

化学修饰对夏枯草多糖理化特征及生物活性的影响

李冬雪, 陈瑞战, 白鹤龙, 杨 翠, 吴文静, 王永堂, 宫铭泽

(长春师范大学 化学学院, 长春 130032)

摘要: 采用超声破碎提取夏枯草多糖(PVPs), 从中分离得到纯化多糖组分(PVP-2), 并比较 PVP-2 及其锌、硒、硫酸化、磷酸化修饰 PVP-2 衍生物(Zn-PVP-2, Se-PVP-2, S-PVP-2 和 P-PVP-2)的理化特征、抗氧化、降血糖和抑菌活性。结果表明: 与天然 PVP-2 相比, 衍生物的糖醛酸、总酚、总黄酮、硫酸基团、葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸的含量、水溶性、抗氧化、降血糖及抑菌活性均明显提高, 但相对分子质量和蛋白质含量降低。修饰导致 PVPs 的中性侧链降解, 并明显改变了单糖的物质的量比, 但未改变 PVP-2 的主链结构。P-PVP-2 的抗氧化活性和降血糖活性最高, Se-PVP-2 的抑菌活性最好, 表明化学修饰方法对 PVP-2 的修饰均有效, 化学修饰可提升 PVPs 在食品和医药工业中的应用潜力。

关键词: 夏枯草多糖; 修饰; 理化特征; 生物活性

中图分类号: O629 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-5489(2026)03-0691-16

Effects of Chemical Modification on Physicochemical Characteristics and Bioactivity of *Prunella vulgaris* Polysaccharide

LI Dongxue, CHEN Ruizhan, BAI Helong, YANG Cui,

WU Wenjing, WANG Yongtang, GONG Mingze

(College of Chemistry, Changchun Normal University, Changchun 130032, China)

Abstract: *Prunella vulgaris* polysaccharides (PVPs) were extracted by using ultrasonication extraction, and polysaccharide component (PVP-2) was isolated and purified from PVPs. Physicochemical characteristics, antioxidant, hypoglycemic and antibacterial activities of PVP-2 and derivatives (Zn-PVP-2, Se-PVP-2, S-PVP-2 and P-PVP-2) modified by zinc, selenium, sulfonation and phosphorylation were compared. The results show that compared with natural PVP-2, the contents of uronic acid, total phenol, total flavonoids, sulfuric acid group, glucuronic acid and galacturonic acid, water solubility, antioxidant, hypoglycemic and antibacterial activities of the derivatives are significantly increased, but the relative molecular weight and protein content are decreased. The modification leads to the degradation of the neutral side chains of PVPs, and significantly changes the molar ratio of monosaccharides, but does not change the backbone structure of PVP-2. P-PVP-2 has the highest antioxidant activity and hypoglycemic activity, and Se-PVP-2 has the best antibacterial activity, indicating that the chemical modification methods are effective in the modification of PVP-2.

收稿日期: 2025-02-28. 网络首发日期: 2025-04-02.

第一作者简介: 李冬雪(1999—), 女, 满族, 硕士研究生, 从事天然有机化合物的研究, E-mail: lidongxue5841@163.com. 通信

作者简介: 陈瑞战(1967—), 男, 汉族, 博士, 教授, 从事天然有机化合物的研究, E-mail: ruizhanchen@163.com.

基金项目: 吉林省自然科学基金(批准号: YDZJ202101ZYTS183).

网络首发地址: <https://link.cnki.net/urlid/22.1340.O.20250402.1433.004>.

and chemical modification can enhance the potential application of PVPs in the food and pharmaceutical industries.

Keywords: *Prunella vulgaris* polysaccharide; modification; physicochemical characteristics; bioactivity

多糖是一类天然大分子聚合物,广泛存在于动物、植物、海藻和微生物中,具有优异的药理活性,如抗氧化、降血糖、抗肿瘤、抗病毒、抗炎、免疫调节、抗菌、抗衰老和抗辐射等^[1]. 多糖以其来源丰富、毒性低、生产成本低、生物活性广、可再生和可生物降解等优点已引起人们广泛关注,在食品、医药、化妆品、包装、功能性食品、益生元和药物输送等领域^[2-3]应用广泛. 但并不是所有多糖都有上述特性,一些天然多糖常与蛋白质、多酚和黄酮类化合物等结合,且由于其相对分子质量(M_w)大、水溶性(WS)差和跨膜阻力大等特点,存在提取分离较困难和功能性质不理想等问题,从而限制了其在特定领域的吸收和利用. 因此,一些天然多糖需进行提取和修饰,以改变其理化特征,提高其生物活性,拓宽其应用潜力. 一些新的提取技术(如超声波、微波、酶、超高压、脉冲电场、亚临界水^[2]、超临界 CO_2 流体等^[4])在提高多糖提取效率的同时,也会在不同程度上改变多糖的理化性质,从而使提取的多糖具有更好的功能性. 研究表明,通过化学修饰(硫酸化、磷酸化、乙酰化、羧甲基化、硒化和锌修饰^[1]等)可为多糖的功能化提供更为有效的途径. 由于引入特定功能基团改变了多糖链的构象,改善了多糖的结构组成、 M_w 、配位方式、离子性质和电荷性质,暴露或增加了更多的活性基团,提高了多糖的 WS、生物利用度和生物活性^[3]. 因此,适当的化学修饰是改善多糖生物活性的理想途径.

夏枯草(*Prunella vulgaris* L., PVLs)为多年生草本植物,属于唇形科,广泛分布于亚洲、欧洲、非洲西北部和北美^[5]. PVLs 主要含有三萜、黄酮、多糖、有机酸和挥发油等活性成分^[6],具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、抗增殖活性、降血糖、抗病毒、抗菌和免疫调节等功效^[7],但目前对 PVLs 的研究文献报道较少.

夏枯草多糖(PVPs)作为一类天然高分子糖类化合物,具有抗氧化、抗炎、免疫调节、抗肿瘤及抗菌等多重功效. 如多糖能增强机体免疫反应,调节 T 细胞和 B 细胞活性,从而提升抗病能力;多糖可通过抑制癌细胞增殖和诱导细胞凋亡实现抗癌效果. 尽管夏枯草多糖具有多种生物学效应,但因其结构复杂、水溶性差、跨膜阻力大、活性不理想、生物利用度不高等因素,制约了该多糖的开发和应用. 因此,系统开展夏枯草果穗多糖的研究,比较不同修饰技术对其特征与活性的影响,有助于解释其活性与特征的相关性,为改善其功能性质和活性、提高其生物利用度及拓宽应用领域提供理论依据.

本文采用超声破碎提取(UCE)PVPs,从中分离得到纯化多糖组分(PVP-2),之后对其进行锌化(Zn-PVP-2)、硒化(Se-PVP-2)、硫酸化(S-PVP-2)和磷酸化(P-PVP-2)修饰,比较天然多糖组分及其衍生物的理化特征、功能性质、抗氧化、降血糖和体外抗菌活性,分析特征与活性的关系以及可能的作用机制,为进一步提高 PVPs 的生物学效能并拓展应用领域提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料和化学试剂

PVLs 购于安徽省某中药材市场,经长春师范大学李丽教授鉴定为 PVLs. 石油醚、无水乙醇、苯酚、DEAE-Sepharose CL-6B、葡聚糖凝胶 G-150、 $\text{Zn}(\text{Ac})_2$ 、 Na_2SeO_3 、浓 H_2SO_4 、正丁醇、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、三聚磷酸钠、三偏磷酸钠和吩嗪硫酸甲酯(PMS)购于山东西亚化学有限公司;还原性辅酶 I (NADH)购于安徽酷尔生物工程有限公司;1,1-二苯基-2-苦基肼(DPPH)、2,2'-联氨-双(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)二胺盐(ABTS)、氯化硝基四氮唑蓝(NBT)、阿卡波糖、 α -淀粉酶和 β -葡萄糖苷酶购于上海源叶生物科技有限公司;金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)购于上海博科生物技术有限公司;大肠杆菌(*Escherichia coli*)购于上海秦诚生物科技有限公司.

1.2 PVPs 制备

将干燥的 PVLs 粉碎,先用石油醚和乙醇回流 3 h,除去色素、脂质和小分子成分,再过滤、干燥,得到预处理样品. 预处理样品与水混合后,室温下浸泡 12 h,用超声波破碎机(SL-2010N 型,超威电

子有限公司)进行 UCE. 提取条件为:超声时间 35 min、温度 46 ℃、功率 200 W、水与 PVLs 的比例为 40 mL/g;将提取混合液离心、取上清液、减压浓缩后,用 4 倍体积乙醇在 4 ℃沉淀过夜,离心,保留沉淀,水溶解后用 Sevage 法去除蛋白质,蒸馏水透析,冻干得到 PVPs.

将 PVPs 溶液(0.1 g/mL)加入 DEAE-Sephrose CL-6B(26.8 mm × 188.7 mm)柱中,用 0~2 mol/L NaCl 溶液(流速 1 mL/min)洗脱,自动收集洗脱液(每管 5 mL),采用苯酚-硫酸法测定糖含量,并绘制吸光度与管数的洗脱曲线.合并主峰洗脱液(PVPs-2),采用 Sephadex G-150 凝胶柱(2.6 cm × 40 cm)进一步纯化,用水以流速 0.6 mL/min 洗脱,收集主峰洗脱液,浓缩、透析、冻干后即可得 PVP-2.

1.3 化学修饰

1.3.1 锌化修饰

将 30 mg PVP-2 与 10 mL H₂O 混合,加入 2 mL Zn(Ac)₂溶液(30 mg/mL, pH=4.0),于 50 ℃搅拌 10 min.用 0.5 mol/L NaOH 调节溶液的 pH=8,并在 50 ℃保持 24 h 后,用 0.5 mol/L HCl 调节溶液 pH=4.0.上清液用蒸馏水透析(截留 $M_w=3\ 500$)72 h,除去游离 Zn²⁺,收集截留液,浓缩、冻干,得到锌修饰 PVP-2(Zn-PVP-2).以 ZnSO₄为标准,用原子吸收光谱法测定 Zn-PVP-2 中的锌含量.

1.3.2 硒化修饰

将 30 mg PVP-2 溶于 7 mL HNO₃(体积分数 0.6%)中,于 25 ℃搅拌 0.5 h,加入 30 mg Na₂SeO₃,于 70 ℃反应 10 h,冷却至 25 ℃后,用 1 mol/L NaOH 中和至 pH=7.0,离心、收集上清液,用蒸馏水透析至加入抗坏血酸透析液不再产生红色为止,收集截留液,浓缩、冻干,即可得硒化 PVP-2(Se-PVP-2).Se-PVP-2 中的硒含量参考文献[8]测定.Se-PVP-2 中硒含量计算公式为

$$\rho = 1\ 000 \times [(\rho_1 - \rho_2) \times V] / m, \quad (1)$$

其中 ρ_1 和 ρ_2 分别为 Se-PVP-2 和空白溶液中硒的质量浓度, V 和 m 分别为总体积和测试 PVP-2 的质量.

1.3.3 硫酸化修饰

将 7.5 mL H₂SO₄(质量分数为 98.3%)、2.5 mL 正丁醇和 0.125 g (NH₄)₂SO₄在搅拌下混合,于 0 ℃反应 0.5 h,加入 30 mg PVP-2,在 0 ℃搅拌 1 h 后,用 1 mol/L NaOH 中和(pH=7),离心,上清液用蒸馏水透析(截留 $M_w=3\ 500$)24 h,冻干得到硫酸修饰 PVP-2(S-PVP-2).参考文献[9]方法,以 K₂SO₄为标准,利用下式计算 S-PVP-2 的取代度(DS):

$$DS = 1.62 \times w(S) / (32 - 1.02 \times w(S)), \quad (2)$$

其中 $w(S)$ 为硫酸盐的质量分数.

1.3.4 磷酸化修饰

将 30 mg PVP-2 与 10 mL 磷化剂(三聚磷酸钠 0.857 g+三偏磷酸钠 0.134 g)混合,用 1 mol/L NaHCO₃中和(pH=7),在 90 ℃反应 3 h,将混合溶液用体积分数为 95%的乙醇在 4 ℃沉淀 24 h 后,离心,将沉淀加适量水溶解,用蒸馏水透析 48 h,冻干后得到磷酸化 PVP-2(P-PVP-2).采用钼蓝比色法^[10]计算 P-PVP-2 的 DS,计算公式为

$$DS = 162 \times w(P) / (3\ 100 - 84 \times w(P)), \quad (3)$$

其中 $w(P)$ 为磷酸基团含量,162 为单糖残基的 M_w ,3 100 为 100 倍磷的相对原子质量,84 为取代基的摩尔质量.

1.4 化学成分分析

采用苯酚-硫酸法(以葡萄糖(Glc)为标准)、间羟基苯法(以葡萄糖醛酸(GlcA)为标准)、Bradford 法(以牛血清蛋白为参比)、氯化铝测定(以芦丁为标准)和比色法(以没食子酸为标准),分别测定多糖的中性糖(NSC)、糖醛酸(UAC)、蛋白质(PC)、总黄酮(TFC)和总酚(TPC)的含量.

1.5 理化特征分析

1.5.1 均一性、相对分子质量及单糖组成测定

参考文献[11]的高效凝胶色谱(HPGPC)和高效液相色谱(HPLC)方法对 PVPs 的均一性、相对分

子质量及单糖组成进行测定.

将 5 mg PVPs 与 2 mL(2 mol/L) 三氟乙酸(TFA)混合,在 120 ℃水解 4 h,用甲醇反复洗涤和蒸发去除过量的 TFA. 将水解产物(或混合标准单糖)加入 0.2 mL NaOH (0.3 mol/L)和 0.2 mL 的 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP, 0.5 mol/L),在 70 ℃衍生 1 h. 冷却后,用 0.2 mL HCl (0.3 mol/L)中和所得溶液,用氯仿(1 mL)萃取 3 次,过 0.45 μm 滤膜. 使用 Vanquish Core HPLC 系统(Diode Array Detector CG 型,美国 Thermo Scientific 公司)对衍生物进行分析,该系统配备 Acclaim 120 C₁₈ (4.6 mm×250 mm);色谱条件为:检测波长 250 nm,柱温 30 ℃,进样量 10 μL,流速 1 mL/min,流动相为 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS, pH=6.86)和乙腈(体积比为 83 : 17).

1.5.2 紫外和红外光谱分析

使用紫外-分光光度计(Cary 4000 型,美国安捷伦公司)扫描 PVP-2,Zn-PVP-2,Se-PVP-2,S-PVP-2 和 P-PVP-2 在 200~400 nm 内的紫外光谱;使用 KBr 片剂法用 Fourier 变换红外光谱(FT-IR)仪(is50 型,美国 Thermo 公司)测量样品在 4 000~400 cm⁻¹的 FT-IR 光谱.

1.5.3 热重分析

采用 TG-7 热重分析仪(Perkin-Elmer TG-7 型,美国 Perkin Elmer 公司)对 PVP-2,Zn-PVP-2,Se-PVP-2,S-PVP-2 和 P-PVP-2 进行热重分析,升温速率为 10 ℃/min,N₂流速为 50 mL/min,温度为 25~800 ℃.

1.5.4 水溶性、保水性和保油性测定

参考文献[11]方法测定 PVPs 的水溶性(WS)、保水性(WHC)和保油性(OHC). 计算公式分别为

$$w(\text{WS}) = (1 - \frac{m_1}{m_0}) \times 100\%, \tag{4}$$

$$w(\text{WHC}) = \frac{m_1}{m_0} \times 100\%, \tag{5}$$

$$w(\text{OHC}) = \frac{m_2}{m_0} \times 100\%. \tag{6}$$

其中: m_0 为原始样品质量; m_1 为样品用水溶解后离心得到沉淀物的干质量; m_2 为样品用大豆油溶解后离心得到沉淀物的干质量.

1.6 抗氧化活性测定

使用 1,1-二苯基-2-苦基肼自由基(DPPH·)、2,2'-连氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸自由基(ABTS⁺·)、超氧阴离子自由基(O₂⁻)和羟基自由基(·OH)的清除率(SA, %)测定多糖抗氧化活性. 实验步骤参考文献[12], 4 种自由基 SA 的计算公式为

$$\text{SA} = [1 - (A_1 - A_2)/A_0] \times 100\%, \tag{7}$$

其中 A_0 , A_1 和 A_2 分别为实验试剂+溶剂混合物、PVPs+实验试剂和不含实验试剂的 PVPs 混合物的吸光度值.

1.7 降血糖活性测定

采用 α-淀粉酶和 α-葡萄糖苷酶的抑制活性测定 PVP-2,Zn-PVP-2,Se-PVP-2,S-PVP-2 和 P-PVP-2 的降血糖活性. 将 0.5 mL PVPs 溶液(0.4~2 mg/mL)与 0.5 mL α-淀粉酶溶液混合,在 37 ℃孵育 15 min 后,加入 0.5 mL 质量分数为 1%的淀粉溶液,在 37 ℃反应 10 min. 再向混合物中加入 1 mL 的 3,5-二硝基水杨酸(DNS)试剂,在 100 ℃加热 5 min,冷却至 25 ℃后加入 10 mL H₂O,在 540 nm 处测定吸光度,酶抑制活性(IA)计算公式为

$$\text{IA} = [1 - (B_1 - B_2)/B_0] \times 100\%, \tag{8}$$

其中 B_0 , B_1 , B_2 分别为不含 PVPs 的反应溶液、反应体系的混合溶液和不含酶体系的 PVPs 反应溶液的吸光度.

将 50 μL PVPs 溶液(0.4~2 mg/mL)加入 50 μL α-葡萄糖苷酶溶液中,在 37 ℃反应 10 min,再加入 100 μL 对硝基苯基吡喃葡萄糖苷(PNPG)溶液(5 mmol/mL),在 37 ℃反应 10 min,加入 100 μL Na₂CO₃(0.2 mol/mL),测定 540 nm 处的吸光度,用式(8)计算 α-葡萄糖苷酶的 IA.

1.8 抗菌活性测定

采用滤纸扩散法评估 PVPs 对金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)和大肠杆菌(*E. coli*)的抗菌活性(AA). 将 100 μL *S. aureus* 和 *E. coli*(浓度为 $1\times 10^5\sim 1\times 10^6$ CFU/mL, 其中 CFU 为菌落数)涂布于营养琼脂平板上, 在平板中央放置直径 6 mm、厚度 1 mm 的滤纸圆盘, 并将 30 μL PVPs 溶液(质量浓度为 1~10 mg/mL)滴加在滤纸上, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 48 h. 每个质量浓度的 PVPs 均进行 3 次重复实验. 通过测量滤纸圆盘周围的抑菌圈直径评估抗菌活性.

1.9 统计分析

使用 IBM SPSS Statistics 24.0 和 Origin Pro 2021(Origin Lab Co)软件进行统计分析, 结果表示为: 平均值 $\pm$ 标准差($n=3$). 两组之间的差异采用单因素方差分析(ANOVA)进行分析. $P<0.05$ 表示具有显著性差异.

2 结果与讨论

2.1 PVPs 的提取、分离与纯化

在单因素试验的基础上, 采用响应面法(RSM)对 UCE 的工艺参数进行优化, 得到 UCE 的最佳工艺参数为: 功率 199.58 W、时间 34.93 min、温度 46.17 $^{\circ}\text{C}$. 在该优化条件下, UCE 的 PVPs 提取率为 14.17%, 是热回流提取多糖(H-PVPs, 提取率为 3.51%)的 4.03 倍. 结果表明, 超声空化、剪切和热作用可破坏 PVLs 细胞壁, 促进 PVPs 溶解与传质, 从而提高了 PVPs 的提取率.

在最佳 UCE 条件下获得 PVPs, 再经 DEAE-Sepharose CL-6B(26.8 mm $\times$ 188.7 mm)柱分离, 用 0~2 mol/L NaCl 进行洗脱, 得到 4 个主要洗脱峰(分别命名为 PVPs-1,PVPs-2,PVPs-3 和 PVPs-4). 收集糖含量和提取率最高的 PVPs-2 组分, 经透析、浓缩、冻干, 再用 Sephadex G-150 凝胶柱(2.6 cm $\times$ 40 cm)进一步纯化, 用 H_2O 洗脱, 得到均一组分 PVP-2, 提取率为 52.91%. 可见本文方法是一种高效的提取、分离和纯化方法.

2.2 理化特征及功能性质

2.2.1 修饰 PVP-2 的 DS 和化学成分

取代度(DS)是衡量多糖链中羟基被各种基团(如硫酸基团和磷酸基团等)取代程度的指标, 是影响修饰多糖结构和生物活性的关键因素之一. S-PVP-2 和 P-PVP-2 的 DS 分别为 0.49 和 0.35, 表明经硫酸化和磷酸化后, PVP-2 部分链上的羟基已成功被硫酸基团和磷酸基团取代, 其中硫酸基团或磷酸基团与 PVP-2 侧链中的碳原子以共价键结合形成 S-PVP-2 或 P-PVP-2, 连接方式如图 1 所示. 随着引入这些基团, PVP-2 链的电荷密度增加, 糖链的构象也随之发生改变, 从而导致其功能性质发生改变. PVP-2 经硒和锌修饰后, 用蒸馏水透析除去自由离子, 修饰产物中硒和锌的质量比分别为 $(330.11\pm 29.15)\mu\text{g/g}$ 和 $(184.85\pm 15.34)\mu\text{g/g}$, 表明 Se 和 Zn 以 C—O—Se, Se—O 和 Se=O 共价键及 Zn—O 配位键成功引入多糖链, 连接方式如图 1 所示. 研究表明, 硒化修饰可诱导多糖分子发生交联, 形成交联网络, 从而改变多糖的空间结构、分子间相互作用、稳定性、WS、电荷、反应性、构象、 M_w 和生物活性^[13], 锌修饰可改变多糖的表面结构, 使其分子结构变松散.

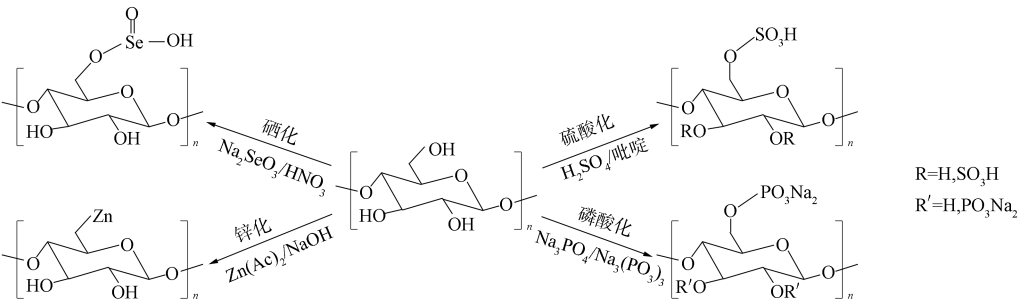


图 1 PVP-2 的不同修饰反应

Fig. 1 Different modification reactions of PVP-2

2.2.2 化学成分

PVP-2 及其修饰产物的化学成分统计结果列于表 1, 其中 NSC 为中性糖质量分数, PC 为蛋白质质量分数, UAC 为糖醛酸质量分数, TPC 为总酚质量分数, TFC 为总黄酮质量分数, SGC 为硫酸根质量分数, M_w 为平均相对分子质量, WS 为水溶性, WHC 为持水性, OHC 为持油性, DS 为取代度, ND 为未检出. 由表 1 可见, PVP-2, Zn-PVP-2, Se-PVP-2, S-PVP-2 和 P-PVP-2 的 NSC 分别为 $(53.67\pm3.97)\%$, $(46.45\pm3.95)\%$, $(42.03\pm2.94)\%$, $(46.94\pm2.89)\%$ 和 $(40.53\pm3.98)\%$, 表明所有衍生物均显著低于 PVP-2 的 NSC ($P<0.05$), 这可能是由于修饰引起天然多糖侧链中的中性糖水解所致, 但 4 种修饰方法导致 NSC 降低的程度不同. 通常在化学修饰过程中, 随着新功能基团引入的增加, NSC 逐渐降低, 降低的程度与修饰方法和条件密切相关.

表 1 不同修饰方法对 PVP-2 物理化学特性和功能性能的影响

Table 1 Effects of different modification methods on physicochemical characteristics and functional performance of PVP-2

样品	PVP-2	Zn-PVP-2	Se-PVP-2	S-PVP-2	P-PVP-2
$w(\text{NSC})/\%$	53.67 ± 3.97^a	46.45 ± 3.95^b	42.03 ± 2.94^b	46.94 ± 2.89^{ab}	40.53 ± 3.98^b
$w(\text{PC})/\%$	8.03 ± 0.59^a	7.39 ± 0.36^{ab}	2.38 ± 0.06^c	7.19 ± 0.24^b	1.18 ± 0.03^d
$w(\text{UAC})/\%$	11.47 ± 0.95^c	13.79 ± 1.28^{bc}	16.56 ± 1.51^{ab}	15.74 ± 1.45^{ab}	17.37 ± 1.67^a
$w(\text{TPC})/\%$	3.80 ± 0.31^d	4.41 ± 0.41^{cd}	5.45 ± 0.57^{ab}	5.01 ± 0.52^{bc}	6.08 ± 0.62^a
$w(\text{TFC})/\%$	4.68 ± 0.37^c	5.61 ± 0.39^c	8.62 ± 0.61^a	7.31 ± 0.53^b	9.69 ± 0.87^a
$w(\text{SGC})/\%$	9.11 ± 0.78^d	11.76 ± 0.97^c	8.76 ± 0.61^d	22.15 ± 1.83^a	17.75 ± 1.32^b
M_w	$154\,300\pm16\,340^a$	$123\,930\pm15\,210^b$	$94\,120\pm8\,780^c$	$111\,060\pm11\,870^{cd}$	$87\,970\pm5\,400^c$
$w(\text{WS})/\%$	96.45 ± 4.24^a	92.16 ± 3.16^a	96.83 ± 4.17^a	97.45 ± 4.34^a	98.21 ± 4.77^a
$w(\text{WHC})/\%$	5.34 ± 0.04^d	6.57 ± 0.16^a	5.63 ± 0.09^c	6.34 ± 0.15^b	5.13 ± 0.02^d
$w(\text{OHC})/\%$	2.62 ± 0.06^c	3.76 ± 0.17^a	3.15 ± 0.11^b	3.98 ± 0.19^a	2.21 ± 0.04^d
DS/ $\%$	ND	ND	ND	0.49 ± 0.03	0.35 ± 0.02
$w(\text{Zn})/(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	ND	184.85 ± 15.34	ND	ND	ND
$w(\text{Se})/(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	ND	ND	330.11 ± 29.15	ND	ND
$w(\text{Man})/\%$	4.73 ± 0.19^b	4.01 ± 0.12^c	7.92 ± 0.22^a	4.34 ± 0.17^c	4.75 ± 0.18^b
$w(\text{Rha})/\%$	6.91 ± 0.18^b	5.67 ± 0.14^c	7.87 ± 0.25^a	7.00 ± 0.21^b	6.84 ± 0.14^b
$w(\text{GlcA})/\%$	3.51 ± 0.12^d	5.34 ± 0.14^c	6.20 ± 0.16^b	5.98 ± 0.15^b	7.37 ± 0.21^a
$w(\text{GalA})/\%$	7.02 ± 0.26^d	8.46 ± 0.29^c	9.68 ± 0.35^{ab}	9.09 ± 0.31^{bc}	9.87 ± 0.41^a
$w(\text{Glc})/\%$	6.38 ± 0.18^a	5.47 ± 0.21^b	2.80 ± 0.12^d	3.97 ± 0.16^c	2.22 ± 0.11^e
$w(\text{Gal})/\%$	14.04 ± 0.56^a	10.00 ± 0.32^c	10.20 ± 0.35^{bc}	10.80 ± 0.31^b	11.02 ± 0.43^b
$w(\text{Xyl})/\%$	36.17 ± 1.79^{ab}	37.65 ± 1.81^a	29.77 ± 1.65^c	33.68 ± 1.74^b	33.07 ± 1.77^b
$w(\text{Ara})/\%$	21.23 ± 1.23^b	23.40 ± 1.35^{ab}	25.55 ± 1.43^a	25.14 ± 1.33^a	24.84 ± 1.37^a

注: 数值为平均值 $\pm$ SD($n=3$); 不同小写字母表示不同成分含量的差异($P<0.05$), 即列间比较显著.

PVP-2, Zn-PVP-2, Se-PVP-2, S-PVP-2 和 P-PVP-2 中的 PC 分别为 $(8.03\pm0.59)\%$, $(7.39\pm0.36)\%$, $(2.38\pm0.06)\%$, $(7.19\pm0.24)\%$ 和 $(1.18\pm0.03)\%$, 表明 4 种修饰方法均显著降低了 PC ($P<0.05$). 经多次 Sevag 脱蛋白质后, PVP-2 及其 4 种衍生物均含有一定量的蛋白质, 可能是因为蛋白质与多糖通过共价键形成了稳定的缀合物, 4 种衍生物中 Zn-PVP-2 的 PC 含量最高, 是 PC 含量最低 P-PVP-2 的 6.26 倍. 这可能是由于锌与蛋白质和多糖形成了稳定的多元共轭物, 减少了修饰过程中糖蛋白的分解, 将无机锌转化为有机形式, 提高了锌的生物利用度所致. P-PVP-2 的 PC 最低, 这可能是由于磷酸化促进了蛋白质降解, 导致 PC 显著降低, 与 Yang 等^[14]报道的磷酸化修饰后多糖中碳水化合物和蛋白质含量降低的结果一致.

PVP-2 及其衍生物的 UAC 大小顺序为 P-PVP-2>Se-PVP-2>S-PVP-2>Zn-PVP-2>PVP-2, 表明衍生物显著高于 PVP-2 中的 UAC ($P<0.05$), 其原因可能是由于修饰多糖制备过程中的中性多糖链降解, 最终导致位于主链中的 UAC 升高. 其中 P-PVP-2 比 PVP-2 中的 UAC 高 51.44%, 进一步表明磷酸化修饰在保持 P-PVP-2 酸性主链结构的同时, 促进了中性多糖链的更高降解, UAC 明显提高 ($P<0.05$).

PVP-2, Zn-PVP-2, Se-PVP-2, S-PVP-2 和 P-PVP-2 的 TPC 和 TFC 分别为 $(3.80 \pm 0.31)\%$ ~ $(6.08 \pm 0.62)\%$ 和 $(4.68 \pm 0.37)\%$ ~ $(9.69 \pm 0.87)\%$. 表明 5 个 PVPs 均含有高比例的黄酮和多酚类化合物. UCE 法显著高于 HRE 法提取 PVPs 的 TPC 和 TFC ($P < 0.05$). 由于超声波产生的强烈空化和剪切作用促进了这些次生产物的溶解, 减少了传统 HRE 高温引起酚类化合物的降解, 经醇沉、分离、纯化、修饰和透析后, 黄酮和多酚类成分并未被去除, 推测这些成分可能与多糖和蛋白质结合形成多元缀合物^[15]. 4 种衍生物均高于天然 PVP-2 的 TPC 和 TFC, 且 P-PVP-2 的 TPC 和 TFC 均最高, 分别是 PVP-2 的 1.60 倍和 2.07 倍. 其原因可能是修饰过程中多糖链断裂, 糖的相对含量降低所致. 同时引入磷酸基增加了 P-PVP-2 的负电荷和静电作用, 促使多糖与多酚和黄酮类化合物通过共价键、多氢键及静电作用进行交联, 形成稳定的多元缀合物^[15], 不仅提高了多糖的保水性、保油性和生物活性, 还提高了多酚和黄酮类化合物的溶解度和生物利用度.

PVP-2 及其 4 种衍生物的 SGC 值为 $(8.76 \pm 0.61)\%$ ~ $(22.15 \pm 1.83)\%$, 表明 PVP-2 为天然硫酸化多糖. 5 种多糖中 S-PVP-2 的 SGC 值最高, 为 $(22.15 \pm 1.83)\%$, 比天然 PVP-2 高 143.14%, 表明 PVP-2 硫酸化成功. Se-PVP-2 的 SGC 最低, 这可能是硒化物修饰过程中硫酸基团在强酸和高温条件下发生了一定程度降解, 导致其低于天然 PVP-2 的 SGC 值. 综上可见, 4 种化学修饰方法均有效改变了 PVP-2 的化学组成, 从而改变其功能性质.

2.2.3 相对分子质量及单糖组成

根据准葡聚糖标准曲线方程, 测定 PVP-2, Zn-PVP-2, Se-PVP-2, S-PVP-2, P-PVP-2 的 M_w 分别为 $154\,300 \pm 16\,340$, $123\,930 \pm 15\,210$, $94\,120 \pm 8\,780$, $111\,060 \pm 11\,870$, $87\,970 \pm 5\,400$, 表明 4 种修饰方法均能显著降低 PVP-2 的 M_w ($P < 0.05$), 该变化可归因于修饰过程中多糖的糖苷键断裂所致, 与 Zhang 等^[16] 的结果相似. 与 PVP-2 相比, P-PVP-2 和 Se-PVP-2 的 M_w 分别降低了 42.99% 和 39.00%, 其原因可能是在磷酸化过程中, 长时间高温导致多糖链发生水解断裂, 形成了 M_w 较低的碎片. 在硒化过程中, 由于强酸条件使多糖链快速水解, 导致 Se-PVP-2 的 M_w 降低. 因此 4 种化学修饰在有效降低 PVP-2 M_w 的同时, 也改变了多糖链结构, 从而改善了功能性质.

单糖组成的高效液相色谱(HPLC)如图 2 所示. 由图 2 可见, 在建立的 HPLC 条件下, 各单糖组分均能得到有效分离和定量, 5 种 PVPs 均由 Rha, GlcA, Glc, GalA, Man, Gal, Xyl 和 Ara 组成, 但物质的量比不同, 其中以 Xyl, Ara 和 Gal 为主要单糖. 4 种衍生物的单糖组成比例显著变化 ($P < 0.05$), 单糖种类未发生改变. 表明这些修饰导致的多糖降解可能主要发生在支链上, 对主链没有明显影响.

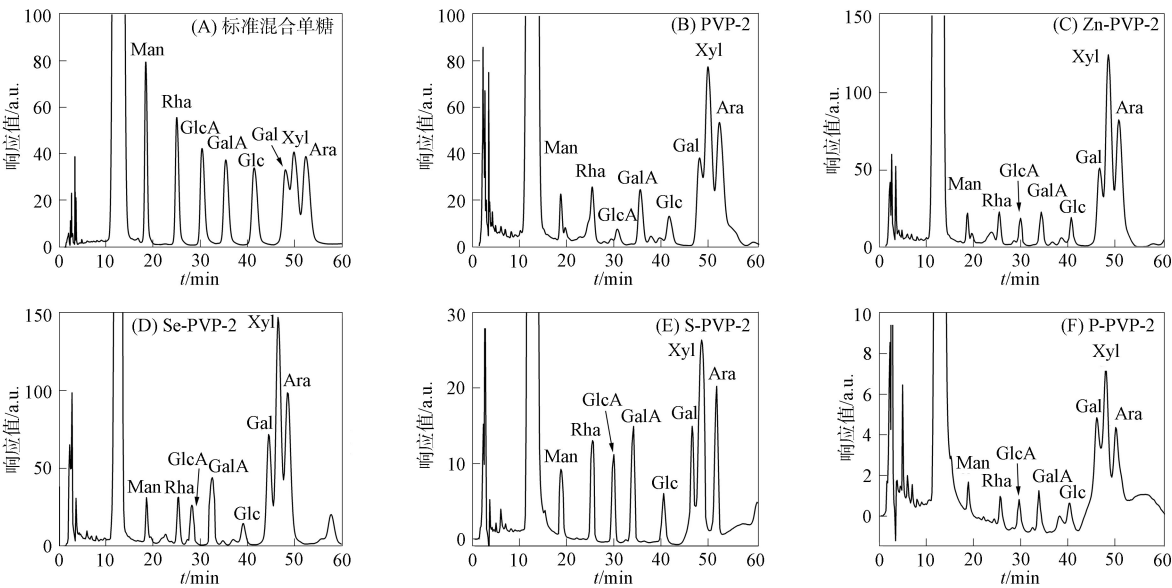


图 2 单糖组成的 HPLC
Fig. 2 HPLC of monosaccharide composition

Xu 等^[17]研究表明, 硒化和锌化修饰不改变单糖类型, 只是物质的量比有明显改变. 此外, 4 种衍生物与天然 PVP-2 中的 GlcA 和 GalA 含量相比有显著提高($P<0.05$), 与衍生物中 UAC 的提高一致. 这些结果证明化学修饰可改变多糖的化学组成, 从而改变其理化特征和功能性质.

2.2.4 PVPs 的热分析

样品的热重(TG)和导数热重(DTG)曲线如图 3 所示. 由图 3 可见, PVP-2,Zn-PVP-2,Se-PVP-2,S-PVP-2,P-PVP-2 的 TG 曲线均呈 3 个主要降解阶段, 每阶段不同样品的降解温度和失质量速率不同, 证明 PVP-2 及其衍生物具有不同的热稳定性. 第一阶段, 降解温度为 189.3~237.9℃、失质量率为 7.9%~27.7%, 可能是由于 PVPs 中自由水和结合水蒸发所致^[17]. 第二阶段, PVP-2,Zn-PVP-2,Se-PVP-2,S-PVP-2 和 P-PVP-2 的温度分别为 215.93~432.96,237.9~427.9,224.8~379.7,213.1~626.2,189.3~382.9℃, 失质量率分别为 52.5%,51.8%,45.2%,26.2%和 49.4%, 最大失质量速率分别出现在 283.46,285.54,288.72,758.46,252.37℃附近, 这可能是由于多糖中糖苷键和氢键断裂所致. 第三阶段的失质量可能与碳分解有关, PVP-2,Zn-PVP-2,Se-PVP-2,S-PVP-2 和 P-PVP-2 的最终残留量分别为 18.8%,23.9%,16.6%,31.4%,17.2%. 此外, S-PVP-2 在 153.27,248.96,758.46℃处出现 3 个热解峰, 可能是由于—SO₃H 取代 OH 基团, 导致分子内和分子间形成氢键, 从而改变了 S-PVP-2 的分子间结构, 这些变化提高了 S-PVP-2 的热稳定性, 导致第二阶段仅出现 26.2%的失质量, 大部分失质量发生在第三阶段. 上述结果表明, 5 种多糖均有较好的热稳定性, 在较高温度下 S-PVP-2 优于 PVP-2 的热稳定性.

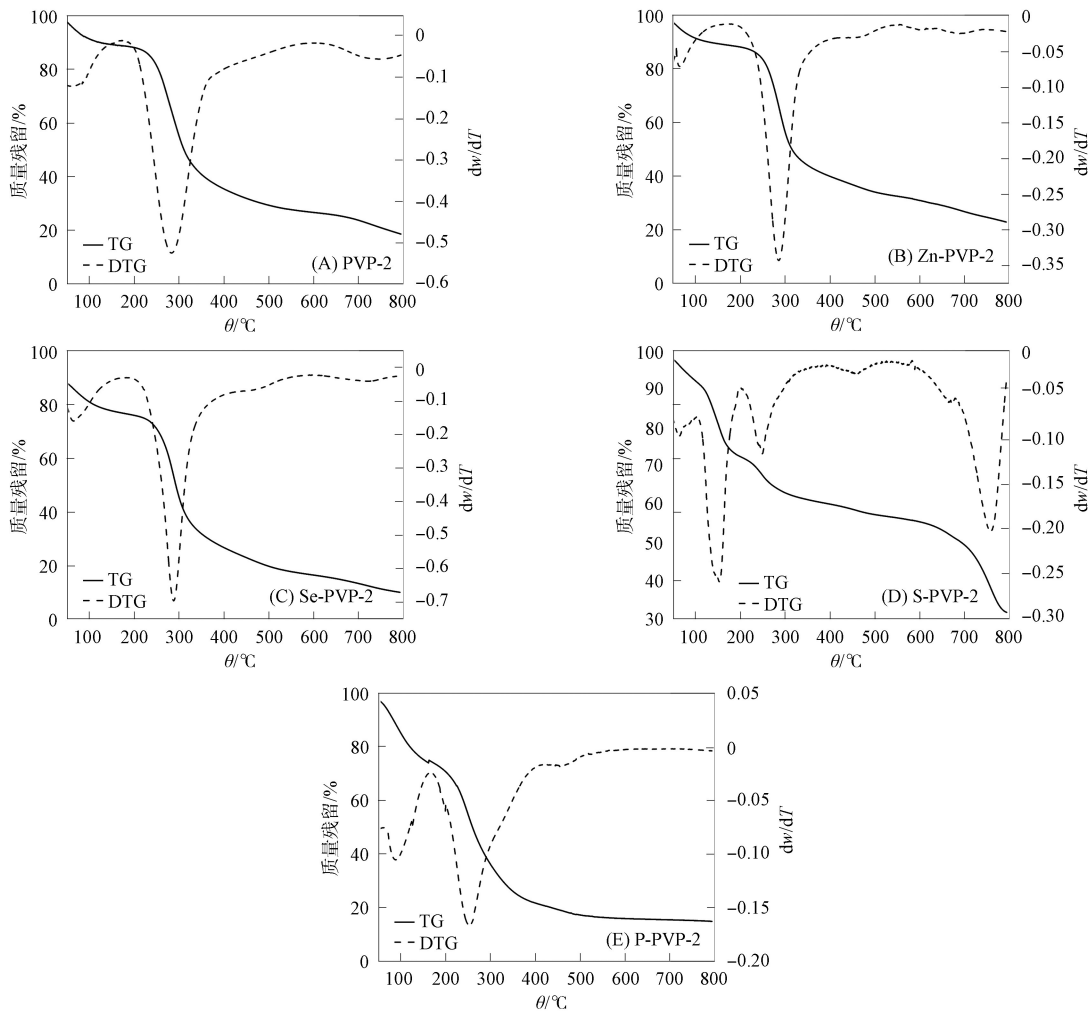


图 3 样品的 TG 和 DTG 曲线
Fig.3 TG and DTG curves of samples

2.2.5 紫外和红外光谱分析

图 4 为 PVP-2, Zn-PVP-2, Se-PVP-2, S-PVP-2 和 P-PVP-2 的紫外光谱. 由图 4 可见, PVP-2 及其衍生物在 260~280 nm 处出现弱特征吸收峰, 表明它们含有蛋白质或核酸. Se-PVP-2 和 P-PVP-2 在 260, 280 nm 处均无明显的吸光度, 表明它们的 PC 均很低, 这与 P-PVP-2 和 Se-PVP-2 中 PC 最低的情况一致. 此外, Se-PVP-2 和 Zn-PVP-2 的吸光度均显著降低, 这可能是由于—SeO₃ 和 Zn(Ⅱ) 与 PVP-2 的羟基结合, 使体系的共轭度降低所致^[18]. S-PVP-2 在 260 nm 处高于其他 3 种修饰多糖的吸收峰强度, 这是由于硫酸基团的 $n-\pi^*$ 跃迁所致, 表明硫酸修饰中存在更多的 S=O^[9].

PVP-2, Zn-PVP-2, Se-PVP-2, S-PVP-2 和 P-PVP-2 的 FT-IR 光谱如图 5 所示. 由图 5 可见, PVP-2 及其 4 种衍生物在 3 414~3 447, 2 925~2 962, 1 613~1 643, 1 421~1 444, 1 137~1 155, 1 004~1 044, 965~970, 830~835, 603~635 cm⁻¹ 附近均有典型的多糖特征吸收峰, 分别为 O—H(N—H) 基团的伸缩振动、CH₂ 和 CH₃ 基团的 C—H 伸缩振动、—COOH 的不对称伸缩振动、C—O—H 和 C—O—C 的伸缩振动. 相似的特征吸收峰表明, 4 种化学修饰未明显改变 PVP-2 的主要骨架结构, 这与经化学修饰后多糖链骨架结构未改变的结果一致^[9]. 同时, 代表—OH 的伸缩振动峰由 3 447 cm⁻¹ 处(PVP-2)移至 3 414~3 434 cm⁻¹ 处(4 种衍生物), 且峰形略变窄, 表明修饰基团与多糖之间的相互作用可能发生在羟基上. 此外, PVP-2, Zn-PVP-2, Se-PVP-2, S-PVP-2 和 P-PVP-2 在 1 256, 830 cm⁻¹, 1 265, 830 cm⁻¹, 1 262, 835 cm⁻¹, 1 254, 836 cm⁻¹, 1 257, 827 cm⁻¹ 附近的吸收峰分别归因于—S=O 和 C—O—S 的不对称振动, 表明它们均为硫酸化多糖中含量较高的多糖. S-PVP-2 强于其他组分在 1 254, 836 cm⁻¹ 附近的吸收峰强度均, 表明已成功引入硫酸基团. 在 PVP-2 及其 4 种衍生物中, 在 1 573~1 570 cm⁻¹ 附近观察到的吸收峰可归因于酰胺Ⅱ带的 N—H 弯曲和 C—N 拉伸, 表明 5 种 PVPs 中均含有一定量的蛋白质. 在

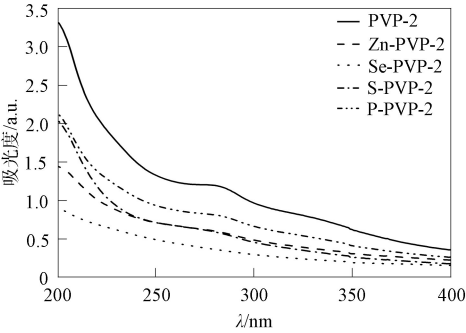


图 4 样品的紫外光谱
Fig. 4 UV spectra of samples

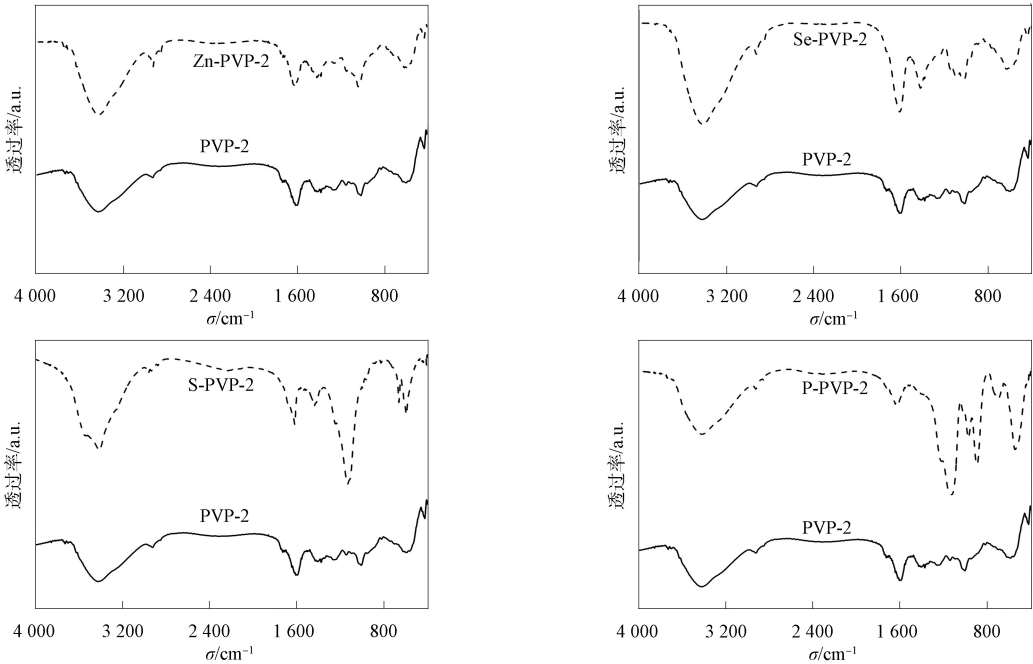


图 5 样品的 FT-IR 谱
Fig. 5 FT-IR spectra of samples

Se-PVP-2 中, $527, 1\ 097, 959\text{ cm}^{-1}$ 附近出现吸收峰, 分别归属于 C—O—Se 和 O—Se—O 的拉伸振动以及 Se=O 的不对称拉伸, 表明 PVP-2 已被成功硒化修饰^[19]. Zn-PVP-2 在 $922, 442\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰较弱, 可归属为 Zn—O 配位键的弯曲和拉伸振动^[20]. P-PVP-2 在 $1\ 231, 988\text{ cm}^{-1}$ 附近的吸收峰归属为 P=O 和 P—O—C 的伸缩振动, 表明磷酸化修饰成功^[21]. 上述结果表明, 4 种化学方法已成功修饰 PVP-2, 但这些修饰均未改变多糖的主链结构.

2.2.6 功能特性分析

由表 1 可见, WS 值依次为 P-PVP-2>S-PVP-2>Se-PVP-2>PVP-2>Zn-PVP-2, 可见 4 种修饰方法对 WS 值的影响不同. 在 5 种多糖中, P-PVP-2 的 WS 值最高, M_w 最低, 这可能是由于磷酸化过程中长时间高温导致多糖降解, 使 P-PVP-2 粒径减小, WS 值增大所致^[22]. 引入磷酸基和硫酸基增强了 P-PVP-2 和 S-PVP-2 的极性和亲水性, 提高了其 WS 值. P-PVP-2 和 S-PVP-2 中的 UAC 和 SGC 均明显增加, 由于具有较高 UAC 和 SGC 的多糖更容易与水形成氢键而溶解于水中, 因此可使其 WS 值增加. Zn-PVP-2 比 PVP-2 的 WS 值低, 这可能是由于 Zn-PVP-2 中 Zn(II) 与羟基结合, 使极性亲水基团减少所致. 在 5 种多糖中, Zn-PVP-2 的保水性和保油性均最高, 这可能是由于 Zn(II) 桥接 PVP-2 分子, 增加了分子间的相互作用, 形成了更多微孔, 从而增加了 Zn-PVP-2 与水(或油)分子间的交联, 有利于提高 Zn-PVP-2 的保水性和保油性. 综上可见, 4 种修饰方法改变了 PVP-2 的理化特征, 从而改善了其功能性能.

2.3 抗氧化活性分析

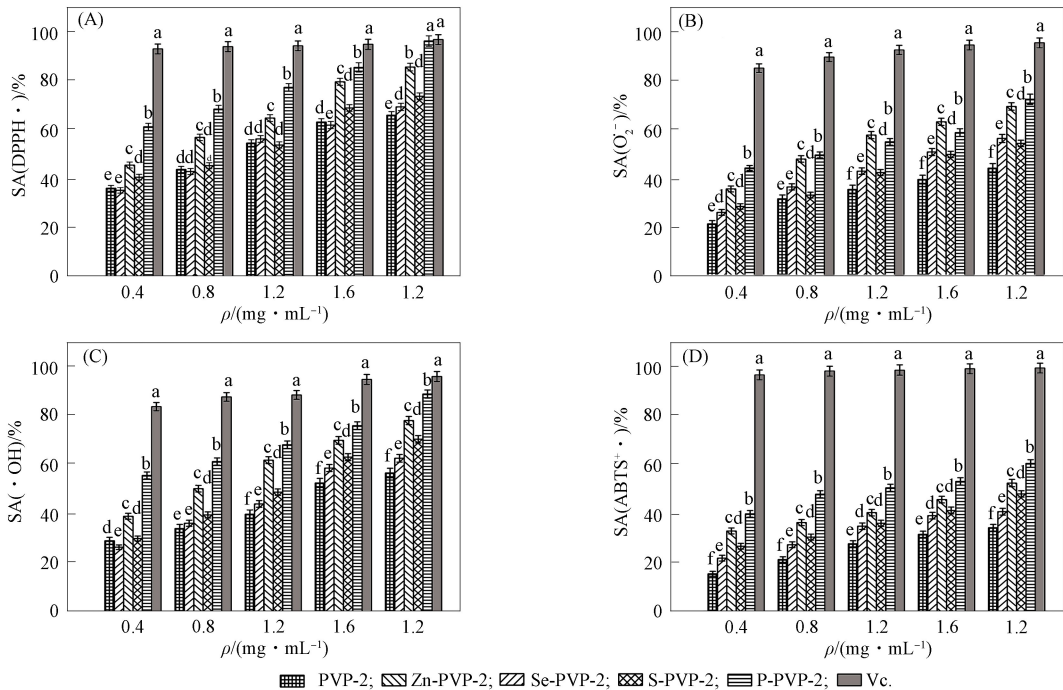
DPPH· 在乙醇中呈紫色, 由于其可接受多糖提供的电子或氢气, 形成还原形式, 若失去紫色, 且在 517 nm 波长处吸光度值下降, 则吸光度降低的程度与 DPPH· 的清除能力呈线性相关, 因此被广泛用于评价样品的抗氧化能力. 样品对 DPPH·, $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{ABTS}^+\cdot$ 的清除活性如图 6 所示. 由图 6(A) 可见, 5 种 PVP 均对 DPPH· 表现出优异的清除性, 且呈剂量依赖性. 当质量浓度为 2 mg/mL 时, PVP-2, Zn-PVP-2, Se-PVP-2, S-PVP-2, P-PVP-2 和 Vc 的 SA 分别为 $(62.52\pm1.41)\%$, $(68.95\pm1.47)\%$, $(85.09\pm1.54)\%$, $(73.21\pm1.49)\%$, $(95.66\pm2.02)\%$, $(96.23\pm2.12)\%$, 表明 4 种修饰方法均能显著提高了 SA ($P<0.05$), 其中 P-PVP-2 对 DPPH· 的 SA 最大, 比 PVP-2 的 SA 提高了 53.0% , 这主要是由于磷酸化导致 P-PVP-2 的 M_w 显著降低所致. 由于相同质量但相对分子质量低的多糖具有更多的还原性端基(羟基和氨基), 因此有更大的概率与自由基接触和结合, 导致终止自由基链式反应, 从而表现出更高的 SA. Se-PVP-2 比 PVP-2 对 DPPH· 的 SA 提高了 36.1% , 这可能是因为硒与多糖结合后, Se-PVP-2 氢键解离能减弱, 多糖异构体碳上的氢原子被活化, 供氢的能力增强所致; 此外, 硒化修饰也使其 M_w 降低, 端羟基数量增多, 与自由基结合的机会增加, 导致其比天然 PVP-2 对 DPPH· 的 SA 更高.

由图 6(B) 可见, PVP-2 及其 4 种衍生物均对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 表现出明显清除性, 且呈剂量依赖性. 当质量浓度为 2 mg/mL 时, 对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的 SA 依次为 P-PVP-2>Se-PVP-2>Zn-PVP-2>S-PVP-2>PVP-2, 可见 4 种衍生物在相同质量浓度下均显著高于 PVP-2 对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的 SA ($P<0.05$). 该结果主要归因于 4 种修饰方法显著提高了衍生物的 UAC ($P<0.05$), 而多糖中的醛基可促进羟基氢解离, 提高与 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的结合能力, 进而表现出更强的清除能力. 同时, 磷酸化后 PVP-2 碳链电子密度增大, 清除自由基的能力增强; 硒化修饰的 PVP-2 可提高抗氧化酶的活性, 从而间接提高了其清除自由基的能力; 经硫酸化后, S-PVP-2 提供氢原子或阴离子电荷的能力更强, 可提高 S-PVP-2 对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的 SA; 锌修饰多糖不仅能增强抗氧化酶的活性, 还能竞争性抑制金属离子(如 Cu^{2+} 和 Fe^{2+}) 通过 Fenton 反应刺激脂质氧化, 减少自由基生成, 从而发挥抗氧化功效^[23]. 这些结果表明, 4 种修饰方法可通过不同机制提高 PVP 的抗氧化活性, 而且提高程度不仅取决于单一因素, 还取决于多种因素之间的相互作用.

由图 6(C) 可见, 当质量浓度为 $0.4\sim2\text{ mg/mL}$ 时, 所有样品均对 $\cdot\text{OH}$ 表现出较高的 SA, 且呈剂量依赖性. 当质量浓度为 2 mg/mL 时, 对 $\cdot\text{OH}$ 的 SA 依次为 P-PVP-2>Se-PVP-2>S-PVP-2>Zn-PVP-2>PVP-2, 表明修饰 PVP-2 比天然 PVP-2 对 $\cdot\text{OH}$ 有更高的 SA. 这可能与 4 种衍生物显著高于天然 PVP-2 中的 TPC, TFC 和 SGC(除 Se-PVP-2 外) 有关. 由于酚羟基更容易给出氢, 因此可形

成稳定且共轭程度更高的结构, 有更强的结合自由基和终止自由基链式反应能力. 此外, 多酚、黄酮和多糖多元结合物的形成协同增强了供氢能力, 且酚类化合物含量越高, 抗氧化性能越好; 多糖的 SGC 越高, 供氢或供电子能力越强, 抗氧化活性越高^[5]. 与对 DPPH· 和 O₂⁻ 清除能力的结果一致, P-PVP-2 和 Se-PVP-2 比其他多糖对 ·OH 具有更高的 SA. 除以上因素外, P-PVP-2 的电负性增加, 糖链结构发生变化, 导致羟基暴露增多, ·OH 清除能力增强^[21]. 硒化改变了 Se-PVP-2 的高级结构, 增加了比表面积, 暴露了更多的活性位点, 增加了其与自由基接触的机会, 从而提高了对 ·OH 的清除能力. 这些结果与文献[24]的结果一致, 表明磷酸化、硒化、硫酸化和锌化可显著($P<0.05$)增强天然多糖的抗氧化活性.

由图 6(D)可见, 在实验的质量浓度范围内, 5 种多糖均对 ABTS⁺· 有一定的 SA, 且呈剂量依赖性. 当质量浓度为 2 mg/mL 时, PVP-2, Zn-PVP-2, Se-PVP-2, S-PVP-2, P-PVP-2 和 Vc 对 ABTS⁺· 的 SA 分别为(34.13±1.35)%, (40.69±1.31)%, (52.38±1.49)%, (47.94±1.39)%, (60.38±1.57)% 和 (99.38±2.05)%, 表明 4 种修饰方法均可有效提高对 ABTS⁺· 的清除能力. 由表 1 可见, P-PVP-2 的 GlcA 和 GalA 含量最高, Glc 含量最低, 对 ABTS⁺· 的 SA 最高. Se-PVP-2 的 GlcA 和 GalA 含量次高, Glc 含量次低, 对 ABTS⁺· 的 SA 次高, 表明 GlcA 和 GalA 含量可能与对 ABTS⁺· 的 SA 呈正相关, Glc 含量与对 ABTS⁺· 的 SA 呈负相关, 与文献[25]的研究结果相符.



数据为测量值±标准差($n=3$), 不同字母(a~f)表示同一质量浓度不同成分的平均清除率差异具有统计学意义($P<0.05$).

图 6 样品对 DPPH· (A), O₂⁻ (B), ·OH (C) 和 ABTS⁺· (D) 的体外抗氧化活性

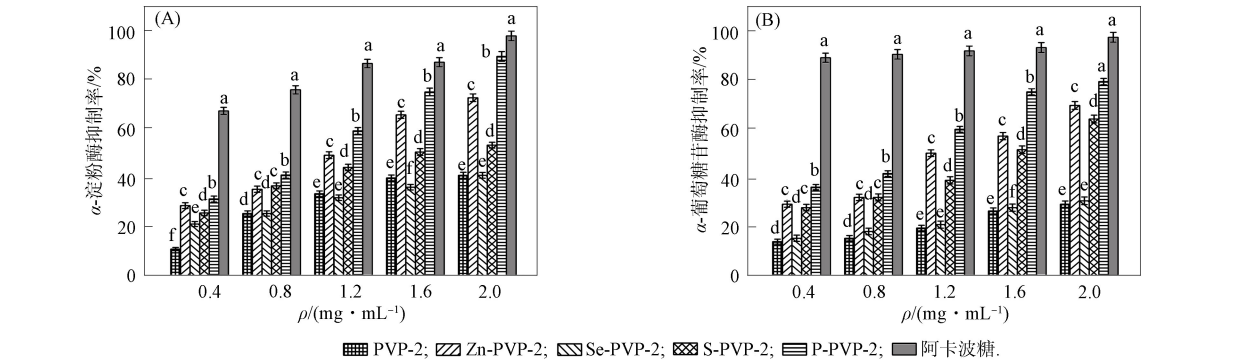
Fig. 6 Antioxidant activity in vitro of samples on DPPH· (A), O₂⁻ (B), ·OH (C) and ABTS⁺· (D)

综上, 可以认为 4 种修饰方法提高抗氧化活性的机理是多种因素综合作用的结果. 因此, 选择合适的修饰方法、优化修饰工艺参数、控制基团取代度和取代位置以及实现多糖结构的精准修饰, 是提高天然多糖抗氧化活性的最有效途径.

2.4 PVP-2 降血糖活性分析

样品对 α-淀粉酶和 α-葡萄糖苷酶的降血糖活性如图 7 所示. 由图 7 可见, 5 个样品均具有显著的 α-淀粉酶和 α-葡萄糖苷酶 IA($P<0.05$), 且在 0.4~2 mg/mL 内呈剂量依赖. 当质量浓度为 2 mg/mL 时, PVP-2, Zn-PVP-2, Se-PVP-2, S-PVP-2, P-PVP-2 和阿卡波糖对 α-淀粉酶和 α-葡萄糖苷酶的抑制率分别为(40.86±1.19)%, (72.58±1.54)%, (42.28±1.24)%, (53.23±1.39)%, (89.46±1.68)% 和 (97.85±1.97)%, (29.17±1.29)%, (69.44±1.59)%, (30.56±1.34)%, (63.89±1.56)%,

(79.17±1.66)%,(97.22±2.01)%。5 种多糖对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的 IA 大小相似,其顺序为 P-PVP-2>Zn-PVP-2>S-PVP-2>Se-PVP-2>PVP-2,表明修饰 PVP-2 高于天然 PVP-2 的 IA。其中一个主要原因可能是 4 种修饰方法显著降低了 PVP-2 的 M_w 。低 M_w 的多糖表现出更好的降血糖活性,这可能是因为相同质量的低 M_w 多糖有更多的活性位点与 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶结合,导致两种酶发生构象变化,降低了两种酶的催化活性,阻止底物转化为单糖和寡糖,从而发挥了较好的降血糖作用^[26]。而且 M_w 较低的多糖分子溶解性和降血糖活性更好。此外,4 种衍生物明显高于天然 PVP-2 的降血糖活性($P<0.05$),也可能与衍生物的 UAC,TPC 和 TFC 显著升高有关,因为多糖的羟基和酮基增强了与酶的结合能力,形成复合物,释放的 H^+ 可导致极性和分子构象改变和酶活性部分丧失^[27]。UAC 越高,多糖的 WS 值越高,越有利于发挥多糖的降糖活性(HA)作用。此外,多酚、黄酮、锌、硒和多糖等成分结合形成多组分缀合物,可产生协同降血糖作用。可见,锌化、硒化、硫酸化和磷酸化均可增强天然多糖的降血糖活性,其中磷酸化修饰的降血糖活性最高。因此,选择合适的修饰方法是提高降血糖活性的有效途径。



数据为测量值±标准差($n=3$),不同字母(a~f)表示同一质量浓度不同成分的平均清除率差异具有统计学意义($P<0.05$)。

图 7 样品对 α -淀粉酶(A)和 α -葡萄糖苷酶(B)的降血糖活性
Fig. 7 Hypoglycemic activity samples on α -amylase (A) and α -glucosidase (B)

2.5 PVP-2 抗菌活性分析

通过测量抑菌圈直径(mm)分析 PVP-2,Zn-PVP-2,Se-PVP-2,S-PVP-2 和 P-PVP-2 对 *S. aureus* 和 *E. coli* 的抑菌活性,结果列于表 2。

表 2 PVP-2,Zn-PVP-2,Se-PVP-2,S-PVP-2 和 P-PVP-2 的抑菌活性
Table 2 Antibacterial activity of PVP-2,Zn-PVP-2,Se-PVP-2,S-PVP-2 and P-PVP-2

$\rho/(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	<i>BA(S. aureus)/mm</i>				
	PVP-2	Zn-PVP-2	Se-PVP-2	S-PVP-2	P-PVP-2
1	7.45±0.23 ^b	8.25±0.35 ^a	8.56±0.32 ^a	8.54±0.24 ^a	8.22±0.19 ^a
3	7.68±0.27 ^c	10.18±0.38 ^a	9.43±0.39 ^b	9.26±0.27 ^b	9.11±0.21 ^b
5	8.79±0.31 ^c	10.26±0.41 ^a	9.79±0.43 ^a	10.35±0.33 ^a	9.52±0.27 ^b
10	9.23±0.39 ^d	10.98±0.43 ^b	12.34±0.51 ^a	10.79±0.34 ^{bc}	10.16±0.32 ^c

$\rho/(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	<i>BA(E. coli)/mm</i>				
	PVP-2	Zn-PVP-2	Se-PVP-2	S-PVP-2	P-PVP-2
1	6.12±0.12 ^b	7.23±0.23 ^a	7.24±0.33 ^a	6.27±0.22 ^b	6.24±0.15 ^b
3	7.14±0.17 ^{ab}	7.29±0.27 ^a	7.28±0.35 ^a	6.75±0.25 ^{bc}	6.45±0.17 ^b
5	7.18±0.19 ^b	7.31±0.35 ^b	8.15±0.43 ^a	6.92±0.27 ^b	6.78±0.19 ^b
10	7.21±0.22 ^a	7.38±0.39 ^a	9.24±0.46 ^a	7.34±0.31 ^a	7.31±0.23 ^a

注:数据表示为平均值±标准差($n=3$),不同小写字母表示同一浓度的不同成分平均清除率的差异具有统计学意义($P<0.05$)。

由表 2 可见,PVP-2 及其衍生物对 *S. aureus* 和 *E. coli* 的抑制率(BA)在 1~10 mg/mL 内均呈线性增加,但对不同菌种的抑制程度不同。当质量浓度为 10 mg/mL 时,PVP-2,Zn-PVP-2,Se-PVP-2,S-PVP-2 和 P-PVP-2 对 *S. aureus* 和 *E. coli* 的抑菌圈直径分别为(9.23±0.39),(10.98±0.43),

(12.34±0.51),(10.79±0.34)mm 和(10.16±0.32),(7.21±0.22),(7.38±0.39),(9.24±0.46),(7.34±0.31),(7.31±0.23)mm. 可见 Se-PVP-2 和 Zn-PVP-2 比其他多糖表现出更强的抑菌活性, 且对 *S. aureus* 优于 *E. coli* 的 BA. 这可能是由于经锌和硒修饰后, PVP-2 分子链中更多的阳离子或负离子基团与带负电荷的 *E. coli* 菌或带正电荷的 *S. aureus* 相互作用, 导致菌细胞内容物漏出, 甚至死亡所致. 在相同质量浓度下 4 种衍生物均优于 PVP-2 对 *S. aureus* 和 *E. coli* 的抑制能力, 这可能与 4 种衍生物均显著高于 PVP-2 中的 UAC,TPC,TFC,SGC,GalA 和 Glc 含量有关. 这些成分或基团增加可提高修饰多糖破坏测试菌细胞壁和胞质膜的能力, 导致细菌所需分子漏出和细胞死亡^[11]. 可见, 硒修饰可通过降低 M_w 、改变或增强 Se-PVP-2 的电荷和溶解度提高 BA.

2.6 相关性分析

为揭示 PVP-2 的特性与活性之间的关系, 对其进行相关性和显著性分析, 结果分别列于表 3 和表 4.

表 3 物理化学特性与生物活性之间的相关性

Table 3 Correlations between physicochemical characteristics and bioactivities

特征因子	OHCR/%	OCR/%	DCR/%	ACR/%	AIC/%	GIC/%	DEI/mm	DSI/mm
NSC	−0.92	−0.94	−0.95	−0.97	−0.95	−0.97	0.06	−0.31
PC	−0.94	−0.94	−0.94	−0.92	−0.94	−0.88	0.31	0.02
UAC	0.95	0.97	0.96	0.98	0.97	0.99	0.22	0.52
TPC	0.99	0.99	1.00	0.99	0.99	0.99	0.08	0.35
TFC	0.97	0.98	0.95	0.97	0.97	0.96	0.15	0.45
SGC	0.77	0.79	0.76	0.77	0.79	0.72	−0.45	−0.08
M_w	−0.95	−0.96	−0.94	−0.95	−0.96	−0.91	0.22	0.11
WS	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.94	0.36	0.54
WHC	0.12	0.18	0.20	0.26	0.20	0.36	0.50	0.69
OHC	−0.67	−0.72	−0.72	−0.77	−0.74	−0.81	−0.11	−0.51
Man	0.45	0.46	0.38	0.41	0.44	0.33	−0.39	−0.12
Rha	−0.45	−0.51	−0.53	−0.58	−0.53	−0.65	−0.29	−0.59
GlcA	0.95	0.95	0.96	0.97	0.96	0.98	0.23	0.48
GalA	0.97	0.98	0.96	0.98	0.98	0.98	0.13	0.45
Glc	−0.93	−0.95	−0.95	−0.97	−0.96	−0.99	−0.14	−0.47
Gal	0.70	0.72	0.74	0.75	0.72	0.81	0.57	0.71
Xyl	−0.62	−0.59	−0.52	−0.52	−0.56	−0.45	0.00	−0.10
Ara	0.86	0.89	0.84	0.89	0.88	0.91	0.33	0.66

注: OHCR 为 ·OH 清除率, OCR 为 O_2^- 清除率, DCR 为 ·DPPH 清除率, ACR 为 $ABTS^+$ ·清除率, AIC 为 α -淀粉酶抑制活性, GIC 为 α -葡萄糖苷酶抑制活性, DEI 为 *E. coli* 抑菌圈直径, DSI 为 *S. aureus* 抑菌圈直径.

由表 3 和表 4 可见, 特征因子中的 UAC,TPC,TFC,GlcA,GalA,Ara 和 WS 与抗氧化活性呈显著正相关($P<0.05$), 但各因子对活性的影响程度明显不同, 影响大小顺序为 TPC>GalA>TFC>UAC>GlcA>WS>Ara, 表明 TPC 是影响 PVP-2 抗氧化活性的最重要因素, 特征因子 M_w ,Glc, NSC 和 PC 与抗氧化活性呈显著负相关. HA 与 TPC,UAC,GalA,GlcA,TFC,WS 和 Ara 呈正相关, 与 Glc,NSC, M_w 和 PC 呈负相关. 在同一质量浓度下, 由关联系数(R)可知, PVP-2 对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的 IA 差异较小. 可见, 不同修饰方法均可改变 PVP-2 的理化特性, 从而提高其抗氧化性能和 HA. 研究发现, 所有检测的 18 种理化特性与 4 种抗氧化活性和 2 种 HA 表现出完全一致的相关性, 并且关联系数(R)和显著性水平(P)也非常接近, 表明多糖的抗氧化活性和降血糖活性间存在内在关系, 因此推测氧化应激促进了糖尿病的发生发展, 而多糖在清除自由基和抑制氧化应激的同时, 可通过调节相关酶的活性, 修复或逆转胰腺 β 细胞的功能障碍, 发挥抗糖尿病的作用. 虽然 4 种衍生物与天然 PVP-2 的 BA 相比均有不同程度提高, 但其 BA 与所考察的指标无明显的相关性, 与抗氧化和降血糖活性也未发现相关性, 这可能是由于这些修饰方法通过引入新的功能基团, 改变了多糖的离子性质、电荷密度、氢键及高级结构, 从而提高了其 BA 所致.

表 4 物理化学特性与生物活性之间的显著性

Table 4 Significance between physicochemical characteristics and bioactivities

特征因子	OHCR/%	OCR/%	DCR/%	ACR/%	AIC/%	GIC/%	DEI/mm	DSI/mm
NSC	0.028 6*	0.016 1*	0.014 8*	0.007 5**	0.011 6*	0.007 0**	0.923 2	0.607 7
PC	0.015 4*	0.018 4*	0.018 7*	0.024 8*	0.017 3*	0.050 6	0.611 3	0.970 2
UAC	0.012 7*	0.006 7**	0.010 4*	0.004 2**	0.006 9**	0.001 1**	0.720 2	0.366 6
TPC	0.001 5**	0.000 9***	0.000 3***	0.000 4***	0.000 7***	0.000 8***	0.903 1	0.568 4
TFC	0.005 6**	0.003 0**	0.012 0*	0.005 8**	0.005 1**	0.008 2**	0.813 3	0.451 0
SGC	0.125 0	0.112 6	0.139 6	0.124 4	0.111 6	0.174 3	0.442 2	0.902 7
M_w	0.011 4*	0.009 7**	0.016 3*	0.014 4*	0.009 8**	0.032 6*	0.726 1	0.855 2
WS	0.026 4*	0.027 1*	0.025 0*	0.025 6*	0.029 1*	0.015 7*	0.552 9	0.344 3
WHC	0.846 3	0.768 0	0.741 2	0.673 1	0.742 1	0.554 7	0.395 1	0.196 0
OHC	0.220 2	0.167 9	0.169 2	0.125 0	0.152 7	0.094 6	0.862 9	0.376 5
Man	0.443 1	0.436 4	0.531 5	0.496 6	0.458 0	0.590 8	0.515 3	0.842 1
Rha	0.449 1	0.383 6	0.356 1	0.306 9	0.357 6	0.233 1	0.635 6	0.291 0
GlcA	0.014 5*	0.012 0*	0.008 4**	0.007 6**	0.011 1*	0.002 5**	0.703 8	0.415 6
GalA	0.007 6**	0.003 1**	0.010 7*	0.003 7**	0.004 1**	0.004 4**	0.836 1	0.443 4
Glc	0.021 7*	0.011 8*	0.011 7*	0.004 9**	0.009 5**	0.001 0**	0.816 0	0.419 6
Gal	0.185 9	0.173 8	0.154 0	0.146 4	0.170 4	0.095 8	0.317 9	0.182 4
Xyl	0.263 4	0.292 9	0.372 8	0.373 0	0.328 5	0.446 8	0.997 7	0.877 6
Ara	0.063 5*	0.044 6*	0.073 4*	0.043 9*	0.049 9*	0.034 5*	0.592 3	0.225 3

注: OHCR 为 ·OH 清除率, OCR 为 O_2^- 清除率, DCR 为 ·DPPH 清除率, ACR 为 $ABTS^+$ ·清除率, AIC 为 α -淀粉酶抑制活性, GIC 为 α -葡萄糖苷酶抑制活性, DEI 为 *E. coli* 抑菌圈直径, DSI 为 *S. aureus* 抑菌圈直径. * 显著相关($P<0.05$), ** 高度显著相关($P<0.01$), *** 极显著相关($P<0.001$).

相比于其他修饰方法, 磷酸化修饰可显著提高 TFC,TPC,UAC,GlcA,GalA 含量, 同时降低 Glc, NSC,PC 含量和 M_w 值, 证明磷酸化修饰通过化学(增加自由基转化)和物理(长时间高温)作用表现出更高的修饰效率, 表明化学和物理修饰相结合可能产生比单一修饰更好的协同效应. 蛋白质、多糖和黄酮类化合物通过各种方式与多糖形成多元缀合物, 改变多糖的活性位点, 提高其生物利用度和活性, 多酚-多糖-蛋白质三元共聚物体系表现出更多的联合驱动和协同作用, 展现出更优异的抗氧化、抗菌和抗炎特性. 上述结果表明, 通过 4 种修饰方法引入功能基团, 可改变多糖的链结构或空间结构, 从而使修饰多糖表现出更好的生物活性.

综上所述, 本文对提取(分离和纯化)、锌化、硒化、硫酸化和磷酸化产物 PVP-2, Zn-PVP-2, Se-PVP-2, S-PVP-2 和 P-PVP-2 的理化特征、功能性质及生物活性进行了比较研究. 结果表明, 4 种修饰方法均可有效改变多糖的理化特征和活性, 其中 P-PVP-2 的抗氧化性和 HA 性最高, 说明磷酸化是提高抗氧化性和 HA 性的有效途径, Se-PVP-2 的 BA 性最强, 说明硒化修饰是提高 BA 性的有效方法. 本文揭示了多糖的理化特征、功能性质与其抗氧化、降血糖及抑菌活性的相关性, 为开发高活性多糖提供了理论依据.

参 考 文 献

[1] WANG Z C, ZHENG Y, HU Y W, et al. Improvement of Antibacterial Activity of Polysaccharides via Chemical Modification; A Review [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 269: 132163-1-132163-13.

[2] BAI C L, CHEN R Z, CHEN Y B, et al. Plant Polysaccharides Extracted by High Pressure; A Review on Yields, Physicochemical, Structure Properties, and Bioactivities [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 263: 129939-1-129939-16.

[3] 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: 104317-1-

- 104317-16.
- [4] GONG T, LIU S L, WANG H Z, et al. Supercritical CO₂ Fluid Extraction, Physicochemical Properties, Antioxidant Activities and Hypoglycemic Activity of Polysaccharides Derived from Fallen *Ginkgo* Leaves [J]. Food Bioscience, 2021, 42: 101153-1-101153-11.
- [5] HU J Y, YAN C, LI S, et al. Comparative Physiological Responses and Transcriptome Analysis Revealing the Metabolic Regulatory Mechanism of *Prunella vulgaris* L. Induced by Exogenous Application of Hydrogen Peroxide [J]. Industrial Crops & Products, 2023, 192: 116065-1-116065-18.
- [6] PAN J Y, WANG H Y, CHEN Y H. *Prunella vulgaris* L.: A Review of Its Ethnopharmacology, Phytochemistry, Quality Control and Pharmacological Effects [J]. Frontiers in Pharmacology, 2022, 13: 903171-1-903171-21.
- [7] LUO H S, LI Y M, XIE J C, et al. Effect and Mechanism of *Prunella vulgaris* L. Extract on Alleviating Lipopolysaccharide-Induced Acute Mastitis in Protecting the Blood-Milk Barrier and Reducing Inflammation [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2024, 328: 117998-1-117998-11.
- [8] GAO P Y, BIAN J, XU S S, et al. Structural Features, Selenization Modification, Antioxidant and Anti-tumor Effects of Polysaccharides from Alfalfa Roots [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 149: 207-214.
- [9] ZHANG X X, ZHANG W W, NI Z J, et al. Effects of Different Chemical Modifications on Physicochemical and Antioxidation Properties of *Lycium barbarum* Seed Dreg Polysaccharides [J]. Food Chemistry: X, 2024, 22: 101271-1-101271-10.
- [10] JIN M Z, ZHANG W Q, ZHANG X M, et al. Characterization, Chemical Modification and Bioactivities of a Polysaccharide from *Stropharia rugosoannulata* [J]. Process Biochemistry, 2023, 128: 30-39.
- [11] CHEN R Z, LUO S J, WANG C X, et al. Effects of Ultra-high Pressure Enzyme Extraction on Characteristics and Functional Properties of Red Pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) Peel Pectic Polysaccharides [J]. Food Hydrocolloids, 2021, 121: 107016-1-107016-14.
- [12] LIU Z Y, YE J Y, ZHANG R Q, et al. Fractionation and Antioxidation Activities of Polysaccharides from *Zanthoxylum bungeanum* Maxim [J]. Food Chemistry, 2024, 439: 138050-1-138050-10.
- [13] HE Y L, CHEN H, YE Z Y, et al. Structural Characterization and Bioactivities of a Novel Polysaccharide Obtained from *Lachnum* YM38 Together with Its Zinc and Selenium Derivatives [J]. Process Biochemistry, 2022, 12: 282-298.
- [14] 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: e202301781-1-e202301781-11.
- [15] FERNANDES P A R, COIMBRA M A. The Antioxidant Activity of Polysaccharides: A Structure-Function Relationship Overview [J]. Carbohydrate Polymers, 2023, 314: 120965-1-120965-15.
- [16] ZHANG Y, LIU Y H, NI G Y, et al. Sulfated Modification, Basic Characterization, Antioxidant and Anticoagulant Potentials of Polysaccharide from *Sagittaria trifolia* [J]. Arabian Journal of Chemistry, 2023, 16: 104812-1-104812-18.
- [17] XU L J, PAN X, LI D J, et al. Structural Characterization, Rheological Characterization, Hypoglycemic and Hypolipidemic Activities of Polysaccharides from *Morchella importuna* Using Acidic and Alkaline Deep Eutectic Solvents [J]. LWT-Food Science and Technology, 2024, 193: 115742-1-115742-12.
- [18] JIA Y N, LI N N, WANG Q R, et al. Effect of Fe (Ⅲ), Zn (Ⅱ), and Cr (Ⅱ) Complexation on the Physicochemical Properties and Bioactivities of Corn Silk Polysaccharide [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 189: 847-856.
- [19] YUAN M H, HUANG X Y, TIAN S, et al. Selenized Modification and Structural Characterization of *Pleurotus eryngii* Polysaccharides and Their Immunomodulatory Activity [J]. Process Biochemistry, 2024, 144: 97-111.
- [20] LI X B, JIANG F C, LIU M Y, et al. Synthesis, Characterization, and Bioactivities of Polysaccharide Metal

Complexes; A Review [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70: 6922-6942.

[21] 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: 111754-1-111754-11.

[22] 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 & Products, 2024, 210: 118205-1-118205-9.

[23] DUAN Y, JIANG F C, LI Q, et al. Multifunctional Polysaccharide/Metal/Polyphenol Double-Crosslinked Hydrogel for Infected Wound [J]. Carbohydrate Polymers, 2024, 332: 121912-1-121912-16.

[24] ZHAN Q P, CHEN Y, GUO Y F, et al. Effects of Selenylation Modification on the Antioxidative and Immunoregulatory Activities of Polysaccharides from the Pulp of *Rose laevigata* Michx Fruit [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 206: 242-254.

[25] FENG Y Q, QIU Y J, DUAN Y Q, et al. Characterization, Antioxidant, Antineoplastic and Immune Activities of Selenium Modified *Sagittaria sagittifolia* L. Polysaccharides [J]. Food Research International, 2022, 153: 110913-1-110913-16.

[26] JI X L, GUO J H, CAO T Z, et al. Review on Mechanisms and Structure-Activity Relationship of Hypoglycemic Effects of Polysaccharides from Natural Resources [J]. Science and Human Wellness, 2023, 12: 1969-1980.

[27] NIU G G, YOU G, ZHOU X Y, et al. Physicochemical Properties and in vitro Hypoglycemic Activities of Hsian-Tsao Polysaccharide Fractions by Gradient Ethanol Precipitation Method [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 231: 123274-1-123274-14.

(责任编辑:单 凝)