

龙牙百合多糖的理化性质研究 及结构表征

陈小蒙¹ 刘成梅²

1. 上海市贸易学校, 上海;

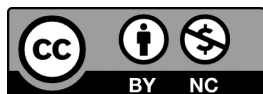
2. 南昌大学食品学院食品科学与技术国家重点实验室, 南昌

摘要 | 采用水提醇沉法从新鲜龙牙百合中提取出粗多糖, 经 DEAE-Sephrose Fast Flow 分离纯化出两种多糖 LLP₁、LLP₂, 再进行理化性质分析, 并用多种色谱手段对两种多糖进行结构表征。结果表明: LLP₁、LLP₂ 均易吸潮, 溶于热水和二甲亚砜, 不溶于有机溶剂, 糖醛酸含量分别为 4.02%、77.13%, 不含淀粉; 气相色谱分析显示 LLP₁ 单糖组成为甘露糖、葡萄糖和阿拉伯糖, 摩尔比为 18.60 : 25.14 : 1.00, LLP₂ 单糖组成为半乳糖、鼠李糖和阿拉伯糖, 摩尔比为 3.58 : 1.00 : 1.09; 红外光谱扫描、核磁共振分析共同表明 LLP₁ 为吡喃糖环, 含有 α 型和 β 型糖苷键, 含有少量糖醛酸, LLP₂ 为吡喃糖环, 含有 α 型糖苷键, 且为糖蛋白复合物; 高碘酸氧化和 Smith 降解反应结果显示 LLP₁ 主链含有大量 1 → 2 或 1 → 6 糖苷键和非还原末端糖基, 葡萄糖存在 1 → 3 糖苷键, LLP₂ 主链含有大量 1 → 2 糖苷键, 半乳糖以 1 → 3 糖苷键为主, 鼠李糖、阿拉伯糖不存在 1 → 3 糖苷键。

关键词 | 龙牙百合; 多糖; 理化性质; 结构表征

Copyright © 2021 by author (s) and SciScan Publishing Limited

This article is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



通讯作者: 刘成梅, 博士, 南昌大学教授, 博士生导师, E-mail: liuchengmei@aliyun.com。

文章引用: 陈小蒙, 刘成梅. 龙牙百合多糖的理化性质研究及结构表征 [J]. 社会科学进展, 2022, 4(3): 264-275.

<https://doi.org/10.35534/pss.0403023>

龙牙百合 (*Lilium brownii* var. *viridulum* Baker) 是卫计委审批通过的首批药食两用品, 含有丰富的多糖、多酚等功能成分。近年来百合多糖的保健功能引起了学者们的关注, 刘成梅^[1]等发现百合多糖对四氧嘧啶引起的糖尿病模型小白鼠有明显的降血糖作用; 李玉萍^[2]等发现百合多糖的抗糖尿病作用与促进胰岛 β 一细胞增殖和胰岛素分泌功能有关; Hou R 等^[3]研究发现百合多糖可明显提高小鼠机体固有细胞免疫和适应性细胞免疫的功能。

目前对于百合多糖的研究大多集中在提取、分离纯化和生物活性方面, 结构的研究集中在单糖组成和分子量上, 而对于构效关系研究非常有限。本文以龙牙百合多糖的两种纯化物 LLP₁、LLP₂ 为原料, 研究了百合多糖的基本理化性质, 用高碘酸氧化、Smith 降解、气相色谱 (GC)、红外光谱 (IR)、¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 光谱对纯化组分进行结构解析, 为从分子水平上阐明龙牙百合多糖组分与生物活性之间的关系、药理功能和作用机制提供重要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

龙牙百合多糖的两种纯化物 LLP₁、LLP₂, 由南昌大学食品学院食品科学与技术国家重点实验室提供; 鼠李糖、核糖、阿拉伯糖、木糖、岩藻糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖、半乳糖醛酸, Pharmacia。浓硫酸、盐酸羟胺、吡啶、醋酸酐、咪唑、蒽酮等, 国产分析纯。

1.2 仪器与设备

VIS-7200 紫外可见分光光度仪, 北京普析通用仪器责任有限公司; Milli-Q 超纯水仪, 美国 Millipore 公司; Labconco Free Zone 2L 冻干机, 美国 LABCONCO; Nicolet FT-IR 5700 型傅立叶红外光谱仪, Thermo Electron Corporation; Agilent 6890 气相色谱仪, 美国 Agilent 公司; Bruker-DMX-400MHz 核磁共振仪, Bruker 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 理化性质分析

溶解性：用水、乙醇、丙酮、正丁醇、二甲亚砜考察百合多糖溶解性。

I₂-KI 反应：称取百合多糖冻干品 2 mg，溶于 2 mL 蒸馏水，加入 1.2 mL 碘试剂（含 0.02% I₂ 的 0.2% KI 溶液），充分混匀后用紫外可见记录光谱仪于 200–700 nm 扫描^[4]。

糖醛酸含量测定：硫酸—咪唑法。取 7 支具塞比色管，依次加入 1 mL 浓度为 0 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL、200 μg/mL、300 μg/mL、400 μg/mL、500 μg/mL 的半乳糖醛酸标准溶液，在冰水浴中向各管加入 6 mL 浓硫酸、摇匀，于 85 °C 水浴中加热 20 min，取出后立即冷至室温，加 0.1% 咪唑无水乙醇溶液 0.2 mL、摇匀，于室温暗处保持 2 h，测定吸光度 A_{530 nm}，建立线性回归方程，取样品液 1 mL，用同样方法测定，通过线性计算糖醛酸含量。

1.3.2 单糖组成分析

(1) 气相色谱条件

分离柱，DB-1701 弹性石英毛细管柱（30 m × Φ 0.32 mm）；升温程序 160 °C 保持 2 min，以 10 °C /min 升温至 240 °C，保持 15 min；载气 N₂ 流速 2.1 mL/min，进样量 1 μL；分流比 1 : 20。

(2) 单糖糖脒乙酸酯衍生物的制备^[5]

取 8 种标准单糖加入盐酸羟胺 10 mg、内标物肌醇六乙酰酯 7 mg、无水吡啶 1 mL，90 °C 水浴中振荡加热 30 min，取出后冷至室温，加入 1 mL 无水醋酸酐，90 °C 下继续反应 30 min 进行乙酰化，冷却后加入 1 mL 超纯水搅拌，然后分别用 1 mL、0.5 mL 氯仿萃取 2 次，合并氯仿层，减压抽干后加入 1 mL 氯仿溶解，产物过 0.45 μm 微滤膜，滤液进行 GC 分析。LLP₁、LLP₂ 的硫酸水解产物按同样方法制备、分析。

1.3.3 高碘酸氧化

高碘酸钠消耗量标准曲线的绘制^[6]：分别配制 0.015 mol/L NaIO₄ 和 0.015 mol/L NaIO₃ 溶液，分别取适量 NaIO₄ 和 NaIO₃ 溶液以 5 : 0、4 : 1、3 : 2、

2 : 3、1 : 4 和 0 : 5 (V/V) 混合, 取混合液 0.4 mL 用水定容至 100 mL, 测吸光值 $A_{223\text{nm}}$, 以混合液中 NaIO_4 的浓度 (mol/L) 为横坐标, 以 $A_{223\text{nm}}$ 为纵坐标, 绘制标准曲线。

分别取 LLP_1 和 LLP_2 各 10 mg 溶于 20 mL 的 0.015 mol/L 高碘酸钠中, 置 4 °C 冰箱, 间或振摇, 于 24 h 间隔取样, 每次 0.4 mL, 用水定容至 100 mL, 测定吸光度 $A_{223\text{nm}}$, 直至吸光度基本稳定。通过标准曲线计算得每摩尔糖基 (以单糖残基数为基准) 消耗 IO_4^- 的量 (mol)。

同时取样 4.0 mL, 加 2 滴乙二醇, 放置 20 min, 以酚酞为指示剂, 用 0.01 mol/L NaOH 溶液滴定甲酸生成量, 测定 0.015 mol/L NaIO_3 溶液的吸光值 $A_{223\text{nm}}$, 将吸光度值与原 NaIO_4 溶液相比较, 根据 NaIO_4 浓度下降的数值, 推算出平均每个糖基所消耗 NaIO_4 的量。

1.3.4 Smith 降解及气相色谱分析

上述经高碘酸钠氧化的剩余样品溶液, 加 2 mL 乙二醇搅拌 30 min, 室温放置 2 h, 流水透析 48 h、蒸馏水透析 24 h, 浓缩后加入 40 mg KBH_4 , 室温暗处搅拌 24 h, 用 0.1 mol/L 的醋酸调 pH 值至 5.0, 流水透析 48 h、蒸馏水透析 24 h, 减压蒸干。加入 2 mol/L 三氟乙酸 3 mL, 真空封管后 100 °C 水解 8 h, 减压蒸干, 加入 3 mL 甲醇, 减压蒸干 3 次, 置真空干燥箱减压干燥过夜。加入 1 mL 吡啶、1 mL 醋酸酐, 真空封管后 100 °C 反应 1 h, 过 0.45 μm 微滤膜, 减压蒸干。加 0.5 mL 氯仿溶解, 进行气相色谱分析, 同时取 8 种标准单糖、赤藓醇、甘油各 3 mg 作为标准品, 同样处理后进行气相色谱分析, 色谱条件同单糖分析。

1.3.5 红外光谱分析

称取干燥的多糖样品 1 ~ 2 mg, KBr 研磨后压片, 用红外光谱仪在 400 ~ 4000 cm^{-1} 区内进行扫描, 初步分析多糖的构型^[7]。

1.3.6 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 光谱分析^[8]

取样品 30 mg, 冷冻干燥 72 h, 溶于 0.5 mL D_2O 中, 测定其 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 谱。

2 结果与讨论

2.1 百合多糖的理化性质

2.1.1 溶解性

LLP₁为白色絮状固体，极易吸潮。溶于水和二甲亚砜，尤易溶于热水，不溶于高浓度乙醇、甲醇、丙酮、乙酸乙酯、正丁醇等有机溶剂，水溶液呈透明黏稠状。LLP₂为淡黄色絮状固体，易吸潮，溶于热水和二甲亚砜，不溶于乙醇、甲醇、丙酮、乙酸乙酯、正丁醇等有机溶剂。

2.1.2 I₂-KI 反应

两种百合多糖的I₂-KI反应结果见图1，反应物在565 nm处均无最大吸收，说明两种多糖存在较长的侧链和较多的分枝。LLP₁、LLP₂的I₂-KI反应均呈阴性，说明不含淀粉。

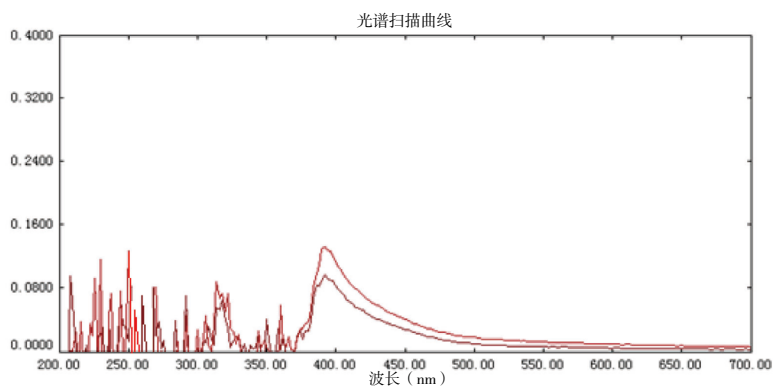


图1 LLP₁、LLP₂与碘试剂混合后的扫描光谱

Figure 1 Scanning spectrum of LLP₁ and LLP₂ mixed with iodine reagent

2.1.3 糖醛酸含量

由半乳糖醛酸标准曲线得回归方程：

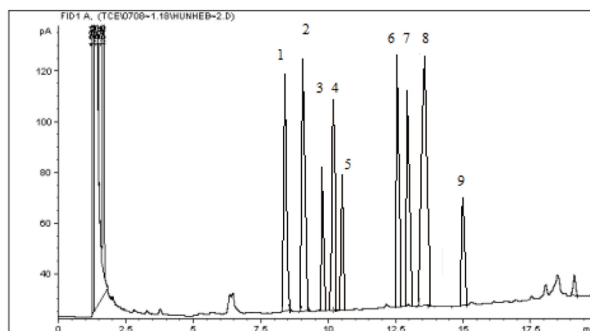
$$A_{530nm}=4.6817C-0.0586, \text{ 相关系数 } R^2=0.9912 \quad (1)$$

式中： A_{530nm} 为反应物吸光度值；C为半乳糖醛酸浓度， $\mu\text{g/mL}$ 。

用同样方法测定 LLP_1 、 LLP_2 半乳糖醛酸浓度，计算得 LLP_1 、 LLP_2 的糖醛酸含量分别为 4.02%、77.13%。

2.2 单糖组分分析

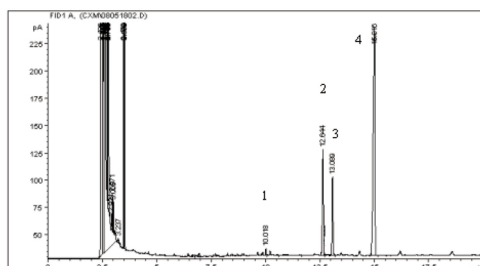
标准单糖 GC 分析结果见图 2， LLP_1 、 LLP_2 单糖组成的 GC 分析结果分别见图 3、4。通过保留时间定性分析， LLP_1 中主要含有甘露糖、葡萄糖和阿拉伯糖，其摩尔比为 18.60 : 25.14 : 1.00； LLP_2 主要含半乳糖、鼠李糖和阿拉伯糖，其摩尔比为 3.58 : 1.00 : 1.09。



1- 核糖；2- 鼠李糖；3- 岩藻糖；4- 阿拉伯糖；5- 木糖；6- 甘露糖；
7- 葡萄糖；8- 半乳糖；9- 内标

图 2 单糖混合物糖腈乙酸酯衍生物的 GC 图

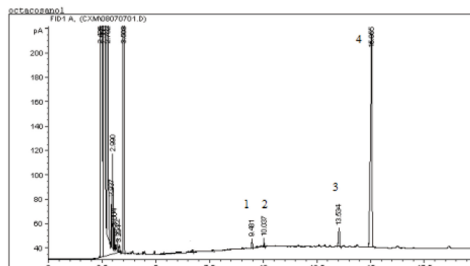
Figure 2 GC chart of monosaccharide mixture saccharonitrile acetate derivative



1- 阿拉伯糖；2- 甘露糖；3- 葡萄糖；4- 内标

图 3 LLP_1 水解产物气相色谱图

Figure 3 Gas chromatogram of LLP_1 hydrolysate



1- 鼠李糖；2- 阿拉伯糖；3- 半乳糖；4- 内标

图 4 LLP_2 水解产物气相色谱图

Figure 4 Gas chromatogram of LLP_2 hydrolysate

2.3 高碘酸氧化-Smith降解及气相色谱分析

2.3.1 高碘酸氧化

由高碘酸钠消耗量标准曲线得回归方程:

$$y=0.0079x+0.0946, \text{ 相关系数 } R^2=0.9992 \quad (2)$$

式中: y 为反应体系吸光度值; x 为高碘酸钠的浓度, mol/L。

多糖样品经高碘酸氧化完全后, 根据标准曲线算出每摩尔糖基消耗的高碘酸钠摩尔数, 并用 NaOH 滴定、算出每摩尔糖基产生的甲酸数, 结果见表 1。

表 1 高碘酸氧化过程中高碘酸钠消耗量和甲酸产生量

Table 1 Consumption of sodium periodate and production of formic acid during the oxidation of periodate

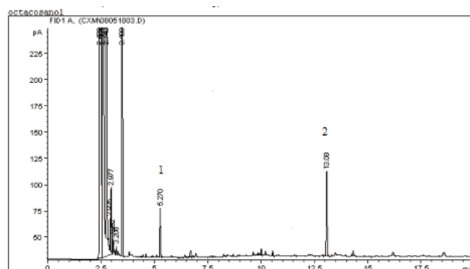
样品	LLP ₁	LLP ₂
高碘酸钠消耗量 (mol/mol 糖基)	0.83	0.62
甲酸生成量 (mol/mol 糖基)	0.21	0

由表 1 看出, LLP₁ 有甲酸生成, 而 LLP₂ 没有, 说明 LLP₁ 存在 1→6 位键合的糖基或非还原末端糖基, LLP₂ 没有该类型糖基; 两种多糖的高碘酸消耗量大于甲酸生成量的二倍, 说明含有只消耗高碘酸不产生甲酸的 1→2 糖苷键或 1→4 糖苷键; 两种多糖的高碘酸消耗量减去甲酸生成量均小于 1, 说明都含有不能被高碘酸氧化的 1→3 糖苷键。

2.3.2 Smith降解及气相色谱分析

图 5 显示, LLP₁ 的 Smith 降解产物检出大量甘油, 说明主链含有大量 1→2 或 1→6 键型; 葡萄糖的检出, 说明该单糖存在不被高碘酸氧化的 1→3 键型; 未检出赤藓醇说明不存在 1→4 糖苷键。

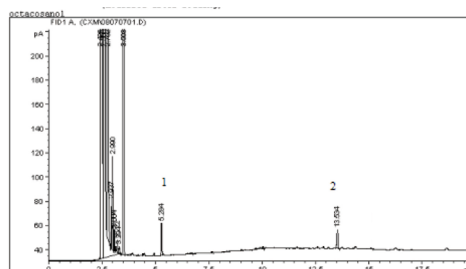
图 6 显示, LLP₂ 的 Smith 降解产物检出大量甘油, 说明主链以 1→2 或 1→6 键型为主, 但高碘酸氧化结果显示 LLP₂ 无甲酸生成, 因此判断 LLP₂ 主链以 1→2 键型为主。与未经氧化的样品相比, 半乳糖的检出说明该糖中的半乳糖以不被高碘酸氧化的 1→3 键型为主; 未检出赤藓醇说明不存在 1→4 糖苷键。



1- 甘油; 2- 葡萄糖

图5 LLP₁ Smith降解后GC分析结果

Figure 5 GC analysis results after degradation of LLP₁ Smith



1- 甘油; 2- 半乳糖

图6 LLP₂ Smith降解后GC分析结果

Figure 6 GC analysis results after degradation of LLP₂ Smith

2.4 红外光谱分析

4000 cm^{-1} ~ 1300 cm^{-1} 的频区是官能团区, 用于鉴别官能团的存在。LLP₁、LLP₂ 分别在 3417.3 cm^{-1} 和 3422.9 cm^{-1} 处有强且宽的吸收峰, 系多糖上的 O-H 形成分子间、内氢键; 2924.4 cm^{-1} 和 2926.5 cm^{-1} 附近的肩峰为饱和 C-H 伸缩振动的信号, 中等强度。3400 cm^{-1} 和 2900 cm^{-1} 左右的吸收峰为多糖类物质的特征峰。LLP₁ 在 1735.2 cm^{-1} 和 1637.7 cm^{-1} 处有较弱的吸收峰, LLP₂ 在 1743.5 和 1618 cm^{-1} 有很强的吸收峰, 均为 C=O 键的伸缩振动峰, 推断 LLP₁ 中含有少量糖醛酸, 而 LLP₂ 含有大量糖醛酸, 与硫酸-咔唑法测定结果一致。

LLP₁、LLP₂ 在 1200 ~ 1000 cm^{-1} 之间出现 3 个强吸收峰, 此为吡喃糖环特征吸收峰, 说明两种多糖属于吡喃糖。1060 cm^{-1} 附近出现的峰是常见的羟基和吡喃糖环内酯吸收产生的吸收峰, 是由于糖环 C-O-H 和 C-O-C 伸缩振动形成, 构成了糖类的特征吸收峰。

1300 cm^{-1} 以下频区是用于整个分子特征分析的指纹区。LLP₁ 在 890 cm^{-1} 和 810 cm^{-1} 附近有吸收峰, 表明其含有 α 型和 β 型糖苷键。LLP₂ 在 840 cm^{-1} 附近有明显的吸收峰表明其含有 α 型糖苷键; LLP₂ 在 638.3 cm^{-1} 附近有吸收峰, 说明 LLP₂ 存在酰胺键; LLP₂ 在 950 cm^{-1} 有吸收峰, 表明存在鼠李糖。

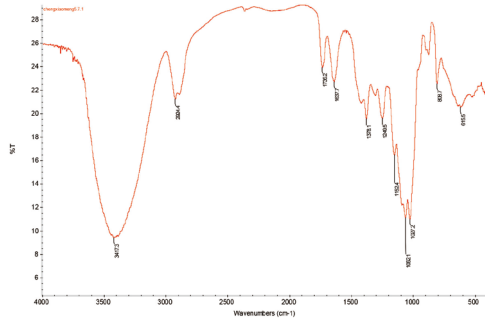


图7 LLP₁ 的红外光谱图

Figure 7 Infrared spectrum of LLP₁

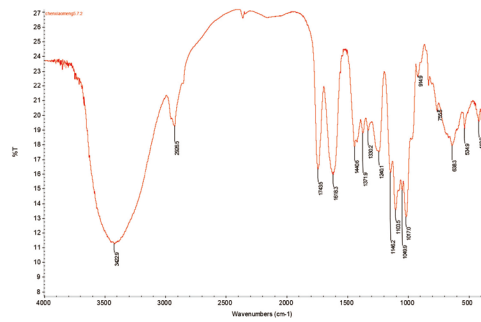


图8 LLP₂ 的红外光谱图

Figure 8 Infrared spectrum of LLP₂

2.5 核磁共振谱分析结果

2.5.1 LLP₁ 和 LLP₂ 的 ¹H NMR 光谱结果分析

在异头质子区 (δ 4.7–5.5 ppm), LLP₁ 在 δ 4.71 处有明显的信号峰, 表明 LLP₁ 主要含有 β 型糖苷键, 同时在 δ 5.37 和 δ 5.45 处有微弱的信号峰, 说明 LLP₁ 含有少量 α 型糖苷键; LLP₂ 在 δ 5.04 和 δ 5.11 处有较强的信号峰, 说明 LLP₂ 主要含有 α 型糖苷键。

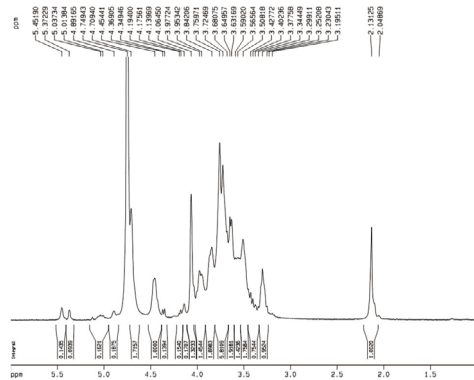


图9 LLP₁ 的 ¹H NMR 图谱

Figure 9 ¹H NMR spectrum of LLP₁

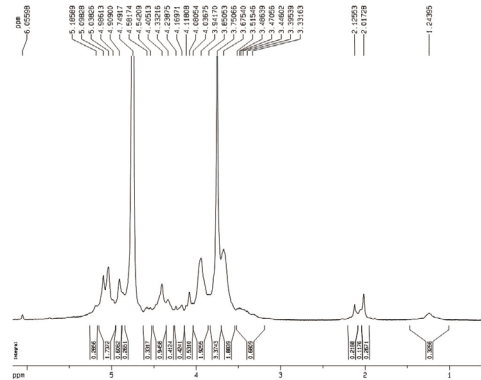


图10 LLP₂ 的 ¹H NMR 图谱

Figure 10 ¹H NMR spectrum of LLP₂

2.5.2 LLP₁ 和 LLP₂ 的 ¹³C NMR 光谱结果分析

LLP₁ 的 ¹³C NMR 谱中, 异头碳出现 3 个主要的谱峰 (100.12 ppm、100.27 ppm、

102.63 ppm), 说明含有 α 型和 β 型糖苷键; 77–81 ppm 之间组峰为 C₃、C₄ 位被取代后形成的峰, 70–77 ppm 之间组峰为 C₂、C₃、C₄ 或 C₅ 位未被取代后形成的峰, 60.27 ppm 为 C₆ 位未被取代后形成的峰。

LLP₂ 的 ¹³C NMR 谱中, 异头碳的化学位移小于 103 ppm, 说明含有 α 型糖苷键; 谱图中出现羰基吸收峰 (170.95 ppm), 为糖醛酸羧基的特征信号, 进一步证实了 LLP₂ 存在糖醛酸; δ 52.99 ppm 处强烈的谱峰是蛋白质中氨基酸残基的化学位移信号, 说明 LLP₂ 中存在蛋白质; δ 20.5 ppm 处见碳信号, 说明 LLP₂ 中含甲基糖。

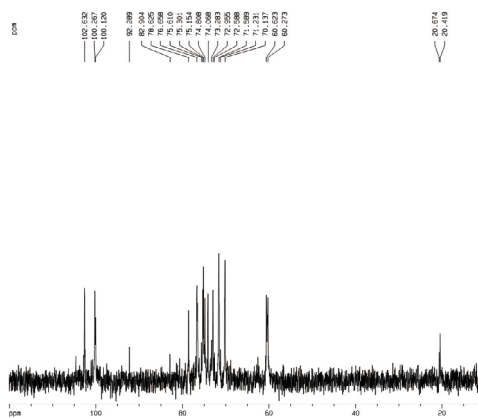


图 11 LLP₁ 的 ¹³C NMR 图谱

Figure 11 ¹³C NMR spectrum of LLP₁

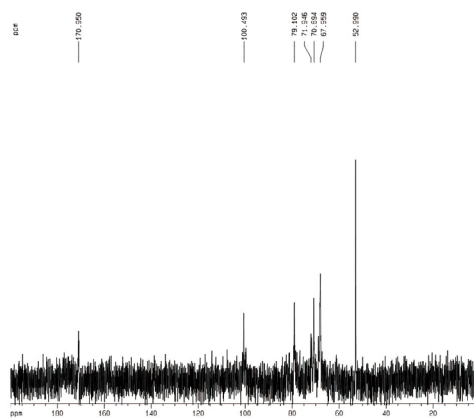


图 12 LLP₂ 的 ¹³C NMR 图谱

Figure 12 ¹³C NMR spectrum of LLP₂

3 结论

根据文献报道^[9], 多糖中糖醛酸的含量、有无结合蛋白、糖苷键的结合形式等与其生物活性密切相关, 分子结构的微小变化都会影响活性。经过一系列的化学及色谱分析方法, 发现两种百合多糖在结构上有较大区别。LLP₁ 含有少量糖醛酸, 由甘露糖、葡萄糖和阿拉伯糖组成, 主链含有大量 1→2 或 1→6 键型、非还原末端糖基, 且含有 α 和 β 两种类型的糖苷键; LLP₂ 含有大量糖醛酸, 且为糖蛋白复合物, 由半乳糖、鼠李糖和阿拉伯糖组成, 主链含有大量 1→2 键型, 含有 α 型糖苷键。本次研究结果为分析龙牙百合多糖组分与生物活性之间的关

系、药理功能和作用机制提供重要的理论依据。

参考文献

- [1] 刘成梅, 付桂明, 涂宗财, 等. 百合多糖降血糖功能研究 [J]. 食品科学, 2002, 23 (6): 113.
- [2] 李玉萍, 皮小芳, 刘成梅, 等. 百合多糖降糖作用机理的体外研究 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23 (8): 1964-1966.
- [3] Hou R, Chen J, Yue C, et al. Modification of lily polysaccharide by selenylation and the immune-enhancing activity [J]. Carbohydr Polym. 2016, 5 (142): 73-81.
- [4] 李志孝, 刘方明, 孟延发, 等. 鬼臼葡聚糖的化学结构 [J]. 化学学报, 1996 (54): 1037-1040.
- [5] 康学军, 曲见松, 顾忠泽. 白芷多糖的分析 [J]. 分析化学, 2006, 34 (4): 533-535.
- [6] Ghosh K, Chandra K, Roy S K, et al. Structural investigation of a polysaccharide (Fr. I) isolated from the aqueous extract of an edible mushroom, *Volvariella diplasia* [J]. Carbohydrate Research, 2008, 343 (6): 1071-1078.
- [7] Kumar C G, Joo H S, Choi J W, et al. Purification and characterization of an extracellular polysaccharide from haloalkalophilic *Bacillus*. Enzyme and Microbial Technology, 2004, 34 (7): 673-681.
- [8] Qiao D L, Liu J, Ke C L, et al. Structural characterization of polysaccharides from *Hyriopsis cumingii* [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 82 (4): 1184-1190.
- [9] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术 [M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999.

Study on Physicochemical Properties and Structural Characterization of Polysaccharides from *Lilium Longya*

Chen Xiaomeng¹ Liu Chengmei²

1. Shanghai Trade School, Shanghai;

2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang

Abstract: Crude polysaccharides were extracted from fresh *Lilium longya* by water extraction and alcohol precipitation. Two polysaccharides LLP₁ and LLP₂, were isolated and purified by DEAE-Sepharose Fast Flow, and their physicochemical properties were analyzed, and the structures of the two polysaccharides were characterized by various chromatographic methods. The results showed that both LLP₁ and LLP₂ were easy to absorb moisture, soluble in hot water and dimethyl sulfoxide, but insoluble in organic solvents, and the uronic acid content was 4.02% and 77.13% respectively, without starch. Gas chromatographic analysis showed that LLP₁ monosaccharides were composed of mannose, glucose and arabinose, with a molar ratio of 18.60, 25.14, and 1.00, LLP₂ monosaccharides were galactose, rhamnose and arabinose, with a molar ratio of 3.58 to 1.00 and 1.09. Infrared scanning and nuclear magnetic resonance analysis show that LLP₁ is a glucopyranose ring, contains α -type and β -type glycosidic bonds, contains a small amount of uronic acid, LLP₂ is a glucopyranose ring, contains α -type glycosidic bonds, and is a glycoprotein complex. The results of periodate oxidation and Smith degradation showed that there were a large number of 1² or 1⁶ glycosidic bonds and non-reducing terminal glycosidic bonds in LLP₁ main chain, 1³ glycosidic bonds in glucose, 1² glycosidic bonds in LLP₂ main chain, 1³ glycosidic bonds in galactose, and no 1³ glycosidic bonds in rhamnose and arabinose.

Key words: *Lilium longya*; Polysaccharides; Physicochemical properties; Structural characterization