

磷酸化修饰鬼臼果多糖的制备及生物活性

王俊龙, 江升旗, 刘梦瑶, 于雪慧, 时文盼, 蔺永刚*

(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)

摘要: 以鬼臼果 (*Podophyllum emodi*) 为原料, 提取鬼臼果多糖 (*Podophyllum emodi* polysaccharides, PEP), 纯化后采用磷酸钠法制备磷酸化修饰鬼臼果多糖 (P-PEP), 采用单因素实验及响应面法优化了 P-PEP 的制备工艺。通过高效凝胶渗透色谱、UV 吸收光谱、GC-MS、XRD、SEM、TGA、NMR 对 PEP 和 P-PEP 的理化性质和结构进行了表征, 评价了其抗氧化能力和降血糖活性。结果表明, 在反应温度 72 °C、体系 pH=9、反应时间 5.1 h 的最佳工艺条件下, P-PEP 的磷酸根取代度为 11.37%; PEP 和 P-PEP 的重均相对分子质量分别为 20898 和 21432 Da, 是由鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖 4 种单糖组成的酸性杂多糖, 4 种单糖的相对含量显著不同, PEP 是以 β -糖苷键连接的吡喃糖为主, 兼有少量的 α -糖苷键连接的吡喃糖, P-PEP 是以 α -糖苷键连接的吡喃糖为主的多糖。P-PEP 比 PEP 的结晶度降低, 呈不规则的小球状和棒状结构形貌, 同时热稳定性提高, 600 °C 残炭率从 PEP 的 21.27% 提高至 48.35%。PEP 和 P-PEP 对 1,1-二甲基-2-三硝基苯肼自由基的最大半抑制质量浓度 (IC_{50}) 分别为 0.93 和 0.60 g/L, 对 2,2'-联氨-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐阳离子自由基的 IC_{50} 分别为 1.05 和 0.67 g/L, 对 α -葡萄糖苷酶的 IC_{50} 分别为 3.46 和 1.43 g/L, 对 α -淀粉酶的 IC_{50} 分别为 3.81 和 0.49 g/L。P-PEP 中鼠李糖 (Rha) 相对含量 (42.31%) 比 PEP 中 Rha 相对含量 (28.04%) 显著增大, 具有还原性的 Rha 可以增强多糖的螯合能力, 导致 P-PEP 体外抗氧化活性强于 PEP。

关键词: 鬼臼果多糖; 磷酸化修饰工艺; 理化性质; 生物活性; 中药现代化技术

中图分类号: TQ281 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2025) 09-1994-11

Preparation and bioactivity of phosphorylated *Podophyllum emodi* polysaccharides

WANG Junlong, JIANG Shengqi, LIU Mengyao, YU Xuehui, SHI Wenpan, LIN Yonggang*

(Xinjiang Key Laboratory of Clean Conversion and High Value Utilization of Biomass Resources, Yili Normal University, Yili 835000, Xinjiang, China)

Abstract: Phosphorylated *Podophyllum emodi* polysaccharides (P-PEP) were prepared from reaction of sodium phosphate with purified *Podophyllum emodi* polysaccharides (PEP) extracted from *Podophyllum emodi* fruit, with the preparation process optimized using single-factor experiments and response surface methodology. The physicochemical properties and structures of PEP and P-PEP were characterized by high performance gel permeation chromatography, UV adsorption spectrum, GC-MS, XRD, SEM, TGA and NMR, and their antioxidant capacity and hypoglycemic activity were evaluated. The results showed that the phosphate ion substitution degree of P-PEP was 11.37% under the optimum process conditions of reaction temperature 72 °C, pH=9 and reaction time 5.1 h. PEP and P-PEP, with a weight-average relative molecular mass of 20898 and 21432 Da, respectively, were acidic heteropolysaccharides composed of rhamnose, arabinose, galactose and glucose. The relative contents of the four monosaccharides in PEP and P-PEP were significantly different. PEP were polysaccharides mainly composed of pyranose linked by β -glucoside bonds, with a small amount of pyranose linked by α -glucoside bonds, while P-PEP were polysaccharides mainly

收稿日期: 2024-08-13; 定用日期: 2024-09-30; DOI: 10.13550/j.jxhg.20240636

基金项目: 2023 年伊犁州应用技术研究与创新驱动专项项目 (YYD2023A11); 2024 年度伊犁师范大学伊犁河谷重点项目 (2024HGZD02)

作者简介: 王俊龙 (1992—), 男, 实验师, E-mail: 974881461@qq.com. 联系人: 蔺永刚 (1984—), 男, 实验师, E-mail: 869294906@qq.com.

composed of pyranose linked by α -glucoside bonds. P-PEP with irregular spheroidal and rod-like structure morphology exhibited lower crystallinity and improved thermal stability compared with PEP, with the carbon residue rate increased from 21.27% to 48.35% at 600 °C. The maximum inhibitory mass concentration (IC_{50}) of PEP and P-PEP for 1,1-dimethyl-2-trinitrophenylhydrazine free radicals were 0.93 and 0.60 g/L, respectively, and the IC_{50} for 2,2'-hydrazine-bis(3-ethyl-benzothiazole-6-sulfonic acid) diammonium cation free radicals were 1.05 and 0.67 g/L, respectively. The IC_{50} for α -glucosidase and α -amylase were 3.46 and 1.43 g/L and 3.81 and 0.49 g/L, respectively. The relative content of rhamnose (Rha) in P-PEP (42.31%) was significantly higher than that in PEP (28.04%), and the reducing Rha could enhance the chelating ability of polysaccharides, resulting in stronger antioxidant activity of P-PEP than PEP *in vitro*.

Key words: *Podophyllum Emodi* polysaccharides; phosphorylation modification process; physicochemical properties; bioactivity; modern technology of Chinese medicine

随着中国天然药用植物研究的快速发展和现代提取技术的进步, 鬼臼多糖的功能活性和药用价值受到越来越多的关注^[1]。中药鬼臼药用历史悠久, 在《本草纲目》和《神农本草经》均有记载^[2]。鬼臼具有清热解毒、消肿止痛、活血化瘀等多种功效, 常用于治疗各种炎症、肿痛及月经不调等病症。现代研究表明, 鬼臼果含黄酮、多酚、多糖、萜类等化学成分, 以及人体所需的铁、锌等微量元素^[3]。鬼臼多糖现已被证实具有抗氧化、抗炎、抗菌和降血糖等活性^[4], 但其抗氧化、降血糖活性相对较弱。为增强植物多糖的生物相容性及药理活性, 常通过化学修饰方法增强其生物活性。现阶段, 植物多糖的化学修饰主要有磷酸化、硫酸化、硒化、乙酰化等方法^[5]。其中, 磷酸化修饰方法简便, 在增强生物活性方面具有明显优势。周蒙等^[6]研究了不同修饰工艺对若羌灰枣多糖抗氧化活性的影响, 结果发现, 磷酸化修饰可以显著提升若羌灰枣多糖对羟基自由基的清除能力, 与乙酰化、羧甲基化、硫酸化修饰相比, 羟基自由基清除能力分别提升 45.63%、20.63%、94.92%。

磷酸化修饰在改变多糖结构的同时, 通常会导致其理化性质的变化, 包括相对分子质量、单糖组成、形貌、晶体结构等; 此外, 不同多糖结构差异, 其磷酸化修饰对其生物活性的影响也不尽相同。目前, 关于鬼臼果多糖修饰研究仍处于初步阶段, 磷酸化修饰对鬼臼果多糖抗氧化、降血糖的影响, 以及可能导致的理化性质及结构变化尚不可知。

本文拟采用超声辅助法提取并经纤维素柱、凝胶色谱柱层析分离纯化鬼臼多糖; 然后, 通过磷酸钠法对纯化鬼臼多糖进行磷酸化修饰, 并优化修饰工艺条件。表征和测试磷酸化鬼臼果多糖的理化性质和结构, 评价磷酸化修饰前后鬼臼果多糖对自由基的清除能力和降血糖活性。以期磷酸化修饰多

糖构效关系研究提供理论依据和数据支撑, 也为鬼臼果的开发利用提供参考。

1 实验部分

1.1 材料、试剂与仪器

鬼臼果, 采自云南省沧源县芒卡镇, 经伊犁师范大学天然产物重点实验室主任南光明教授鉴定为小檗科鬼臼属毛茛目植物鬼臼的果实; 透析袋(截留相对分子质量 3500 Da), 美国 Sigma 公司。

石油醚、无水乙醇、硫酸钠、三偏磷酸钠、NaOH、三氟乙酸、分析纯, 伊犁万隆工贸有限责任公司; 刚果红、抗坏血酸(V_C)、阿卡波糖(Acarbose)、1,1-二甲基-2-三硝基苯肼(DPPH)、2,2'-联氨-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)、葡萄糖苷酶、 α -淀粉酶, 分析纯, 上海麦克林生化科技股份有限公司; 蓝色葡聚糖标准品、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), 分析纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (质量分数为 47%)、三羟甲基氨基甲烷、浓硫酸(质量分数 98%)、浓硝酸、钼酸铵、过氧化氢(质量分数 30%), 分析纯, 伊犁科硕商贸有限公司; DEAE-100 纤维素柱、Sephadex G-100 凝胶柱, 上海碧云天生物技术股份有限公司; 超纯水, 自制。

XH-300A 电脑微波超声波组合合成/萃取仪, 北京祥鹤科技发展有限公司; UV-2550 型紫外-可见分光光度计(UV-Vis)、IRprestige-21 型傅里叶变换红外光谱仪(FTIR)、LC-20AB 型高效液相色谱仪(HPLC), 日本 Shimadzu 公司; JSM-7500F 型扫描电子显微镜(SEM), 日本电子株式会社; Spectra Max M5 型多功能酶标仪, 美国 Molecular Devices 公司; D8 Advance A25 型 X 射线衍射仪(XRD)、

AVANCE NEO 400 MHz 型核磁共振波谱仪(NMR), 德国 Bruker 公司; 7820A 型气相色谱仪(GC)、7200B 四极杆飞行时间气质联用(GC/MS)系统, 美国 Agilent 公司; HS-TGA-102 热重分析仪(TGA), 上海和晟仪器科技有限公司; LC-10T 型高效凝胶渗透色谱仪(HPGPC), 赛智科技(杭州)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 鬼白果多糖的提取、分离与纯化

鬼白果经自然阴干, 粉碎过 30 目筛。在料液比(mg:mL)为 2:1 的条件下, 采用石油醚、无水乙醇分别脱脂、脱色素 24 h 后, 自然风干后得到鬼白果粉末, 于 -5 °C 冰箱冷藏备用。

采用超声辅助法在电脑微波超声波组合合成/萃取仪上提取鬼白果粗多糖。将 10.0 g 鬼白果粉末按液(超纯水)料比(mL:g)40:1, 在提取温度 50 °C、超声功率 500 W 条件下提取 90 min。待提取结束后, 过滤, 收集滤液, 采用三氯乙酸法^[7]除蛋白(重复 4 次), 然后将除蛋白后提取液减压浓缩、醇沉(5 °C、24 h), 透析(截留相对分子质量 3500 Da、72 h), 冷冻干燥(-70 °C、48 h), 得鬼白果粗多糖。最后, 经 DEAE-100 纤维素柱分离, 依次用 300 mL 去离子水, 浓度 0.05、0.10、0.25 mol/L NaCl 溶液进行洗脱, 采用苯酚硫酸法^[8]绘制洗脱曲线。再经 Sephadex G-100 凝胶色谱柱纯化, 用 300 mL 超纯水洗脱收集同一峰洗脱样品, 减压浓缩、透析(3500 Da, 72 h)、冷冻干燥(-70 °C、48 h), 得白色棉絮状纯化鬼白果多糖, 记为 PEP。多糖产率按式(1)计算:

$$\text{多糖产率}/\% = \frac{\rho \times N \times V}{M} \times 100 \quad (1)$$

式中: ρ 为多糖质量浓度, g/mL; N 为稀释倍数; V 为待测液体积, mL; M 为鬼白果粉末质量, g。

1.2.2 磷酸化鬼白果多糖(P-PEP)的制备

参照 HE 等^[9]方法并稍作修改, 制备磷酸化鬼白果多糖。将 1.0 g PEP、2.0 g 三偏磷酸钠、5.0 g 硫酸钠、5.0 g 三聚磷酸钠充分溶解在 100 mL 超纯水中; 随后, 用 1 mol/L 的 NaOH 溶液调其 pH=9, 并将其在 70 °C 下搅拌反应 5 h; 待反应结束, 冷却至室温后, 透析(截留相对分子质量 3500 Da、72 h), 冷冻干燥(-70 °C、48 h), 得淡黄色棉絮状磷酸化鬼白果多糖, 记为 P-PEP。

1.2.3 磷酸根取代度的测定

采用钼蓝比色法^[10]绘制 P-PEP 磷酸根含量标准曲线。

Tris 缓冲液的配制: 将 200 mg $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (质量分数为 47%) 和 6.0 g 三羟甲基氨基甲烷溶于

300 mL 超纯水中, 用浓度 1 mol/L 盐酸将其 pH 调至 7。

定磷试剂的配制: 由 1 mL 浓度 0.05 mol/L 的 V_c 水溶液、2 mL 浓硫酸、2 mL 体积分数 3% 钼酸铵溶液混合均匀。

精确配制不同质量浓度的磷酸根标准溶液(10~100 mg/L)各 2 mL, 依次加入 3 mL Tris 缓冲液(0.2 mol/L、pH=7)、5 mL 定磷试剂, 定容至 10 mL 容量瓶。于 45 °C 下反应 1 h, 冷却至室温后, 用 UV-Vis 测定其在 580 nm 处吸光度, 得磷酸根质量浓度(x , mg/L)-吸光度(y)标准曲线方程为 $y=0.32x+0.0832$ ($R^2=0.9989$)。

将 0.5 g P-PEP 置于坩埚中, 然后加入 1 mL 浓硫酸和 1 mL 浓硝酸, 加热至产生白烟后, 加入 1 mL 过氧化氢, 再缓慢加热, 重复上述操作直至不再产生白烟, 冷却至室温, 将坩埚中的物质转移至 10 mL 容量瓶中, 用超纯水定容。用 UV-Vis 测定溶液在 580 nm 处的吸光度, 代入标准曲线方程计算 P-PEP 的磷酸根质量浓度(ρ)(mg/L), 根据式(2)计算 P-PEP 的磷酸根取代度(D , %)^[11]:

$$D/\% = [5.23\rho/(100-3.32\rho)] \times 100 \quad (2)$$

1.3 表征方法和性能测试

1.3.1 重均相对分子质量(M_w)的测定

PEP、P-PEP 的 M_w 采用 HPGPC^[12]进行测定。

精确配制质量浓度为 2.0 g/L 的 PEP、PPEP 水溶液, 以超纯水为流动相, 流速 0.6 mL/min, 上样量 5 μL , 色谱柱为 TSK gel-3000 PWXL (300 mm \times 7.8 mm \times 7 μm), 检测器为示差检测器, 采用不同相对分子质量的蓝色葡聚糖(5、10、15、20、25、50 kDa)为标准品, 分别绘制 PEP、P-PEP 的 M_w 色谱曲线, 并建立标准曲线方程 $y=-0.0175x+0.01587$ ($R^2=0.9989$), 其中, x 为保留时间, min; y 为相对分子质量的对数。

1.3.2 单糖组成的测定

PEP、P-PEP 的衍生化处理、GC-MS 条件参照本课题组前期研究方法进行^[7]。根据 GC-MS 保留时间、质谱离子碎片信息综合分析单糖组成。

1.3.3 UV 吸收光谱的测试

将质量浓度为 0.2 g/L 的 PEP、P-PEP 水溶液置于比色皿中, 采用紫外-可见分光光度计对其进行测试, 扫描波长 200~400 nm。

1.3.4 XRD 测试

将适量 PEP、P-PEP 研磨成粉末, 均匀平铺在样品台中心。靶材 Cu, 管电压 40 kV, 管电流 40 mA, K_α 射线波长 0.1541 nm, 扫描速率 6 ($^\circ$)/min, $2\theta=5^\circ\sim 80^\circ$ 。

1.3.5 SEM 测试

使用导电胶带分别将适量 PEP、P-PEP 固定在样品台上, 使用离子溅射仪喷金。采用低位二次电子 (LEI) 模式, 工作电流 20 μ A, 电子加速电压 15.0 kV, 放大倍数 500 倍。

1.3.6 TGA 测试

分别将 10 mg PEP、P-PEP 置于铂坩埚中, N_2 氛围下以 10 $^{\circ}C/min$ 升温速率, 从 25 $^{\circ}C$ 加热至 600 $^{\circ}C$ 。

1.3.7 FTIR 测试

采用溴化钾压片法, 波数 4000~800 cm^{-1} , 分辨率 4 cm^{-1} , 扫描次数 32 次。

1.3.8 NMR 测试

将质量均为 30 mg 的 PEP、P-PEP 分别溶解在 0.5 mL 氘代水 (D_2O) 中, 随后置于核磁管中, 采用 NMR 测定样品的 1H NMR、 ^{31}P NMR。

1.4 P-PEP 制备工艺的考察

1.4.1 单因素实验

采用 1.2.2 节方法和步骤, 固定其他条件不变, 考察反应温度 (50、60、70、80、90 $^{\circ}C$) 对 P-PEP 磷酸根取代度的影响。

采用 1.2.2 节方法和步骤, 固定其他条件不变, 考察体系 pH (6、7、8、9、10) 对 P-PEP 磷酸根取代度的影响。

采用 1.2.2 节方法和步骤, 固定其他条件不变, 考察反应时间 (2、3、4、5、6 h) 对 P-PEP 磷酸根取代度的影响。

1.4.2 响应面实验

在单因素实验的基础上, 采用 Design-Expert 13.0 软件, 以反应温度 (A)、pH (B)、反应时间 (C) 为因素, P-PEP 磷酸根取代度为响应值, 设计三因素三水平的响应面实验, 因素与水平设计如表 1 所示。

表 1 响应面实验因素与水平

Table 1 Factors and levels of response surface experiment

水平	因素		
	反应温度(A)/ $^{\circ}C$	pH(B)	反应时间(C)/h
-1	60	8	4
0	70	9	5
1	80	10	6

1.5 抗氧化、降血糖活性测试

分别配制质量浓度为 0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、6.00、8.00 g/L 的 PEP、P-PEP 水溶液, 以 V_C 、阿卡波糖为阳性对照, 参照课题组前期报道方法^[7], 分别测定 PEP、P-PEP 对 DPPH 自由基、ABTS 阳离子 ($ABTS^+$) 自由基清除能力, 以及对 α -淀粉酶和

α -葡萄糖苷酶的活性抑制能力, 分别计算其最大半抑制浓度 (IC_{50} , g/L)。

2 结果与讨论

2.1 鬼臼果多糖的分离纯化分析

图 1 为鬼臼果粗多糖的洗脱曲线图。

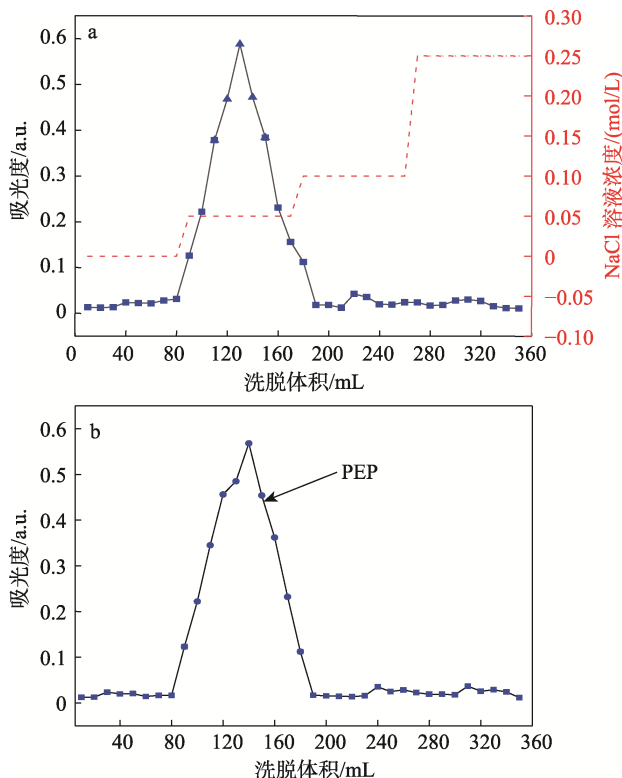


图 1 纤维素柱 (a) 和凝胶色谱柱 (b) 的层析洗脱曲线
Fig. 1 Chromatographic elution curves of cellulose column (a) and gel column (b)

从图 1 可以看出, 鬼臼果粗多糖经纤维素柱的超纯水、NaCl 溶液洗脱后, 得到多糖组分 (图 1a), 再经凝胶色谱柱进一步纯化后, 呈现出单个对称洗脱峰 (图 1b)。经计算, 10.0 g 鬼臼果粗多糖经纤维素柱、凝胶色谱柱纯化后产率分别为 25.78% 和 59.25%, 得到约 1.1 g 的 PEP, 总得率为 15.27%。

2.2 单因素实验结果分析

图 2 为反应温度、体系 pH、反应时间对 P-PEP 磷酸根取代度的影响。

从图 2a 可以看出, 随着反应温度的升高, P-PEP 的磷酸根取代度呈先增加后减小的趋势。这是因为, PEP 的磷酸化反应需要一定的活化能, 在低温下, 分子间碰撞频率降低, 仅有少量 PEP 能够参与磷酸化反应。但温度过高时, 磷酸根在反应体系中稳定性降低, 易从多糖中脱离, 从而导致 P-PEP 的磷酸化取代度降低^[13]。当反应温度为 70 $^{\circ}C$ 时, P-PEP 的磷酸根取代度最大, 为 11.23%。

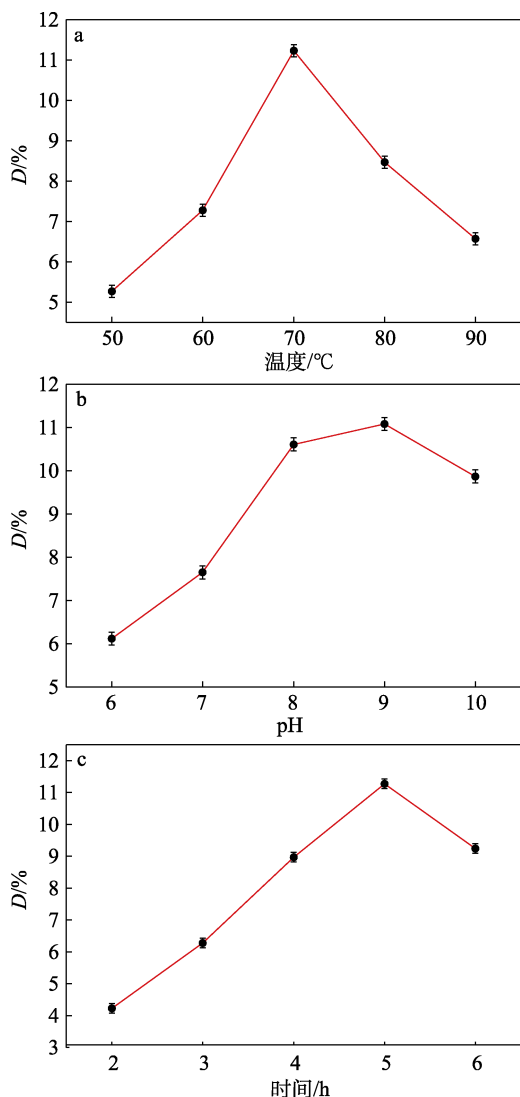


图 2 反应温度 (a)、体系 pH (b) 和反应时间 (c) 对 P-PEP 的磷酸根取代度的影响
Fig. 2 Effects of reaction temperature (a), pH of system (b) and reaction time (c) on substitution degree of phosphate

从图 2b 可以看出,随着体系 pH 的增大, P-PEP 的磷酸根取代度也呈先增加后减小的趋势。这是因为, PEP 磷酸化效率通常与 H⁺浓度密切相关,在适当 pH 范围内, H⁺可以促进磷酸化反应进行。pH 过低时, H⁺浓度过高, PEP 上的羟基被质子化,导致反应活性降低,磷酸根取代度降低; pH 过高时, H⁺浓度降低,导致反应速率降低^[10]。当体系 pH=9 时, P-PEP 的磷酸根取代度最大,为 11.08%。

从图 2c 可以看出,随着反应时间的延长, P-PEP 的磷酸根取代度先增加后减小。这是因为,反应时间延长可使 PEP 与磷酸根充分接触,从而促进反应进行,但长时间处在高温、酸性条件下, PEP 易发生水解,导致 P-PEP 的磷酸根取代度降低^[14]。当反应时间为 5 h 时, P-PEP 的磷酸根取代度最大,为 11.27%。

综合单因素实验结果,较佳的反应条件为:反应温度 70 °C、体系 pH=9、反应时间 5 h。

2.3 响应面实验结果分析

2.3.1 响应面分析

采用 Design expert 13.0 软件对表 2 中的数据进行二项式拟合,并对模型进行方差分析,得到二项式拟合方程为 $D=11.310+0.587A-0.056B+0.131C+0.210AB-0.120AC-0.152BC-1.560A^2-0.616B^2-1.040C^2$ ($P<0.0002$, $R^2=0.9664$)。

表 2 响应面实验编码值与实际值对照
Table 2 Comparison of coding values and actual values of response surface

序号	编码值			实际值			D/%
	A	B	C	反应温度/°C	pH	反应时间/h	
1	0	0	0	70	9	5	11.23
2	0	1	1	70	10	6	9.45
3	1	0	-1	80	9	4	8.89
4	1	1	0	80	10	5	10.15
5	1	0	1	80	9	6	9.17
6	0	0	0	70	9	5	11.34
7	-1	0	-1	60	9	4	8.02
8	0	0	0	70	9	5	11.29
9	0	-1	1	70	8	6	9.87
10	0	1	-1	70	10	4	9.75
11	-1	0	1	60	9	6	8.78
12	-1	1	0	60	10	5	8.01
13	-1	-1	0	60	8	5	8.54
14	0	0	0	70	9	5	11.37
15	0	0	0	70	9	5	11.32
16	1	-1	0	80	8	5	9.84
17	0	-1	-1	70	8	4	9.56

2.3.2 方差分析

表 3 为方差分析 (ANOVA) 结果。

表 3 回归模型方差分析
Table 3 Regression model analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	21.21	9	2.36	22.35	0.0002	**
A 反应温度	2.76	1	2.76	26.19	0.0014	*
B pH	0.03	1	0.03	0.24	0.6391	
C 反应时间	0.14	1	0.14	1.31	0.2905	
AB	0.18	1	0.18	1.67	0.2369	
AC	0.06	1	0.06	0.55	0.4839	
BC	0.09	1	0.09	0.88	0.3789	
A ²	10.23	1	10.23	97.03	<0.0001	**
B ²	1.60	1	1.60	15.17	0.0059	**
C ²	4.52	1	4.52	42.88	0.0003	**
残差	0.74	7	0.11			
失拟误差	0.73	3	0.24	84.99	0.0624	○
纯误差	0.01	4	0			
总误差	21.95	16				

注: “**” 表示差异极显著 ($P<0.01$); “*” 表示差异显著 ($P<0.05$); “○” 表示差异不显著 ($P>0.05$)。

从表 3 可以看出, 模型 F 值为 22.35, P 值为 0.0002, $P < 0.01$, 差异极显著; 失拟误差项 P 值为 0.0624, 表明该模型有效, 并且误差较小; 模型相关系数 (R^2) = 0.9664, 说明该模型 96.64% 的数据可以用回归模型解释; R_{Adj}^2 为 0.9231, 说明预测值与实测值具有 92.31% 的相关性, 表明模型的拟合度较高^[15]; 模型变异系数 (CV) 为 3.31, 表明该模型有充足的信号来响应。

2.3.3 响应面分析与验证实验

图 3 为响应值与不同因素的响应面曲线图, 图 4 为不同因素对 P-PEP 的磷酸根取代度影响的等高线图。

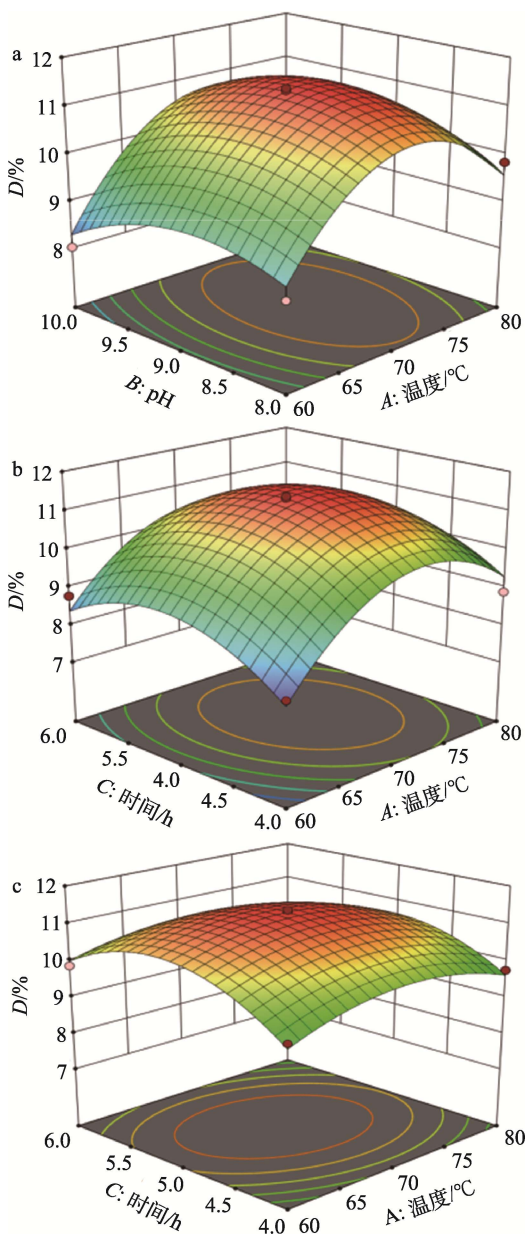


图 3 不同因素对磷酸根取代度影响的响应面曲线图
Fig. 3 Response curves of effects of different factors on substitution degree of phosphate

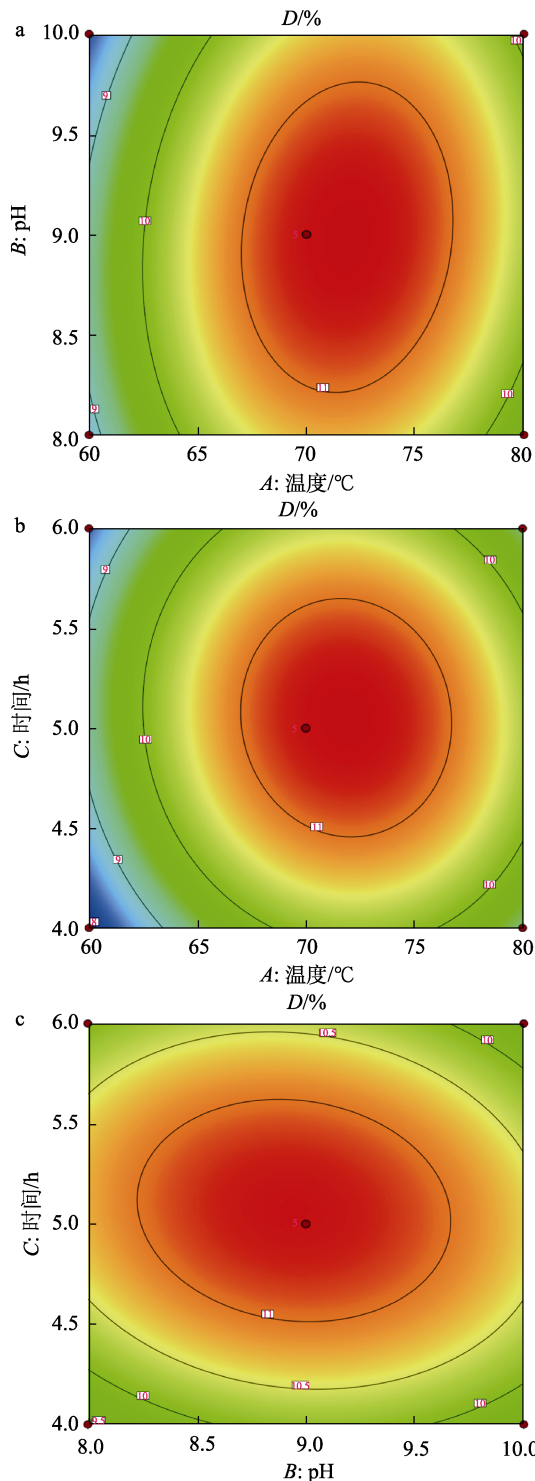


图 4 不同因素对 P-PEP 磷酸根取代度影响的等高线图
Fig. 4 Contour plots of effects of different factors on substitution degree of phosphate

从图 3 可以看出, 不同因素交互作用曲线图均呈现开口朝下的凸面, 表明 P-PEP 的磷酸根取代度存在一个极大值^[16]。结合图 4, 不同因素对 P-PEP 的磷酸根取代度的影响顺序由大到小顺序为: 反应温度 (A) > 反应时间 (C) > 体系 pH (B)。响应面图得到优化条件为: 反应温度 71.848 °C、pH=8.978、

反应时间 5.054 h, 模型预测 P-PEP 的磷酸根取代度为 11.368%。为方便后续实验操作, 对优化后的实验条件调整为: 反应温度 72 °C、pH=9、反应时间 5.1 h, 在此条件下重复 3 次实验验证, P-PEP 的磷酸根取代度算数平均值为 11.37%。与预测值之间的偏差为 0.004%, 实验结果与预测值接近, 说明该模型可靠, 该优化条件是可行的。

2.4 理化性质及结构分析

2.4.1 M_w 分析

图 5 为 PEP 和 P-PEP 的 HPGPC 谱图。

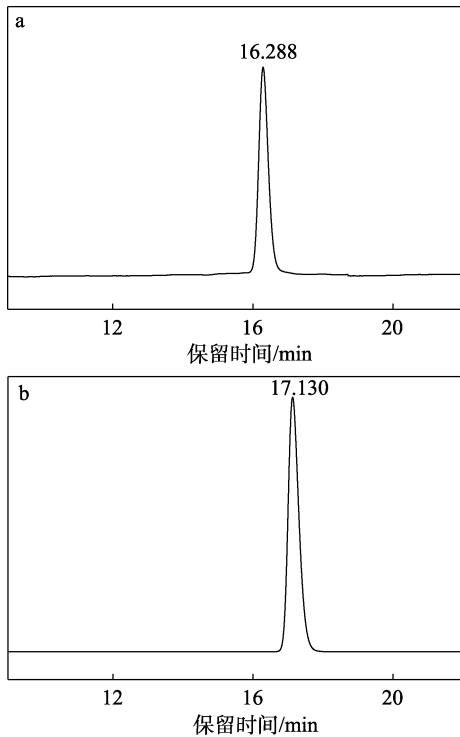


图 5 PEP (a) 和 P-PEP (b) 的 HPGPC 谱图
Fig. 5 HPGPC chromatograms of PEP (a) and P-PEP (b)

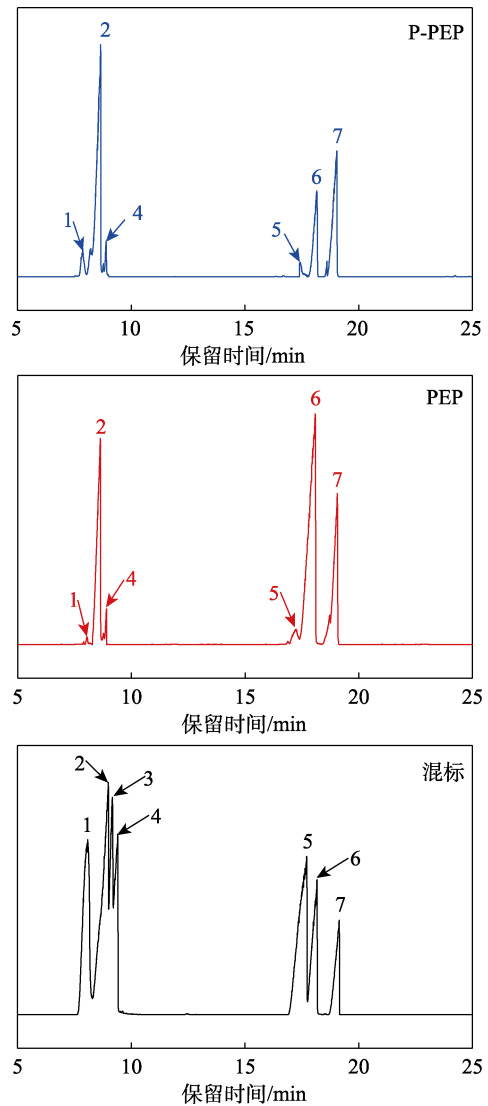
多糖的均一性、相对分子质量均会影响多糖在水溶液中的溶解性, 进而影响其生物活性。从图 5 可以看出, PEP (图 5a)、P-PEP (图 5b) 有且仅有 1 个峰, 证明两种多糖的相对分子质量相对集中且均一。与已知相对分子质量蓝色葡聚糖标准品对照, PEP、P-PEP 的 M_w 分别为 20898 和 21432 Da。P-PEP 的 M_w 增大可能归因于引入的磷酸基团相对分子质量较大, 其促使多糖中糖链之间交联或在溶液中形成聚合物^[17]。这也间接证实了 PEP 的磷酸化修饰成功。

2.4.2 单糖组成分析

图 6 为 PEP、P-PEP 和单糖混标的 GC 谱图。

从图 6 可以看出, PEP、P-PEP 主要是由 Rha、Ara、Gal 和 Glu 组成, 并且两种多糖均含有少量的

Fuc 和 Xyl。与 PEP 相比, P-PEP 的单糖组成未发生变化, 但 Fuc、Rha、Glu 单糖的相对含量增大, 而 Ara、Xyl、Gal 的相对含量则表现出一定程度的下降, 这表明, PEP 的磷酸化修饰主要发生在侧链而未发生在主链, 并且侧链中主要是由 Ara、Xyl、Gal 3 种单糖组成。值得注意的是, P-PEP 中 Rha 的相对含量 (42.31%) 比 PEP 中 Rha 相对含量 (28.04%) 显著增大, 这是因为, 具有还原性的 Rha 可以增强多糖的整合能力, 这可能会导致 P-PEP 体外抗氧化活性强于 PEP^[18]。



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

图 6 PEP、P-PEP 及混标的 GC 谱图

Fig. 6 GC spectra of PEP, P-PEP and mixture of standard samples

2.4.3 UV 吸收光谱分析

图 7 为 PEP 和 P-PEP 的 UV 吸收光谱。

从图 7 可以看出, P-PEP 相比于 PEP 在 224 nm 处有明显吸收峰, 这可能是由于磷酸基团带有 3

个负电荷, 在形成不饱和化学键的电子发生 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁引起的^[19]。在 280 nm 处, PEP 和 P-PEP 均有一定的弱吸收峰, 说明两者均含有少量的游离蛋白。值得注意的是, PEP 经磷酸化修饰后吸光度减弱, 这可能是多糖中羟基基团被磷酸根基团取代, 影响了电子的共轭效应, 从而导致整体吸光度降低^[10]。这也间接表明, PEP 的磷酸化修饰成功。

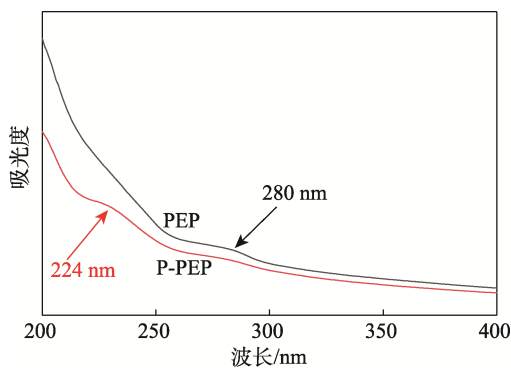


图 7 PEP 和 P-PEP 的 UV 光谱
Fig. 7 UV spectra of PEP and P-PEP

2.4.4 XRD 分析

多糖晶体结构通常直接影响其生物相容性、降解性、药物释放特性等, 在制药、食品和生物领域应用至关重要^[20]。图 8 为 PEP 和 P-PEP 的 XRD 谱图。

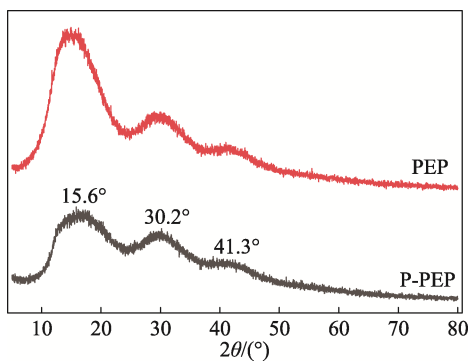


图 8 PEP 和 P-PEP 的 XRD 谱图
Fig. 8 XRD patterns of PEP and P-PEP

从图 8 可以看出, PEP 和 P-PEP 在 $2\theta=15.6^\circ$ 、 30.2° 、 41.3° 处均出现较宽的弥散衍射峰, 其为多糖的特征衍射峰, 而其他位置较为平坦, 表明 PEP 和 P-PEP 同时以结晶和非结晶形态存在。PEP 的衍射峰强度高于 P-PEP, 表明磷酸化修饰降低了多糖的结晶度。这可能是因为, 磷酸基团融入 PEP 糖链中, 导致原有的氢键发生断链, 分子间排序从有序状向无序状转变, 从而降低了 P-PEP 的结晶度^[16]。已有报道指出^[21], 多糖的溶解度、黏度等物理特性与其结晶度和无定形有着直接关系, 溶解度、黏度越优异, 其作为药物释放特性、生物相容性越好。

2.4.5 SEM 分析

图 9 为 PEP 和 P-PEP 的 SEM 图。

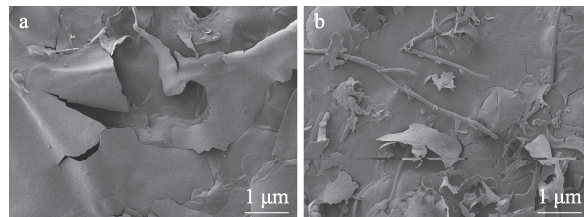


图 9 PEP (a) 和 P-PEP (b) 的 SEM 图
Fig. 9 SEM images of PEP (a) and P-PEP (b)

从图 9 可以看出, PEP 表面呈片状结构, 光滑平整(图 9a); P-PEP 表面平整, 有不规则的小球状、棒状结构, 以及大小、形状不同的碎片, 并且卷曲程度大(图 9b)。这可能是因为, 磷酸化修饰引入的磷酸基团作为一种极性基团, 会在 PEP 分子间产生新的相互作用力(如氢键、离子键等), 从而影响其糖链的排序方式, 导致原有的晶体结构发生变化^[13]。此外, 磷酸化修饰多糖会形成不同物理特性的聚集体, 其表面形貌展现出不同的形貌和尺寸(如小球状、棒状等), 并引发卷曲效应^[17]。

2.4.6 TGA 分析

图 10 为 PEP 和 P-PEP 的 TGA 测试结果。

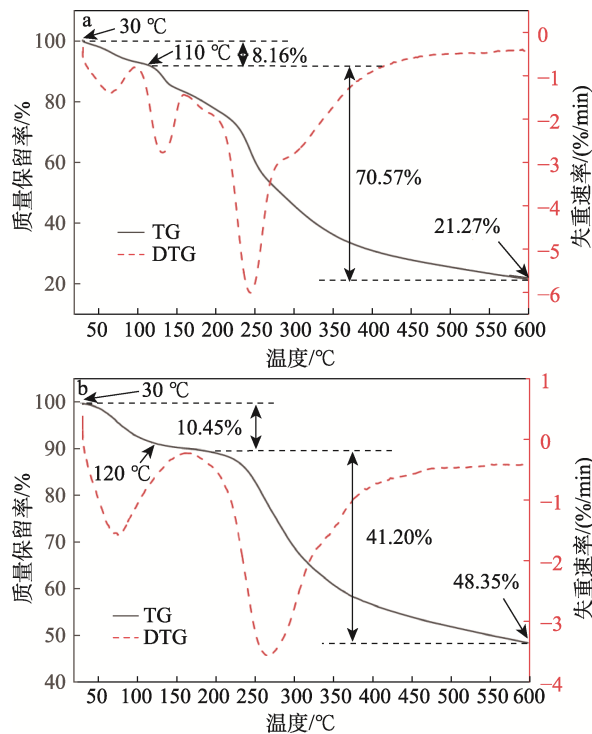


图 10 PEP (a) 和 P-PEP (b) 的 TG 和 DTG 曲线
Fig. 10 TG and DTG curves of PEP (a) and P-PEP (b)

从图 10 可以看出, 30~600 °C 内, PEP 和 P-PEP 均呈现出两步降解, 质量变化分为 3 个阶段。第一

个阶段在 30~120 °C, PEP 和 P-PEP 质量损失分别为 8.16%和 10.45%, 这一阶段主要是由于多糖中游离水、结晶水和有机挥发性物质快速蒸发引起的^[22]; 第二阶段主要发生在 110~450 °C, 其中, PEP 和 P-PEP 分别从 110 和 200 °C开始降解, 在这一阶段, PEP 和 P-PEP 失重速率较为明显, 其质量损失分别为 70.57%和 41.20%, 主要是由高温导致多糖热降解及多糖分子间糖苷键断链引起的^[23]。结果表明, P-PEP 糖苷键更加稳定, 热稳定性更优异。随后, 多糖降解逐渐转变为炭化过程, 多糖分解为灰分和无机成分, 600 °C时, PEP 和 P-PEP 的最终残炭率分别为 21.27%和 48.35%。

2.4.7 FTIR 分析

图 11 为 PEP 和 P-PEP 的 FTIR 谱图。

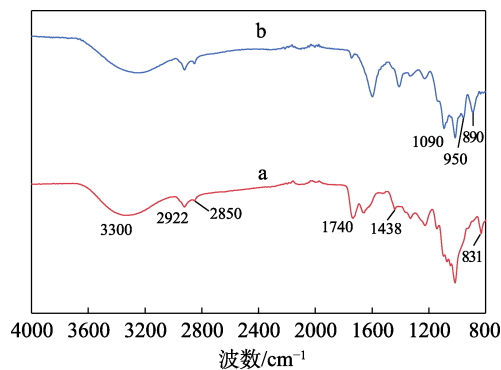


图 11 PEP (a) 和 P-PEP (b) 的 FTIR 谱图
Fig. 11 FTIR spectra of PEP (a) and P-PEP (b)

从图 11 可以看出, 3300 cm^{-1} 处的宽峰对应多糖羟基的伸缩和弯曲振动, 表明 PEP 和 P-PEP 均存在大量的羟基^[11]; 2922、1438 cm^{-1} 处的吸收峰分别对应于 C—H 的伸缩振动和弯曲振动; 2850 cm^{-1} 处的吸收峰对应于亚甲基的反对称伸缩振动^[24]; 1740 cm^{-1} 处的吸收峰表明, PEP 和 P-PEP 均为酸性多糖。同时, PEP 在 831 cm^{-1} 处的吸收峰表明, PEP 是以 β -糖苷键连接的吡喃糖为主, 兼有少量的 α -糖苷键连接的吡喃糖; P-PEP 在 890 cm^{-1} 处的吸收峰表明, P-PEP 是以 α -糖苷键连接的吡喃糖为主的多糖^[25]。与 PEP 相比, P-PEP 出现了新的吸收峰, 其中, 1090 cm^{-1} 处的吸收峰为 P=O 键的对称伸缩振动, 950 cm^{-1} 处的吸收峰为 P—O—C 键的伸缩振动^[10], 表明磷酸根成功被引入到 PEP 中, 证实磷酸化修饰成功。

2.4.8 NMR 分析

图 12 为 PEP 和 P-PEP 的 ¹HNMR、³¹PNMR 谱图。

从图 12a 可以看出, δ 4.70 为 D₂O 的氢质子信号峰^[24]; δ 4.54~5.33 归属于多糖异头氢质子信号, 在该范围内出现的异头氢表明, PEP 同时存在 α 、 β 构型的糖苷键, P-PEP 只存在 β 构型的糖苷键^[7]。

P-PEP 在 δ 5.70 处出现氢质子信号峰, 但 PEP 中此化学位移处没有氢质子信号峰, 表明 PEP 在此处发生了磷酸化^[10]。P-PEP 在 δ 3.72 处的羟基氢质子信号强度比 PEP 明显减弱, 表明 PEP 的羟基也参与了磷酸化反应^[19]。

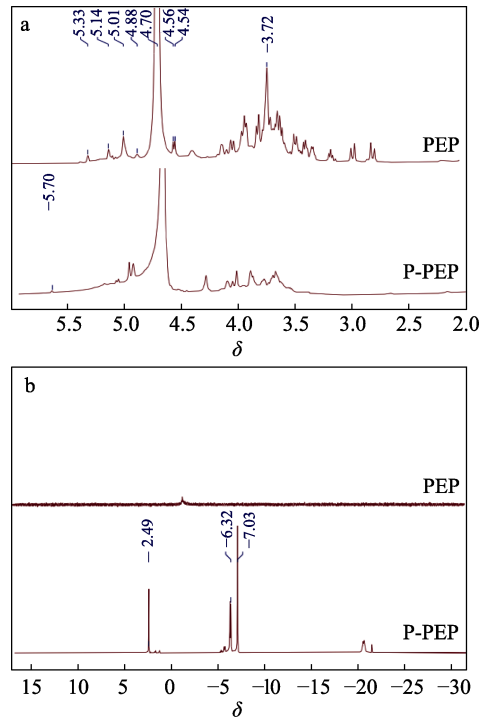


图 12 PEP 和 P-PEP 的 ¹H NMR (a) 和 ³¹P NMR (b) 谱图
Fig. 12 ¹H NMR (a) and ³¹P NMR (b) spectra of PEP and P-PEP

从图 12b 可以看出, 与 PEP 相比, P-PEP 在 δ -2.49、-6.32、-7.03 处存在 3 个强磷质子信号峰, 表明 P-PEP 糖环中有多个位置取代, 成为多取代多糖衍生物, 其中强度最高的为 δ -7.03, 说明该位置上的羟基最易被磷酸根基团取代。

2.5 生物活性分析

2.5.1 抗氧化能力分析

多糖能够清除活性氧自由基, 显著改善活性氧造成的损伤。DPPH、ABTS⁺常用来测定多糖的抗氧化能力, 其清除能力一般通过抑制率来反映, 抑制率越高, 抗氧化活性越强^[26]。图 13 为 PEP 和 P-PEP 对 DPPH 自由基、ABTS⁺自由基的清除能力测试结果。

从图 13 可以看出, 阳性对照 V_C 对 DPPH 自由基、ABTS⁺自由基的清除率显著高于 PEP 和 P-PEP。PEP 和 P-PEP 的 DPPH、ABTS⁺自由基清除率与质量浓度呈正相关。质量浓度 8.00 g/L 的 PEP 和 P-PEP 对 DPPH 自由基清除率分别为 75.39%和 85.92% (图 13a), IC₅₀ 分别为 0.93 和 0.60 g/L; 质量浓度 8.00 g/L 的 PEP 和 P-PEP 对 ABTS⁺自由基清

除率分别为 77.93% 和 84.25% (图 13b), IC_{50} 分别为 1.05 和 0.67 g/L。结果表明, 磷酸化修饰能够提升 PEP 对 DPPH 自由基和 ABTS⁺ 自由基的清除能力。这可能是因为, DPPH 自由基和 ABTS⁺ 自由基清除能力主要依赖抗氧化剂向自由基提供电子的能力, 而磷酸基团的引入改变了 PEP 的电子特性, 增强了其作为电子供体的能力^[27]。

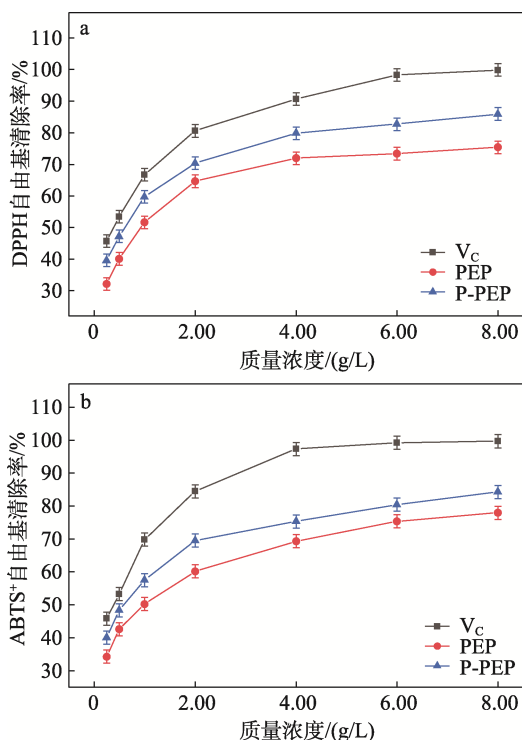


图 13 PEP 和 P-PEP 对 DPPH 自由基 (a)、ABTS⁺ 自由基 (b) 的清除率

Fig. 13 Scavenging rates of PEP and P-PEP on DPPH free radical (a) and ABTS⁺ free radical (b)

2.5.2 降血糖活性分析

餐后人体血糖水平的控制与碳水化合物的消化和吸收密切相关, α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的抑制作用可以导致葡萄糖的缓慢释放, 从而控制餐后血糖水平^[28]。图 14 为 PEP 和 P-PEP 对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的抑制作用测试结果。

从图 14 可以看出, PEP 和 P-PEP 对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的抑率与质量浓度呈正相关, 但均低于阳性对照阿卡波糖对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的抑制率。质量浓度 8.00 g/L 的 PEP 和 P-PEP 对 α -葡萄糖苷酶抑制率分别为 54.21% 和 66.38% (图 14a), IC_{50} 分别为 3.46 和 1.43 g/L; 质量浓度 8.00 g/L 的 PEP 和 P-PEP 对 α -淀粉酶抑制率分别为 55.61% 和 79.67% (图 14b), IC_{50} 分别为 3.81 和 0.49 g/L。结果表明, 磷酸化修饰能够显著提升 PEP 的降血糖活性, 这可能是因为, P-PEP 中的磷酸根与 α -葡萄

糖苷酶和 α -淀粉酶中的氨基酸残基相互作用更强, 导致部分酶失活, 从而达到降血糖目的^[29]。

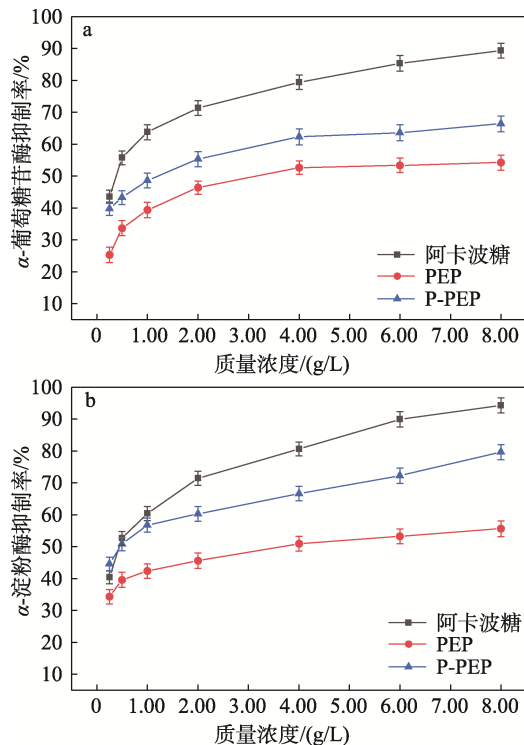


图 14 PEP 和 P-PEP 对 α -葡萄糖苷酶 (a)、 α -淀粉酶 (b) 的抑制率

Fig. 14 Inhibition rates of PEP and P-PEP on α -glucuronidase (a) and α -amylase (b)

3 结论

采用超声辅助法提取的鬼白果粗多糖经纤维素柱、凝胶色谱柱纯化后得到 PEP, 然后采用磷酸钠法制备磷修饰的 P-PEP, 并采用单因素实验和响应面设计对修饰工艺进行优化。

(1) P-PEP 的最佳制备工艺为: 反应温度 72 °C、体系 pH=9、反应时间 5.1 h, 在此条件下, P-PEP 的磷酸根取代度为 11.37%。

(2) PEP 和 P-PEP 均为主要由 Rha、Ara、Gal 和 Glu 4 种单糖组成的酸性杂多糖, 4 种单糖的相对含量显著不同。PEP 以 β -糖苷键连接的吡喃糖为主, 兼有少量的 α -糖苷键连接的吡喃糖; P-PEP 是 α -糖苷键连接的吡喃糖为主的多糖。

(3) P-PEP 的 M_w 从 PEP 的 20898 Da 增至 21432 Da。磷酸化修饰降低了 PEP 的结晶度, 并呈不规则的小球状和棒状结构, 同时提升了 PEP 的热稳定性, 600 °C 的 PEP 和 P-PEP 残炭率分别为 21.27% 和 48.35%。

(4) 磷酸化修饰显著提升了 PEP 的体外抗氧化及降血糖活性。PEP 和 P-PEP 对 DPPH 自由基的 IC_{50}

分别为 0.93 和 0.60 g/L, 对 ABTS⁺自由基的 IC₅₀ 分别为 1.05 和 0.67 g/L, 对 α -葡萄糖苷酶的 IC₅₀ 分别为 3.46 和 1.43 g/L, 对 α -淀粉酶的 IC₅₀ 分别为 3.81 和 0.49 g/L。

参考文献:

- [1] ZHENG X Y (郑秀云). The application effect of targeted nursing combined with Tibetan medicine 25 flavor Guijiu pill in the treatment of dysmenorrhea patients[J]. Journal of Medicine and Pharmacy of Chinese Minorities (中国民族医药杂志), 2024, 30(7): 76-78.
- [2] JIANG X M (蒋晓明). Studies of chemical fingerprints of Guijiu plants from Shennongjia[D]. Wuhan: Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences (中国科学院武汉植物园), 2015.
- [3] JIANG T, SUN L, WANG Y M, *et al.* Podophyllotoxin via SIRT1/PPAR/NF- κ B axis induced cardiac injury in rats based on the toxicological evidence chain (TEC) concept[J]. Phytomedicine, 2024, 130(42): 155655.
- [4] LIU H L, YU H Y, GAO R, *et al.* A zero-valent sulfur transporter helps podophyllotoxin uptake into bacterial cells in the presence of CTAB[J]. Antioxidants, 2024, 13(27): 1-17.
- [5] ZHANG N (张娜), LIU Y (刘扬), CHEN X Q (陈小强), *et al.* Research progress on chemically modified plant polysaccharides: Bioactivities and applications in the food industry[J]. Science and Technology of Food Industry (食品工业科技), 2024, 46(7): 375-384.
- [6] ZHOU M (周蒙), LUO P (罗鹏), MAO R B (毛若冰), *et al.* Study on the phosphorylation modification and antioxidant activity of polysaccharides from Ruoqiang grey jujube[J]. Cereals and Oils (粮食与油脂), 2023, 36(2): 68-72.
- [7] WANG J L (王俊龙), LIN Y G (蔺永刚), SHI W P (时文盼), *et al.* Extraction process, structural characterization and biological activity of polysaccharides from *Stropharia rugosoannulata*[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2025, 42(2): 388-401.
- [8] WANG Y X (王迎春), TANG Z W (唐子惟), PENG T (彭腾), *et al.* Optimization of phenol sulfuric acid method for the polysaccharide content of wine-steamed *Polygonatum cyrtonema* Hua[J]. Science and Technology of Food Industry (食品工业科技), 2021, 42(8): 308-316.
- [9] HE W, LIU J, SHEN J J, *et al.* Extraction of polysaccharides from shiitake mushroom based on pineapple enzymatic technology[J]. Journal of Physics, 2024, 12(8): 146-154.
- [10] XIA S L, ZHAI Y C, WANG X, *et al.* Phosphorylation of polysaccharides: A review on the synthesis and bioactivities[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 184(15): 946-954.
- [11] LI Y (李瑶), XIONG C M (熊彩明), ZHANG J L (张佳乐), *et al.* Preparation, structural characterization and biological activity of phosphorylated polysaccharide from *Undaria pinnatifida* Suringar[J]. Food Science (食品科学), 2024, 45(7): 35-42.
- [12] YANG T, ZHANG Y N, GUO L, *et al.* Antifreeze polysaccharides from wheat bran: The structural characterization and antifreeze mechanism[J]. Biomacromolecules, 2024, 25(7): 3877-3892.
- [13] BIAN P (边鹏), DU G (杜刚), CHAI Y Y (柴雨阳), *et al.* Physicochemical properties and antioxidant activity of carboxymethylated and phosphorylated *Lavandula* polysaccharides [J]. Fine Chemicals (精细化工), 2025, 42(2): 1286-1294. <https://doi.org/10.13550/j.jxhg.20240447>.
- [14] TIAN S Y, HAO C C, XU G K, *et al.* Optimization conditions for extracting polysaccharide from *Angelica sinensis* and its antioxidant activities[J]. Food Drug Anal, 2017, 25(4): 766-775.
- [15] YE D Y, JIANG Z B, ZHENG F C, *et al.* Optimized extraction of polysaccharides from *Grateloupia livida* (Harv.) Yamada and biological activities[J]. Molecules, 2015, 20(9): 16817-16832.
- [16] HU W J, YU A Q, WANG S, *et al.* Extraction, purification, structural characteristics, biological activities, and applications of the polysaccharides from *Zingiber officinale* Roscoe. (Ginger): A Review[J]. Molecules, 2023, 28(9): 1-22.
- [17] ZHU H B, XIE L M, ZHANG W D, *et al.* Extraction and properties of *Cyclocarya paliurus* leaf polysaccharide and its phosphorylated derivatives[J]. Industrial Crops and Products, 2024, 210(74): 562-574.
- [18] MA Y Q, XIU W Y, WANG X, *et al.* Structural characterization and *in vitro* antioxidant and hypoglycemic activities of degraded polysaccharides from sweet corn cob[J]. Journal of Cereal Science, 2022, 108(53): 176-184.
- [19] ZHANG X C (张心驰), HUI H P (惠和平), GUO D F (郭栋费), *et al.* Analysis on structure and hypoglycemic activity of Lanzhou lily polysaccharides from gradient alcoholic precipitation[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2023, 40(10): 2231-2240.
- [20] LIU H Y, CHEN B, LIU Y Y, *et al.* Application of polysaccharide materials in the prevention and treatment of oral diseases[J]. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2024, 45(13): 314-322.
- [21] CHEN X Y, JI H Y, ZHANG C F, *et al.* Optimization of extraction process from *Taraxacum officinale* polysaccharide and its purification, structural characterization, antioxidant and antitumor activity[J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2019, 14(1): 194-206.
- [22] ABUDUWAILI A, NUERXIATI R, MUTAILIFU P, *et al.* Isolation, structural modification, characterization, and bioactivity of polysaccharides from *Folium Isatidis*[J]. Industrial Crops and Products, 2022, 8(11): 278-285.
- [23] HOSEINIYAN BENVIDI S M, JAHANBIN K. A new water-soluble polysaccharide from *Echinops pungens* Trautv roots. Part I. Isolation, purification, characterization and antioxidant activity[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 161(34): 909-916.
- [24] PAN L C, ZHU Y M, ZHU Z Y, *et al.* Chemical structure and effects of antioxidation and against α -glucosidase of natural polysaccharide from *Glycyrrhiza inflata* Batalin[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 155(22): 560-571.
- [25] ABUDUWAILI A, MUTAILIFU P, NUERXIATI R, *et al.* Structure and biological activity of polysaccharides from *Nitraria sibirica* pall fruit[J]. Food Bioscience, 2021, 40(2): 87-95.
- [26] WANG L, ZHAO Z W, ZHAO H Q, *et al.* Pectin polysaccharide from *Flos Magnoliae* (Xin Yi, *Magnolia biondii* Pamp. flower buds): Hot-compressed water extraction, purification and partial structural characterization[J]. Food Hydrocolloids, 2022, 12(2): 294-302.
- [27] LI J C, CHEN Z X, SHI H M, *et al.* Ultrasound-assisted extraction and properties of polysaccharide from *Ginkgo biloba* leaves[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2023, 93(27): 106295.
- [28] JI X L, GUO J H, GAO T Z, *et al.* Review on mechanisms and structure-activity relationship of hypoglycemic effects of polysaccharides from natural resources[J]. Food Science and Human Wellness, 2023, 12(6): 1969-1980.
- [29] CHEN Y T (陈玥彤), ZHANG S S (张闪闪), LI W Y (李文意), *et al.* Structural characterization and hypoglycemic effect *in vitro* of phosphorylated *Auricularia auriculata* polysaccharide[J]. Food Science (食品科学), 2022, 43(8): 29-35.