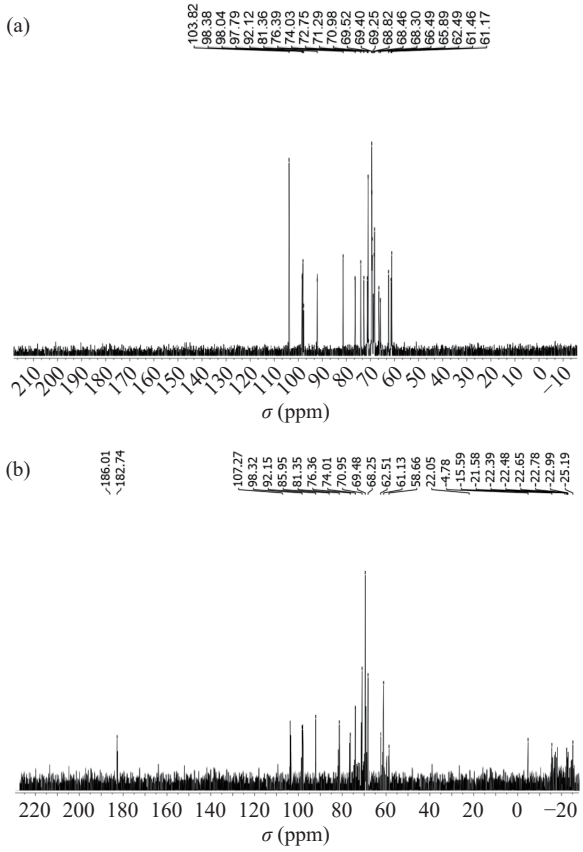


图 5 棉子糖与 P-棉子糖的 ^{13}C NMR

Fig.5 ^{13}C NMR of raffinose and phosphorylated raffinose

注：(a)棉子糖的 ^{13}C NMR；(b) P-棉子糖的 ^{13}C NMR。

2.4 P-棉子糖体外抗氧化活性

P-棉子糖体外抗氧化活性测定结果如图 6 所示。以 V_C 为阳性对照，结果显示改性前后棉子糖体外抗氧化活性与浓度（0.8~60 mg/mL）呈正相关，且 P-棉子糖的体外抗氧化活性始终高于棉子糖。本研究得出的结论，与姜志炫等[5]、Yuan 等[16]、姜振浩[35] 针对磷酸化低聚糖开展的体外抗氧化研究结果一致，均呈现出浓度依赖性。

以 V_C 为阳性对照，当浓度为 60 mg/mL 时，P-棉子糖的 DPPH 自由基清除率为 87.94%，较接近 20 mg/mL 时 V_C 的 DPPH 自由基清除率 99.29%，较棉子糖的 DPPH 自由基清除率 83.14% 相对提高 5.77%，表明磷酸化修饰可增强棉子糖对 DPPH 自由

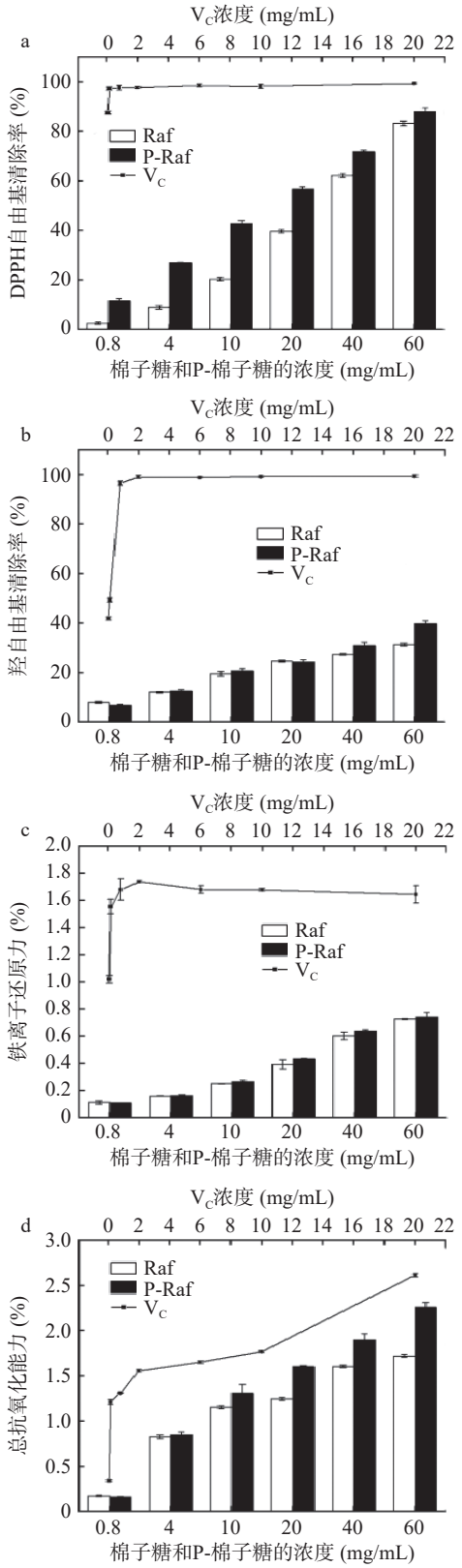


图 6　棉子糖与 P-棉子糖的体外抗氧化结果

Fig.6　*In vitro* antioxidant results of phosphorylated raffinose and raffinose

注：a. DPPH 自由基的清除率；b. 羟自由基的清除率；c. 铁离子还原力；d. 总抗氧化能力。

基的捕获能力；P-棉子糖的羟基自由基清除率为 39.67%，低于 20 mg/mL 时 V_C 的羟基自由基清除率 99.27%，较棉子糖的羟基自由基清除率 31.22% 相对提高 27.06%，表明磷酸化修饰可有效增强棉子糖对羟自由基的清除能力；P-棉子糖的铁离子还原力为 0.74%，接近 20 mg/mL 时 V_C 的铁离子还原力 1.64%，较棉子糖的铁离子还原力 0.73% 相对提高 1.37%，表明磷酸化修饰对 Raf 铁离子还原能力提升效果不显著；P-棉子糖总抗氧化能力为 2.26%，接近 20 mg/mL 时 V_C 的总抗氧化能力 2.61%，较棉子糖的总抗氧化能力 1.72% 相对提高 31.40%，表明磷酸化修饰可大幅提高 Raf 的总抗氧化能力，但目前 P-棉子糖的抗氧化作用机理还不明确，仍需进一步探讨研究。

3　结论

本研究在单因素实验的基础上通过响应面优化法得到最佳制备工艺，P-棉子糖中磷酸根含量为 32.14%，与模型预期值 32.46% 偏差极小，证实了工艺模型的可靠度；FT-IR 及 NMR 结果显示，棉子糖磷酸化修饰成功，且 P-棉子糖中磷酸基团的取代位置最有可能在棉子糖中半乳糖或葡萄糖单元的 C-6 位置以及果糖单元的 C-5 位置；抗氧化实验结果表明，当浓度为 60 mg/mL 时，P-棉子糖的 DPPH 自由基的清除能力、羟自由基清除能力、铁离子还原能力、总抗氧化能力相对棉子糖分别提高了 5.77%、27.06%、1.37%、31.40%，说明磷酸化修饰可有效提高棉子糖的体外抗氧化活性。本研究为 P-棉子糖制备工艺及活性的进一步研究提供了理论依据，更为低聚糖作为抗氧化产品在食品和医药等领域的深入研究和拓展提供数据支撑，后续可进一步考察 P-棉子糖在体内生物活性及其益生元功效，扩展 P-棉子糖在食药领域的开发与利用。

© The Author(s) 2026. 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] 杨寿清. 天然功能性活性因子—棉籽糖[J]. 冷饮与速冻食品工业，2002，8(3)：42−44. [YANG S Q. Natural functional active factor—raffinose[J]. Beverage & Fast Frozen Food Industry，2002，8(3)：42−44.]

[2] 刘佰阳，李光玉，鲍坤，等. 棉籽低聚糖对水貂生长性能、营养物质消化代谢、肠道菌群和免疫性能的影响[J]. 动物营养学报，2013，25(5)：1123−1130. [LIU B Y，LI G Y，BAO K，et al. Effects of cottonseed oligosaccharides on growth performance，nutrient digestion and metabolism，intestinal flora and immune performance of minks[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition，2013，25(5)：1123−1130.]

[3] SØRENSEN M，PENN M，EL-MOWAFI A，et al. Effect of stachyose，raffinose and soya-saponins supplementation on nutrient digestibility，digestive enzymes，gut morphology and growth performance in Atlantic salmon (*Salmo salar*，L)[J]. Aquaculture，2011，314(1-4)：145−152.

[4] 陈建宇，刘岭，陈运霞. 棉籽糖替代抗生素对断奶仔猪生长性

能和营养物质表观消化率的影响[J]. 饲料工业, 2017, 38(18): 25−27. [CHEN J Y, LIU L, CHEN Y X. Effects of raffinose replacing antibiotics on growth performance and apparent nutrient digestibility of weaned piglets[J]. Feed Industry, 2017, 38(18): 25−27.]

[5] 姜志炫, 蔡自富, 董思思, 等. 刺梨多糖的化学修饰及其抗氧化和降血糖活性分析[J]. 食品工业科技, 2026, 47(2): 94−103. [JIANG Z X, CAI Z F, DONG S S, et al. Chemical modification of *Rosa roxburghii* polysaccharides and analysis of their antioxidant and hypoglycemic activities[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(2): 94−103.]

[6] XIA Shunli, ZHAI Yongcong, WANG Xue, et al. Phosphorylation of polysaccharides: A review on the synthesis and bioactivities[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 184: 946−954.

[7] TANAKA T, KOBAYASHI T, TAMENORI Y, et al. Phosphoryl oligosaccharides of calcium enhance mineral availability and fluorapatite formation[J]. Archives of Oral Biology, 2019, 101: 135−141.

[8] MUHAMMAD K, HUSSIN F, MAN Y C, et al. Effect of pH on phosphorylation of sago starch[J]. Carbohydrate Polymers, 2000, 42(1): 85−90.

[9] SUFLET D M, CHITANU G C, POPA V I. Phosphorylation of polysaccharides: New results on synthesis and characterisation of phosphorylated cellulose[J]. Reactive and Functional Polymers, 2006, 66(11): 1240−1249.

[10] WANG Junlong, WANG Yuxin, XU Lu, et al. Synthesis and structural features of phosphorylated *Artemisia sphaerocephala* polysaccharide[J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 181: 19−26.

[11] CAO Yuyao, JI Yuhang, LIAO Aimei, et al. Effects of sulfated, phosphorylated and carboxymethylated modifications on the antioxidant activities *in-vitro* of polysaccharides sequentially extracted from *Amana edulis*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 146: 887−896.

[12] PENG Yingyun, BAI Xue, XU Hanwen, et al. Phosphorylation, characterization, and antioxidant activity of polysaccharides from *Flammulina velutipes* scraps[J]. American Journal of Biochemistry and Biotechnology, 2022, 18(3): 279−288.

[13] 王晓凤, 朱建星, 郭玉林. 响应面法优化红菊苣寡糖的磷酸化工艺[J]. 食品科技, 2024, 49(3): 265−272. [WANG X F, ZHU J X, GUO Y L. Optimization of phosphorylation process of red chicory oligosaccharides by response surface methodology[J]. Food Science and Technology, 2024, 49(3): 265−272.]

[14] 张亚坤. 磷酸化修饰甘露寡糖结构表征及对大鼠肠道健康的影响[D]. 郑州: 河南工业大学, 2022. [ZHANG Y K. Structural characterization of phosphorylated manno-oligosaccharides and their effects on intestinal health in rats[D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2022.]

[15] 张元, 林强, 宋玥. 壳寡糖及其磷酸化修饰产物对小鼠脾淋巴细胞增殖及诱生细胞因子的影响[J]. 食品科技, 2012, 37(2): 11−15. [ZHANG Y, LIN Q, SONG Y. Effects of chitosan oligosaccharides and their phosphorylated modified products on proliferation of mouse splenic lymphocytes and induction of cytokines [J]. Food Science and Technology, 2012, 37(2): 11−15.]

[16] YUAN Huamao, ZHANG Weiwei, LI Xuegang, et al. Preparation and *in vitro* antioxidant activity of κ-carrageenan oligosaccharides and their oversulfated, acetylated, and phosphorylated derivatives[J]. Carbohydrate Research, 2005, 340(4): 685−692.

[17] 宋玥, 林强. 磷酸化壳寡糖制备工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(1): 48−50. [SONG Y, LIN Q. Study on preparation process of phosphorylated chitosan oligosaccharides[J]. Anhui Agricultural Sciences, 2010, 38(1): 48−50.]

[18] 唐啟林. 酵母细胞壁 (1→3)-*β*-D-葡聚糖衍生物的制备及抗氧化活性研究[D]. 重庆: 重庆师范大学, 2017. [TANG Q L. Preparation and antioxidant activity of (1→3)-*β*-D-glucan derivatives from yeast cell wall[D]. Chongqing: Chongqing Normal University, 2017.]

[19] YANG Wenjian, ZHANG Yanqiong, TANG Ao, et al. Preparation and antioxidant activity of phosphorylated polysaccharide from purple sweet potato[J]. Chemical Biology & Drug Design, 2021, 98(5): 828−834.

[20] ESTELA J, CERDA V. Flow analysis techniques for phosphorus: An overview[J]. Talanta, 2005, 66(2): 307−331.

[21] ZHANG Bo, CHEN Jixiang, HE Zhixia, et al. Hydrothermal liquefaction of fresh lemon-peel: Parameter optimisation and product chemistry[J]. Renewable Energy, 2019, 143: 512−519.

[22] LI S Q, SHAH N P. Effects of various heat treatments on phenolic profiles and antioxidant activities of *Pleurotus eryngii* Extracts[J]. Journal of Food Science, 2013, 78(8).

[23] CHEN Fang, HUANG Gangliang, YANG Zhiyuan, et al. Antioxidant activity of *Momordica charantia* polysaccharide and its derivatives[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 138: 673−680.

[24] CHEN Songhua, HUANG Hualiang, HUANG Gangliang. Extraction, derivatization and antioxidant activity of cucumber polysaccharide[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 140: 1047−1053.

[25] 李兰, 段政, 汤有宏, 等. 金银花总黄酮的提取工艺及其抗氧化性研究[J]. 酿酒, 2022, 49(6): 131−136. [LI L, DUAN Z, TANG Y H, et al. Study on extraction technology and antioxidant activity of total flavonoids from *Lonicera japonica*[J]. Liquor-Making, 2022, 49(6): 131−136.]

[26] DENG Y M, KARUNARATNE C V, CSATARY E, et al. Chiral bimetallic catalysts derived from chiral metal phosphates: Enantioselective three-component asymmetric aza-Diels–alder reactions of cyclic ketones[J]. The Journal of Organic Chemistry, 2015, 80(16): 7984−7993.

[27] CHEN Ping, SONG Duo, ZHANG Xin, et al. Understanding competitive phosphate and silicate adsorption on goethite by connecting batch experiments with density functional theory calculations[J]. Environmental Science & Technology, 2022, 56(2): 823−834.

[28] HUANG Zhenpeng, CAO Shiying, YU Jihang, et al. Total oxidation of light alkane over phosphate-modified Pt/CeO_2 catalysts[J]. Environmental Science & Technology, 2022, 56(13): 9661−9671.

[29] 惠和平, 凌梅, 吴海彦, 等. 黄芩多糖的磷酸化修饰及其体外降血糖活性[J]. 精细化工, 2025, 42(10): 2190−2197. [HUI H P, LING M, WU H Y, et al. Phosphorylation modification of *Scutellaria baicalensis* polysaccharides and their *in vitro* hypoglycemic activity[J]. Fine Chemicals, 2025, 42(10): 2190−2197.]

[30] 王俊龙, 江升旗, 刘梦瑶, 等. 磷酸化修饰鬼白果多糖的制备

及生物活性[J]. 精细化工, 2025, 42(9): 1994−2004. [WANG J L, JIANG S Q, LIU M Y, et al. Preparation and biological activity of phosphorylated podophyllum fruit polysaccharides[J]. Fine Chemicals, 2025, 42(9): 1994−2004.]

[31] YANG Wenjian, HUANG Gangliang. Chemical modification and structural analysis of polysaccharide from *Solanum tuberdsm*[J]. Journal of Molecular Structure, 2023, 1285: 135480.

[32] 蒋文明, 周石洋. 芦荟多糖及其衍生物的制备与抗氧化活性研究[J]. 保鲜与加工, 2022, 22(11): 61−68,75. [JIANG W M, ZHOU S Y. Study on preparation and antioxidant activity of aloe polysaccharides and their derivatives[J]. Storage and Process, 2022, 22(11): 61−68,75.]

[33] LIN Bobo, HUANG Gangliang. Chemical modification and antioxidant activity of Wendan peel polysaccharide[J]. Scientific Reports, 2025, 15: 6258.

[34] HUO N L, AMEER K, WU Z G, et al. Preparation, characterization, structural analysis and antioxidant activities of phosphorylated polysaccharide from Sanchi (*Panax notoginseng*) flower[J]. Journal of Food Science and Technology, 2022, 59(12): 4603−4614.

[35] 姜振浩. 结球菊苣多糖及寡糖磷酸化衍生物的制备[D]. 沈阳: 沈阳化工大学, 2023. [JIANG Z H. Preparation of phosphorylated derivatives of heading chicory polysaccharides and oligosaccharides[D]. Shenyang: Shenyang University of Chemical Technology, 2023.]