中药现代化技术

黄芩多糖的磷酸化修饰及其体外降血糖活性

惠和平，凌 梅，吴海彦，陈 淋，谭思远，王学军*
（商洛学院 生物医药与食品工程学院，陕西 商洛 726000）

摘要：以黄芩多糖（SBP）为原料、磷酸根含量与体外降血糖活性的加权值（*Q*）为考察指标，通过单因素实验优选了 SBP 磷酸化的工艺参数，比较了磷酸化修饰前后黄芩多糖的理化特性和体外降血糖活性。结果表明，在 SBP 与磷酸化试剂物质的量比 1∶10、反应时间 2 h、反应温度 80 ℃的条件下，磷酸化黄芩多糖（SBP-P）的 *Q* 值最大，磷酸化修饰未影响 SBP 的基本结构，SBP-P 的磷酸根含量为 2.74%±0.07%，相对分子质量增至 4225615±56.69，粒径减至(307.87±63.06) nm，Zeta 电位的绝对值增至(16.63±1.37) mV，微观形貌从光滑的薄片状变为粗糙的块状堆积。在测试质量浓度范围内，SBP-P 的降血糖活性明显增强（p<0.05），且呈质量浓度依赖性。当质量浓度为 4 g/L 时，SBP 和 SBP-P 对 *α*-淀粉酶和 *α*-葡萄糖苷酶的抑制率分别为 65.13%、65.19%和 89.39%、90.29%，半抑制浓度（IC_{50}）分别为 0.676、0.654 g/L 和 0.085、0.080 g/L，SBP-P 的 IC_{50} 更接近于阳性对照阿卡波糖（0.021 和 0.042 g/L）。磷酸化修饰可能通过改变 SBP 的相对分子质量、粒径、Zeta 电位和微观结构等理化特性以增强其水溶性、分散性和稳定性，进而提升了其降血糖活性。

关键词：黄芩多糖；磷酸化修饰；理化特性；*α*-淀粉酶抑制活性；*α*-葡萄糖苷酶抑制活性；中药现代化技术
中图分类号：TS255.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1003-5214 (2025) 10-2190-08

Phosphorylation modification on polysaccharide from *Scutellaria baicalensis* Georgi and its *in vitro* hypoglycemic activity

HUI Heping, LING Mei, WU Haiyan, CHEN Lin, TAN Siyuan, WANG Xuejun*
（*College of Biology Pharmacy and Food Engineering, Shangluo University, Shangluo* 726000, *Shaanxi, China*）

Abstract: The *Scutellaria baicalensis* polysaccharide (SBP) phosphorylation parameters were optimized by single-factor experiments using the weighted value (*Q*) of phosphate content and *in vitro* hypoglycemic activity as evaluation index. The physicochemical properties and *in vitro* hypoglycemic activity of SBP before and after phosphorylation were then compared. The results showed that, under the conditions of molar ratio of SBP to phosphorylated reagent 1∶10, reaction time 2 h and reaction temperature 80 ℃, the phosphorylated *Scutellaria baicalensis* polysaccharide (SBP-P) exhibited the highest *Q* value, with the basic structure of SBP not affected, phosphate content of 2.74%±0.07%, relative molecular mass increased to 4225615±56.69, particle size decreased to (307.87±63.06) nm, the absolute value of Zeta potential increased to (16.63±1.37) mV, and the microstructure changed from smooth sheet to rough bulk. Within the tested mass concentration range, the SBP-P displayed significantly enhanced hypoglycemic activity (p<0.05) positively related to mass concentration. When the mass concentration was 4 g/L, SBP and SBP-P showed inhibition rate on *α*-amylase and *α*-glucosidase of 65.13%, 65.19% and 89.39%, 90.29%, respectively, and half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of 0.676, 0.654 g/L and 0.085, 0.080 g/L, respectively, with the IC_{50} of SBP-P closer to that of the positive control acarbose (0.021 and 0.042 g/L). Phosphorylation might enhance the water solubility, dispersibility and stability of SBP by changing its relative molecular mass,

收稿日期：2024-09-10; **定用日期：**2024-10-24; **DOI:** 10.13550/j.jxhg.20240693
基金项目：陕西省科技厅“十大商药”饮片加工关键技术“科学家+工程师”队伍项目（2023KXJ-180）；商洛学院博士启动基金项目（22SKY106）；商洛市科技局计划项目（2023-C-0004）；商洛大宗中药材规范化种植及品质提升重点研究室项目（SLPT2301）；陕西省教育厅一般专项项目（20JK0617）
作者简介：惠和平（1982—），男，副教授，E-mail：lzdxhui@163.com。**联系人：**王学军（1974—），男，教授，E-mail：xuejunwangd@163.com。

particle size, Zeta potential and microstructure, thus enhancing its hypoglycemic activity.

Key words: *Scutellaria baicalensis* polysaccharides; phosphorylation modification; physicochemical properties; *α*-amylase inhibitory activity; *α*-glucosidase inhibitory activity; modernization technology of traditional Chinese medicines

黄芩（*Scutellaria baicalensis* Georgi）为唇形科植物，黄芩的干燥根，具有清热润燥、泄火祛毒、止血、安胎之功效，中医临床常用于发热咳嗽、肺热烦躁、湿热泻痢、疮毒痈肿等症[1-3]。黄芩主要含有黄酮和多糖等成分，其中，黄芩多糖（SBP）因其良好的生物活性，如抗氧化、抗病毒、降血糖、抗炎等而备受关注[4-8]。但 SBP 结构较复杂，其活性受到分子结构的影响极大。通过结构修饰能够改变多糖的相对分子质量、取代基团类型和分子结构，从而影响多糖的生物活性[9]。目前，常用的结构修饰方法有磷酸化、乙酰化、硫酸化、硒化等[10-12]。其中，磷酸化修饰可使多糖的相对分子质量、粒径和微观结构等发生改变，从而增强多糖的多种生理活性[13-16]。例如：CHEN 等[17]研究发现，磷酸化修饰能够增加南瓜多糖的相对分子质量和体外抗氧化活性；陈玥彤等[18]研究表明，磷酸基团的引入能够使黑木耳多糖变为碎片状，水溶性提高，体外降糖活性提升；LIN 等[15]研究发现，磷酸化修饰后的川牛膝多糖相对分子质量降低，免疫活性提高；李艾莲等[19]研究显示，磷酸化增强了苹果渣多糖对巨噬细胞 RAW 264.7 的活力、吞噬能力和酸性磷酸酶活力。目前，关于 SBP 的磷酸化修饰以及活性研究鲜见报道。

磷酸化处理常采用的方法有酸酐法、三氯氧磷法、五氧化二磷法、磷酸盐法等[16,20-22]。酸酐法作为磷酸化试剂历史悠久，该法具有操作步骤简单、仪器通用、成本低等优点，但磷酸反应过程强烈，会产生大量热量，能导致多糖降解、目标产物收率降低，目前应用较少[23-24]。三氯氧磷法是一种合成高度取代磷酸化产物的方法，其反应时间短、操作简单，但该反应比较剧烈，副产物剧毒，反应中还会伴随着刺激性气体的产生[25-26]。五氧化二磷法是一种常用的磷酸化试剂，具有可接受的安全性。然而，五氧化二磷的低溶解度和多糖在强酸环境中易分解，限制了该法的应用[27-28]。磷酸盐法是一种较为温和的多糖磷酸化技术，常用的试剂有三聚磷酸钠和三偏磷酸钠及其混合物[29-30]。磷酸盐法在制备工艺上简单、安全，试剂价格低廉易获取，具有较高的经济效益，副产品和有害物质较少[16,31]，在工业生产中得到了广泛的应用。

本文拟以 SBP 为原料、三聚磷酸钠为磷酸化试剂、磷酸根含量与降血糖活性的加权值为考察指标，通过单因素实验优选 SBP 磷酸化的工艺条件，对比 SBP 磷酸化前后的理化特征和体外降血糖活性，为 SBP 衍生物的开发与利用提供理论依据。

1　实验部分

1.1　试剂与仪器

黄芩，购自陕西省商洛市夜村镇种植户，经商洛学院李筱玲副教授鉴定为黄芩（*Scutellaria baicalensis* Georgi）；HPD-600 型大孔树脂，AR，天津允开树脂科技有限公司；三羟甲基氨基甲烷，AR，国药集团化学试剂有限公司；三聚磷酸钠、抗坏血酸，AR，天津市大茂化学试剂厂；纤维素酶（5 万 U/g）、*α*-葡萄糖苷酶（7×10^5 U/mL），北京索莱宝科技有限公司；*α*-淀粉酶（猪胰腺，14 U/mg）、阿卡波糖、对硝基苯基-*β*-D-吡喃葡萄糖苷（PNPG），BR，上海源叶生物科技有限公司；葡萄糖标准品，GR，美国 sigma 公司；3,5-二硝基水杨酸（DNS），AR，上海麦克林生化科技股份有限公司；浓硫酸（质量分数 95%~98%），四川西陇科学有限公司；硫酸钠、钼酸铵、浓硝酸（质量分数 68%），AR，天津市科密欧化学试剂有限公司；苯酚、无水乙醇，AR，上海有朋化工有限公司；磷酸盐标准溶液参照 GB/T 5537—2008 配制；MD25 透析袋（截留相对分子质量 3500 Da），江苏麦格生物科技有限公司。

HY-5A 调速多用振荡器，鹤壁市华晨电子科技有限公司；X-8 紫外-可见分光光度计，河南文魁实业有限公司；LGJ-10D 冷冻干燥机，北京四环福瑞科仪科技发展有限公司；SpectraMax M2 多功能酶标仪，上海木森生物科技有限公司；BT-9300ST 纳米粒度及 Zeta 电位分析仪，丹东百特仪器有限公司；SEM3200 扫描电子显微镜，国仪量子技术有限公司；Nicolet 5700 傅里叶变换红外光谱仪，美国 Thermo Fisher Scientific 公司；1260 型超高效液相色谱仪系统，配 PL-aquagel-OH（300 mm×8 mm×8 μm）和 MIXED-M（300 mm×8 mm×8 μm）色谱柱，Optilab T-rEX RI 检测器（Wyatt technology，CA，USA），美国安捷伦公司。

1.2　方法

1.2.1　SBP 的制备

将 400 g 黄芩粉碎，过 10 目筛后加入 1200 g 体积分数 80%的乙醇回流脱脂 2 次（2 h/次），室温

下过滤，将药渣置于 50 ℃烘箱中烘干后备用。将 5 g 药渣按料液比（g∶mL）1∶25 加蒸馏水浸泡 30 min，添加质量分数 2.46%纤维素酶，在 43 ℃下超声处理 41 min，抽滤，减压浓缩至原体积的 1/5，加入 3 倍体积无水乙醇醇沉，静置 12 h，4000 r/min 离心 5 min，取沉淀在–60 ℃下冷冻干燥 24 h 后，溶解在 200 mL 蒸馏水中，加入 8 g HPD-600 型大孔树脂，在 38 ℃下振摇脱色 3 h，多层纱布过滤，取滤减压浓缩至原体积的 1/5，加入 3 倍体积无水乙醇醇沉，静置 12 h，4000 r/min 离心 5 min，将沉淀在–60 ℃下冷冻干燥 24 h，即得 SBP。

1.2.2 总糖含量的测定

1.2.2.1 标准曲线的制作

采用苯酚硫酸法[32]，精密称取葡萄糖标品 10 mg 定容于 10 mL 容量瓶中，分别吸取 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL 定容于 10 mL 容量瓶中，稀释成一系列质量浓度葡萄糖标品溶液。分别移取此系列质量浓度标品溶液 1 mL，依次加入质量分数 5%的苯酚溶液 1 mL、浓硫酸（质量分数 95%~98%）5 mL，混匀后，于 60 ℃水浴 10 min；然后，室温下采用紫外-可见分光光度计在 490 nm 波长下测定其吸光度。以吸光度（y）为纵坐标，标品质量浓度（x，g/L）为横坐标绘制标准曲线，得到的回归方程为 y=6.9806x–0.0043，R^2=0.9925。

1.2.2.2 样品中总糖含量的测定

分别精密称取 SBP 和 SBP-P 10 mg，加蒸馏水定容于 10 mL 容量瓶中。吸取 0.1 mL 置于具塞试管中，加蒸馏水至 1 mL，按照 1.2.2.1 节步骤操作后，采用紫外-可见分光光度计在 490 nm 波长下测定吸光度，代入回归方程分别计算 SBP 和 SBP-P 中总糖含量。

1.2.3 磷酸根含量的测定

1.2.3.1 标准曲线的制作

采用钼蓝比色法[30]，略作变动。分别取 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5 和 5.0 mL 不同质量浓度的磷酸盐标准溶液于 25 mL 比色管中，加入蒸馏水至 5 mL，接着加入 Tris 缓冲液和定磷试剂（等体积的质量分数为 20%的抗坏血酸、3 mol/L 的硫酸与质量分数为 3%的钼酸铵均匀混合）各 3 mL 混匀，置于 45 ℃恒温水浴锅中反应 10 min，待样品冷却后，采用紫外-可见分光光度计在 660 nm 波长下测定其吸光度，并以此为纵坐标（A），以磷酸根质量浓度（x，g/L）为横坐标，绘制标准曲线，得到回归方程为 A=56.84x+0.0266，R^2=0.9989。

1.2.3.2 磷酸根含量的测定

分别取 0.01 g SBP 和 SBP-P 置于烧杯中，加入 1 mL 浓硫酸和 1 mL 浓硝酸，缓慢加热至冒烟，待溶液冷却后，加入 1 mL 质量分数为 30%的 H_2O_2，并继续缓慢加热，重复进行直至烧杯内不再产生烟雾，溶液变为淡黄色。待溶液冷却后加入 1 mL 盐酸（6 mol/L），继续加热以确保酸完全分解，接着转移至 50 mL 容量瓶中定容。取 5 mL 按照 1.2.3.1 节步骤操作，采用紫外-可见分光光度计在 660 nm 波长下测定样品的吸光度，代入回归方程分别计算 SBP 和 SBP-P 中磷酸根含量。

1.2.4 蛋白含量的测定

参照文献[32]方法，采用考马氏亮蓝法测定。

1.2.5 SBP-P 制备的单因素实验

1.2.5.1 考察指标的设定

使用加权值法，以磷酸根含量（P）与体外 α-淀粉酶抑制率（E_1）和 α-葡萄糖苷酶抑制率（E_2）的加权值（Q）为考察指标，并分别对 P、E_1 和 E_2 进行赋值，分别从 9∶0.5∶0.5~1∶4.5∶4.5 调整比例，作图分析直至出现良好趋势，经调节赋值比例后发现，所有变化趋势基本一致。因此，采取折中 $5P$∶$2.5E_1$∶$2.5E_2$ 作为赋值比例，按照式（1）计算加权值（Q）以确定各因素的最佳实验条件。

$$Q=0.5P+0.25E_1+0.25E_2 \quad (1)$$

1.2.5.2 单因素实验条件的确定

设置 3 个因素，5 个实验水平，即 SBP 与磷酸化试剂物质的量比（1∶6、1∶8、1∶10、1∶12 和 1∶14）、反应温度（60、70、80、90 和 100 ℃）和反应时间（1、2、3、4 和 5 h），按照如下操作：取 0.1 g SBP，加入 6.5 mL 蒸馏水溶解，接着加入 25 mg 硫酸钠，混匀后分别加入 6、8、10、12、14 mL 的三聚磷酸钠水溶液（质量浓度 0.1 g/mL），用 0.1 mol/L 碳酸氢钠调 pH 到 7，置油浴锅中，分别于 60、70、80、90、100 ℃下反应 1、2、3、4、5 h 后取出冷却，用透析袋（相对分子质量 3500）透析除盐后，于–60 ℃下冷冻干燥 24 h，即得不同单因素实验水平下磷酸化修饰的黄芩多糖（SBP-P）。单因素实验除考察因素外的默认条件为：SBP 与磷酸化试剂物质的量比 1∶10、反应温度 80 ℃、反应时间 3 h、平行操作 3 次。取 SBP-P 按照 1.2.3 节方法测定磷酸根含量（P），依照 1.2.7 节方法分别测定 E_1 和 E_2，并根据式（1）计算 Q 以确定 SBP 与磷酸化试剂物质的量比、反应温度和反应时间的最佳实验条件。

1.2.6 理化特性的测定

总糖含量的测定：按照 1.2.2 节方法测定样品 SBP 和 SBP-P 中总糖的含量。磷酸根含量的测定：按照 1.2.3 节方法测定样品 SBP 和 SBP-P 中磷酸根的含量。FTIR 测定：将彻底干燥的 SBP 和 SBP-P 各 6 mg 与 KBr 充分混匀后压片，用傅里叶变换红

外光谱仪在波数 4000~400 cm^{-1} 扫描。粒径与 Zeta 电位的测定：取彻底干燥的 SBP 和 SBP-P 各 1 mg，加蒸馏水分别配制成质量浓度为 1 g/L 的溶液，25 ℃下，使用纳米粒度及 Zeta 电位仪进行粒径分布和 Zeta 电位测定，每个样品平行测定 3 次。SEM 测定：分别取适量的 SBP 和 SBP-P 均匀地黏贴于导电胶，吹去表面的浮粉，喷金处理后放入扫描电子显微镜观察样品的微观形貌特征。相对分子质量的测定：采用 GPC 法，取不同相对分子质量（180、2700、5250、9750、13050、36800、64650、135350）的右旋糖酐对照品，精密称定，加入蒸馏水配制成质量浓度为 1 g/L 右旋糖酐对照品溶液，使用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤备用；采用超高效液相色谱仪系统进行测试，流动相为重蒸水，流速 0.8 mL/min，柱温为 35 ℃；以右旋糖苷标准溶液标定色谱柱，得到不同重均相对分子质量右旋糖酐标准物质的保留时间，以示差信号值/标准右旋糖酐重均相对分子质量的对数（Y）为纵坐标，保留时间（t）为横坐标绘制曲线，得到回归方程为 $\lg Y=-0.3177t+12.91$（$R^2=0.995$）；称取样品 SBP 和 SBP-P，分别溶解于重蒸水中，制成质量浓度为 1 g/L 的多糖溶液，使用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤后上 GPC 分析，进样量 50 μL，将测得的保留时间代入线性回归方程计算样品 SBP 和 SBP-P 的相对分子质量。

1.2.7　体外降血糖活性测定

1.2.7.1　α-淀粉酶抑制活性实验

参照文献[33]略作修改，将样品 SBP 和 SBP-P 溶解在蒸馏水中，分别配制成质量浓度 4、2、1、0.50、0.25、0.125 g/L 的样品溶液。将 20 μL 不同质量浓度的样品溶液分别与 10 μL α-淀粉酶溶液（1 U/mL）均匀混合，于 37 ℃水浴保持 15 min，然后加入 500 μL 质量分数为 1%的淀粉溶液，于 37 ℃水浴保持 10 min，接着加入 600 μL 的 DNS 溶液，沸水浴孵育 15 min 后，加入 70 μL 蒸馏水终止反应。用酶标仪在 540 nm 波长下测定吸光度（A_1），以蒸馏水代替样品溶液作为空白对照（A_0），以蒸馏水替代 α-淀粉酶溶液作为背景对照（A_2），以阿卡波糖作为阳性对照，按式（2）计算 E_1：

$$E_1/\% = \left(1-\frac{A_1-A_2}{A_0}\right)\times 100 \qquad (2)$$

1.2.7.2　α-葡萄糖苷酶抑制活性实验

参照文献[34]略作改动，将样品 SBP 和 SBP-P 溶解在蒸馏水中，分别配制成质量浓度为 4、2、1、0.50、0.25、0.125 g/L 的样品溶液。将 20 μL 不同质量浓度的样品溶液分别与 40 μL 的 α-葡萄糖苷酶溶液（0.2 U/mL）混合均匀，于 37 ℃下避光孵育 20 min，依次加入 50 μL 的 PBS 溶液（0.2 mol/L，pH=6.9）、40 μL 的 PNPG 溶液（质量浓度为 0.25 g/L）于 37 ℃水浴保温 20 min 后，加入 140 μL 的 Na_2CO_3 溶液（2 mol/L）终止反应，用酶标仪在 405 nm 波长下测定吸光度（A_1'），以蒸馏水替代样品溶液作为实验的空白对照（A_0'），以蒸馏水替代 α-葡萄糖苷酶溶液背景对照（A_2'），以阿卡波糖为阳性对照，按式（3）计算 E_2：

$$E_2/\% = \left(1-\frac{A_1'-A_2'}{A_0'}\right)\times 100 \qquad (3)$$

1.2.8　数据处理

采用 SPSS 27.0 软件对实验数据进行方差及显著性分析，若 $p<0.05$ 则表示作用显著，用 Origin 2024 进行统计和作图分析。

2　结果与讨论

2.1　单因素实验分析

2.1.1　反应时间对磷酸根含量、体外降血糖活性及加权值的影响

反应时间对磷酸根含量、体外降血糖活性及加权值的影响结果如图 1 所示。

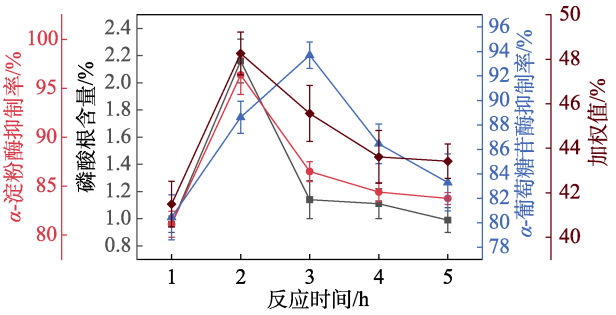


图 1　反应时间对磷酸根含量、体外降血糖活性及加权值的影响

Fig. 1　Effect of reaction time on content of phosphate, *in vitro* hypoglycemic activity and weighted value

由图 1 可知，随着反应时间的延长，SBP-P 中磷酸根含量、体外降血糖活性及加权值均先增加后降低。当反应时间为 2 h 时，SBP-P 中磷酸根含量、对 α-淀粉酶的抑制率和加权值均分别达到最大，为 2.16%、98%和 48.08%。在反应时间为 3 h 时，SBP-P 对 α-葡萄糖苷酶的抑制率达最大，为 94%。这可能是因为，多糖在较高温度下反应时间过长会导致多糖降解，磷酸化修饰机率降低[35]。因此，综合考虑选择反应时间 2 h。

2.1.2　反应温度对磷酸根含量、体外降血糖活性及加权值的影响

反应温度对磷酸根含量、体外降血糖活性及加权值的影响结果如图 2 所示。

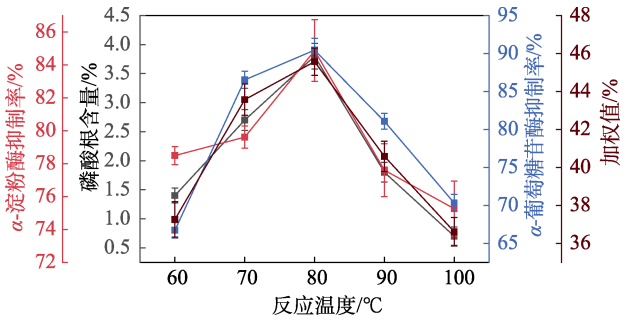


图 2　反应温度对磷酸根含量、体外降血糖活性及加权值的影响

Fig. 2　Effect of reaction temperature on content of phosphate, *in vitro* hypoglycemic activity and weighted value

由图 2 可知，随着温度的升高，SBP-P 中磷酸根含量、体外降血糖活性及加权值先增加后降低。当温度为 80 ℃时，SBP-P 中磷酸根含量、对 α-淀粉酶和 α-葡萄糖苷酶的抑制率以及加权值均达最大，分别为 3.80%、84%、90%和 45.40%。这可能是因为，温度升高，分子键的活泼性增强，磷酸化反应利用率随之增加。但温度过高会破坏多糖分子结构，使其降解凝聚呈絮状[16]，反而不利于磷酸化反应。因此，选择反应温度为 80 ℃。

2.1.3　SBP 与磷酸化试剂物质的量比对磷酸根含量、体外降血糖活性及加权值的影响

SBP 与磷酸化试剂物质的量比对磷酸根含量、体外降血糖活性及加权值的影响如图 3 所示。

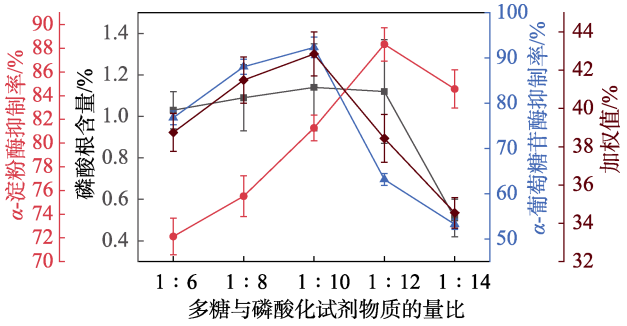


图 3　SBP 与磷酸化试剂物质的量比对磷酸根含量、体外降血糖活性及加权值的影响

Fig. 3　Effect of molar ratio of SBP to phosphorylating agent on content of phosphate, *in vitro* hypoglycemic activity and weighted value

由图 3 可知，SBP-P 中磷酸根含量先缓慢增加后迅速降低，对 α-淀粉酶和 α-葡萄糖苷酶的抑制率以及加权值呈先升后降的明显趋势。当 SBP 与磷酸化试剂物质的量比为 1∶10 时，磷酸根含量到达最大值（1.14%），对 α-葡萄糖苷酶的抑制率达到峰值（92%），加权值达最大值（43.82%）。但对 α-淀粉酶的抑制率在 SBP 与磷酸化试剂物质的量比 1∶12 时达峰值（88%）。可见，SBP-P 对 α-淀粉酶和 α-葡萄糖苷酶均具有良好的抑制能力，与其磷酸根含量成一定的正向相关，可能是磷酸基团的引入增强了多糖竞争底物与酶活性部位的结合，从而抑制了酶的活性[36]。从节约试剂和成本的角度考虑，多糖与磷酸化试剂物质的量比宜选择 1∶10。

结合 SBP-P 对磷酸根和体外抑制 α-淀粉酶与 α-葡萄糖苷酶的结果，SBP 的磷酸化修饰最佳工艺为：反应时间 2 h、反应温度 80 ℃、SBP 与磷酸化试剂物质的量比 1∶10。以此条件进行 3 组平行验证实验，其加权值分别为 50.25%、49.29%、49.62%，偏差为 0.006，在允许误差范围之内，说明此工艺稳定、可靠。

2.2　理化特性分析

2.2.1　总糖、蛋白、磷酸根含量及粒径与 Zeta 电位分析

SBP 和 SBP-P 的总糖、蛋白、磷酸根含量、粒径、Zeta 电位与相对分子质量见表 1。

表 1　SBP 和 SBP-P 的总糖、蛋白、磷酸根含量（质量分数，下同）、粒径、Zeta 电位与相对分子质量

Table 1　Total sugar, protein, and phosphate content, particle size, Zeta potential, and relative molecular mass of SBP and SBP-P

多糖样品	SBP	SBP-P
总糖质量分数/%	80.29±0.19^{a}	78.63±0.86^{a}
磷酸根质量分数/%	0±0.00^{b}	2.74±0.07^{a}
蛋白质量分数/%	1.56±0.16^{b}	0.98±0.08^{b}
粒径/nm	3654.69±144.77^{a}	307.87±63.06^{b}
Zeta 电位/mV	−11.32±1.07^{a}	−16.63±1.37^{b}
相对分子质量	312521±12.39^{a}	4225615±56.69^{b}

注：不同小写字母表示不同多糖组分间具有显著差异（p<0.05）。

由表 1 可知，SBP-P 中磷酸根含量为 2.74%±0.07%，基本不含蛋白，多糖的总糖含量略有降低（p>0.05），可能是在修饰过程中磷酸使得整个反应体系变成酸性，且放出大量热，导致 SBP 部分炭化和水解[27]。SBP-P 磷酸根含量明显比 SBP 增加，说明磷酸化修饰成功。

粒径是指物体的粒子或分子的直径大小，Zeta 电位是表征胶体分散系稳定性的重要指标，通常分子的粒径越小，Zeta 电位的绝对值越大，则表明该物质在溶液中分散性和溶解性越好，形成的溶液越稳定，否则该物质分子越容易发生聚集[21,27]。SBP 和 SBP-P 的粒径与 Zeta 电位结果如表 1 和图 4 所示。

由表 1 和图 4 可知，SBP-P 的粒径明显减小至 (307.87±63.06) nm，其在水中溶解性将更好，更易形成均匀稳定的溶液。SBP-P 的 Zeta 电位绝对值提

高至(16.63±1.37) mV，带有更多的电荷，这增加了颗粒间斥力，使颗粒在水溶液中分散更均匀，形成的体系更稳定[27]。因此，磷酸化修饰有助于提高 SBP 的溶解性、分散性和稳定性，从而更好地发挥其降血糖活性，这与海藻多糖磷酸化修饰的结果相似[37]。

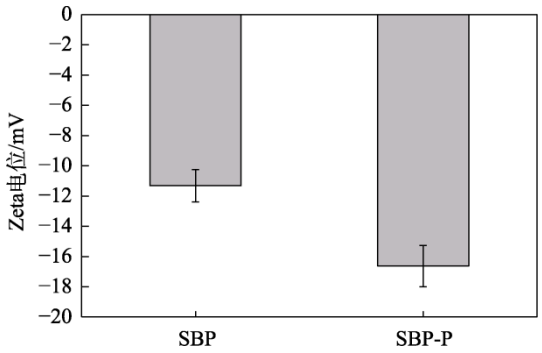


图 4　SBP 和 SBP-P 的 Zeta 电位

Fig. 4　Zeta potential of SBP and SBP-P

2.2.2　FTIR 分析

SBP 和 SBP-P 的 FTIR 谱图见图 5。

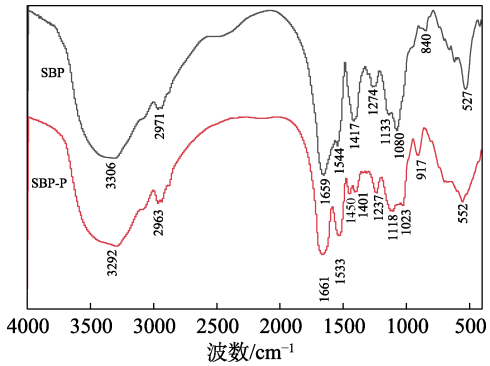


图 5　SBP 和 SBP-P 的 FTIR 谱图

Fig. 5　FTIR spectra of SBP and SBP-P

由图 5 可知，SBP 和 SBP-P 在 4000~400 cm^{-1} 均出现了相似的糖类特征吸收峰，3292 cm^{-1} 处为—OH 的伸缩振动吸收峰，2963 cm^{-1} 处为—CH_2—的伸缩振动吸收峰[2,18,22]，1661 cm^{-1} 处出现的吸收峰为结合水的伸缩振动，1401 cm^{-1} 处的吸收峰归属于 C—H 键的伸缩振动[12,27,34]。SBP-P 在 1533 cm^{-1} 处出现了强吸收峰，这是 P═O 键的特征峰[35-36]。同时，917 cm^{-1} 处为 P—O—C 键的伸缩振动吸收峰[20-21,27]，说明磷酸化修饰成功，这与磷酸根含量的测定结果一致。

2.2.3　SEM 分析

SBP 和 SBP-P 的 SEM 结果见图 6。

SBP 表面光滑呈薄片层状，外围卷曲呈叶状（图 6a），放大后，表面呈现较均匀的纹理，周边伸出枝丫状叶片（图 6b）。SBP-P 表面呈细小碎片状凌乱地堆叠（图 6c），放大后可见，表面粗糙，凹凸不平有褶皱（图 6d）。结果表明，磷酸化修饰改变了 SBP 的微观表面形态，可能与静电斥力增加、分子间作用力减弱有关[38]。凹凸不平且有沟壑的微观结构增加了 SBP 的比表面积，有助于提高其溶解性和分散性，与粒径和 Zeta 电位分析结果一致，也进一步证明，磷酸化修饰改变了 SBP 的理化特性，进而提升了其降血糖活性。这与广叶绣球菌多糖和黑木耳多糖的磷酸化修饰结果一致[18,38]。

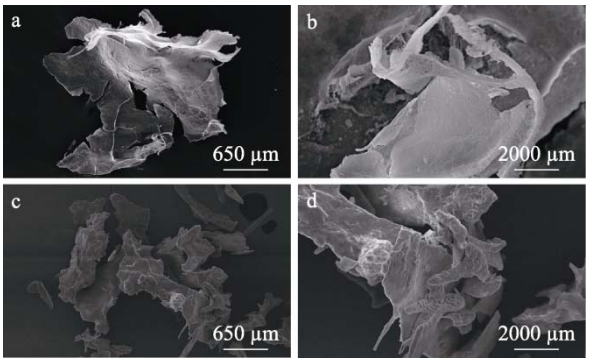


图 6　SBP（a、b）和 SBP-P（c、d）在不同放大倍数下的 SEM 图

Fig. 6　SEM images of SBP (a, b) and SBP-P (c, d) at different maganifications

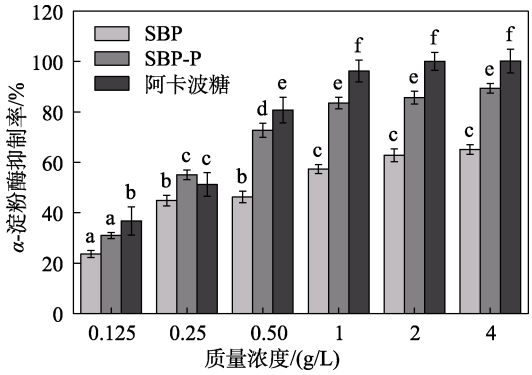
2.2.4　相对分子质量分析

经 GPC 法测定后，SBP 和 SBP-P 的保留时间分别为 23.34 和 19.78 min，代入回归方程中，得到 SBP 和 SBP-P 的相对分子质量分别为 312521±12.39 和 4225615±56.69。SBP-P 的相对分子质量明显增加，表明磷酸化修饰成功。李艾莲等[19]研究表明，磷酸化引入了一个点状磷酸基团，改变了多糖的相对分子质量和糖链的构象，进一步增加了其水溶性。

2.3　体外降血糖活性分析

2.3.1　*α*-淀粉酶抑制活性分析

SBP 和 SBP-P 对 *α*-淀粉酶抑制率见图 7。



不同字母表示各质量浓度间差异显著（p<0.05），下同

图 7　SBP 和 SBP-P 对 *α*-淀粉酶抑制率

Fig. 7　Inhibition rate of SBP and SBP-P on *α*-amylase

由图 7 可知，随着质量浓度的增加，SBP 和 SBP-P 对 α-淀粉酶抑制率先持续增大后趋于稳定。当质量浓度为 4 g/L 时，SBP 和 SBP-P 对 α-淀粉酶抑制率均达到最高，分别为 65.13%和 89.39%，半抑制浓度(IC_{50})分别为 0.676 和 0.085 g/L，且 SBP-P 对 α-淀粉酶的 IC_{50} 显著低于磷酸化修饰的广叶绣球菌多糖（质量浓度 0.90 g/L）[38]和黑木耳多糖（质量浓度 3.308 g/L）[18]，接近于阳性对照阿卡波糖的 IC_{50}（质量浓度 0.021 g/L）。在测定质量浓度范围内，SBP-P 对 α-淀粉酶抑制率明显强于 SBP 的抑制能力（p<0.05）。另外，在质量浓度 0.25 g/L 时，SBP-P 对 α-淀粉酶抑制率略高于阳性对照阿卡波糖（p>0.05）。可见，磷酸化修饰有助于提升 SBP 对 α-淀粉酶抑制率。α-淀粉酶能分解淀粉和糖原等物质成为较小的糖分子，经吸收入血后可导致餐后血糖水平急剧升高[8,16]。抑制 α-淀粉酶能够减缓淀粉的分解，延缓碳水化合物的吸收速率，有助于控制餐后血糖的升高。因此，SBP-P 更有潜力被作为餐后血糖的控制因子。

2.3.2　α-葡萄糖苷酶抑制活性分析

SBP 和 SBP-P 对 α-葡萄糖苷酶抑制率见图 8。

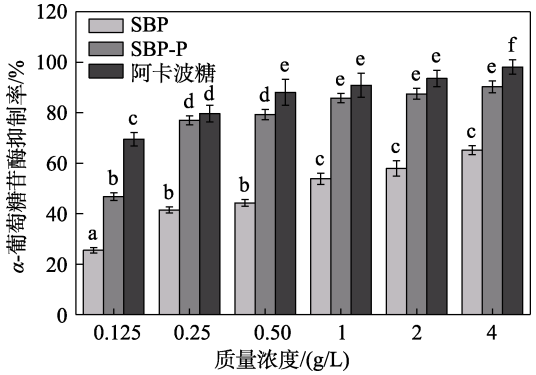


图 8　SBP 和 SBP-P 对 α-葡萄糖苷酶抑制率

Fig. 8　Inhibition rate of SBP and SBP-P on α-glucosidase

由图 8 可知，随着质量浓度的增加，SBP 和 SBP-P 对 α-葡萄糖苷酶抑制率逐渐增大。在质量浓度为 4 g/L 时，SBP 和 SBP-P 对 α-葡萄糖苷酶抑制率达到最高，分别为 65.19%和 90.29%，IC_{50} 分别为 0.654 和 0.080 g/L，而且 SBP-P 对 α-葡萄糖苷酶的 IC_{50} 明显低于磷酸化修饰的广叶绣球菌多糖（0.84 g/L）[38]和黑木耳多糖（10.66 g/L）[18]，相似于磷酸化裙带菜多糖（0.07 g/L）[36]，接近于阳性对照阿卡波糖的 IC_{50}（0.042 g/L）。在测试质量浓度范围内，SBP-P 对 α-葡萄糖苷酶抑制率显著强于 SBP（p<0.05）。磷酸化修饰明显提高了 SBP 对 α-葡萄糖苷酶抑制率，主要源于磷酸基团是强极性基团，可以增加多糖的亲水性，改变多糖的空间构象，使得多糖分子能够更好地与酶结合[9,19]；另外，磷酸基团通常带负电荷，能够使多糖与酶之间产生静电吸引，增加多糖与酶的亲和力[12,16]，进而提高抑制效果。α-葡萄糖苷酶是催化消化过程中碳水化合物释放葡萄糖的关键酶，抑制 α-葡萄糖苷酶可减慢碳水化合物分解成葡萄糖的速率，从而减少葡萄糖的吸收，有助于平缓餐后血糖的上升，同时可保护胰岛功能[27,34]。SBP-P 对 α-葡萄糖苷酶抑制率几乎接近于阳性对照阿卡波糖，结合其对 α-淀粉酶的抑制能力，SBP-P 有望作为餐后血糖调节因子的候选物被开发利用在食品、医药等领域。

3　结论

（1）结合磷酸根含量和体外降血糖活性的加权值，通过单因素实验成功优选出 SBP 的磷酸化修饰工艺：反应时间 2 h、反应温度 80 ℃、SBP 与磷酸化试剂物质的量比 1∶10。在此条件下在此条件下制得的 SBP-P 磷酸根含量为 2.74%±0.07%。

（2）SBP-P 的总糖含量稍有减小，但多糖的典型特征基本保留，相对分子质量增大、粒径减小、Zeta 电位的绝对值增大，微观形貌从光滑的薄片状变为粗糙的块状堆积，比表面积增加，水溶性提高，稳定性增强。

（3）SBP-P 体外降血糖活性显著增强，在测试质量浓度范围内（0.125~4 g/L），SBP-P 对 α-淀粉酶和 α-葡萄糖苷酶的抑制率明显高于 SBP，IC_{50} 分别从 0.676 和 0.654 g/L 降为 0.085 和 0.080 g/L，接近于阳性对照阿卡波糖的 IC_{50}（0.021 和 0.042 g/L）。

（4）磷酸化修饰可能主要通过改变 SBP 的相对分子质量、粒径、Zeta 电位和微观结构等理化特性以增强其水溶性、分散性和稳定性，进而提升 SBP 的降血糖活性。

（5）SBP-P 有潜力作为一种餐后血糖调节因子被开发利用在食品、医药等领域。但有关 SBP-P 的降血糖机制还需进一步研究，后期可通过细胞和动物实验进一步验证 SBP-P 的降血糖活性，并深入研究磷酸化修饰引起 SBP 内部化学结构，如糖苷键和序列等的变化，以阐明 SBP 的构效关系，为 SBP 衍生物的开发和利用提供更为丰富的参考依据。

参考文献：

[1] ZHAO T T, TAMG H L, XIE L, *et al*. *Scutellaria baicalensis Georgi*. (Lamiaceae): A review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology[J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2019, 71: 1353-1369.

[2] SUN L D, LIN F, SUN B B, *et al*. *Scutellaria* polysaccharide mediates the immunity and antioxidant capacity of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*)[J]. Developmental and Comparative Immunology, 2023, 143: 104678.

[3] National Pharmacopoeia Commission. Chinese Pharmacopoeia [2020 Edition] (Volume Ⅰ)[M]. Beijing: China Medical Science Press (中

国医药科技出版社), 2020: 1088.
[4] CUI L, WANG W, LUO Y, *et al*. Polysaccharide from *Scutellaria baicalensis Georgi* ameliorates colitis *via* suppressing NF-*κ*B signaling and NLRP3 inflammasome activation[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 132: 393-405.
[5] LUO Y Q (罗雅琴), HUANG W (黄伟). Progress in the research on the mechanism of action of *Scutellaria baicalensis* and its active ingredients in treating ulcerative colitis[J]. Shandong Science (山东科学), 2021, 269: 118329.
[6] ZHANG D G (张道广), KWANG J, PAN S L (潘胜利). Antiviral effect of polysaccharide from *Scutellaria baicalensis Georgi* on porcine respiratory and reproductive syndrome virus[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research (时珍国医国药), 2005, 9: 943-944.
[7] LIU M J (刘梦杰), WANG F (王飞), ZHANG Y (张燕), *et al*. Antioxidant activity *in vivo* of polysaccharides from *Scutellaria baicalensis Georgi*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology (中国食品学报), 2016, 16(7): 52-58.
[8] HUI H P, GAO W J. Structure characterization, antioxidant and hypoglycemic activity of an arabinogalactoglucan from *Scutellaria baicalensis Georgi*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 207: 346-357.
[9] LIU T B, REN Q Q, WANG S, *et al*. Chemical modification of polysaccharides: A review of synthetic approaches, biological activity and the structure-activity relationship[J]. Molecules, 2023, 28(16): 6073.
[10] ZHANG Z M (张子木), LUO K (罗凯), HUANG X F (黄秀芳). Research progress on modification of plant polysaccharides[J]. Shandong Chemical Industry (山东化工), 2021, 50(9): 77-79, 101.
[11] CHEN X X, SHEN M Y, YU Q, *et al*. Recent advance in chemistry modified methods of natural polysaccharides and their applications[J]. Trends in Food Science & Technology, 2024, 144(14): 104317.
[12] CHEN Y, ZHANG N, CHEN X Q. Structurally modified polysaccharides: Physicochemical properties, biological activities, structure-activity relationship, and applications[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(7): 3259-3276.
[13] XIA S, ZHAI Y, WANG X, *et al*. Phosphorylation of polysaccharides: A review on the synthesis and bioactivities[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 184: 946-954.
[14] HUO N L, AMEER K, WU Z G, *et al*. Preparation, characterization, structural analysis and antioxidant activity of phosphorylated polysaccharide from Sanchi (*Panax notoginseng*) flower[J]. Food Science and Technology, 2022, 59(12): 4603-4614.
[15] LIN L, YANG J, YANG Y, *et al*. Phosphorylation of *radix Cyathula officinalis* polysaccharide improves its immune-enhancing activity [J]. Journal of Carbohydrate Chemistry, 2020, 39(1): 50-62.
[16] YANG Y (杨艺), ZHAO Y (赵媛), SUN J L (孙记录), *et al*. Research progress on chemical modification methods of polysaccharides and their biological activity[J]. Science and Technology of Food Industry (食品工业科技), 2023, 44(11): 468-479.
[17] CHEN L, HUANG G L. Antioxidant activities of phosphorylated pumpkin polysaccharide[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 125: 256-261.
[18] 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.
[19] LI A L (李艾莲), CHEN X F (陈雪峰), CAI L Y (才露阳), *et al*. *In vitro* antioxidant and immunomodulatory activities of phosphorylated apple pomace polysaccharides[J]. Food Science and Technology (食品科技), 2023, 48(12): 197-204.
[20] CHEN F, HUANG G, YANG Z, *et al*. Antioxidant activity of *Momordica charantia* polysaccharide and its derivatives[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 138: 673-680.
[21] HU H, LI H, HAN M, *et al*. Chemical modification and antioxidant a ctivity of the polysaccharide from *Acanthopanax leucorrhizus*[J]. Carbohydrate Research, 2020, 487: 107890.
[22] XIE L M, SHEN M Y, WEN P W, *et al*. Preparation, characterization, antioxidant activity and protective effect against cellular oxidative stress of phosphorylated polysaccharide from *Cyclocarya paliurus*[J]. Food and Chemical Toxicology, 2020, 145: 111754.
[23] ZHANG C (张灿), DING Y (丁娅), YANG B (杨波), *et al*. Design, synthesis and characterization of *N*-methylenephosphate chitosan derivatives[J]. Chinese Journal of Natural Medicines (中国天然药物), 2004(2): 33-37.
[24] SUFLET D M, CHITANU G C, POPA V I. Phosphorylation of polysaccharides: New results on synthesis and characterization of phosphorylated cellulose[J]. Reactive & Functional Polymers, 2006, 66(11): 1240-1249.
[25] HU S, SONG L, PAN H F, *et al*. Thermal properties and combustion behaviors of flame retarded epoxy acrylate with a chitosan based flame retardant containing phosphorus and acrylate structure[J]. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, 2012, 97: 109-115.
[26] ZHANG X H (张雪红), LIU L N (刘利娜), LIN C W (林翠梧). Study on phosphorylation modification and immuno-competence of pectin[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods (粮油食品科技), 2017, 25(3): 65-69.
[27] ZHAO T, YANG M, MA L, *et al*. Structural modification and biological activity of polysaccharides[J]. Molecules, 2023, 28(14): 5416.
[28] LIU T, REN Q, WANG S, *et al*. Chemical modification of polysaccharides: A review of synthetic approaches, biological activity and the structure-activity relationship[J]. Molecules, 2023, 28(16): 6073.
[29] XIN L Y (辛灵莹). Study on phosphorylation and biological activity of extracellular polysaccharide from *Lactococcus lactis*[D]. Nanjing: Nanjing Normal University (南京师范大学), 2012.
[30] 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(67): 1286-1294.
[31] PENG Y, BAI X, XU H, *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.
[32] HUI H P, JIN H, LI X Z, *et al*. Purification, characterization and antioxidant activities of a polysaccharide from the roots of *Lilium davidii var. unicolor cotton*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 135: 1208-1216.
[33] 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.
[34] HUI H P, W X J, HE N W, *et al*. Process optimization and effect of different extraction methods on the characteristics and activities of *Herba Patriniae* polysaccharides: A correlation analysis[J]. Arabian Journal of Chemistry, 2024, 17: 105460.
[35] JIANG Z H (姜振浩), ZHU J X (朱建星), ZHANG W Z (张万忠). Optimization of phosphorylation of polysaccharides from chicory (*Cichoricum intybus var. foliosum Hegi*) by response surface method [J]. Science and Technology of Food Industry (食品工业科技), 2023, 44(24): 200-206.
[36] 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.
[37] ZHOU T, LI X Y. Chemically modified seaweed polysaccharides: Improved functional and biological properties and prospective in food applications[J]. Comprehensive Reviews Food Science and Food Safety, 2024, 23: e13396.
[38] CUI F M (崔芳铭), BI S Y (毕书瑜), HOU J Y (侯江燕), *et al*. Phosphorylation of *Sparassis latifolia* polysaccharides and their antioxidant and hypoglycemic activities *in vitro*[J]. Acta Edulis Fungi (食用菌学报), 2024, 31(3): 51-58.