

# 轮叶党参多糖的分离纯化及结构研究

## Isolation, purification and structure analysis of polysaccharide from lance asiabell root

刘艳秋 王亚茹 毛迪锐 常凯

LIU Yanqiu WANG Yaru MAO Dirui CHANG Kai

(北华大学林学院, 吉林 吉林 132013)

(Forestry College of Beihua University, Jilin, Jilin 132013, China)

**摘要:**目的:确定轮叶党参多糖组分 1(CLPSI)结构,为轮叶党参多糖活性研究和天然植物多糖的开发提供依据。方法:经提取、分离纯化后获得组分 CLPSI,利用气相色谱、红外光谱、核磁共振、高碘酸氧化、Smith 降解和甲基化分析方法等确定 CLPSI 结构。结果:CLPSI 比旋光度为右旋  $44^\circ$ ,总糖含量为 97.6%,糖醛酸为 13.18%;相对分子质量为 91.7,CLPSI 单糖组成为阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、半乳糖醛酸、甘露糖,摩尔比为 2.7 : 3.4 : 2.3 : 1.1 : 0.5。CLPSI 中存在葡萄糖醛酸,分子中含有吡喃糖并且存在  $\alpha$ -和  $\beta$ -构型。主链主要由阿拉伯糖和半乳糖组成,半乳糖和葡萄糖构成支链和主链的末端残基;半乳糖分支点糖残基是葡萄糖(1 $\rightarrow$ 4,6)、半乳糖(1 $\rightarrow$ 3,6);半乳糖有 1 $\rightarrow$ 6、1 $\rightarrow$ 3,6、1 $\rightarrow$ 、1 $\rightarrow$ 3、1 $\rightarrow$ 4 键型;葡萄糖有 1 $\rightarrow$ 、1 $\rightarrow$ 4、1 $\rightarrow$ 4,6 键型;阿拉伯糖为 1 $\rightarrow$ 5 键型,半乳糖醛酸为 1 $\rightarrow$ 3 键型。结论:CLPSI 为一种结构复杂的酸性多糖。

**关键词:**轮叶党参;多糖;水提醇沉;柱层析;结构特征

**Abstract: Objective:** The structure of CLPSI (polysaccharide fraction 1 of *Codonopsis lanceolata*) was determined to provide a basis for the study of polysaccharide activity of *C. lanceolata* and the development of natural plant polysaccharides. **Methods:** After extraction, separation, and purification, the separation component CLPSI was determined by gas chromatography, infrared spectroscopy, nuclear magnetic resonance, periodate oxidation, Smith degradation, and methylation analysis to determine the structure of CLPSI. **Results:** The specific rotation of CLPSI is  $+44^\circ$ , the content of the total polysaccharide is 97.6%, the uronic acid of CLPSI is 13.18%, and the molecular

weight of CLPSI is 91.7. The monosaccharide component of CLPSI contains Ara, Gal, Glc, GalA. The molar ratio is 2.7 : 3.4 : 2.3 : 1.1 : 0.5. Chemical composition and structure of polysaccharide CLPSI was studied by infrared spectrum, NMR, partial hydrolysis with acid degradation, Smith, methylation and GC-MS. The results showed that monosaccharide compositions of CLPSI contained GluA and pyranose, while pyranose included both  $\alpha$ -pyranoside and  $\beta$ -pyranoside in structure. The backbone was composed of Ara and Gal, the branched with Gal and the terminal residues of backbone with Glu. Branch point of Gal residues is linked by Glc (1 $\rightarrow$ 4,6); Gal (1 $\rightarrow$ 3,6); Gal contains 1 $\rightarrow$ ,1 $\rightarrow$ 3,1 $\rightarrow$ 4,1 $\rightarrow$ 6,1 $\rightarrow$ 3,6; Gal contains 1 $\rightarrow$ ,1 $\rightarrow$ 3,1 $\rightarrow$ 4,1 $\rightarrow$ 6,1 $\rightarrow$ 3,6; Glc contains 1 $\rightarrow$ ,1 $\rightarrow$ 4,1 $\rightarrow$ 4,6; Ara contains 1 $\rightarrow$ 5; Galacturonic acid 1 $\rightarrow$ 3. **Conclusion:** CLPSI is a complex acidic polysaccharide. The structure analysis of *C. lanceolata* polysaccharides is the basis for studying the structure-activity relationship of *C. lanceolata* polysaccharides, which is of great significance for understanding the biological activity and mechanism of *C. lanceolata* polysaccharides.

**Keywords:** lance asiabell root; polysaccharide; water extraction and alcohol precipitation; column chromatography; structural characteristics

轮叶党参(*Codonopsis lanceolata* Benth. et. Hook. f) 又称山胡萝卜、北沙参等,为桔梗科党参属多年生缠绕性藤本植物。主要分布在中国东北、华北和华东地区以及朝鲜、日本和俄罗斯等地<sup>[1]</sup>。轮叶党参多生长在沟边、灌木林下或阔叶林内,主要食用部位为根,具有较高的营养价值<sup>[2-3]</sup>。随着科技的进步,轮叶党参活性成分的研究已经取得了一定进展,当前对轮叶党参功能性成分研究主要集中在皂苷、黄酮和生物碱类物质,具有降血脂、降胆固醇、减肥、调节胃肠道和改善记忆等作用<sup>[4-6]</sup>。

多糖是由若干个单糖分子由端基碳原子连接形成的高分子化合物,分子结构含有多种苷键类型<sup>[7-8]</sup>,具有广

**基金项目:**吉林省自然科学基金(面上项目)(编号:20230101246JC);吉林省教育厅科学研究项目(编号:JJKH20230076KJ)

**作者简介:**刘艳秋,女,北华大学讲师,博士。

**通信作者:**常凯(1975—),男,北华大学副教授,硕士。

E-mail:532029059@qq.com

收稿日期:2023-06-20

改回日期:2023-08-20

泛的生物活性,是开发药物、功能性食品的重要来源之一。多糖对保持细胞活性、增强免疫器官功能、维持细胞正常生命代谢具有重要意义。目前关于轮叶党参的研究主要集中在粗多糖提取方法及生物活性,对轮叶党参多糖的分离纯化、结构分析以及分离组分的生物活性研究较少。根据文献[9],利用热水浸提得到的轮叶党参多糖含量为8.50%。轮叶党参粗多糖可显著增强小鼠单核巨噬细胞系统的吞噬功能,对提高小鼠免疫力具有一定作用,2 g/kg 轮叶党参粗多糖对小鼠移植瘤 S180 抑制率为54%<sup>[10]</sup>。

研究拟以吉林省长白山区轮叶党参为原料,利用水提醇沉、脱脂、脱蛋白、脱色、DEAE-纤维素阴离子柱层析、Sephadex S-300 葡聚糖柱层析等方法制备轮叶党参多糖组分,利用物理、化学方法结合波谱分析揭示轮叶党参多糖结构特征,以期为进一步研究轮叶党参多糖结构与活性的关系提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

轮叶党参:吉林省长白山区轮叶党参种植基地;

L(+)-阿拉伯糖、L(+)-鼠李糖、D(+)-木糖、D(+)-半乳糖、D(+)-木糖、D(+)-甘露糖:优级纯,美国 Sigma 公司。

### 1.2 仪 器 与 设 备

气相色谱仪:GC-14C 型,日本岛津公司;

高效液相色谱仪:LC-10A 型,日本 Shimadzu 公司;

数显恒温水浴锅:HH-2 型,江苏省金坛市科技仪器有限公司;

旋转蒸发器:E-52 型,上海医疗器械厂;

高速离心机:LG10-2.4A 型,北京医用离心机厂。

### 1.3 方 法

#### 1.3.1 轮叶党参多糖的制备

(1)粗多糖提取:轮叶党参多糖提取条件为超声功率147 W、超声时间15 min、纤维素酶酶解温度45 ℃、加酶量0.7%、酶解 pH 值4.5<sup>[11]</sup>,过滤后,减压浓缩加入4倍无水乙醇沉淀,冷冻干燥得轮叶党参粗多糖。

(2)轮叶党参多糖纯化:将轮叶党参粗多糖经无水乙醇脱脂、活性炭脱色、木瓜蛋白酶酶解后再用 Sevag 法处理4次,DEAE-52 纤维素离子柱层析得到3个主要组分轮叶党参多糖组分1(CLPS1)、轮叶党参多糖组分2(CLPS2)和轮叶党参多糖组分3(CLPS3),分离所得的3种多糖 CLPS1 占48.3%、CLPS2 占40.5%、CLPS3 占8.15%<sup>[12]32-40</sup>。

(3)Sephadex S-300 葡聚糖凝胶柱层析:经 DEAE-52 纤维素离子柱层析得到的组分进一步用 Sephadex S-300 葡聚糖柱层析洗脱,各组分分别溶于少量蒸馏水中,装样,柱规格为  $\Phi$  1.6 cm  $\times$  30 cm,洗脱液为 0.1 mol/L

NaCl,洗脱速度为 0.5 mL/min,分别收集洗脱液,利用苯酚-硫酸法测定多糖含量。

1.3.2 CLPS1 比旋光度的测定 准确称取一定量的 CLPS1,配制成质量浓度为 1 mg/mL 的多糖溶液。调节温度 20 ℃,按式(1)计算 CLPS1 的比旋光度。

$$[\alpha]_b = \frac{a \times 100}{l \times c}, \quad (1)$$

式中:

$l$ ——旋光管长度, dm;

$c$ ——100 mL 溶液中含有的样品质量, g;

$t$ ——测定时的温度, ℃;

$\lambda$ ——钠光谱的 D 线(589.3 nm);

$a$ ——测定的旋光度值;

$[\alpha]$ ——比旋光度。

1.3.3 糖醛酸含量测定 采用硫酸-吡啶法。在 9 支刻度试管中分别加入质量浓度为 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80  $\mu$ g/mL 的半乳糖醛酸标准液 2 mL,缓慢加入 12 mL  $H_2SO_4$ ,充分混匀,沸水浴加热 10 min,冷却至 20 ℃,分别取 1 mL 0.15% 吡啶试剂加入到上述 9 支刻度试管中,混合均匀,放置 30 min,在 530 nm 处测定吸光度,以糖醛酸浓度为横坐标、吸光度为纵坐标绘制标准曲线。

取样品溶液 2 mL,按照上述标准曲线测定方法,平行测定 3 次取平均值,根据标准曲线计算糖醛酸含量。

1.3.4 CLPS1 分子量的测定 精确量取 5.0 mg CLPS1 溶于 1 mL 0.7%  $Na_2SO_4$  中,充分溶解后,用直径为 0.45  $\mu$ m 过滤膜过滤,取 10  $\mu$ L 糖品进样,利用 HPLC 分析<sup>[12]40-72</sup>。

采用 CLASS VP HPLC 数据分析工作站;示差折光检测器为 SHIMADZU RID-10A;分子排阻色谱柱为 G3000 PWXL 7.8 mm(ID)  $\times$  30.0 cm(L);流动相为 0.7%  $Na_2SO_4$ ;流速为 0.5 mL/min;柱温为 40 ℃;按上述方法进行葡聚糖标准品。以信号强度为纵坐标和保留时间为横坐标绘制标准曲线,按照标准曲线计算 CLPS1 平均相对分子量。

1.3.5 单糖组成分析 采用气相色谱法。根据文献[13]修改如下:准确称取 CLPS1 30.0 mg、2 mol/L 三氟乙酸(TFA)2 mL 放入水解管中,真空密封,120 ℃水解 3 h,取 0.5 mL 乙醇加入到水解液中。待水解完全后加入 1 mg 肌醇和 1 mL 0.1 mol/L  $Na_2CO_3$ ,30 ℃恒温 50 min,加入 50 mg  $KBH_4$ ,25 ℃保持 1.5 h,用乙酸调节 pH 至中性,在温度 40 ℃,真空度为 0.06 MPa 条件下干燥 1 h,加 1 mL 正丙胺和 1 mL 吡啶,55 ℃反应 30 min 后干燥,再次加入 0.5 mL 吡啶和 0.5 mL 乙酸酐,90 ℃保温 1 h,然后经低温真空干燥得到样品,再用二氯甲烷溶解,取上清液进行气相色谱(GC)测定。

色谱柱为 Rtx2330 石英毛细管柱(30 m  $\times$  0.32 mm  $\times$

0.2 mm); 气化室温度为 250 °C; FID 氢焰检测器; 程序升温为 170 °C, 保持 2 min, 以 8 °C/min 升至 240 °C, 保持 1 min, 再以 8 °C/min 升至 265 °C, 保持 20 min; 进样温度为 275 °C; 检测器温度为 300 °C; 进样量 1 μL; 载气为氮气; 流速为 1.5 mL/min。

1.3.6 红外光谱(FT-IR)分析 根据文献[14]。

1.3.7 NMR 分析 将 10 mg CLPS1 溶于 1 mL D<sub>2</sub>O 中, 利用核磁共振仪测定 <sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR 谱<sup>[15]</sup>。

1.3.8 部分酸水解 称 CLPS1 125 mg 置于试管内, 加入 2.5 mL 蒸馏水和 2.5 mL 0.1 mol/L 三氟乙酸溶液, 充分混匀, 95 °C 水解 8 h。快速降温至 20 °C, 4 000 r/min 离心 10 min, 干燥沉淀。上清液用蒸馏水透析 24 h, 袋外透析液浓缩, 调整 pH 至中性, 真空干燥。袋内液加 5 倍体积无水乙醇, 醇沉 8 h, 4 000 r/min 离心 10 min, 上清液和沉淀分别冷冻干燥, 将所有干燥样品用气相色谱分析。

1.3.9 高碘酸氧化 根据文献[16]修改如下: 准确称取 CLPS1 10 mg, 用少量蒸馏水溶解, 加入 30 mmol/L NaIO<sub>4</sub> 0.5 mL 定容至 10 mL, 20 °C 避光反应, 每隔 6 h 取 0.1 mL 样液至氧化完全为止。反应液稀释 250 倍, 以蒸馏水作对照, 在波长 223 nm 处测光密度值, 计算高碘酸的消耗量。

以溴甲酚红作指示剂, 用 0.005 mol/L NaOH 滴定 2 mL 反应液, 计算甲酸生成量。

1.3.10 Smith 降解 溶液用流水和蒸馏水分别透析 24 h, 浓缩, 加入 NaBH<sub>4</sub> 反应 10 h。用 50% HAc 中和至 pH 为 7, 流水及蒸馏水透析 24 h。取 1/3 干燥后用于气相色谱分析, 剩余 2/3 用于 Smith 降解。

加入 1 : 1 体积比的 1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 °C 水解 40 h, BaCO<sub>3</sub> 调整 pH 为 6, 过滤, 滤液用蒸馏水透析 48 h, 袋外部分干燥做气相色谱分析, 袋内加乙醇, 8 h 后离心, 上清液及沉淀部分分别干燥后做气相色谱分析。

1.3.11 酯化还原反应 准确称取 N-环己基-3-(2-吗林代己基)碳二亚胺对甲苯磺酸盐 0.75 g 加入 30 mL 1 mg/mL CLPS1 水溶液中, 用 0.01 mol/L HCl 调 pH 至 4.75。反应 3 h 后, 加入 15 mL 2 mol/L KBH<sub>4</sub>, 用 4 mol/L HCl 调 pH 值至中性, 蒸馏水透析 3 d, 减压干燥, 重复反应, 直至还原产物无半乳糖醛酸。将干燥过的还原产物甲基化 3 次, 至甲基化完全, 得到 N-环己基-3-(2-吗林代己基)碳二亚胺酯化还原后的甲基化产物。

1.3.12 甲基化分析 根据文献[17]修改如下:

(1) CLPS1-二甲亚砜溶液的制备: 称取 CLPS1 20.0 mg, 溶于 6 mL 二甲亚砜(DMSO)中, 充入惰性气体 N<sub>2</sub> 封管, 使 CLPS1 充分溶解。

(2) NaOH-DMSO 混悬液的制备: 将 240 mg 的 NaOH 与 6 mL DMSO, 充 N<sub>2</sub> 密封, 研磨充分形成混悬液。

(3) 甲基化: 将 NaOH-DMSO 混悬液加入 CLPS1-

DMSO 溶液中, 充 N<sub>2</sub> 密封, 磁力搅拌 1.5 h, 加入 3.6 mL 碘甲烷, 密封, 反应 7 min 后加入 6 mL 蒸馏水, 产物流水透析 24 h, 蒸馏水透析 24 h。

(4) 萃取甲基化多糖: 将反应液浓缩至 10 mL, 加入 10 mL CHCl<sub>3</sub>, 充分振荡 30 min, 萃取甲基化多糖。用蒸馏水充分洗涤萃取液, 真空干燥除去 CHCl<sub>3</sub> 至 1 mL。

(5) 水解反应: 将甲基化的多糖, 加 1 mL 85% HCOOH, 充 N<sub>2</sub> 封管, 沸水反应 5 h, 然后加调整 pH 为中性, 低温真空干燥, 再加入 2 mL 2 mol/L C<sub>2</sub>HF<sub>3</sub>O<sub>2</sub>, 沸水水解 6 h, 调整 pH 为中性后除去乙醇。

(6) 还原反应: 加入 70 mg NaBH<sub>4</sub> 反应 24 h, 常温搅拌; 然后加入少量强酸性阳离子交换树脂, 搅拌 2 h 后过滤, 向滤液中加入甲醇去除硼酸至 pH 7, 低温真空干燥。

(7) 乙酰化: 加乙酰酐 0.5 mL、吡啶 0.5 mL, 100 °C 反应 2 h 后低温真空干燥。

1.3.13 数据分析 利用 Excel 整理数据, 采用 Microsoft Visio 软件绘图, IBM SPSS Statistics25 软件对数据进行分析处理, 各试验重复 3 次。

## 2 结果与讨论

### 2.1 Sephadex S-300 葡聚糖凝胶柱层析

图 1~图 3 为轮叶党参多糖经 DEAE-52 纤维柱层析后, 由 Sephadex S-300 葡聚糖柱色谱用蒸馏水洗脱得到的 3 个洗脱峰, 分别对应 CLPS1、CLPS2、CLPS3 3 种多糖, 其保留率分别为 94.12%, 92.31%, 90.50%。CLPS1、CLPS2、CLPS3 多糖洗脱曲线均为单一洗脱峰, 并且峰形呈对称状态, 证明每种组分为均一多糖。经前期试验<sup>[18]</sup>得出, CLPS1、CLPS2、CLPS3 组分对 DPPH· 清除能力的 IC<sub>50</sub> 值分别为 (3.04 ± 0.35), (3.87 ± 0.36), (4.21 ± 0.12) mg/mL, CLPS1 的抗氧化性强于 CLPS2 和 CLPS3。

### 2.2 糖醛酸含量测定

图 2 为所得的半乳糖醛酸标准曲线。回归方程为:  $Y=0.0078X-0.0185$ ,  $R^2=0.9992$ 。经测得 CLPS1 总

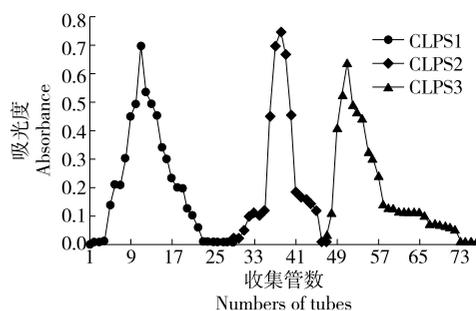


图 1 CLPS1、CLPS2 和 CLPS3 Sephadex S-300 葡聚糖凝胶层析曲线

Figure 1 Elution pattern of CLPS1, CLPS2 and CLPS3 on Sephadex S-300

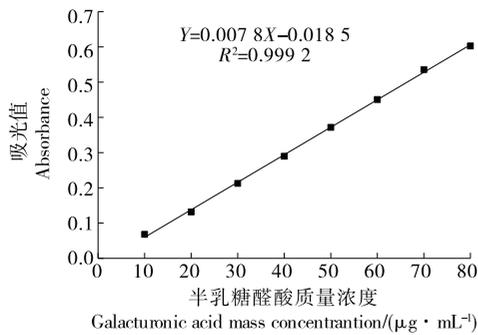


图2 半乳糖醛酸标准曲线

Figure 2 The standard curve of galacturonic acid

糖含量为 97.6%，糖醛酸为 13.18%，说明得到的 CLPS1 组分纯度较高。温度 20 ℃ 时，光源为 D 钠光，波长 589.3 nm，CLPS1 比旋光度为右旋 44.0。

### 2.3 CLPS1 相对分子质量分析

多糖的相对分子质量是影响多糖活性、水溶液状态及其构型主要因素之一，由图 3 可知，在保留时间为 11.156 min 时出峰，洗脱峰所对应的相对分子质量为 91.7，此时色谱图峰型呈对称状态，较狭窄，说明纯度较高，相对分子质量分布范围较小。

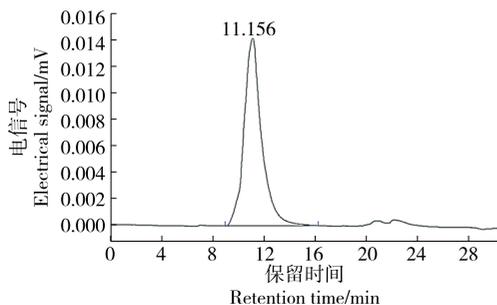


图3 CLPS1 高效液相色谱图横坐标

Figure 3 HPLC of the CLPS1

### 2.4 单糖组成分析

采用气相色谱法对 CLPS1 单糖组成进行分析(图 4)，CLPS1 水解后检测出 5 种单糖成分，根据保留时间判断单糖分别是阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、半乳糖醛酸和甘露糖，其摩尔比为 2.7 : 3.4 : 2.3 : 1.1 : 0.5。葡萄糖和阿拉伯糖为主要成分，甘露糖含量最低，与对照组相比纯化后的多糖没有杂质。

### 2.5 CLPS1 的红外光谱分析

由图 5 可知，CLPS1 红外光谱图出现与糖类结构相关的特征吸收峰，3 388  $\text{cm}^{-1}$  处的强吸收峰为 O—H 伸缩振动，因为多糖分子含有大量羟基，形成的分子内和分子间氢键使在 3 388  $\text{cm}^{-1}$  处的峰特别宽。2 911  $\text{cm}^{-1}$  处出现的吸收峰为 C—H 伸缩振动，1 371  $\text{cm}^{-1}$  处吸收峰为 C—H 的特征吸收峰，在 1 636  $\text{cm}^{-1}$  处强吸收峰为羧基离子的特征吸收峰，在 1 415  $\text{cm}^{-1}$  的弱吸收峰是 C—H 的

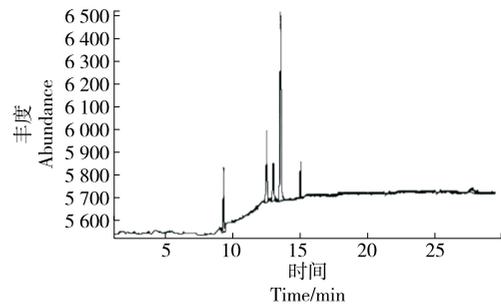


图4 CLPS1 的气相色谱图

Figure 4 The result of CLPS1 by gas chromatogram

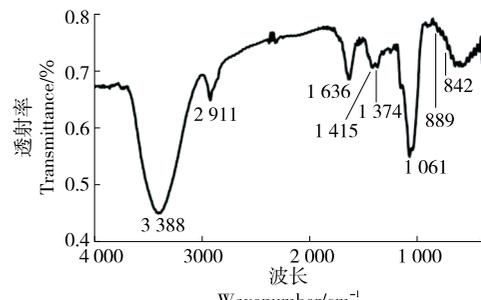


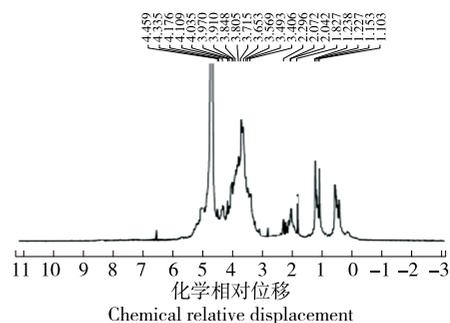
图5 CLPS1 的红外光谱分析

Figure 5 Infrared spectrum analysis of CLPS1 polysaccharide

变角振动，说明有醇类物质存在，表明在 CLPS1 中存在糖醛酸。在 1 061  $\text{cm}^{-1}$  处出现的吸收峰是糖环骨架 C—O 和 C—O—C 的伸缩振动为吡喃糖特征吸收峰。在 842，889  $\text{cm}^{-1}$  处出现特征吸收峰说明存在  $\alpha$ -构型和  $\beta$ -构型。根据红外光谱特征峰表明 CLPS1 为酸性均一吡喃糖，结构中含有半乳糖醛酸、 $\beta$ -构型的多糖抗氧化能力可能显著提高<sup>[19]</sup>。

### 2.6 CLPS1 的 $^1\text{H}$ NMR 分析

采用核磁共振对 CLPS1 碳的基本骨架分析，由图 6 可知，CLPS1 化学位移在  $\delta_{\text{H}}$  0 与  $\delta_{\text{H}}$  5.0 之间。高场区为  $\delta_{\text{H}}$  2.11 与  $\delta_{\text{H}}$  2.12，说明结构中有 O—乙酰基，在低场区  $\delta_{\text{H}}$  5.19 有强信号，为呋喃型的  $\alpha$ -L-阿拉伯糖异头质子，阿拉伯糖质子信号主要集中在  $\delta_{\text{H}}$  5.1 与  $\delta_{\text{H}}$  5.5。在  $\delta_{\text{H}}$  5.05 左右处为  $\alpha$ -D-半乳糖醛酸异头质子。 $\delta_{\text{H}}$  3.90 处的强信

图6 CLPS1 的  $^1\text{H}$  NMR 图谱Figure 6  $^1\text{H}$  NMR spectrum of CLPS1

号为半乳糖醛酸的异头质子信号,这与单糖测定及红外光谱检测到的半乳糖醛酸在  $1\ 636,1\ 415\ \text{cm}^{-1}$  处出现吸收峰结果一致,均证实了有半乳糖醛酸和阿拉伯糖的存在,CLPS1 为酸性多糖。

### 2.7 CLPS1 的 $^{13}\text{C}$ NMR 分析

由图 7 可知,高场区出现甲基峰其化学位移  $\delta_{\text{C}}\ 17.603$ ,  $\delta_{\text{C}}\ 21.709$  出现信号峰说明有乙酰基,  $\delta_{\text{C}}\ 26.013$  出现信号峰说明存在 O-乙酰基,表明乙酰基取代在 CLPS1 残基的不同位置,  $\delta_{\text{C}}\ 77.745$  表明半乳糖中存在 C-4 取代。

### 2.8 部分酸水解产物分析

利用部分酸水解法对 CLPS1 组成进行分析,部分酸水解后结果如图 8 所示。对 CLPS1 部分酸水解液直接离心,沉淀中有半乳糖、阿拉伯糖和微量的半乳糖醛酸,说明 CLPS1 主链主要由阿拉伯糖和半乳糖组成;从袋外透析液中检测出半乳糖和葡萄糖,说明支链和主链的末端残基是半乳糖和葡萄糖;经袋内醇沉后,在上清液中检出半乳糖、葡萄糖和微量的半乳糖醛酸,证明 CLPS1 支链或主链边缘含有半乳糖和葡萄糖;袋内醇沉、离心后,沉淀中检出半乳糖和阿拉伯糖,说明 CLPS1 主要结构是由半乳糖和阿拉伯糖组成的。研究<sup>[20]</sup>证明,单糖种类较多的多糖可能对神经炎起到对抗作用,琵琶甲多糖由甘露糖、鼠李糖、氨基葡萄糖、葡萄糖醛酸等 10 种单糖组成,  $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$  的琵琶甲多糖对脂多糖诱导的小鼠小胶质瘤细胞有一定抑制作用。

### 2.9 CLPS1 高碘酸氧化与 Smith 降解

由表 1 可知,经完全酸水解后,水解液中检测出甘

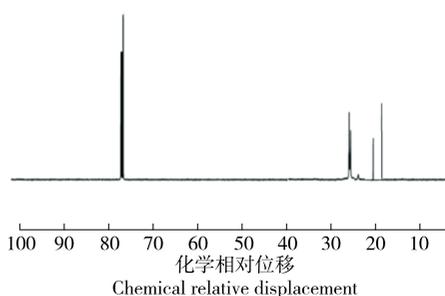


图 7 CLPS1 的  $^{13}\text{C}$  NMR 图谱

Figure 7  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of CLPS1

油、赤藓醇、半乳糖和半乳糖醛酸,未检测到赤藓酸、阿拉伯糖和葡萄糖,高碘酸能氧化葡萄糖和阿拉伯糖键型,存在甘油和赤藓醇,说明 CLPS1 结构中有  $1\rightarrow4,6,1\rightarrow,1\rightarrow2,6,1\rightarrow2,1\rightarrow6,1\rightarrow4$  键型。半乳糖中有  $1\rightarrow2,3,4,1\rightarrow2,3,1\rightarrow3,1\rightarrow2,4,1\rightarrow3,4,1\rightarrow3,6$ ;半乳糖醛酸为  $1\rightarrow2,3,4,1\rightarrow3,4,1\rightarrow3,1\rightarrow2,3,1\rightarrow2,4$ ;经 Smith 降解后袋内无沉淀,上清液中没有检测出目标物,说明主链部分已经氧化完全,袋外部分没有检测出赤藓醇、阿拉伯糖和葡萄糖,检测出半乳糖和半乳糖醛酸,说明半乳糖醛酸和半乳糖中不能被高碘酸氧化的键型与能被高碘酸氧化的键型间隔排列。

经过高碘酸氧化 72 h,试样和高碘酸用量分别为  $0.14\ \text{mmol}$ ,高碘酸和己糖消耗量摩尔比为 0.98,生成  $0.04\ \text{mmol}$  甲酸,甲酸生成量和己糖摩尔比为 0.28。氧化反应结束后检测出甲酸,说明半乳糖、葡萄糖存在  $1\rightarrow$  或  $1\rightarrow6$  键型。高碘酸反应量多于甲酸生成量,说明存在

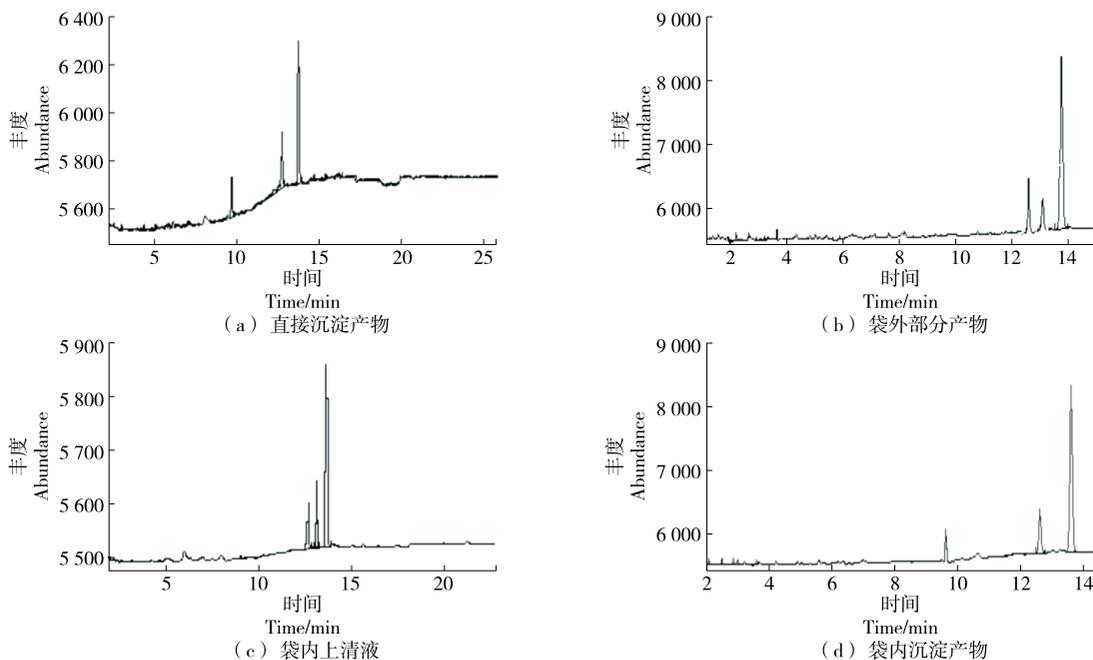


图 8 CLPS1 酸水解气相色谱分析

Figure 8 Analysis of CLPS1 acid hydrolysis by gas chromatography

表 1 CLPS1 高碘酸氧化及 Smith 降解产物分析<sup>†</sup>

Table 1 Analysis of CLPS1 periodate oxidation and Smith degradation products

样品	完全酸 水解	Smith 降解		
		袋外部分	上清液	沉淀
甘油	*	*	—	—
赤藓醇	*	*	—	—
赤藓酸	—	—	—	—
半乳糖	*	*	—	—
阿拉伯糖	—	—	—	—
半乳糖醛酸	*	*	—	—
葡萄糖	—	—	—	—

<sup>†</sup> “—”代表无;“\*”代表有。

1→2、1→2,6、1→4、1→4,6 键型。平均每摩尔己糖残基产生 0.291 mol 甲酸,每 10 个己糖残基有 1→6 糖苷键。

### 2.10 甲基化与酯化分析

由表 2 可知,CLPS1 末端残基为葡萄糖,半乳糖分支点是葡萄糖(1→4,6)、半乳糖(1→3,6);半乳糖有 1→、1→3、1→4、1→6、1→3,6 键型;葡萄糖有 1→、1→4、1→4,6 键型;阿拉伯糖只有 1→5 一种键型,其中阿拉伯糖(1→5)摩尔比为 4.02,其次是半乳糖(1→6)摩尔比为 1.60。半乳糖酯化前和酯化后数量增量差是因为半乳糖醛酸还原成了半乳糖。由表 3 可知,葡萄糖(1→)摩尔比为 1.02,说明葡萄糖少数以端基碳原子的形式存在,葡萄糖(1→4)摩尔比为 0.83,葡萄糖(1→4,6)摩尔比为 1.10,说明多数葡萄糖以侧链的形式存在,半乳糖多数以侧链的形式存在,少数以端基碳原子形式存在,阿拉伯糖(1→5)全部以侧链的形式存在,不存在端基碳原子。从表 4 可知,半乳糖(1→3)由还原前 0.56 增加到还原后的 1.77,说明半乳糖醛酸可能含有 1→3 键型。半乳糖酯化前和酯化后数量差为半乳糖醛酸还原成半乳糖后的增量。由表 5 可知,半乳糖(1→3)数量增加,说明半乳糖醛酸可能含有 1→3 键型。

表 2 CLPS1 甲基化产物分析

Table 2 Analysis of CLPS1 degradation products of methylation

峰号	甲基化单糖	键型	摩尔比
1	2,3,4,6-葡萄糖	葡萄糖(1→)	1.18
2	2,3-阿拉伯糖	阿拉伯糖(1→5)	4.02
3	2,3,4,6-半乳糖	半乳糖(1→)	1.00
4	2,4,6-半乳糖	半乳糖(1→3)	0.56
5	2,3,6-葡萄糖	葡萄糖(1→4)	0.99
6	2,3,6-半乳糖	半乳糖(1→4)	0.66
7	2,3,4-半乳糖	半乳糖(1→6)	1.60
8	2,3-葡萄糖	葡萄糖(1→4,6)	0.98
9	2,4-半乳糖	半乳糖(1→3,6)	1.23

表 3 酯化还原后 CLPS1 甲基化产物分析

Table 3 Analysis of CLPS1 degradation products of methylation

峰号	甲基化单糖	键型	摩尔比
1	2,3,4,6-葡萄糖	葡萄糖(1→)	1.02
2	2,3-阿拉伯糖	阿拉伯糖(1→5)	3.99
3	2,3,4,6-半乳糖	半乳糖(1→)	0.92
4	2,4,6-半乳糖	半乳糖(1→3)	1.77
5	2,3,6-葡萄糖	葡萄糖(1→4)	0.83
6	2,3,6-半乳糖	半乳糖(1→4)	0.71
7	2,3,4-半乳糖	半乳糖(1→6)	1.49
8	2,3-葡萄糖	葡萄糖(1→4,6)	1.10
9	2,4-半乳糖	半乳糖(1→3,6)	1.55

表 4 CLPS1 甲基化产物和酯化还原甲基化产物中半乳糖的对比分析

Table 4 Contrasting analysis of CLPS1 degradation products of methylation and methylation

甲基化单糖	键型	还原前 摩尔比	还原后 摩尔比	半乳糖醛酸 摩尔比
2,3,4,6-半乳糖	1→	1.00	0.92	1.28
2,4,6-半乳糖	1→3	0.56	1.77	
2,3,6-半乳糖	1→4	0.66	0.71	
2,3,4-半乳糖	1→6	1.60	1.49	
2,4-半乳糖	1→3,6	1.23	1.55	

表 5 CLPS1 甲基化糖摩尔比

Table 5 Molar ratio of methylation of CLPS1

单糖残基	甲基化糖	键型	甲基化 分析	摩尔 比	GC 摩 尔比
葡萄糖	2,3,4,6-葡萄糖	葡萄糖(1→)	1.17	3.06	2.3
	2,3,6-葡萄糖	葡萄糖(→4)	0.95		
	2,3-葡萄糖	葡萄糖(1→4,6)	0.94		
半乳糖	2,3,4,6-半乳糖	半乳糖(1→)	1.03	5.39	3.4
	2,4,6-半乳糖	半乳糖(1→3)	0.58		
	2,3,6-半乳糖	半乳糖(1→4)	0.64		
	2,3,4-半乳糖	半乳糖(1→6)	1.59		
	2,4-半乳糖	半乳糖 1→3,6)	1.55		
阿拉伯糖	2,3-阿拉伯糖	阿拉伯糖(1→5)	4.03	4.03	2.8
半乳糖醛酸			1.22	1.22	0.9

## 3 结论

轮叶党参经水提取醇沉、纯化分离后得到轮叶党参多糖组分 1,其总糖含量为 97.6%,糖醛酸为 13.18%,相对分子质量为 91.7。气相色谱分析表明,轮叶党参多糖组分 1 为一种结构复杂的酸性多糖,主要单糖组成为阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、半乳糖醛酸、甘露糖,其中葡萄

糖含量最高。红外光谱扫描发现, 轮叶党参多糖组分 1 具有多糖的特征吸收峰, 含有  $\alpha$ -和  $\beta$ -两种苷键构型, 主链由阿拉伯糖和半乳糖组成, 半乳糖和葡萄糖形成支链和主链的末端残基。 $\beta$ -构型吡喃糖且含有糖醛酸可能有助于提高多糖抗氧化能力<sup>[21]</sup>, 轮叶党参多糖组分 1 结构中存在  $\beta$ -构型可能是轮叶党参多糖组分 1 抗氧化能力较强的原因之一。另外, 轮叶党参多糖组分 1 结构中存在羧基、羟基、醛基和酮基等吸电子基团, 能提供更多的氢离子中和自由基也提高了多糖的抗氧化能力。

多糖的结构决定着多糖的生物活性, 已经证实一些植物多糖的抗氧化能力与单糖和糖苷键连接方式、空间构象、相对分子质量、官能团和支链的分化程度以及单糖组成有关。有研究<sup>[22]</sup>表明, 多糖活性与降解产生的多糖相对分子质量大小有关, 轮叶党参多糖组分 1 进一步降解产生低相对分子质量多糖可能会提高其抗氧化性。多糖的糖醛酸数量也与抗氧化能力呈正相关<sup>[23]</sup>, 轮叶党参多糖组分 1 中糖醛酸的存在增加了其抗氧化能力。因此, 研究多糖结构对分析多糖生理功能具有重要意义。后续将依据轮叶党参多糖组分 1 结构特征对其生理活性展开深入研究。

### 参考文献

[1] KIM J Y, HWANG B S, KWON S H, et al. Various biological activities of extracts from deodeok (*Codonopsis lanceolata* Trautv.) buds[J]. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 2021(1): 10-15.

[2] 赵传彦. 羊乳的价值及市场前景[J]. 特种经济动植物, 2004, 7(1): 35.

ZHAO C Y. The value and market prospect of goat milk[J]. Special Economic Animals and Plants. 2004, 7(1): 35.

[3] 于巧宁. 基于位点特异性 PCR 技术对北沙参及其产品植物来源的分子鉴定[D]. 烟台: 烟台大学, 2022: 1-4.

YU Q N. Botanical origin identification of *Glehnia littoralis* and its products based on allele-specific PCR[D]. Yantai: Yantai University, 2022: 1-4.

[4] WEON J, EOM M R, JUNG Y S, et al. Steamed and fermented ethanolic extract from *Codonopsis lanceolata* attenuates amyloid- $\beta$ -induced memory impairment in mice [J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2016, 5(23): 1-9.

[5] 张艳英, 王晓刚, 支晓慧. 轮叶党参总皂苷对糖尿病大鼠心肌组织 MDA、TNF- $\alpha$ 、sICAM-1 及 sVCAM-1 表达的影响[J]. 中国现代医药杂志, 2021, 23(7): 19-21.

ZHANG Y Y, WANG X G, ZHI X H. Effect of total saponins of *Codonopsis lanceolata* on the expression of MDA, TNF- $\alpha$ , sVCAM-1 and sVCAM-1 in myocardium of diabetic rats[J]. Modern Medicine Journal of China, 2021, 23(7): 19-21.

[6] 张馨方, 程孟雅, 杨桥, 等. 红汁乳菇多糖的结构特征及对肠道菌群的影响[J]. 食品与机械, 2022, 38(5): 143-148.

ZHANG X F, CHENG M Y, YANG Q, et al. Structural

characteristics of polysaccharides from *Lactarius hatsudake* and its effect on intestinal flora [J]. Food & Machinery, 2022, 38(5): 143-148.

[7] 佟海滨. 锦灯笼水溶性多糖的结构及其降血糖活性研究[D]. 长春: 东北师范大学, 2007: 1-5.

TONG H B. Structural characterization and hypoglycemic activity of a polysaccharide isolated from the fruit of *Physalis alkekengi* L. [D]. Changchun: Northeast Normal University, 2007: 1-5.

[8] 王颖, 包永睿, 孟宪生, 等. 云芝多糖对小鼠脾细胞的免疫增强作用研究[J]. 中南药学, 2017, 15(3): 284-287.

WANG Y, BAO Y R, MENG X S, et al. Activation of spleen cells by *Coriolus versicolor* polysaccharide[J]. Central South Pharmacy, 2017, 15(3): 284-287.

[9] 鲍智娟. 轮叶党参多糖提取及其含量测定[J]. 延边大学学报(自然科学版), 2009, 35(4): 350-352.

BAO Z J. The extraction and content determination of polysaccharide from *Codonopsis lanceolata* [J]. Journal of Yanbian University (Natural Science), 2017, 15(3): 284-287.

[10] 韩春姬, 李铉万, 李莲姬, 等. 轮叶党参多糖对小鼠 S180 肉瘤的抑制作用[J]. 延边大学医学学报, 2000(4): 249-250.

HAN C J, LI X W, LI L J, et al. The extraction and content determination of polysaccharide from *codonopsis lanceolata* [J]. Journal of Medical Science Yanbian University, 2000(4): 249-250.

[11] 张梁, 杨学秋, 刘秀杰, 等. 超声波提取轮叶党参多糖工艺优化及抗氧化活性[J]. 北华大学学报(自然科学版), 2018, 19(3): 312-318.

ZHANG L, YANG X Q, LIU X J, et al. Optimization of ultrasonic extraction conditions for polysaccharides from *Codonopsis lanceolata* and its antioxidative activity [J]. Journal of Beihua University (Natural Science), 2018, 19(3): 312-318.

[12] 刘艳秋. 轮叶党参多糖的分离纯化、结构分析及其生物活性研究[D]. 吉林: 东北林业大学, 2018.

LIU Y Q. Isolation Purification, Structure identification and biological activities of Polysaccharide from *Codonopsis lanceolata* [D]. Jilin: Northeast Forestry University, 2018.

[13] 刘洋. 黑果枸杞叶多糖的分离纯化、分析鉴定及生物活性研究[D]. 西安: 西北大学, 2016: 15-25.

LIU Y. Study on extraction, purification, characterization and biological activity of polysaccharides from *lycium ruthenicum* leaves[D]. Xi'an: Northwest University, 2016: 15-25.

[14] LEHRFELD J. Simultaneous gas-liquid chromatographic determination of aldonic acids and aldoses[J]. Analysis Chemistry, 1985, 57: 346-348.

[15] 何宇愿. 狗肝菜多糖的分离纯化、结构解析及保肝活性研究[D]. 广州: 广东药学院, 2016: 29-36.

HE Y Y. Isolation, purification, structure characterization and hepatoprotective effect of polysaccharides from *dicliptera chinensis* [D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University, 2016: 29-36.

(下转第 240 页)

- Agaricus brasiliensis polysaccharides inducing the NO release in macrophages[J]. Food & Machinery, 2018, 34(5): 16-19.
- [44] 徐勇. 姬松茸碱提水溶性多糖提取、结构鉴定及抗氧化活性研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2019: 16, 30, 53-54.
- XU Y. Extraction, structural elucidation and antioxidant activity of water-soluble polysaccharides alkali extracted from Agaricus blazei Murill.[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2019: 16, 30, 53-54.
- [45] 喻文丽, 樊永红, 迪拉热·海米提, 等. 食用菌活性成分绿色提取方法研究进展[J]. 中国食用菌, 2020, 39(9): 8-14.
- YU H L, FAN Y H, DILARE H M T, et al. Research on green method for extracting active ingredients of edible fungi[J]. Edible Fungi of China, 2020, 39(9): 8-14.
- [46] 杨丹妮, 汪振炯, 吕胜男. 超声波协同酶法提取姬松茸基质多糖及其抗肿瘤活性研究[J]. 食品科技, 2017, 42(11): 212-217.
- YANG D N, WANG Z J, LU S N. The optimal extraction technology and anti-tumor effect of Agaricus blazei Murill polysaccharide by cellulase assisted with ultrasonic method [J]. Food Science and Technology, 2017, 42(11): 212-217.
- [47] 王宏雨, 张迪, 林衍铨, 等. 姬松茸多糖超声波循环提取工艺研究[J]. 中国食用菌, 2017, 36(4): 45-47.
- WANG H Y, ZHANG D, LIN H Q, et al. Optimization on ultrasonic circulating extraction of polysaccharide from Agaricus blazei Murill[J]. Edible Fungi of China, 2017, 36(4): 45-47.
- [48] 李健, 孙宁, 刘宁, 等. 微波协同碱提法优化提取姬松茸多糖工艺[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2016, 37(6): 67-74.
- LI J, SUN N, LIU N, et al. Optimization of Agaricus blazei Murill polysaccharides microwave-assisted alkali extraction[J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2016, 37(6): 67-74.
- [49] 景永帅, 孙丽丛, 程文境, 等. 微波辅助法提取多糖的研究进展[J]. 食品与机械, 2020, 36(10): 228-232.
- JING Y S, SUN L C, CHENG W J, et al. Research progress in microwave-assisted extraction of polysaccharides [J]. Food & Machinery, 2020, 36(10): 228-232.
- [50] 付志英, 林花, 丁玲. 应用超声波技术提取姬松茸多糖工艺的优化研究[J]. 江西农业学报, 2015, 27(10): 92-95.
- FU Z Y, LIN H, DING L. Research on optimization of extraction process of polysaccharides from Agaricus blazei by using ultrasonic technology[J]. Acta Agriculture Jiangxi, 2015, 27(10): 92-95.
- [51] 梁婷, 赵亚男, 刘爱丽, 等. 微波法提取姬松茸多糖的工艺研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(4): 236-238.
- LIANG T, ZHAO Y N, LIU A L, et al. Study on extraction of polysaccharides from Agaricus blazei Murill by microwave [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(4): 236-238.
- [52] CUI R, ZHU F. Ultrasound modified polysaccharides: A review of structure, physicochemical properties, biological activities and food applications[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 107: 491-508.
- [53] 王艳, 聂志勇, 贺瑛, 等. 超声波协同复合酶法提取姬松茸多糖[J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21(5): 866-870.
- WANG Y, NIE Z Y, HE Y, et al. Study on the extraction of Agaricus blazei Murill polysaccharide with compound enzymes under ultrasonic wave [J]. Natural Product Research and Development, 2009, 21(5): 866-870.
- 
- (上接第 168 页)
- [16] BUCHANAN C M, HYATT J A, LOWMAN D W. 2D-NMR of polysaccharides: Spectral assignments of cellulose triesters [J]. Macromolecules, 1987, 20(11): 2 750-2 754.
- [17] WANG X M, SUN R G, ZHANG J, et al. Structure and antioxidant activity of polysaccharide POJ-U1a extracted by ultrasound from ophiopogon japonicus[J]. Fitoterapia, 2012, 83: 1 567-1 584.
- [18] 陈春丽. 哈萨克药材别克参多糖分离纯化、抗炎免疫活性及药材质量标准研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2012: 29-30.
- CHEN C L. Studies on the Structure, immunomodulatory and anti-inflammatory activities of Erythronium sibiricum bulb polysaccharides and Erythronium sibiricum bulb's Quality Standard[D]. Urumqi: Xinjiang medical University, 2012: 29-30.
- [19] 李楠, 张香飞, 杨春杰. 板栗多糖初级结构表征及抗氧化活性[J]. 食品与机械, 2022, 38(10): 24-28, 49.
- LI N, ZHANG X F, YANG C J. Primary structure characterization and antioxidant activity of polysaccharide from Zizyphus jujuba cv. Banzao[J]. Food & Machinery, 2022, 38(10): 24-28, 49.
- [20] 罗建蓉, 王诗雨, 蒋丽珠, 等. 琵琶甲多糖的提取分离、结构表征及生物活性研究[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(8): 1 057-1 063.
- LUO J R, WANG S Y, JIANG L Z, et al. Study on the extraction, separation, structural characterization and biological activities of polysaccharides from blaps rynchopetera fairmaire [J]. Chinese Journal of Modern Drug Application, 2023, 40(8): 1 057-1 063.
- [21] 龚雯, 唐婕, 韦雅渊, 等. 金花茶多糖分离纯化、结构表征及其体外抗氧化性[J]. 食品与机械, 2021, 37(6): 184-190.
- GONG W, TANG J, WEI Y Y, et al. Isolation, purification, structural characterization of polysaccharide from camellia nitidissima chi and its antioxidant activities in vitro [J]. Food & Machinery, 2021, 37(6): 184-190.
- [22] 杭书扬, 杨留枝, 史苗苗, 等. 山药皮残渣多糖结构表征及抗氧化活性测定[J]. 食品与机械, 2023, 39(2): 153-158, 206.
- HANG S Y, YANG L Z, SHI M M, et al. Characterization and antioxidant activity determination of polysaccharide from yam peel residue[J]. Food & Machinery, 2023, 39(2): 153-158, 206.
- [23] HU M, CUI N, BO Z X, et al. Structural determinant and its underlying molecular mechanism of STPC2 related to anti-angiogenic activity[J]. Marine Drugs, 2017, 15(2): 1-12.