

磷酸化、羧甲基化修饰准噶尔山楂 多糖理化性质及降糖活性

江升旗¹, 柴雨阳^{1,2}, 王俊龙^{1*}, 边鹏¹, 时文盼¹, 蔺永刚^{1*}

(1. 伊犁师范大学 新疆生物质资源清洁转化与高值化利用重点实验室, 新疆 伊宁 835000; 2. 重庆医科大学 儿科学院, 重庆 400016)

摘要: 通过磷酸钠法、氯乙酸法分别对准噶尔山楂多糖 (CSP) 进行磷酸化、羧甲基化修饰, 制备了磷酸化准噶尔山楂多糖 (P-CSP) 和羧甲基化准噶尔山楂多糖 (CM-CSP)。采用 FTIR、NMR、XRD、SEM、TGA 对 CSP、P-CSP、CM-CSP 进行了表征, 通过 CSP、P-CSP 和 CM-CSP 对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制率及对胰岛素抵抗人源癌细胞 (IR-HepG2) 葡萄糖消耗量、肝糖原含量进行了测定, 考察了其体外和体内降糖活性。结果表明, 与 CSP 相比, P-CSP、CM-CSP 的黏度 [(1988.00±27.25)、(1638.00±31.35) mPa·s] 降低, 水溶性 [(132.38±0.41)、(136.47±0.25) g/L]、相对分子质量 (19.74 kDa) 增加, 表面形貌发生改变, 热稳定性提高; 但单糖 (甘露糖、阿拉伯糖、半乳糖和葡萄糖) 组成、三螺旋结构未发生变化; CSP、P-CSP、CM-CSP 对 α -淀粉酶最大半数抑制浓度 (IC₅₀) 分别为 3.78、1.94、3.82 g/L, 对 α -葡萄糖苷酶的 IC₅₀ 分别为 3.82、1.98、2.12 g/L; 质量浓度 2.0 g/L 的 CSP、P-CSP、CM-CSP 的葡萄糖消耗量分别为 6.61、8.23、7.62 mmol, 肝糖原含量分别为 6.31、7.14、6.52 mg/g。

关键词: 磷酸化; 羧甲基化; 准噶尔山楂多糖; 理化性质; 降糖活性; 中药现代化技术

中图分类号: Q539; TQ281 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2025) 07-1564-09

Physicochemical properties and hypoglycemic activity of phosphorylated and carboxymethylated *Crataegus songarica* K. Koch polysaccharides

JIANG Shengqi¹, CHAI Yuyang^{1,2}, WANG Junlong^{1*}, BIAN Peng¹,
SHI Wenpan¹, LIN Yonggang^{1*}

(1. Xinjiang Key Laboratory of Clean Conversion and High Value Utilization of Biomass Resources, Yili Normal University, Yili 835000, Xinjiang, China; 2. College of Pediatrics, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Phosphorylated *Crataegus songarica* K. Koch (P-CSP) and carboxymethylated *Crataegus songarica* K. Koch (CM-CSP) were prepared from *Crataegus songarica* K. Koch (CSP) by sodium phosphate method and chloroacetic acid method, respectively. CSP, P-CSP and CM-CSP were characterized by FTIR, NMR, XRD, SEM and TGA, with their inhibitory rates on α -amylase as well as α -glucosidase, glucose consumption and liver glycogen content of insulin-resistant human cancer cells (IR-HepG2) determined, and their *in vitro* and *in vivo* hypoglycemic activity evaluated. The results showed that, compared with CSP, the P-CSP and CM-CSP displayed reduction in viscosity [(1988.00±27.25), (1638.00±31.35) mPa·s], increase in water solubility [(132.38±0.41), (136.47±0.25) g/L] as well as relative molecular mass (19.74 kDa), change in surface morphology, and improvement in thermal stability, but no change in the composition and triple helix structure of monosaccharides (mannose, arabinose, galactose and glucose). The half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of CSP, P-CSP and CM-CSP for α -amylase were 3.78,

收稿日期: 2024-07-31; 定用日期: 2024-08-26; DOI: 10.13550/j.jxhg.20240601

基金项目: 2024 年大学生创新创业项目 (S202410764032); 2024 年伊犁河谷资源保护与利用重点项目 (2024HGZD02); 2023 年伊犁州应用技术研究与创新驱动专项 (YYD2023A11); 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目 (2022D01C455)

作者简介: 江升旗 (2002—), 男, E-mail: 1615704226@qq.com。联系人: 王俊龙 (1992—), 男, 硕士, 实验师, E-mail: 974881461@qq.com; 蔺永刚 (1983—), 男, 硕士, 实验师, E-mail: 869294906@qq.com。

1.94, 3.82 g/L, and the IC_{50} for α -glucosidase were 3.82, 1.98, 2.12 g/L, respectively. The glucose consumption of CSP, P-CSP and CM-CSP with a mass concentration of 2.0 g/L was 6.61, 8.23 and 7.62 mmol, respectively, while the liver glycogen content was 6.31, 7.14 and 6.52 mg/g, respectively.

Key words: phosphorylation; carboxymethylation; *Crataegus songarica* K. Koch polysaccharides; physicochemical properties; hypoglycemic activity; modernization technology of traditional Chinese medicines

准噶尔山楂 (*Crataegus songarica* K. Koch) 为蔷薇科, 山楂属, 光核组唯一种植物, 落枝灌木或小乔木。在中国, 准噶尔山楂仅分布于新疆伊犁地区霍城县科尔琴山的大西沟 10 多条山谷中, 已被列为国家二级重点保护植物^[1]。准噶尔山楂花色绚丽、果实鲜艳、营养价值高, 既可作为观赏性植物, 又可生食和加工, 一直受到当地少数民族的喜爱。研究表明, 准噶尔山楂含有多酚、多糖、脂类、萜类等化学成分及人体所需的铁、锌等微量元素^[2-3], 具有促消化、降脂减肥、降血糖、降血脂、抗氧化、改善心血管健康及抗菌等功效^[4], 临床上可用于治疗肉食积滞、胃脘胀满、泻痢腹痛、瘀血经闭等症^[5]。目前, 准噶尔山楂药理活性方面研究主要集中在叶、果实中黄酮类、酚类等小分子^[6], 针对准噶尔山楂多糖的研究仅体现在提取工艺优化上^[7], 并未对其多糖理化性质及活性方面开展深入研究。

多糖是山楂属植物的主要成分之一, 因其具有显著的生物活性、良好的生物相容性, 且安全、无毒而备受关注^[8]。近年来, 为了提高多糖的生物相容性及药理活性, 研究者利用多糖天然链上的一OH、—CHO、—NH₂等活性基团与磷酸基、羧甲基、无机硒、乙酰基等基团反应, 相继开发了磷酸化、羧甲基化、硒化和乙酰化等多种多糖的修饰方法^[9]。冯琳等^[6]研究发现, 准噶尔山楂多糖具有一定的降血糖功效。结合本课题组前期制备的一种羧甲基化桦树茸多糖, 对其降糖活性进行评价, 结果发现, 修饰后的桦树茸多糖降糖活性显著提升^[10]。

本文拟以准噶尔山楂为原料, 采用超声辅助提取并纯化准噶尔山楂多糖, 采用磷酸钠法、氯乙酸法对其进行磷酸化、羧甲基化修饰, 比较修饰前后多糖的理化性质、体外降糖活性, 以及对胰岛素抵抗的人源癌细胞模型 (IR-HepG2) 细胞的葡萄糖消耗量、肝糖原含量进行测定, 以期为准噶尔山楂多糖及其衍生物的降糖活性深入研究奠定理论基础。

1 实验部分

1.1 原料、试剂与仪器

准噶尔山楂 (*Crataegus songarica* K. Koch), 2023 年 10 月采自新疆伊犁霍城县大西沟, 经新疆生物质资源清洁转化与高值化利用重点实验室主任

钱大益教授鉴定为蔷薇科、苹果亚科、山楂属植物的果实; 透析袋 (截留相对分子质量 3500 Da), 伊犁万隆化工有限公司; 磷酸盐缓冲溶液 (PBS, pH=7.2~7.4)、液体培养基 (去离子水)、DMEM 完全培养基、胰蛋白酶消化液 (质量分数为 0.25%)、盐酸二甲双胍、葡萄糖试剂盒、肝糖原试剂盒, 美国 Sigma 公司; DEAE-100 纤维素柱、Sephadex G-100 凝胶柱, 上海碧云天生物技术有限公司; 胰岛素, IR-HepG2 细胞系, 南京科佰欧生物技术有限公司。

石油醚、无水乙醇、NaCl、二氯甲烷、三氯甲烷、三氯乙酸、三氟乙酸、三偏磷酸钠、三聚磷酸钠、NaOH、Na₂SO₄、丙酮、异丙酮、氯乙酸、冰醋酸、浓硝酸 (质量分数约为 68%)、H₂O₂ (质量分数为 30%)、浓盐酸 (质量分数为 37%)、浓硫酸 (质量分数 98%), 分析纯, 天津市百世化工有限公司; 岩藻糖 (Fuc)、鼠李糖 (Rha)、甘露糖 (Man)、阿拉伯糖 (Ara)、木糖 (Xyl)、半乳糖 (Gal)、葡萄糖 (Glu)、葡萄糖标准品、阿卡波糖 (Acarbose)、刚果红, 伊犁万隆化工有限公司。实验用水均为去离子水, 自制。

DV-2 型旋转黏度计, 北京优莱博有限公司; PL-GPC 50 型凝胶渗透色谱仪, 美国 Waters 公司; UV-2550 型紫外-可见分光光度计 (UV-Vis), 日本 Shimadzu 公司; SpectraMax M2 型多功能酶标仪, 美国 Molecular Devices 公司; Cary 630 型傅里叶变换红外光谱仪 (FTIR)、7820A 型气相色谱仪 (GC), 美国 Aglient 公司; SSTA-8000 型同步热分析仪 (TGA), 美国 PerkinElmer 仪器有限公司; 7500 F 型场发射扫描电子显微镜 (SEM), 日本 JEOL 公司; D8 Advance 型 X 射线衍射仪 (XRD)、AV600 型核磁共振波谱仪 (NMR), 德国 Bruker 公司; UP-II-15TNZ 型超纯水机, 四川优普超纯科技有限公司; TDZ5-WS 型离心机, 长沙湘仪仪器有限公司; LGJ-10N 型真空冷冻干燥机, 北京亚星仪科科技发展有限公司。

1.2 方法

1.2.1 准噶尔山楂粗多糖制备

将新鲜采摘的准噶尔山楂洗净、冻干 (-20 °C, 24 h) 后去核, 常温阴干后粉碎过 40 目筛, 于索氏提取器中依次用石油醚、无水乙醇 (液料比为 2 : 1,

mL : mg) 脱脂、脱色素 24 h 后, 收集滤渣, 在常温下自然晾干, 得到准噶尔山楂粉末, 于 $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

称取预处理的准噶尔山楂粉末 20.0 g, 采用超声辅助水提法提取准噶尔山楂多糖, 料液比 (g : mL) 1 : 40, 提取温度 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$, 超声功率 300 W, 提取时间 80 min。随后, 将滤液沉浸过夜后除去下层滤渣, 得到准噶尔山楂粗多糖溶液。采用三氯乙酸法除蛋白质, 重复多次, 直至 UV-Vis 谱图于 280 nm 处无明显吸收峰^[10], 离心 (4000 r/min, 10 min) 去除下层蛋白质, 减压浓缩至原体积 1/3, 加 3 倍体积的无水乙醇, 醇沉 24 h, 在去离子水中透析 (3500 D, 72 h), 冷冻干燥 ($-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, 48 h), 得到淡粉红色棉絮状多糖, 即准噶尔山楂粗多糖, 以准噶尔山楂粉末计, 粗多糖得率为 36.7%。

1.2.2 准噶尔山楂粗多糖分离纯化

称取 1.0 g 准噶尔山楂粗多糖, 使用去离子水溶解后上样至 DEAE-100 纤维素柱 (37 mm×260 mm), 以 1 mL/min 的流速分别用 2 倍柱体积的超纯水和不同浓度的 NaCl 溶液 (0.2、0.4、0.6 mol/L) 进行洗脱。采用自动收集器收集洗脱液, 每管 20 mL, 使用酶标仪测定洗脱液在 620 nm 处的吸光度, 并绘制洗脱曲线。

合并同一组分的糖溶液, 透析 (3500 Da, 72 h), 冷冻干燥 ($-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, 48 h)。随后, 采用 Sephadex G-100 凝胶柱 (16 mm×800 mm) 进一步纯化, 流速为 0.4 mL/min, 以 3 倍柱体积的超纯水为洗脱剂进行洗脱, 采用自动收集器收集洗脱液, 每管 10 mL, 使用酶标仪测定洗脱液在 620 nm 处的吸光度 (A_{620}), 并绘制洗脱曲线, 收集合并同一多糖组分, 得到纯化后的准噶尔山楂多糖, 记为 CSP。

1.2.3 磷酸化准噶尔山楂多糖制备

参考 YANG 等^[11]方法进行磷酸化修饰, 并略作修改。分别称取 3 g 三聚磷酸钠和 3 g 三偏磷酸钠一并溶于 100 mL 超纯水中, 随后加入 0.3 g 的 CSP 和 2.5 g 的 Na_2SO_4 , 采用浓度 0.01 mol/L 的 NaHCO_3 溶液调节溶液 pH = 9.0, 于 $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下磁力搅拌反应 3 h。待反应结束后, 加入 300 mL 无水乙醇, 醇沉 ($5\text{ }^{\circ}\text{C}$, 24 h)、透析 (3500 Da, 72 h)、冷冻干燥 ($-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, 48 h), 得到淡黄色棉絮状多糖, 即磷酸化准噶尔山楂多糖, 记为 P-CSP。以 CSP 计, P-CSP 得率为 64.4%。

1.2.4 羧甲基化准噶尔山楂多糖制备

参考 LI 等^[12]方法进行羧甲基化修饰, 并略作修改。准确称取 0.3 g 的 CSP 溶于 30 mL 异丙醇中, 室温下磁力搅拌 1 h。待反应结束后, 加入 20 mL 体积分数为 20% 的 NaOH 溶液和 2 g 氯乙酸溶液

(分 4 次, 每次 0.5 g), 随后于 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下磁力搅拌 2 h。待反应结束后, 冷却至室温, 使用浓度 0.02 mol/L 的冰醋酸调节 pH = 7.0, 随后加入 300 mL 无水乙醇醇沉 ($5\text{ }^{\circ}\text{C}$, 24 h)、透析 (3500 Da, 72 h)、冷冻干燥 ($-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, 48 h) 后, 得到白色棉絮状多糖, 即羧甲基化准噶尔山楂多糖, 记为 CM-CSP。以 CSP 计, CM-CSP 得率为 58.2%。

1.3 表征和测试

1.3.1 磷酸根含量、羧甲基化取代度测定

采用钼蓝比色法测定 P-CSP 中的磷酸根含量^[11]。配制不同含量的磷酸根标准溶液 (20~100 $\mu\text{g}/\text{mg}$), 分别加入 5 mL 定磷试剂 (由 1 mL 质量分数 20% 的抗坏血酸溶液、2 mL 质量分数 98% 的浓硫酸、2 mL 质量分数 3% 的钼酸铵溶液配制), 于 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h, 冷却至室温后, 分别用 UV-Vis 测定溶液在 654 nm 处的吸光度, 并绘制吸光度-磷酸根含量标准曲线, 得到标准曲线方程为: $y = 0.54x + 0.0527$ ($R^2 = 0.9983$)。

称取 0.5 g 的 P-CSP 于坩埚中, 加入 1 mL 浓硫酸和 1 mL 浓硝酸, 加热至产生白烟后, 加入 1 mL 质量分数 30% 的 H_2O_2 , 再次加热, 重复多次直至无白烟产生。随后, 用蒸馏水定容至 10 mL 容量瓶, 用 UV-Vis 测定溶液在 654 nm 处的吸光度, 代入吸光度-磷酸根含量标准曲线方程计算得到样液中的磷酸根含量。

采用滴定法测定 CM-CSP 中的羧甲基取代度^[12]。称取 10 mg 的 CM-CSP 置于烧杯中, 加入 5 mL 浓度为 0.1 mol/L 的盐酸, 室温下磁力搅拌反应 1 h 后, 加入 10 mL 浓度为 0.5 mol/L 的 NaOH 溶液, 于 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 1 h 后, 采用浓度为 0.1 mol/L 的盐酸滴定, 酚酞作指示剂, 溶液中红色消失为滴定终点, 记录盐酸的消耗量 (V_2 , mL)。根据公式 (1) 和 (2) 计算羧甲基含量 (A , mmol/g) 和羧甲基取代度 (DS)。

$$A = (C_1V_1 - C_2V_2) / W \quad (1)$$

$$\text{DS} = 0.162A / (1 - 0.058A) \quad (2)$$

式中: W 为样品质量, g; C_1 为 NaOH 浓度, mol/L; C_2 为盐酸浓度, mol/L; V_1 为 NaOH 体积, mL; V_2 为盐酸消耗量, mL。

1.3.2 物性测定

CSP、P-CSP 和 CM-CSP 的黏度参照 GB/T 266—2011《液体黏度及透明度测定法通则》测定^[13]; 溶解度采用平衡法测定^[13]; 相对分子质量采用高效凝胶渗透色谱法测定^[13], TSK-gel GMPWXL (7.8 mm×300 mm) 凝胶色谱柱, 流动相为超纯水, 流速 0.6 mL/min, 检测器为示差折光检测器 (RID), 柱温和检测器温度均为 $36\text{ }^{\circ}\text{C}$, 进样量 20 μL 。

1.3.3 单糖组成测定

CSP、P-CSP 和 CM-LAP 衍生化^[9]: 称取 3 mg

样品置于 25 mL 顶口瓶, 加入 5 mL 浓度为 2 mol/L 的三氟乙酸溶液, 于 110 °C 水解 5 h; 反应结束后, 冷却至室温, 加入 5 mL 甲醇, 旋转蒸发除去残留的三氟乙酸(重复 3~4 次); 随后, 加入 0.5 mL 吡啶、8 mg 盐酸羟胺于 100 °C 反应 1 h; 待反应结束后, 加入 1 mL 蒸馏水、1 mL 二氯甲烷萃取, 弃水相(重复 4~5 次), 二氯甲烷相经有机膜过滤后, 置于气相小瓶中供 GC 分析。单糖标准品无需酸解, 其余步骤同样品的处理, 采用 GC-MS 分析单糖组成。GC 条件: Agilent CP-Sil 88 毛细管色谱柱(30 m×0.20 mm×0.25 μm), 起始温度 130 °C, 保留 2 min, 以 4 °C/min 升至 240 °C, 保持 3 min, 载气(He)流速 4 mL/min, 进样 1 μL, 分流比 40:1。MS 条件: EI 源电离模式, 离子源温度 230 °C, 电子能量 70 eV。

1.3.4 XRD 测试

取适量 CSP、P-CSP、CM-CSP 样品置于样品台。靶材 Cu, 管电压 40 V, 管电流 40 mA, K_{α} 射线, $\lambda = 0.1541$ nm, 扫描范围 5°~80°, 扫描速率 6 (°)/min。

1.3.5 SEM 测试

采用导电胶带将 CSP、P-CSP 和 CM-CSP 固定在样品架, 离子溅射喷金, 在加速电压 10.0 kV、工作电流 20 μA 条件下, 放大 10000 倍观察样品微观形貌。

1.3.6 TGA 测试

分别称取 10 mg 的 CSP、P-CSP 和 CM-CSP 置于铂坩埚中, N_2 保护下, 以 10 °C/min, 从 25 °C 升温至 600 °C, 测定样品的 TG、DTG 曲线。

1.3.7 三螺旋结构测定

采用刚果红法^[9]测定多糖的三螺旋结构。分别移取 1 mL 质量浓度 0.5 g/L 的 CSP、P-CSP 和 CM-CSP 水溶液, 各依次加入 1 mL 浓度 0.3 mmol/L 的刚果红溶液、3 mL 不同浓度(0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mol/L)的 NaOH 溶液, 混匀后置于暗室反应 10 min。使用 UV-Vis 测定样品溶液在 400~700 nm 范围内的最大吸收波长, 以刚果红为对照品, 绘制实验曲线。

1.3.8 FTIR 测定

各称取 5 mg 的 CSP、P-CSP 和 CM-CSP 分别与 200 mg 的 KBr 粉末混匀压片。波数范围 4000~800 cm^{-1} , 分辨率 5 cm^{-1} , 扫描次数 32 次。

1.3.9 NMR 测定

各称取 10 mg 的 CSP、P-CSP 和 CM-CSP 分别溶解于 0.6 mL D_2O 中, 移至核磁管中进行 NMR 测定。

1.4 降糖活性测定

1.4.1 体外降糖活性测定

分别配制质量浓度为 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、4.0、6.0 g/L 的 CSP、P-CSP 和 CM-CSP 水溶液, 以阿卡波糖(Acarbose)为阳性对照。参照 XIU 等^[14]

方法, 分别测定 CSP、P-CSP 和 CM-CSP 对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制活性, 并计算其最大半数抑制质量浓度(IC_{50} , g/L)。

1.4.2 多糖对胰岛素抵抗 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗量、肝糖原含量的影响

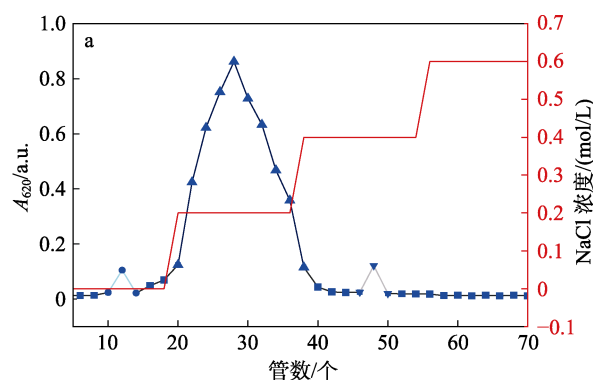
采用胰岛素抵抗的人源癌细胞模型(IR-HepG2)探究 CSP、P-CSP 和 CM-CSP 对葡萄糖消耗量及肝糖原含量的影响^[15]。取对数生长的细胞, 添加胰蛋白酶消化液消化, 用液体培养基调节细胞密度为 3×10^4 个/mL, 随后接种于 96 孔板(100 μL/孔), 在 37 °C、体积分数 5%的 CO_2 培养箱中培养 12 h 后, 采用 PBS 洗涤 3 次。随机设立空白对照组(DMEM 完全培养基培养的 IR-HepG2 细胞)、模型组(胰岛素诱导 HepG2 细胞)、阳性对照组(100 μg/mL 的盐酸二甲双胍处理 IR-HepG2 细胞)、样品组(0.1、0.5、1.0、2.0 g/L 的 CSP、P-CSP 和 CM-CSP), 除空白对照组外, 模型组、阳性对照组和样品组均使用浓度 5×10^{-7} mol/L 胰岛素诱导 48 h, 使其产生胰岛素抗体, 随后置于 37 °C、体积分数 5%的 CO_2 培养箱中培养 24 h, 离心(3600 r/min, 10 min), 参照葡萄糖试剂盒检测方法测定培养液中葡萄糖消耗量; 按肝糖原试剂盒检测方法测定培养基中肝糖原含量。

2 结果与讨论

2.1 准噶尔山楂多糖的分离纯化结果分析

图 1 为准噶尔山楂粗多糖的分离纯化结果。

从图 1 可以看出, 准噶尔山楂多糖经 DEAE-100 纤维素柱分级共得到 3 个组分(图 1a), 得率分别为 1.24%、22.42%、1.38%。其中, 浓度为 0.2 mol/L 的 NaCl 溶液盐洗组分含量较高, 水洗组分和浓度为 0.4 mol/L 的 NaCl 溶液盐洗组分含量较低, 因此, 后续实验主要对浓度为 0.2 mol/L 的 NaCl 溶液盐洗组分进行测试。浓度为 0.2 mol/L 的 NaCl 溶液盐洗组分经 Sephadex G-100 洗脱后, 其洗脱曲线呈现单一对称峰型(图 1b), 收集合并第 24~48 管, 经浓缩、常温下去离子水中透析(3500 Da, 72 h)、冷冻干燥(-70 °C, 48 h), 得白色棉絮状多糖 CSP。



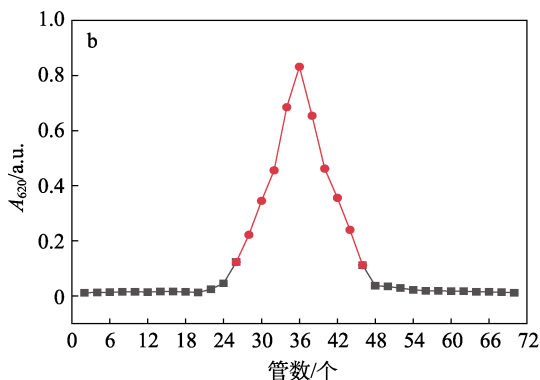


图 1 准噶尔山楂粗多糖经 DEAE-100 (a)、Sephadex G-100 (b) 柱纯化的洗脱曲线

Fig. 1 Elution curves of crude *Crataegus songarica* K. Koch polysaccharides purified by DEAE-100 (a) and Sephadex G-100 (b)

2.2 物性测定结果分析

表 1 为 CSP、P-CSP、CM-CSP 的磷酸根含量、羧甲基化取代 (DS)、黏度、溶解度和相对分子质量结果。

表 1 CSP、P-CSP、CM-CSP 的物性
Table 1 Physical properties of CSP, P-CSP, CM-CSP

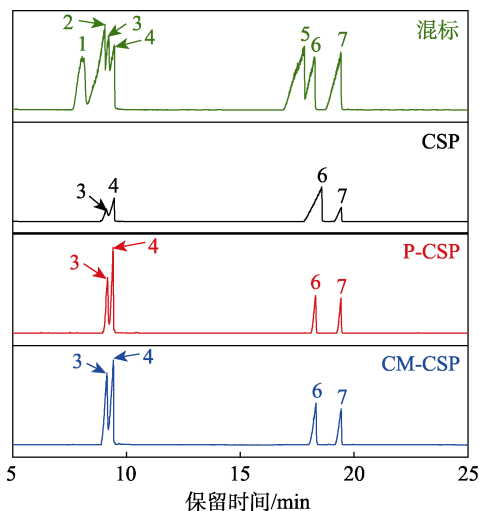
样品	磷酸根含量/($\mu\text{g}/\text{mg}$)	DS	黏度/($\text{mPa}\cdot\text{s}$)	水溶性/(g/L)	相对分子质量/ kDa
CSP	—	—	2035.00 ± 37.28	123.42 ± 0.38	18.92
P-CSP	78.9	—	1988.00 ± 27.25	132.38 ± 0.41	19.74
CM-CSP	—	0.91	1638.00 ± 31.35	136.47 ± 0.25	19.74

注：“—”代表无此检测项目。

从表 1 可以看出，P-CSP 的磷酸根含量为 $78.9 \mu\text{g}/\text{mg}$ ，CM-CSP 的羧甲基化取代度为 0.91。与 CSP 的黏度 [$(2035.00\pm 37.28) \text{mPa}\cdot\text{s}$] 相比，P-CSP、CM-CSP 的黏度分别降低至 (1988.00 ± 27.25) 、 $(1638.00\pm 31.35) \text{mPa}\cdot\text{s}$ 。这可能是因为，修饰后的多糖分子基团产生电荷，糖苷键间斥力增加，排列更加松散，从而降低了多糖黏度；而羧甲基化比磷酸化更容易引入电荷，导致多糖黏度降低更明显^[16]。P-CSP、CM-CSP 水溶性分别提升至 (132.38 ± 0.41) 、 $(136.47\pm 0.25) \text{g}/\text{L}$ ，这可能是因为，经修饰后，多糖分子间亲水基团增多，使多糖分子与水分子间相互作用增强；此外，羧甲基化修饰也增强了多糖分子之间的斥力，使分子间更容易发生水合作用^[16]。P-CSP、CM-CSP 相对分子质量均为 19.74kDa ，较 CSP 相对分子质量 (18.92kDa) 增大，这可能是引入的羧甲基基团和磷酸根基团相对分子质量较大，与原有多糖形成共价键导致相对分子质量增加^[16]，这也间接证实了磷酸化、羧甲基化修饰成功。

2.3 单糖组成分析

图 2 为单糖混标、CSP、P-CSP、CM-CSP 的 GC 谱图。



1—Fuc; 2—Rha; 3—Man; 4—Ara; 5—Xyl; 6—Gal; 7—Glu

图 2 CSP、P-CSP、CM-CSP 的 GC 谱图

Fig. 2 GC spectra of CSP, P-CSP and CM-CSP

从图 2 可以看出，CSP 是主要由 Man、Ara、Gal 和 Glu 组成的杂多糖，4 种单糖摩尔分数分别为 11.32%、20.08%、54.32%、14.28%，这与范馨予等^[7]从准噶尔山楂提取的多糖中单糖组成研究结果一致。P-CSP、CM-CSP 单糖组成相较 CSP 未发生变化，但 Man、Ara、Glu 摩尔分数明显增大。其中，P-CSP 中各单糖摩尔分数分别为 27.32% (Man)、31.78% (Ara)、21.53% (Gal)、19.37% (Glu)，CM-CSP 中各单糖摩尔分数分别为 29.52% (Man)、34.23% (Ara)、19.73% (Gal)、16.52% (Glu)。这表明，磷酸化、羧甲基化修饰引起的多糖降解未发生在主链上，而是发生在支链上。这可能是由于多糖支链通常拥有更多的修饰位点，与主链相比，支链上的多糖更容易受到外界基团的攻击，导致其羟基更容易被取代^[17]。

2.4 XRD 分析

图 3 为 CSP、P-CSP、CM-CSP 的 XRD 谱图。

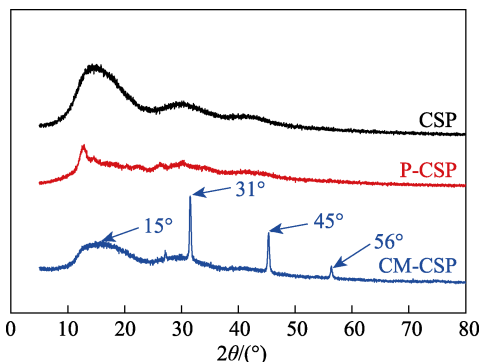


图 3 CSP、P-CSP、CM-CSP 的 XRD 谱图

Fig. 3 XRD patterns of CSP, P-CSP and CM-CSP

研究^[18]证明，多糖的物理特性与其结晶度和无定形有着直接关系。从图 3 可以看出，CSP、P-CSP、

CM-CSP 均在 $2\theta=10^\circ\sim 20^\circ$ 呈现一个较宽的弥散峰, 其为多糖的特征吸收峰。CSP 与 P-CSP 的峰形较为相似, 但 CM-CSP 与 CSP 相比存在较大差异, 其在 $2\theta=31^\circ$ 、 45° 、 56° 有明显的尖峰, $2\theta=31^\circ$ 处峰对应羧甲基纤维素的衍射峰, $2\theta=45^\circ$ 处峰对应于较高的晶面间距, 在羧甲基化处理后, 可能与分子排列的改变相关, $2\theta=56^\circ$ 处峰通常与晶体的密堆积, 以及在羧甲基化后所形成的新的结晶相相关。此外, 在 3 种多糖中还观察到较为平缓的部分, 说明多糖也存在非晶体结构, 这可能是 CSP、P-CSP、CM-CSP 中的糖基在聚合过程中, 部分区域呈现出有序性和无序性共存, 从而呈现晶体与非晶体共存的结构特性^[15]。这也表明, 修饰能够引起多糖晶型结构的变化, 从而间接改变多糖的溶解度、黏度等物理特性。

2.5 SEM 分析

图 4 为 CSP、P-CSP、CM-SCP 的 SEM 图。

从图 4 可以看出, CSP 表面光滑平整且具有网状结构 (图 4a), 说明 CSP 相对分子质量偏大并且形态均一, 这可能与其纯化过程中去除杂质有关。P-CSP 和 CSP 的表面形态基本一致, 但表面出现褶皱、卷曲 (图 4b), 说明经磷酸化修饰后的 P-CSP 分子键作用力降低, 氢键作用力减小。CM-CSP 相比于 CSP 呈不规则的碎片状, 结构较为疏松, 存在较大空隙, 且卷曲程度加大 (图 4c), 这可能是因为, 加入新基团后, 导致分子间距增大, 孔径增大及分子间作用力改变^[19]。表明磷酸化修饰和羧甲基化修饰改变了准噶尔山楂多糖的空间形态。

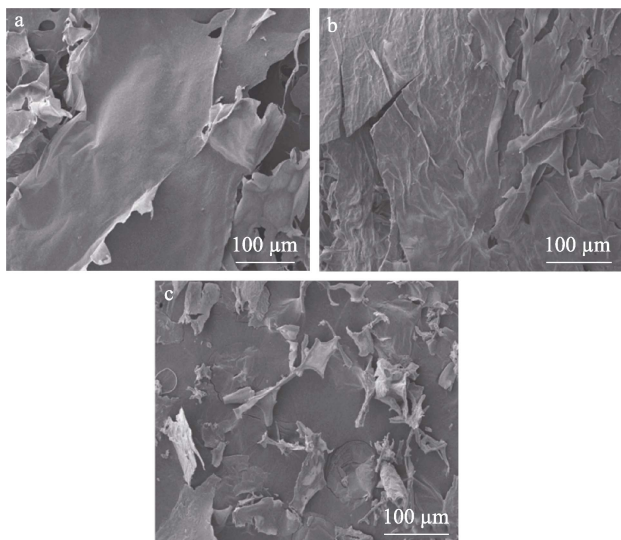


图 4 CSP (a)、P-CSP (b)、CM-CSP (c) 的 SEM 图
Fig. 4 SEM images of CSP (a), P-CSP (b) and CM-CSP (c)

2.6 三螺旋结构分析

图 5 为 CSP、P-CSP、CM-CSP 的刚果红实验结果。

刚果红有序的螺旋构象可与多糖结合形成络合物。通常情况下, 具有三螺旋结构的多糖溶液在低浓度 NaOH 溶液中, 最大吸收波长 (λ_{\max}) 增大并发生红移现象; 而在高浓度 NaOH 溶液中, 三螺旋结构中的氢键断裂, 三螺旋结构可能发生解旋、无规则弯曲等结构变化, 此时 λ_{\max} 降低发生蓝移现象^[20]。从图 5 可以看出, CSP、P-CSP、CM-CSP 在浓度为 0~0.6 mol/L 的 NaOH 溶液中, 均表现出先红移后蓝移的趋势, λ_{\max} 表现出的差异性可能与各组分基团变化、单糖比例以及不同相对分子质量相关, 这表明 CSP 经羧甲基化和磷酸化修饰后, P-CSP、CM-CSP 的三螺旋结构并未发生变化。

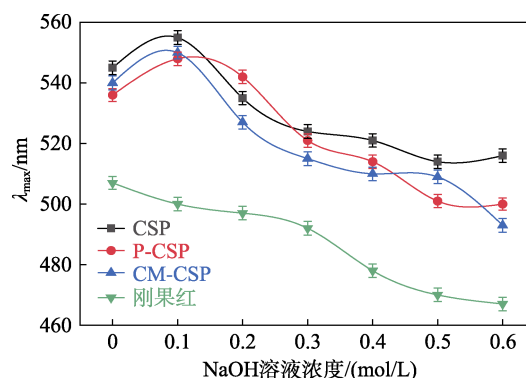


图 5 CSP、P-CSP、CM-CSP 的刚果红实验结果
Fig. 5 Congo red experimental results of CSP, P-CSP and CM-CSP

2.7 TG 分析

图 6 为 CSP、P-CSP、CM-CSP 的 TG 和 DTG 曲线。

从图 6 可以看出, 随着温度的升高, CSP、P-CSP、CM-SCP 的 TG 曲线呈现出相同的规律, 均具有 3 个失重阶段。第 1 个失重阶段发生在 $50\sim 134^\circ\text{C}$, 此阶段 CSP、P-CSP、CM-SCP 质量损失分别为 14.45%、16.66%、8.70%, 这主要是由于多糖中的游离水、结晶水快速蒸发引起的^[21]; 第 2 个阶段发生在 $200\sim 340^\circ\text{C}$, 此阶段失重明显, CSP、P-CSP、CM-CSP 质量损失分别为 47.74%、38.16%、43.77%, 这主要是因为, 多糖中的糖醛酸链开始出现热降解和多糖分子间糖苷键断链, 多糖内的羧基团发生脱羧反应, 导致其质量的快速损失^[22]; 第 3 个阶段主要发生在 $390\sim 500^\circ\text{C}$, 此阶段多糖的热分解明显缓慢, 多糖样品逐渐变为炭化结构, 当温度为 600°C 时, CSP、P-CSP、CM-CSP 的残炭率分别为 31.91%、40.71%、43.84%。表明经磷酸化、羧甲基化修饰的准噶尔山楂多糖 (P-CSP、CM-CSP) 热稳定性更好。研究^[21]指出, 磷酸化、羧甲基化基团的引入导致多糖结构发生变化, 这是导致多糖热稳定性变化的主要原因, 并且多糖的残杂率、单糖的连接方式等也会对热稳定性产生影响。

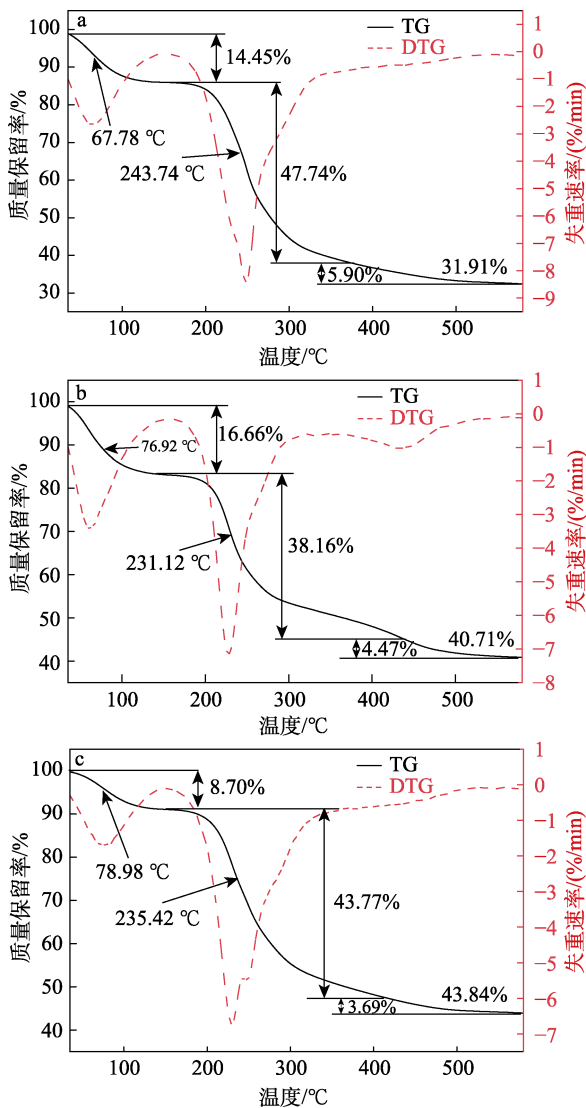


图 6 CSP (a)、P-CSP (b)、CM-CSP (c) 的 TG 曲线
Fig. 6 TG curves of CSP (a), P-CSP (b) and CM-CSP (c)

2.8 FTIR 分析

图 7 为 CSP、P-CSP、CM-CSP 的 FTIR 谱图。

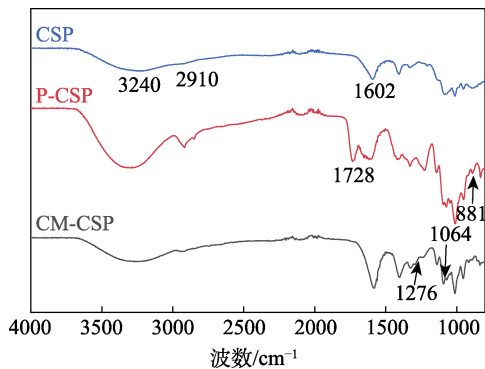


图 7 CSP、P-CSP、CM-CSP 的 FTIR 谱图
Fig. 7 FTIR spectra of CSP, P-CSP and CM-CSP

从图 7 可以看出，准噶尔山楂多糖修饰前后主体结构无明显变化，表明磷酸化、羧甲基化多糖仍然保留了原多糖的主要性质。其中，3240 cm⁻¹ 处峰

归属为—OH 的伸缩振动，磷酸化、羧甲基化修饰后 (P-CSP、CM-CSP) 此峰明显增强，这可能是由于修饰后的氢键和主链的长度遭到破坏，从而暴露出更多的氢键和烷基键^[14]。2910 cm⁻¹ 处峰归属为—CH₂ 的不对称伸缩振动；1602 cm⁻¹ 处峰归属于 C=O 键的伸缩振动^[9]。相比 CSP，P-CSP 在 1728 cm⁻¹ 处出现新峰，为磷酸化衍生物中 P=O 键的不对称伸缩振动^[23]，在 881 cm⁻¹ 处峰是由 P—O—C 的伸缩振动引起的^[24]；CM-CSP 在 1276、1064 cm⁻¹ 处出现新峰，这归因于—COO—的对称伸缩振动和非对称伸缩振动^[25]。由此可见，衍生物的特征吸收峰证实了磷酸基、羧甲基成功地修饰到了准噶尔山楂多糖的结构中。

2.9 NMR 分析

图 8 为 CSP、P-CSP、CM-CSP 的 ¹HNMR 和 ³¹PNMR 谱图。

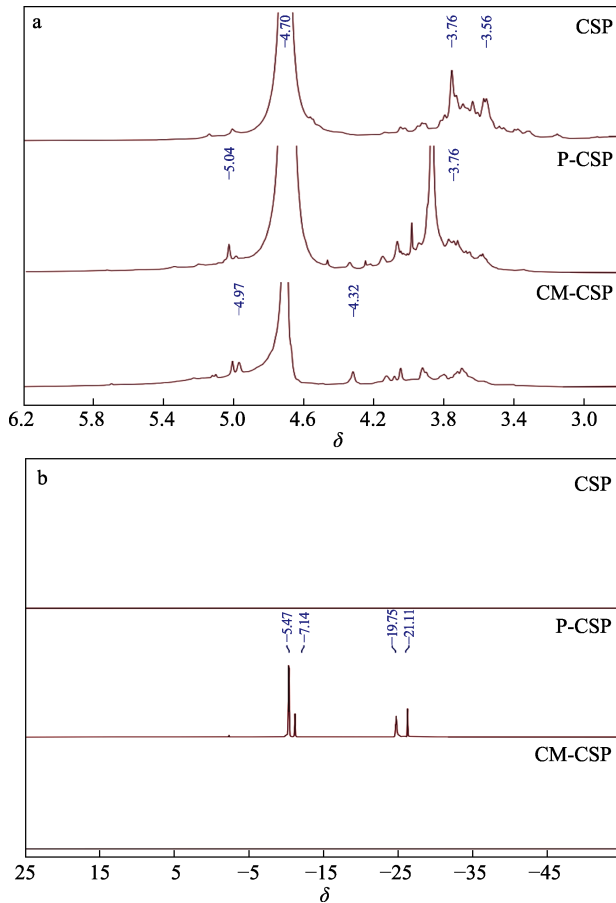


图 8 CSP、P-CSP、CM-CSP 的 ¹HNMR (a) 和 ³¹PNMR (b) 谱图
Fig. 8 ¹HNMR (a) and ³¹PNMR (b) spectra of CSP, P-CSP, and CM-CSP

从图 8a 可以看出，在 δ 3.00~6.00 范围内的信号峰归因于多糖中的质子峰，其中，δ 3.00~4.60 的信号峰归因于 H-2、H-6 的质子峰^[26]；δ 4.70 为 D₂O 的特征吸收峰；δ 4.80~6.00 的信号峰归属于多糖异

头氢, 并且在该区域出现的信号表明, CSP、P-CSP、CM-CSP 均含有 β 构型的糖苷键^[27]。对比 CSP, P-CSP 在 δ 5.04 处出现新的信号峰, 而在 δ 3.76 处的羟基信号强度明显减弱, 表明 P-CSP 在此处发生过磷酸化^[11]; CSP 在 δ 3.56 处出现了甲氧基 ($-\text{OCH}_3$) 中氢的特征峰, CM-CSP 中在此处信号明显减弱, 这可能是由于在 δ 3.56 处羧甲基 ($-\text{OCH}_2\text{COO}$) 基团取代了甲氧基上的氢所导致^[12]。

从图 8b 可以看出, 相比 CSP 和 CM-CSP, P-CSP 在 δ -5.47、-7.14、-19.75、-21.11 处出现新的信号峰, 再一次证实磷酸化修饰成功。

2.10 降糖活性评价

2.10.1 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶抑制活性

图 9 为 CSP、P-CSP、CM-CSP 对 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶的抑制活性测试结果。

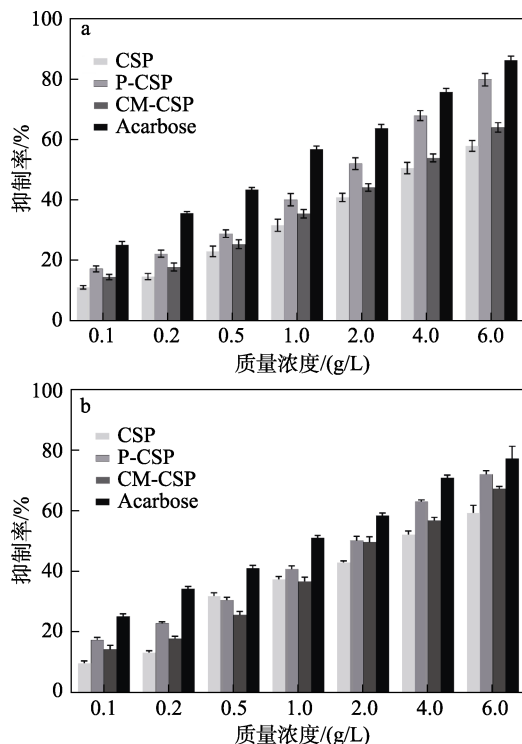


图 9 CSP、P-CSP、CM-CSP 对 α -淀粉酶 (a)、 α -葡萄糖苷酶 (b) 的抑制率

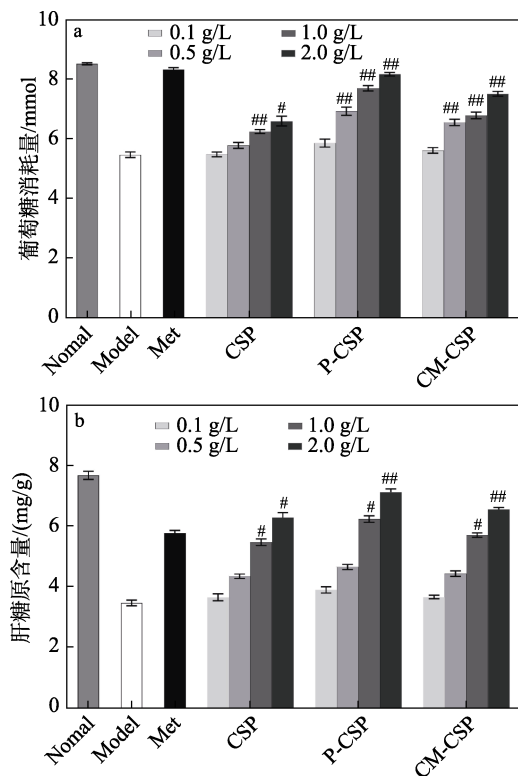
Fig. 9 Inhibition rate of CSP, P-CSP and CM-CSP against α -amylase (a) and α -glucuronidase (b)

α -淀粉酶能够促进糖原、低聚糖的水解, 将二糖转换为人体易吸收的单糖; α -葡萄糖苷酶主要存在于肠细胞腔面, 是促使双糖水解为单糖的重要酶, 因此, 抑制 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶活性对维持餐后血糖水平具有重要意义^[28]。从图 9 可以看出, CSP、P-CSP、CM-CSP 对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶均表现出较强的抑制活性, 并且呈剂量依赖性。当质量浓度为 6.0 g/L 时, CSP、P-CSP、CM-CSP 对 α -淀粉酶的抑制率分别为 57.80%、79.71%、

63.91% (图 9a), 其 IC_{50} 分别为 3.78、1.94、3.82 g/L; 对 α -葡萄糖苷酶抑制率分别为 59.30%、72.04%、67.24% (图 9b), 其 IC_{50} 分别为 3.82、1.98、2.12 g/L。与 CSP 相比, P-CSP 对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制率分别同比提高 21.91% 和 12.74%; CM-CSP 对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制率分别同比提高 6.11%、7.94%。磷酸基团具有更高的亲核特性, 这可能是磷酸化衍生物体外降血糖能力强于其他衍生物的原因^[11]。

2.10.2 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗量、肝糖原含量分析

图 10 为 CSP、P-CSP、CM-CSP 对 IR-HepG2 细胞的葡萄糖消耗量、肝糖原含量的影响。



“#”代表与模型组 (Model) 相比差异显著 ($P < 0.05$); “##”代表与模型组相比差异极显著 ($P < 0.01$)

图 10 CSP、P-CSP、CM-CSP 对 IR-HepG2 细胞的葡萄糖消耗量 (a)、肝糖原含量 (b) 的影响

Fig. 10 Effect of CSP, P-CSP and CM-CSP on glucose consumption (a) and liver glycogen content (b) in IR-HepG2 cells

胰岛素抵抗 (IR) 能够导致机体对胰岛素敏感性和反应性降低, 降低胰岛素促进外周组织中的葡萄糖摄取和利用效果。HepG2 细胞是构建胰岛素抵抗模型的最佳细胞系, 葡萄糖消耗量、肝糖原含量是细胞摄取和利用葡萄糖能力的重要指标^[29]。

从图 10a 可以看出, 胰岛素处理的模型组 (Model) 中的葡萄糖消耗量 (5.53 mmol) 明显低于正常组 (Normal) 中的葡萄糖消耗量 (8.64 mmol),

证明该模型成功建立。与 Model 相比,用二甲双弧处理的阳性对照组 (Met) 葡萄糖消耗量 (8.42 mmol) 提高了 2.89 mmol; 样品组质量浓度在 0.1~2.0 g/L 范围内, CSP、P-CSP、CM-CSP 处理的 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗量显著增加。当样品组质量浓度为 2.0 g/L 时, CSP、P-CSP、CM-CSP 葡萄糖消耗量分别为 6.61、8.23、7.62 mmol。值得注意的是, P-CSP 处理的样品组葡萄糖消耗量 (8.23 mmol) 接近 Met 的葡萄糖消耗量 (8.42 mmol), 表明 P-CSP 在增强 IR-HepG2 细胞葡萄糖代谢方面具有优越能力。

从图 10b 可以看出, 与 Model 相比, 样品组质量浓度在 0.1~2.0 g/L 范围内, CSP、P-CSP、CM-CSP 处理的 IR-HepG2 细胞肝糖原含量呈剂量增加趋势。当样品组质量浓度为 2.0 g/L 时, CSP、P-CSP、CM-CSP 肝糖原含量分别为 6.31、7.14、6.52 mg/g。

上述结果表明, 经磷酸化、羧甲基化修饰的准噶尔山楂多糖可以促进肝糖原的合成, 从而提升葡萄糖的消耗量。

3 结论

本文采用磷酸钠法、氯乙酸法对准噶尔山楂多糖进行磷酸化和羧甲基化修饰, 制备了 P-CSP、CM-CSP。

(1) 与 CSP 相比, P-CSP、CM-CSP 黏度降低, 溶解度提高, 相对分子质量增大; P-CSP 和 CM-CSP 均具有晶体和非晶体共存结构, 且两种修饰方法均未改变 CSP 的三螺旋结构, 但修饰前后表面形貌发生明显变化, 其中 P-CSP 表面出现褶皱、卷曲, CM-CSP 呈现出不规则的碎片状, 且结构较为疏松。

(2) P-CSP、CM-CSP 的热稳定性较 CSP 提升, CSP、P-CSP、CM-CSP 的 600 °C 残炭率分别为 31.91%、40.71%、43.84%。

(3) CSP 是由 Man、Ara、Gal 和 Glu 组成的杂多糖, 经磷酸化和羧甲基化修饰后, 单糖组成未发生变化, 但单糖摩尔分数发生变化。磷酸化、羧甲基化修饰引起的多糖降解未发生在主链上, 而是发生在支链上。

(4) 与 CSP 相比, P-CSP 和 CM-CSP 对 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶抑制率均提升; 当样品组质量浓度为 2.0 g/L 时, P-CSP 的葡萄糖消耗量 (8.23 mmol) 和 CM-CSP 的葡萄糖消耗量 (7.62 mmol) 接近阳性对照组 (8.42 mmol), 证实经磷酸化、羧甲基化修饰可以提升准噶尔山楂多糖的降血糖活性。

本文不仅可为准噶尔山楂资源的开发利用提供新的思路, 也可以为其他药用植物多糖的理化性质测定、降糖活性提升提供参考。

参考文献:

- [1] YANG L (杨蕾), LYU H Y (吕海英), MA J (马进), *et al.* Structure and dynamic analysis of *Crataegus songarica* K. Koch population in Tianshan wild fruit forest of Xinjiang[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica (西北植物学报), 2018, 38(12): 2314-2323.
- [2] IKHSANOV Y S, KUSAINOVA K M, TASMAGAMBETOVA G Y, *et al.* Amino acid and vitamin composition of *Crataegus orientalis* Pall[J]. Series Chemistry and Technology, 2021, 446(2): 149-154.
- [3] GUO Y P, YANG H, WANG Y L, *et al.* Determination of flavonoids compounds of three species and different harvesting periods in *Crataegi folium* based on LC-MS/MS[J]. Molecules, 2021, 26: 1602.
- [4] YOUNIS W, ALAMGEER, SCHINI-KERTH V B, *et al.* Role of the NO/cGMP pathway and renin-angiotensin system in the hypotensive and diuretic effects of aqueous soluble fraction from *Crataegus songarica* K. Koch[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2020, 249: 112400.
- [5] SHATOOR A S, SHATI A, SHATOOR A K, *et al.* The hypocoagulant effect of *Crataegus aronia* in rats entails vitamin K-dependent and vitamin K-independent effects[J]. Food Biochemistry, 2020, 44: e13094.
- [6] FENG L (冯琳), LUO S B (罗世博), PIDAMAIMAITI GULIGENA (古丽格娜·皮达买买提), *et al.* Optimization of extraction process of total triterpenoids from *Crataegus songarica* by response surface methodology and its purification process[J]. Science and Technology of Food Industry (食品工业科技), 2024, 45(9): 196-204.
- [7] FAN X Y (范馨予), WANG S M (王世苗), ZHANG X Y (张晓妍), *et al.* Optimization of extraction technology and antioxidant activity of *Crataegus songarica* polysaccharide by response surface methodology[J]. Feed Research (饲料研究), 2023, 21(3): 64-70.
- [8] LIU C Y, ZHANG T T, ZHAO P, *et al.* Purification and structural analysis of a novel polysaccharide from *Rehmannia radix Praeparata*[J]. Research Article, 2023, 102(3): 514-522.
- [9] QI K, XIA G D, HUANG G L, *et al.* Extraction, chemical modification, and antioxidant activities of *Daucus carota* polysaccharide[J]. Chemical Biology & Drug Design, 2021, 98: 1098-1103.
- [10] WANG J L (王俊龙), SHI W P (时文盼), LIN Y G (蔺永刚), *et al.* Carboxymethyl modification, physicochemical properties, and hypoglycemic activity of *Inonotus bliquus* polysaccharides[J]. Food and Fermentation Industries (食品与发酵工业), 2025, 51(4): 244-254.
- [11] YANG S H, WANG X L, ZHANG H N, *et al.* Phosphorylation modification, structural characterization, antioxidant and DNA protection capacities of polysaccharides from *Asarum sieboldii* Miq[J]. Chemistry & Biodiversity, 2024, 21(2): e202301781.
- [12] LI L Y, ZHANG F J, ZHU L, *et al.* Carboxymethylation modification, characterization of dandelion root polysaccharide and its effects on gel properties and microstructure of whey protein isolate[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 24(2): 124-136.
- [13] CAO L (曹磊), LIU W (刘伟), WANG J L (王俊龙), *et al.* Preparation of low viscosity polysaccharide from *Plantago ovata* Forsk by sulfation method and its structural characterization and antioxidant activities[J]. Natural Product Research and Development (天然产物研究与开发), 2024, 36(4): 26-36.
- [14] XIU W Y, WANG X, NA Z G, *et al.* Ultrasound-assisted hydrogen peroxide-ascorbic acid method to degrade sweet corn cob polysaccharides can help treat type 2 diabetes via multiple pathways *in vivo*[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2023, 101: 106683.
- [15] LI W, ZHANG Y Q, ZHAO X T, *et al.* Optimization of ultrasonic-assisted extraction of *Platycodon grandiflorum* polysaccharides and evaluation of its structural, antioxidant and hypoglycemic activity[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2023, 100: 106635.
- [16] ZHANG Y, NIE R N, LIU W X, *et al.* Sulfation on polysaccharides from *Zizania latifolia* extracted using ultrasound: Characterization, antioxidant and anti-non-small cell lung cancer activities[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2024, 103: 106803.
- [17] WANG W L, LIU X Y, WANG L X, *et al.* *Ficus carica* polysaccharide extraction via ultrasound-assisted technique: Structure characterization, antioxidant, hypoglycemic and immunomodulatory activities[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2023, 101: 106680.