

张慧慧, 李灿, 刘会平, 等. 肉桂多糖的提取纯化及体外抗氧化和降血糖活性分析 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(7): 15–24. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023080088

ZHANG Huihui, LI Can, LIU Huiping, et al. Extraction and Purification of *Cinnamomum cassia* Polysaccharides and Its Antioxidant and Hypoglycemic Activities *in Vitro*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(7): 15–24. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023080088

· 特邀主编专栏—食品中天然产物提取分离、结构表征和生物活性 (客座主编: 杨栩、彭鑫) ·

肉桂多糖的提取纯化及体外抗氧化和降血糖活性分析

张慧慧, 李 灿, 刘会平*, 马笑笑, 张 欣, 王 兵, 刘 盈
(天津科技大学食品科学与工程学院, 天津 300457)

摘 要: 对肉桂多糖进行提取纯化, 探究其理化性质及抗氧化和降血糖活性。采用水提醇沉法, 通过响应面试验考察提取温度、时间、液料比对肉桂多糖得率的影响, 利用高效液相色谱法、热重分析等方法探究肉桂多糖的理化性质, 并通过体外实验测试其抗氧化及降血糖活性。结果显示, 最佳提取条件为温度 90 ℃、时间 2.5 h、液料比 20:1 (mL/g)、提取 2 次, 此条件下平均得率为 3.22%。纯化出的多糖相对分子质量为 1.95×10^6 Da, 总糖含量 $90.11\% \pm 1.24\%$, 230 ℃ 以内稳定。红外光谱图显示其具有多糖的特征吸收峰, 核磁共振谱显示肉桂多糖具有 α 、 β 构型等结果与红外一致, 刚果红染色分析其不具有三股螺旋结构。活性测试显示肉桂多糖具有良好的抗氧化能力, 三种自由基 DPPH·、ABTS⁺·、·OH 的 IC₅₀ 值分别为 0.191、2.835、3.221 mg/mL, 多糖 6 mg/mL 的总还原力值为 1.18。同时肉桂多糖还对 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶具有抑制效果, IC₅₀ 值分别为 0.189、0.340 mg/mL。本研究提取纯化得到一种高分子量肉桂多糖, 且具有良好的抗氧化、降血糖活性, 可为肉桂的功能性开发利用提供依据。

关键词: 肉桂多糖, 提取工艺优化, 理化分析, 抗氧化活性, 降血糖活性

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)07-0015-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023080088

本文网刊:



Extraction and Purification of *Cinnamomum cassia* Polysaccharides and Its Antioxidant and Hypoglycemic Activities *in Vitro*

ZHANG Huihui, LI Can, LIU Huiping*, MA Xiaoxiao, ZHANG Xin, WANG Bing, LIU Ying

(College of Food Science and Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: In this paper, *Cinnamomum cassia* polysaccharide (CCP) was extracted and purified, and its physicochemical properties, antioxidant and hypoglycemic activities were investigated. The polysaccharide yield was optimized by the response surface test with three conditions: Temperature, time and liquid-solid ratio. Then the physicochemical properties of purified CCP were investigated by high performance liquid chromatography, thermogravimetric analysis and other methods, meanwhile, its antioxidant and hypoglycemic activities were tested *in vitro*. Results indicated that the optimum extraction conditions as follow: Extraction temperature 90 ℃, extraction time 2.5 h, liquid-solid ratio 20:1 (mL/g), extraction twice, under these conditions, the average yield was 3.22%. The relative molecular weight of CCP was 1.95×10^6 Da, the total sugar content was $90.11\% \pm 1.24\%$, and it was stable within 230 ℃. Both Fourier-transform infrared and nuclear magnetic hydrogen spectra showed that CCP had α , β -glycosidic bonds and other structures, in addition, Congo red staining showed that it might not have triple helix structure. Activity assays showed that CCP had good scavenging effect on DPPH·, ABTS⁺·, ·OH, with IC₅₀ values of 0.191, 2.835 and 3.221 mg/mL, respectively, and the total reducing power value of the polysaccharide at 6 mg/mL was 1.18. In addition, CCP also had inhibitory activity against α -amylase and α -glucosidase, with IC₅₀ values of 0.189 and 0.340 mg/mL. In this study, a high molecular weight *Cinnamomum cassia*

收稿日期: 2023-08-11

基金项目: 国家自然科学基金 (31801568); 天津市自然科学基金 (21YDTPJC00060)。

作者简介: 张慧慧 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 动物资源开发与功能食品, E-mail: 18317582169@163.com。

* 通信作者: 刘会平 (1964-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 功能性多糖的提取纯化、结构解析及功能评价, E-mail: liuhuiping111@163.com。

polysaccharide was extracted and purified, which had good antioxidant and hypoglycemic activities, which may provide a basis for the functional development and utilization of *Cinnamomum cassia*.

Key words: *Cinnamomum cassia* polysaccharides; optimization of extraction process; physical and chemical analysis; antioxidant activity; hypoglycemic activity

肉桂(*Cinnamomum cassia*)是樟科樟属植物肉桂的干燥树皮,既可药用也常被用做食品香料,调味品等,国家卫生部将其划分为药食同源物品,在我国广泛分布于广西等热带或亚热带地区^[1]。肉桂中含有多种活性成分,如肉桂醛、萜类物质、苯丙素、多糖等,因此具有多种生物活性^[2]。已有大量研究表明,肉桂具有抗氧化、抑菌抗炎、抗凝血、抗糖尿病等功能作用^[3-7]。

目前已有的与各种肉桂多糖相关的研究主要如下: Al-Ajalein 等^[8]用微波辅助的方法从肉桂树皮中提取到一种低分子量果胶多糖,主要由葡萄糖、阿拉伯糖、半乳糖、半乳糖醛酸组成,研究发现其具有抗色素沉着过度 and 酪氨酸酶抑制作用。李胜男等^[9]从肉桂水提物中分离纯化出分子量为 3630 Da 的中性多糖,主要由葡萄糖组成,具有良好的 DPPH· 和 ABTS⁺·清除能力。张铭儒等^[10]制备到主要由甘露糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖组成的肉桂多糖,并发现其可能通过调节糖脂代谢而显示出对糖尿病小鼠降血糖作用。此外,于峰等^[11]也发现肉桂多糖对四氧嘧啶诱发的实验性糖尿病小鼠有显著的降糖效果。

但不同来源的肉桂其活性物质的结构性质存在部分差异^[12],关于某种特定资源肉桂多糖的研究鲜有报道。“防城肉桂”是广西防城港市特产,中国地理标志证明商标,资源丰富,品质独特,故以防城港肉桂为原料,采用水提醇沉法提取肉桂多糖,探究其体外抗氧化活性及降血糖活性,以期防城港肉桂资源的综合利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

肉桂 产自广西省防城港;无水乙醇、正丁醇 天津市江天化工技术股份有限公司;三氯甲烷 天津市化学试剂厂;2,1-二苯基-2-三硝基肼(DPPH)、2,2'-联氨-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS)、硫酸亚铁、水杨酸、过氧化氢、铁氰化钾、氯化铁等 麦克林生化科技有限公司;Sephadex G-200、无水葡萄糖、AB-8 大孔吸附树脂、葡聚糖标准品 北京索莱宝科技有限公司;阿卡波糖、 α -淀粉酶(5 U/mg)、 α -葡萄糖苷酶(7.5 U/mg) 上海源叶生物科技有限公司;所用试剂均为分析纯。

SE-2000 高速粉碎机 圣象电器有限公司;ESJ205-4 电子天平 Mettler Toledo;DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器 杭州旌斐仪器科技有限公司;RE-52A 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂;

H1850R 高速冷冻离心机 湖南湘仪离心机仪器有限公司;BS-100A 自动部分收集器 上海沪西分西仪器有限公司;FD-1A-50 真空冷冻干燥机 上海比郎仪器制造有限公司;Agilent 1260 高效液相色谱仪 美国安捷伦科技公司;VECTOR-220 傅里叶红外光谱仪 德国布鲁克公司;Multiskan GO 酶标仪 美国 Thermo Fisher 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 肉桂多糖的提取 肉桂用高速粉碎机粉碎,将粉末用 95% 乙醇搅拌 5 h 进行脱脂脱色^[13],结束后滤去乙醇溶液,沉淀于 55 ℃ 彻底干燥。采用传统水提醇沉法提取肉桂多糖。热水浸提 2 次后合并滤液,真空旋转蒸发至原四分之一体积,随后边搅拌边加入无水乙醇至溶液浓度为 60%,4 ℃ 沉淀 18 h。结束后,离心(4000 r/min)15 min 分离沉淀,散至无乙醇味,加入蒸馏水复溶,冷冻后真空干燥。肉桂粗多糖得率计算公式如下:

$$\text{粗多糖得率(\%)} = \frac{\text{粗多糖质量(g)}}{\text{原料质量(g)}} \times 100$$

1.2.2 单因素实验 为探究不同提取条件对肉桂多糖得率的影响,选定提取温度 90 ℃,时间 2 h,液料比 20:1(mL/g),提取 1 次,醇沉浓度 60% 的条件,考察浸提温度(60、70、80、90、100 ℃),浸提时间(1、2、2.5、3、3.5 h),液料比(10:1、15:1、20:1、25:1、30:1 mL/g),浸提次数(1、2、3、4 次)对粗多糖得率的影响。

1.2.3 响应面优化试验 根据单因素实验结果,固定浸提次数 2 次,选择三个变量:浸提温度、浸提时间、液料比,运用 Design Expert 13 软件进行三因素三水平的 Box-Behnken 试验设计。试验因素与水平见表 1。

表 1 响应面试验的因素与水平
Table 1 Factors and levels of response surface experiment

因素	水平		
	-1	0	1
A 浸提温度(℃)	80	90	100
B 浸提时间(h)	2	2.5	3
C 液料比(mL/g)	15:1	20:1	25:1

1.2.4 肉桂多糖的纯化 通过 Sevag 法($V_{\text{三氯甲烷}}:V_{\text{正丁醇}}=4:1$)去除蛋白质,取 Sevag 试剂与 4 倍体积粗多糖溶液混合并振荡,离心,直至不出现蛋白层,重复约 7 次。然后将除蛋白后的粗多糖溶液通过预处理后的 AB-8 大孔吸附树脂层析柱以恒流泵 30 r/min

的流速进行脱色^[14],将脱色成功的溶液浓缩,蒸馏水透析 72 h,冷冻干燥后获得粗多糖。配制 20 mg/mL 的多糖溶液,过 0.22 μm 滤膜后加样至 Sephadex G-200 层析柱,以蒸馏水作洗脱剂,流速为 3 min/mL,每管收集 2 mL。用苯酚-硫酸法^[15]测定每管洗脱液中多糖含量,绘制出洗脱曲线,其中洗脱曲线的横坐标为收集的试管号,纵坐标为 490 nm 处洗脱液的吸光度值。收集曲线峰管中的洗脱液,冷冻干燥得纯化的肉桂多糖,命名为 CCP。

1.2.5 CCP 含量测定 采用苯酚-硫酸法^[15]测定 CCP 的总糖含量,其中标准品是无水葡萄糖,标准曲线为葡萄糖含量-吸光度值图。具体操作如下:

分别取 0.1 mg/mL 葡萄糖标准溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1 mL 于玻璃试管,补充蒸馏水至总体积为 1 mL,随后各加入 1 mL 6% 苯酚溶液和 5 mL 浓硫酸,振荡混匀后室温静置 10 min,沸水浴 15 min,降温后测定各试管溶液在 490 nm 处的吸光度。将 CCP 配制成 0.1 mg/mL 的溶液,取 1 mL 按照上述方法处理后测定溶液的吸光度值。根据标准曲线计算 CCP 的总糖含量,计算公式如下:

$$\text{总糖含量}(\%) = \frac{X}{m} \times 100$$

式中, X 为样品组吸光度值代入标准曲线后所得葡萄糖含量(mg); m 为样品质量(mg)。

1.2.6 CCP 相对分子质量 将葡聚糖标准品(T10、T40、T70、T110、T500、T2000)及 CCP 各自溶解在蒸馏水中(1 mg/mL)并通过 0.22 μm 滤膜。以超纯水作流动相,采用高效液相色谱仪中示差检测器和凝胶色谱柱对所备样品进行检测,运行参数为柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,进样体积 20 μL ,洗脱速度 0.6 mL/min。根据各标准品保留时间-分子量 lg 值所得的标准曲线计算 CCP 的相对分子质量,计算公式如下:

$$\text{相对分子质量} = 10^y$$

式中, y 为样品保留时间代入标准曲线后所得的值。

1.2.7 CCP 的傅里叶红外光谱分析 称取 1 mg CCP 和 150 mg 干燥 KBr 置于研钵并快速研磨成粉末,在 12 MPa 压力下压成均匀透光的薄片。通过傅里叶红外光谱仪在 4000~400 cm^{-1} 范围以 4 cm^{-1} 的分辨率识别 CCP 的特征吸收峰,扫描 16 次。

1.2.8 CCP 的 ^1H 核磁共振检测 称取 50 mg CCP,用 0.5 mL D_2O 充分溶解并移入核磁管中,利用 DPX-400 核磁共振波谱仪记录 ^1H 谱。

1.2.9 刚果红分析 参考 Ma 等^[16]的方法,配制浓度为 0.5 mg/mL CCP 溶液、50 $\mu\text{mol/L}$ 刚果红溶液和 1 mol/L NaOH 溶液。取 2 mL CCP 溶液和等体积刚果红溶液,再加入不同体积的蒸馏水和 NaOH 溶液,最终使 NaOH 浓度分别为 0、0.05、0.1、0.15、0.2、0.3、0.4 mol/L,室温下反应 10 min 后,使用紫外

分光光度计在 400~600 nm 范围内测定不同梯度溶液的最大吸收波长。

1.2.10 热重分析 称取 5 mg CCP 样品置于坩埚中,设置初始温度为 30 $^{\circ}\text{C}$,结束温度为 600 $^{\circ}\text{C}$,以 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的加热速度进行热力学测试。

1.2.11 CCP 的体外抗氧化活性测定 实验参考的方法均略有改动,具体方案如下。

1.2.11.1 DPPH 自由基清除能力测定 方法参考 Deng 等^[17],配制 0.2 mmol/L DPPH 无水乙醇溶液,不同浓度 CCP 溶液(0.05、0.1、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、6.0 mg/mL),取 1 mL CCP 溶液与 2 倍的 DPPH 无水乙醇溶液混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗反应 30 min,检测溶液在 517 nm 处的吸光度值。同时,以 V_C 为阳性对照。

$$\text{DPPH} \cdot \text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100$$

式中, A_1 是 CCP 溶液组吸光度值; A_2 是 DPPH 无水乙醇换成无水乙醇; A_0 是多糖溶液换成蒸馏水。

1.2.11.2 ABTS $^{+}$ 自由基清除能力测定 方法参考 Thambiraj 等^[18],配制 ABTS $^{+}$ 工作液(等体积混合 7 mmol/L ABTS 和 2.45 mmol/L 过硫酸钾,用蒸馏水将混合液在 734 nm 处的吸光度值调整为 0.7 $\pm$ 0.02)。取 0.4 mL 不同浓度的 CCP 溶液(同 1.2.11.1)与 4 mL 工作液混匀,黑暗反应 5 min,检测溶液在 734 nm 处的吸光度值。同样以 V_C 为阳性对照。

$$\text{ABTS}^{+} \cdot \text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100$$

式中, A_1 是 CCP 溶液组吸光度值; A_2 是 ABTS $^{+}$ 工作液换成蒸馏水; A_0 是多糖溶液换成蒸馏水。

1.2.11.3 羟自由基清除能力测定 方法参考 Zhang 等^[19],准备 6 mmol/L 的硫酸亚铁溶液和水杨酸·无水乙醇溶液、0.1% 的过氧化氢溶液、不同质量浓度的 CCP 溶液(同 1.2.11.1)。取 1 mL 多糖溶液依次加入等体积的三种试剂并充分混合,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min 后,检测混合液在 510 nm 处的吸光度值。以 V_C 为阳性对照。

$$\cdot\text{OH清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100$$

式中, A_1 是 CCP 溶液组吸光度值; A_2 是过氧化氢溶液换成蒸馏水; A_0 是多糖溶液换成蒸馏水。

1.2.11.4 总还原力测定 方法参考 Chen 等^[20],配制 0.2 mol/L pH6.6 的磷酸缓冲液、1% 铁氰化钾、10% 三氯乙酸、0.1% 氯化铁、不同质量浓度的 CCP 溶液(同 1.2.11.1)。将 1 mL 多糖溶液、2.5 mL 的磷酸缓冲液和铁氰化钾溶液混匀,50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 20 min。冷却后再加 2.5 mL 三氯乙酸,离心后取上清 2.5 mL,加入等体积蒸馏水和 0.5 mL 氯化铁溶液,检测混合溶液在 700 nm 处的吸光度值,最终以吸光度值大小

表示总还原力的强弱。以 V_C 为阳性对照。

1.2.12 CCP 的 α -淀粉酶抑制活性 方法参考 Cao 等^[21], 但有改动。用 0.1 mol/L 的 PBS 配制不同质量浓度 (0.05、0.1、0.25、0.5、0.75、1.0、1.5 mg/mL) 的肉桂多糖溶液, 酶活力为 50 U/mL 的 α -淀粉酶溶液以及 1% 的可溶性淀粉溶液。取多糖样品和 α -淀粉酶溶液各 30 μ L, 37 $^{\circ}$ C 反应 10 min, 再加入同体积可溶性淀粉溶液, 沸水浴 15 min, 迅速冷却后向其中加入 50 μ L DNS, 然后 95 $^{\circ}$ C 加热 5 min, 冷却后加入 500 μ L 蒸馏水, 检测溶液在 540 nm 处的吸光度值, 以阿卡波糖为阳性对照。

$$\text{抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3}\right) \times 100$$

式中, A_1 是 CCP 溶液组吸光度值; A_2 是将 α -淀粉酶溶液换成 PBS; A_3 是将多糖溶液换成 PBS。

1.2.13 CCP 的 α -葡萄糖苷酶抑制活性 方法参考 Xu 等^[22], 但有改动。用 0.1 mol/L 的 PBS 配制 1.2.12 中的多糖溶液, 1 U/mL 的 α -葡萄糖苷酶溶液、5 mmol/L 的 4-硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷 (PNPG)。取多糖溶液与 α -葡萄糖苷酶各 40 μ L 混匀, 37 $^{\circ}$ C 孵育 10 min, 然后加入 40 μ L PNPG, 同温度再孵育 5 min, 再加入 100 μ L Na_2CO_3 溶液 (1 mol/L) 终止反应并显色, 检测溶液在 405 nm 处的吸光度值。阳性对照为阿卡波糖。

$$\text{抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3}\right) \times 100$$

式中, A_1 是 CCP 溶液组吸光度值; A_2 是将 α -葡萄糖苷酶溶液换成 PBS; A_3 是将多糖溶液换成 PBS。

1.3 数据处理

实验设三次平行, 数据以平均值 $\pm$ 标准差表示。运用 Design Expert 13、Origin Pro 2021、Graph Pad Prism 8 软件对实验数据进行响应面分析与统计学分析。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

肉桂多糖得率随提取温度的升高而升高, 温度达到 90 $^{\circ}$ C 时, 得率为 3.22%, 温度继续升高到 100 $^{\circ}$ C 时, 多糖的溶出量基本稳定, 多糖得率并未再提升。因此选择 80、90、100 $^{\circ}$ C 三个温度点参与响应面设计。

浸提时间高于 2.5 h 之后, 多糖得率的升高速率趋于平缓, 可见长时间的浸提不会提升得率, 可能是后期出现了杂质的溶出。考虑到提取效率, 选取 2、2.5、3 h 继续响应面实验。

溶剂在一定范围内增加可能使细胞内外浓度差增大, 从而使多糖更多地溶出。液料比在 20:1 mL/g 之后多糖得率开始下降, 可能是随着溶剂量的增加, 此时多糖成分提取已比较充分, 升高的压力差导致其它溶质溶出^[23]。因此选择 15:1、20:1、25:1 mL/g

作为响应面实验水平。

从图 1 可以看到, 当浸提次数超过 2 时对肉桂多糖得率的影响并不明显, 考虑总体提取时间、效率等因素, 确定提取次数为 2 次。

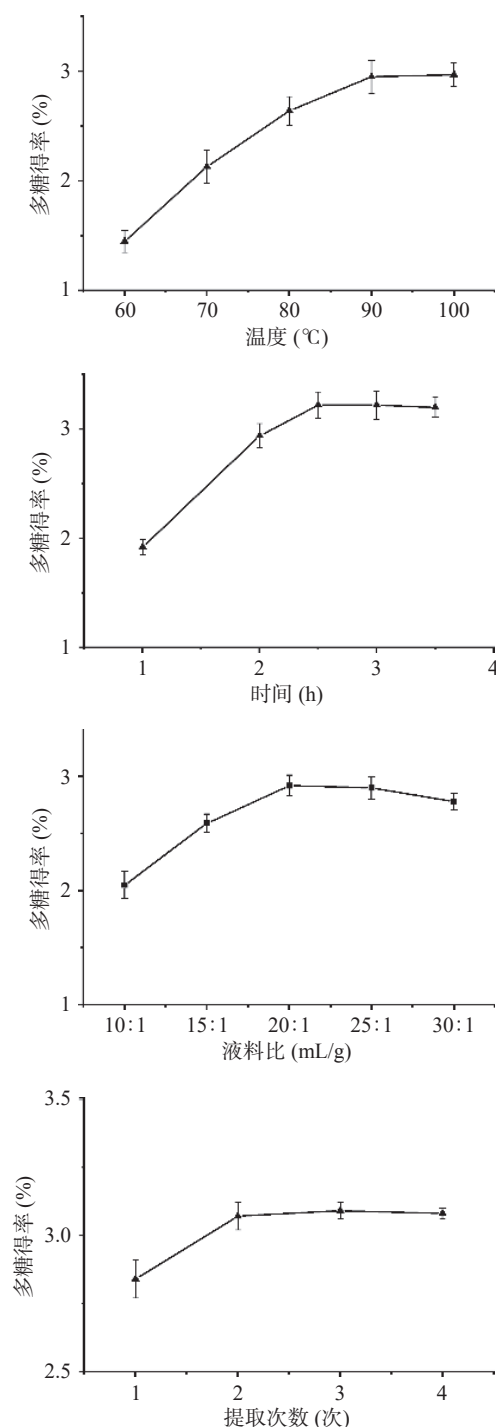


图 1 不同单因素条件下的肉桂多糖提取效果
Fig.1 Extraction efficiency of *Cinnamomum cassia* polysaccharide with different single factor conditions

2.2 响应面实验结果

2.2.1 试验设计与结果 表 2 是响应面实验设计方案及最终结果, 对此结果进行多元拟合分析, 获得预测模型方程: $Y=3.32+0.1425A+0.1988B+0.1213C+0.0375AB+0.0175AC+0.0400BC-0.2280A^2-0.2755B^2-0.3455C^2$ 。

表 2 响应面试验设计及结果
Table 2 Response surface experiment design and results

试验号	A 浸提温度	B 浸提时间	C 液料比	得率(%)
1	0	0	0	3.30
2	0	0	0	3.27
3	1	1	0	3.19
4	0	-1	1	2.58
5	-1	0	-1	2.51
6	0	0	0	3.36
7	1	0	1	3.01
8	0	1	-1	2.73
9	1	-1	0	2.73
10	-1	0	1	2.70
11	1	0	-1	2.75
12	-1	-1	0	2.51
13	0	1	1	3.07
14	0	-1	-1	2.40
15	0	0	0	3.31
16	0	0	0	3.34
17	-1	1	0	2.82

2.2.2 各因素交互作用分析 方差分析由表 3 可见, 该模型差异性($P<0.0001$)极显著, 失拟项($P>0.05$)不显著, 说明模型拟合较好; 同时根据 P 值可知^[24], 回归模型的一次项影响均极显著($P<0.0001$), 交互项 AC 影响不显著($P>0.05$), AB、BC 影响显著($P<0.05$), 二次项均影响极显著($P<0.0001$)。由 F 值大小可知, 试验中各因素对得率的影响顺序为(B)时间>(A)温度>(C)液料比。

表 3 回归模型方差分析结果
Table 3 Variance analysis for response surface quadratic model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	1.77	9	0.1964	227.47	<0.0001	***
A	0.1625	1	0.1625	188.11	<0.0001	***
B	0.3160	1	0.3160	365.94	<0.0001	***
C	0.1176	1	0.1176	136.19	<0.0001	***
AB	0.0056	1	0.0056	6.51	0.0380	*
AC	0.0012	1	0.0012	1.42	0.2725	
BC	0.0064	1	0.0064	7.41	0.0297	*
A ²	0.2289	1	0.2189	253.46	<0.0001	***
B ²	0.3196	1	0.3196	370.07	<0.0001	***
C ²	0.5026	1	0.5026	582.02	<0.0001	***
残差	0.0060	7	0.0009			
失拟项	0.0011	3	0.0004	0.3049	0.8217	
纯误差	0.0049	4	0.0012			
总偏差	1.77	16				
R^2	0.9966	R^2_{Adj}	0.9922			

注: ***差异极显著 $P<0.0001$; *差异显著 $P<0.05$ 。

由图 2 可以看出, 响应面图表面相对陡峭, 等高线轮廓形状为椭圆形, 相对致密, 说明这些提取因素共同影响着肉桂多糖得率^[25], 但可以看出图 2B、2b 中这些形状更为明显, 即浸提时间和液料比的交互作用对多糖得率的影响最为显著, 这也与方差分析中交互项的 P 值对应; 所有响应面均开口向下, 表明回归模型具有极值点^[25], 此时理论提取工艺为温度 91.98 ℃, 时间 2.67 h, 液料比 20.67:1(mL/g), 预测

得率为 3.39%。综合操作等实际因素, 调整提取条件为温度 90 ℃, 时间 2.5 h, 液料比 20:1(mL/g), 以此条件进行 3 次实验的平均得率为 3.22%, 与理论值的相对误差为 0.17%。结果表明了模型的适用性及条件优化的成功^[24]。

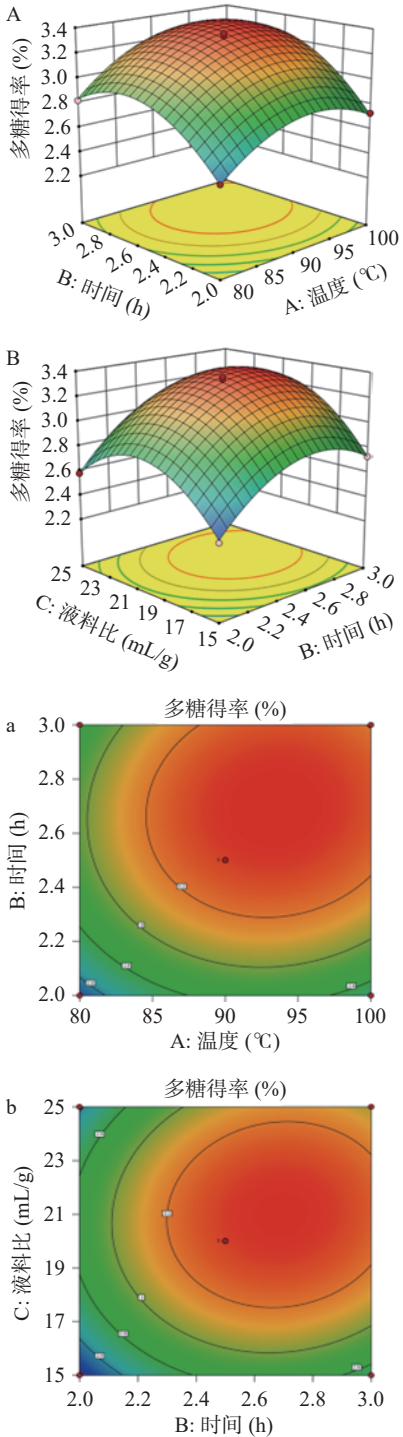


图 2 显著性交互作用因素对多糖得率影响的响应面图 (A、B) 和等高线图(a、b)
Fig.2 Response surface diagram (A, B) and contour diagram (a, b) of the influence of significant interaction factors on polysaccharide yield

2.3 肉桂多糖的纯化

2.3.1 肉桂多糖的纯化 由图 3 可知, 肉桂多糖通

过 Sephadex G-200 层析柱纯化后主要得到一个组分,收集洗脱曲线 9、10 管洗脱液,冷冻干燥后备用。

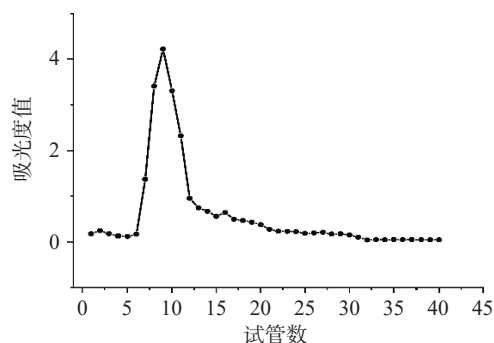


图3 肉桂多糖的洗脱曲线

Fig.3 Elution curve of *Cinnamomum cassia* polysaccharides

2.3.2 CCP 的多糖含量 由葡萄糖标准品获得的标准回归方程为 $y=5.5064x+0.1268$, $R^2=0.9967$, 通过计算得出 CCP 总糖含量为 $90.11\%\pm 1.24\%$ 。

2.3.3 CCP 相对分子质量 由葡聚糖标准品得到标准回归方程为 $y=-0.3555x+9.3736$, $R^2=0.9906$ 。经计算 CCP 的相对分子质量为 1.95×10^6 Da。

2.4 傅里叶红外光谱分析

CCP 的红外光谱图(图4)如下, 3416 cm^{-1} 附近出现的强吸收峰归因于 O-H 的伸缩振动,表明分子间或分子内氢键的存在^[26]。 2924 cm^{-1} 附近的吸收峰归因于 C-H 的伸缩振动^[27]。 1739 cm^{-1} 处的吸收峰是酯羰基的典型特征^[28]。 1631 cm^{-1} 处是 C=O 吸

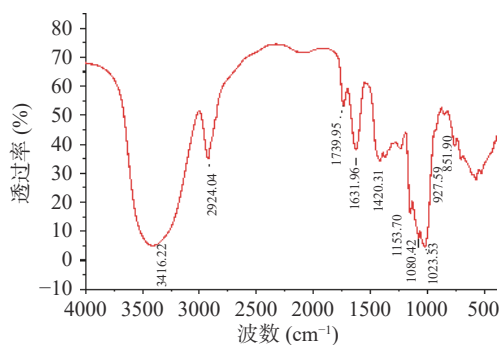


图4 CCP 的傅里叶红外光谱图

Fig.4 Infrared spectroscopy of CCP

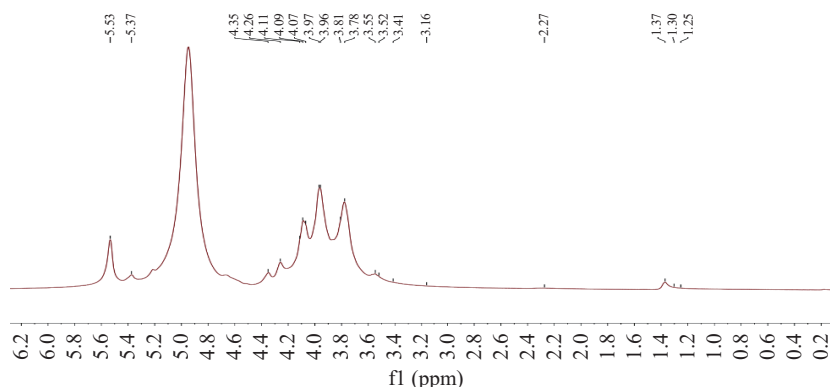


图5 CCP 的¹H 核磁共振谱图

Fig.5 ¹H nuclear magnetic resonance spectrogram of CCP

收峰^[29]。 1420 cm^{-1} 处的吸收峰归因于 C-O 基团的伸缩振动^[30]。 $1200\sim 1000\text{ cm}^{-1}$ 之间的三个吸收峰表明存在吡喃糖环^[31]。 927 cm^{-1} 和 851 cm^{-1} 左右的峰表明多糖中可能存在 β -型糖苷键和 α -型糖苷键^[32]。

2.5 CCP 的¹H 谱分析结果

在¹H 谱图(图5)中,未被标注的最强信号峰属于 D₂O 溶剂峰; δ_{H} 4.3~5.9 ppm 是异头质子信号区,通常异常区域内化学位移大于 5.0 ppm 的异头质子对应 α 构型,大于 4.3 ppm 的异头质子对应 β 构型^[30,33],由¹H 谱图结果可知,CCP 存在 α 和 β 型糖残基,这与红外光谱分析结果一致;此外, δ_{H} 3.5~4.0 ppm 区域是糖环的质子信号^[19]。

2.6 CCP 的刚果红分析

刚果红染料能与含有三股螺旋构象的多糖形成络合物,它的存在会使最大吸收波长与刚果红溶液相比发生红移,但随着 NaOH 浓度增大,络合物结构被破坏,溶液最大吸收波长会下降^[34]。图6显示了两组溶液在扫描范围内整体吸光度值的变化;图7可以看到,在不同浓度 NaOH 溶液中,刚果红和肉桂多糖混合液的最大吸收波长并未发生红移后再下降的现象,表明 CCP 可能不含三股螺旋结构^[19]。

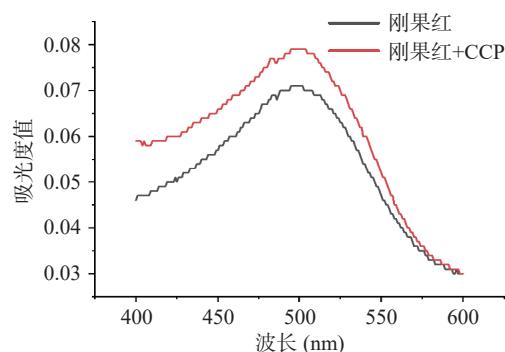


图6 刚果红和刚果红+CCP 溶液(不含 NaOH)的吸光度值

Fig.6 Absorbance value of Congo red and Congo red+CCP solution (without NaOH)

2.7 CCP 的热重分析

CCP 的热失重过程分三个阶段进行(图8)。第一阶段发生在 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右,失去其重量的 6.16%,归

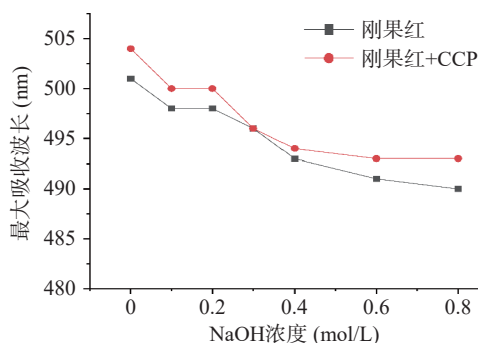


图 7 刚果红和刚果红+CCP 溶液的最大吸收波长示意图

Fig.7 Trends of maximum absorption wavelengths of Congo red and Congo red+CCP solution

因于多糖失去吸附水;第二阶段发生的温度范围是 240~360 ℃,失去其重量的 74.11%,表明多糖在这一温度范围内发生了强烈的分解反应;最后,在 400~600 ℃ 温度范围内,多糖重量变化趋于平缓,为缓慢碳化阶段,大部分变成灰分 and 无机成分。

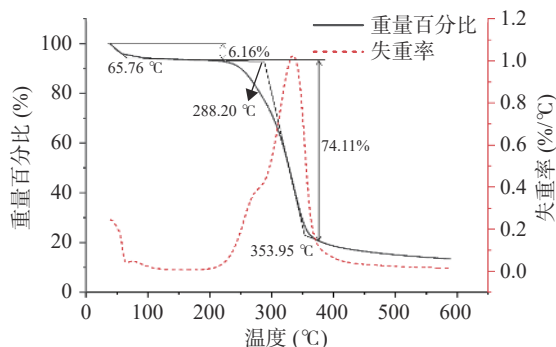


图 8 CCP 的热重分析

Fig.8 Thermogravimetric analysis of CCP

2.8 CCP 的体外抗氧化活性

许多因素会影响抗氧化活性,单一的抗氧化模型无法完全反映样品各方面的抗氧化能力^[35],因此选择多种模型评估 CCP 的抗氧化能力。

2.8.1 DPPH 自由基清除能力 DPPH 自由基常被用来评估还原物质,是研究活性物质对自由基清除能力的有用试剂^[36]。由图 9 可以看出,在 0.05~6 mg/mL 浓度范围内,CCP 对 DPPH 的清除能力逐渐增强,但后面增加缓慢。在 6 mg/mL 时的清除率达到 81.32%,肉桂多糖和 V_C 清除 DPPH 的 IC_{50} 值分别为 0.191、0.008 mg/mL。

2.8.2 ABTS⁺自由基清除能力 ABTS⁺自由基清除实验是确定供氢和断链抗氧化剂活性的有效方法^[36]。如图 9 所示,在实验剂量范围内,ABTS⁺清除率与肉桂多糖浓度呈正相关,肉桂多糖和 V_C 清除 ABTS⁺的 IC_{50} 值分别为 2.835、0.0002 mg/mL。

2.8.3 羟自由基清除能力 羟自由基是在人体内产生且损害生物体的高活性物质,因此,测试对这些生物相关自由基的清除能力是很有必要的^[37]。如图 9 所示,肉桂多糖也具有一定的羟自由基清除能力,最

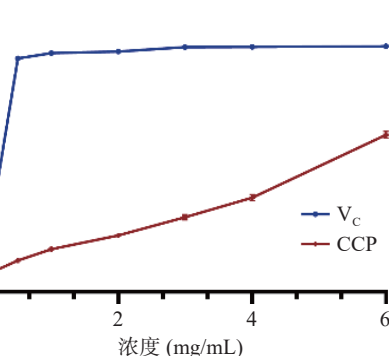
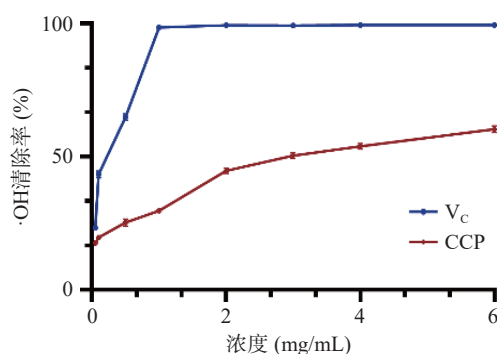
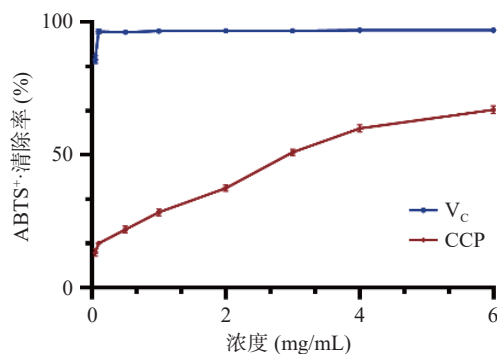
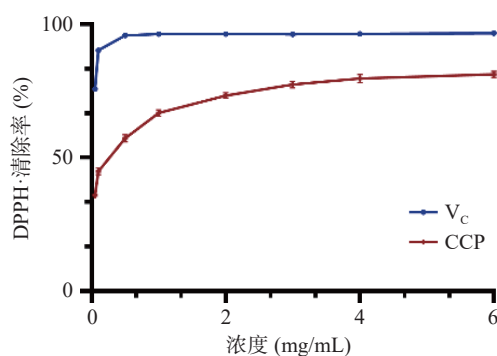


图 9 CCP 的抗氧化能力

Fig.9 Antioxidant capacity of CCP

大浓度 6 mg/mL 时的清除率为 60.23%,肉桂多糖和 V_C 清除羟自由基的 IC_{50} 值分别为 3.221、0.149 mg/mL。

2.8.4 总还原能力 该实验是测试活性物质对三价铁的还原能力,被广泛用于分析植物提取物的抗氧化活性^[38]。实验结果中吸光度值直接反映总还原力的大小,如图 9 所示,肉桂多糖的总还原力随肉桂多糖的质量浓度升高而增大,在 6 mg/mL 时的最大吸光度值约为 1.18,此时抗坏血酸的吸光度值约为 1.85。

在 4 种抗氧化试验中, V_C 浓度达到 1 mg/mL 时的清除率都能达到 95% 以上, 而 CCP 对 DPPH· 的清除效果最好。此外对比发现 CCP 对 DPPH·, ABTS⁺ 的清除率没有李胜男等^[9] 测试的结果高, 有研究显示小分子量多糖比大分子量的有更强的抗氧化活性^[22], 而本研究分离到的肉桂多糖分子量远大于李胜男等^[9] 的 (3630 Da), 可能是此原因导致两者抗氧化能力不同。但与同样的高分子量羊栖菜多糖相比, 肉桂多糖的部分自由基 (DPPH·、·OH) 清除能力更高, 这可能与多糖的其它结构有关^[20]。

2.9 CCP 的体外降血糖活性

2.9.1 α -淀粉酶抑制活性 α -淀粉酶的活性被抑制后可以延缓碳水化合物的消化, 降低葡萄糖的吸收率, 从而减缓餐后血糖的升高速度^[39]。试验结果见图 10, 在多糖最大浓度 1.5 mg/mL 时, 抑制率为 79.73%。肉桂多糖、阿卡波糖的 IC_{50} 值对应为 0.189、0.003 mg/mL。

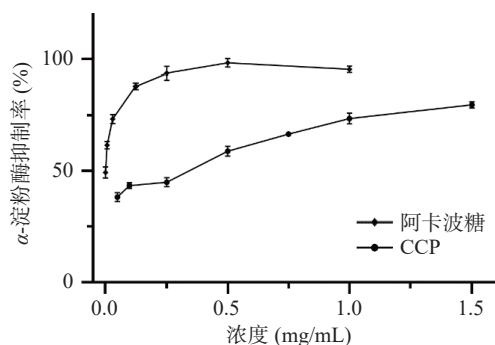


图 10 CCP 的 α -淀粉酶抑制曲线
Fig.10 α -Amylase inhibition curve of CCP

2.9.2 α -葡萄糖苷酶抑制活性 α -葡萄糖苷酶参与人体糖代谢, 抑制其活性可以延缓肠道中碳水化合物的吸收, 从而达到降糖效果^[40]。由图 11 所示, 同浓度范围内, CCP 对 α -葡萄糖苷酶的抑制率不如 α -淀粉酶, 但也可以达到 67.13%, 肉桂多糖、阿卡波糖的 IC_{50} 值分别为 0.340、0.004 mg/mL。

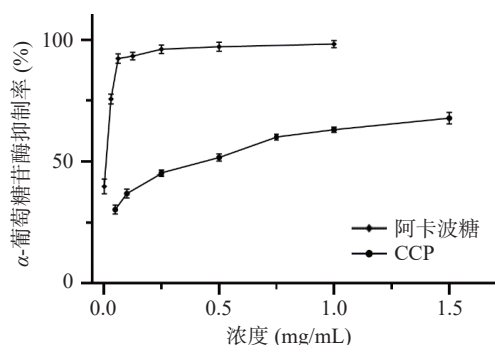


图 11 CCP 的 α -葡萄糖苷酶抑制曲线
Fig.11 α -Glucosidase inhibition curve of CCP

肉桂多糖对两种酶显示出较好的抑制活性, 但远低于阿卡波糖, 然而与其它研究相比, 肉桂多糖对两种酶活力仍具有更好的抑制能力^[22,41]。

3 结论

肉桂作为药食同源物品, 其内各种活性成分得到了广泛的关注。本研究优化了肉桂多糖的提取工艺, 最佳工艺平均得率为 3.22%。多糖经脱蛋白、脱色、葡聚糖凝胶纯化后, 总糖含量为 $90.11\% \pm 1.24\%$, 相对分子质量为 1.95×10^6 Da。CCP 部分结构测定显示其可能存在 α -型和 β -型糖苷键以及吡喃糖环, 不含有三股螺旋结构。热重结果显示其具有较好的热稳定性, 230 $^{\circ}\text{C}$ 以下稳定。在活性实验中, CCP 显示出较好的自由基清除能力和较高的总还原力; 此外, CCP 也通过 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制试验而显示出具有良好的降血糖活性。

由于本研究获得的多糖分子量较大, 其结构特征可能更为复杂, 因此研究主要集中于肉桂多糖的提取纯化、部分一级结构分析及活性探究, 在未来的研究中将借助更多方法及分析仪器, 表征肉桂多糖一级结构, 深入探讨其与生物活性之间的关系。

本研究从防城肉桂中提取到一种新的高分子量多糖, 该多糖在功能性食品或医药应用方面具有潜在的抗氧化及降血糖特性, 上述结果可能为不同来源肉桂多糖的结构及活性研究提供参考, 同时也为肉桂在食品药品等领域的开发利用提供理论依据。

© The Author(s) 2024. 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] JIANG S F, LIU Y Y, CUI S, et al. The complete chloroplast genome analysis of *Cinnamomum cassia* Presl[J]. *Bangladesh Journal of Botany*, 2022, 51(1): 51–55.
- [2] ZHANG C L, FAN L H, FAN S M, et al. *Cinnamomum cassia* Presl: A review of its traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicology[J]. *Molecules*, 2019, 24(19): 3473.
- [3] ALAM A, ANSARI M J, ALQARNI M H, et al. Antioxidant, antibacterial, and anticancer activity of ultrasonic nanoemulsion of *Cinnamomum cassia* L. essential oil[J]. *Plants-Basel*, 2023, 12(4): 834.
- [4] LEE M J, SEO H J, HWANG G S, et al. Molecular mechanism of *Cinnamomum cassia* against gastric damage and identification of active compounds[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(4): 525.
- [5] YANG C H, YANG C S, HWANG M L, et al. Antimicrobial activity of various parts of *Cinnamomum cassia* extracted with different extraction methods[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2012, 36(6): 690–698.
- [6] LEE H S. Anticoagulant properties of the active compound derived from *Cinnamomum cassia* bark[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2007, 16(2): 218–222.
- [7] KOUAME K, PETER A I, AKANG E N, et al. Histological and biochemical effects of *Cinnamomum cassia* nanoparticles in kidneys of diabetic Sprague-Dawley rats[J]. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 2019, 19(2): 138–145.
- [8] AL-AJALEIN A A S, SHAFIE M H, YAP P G, et al. Microwave-assisted extraction of polysaccharide from *Cinnamomum*

- cassia with anti-hyperpigmentation properties: Optimization and characterization studies[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 226: 321–335.
- [9] 李胜男,程贤,毕良武,等.肉桂多糖的结构分析及抗氧化活性研究[J].*林产化学与工业*, 2022, 42(3): 34–40. [LIS N, CHENG X, BI L W, et al. Composition analysis and antioxidant activity of cinnamon polysaccharide[J]. *Chemistry and Industry of Forest Products*, 2022, 42(3): 34–40.]
- [10] 张铭儒,黄嘉欢,黎雨菲,等.肉桂多糖的单糖组成成分及其降血糖作用研究[J].*中国医院药学杂志*, 2022, 42(15): 1533–1538, 1582. [ZHANG M R, HUANG J X, LI Y F, et al. Analysis of monosaccharide composition and hypoglycemic effect of polysaccharides from *Cinnamomum cassia*[J]. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*, 2022, 42(15): 1533–1538, 1582.]
- [11] 于峰,王厚伟,李兆明,等.肉桂多糖对四氧嘧啶致实验性糖尿病小鼠降糖作用的研究[J].*食品与药品*, 2009, 11(11): 1–3. [YU F, WANG H W, LI Z M, et al. Study on anti-hyperglycemic effect of cinnamon polysaccharide on alloxan diabetes mice[J]. *Food and Pharmaceuticals*, 2009, 11(11): 1–3.]
- [12] 王泽亮,张敏,邱道富,等.不同产地肉桂的挥发性成分差异分析[J].*现代食品科技*, 2022, 38(4): 201–207. [WANG Z L, ZHANG M, QIU D F, et al. Difference analysis of volatile components in cinnamon from different producing areas[J]. *Modern Food Science & Technology*, 2022, 38(4): 201–207.]
- [13] 景永帅,孙丽丛,张瑞娟,等.玉竹多糖的体外消化特性及其与乳杆菌和大肠杆菌的相互作用[J].*食品研究与开发*, 2023, 44(2): 21–28. [JING Y S, SUN L C, ZHANG R J, et al. *In vitro* digestion characteristic of *Polygonatum odoratum* polysaccharides and their interaction with *Lactobacillus bulgaricus* and *Escherichia coli*[J]. *Food Research and Development*, 2023, 44(2): 21–28.]
- [14] 陈岩,张润阳,蔡小双,等.不同脱色方法对油莎豆多糖抗氧化与降血糖活性研究[J].*食品安全导刊*, 2022(23): 91–97. [CHEN Y, ZHANG R Y, CAI X S, et al. Study on antioxidant and hypoglycemic activity of polysaccharides from *Cyperus esculentus* by different decolorization methods[J]. *China Food Safety Magazine*, 2022(23): 91–97.]
- [15] MASUKO T, MINAMI A, IWASAKI N, et al. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format[J]. *Analytical Biochemistry*, 2005, 339(1): 69–72.
- [16] MA C L, BAI J W, SHAO C T, et al. Degradation of blue honeysuckle polysaccharides, structural characteristics and antiglycation and hypoglycemic activities of degraded products[J]. *Food Research International*, 2021, 143: 110281.
- [17] DENG J P, CHEN T S, WANG Y F, et al. Antioxidant, anti-inflammatory and immunostimulatory activity of polysaccharide from *Artemisiae argyi* Folium[C]// *Proceedings of the Conference on Optics in Health Care and Biomedical Optics VIII*, Beijing, PEOPLE'S CHINA, 2018: 11–13.
- [18] THAMBIRAJ S R, PHILLIPS M, KOYYALAMUDI S R, et al. Yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) polysaccharides: Antioxidant, immunomodulatory and prebiotic activities and their structural characterisation[J]. *Food Chemistry*, 2018, 267: 319–28.
- [19] ZHANG H, ZOU P, ZHAO H, et al. Isolation, purification, structure and antioxidant activity of polysaccharide from pinecones of *Pinus koraiensis*[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 251: 117078.
- [20] CHEN B J, SHI M J, CUI S, et al. Improved antioxidant and anti-tyrosinase activity of polysaccharide from *Sargassum fusiforme* by degradation[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 92: 715–722.
- [21] CAO C, HUANG Q, ZHANG B, et al. Physicochemical characterization and *in vitro* hypoglycemic activities of polysaccharides from *Sargassum pallidum* by microwave-assisted aqueous two-phase extraction[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 109: 357–368.
- [22] XU Y, NIU X, LIU N, et al. Characterization, antioxidant and hypoglycemic activities of degraded polysaccharides from blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) fruits[J]. *Food Chemistry*, 2018, 243: 26–35.
- [23] 魏鑫鑫.接骨木果实多糖提取分离、纯化及抗氧化活性研究[D].泰安:山东农业大学, 2023. [WEI X X. Extraction, isolation, purification and antioxidant activity of polysaccharides from elderberry fruit[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2023.]
- [24] GUO X, ZOU X, SUN M. Optimization of extraction process by response surface methodology and preliminary characterization of polysaccharides from *Phellinus igniarius*[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 80(2): 344–349.
- [25] TANG Z, WANG Y, HUANG G, et al. Ultrasound-assisted extraction, analysis and antioxidant activity of polysaccharide from the rinds of *Garcinia mangostana* L[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2023, 97: 106474.
- [26] 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.
- [27] LIU G, WANG Q, HU Z, et al. Maillard-reacted whey protein isolates and epigallocatechin gallate complex enhance the thermal stability of the pickering emulsion delivery of curcumin[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(18): 5212–5220.
- [28] AL-SHERAJI S H, ISMAIL A, MANAP M Y, et al. Purification, characterization and antioxidant activity of polysaccharides extracted from the fibrous pulp of *Mangifera pajang* fruits[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2012, 48(2): 291–296.
- [29] ZHANG D, LI S, XIONG Q, et al. Extraction, characterization and biological activities of polysaccharides from *Amomum villosum*[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 95(1): 114–122.
- [30] XIA F, CAO S, WANG M, et al. Optimizing extraction, structural characterization, and *in vitro* hypoglycemic activity of a novel polysaccharide component from *Lentinus edodes*[J]. *Food Bioscience*, 2023, 55: 103007.
- [31] WANG L, CHEN C, ZHANG B, et al. Structural characterization of a novel acidic polysaccharide from *Rosa roxburghii* Tratt fruit and its alpha-glucosidase inhibitory activity[J]. *Food & Function*, 2018, 9(7): 3974–3985.
- [32] CHEN L, HUANG G. Extraction, characterization and antioxidant activities of pumpkin polysaccharide[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 118(Pt A): 770–774.
- [33] YAO H Y, WANG J Q, YIN J Y, et al. A review of NMR analysis in polysaccharide structure and conformation: Progress, challenge and perspective[J]. *Food Research International*, 2021, 143: 110290.
- [34] WANG Z B, PEI J J, MA H L, et al. Effect of extraction media on preliminary characterizations and antioxidant activities of *Phellinus linteus* polysaccharides[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 109: 49–55.
- [35] MUNTEANU I G, APETREI C. Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(7): 3380–3380.
- [36] ASADUZZAMAN A K M, HASAN I, RAHMAN M H, et

- al. Antioxidant and antiproliferative activity of phytoconstituents identified from *Sargassum binderi* seaweed extracts cultivated in Bangladesh[J]. *International Journal of Biosciences*, 2020, 16(3): 481–494.
- [37] KAMRAN F, PHILLIPS M, HARMAN D G, et al. Antioxidant activities of lupin (*Lupinus angustifolius*) protein hydrolysates and their potential for nutraceutical and functional foods[J]. *Food Chemistry Advances*, 2023, 2: 100297.
- [38] WANG Y, WU J, SHEN R, et al. A mild iodocyclohexane demethylation for highly enhancing antioxidant activity of lignin[J]. *Journal of Bioresources and Bioproducts*, 2023, 8(3): 306–317.
- [39] WANG Y, YANG Z, WEI X. Sugar compositions, alpha-glucosidase inhibitory and amylase inhibitory activities of polysaccharides from leaves and flowers of *Camellia sinensis* obtained by different extraction methods[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2010, 47(4): 534–539.
- [40] KAJARIA D, RANJANA, TRIPATHI J, et al. *In-vitro* alpha amylase and glycosidase inhibitory effect of ethanolic extract of antiasthmatic drug-Shirishadi[J]. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 2013, 4(4): 206–209.
- [41] WANG L, LIU F, WANG A, et al. Purification, characterization and bioactivity determination of a novel polysaccharide from pumpkin (*Cucurbita moschata*) seeds[J]. *Food Hydrocoll*, 2017, 66: 357–364.