

六年生兰州百合多糖的理化特性及体外降糖活性

潘立超^{1,2}, 范文婷¹, 赵晶¹, 黄超婧¹, 宋淑敏³, 罗光宏², 杨生辉², 任海伟^{1*}

(1. 兰州理工大学生命科学与工程学院, 甘肃兰州 730050) (2. 甘肃凯源生物技术开发中心有限责任公司, 甘肃张掖 734000) (3. 甘肃中轻轻工产品质量检验检测有限责任公司, 甘肃兰州 730050)

摘要: 兰州百合多糖是其鳞茎的重要组成成分, 与糖代谢调节相关。为明确六年生兰州百合多糖 (*Lilium davidii* var. *willmottiae* Polysaccharides, LLP) 理化特性及体外降糖潜力, 采用水提醇沉、Sevag 法除蛋白和 Sephadex G-100 柱层析制备 LLP, 综合运用高效液相色谱 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)、傅里叶变换红外光谱 (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FT-IR)、刚果红试验、扫描电子显微镜 (Scanning Electron Microscopy, SEM) 和热重-差示扫描量热联用分析 (Thermogravimetry-Differential Scanning Calorimetry, TG-DSC) 对 LLP 的理化特性进行表征; α -葡萄糖苷酶、 α -淀粉酶抑制试验和 HepG2 胰岛素抵抗细胞模型评价其降糖潜力。显示 LLP 相对分子质量约 1.15×10^5 Da, 由甘露糖 (Man)、半乳糖醛酸 (GalA)、葡萄糖 (Glc)、半乳糖 (Gal) 和阿拉伯糖 (Ara) 组成, 摩尔比 15.42:0.62:83.67:0.14:0.15, 有多糖典型红外吸收峰, 水溶液可能具有螺旋构象, 微观呈粗糙疏松片层状, 147.40 °C 以下较稳定; LLP 对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的 IC_{50} ($mg \cdot mL^{-1}$) 分别为 0.82、1.49, 当 LLP 质量浓度达到 $100.00 \mu g \cdot mL^{-1}$ 时, HepG2-IR 细胞葡萄糖消耗量较模型组显著提高 ($P < 0.05$)。表明 LLP 具有典型多糖的理化特征和体外降糖活性, 可为其功能食品的开发提供理论基础。

关键词: 兰州百合; 六年生; 多糖; 理化特性; 酶抑制; HepG2-IR 模型

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2027.8.0936

Physicochemical Characteristics and In Vitro Hypoglycemic Activity of Polysaccharides from Six-Year-Old *Lilium davidii* var. *willmottiae*

PAN Lichao^{1,2}, FAN Wenting¹, ZHAO Jin¹, HUANG Chaojing¹, SONG Shumin³, LUO Guanghong²,
YANG Shenghui², REN Haiwei^{1*}

(1.Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China)(2.Gansu Kaiyuan Biotechnology Development Center Co. Ltd., Zhangye 734000, China)(3.Gansu Zhongqing Light Industry Product Quality Inspection Co. Ltd., Lanzhou 730050, China)

Abstract: Polysaccharides are important constituents of Lanzhou lily bulbs and have been associated with the regulation of glucose metabolism. To characterize the physicochemical properties and in vitro hypoglycemic potential of a polysaccharide fraction (LLP) isolated from the bulbs of six-year-old Lanzhou lily (*Lilium davidii* var. *willmottiae*), LLP was prepared by hot-water extraction and ethanol precipitation, followed by Sevag deproteinization and Sephadex G-100 column chromatography. The physicochemical characteristics of LLP were characterized by high-performance liquid chromatography (HPLC), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), the Congo red assay, scanning electron microscopy (SEM), and thermogravimetry-differential scanning calorimetry (TG-DSC). Its hypoglycemic potential was evaluated using α -glucosidase and α -amylase inhibition assays and an insulin-resistant HepG2 cell model. LLP was found to have a relative molecular mass of approximately 1.15×10^5 Da. It was composed of mannose (Man), galacturonic acid (GalA), glucose (Glc), galactose (Gal), and arabinose (Ara) at a molar ratio of 15.42:0.62:83.67:0.14:0.15. Typical infrared absorption bands of polysaccharides were observed; its aqueous solution was suggested to possess a helical conformation, its microstructure was characterized by rough and loose lamellae, and it was relatively stable below 147.40 °C. The IC_{50} values of LLP against α -glucosidase and α -amylase were determined to be 0.82 and 1.49 $mg \cdot mL^{-1}$, respectively. At $100.00 \mu g \cdot mL^{-1}$, glucose consumption in HepG2-IR cells was significantly increased compared with that in the model group ($P < 0.05$). Thus, typical physicochemical characteristics of polysaccharides and in vitro hypoglycemic activity were observed for LLP, providing

收稿日期: 2026-6-23; 修回日期: 2026-08-16; 接受日期: 2026-08-17

基金项目: 知识产权计划-知识产权保护项目 (25ZSCQG024); 甘肃凯源生物技术开发中心有限责任公司博士后项目 (24YBH001)

作者简介: 潘立超 (1992-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 天然产物研究与开发, E-mail: 3053581403@qq.com

通讯作者: 任海伟 (1983-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 生物质资源研究与开发, E-mail: rhw52571119@163.com

a theoretical basis for its development as a functional food ingredient.

Key words: *Lilium davidii* var. *willmottiae*; six-year-old; polysaccharide; physicochemical characteristics; enzyme inhibition; HepG2-IR model

百合(*Lilium*)为百合科百合属多年生草本植物,其鳞茎兼具食品原料和传统药用资源属性。兰州百合(*Lilium davidii* var. *willmottiae*)主要产于甘肃兰州及周边地区,以鳞片洁白、味甜和食用品质著称^[1,2]。兰州百合鳞茎品质会随生长年限发生变化。李艳等^[3]发现,六年生兰州百合的多糖、氨基酸等主要成分含量较高,具有较好的食用和营养价值;张咏梅等^[4]也指出,五至六年生种球个体较大,且多类氨基酸、果糖和可溶性糖含量较高,色泽、甜味和口感较好。因此,本研究选取六年生兰州百合为原料,对其多糖的理化特性及体外降糖活性进行评价。

多糖是植物中常见的天然大分子,其组成和理化性质会受到原料种类、提取条件及纯化方法的影响。百合鳞茎中含有较丰富的多糖,相关研究主要集中在提取分离、组成分析和分子量测定等方面。Song等^[1]比较了兰州百合未发酵水溶性多糖LP-W与发酵水溶性多糖LPF-W的分子量、单糖组成和糖残基连接特征;Gao等^[2]采用聚乙二醇辅助超声-酶法制备兰州百合多糖LLPs,并分析其单糖组成、红外光谱和微观形貌;Wei等^[5]通过冻融法获得低分子量兰州百合多糖LP,并对其理化性质进行了表征;Hui等^[6]从兰州百合鳞茎中分离得到LZL-1、LZL-2和LZL-3三个高分子量多糖,之后又对半乳葡聚糖BHP-2的连接结构、形貌和热学性质进行了研究^[7]。Li等^[8]系统总结了百合属多糖的提取、纯化、组成和理化特征。在兰州百合多糖研究中,Kang等^[9]从粗多糖中分离出LPe组分,并测定其单糖组成和相对分子质量;Li等^[10]以兰州百合多糖LLP开展了高脂饮食小鼠实验;Xiang等^[11]提取水溶性兰州百合多糖LPs,研究了其与乳清分离蛋白的复配性质;Song等^[12]比较了超声和亚临界水提取所得的三种食用百合多糖,其中两种方法制备的兰州百合多糖分别记为U-LDWP和S-LDWP。已有研究表明,百合种类和制备方法不同,所得多糖的组成及理化性质也可能存在差异。基于此,本研究从六年生兰州百合鳞茎中制备纯化多糖LLP,测定其组成、相对分子质量和理化性质,并评价其对 α -葡萄糖苷酶、 α -淀粉酶及HepG2-IR细胞葡萄糖消耗的影响,为兰州百合多糖的进一步研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

六年生新鲜兰州百合鳞茎购自兰州陇晨源商贸有限公司,经兰州理工大学生命科学与工程学院李善家教授鉴定为兰州百合。淀粉酶制剂(2 U mg^{-1}),购自山东隆科特酶制剂有限公司; α -淀粉酶(猪胰腺, $40\sim 60\text{ U mg}^{-1}$),购自北京索莱宝科技有限公司; α -葡萄糖苷酶,购自上海源叶生物科技有限公司。试验所用细胞为HepG2细胞株;CCK-8试剂盒,购自北京索莱宝科技有限公司;阿卡波糖、盐酸二甲双胍、棕榈酸等均为国产分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;甲醇、乙腈均为色谱纯,购自德国Merck公司。

LC-20A高效液相色谱分析仪,日本岛津公司;Nexus 670傅里叶变换红外光谱仪,美国Nicolet公司;T2602紫外可见分光光度计,上海佑科仪器仪表有限公司;STA449 F3同步热分析仪,德国Netzsch公司;FlexSEM1000扫描电子显微镜,日本日立公司;Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18色谱柱($4.6\text{ mm}\times 250\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$),美国安捷伦科技公司;TSKgel G4000PW_{XL}色谱柱($7.8\text{ mm}\times 300\text{ mm}$),日本TOSOH公司;L-550离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;SCIENTZ-12N/A冷冻干燥机,宁波新芝生物科技股份有限公司;Infinite 200PRO酶标仪,美国TECAN公司;BPN-150CH(UV)二氧化碳培养箱,上海一恒科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 兰州百合多糖的分离纯化

新鲜兰州百合鳞茎洗净冻干后粉碎。按料液比1:21(g mL^{-1})加蒸馏水, $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ 搅拌浸提2.6 h,按相同条件共提取2次,合并提取液,按冻干粉质量的1.50%加入淀粉酶制剂(2 U mg^{-1} , 山东隆科特酶制剂有限公司), $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴1 h, $3\text{ }900\text{ r min}^{-1}$ 离心10 min取上清液。减压浓缩至原体积的20%,加入4倍体积的无水乙醇, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置12 h后, $3\text{ }900\text{ r min}^{-1}$ 离心10 min,收集醇沉物。以蒸馏水复溶后加入水相体积25%的Sevag试剂(氯仿:正丁醇=4:1, V:V),振荡20 min、静置分层,去除蛋白沉淀,重复上述步骤至无蛋白质变性沉淀。转入截留分子量

3 500 Da 的透析袋, 流动水透析 24 h, 减压浓缩后冻干, 得到粗多糖 (LLP-C)。LLP-C 采用柱层析分离纯化, 分离柱: 16 mm×400 mm; 填料: Sephadex G-100; 上样量: 0.50 mL; LLP-C 质量浓度: 30.00 mg mL⁻¹; 流动相: 超纯水; 洗脱速率: 0.20 mL min⁻¹, 每管收量: 2.00 mL。各管取 100.00 μL 洗脱液, 依次加 100.00 μL 苯酚和 500.00 μL 浓硫酸, 沸水浴 10 min 后测定 A₄₉₀, 并绘制洗脱曲线, 合并 B 峰组分后冻干, 命名为 LLP。

以葡聚糖 T-10、T-40、T-70、T-110、T-500 和 T-2000 为标准品, 采用 HPGPC 法测定标准品保留时间 (TSKgel G4000PWXL 7.8 mm×300 mm; 检测器: 示差折光检测器; 柱温: 30 °C; 检测池温度: 35 °C; 流动相: 水; 流量: 0.60 mL min⁻¹; 样品浓度: 5.00 mg mL⁻¹; 进样体积 20.00 μL)。绘制保留时间 (t) 与分子量对数 (lg M_w) 的标准曲线, 以 LLP 主峰保留时间计算其相对分子质量。

1.2.2 理化特性分析

1.2.2.1 红外光谱分析

采用 FT-IR 对多糖的分子结构进行分析^[13]。取 1.00 mg LLP 与 150.00 mg KBr 充分研磨、压片, 在 4 000~400 cm⁻¹ 范围内扫描 16 次, 分辨率为 4 cm⁻¹。

1.2.2.2 单糖组成分析

取 1.00 mL LLP 溶液 (10.00 mg mL⁻¹), 加入 1.00 mL 4.00 mol L⁻¹ 的三氟乙酸 (Trifluoroacetic Acid, TFA), 在氮气保护下于 110 °C 水解 8 h, 减压蒸馏除去 TFA。残留物加入 100.00 μL 0.60 mol L⁻¹ NaOH 充分溶解, 再加入 100.00 μL 0.50 mol L⁻¹ 的 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (1-Phenyl-3-Methyl-5-Pyrazolone, PMP) 甲醇溶液, 密封后于 70 °C 反应 100 min; 冷却后以 100.00 μL 0.30 mol L⁻¹ 的 HCl 调节 pH 值, 2 000 r min⁻¹ 离心 5 min, 弃去下层有机相后, 水相用氯仿多次萃取至有机相无色透明, 合并上层水相, 过 0.22 μm 滤膜, 进行高效液相色谱分析。

单糖标准品按相同条件进行 PMP 衍生化: 取 50.00 μL 质量浓度为 10.00 mg mL⁻¹ 混合标准品溶液, 加入 50.00 μL 1.20 mol L⁻¹ 的 NaOH 混匀, 再加入 100.00 μL 0.50 mol L⁻¹ PMP 甲醇溶液, 密封后于 70 °C 反应 100 min, 后续处理同样品。色谱分析采用 Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 进样量: 10.00 μL, 柱温: 30 °C, 检测波长: 250 nm; 0.02 mol L⁻¹ 磷酸盐缓冲液 (pH 值 6.70) 与乙腈按体积比 83:17 (V:V) 作为流动相, 流量 1.00 mL min⁻¹。

1.2.2.3 刚果红试验

参照郝亚利^[14]的方法并作适当调整。取 2.00 mL 质量浓度为 1.00 mg mL⁻¹ LLP 溶液与 2.00 mL 80.00 μmol L⁻¹ 刚果红溶液混合, 调节 NaOH 终浓度为 0.00~0.50 mol L⁻¹ (间隔 0.10 mol L⁻¹)。室温反应 10 min 后, 在 400~600 nm 范围内扫描, 记录最大吸收波长。以 NaOH 终浓度和最大吸收波长分别作为横、纵坐标作图, 空白对照为去离子水。

1.2.2.4 热重分析

称取 5.00 mg LLP 置于氧化铝坩埚中, 在流量为 60 mL min⁻¹ 的 N₂ 气氛下, 以 10 °C min⁻¹ 的升温速率由 30 °C 升至 600 °C, 进行 TG-DSC 分析。

1.2.2.5 扫描电子显微镜分析

将干燥 LLP 样品固定于碳导电胶带, 经喷金处理后抽真空, 在 5 kV 加速电压下分别以 200×和 5 000×倍率观察其表面形貌。

1.2.3 体外降糖活性测定

1.2.3.1 LLP 与 LLP-C 对糖代谢相关酶的抑制活性测定

(1) α-淀粉酶抑制率测定: 参考张梦晴^[15]和汤陈鹏等^[16]的方法并优化部分条件, 采用 3,5-二硝基水杨酸 (3,5-Dinitrosalicylic Acid, DNS) 显色法进行测定。将 LLP-C 和 LLP 分别配制为质量浓度 1.00、2.00、3.00、4.00、5.00 mg mL⁻¹ 待测液; 以质量分数 5.00% 的可溶性淀粉溶液为底物, 用 0.20 mol L⁻¹ 磷酸盐缓冲液 (pH 值 6.50) 配制 2.00 U mL⁻¹ α-淀粉酶溶液。取 0.30 mL 样品溶液与 0.30 mL α-淀粉酶溶液混合, 于 37 °C 先孵育 15 min, 再加入 0.30 mL 质量分数 5.00% 的可溶性淀粉溶液, 继续于 37 °C 反应 15 min。加入 1.00 mL DNS 试剂终止反应, 100 °C 煮沸 15 min, 冷却后加入 5.00 mL 蒸馏水, 在 540 nm 处测定吸光度。以阿卡波糖为阳性对照, 抑制率按下式计算:

$$I = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0 - A_3}\right) \times 100\% \quad (1)$$

式中:

I ——LLP-C 与 LLP 对 α -淀粉酶的抑制率, %;

A_1 ——在酶标仪的 540 nm 波长下测定的吸光度;

A_2 ——以磷酸盐缓冲液替代酶液测定的吸光度;

A_0 ——以蒸馏水替代多糖溶液测定的吸光度;

A_3 ——分别以水和缓冲液替代样品液和酶液的对照空白吸光度。

(2) α -葡萄糖苷酶抑制率测定: 采用对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷(p-Nitrophenyl- α -D-Glucopyranoside, pNPG) 为底物, 并按郝亚利^[14]的方法进行测定。LLP 和 LLP-C 分别配制成质量浓度 0.125、0.25、0.50、1.00、2.00、4.00 mg mL⁻¹ 样品液。于 96 孔板中每孔加入 20.00 μ L 样品液和 40.00 μ L α -葡萄糖苷酶溶液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 10 min 后加入 40.00 μ L pNPG; 反应 30 min 后用 100.00 μ L 0.20 mol $\cdot$ L⁻¹ Na₂CO₃ 终止反应, 并在 410 nm 处检测吸光度。以阿卡波糖作为阳性对照, 抑制率按下式计算:

$$I = (1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}) \times 100\% \quad (2)$$

式中:

I ——LLP-C 与 LLP 对 α -葡萄糖苷酶的抑制率, %;

A_1 ——在酶标仪的 410 nm 波长下测定的吸光度;

A_2 ——以磷酸盐缓冲液替代酶液测定的吸光度;

A_0 ——以蒸馏水替代多糖溶液测定的吸光度。

1.2.3.2 LLP 对 HepG2-IR 模型细胞葡萄糖消耗量的影响

(1) LLP 对 HepG2 细胞活力的影响: 采用 CCK-8 法^[17]测定。取对数生长期细胞制成悬液, 以 100.00 μ L 每孔接种于 96 孔板, 贴壁后弃培养液, 加入含不同质量浓度 LLP 的培养液, 使其终质量浓度分别为 62.50、125.00、250.00、500.00 μ g $\cdot$ mL⁻¹, 每孔 100.00 μ L; 对照组加入常规培养液。分别处理 12、24、36、48 h 后, 每孔加入 10.00 μ L CCK-8 试剂, 避光孵育 2 h, 于 450 nm 处测定吸光度。根据细胞活力结果, 并结合后续干预需求, 选取 25.00、50.00、75.00、100.00 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 作为 HepG2-IR 模型试验的 LLP 处理浓度。

(2) HepG2-IR 模型的建立: HepG2 细胞日常培养采用高糖 DMEM 完全培养基 (含体积分数 10.00% 的热灭活胎牛血清)。取对数生长期 HepG2 细胞, 参照张伟^[18]的方法构建实验模型。按 100.00 μ L 每孔接种, 培养 24 h 待其贴壁后更换含棕榈酸的完全培养基, 模型组棕榈酸终浓度为 0.20、0.40、0.60、0.80 和 1.00 mmol L⁻¹, 正常组使用不含棕榈酸的同批完全培养基, 并设置 12、24、36、48 h 诱导时间。处理结束后弃液, 用无菌生理盐水清洗 2 次, 换入不含棕榈酸的完全培养基继续培养 24 h, 利用葡萄糖测定试剂盒检测培养液中葡萄糖残余量并换算消耗量, 据此确定棕榈酸的适宜诱导浓度和时间。利用棕榈酸的最佳作用浓度和时间诱导 HepG2 细胞, 弃去含棕榈酸的培养液, 无菌生理盐水清洗 2 次后, 换不含棕榈酸的完全培养基继续培养, 每 12 h 测定一次葡萄糖消耗量, 用以评价模型稳定维持时间。计算公式如下:

$$w = \frac{A_k - A_1}{A_0} \times C_0 \quad (3)$$

式中:

w ——葡萄糖消耗量, mmol L⁻¹;

A_k ——空白组吸光度;

A_1 ——样品测定吸光度;

A_0 ——校准组吸光度;

C_0 ——校准液葡萄糖浓度, 5.55 mmol L⁻¹。

(3) LLP 对 HepG2-IR 模型细胞葡萄糖消耗量的影响: 建模完成后, 弃去培养液并用无菌生理盐水清洗 2 次, LLP 干预组分别加入 200.00 μ L 含 LLP 的完全培养基, 使 LLP 终质量浓度为 25.00、50.00、75.00 和 100.00 μ g $\cdot$ mL⁻¹; 阳性对照组加入 200.00 μ L 质量浓度 1.00 mg mL⁻¹ 的盐酸二甲双胍。培养 12 h 后弃液并用无菌生理盐水清洗 2 次; 均换入等体积普通培养基继续培养 24 h, 再检测葡萄糖消耗量。试验设置正常组、模型组、阳性对照组和 LLP 干预组。

1.3 数据分析

1.2.3 中各试验均设置 3 次平行。Excel 2019 用于数据录入和均值、标准差计算；SPSS 22.0 用于显著性检验，差异标准设为 $P < 0.05$ 。采用 Origin Pro 2021 计算 TG (%) 的一阶微分 DTG ($\% \text{ min}^{-1}$) 并绘制相关图。结果以平均值 $\pm$ 标准差表示。

2 结果与讨论

2.1 LLP 的分离纯化

如图 1 所示，LLP-C 水溶液在 190~400 nm 扫描范围内未于 260 或 280 nm 观察到明显吸收峰，说明其中核酸和蛋白质残留较少；LLP-C 的洗脱曲线呈现 A、B 两个峰，综合峰形、分离效果和样品收集量，后续试验选择 B 峰部分（虚线圆圈圈出部分），收集冷冻干燥后命名为 LLP。液相色谱中 LLP 样品峰（13.649 min）近乎单一对称（18.802 min 处信号峰也出现在流动相空白色谱中，为溶剂峰），表明 LLP 分子量分布集中；根据葡聚糖标准品分子量对数 ($\lg M_w$) - 保留时间 (t) 的标准曲线方程 ($\lg M_w = -0.3859t + 10.328$, $R^2 = 0.9941$) 计算得到相对分子质量为 1.15×10^5 Da。该分子量处于已有研究报道的兰州百合多糖相对分子质量范围内^[1,5,6]。不同研究所得的分子量差异可能与原料、提取条件和纯化方法不同有关。

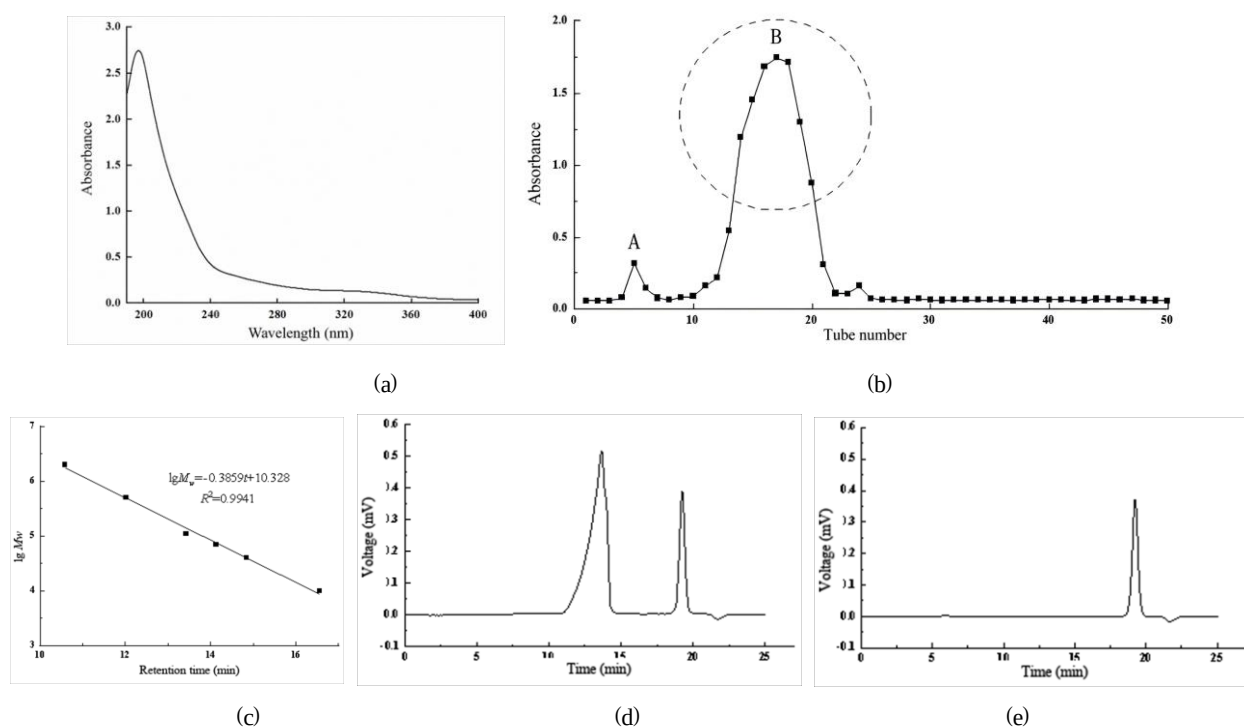


图 1 LLP-C 纯化过程及 LLP 相对分子质量测定

Fig.1 Purification of LLP-C and relative molecular mass determination of LLP

注：(a) LLP-C 紫外扫描图；(b) LLP-C 的 Sephadex G-100 洗脱曲线；(c) 葡聚糖校准曲线；(d) LLP 的 HPGPC 图；(e) 超纯水空白图。

2.2 LLP 的理化特性分析

2.2.1 LLP 的红外光谱

LLP 在 3433.05 cm^{-1} 附近出现较宽吸收峰，主要对应多糖羟基的伸缩振动。 2935.93 cm^{-1} 处峰与 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-$ 中的 C-H 伸缩振动有关。 1732 cm^{-1} 附近的弱峰可能源于羧基或其他羰基的 C=O 伸缩振动，提示 LLP 中存在糖醛酸等酸性基团。 1378 cm^{-1} 附近吸收峰可归属于 C-H 弯曲振动。在 1151 、 1059.08 和 1029 cm^{-1} 附近出现的特征吸收峰，主要归属于 C-O-C 和 C-O 键的伸缩振动，提示存在吡喃糖环相关结构，醚键 (C-O-C) 的不对称振动是产生这些吸收峰的主要原因，而呋喃糖在此波数区间 ($1200 \sim 1000 \text{ cm}^{-1}$) 仅显示两个强吸收峰。 880 cm^{-1} 附近弱吸收峰，提示多糖中可能存在 β -构型的糖苷键， 807 cm^{-1} 处吸收可能与 Man 残基有关^[2,6,7]。

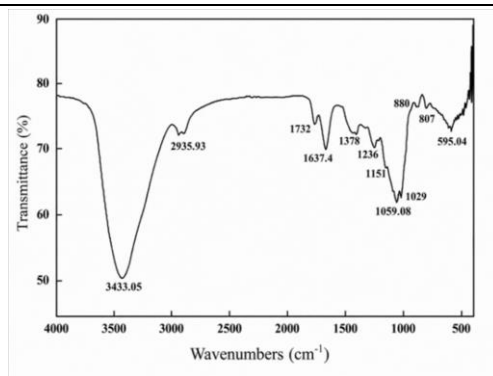


图 2 LLP 的 FT-IR 光谱图

Fig.2 FT-IR spectrum of LLP

2.2.2 LLP 的单糖组成

由图 3 可知, LLP 的各单糖 (Man:GalA:Glc:Gal:Ara) 摩尔比为 15.42:0.62:83.67:0.14:0.15。其中 Glc 占主要比例。该结果与 FT-IR 中糖醛酸和甘露糖相关吸收峰相互印证。

已有研究中的兰州百合多糖多以 Glc 和 Man 为主要单糖, 但各单糖的比例并不完全相同。Gao 等^[2]所得样品同样以 Glc 为主, 但 Gal、Rha 和 Ara 的比例较高; Song 等^[1]还发现, 发酵处理会改变兰州百合多糖的分子量和糖残基连接特征。这说明原料差异、提取条件等会影响最终获得的多糖组成。

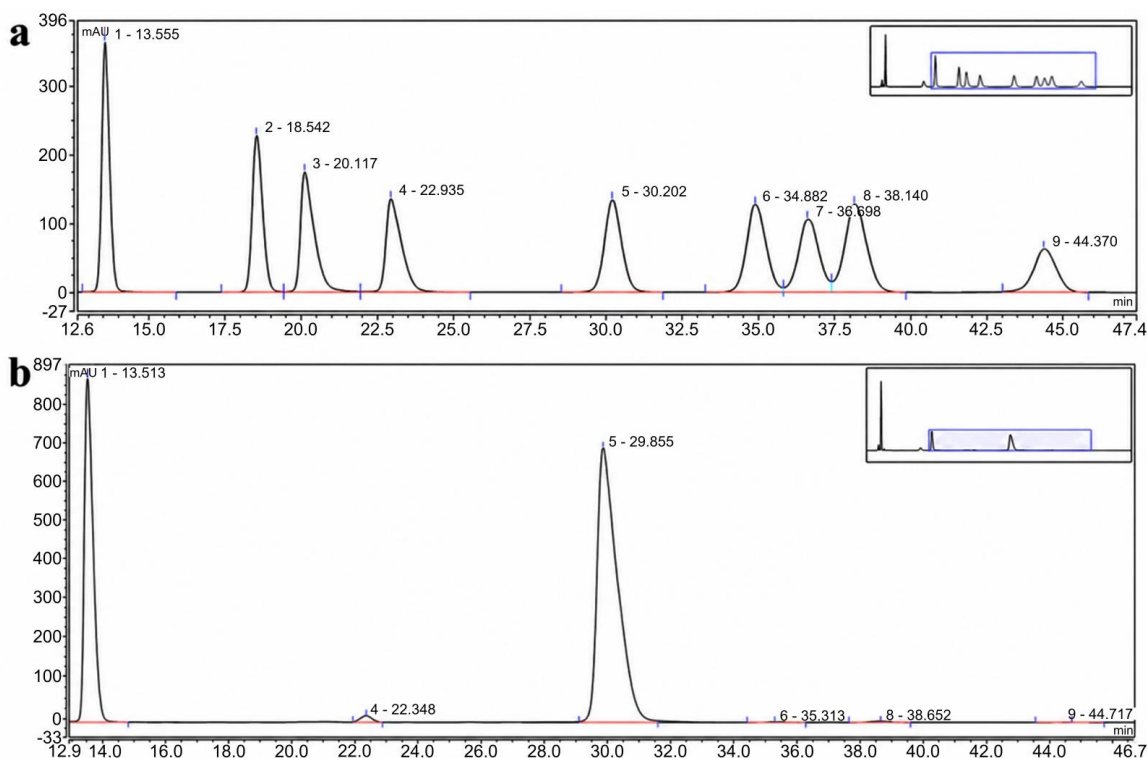


图 3 单糖标准品与 LLP 单糖组成的 HPLC 图

Fig.3 HPLC chromatograms of monosaccharide standards and LLP

注: (a) 单糖标准品, 峰 1~9 依次为 Man、Rha、GlcA、GalA、Glc、Gal、Xyl、Ara 和 Fuc; (b) LLP, 保留时间 13.513、22.348、29.855、35.313 和 38.652 min 处的峰依次归属于 Man、GalA、Glc、Gal 和 Ara。

2.2.3 LLP 的刚果红实验

如图 4 所示, 与刚果红混合后, LLP 体系最大吸收波长由 496 nm 升至 500 nm, 出现一定红移; 随着 NaOH 浓度继续升高, 最大吸收波长总体下降, 提示 LLP-刚果红复合体系稳定性降低, LLP 链构象可能发生变化^[19]。

多糖链在溶液中的展开、缠绕和聚集状态会影响其与酶的接触。LLP 出现轻微红移, 提示其在水溶液中可能保持一定的有序链状态, 这种状态可能影响羟基和羧基等位点的暴露, 从而影响后续的酶抑制作用。因此, LLP

可能的有序链状态可以作为解释其活性的一个因素，同时还应结合分子量、单糖组成和糖醛酸含量等共同分析。

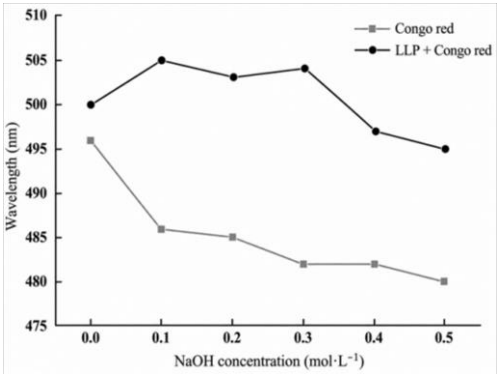


图 4 NaOH 浓度对 LLP-刚果红体系最大吸收波长的影响

Fig.4 Effect of NaOH concentration on maximum absorption wavelength of the LLP-Congo red system

2.2.4 LLP 的热重分析

由图 5 可知，LLP 的热失重过程主要分为两个阶段。第一阶段为 30~147.40 ℃，质量损失约 5.48%，主要与吸附水和结合水挥发有关；第二阶段为 147.40~600 ℃，质量损失明显增加，主要由糖苷键断裂和多糖骨架热降解引起。DTG 曲线显示，LLP 在 243.17 ℃ 附近质量损失速率达到最大，约为 4.91% min⁻¹；500 ℃ 以后质量趋于稳定，600 ℃ 时残留质量分数为 40.78%。DSC 曲线显示 LLP 在 142 ℃ 附近出现弱吸热峰，可能对应结合水解吸附过程，与 TG 曲线第一阶段质量损失相互印证；147.40~298 ℃ 范围内的持续吸热变化可能与 LLP 构象变化及热降解初始过程有关。总体来看，LLP 在 147.40 ℃ 以下具有较好的热稳定性。

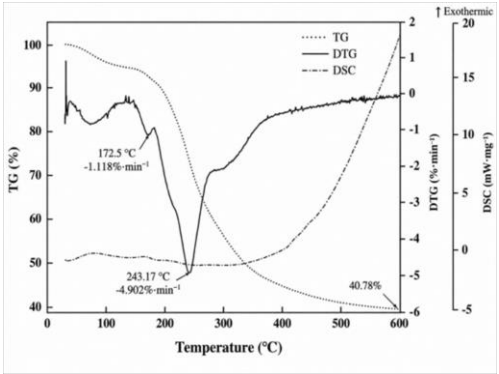


图 5 LLP 的 TG、DTG 与 DSC 曲线

Fig.5 TG, DTG and DSC curves of LLP

2.2.5 LLP 的表观形貌测定

多糖表观形貌受原料来源、提取纯化方式及干燥过程影响^[2]。从图 6 可以看出，LLP 以片层状和无定形聚集结构为主，表面较粗糙，片层之间存在较明显空隙，并伴有不规则沟壑；局部区域可见相对平整的薄片结构。

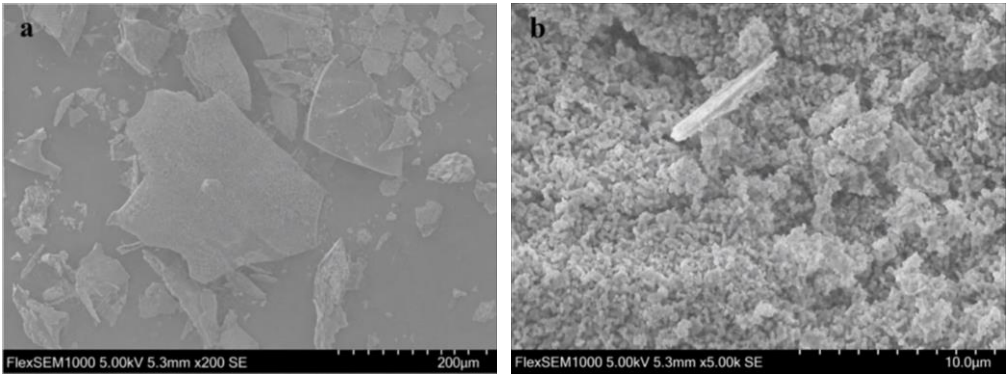


图 6 LLP (a) 200×; (b) 5 000× 的扫描电镜图

Fig.6 SEM images of LLP (a) 200×; (b) 5 000×

2.3 LLP 体外降糖活性评价

2.3.1 LLP 的酶抑制实验

图 7 显示, 在 $0.125\sim 4.00\text{ mg mL}^{-1}$ 范围内, LLP 和 LLP-C 对 α -葡萄糖苷酶的抑制率随质量浓度增加而升高, 高浓度区间增长趋缓。LLP 和 LLP-C 的 IC_{50} 分别为 0.82 、 1.22 和 4.00 mg mL^{-1} 时, LLP 抑制率为 95.24% , 高于 LLP-C 的 85.53% , 但低于阿卡波糖同浓度下的 99.97% 。阿卡波糖在本试验最低浓度 0.125 mg mL^{-1} 时抑制率已超过 50% , 所以其 $\text{IC}_{50} < 0.125\text{ mg mL}^{-1}$ 。结果说明纯化组分 LLP 的活性高于 LLP-C, 但弱于阳性对照, 且仅反映本酶源和本检测体系下的体外抑制作用。

图 8 显示, 在 $1.00\sim 5.00\text{ mg mL}^{-1}$ 范围内, LLP 和 LLP-C 对 α -淀粉酶活性的抑制率随质量浓度升高而增加, 但整体低于阿卡波糖。 5.00 mg mL^{-1} 时, LLP 和 LLP-C 的抑制率分别为 86.21% 和 80.35% , 相应 IC_{50} 为 1.49 mg mL^{-1} 和 1.78 mg mL^{-1} 。阿卡波糖在最低测试浓度 1.00 mg mL^{-1} 时抑制率已超过 50% , 所以其 $\text{IC}_{50} < 1.00\text{ mg mL}^{-1}$ 。与 LLP-C 相比, LLP 对两种消化酶均表现出较强的抑制作用, 说明凝胶过滤后单位质量样品的酶抑制效应有所增强。

张心驰等^[20]报道分级醇沉所得 BLP-50 和 BLP-70 具有较高 α -葡萄糖苷酶抑制率; Hui 等^[7]解析的半乳糖聚糖 BHP-2 对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的 IC_{50} 分别为 0.31 和 0.18 mg mL^{-1} , 均低于本文 LLP。其他食药植物多糖亦呈现明显差异: 杏仁多糖 AP-1 经纯化后 α -葡萄糖苷酶抑制作用增强^[21]; 香菇多糖对 α -葡萄糖苷酶的 IC_{50} 为 0.66 mg mL^{-1} , 并表现为非竞争性抑制^[22]。不同文献的酶来源、底物、浓度区间和拟合模型并不一致, 故 IC_{50} 只适合在同一实验体系内比较。本文阳性对照在最低检测浓度已超过 50% 抑制率, 只能报告 α -葡萄糖苷酶试验 $\text{IC}_{50} < 0.125\text{ mg mL}^{-1}$ 、 α -淀粉酶试验 $\text{IC}_{50} < 1.00\text{ mg mL}^{-1}$, 不在实测区间外外推精确值。其他食药来源多糖的研究也显示, 分子量、单糖构成、糖醛酸比例与酶抑制或降糖效应之间可能存在联系, 但不同模型得到的相关方向并不完全一致^[19,23-26]。近期双酶抑制研究进一步强调, 比较 IC_{50} 时必须控制酶源、底物和反应条件^[27]。

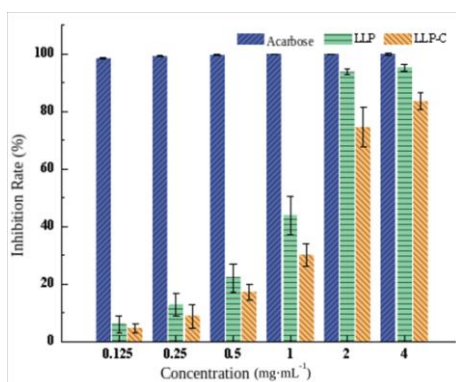


图 7 LLP 与 LLP-C 对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用

Fig.7 Inhibitory effects of LLP and LLP-C on α -glucosidase

注: 数据以平均值±标准差表示 ($n=3$)。下同。

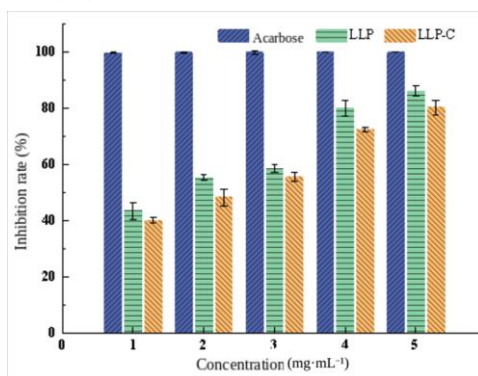


图 8 LLP 与 LLP-C 对 α -淀粉酶的抑制作用

Fig.8 α -Amylase inhibition by LLP and LLP-C

2.3.2 HepG2-IR 模型的建立

HepG2 来源于人肝癌细胞系, 虽不能等同于正常肝细胞, 但保留部分胰岛素受体、葡萄糖转运、糖酵解、糖异生和糖原代谢相关特征, 因而常用于观察肝源性细胞的胰岛素反应和葡萄糖代谢^[28-30]。本研究采用棕榈酸诱导

HepG2-IR 模型, 目的在于评价 LLP 对肝源性细胞葡萄糖利用不足的体外干预作用, 而非模拟骨骼肌葡萄糖摄取或直接证明整体血糖降低。图 9 表明, 正常组随培养时间延长, 葡萄糖消耗量总体升高; 棕榈酸处理后, 各质量浓度组葡萄糖消耗量均有不同程度下降, 说明细胞葡萄糖利用能力受到抑制。综合不同浓度和处理时间结果, 0.80 mmol L^{-1} 棕榈酸处理 24 h 时, 葡萄糖消耗量较正常组降低 30.99%, 模型差异较为明显且细胞状态相对稳定, 因此确定 0.80 mmol L^{-1} 、24 h 为 HepG2-IR 模型诱导条件。

由图 10 可见, 在 60 h 内, 正常组始终保持较高的葡萄糖消耗水平; 模型组虽有轻微波动, 但各时间点均显著低于正常组 ($P < 0.05$), 且模型组内不同时间点之间无显著差异。该结果说明, 用 0.80 mmol L^{-1} 棕榈酸处理 24 h 后的 HepG2-IR 模型可在 60 h 内维持稳定状态, 可用于后续 LLP 干预评价。

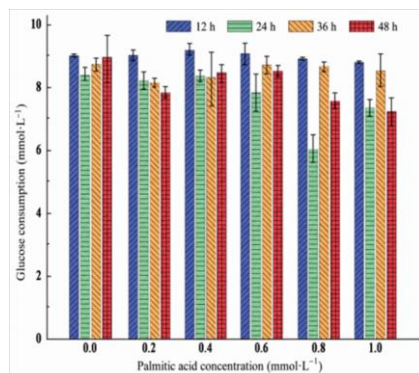


图 9 HepG2-IR 模型的建立

Fig.9 Establishment of the HepG2-IR model

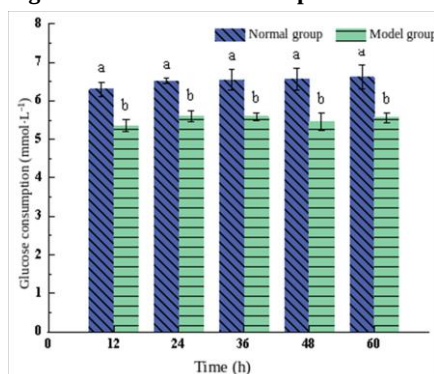


图 10 HepG2-IR 模型持续时间的确定

Fig.10 Determination of the duration of the HepG2-IR model

注: 不同的小写字母表示显著差异 ($P < 0.05$)。图 12 同。

2.3.3 LLP 对 HepG2 细胞活力的影响

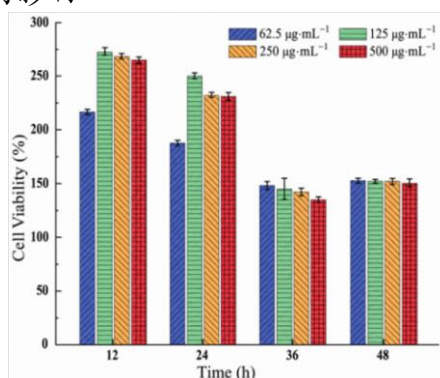


图 11 LLP 对 HepG2 细胞活力的影响

Fig.11 Effect of LLP on HepG2 cell viability

图 11 显示, 在 $62.50 \sim 500.00 \text{ μg·mL}^{-1}$ 范围内, 经 LLP 处理的 HepG2 细胞, 其存活率均超过 100%。这一结果表明在该实验条件下, LLP 未显示出明显的细胞毒性作用。随处理时间延长, 细胞存活率整体呈下降趋势; 12 h

处理组细胞活力较高。为降低高浓度长期处理对细胞状态的干扰,后续 HepG2-IR 模型试验选择 12 h 作为 LLP 干预时间,并采用 25.00、50.00、75.00、100.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 作为处理质量浓度。

2.3.4 LLP 对葡萄糖消耗量的影响

图 12 显示,模型组葡萄糖消耗量显著低于正常组 ($P<0.05$),表明棕榈酸诱导后 HepG2 肝源性细胞的葡萄糖利用受到抑制。LLP 在 25.00~100.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内可提高模型细胞葡萄糖消耗量,且随质量浓度增加呈上升趋势。100.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ LLP 组作用最明显,与模型组相比差异显著 ($P<0.05$),其葡萄糖消耗量达到盐酸二甲双胍阳性对照组的 94.95%。该结果说明 LLP 可改善胰岛素抵抗状态下 HepG2 细胞葡萄糖利用不足的问题,具有一定体外降糖活性。

HepG2-IR 模型主要用于观察肝源性细胞的葡萄糖摄取、利用和肝糖生成相关变化。王洁等^[30]报道拐枣多糖可提高 HepG2-IR 细胞葡萄糖消耗率;刘世锋等^[31]发现灵芝多糖及其菌群代谢产物可促进葡萄糖摄取和糖原合成,并涉及 IRS-1/AKT/GSK-3 β 通路。在棕榈酸诱导的 HepG2-IR 模型中,洋蓟水提物可促进葡萄糖摄取与消耗、降低葡萄糖生成并增加细胞糖原^[32];人参皂苷 F2 可通过 PI3K/AKT/GSK-3 β 相关信号促进糖原合成并抑制糖异生^[28];枸杞多糖则被报道可改善 IR-HepG2 细胞的葡萄糖消耗和摄取,并影响 GSK3 磷酸化、GYS2 表达及肝糖原水平^[29]。从生理机制看,胰岛素激活 IRS/PI3K/AKT 后可抑制 GSK-3 β ,解除其对糖原合酶的抑制,从而促进肝糖原合成;同时,降低 PEPCK 和 G6Pase 等糖异生相关蛋白有助于减少肝糖输出。因此,本文观察到的葡萄糖消耗增加可能与葡萄糖转运、糖酵解、糖原合成或糖异生抑制有关。但本研究仅测定培养液葡萄糖消耗量,未直接检测细胞葡萄糖摄取、糖原含量、PEPCK/G6Pase 或 IRS/PI3K/AKT/GSK-3 β 信号,故上述机制仅用于解释结果的生物学可能性,不能作为已证实机制。

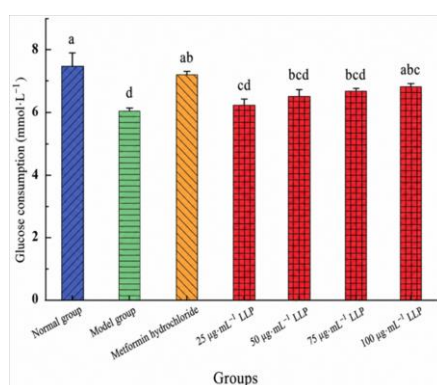


图 12 LLP 对 HepG2-IR 细胞葡萄糖消耗量的影响

Fig.12 Effect of LLP on glucose consumption in HepG2-IR cells

3 结论

本研究以六年生兰州百合为原料,经热水浸提、乙醇沉淀、脱蛋白和 Sephadex G-100 柱层析获得纯化多糖 LLP。LLP 相对分子质量约为 1.15×10^5 Da; FT-IR 结果显示,LLP 具有典型多糖吸收峰,并出现糖醛酸和糖环相关吸收信号;HPLC 分析表明,LLP 由 Man、GalA、Glc、Gal、Ara 组成,摩尔比为 15.42:0.62:83.67:0.14:0.15,其中葡萄糖为主要单糖。刚果红试验提示 LLP 可能具有螺旋构象;SEM 结果显示其主要呈粗糙疏松的片层状聚集结构;TG-DSC 分析表明 LLP 在 147.40 $^{\circ}\text{C}$ 以下热稳定性较好。体外降糖活性实验表明,LLP 对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶均具有浓度依赖性抑制作用,IC₅₀ 分别为 0.82、1.49 mg mL^{-1} ;在 HepG2-IR 模型中,质量浓度为 25.00~100.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 LLP 可不同程度提高细胞葡萄糖消耗量,其中 100.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 处理效果最佳,葡萄糖消耗量达到盐酸二甲双胍阳性对照组的 94.95%,表明 LLP 具有体外消化酶抑制和改善肝源性细胞葡萄糖利用的潜力。综合上述结果,来源于六年生兰州百合的 LLP 具有典型多糖的理化特征和一定体外降糖活性,可为进一步了解兰州百合多糖的理化性质和体外活性提供参考。

参考文献

- [1] SONG S, LIU X, ZHAO B, et al. Effects of *Lactobacillus plantarum* fermentation on the chemical structure and antioxidant activity of

- polysaccharides from bulbs of Lanzhou lily [J]. ACS Omega, 2021, 6(44): 29839-29851.
- [2] GAO D, CHEN H, LIU H, et al. Structure characterization and antioxidant activity analysis of polysaccharides from Lanzhou lily [J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 976607.
- [3] 李艳,晋小军,张迎芳,等.不同生长年限兰州百合质量比较分析[J].食品与发酵工业,2022,48(14):257-262.
- [4] 张咏梅,魏晋梅,李文丽,等.生长年限对兰州百合种球品质的影响[J].南京农业大学学报,2026,49(2):280-289.
- [5] WEI H, WANG Y, LI W, et al. Immunomodulatory activity and active mechanisms of a low molecular polysaccharide isolated from Lanzhou lily bulbs in RAW264.7 macrophages [J]. Journal of Functional Foods, 2022, 92: 105071.
- [6] HUI H, JIN H, YANG X, et al. The structure and antioxidant activities of three high molecular weight polysaccharides purified from the bulbs of Lanzhou lily [J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2023, 17(1): 800-812.
- [7] HUI H, JIN H, YANG X, et al. Fine structure and hypoglycemic effect of a galactoglucan from the bulbs of Lanzhou lily [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 254(Pt1): 127774.
- [8] LI C H, ZHU Z M, CHENG L, et al. Extraction, purification, characteristics, bioactivities, prospects, and toxicity of *Lilium* spp. polysaccharides [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 259: 128532.
- [9] KANG S, GUO Z, ZHAO F, et al. Lanzhou lily polysaccharide fragment protects human umbilical vein endothelial cells from radiation-induced DNA double-strand breaks [J]. Human & Experimental Toxicology, 2022, 41: 1-10.
- [10] LI Z D, WANG X Q, LI X, et al. Polysaccharides from Lanzhou lily attenuate nonalcoholic fatty liver disease modifying the gut microbiota and metabolite profile [J]. Chemistry & Biodiversity, 2025, 22(1): e202401538.
- [11] XIANG R R, ZHANG D D, SONG S, et al. Functional enhancement of whey protein isolate by water-soluble polysaccharides from Lanzhou lily bulbs [J]. Applied Food Research, 2026, 6(1): 102109.
- [12] SONG Z, ZHANG Y, LUO Y, et al. Systematic evaluation on the physicochemical characteristics of a series polysaccharides extracted from different edible lilies by ultrasound and subcritical water [J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 998942.
- [13] HE N W, ZHAI X C, ZHANG X B, et al. Extraction, purification and characterization of water-soluble polysaccharides from green walnut husk with anti-oxidant and anti-proliferative capacities [J]. Process Biochemistry, 2020, 88: 170-179.
- [14] 郝亚利.榆黄菇菌多糖的提取、结构表征及降血糖活性研究[D].天津:天津科技大学,2020.
- [15] 张梦晴.羊栖菜 α -葡萄糖苷酶抑制剂的分离纯化及特性研究[D].无锡:江南大学,2020.
- [16] 汤陈鹏,吕峰,王蓉琳.孔石莼多糖锌结构表征与体外降血糖活性[J].食品科学,2020,41(7):52-58.
- [17] 杨小倩.玉蜀黍不同部位降血糖作用的活性研究[D].长春:长春中医药大学,2021.
- [18] 张伟.甘草次酸的提取、结构修饰及降血糖活性研究[D].天津:天津科技大学,2020.
- [19] WANG F F, JIANG Y J, JIN S F, et al. Structure characterization and bioactivity of neutral polysaccharides from different sources of *Polygonatum* Mill [J]. Biopolymers, 2022, 113(6): e23490.
- [20] 张心驰,惠和平,郭栋费,等.梯度醇沉兰州百合多糖结构及降血糖活性分析[J].精细化工,2023,40(10):2231-2240.
- [21] PENG Y, ZHANG Z, CHEN W, et al. Structural characterization, α -glucosidase inhibitory activity and antioxidant activity of neutral polysaccharide from apricot (*Armeniaca sibirica* L. Lam) kernels [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 238: 124109.
- [22] TU J, ADHIKARI B, BRENNAN M A, et al. Shiitake polysaccharides acted as a non-competitive inhibitor to α -glucosidase and inhibited glucose transport of digested starch from Caco-2 cells monolayer [J]. Food Research International, 2023, 173(Pt1): 113268.
- [23] FAN S H, GUO D Y, ZHANG J H, et al. Structure, physicochemical properties, antioxidant, and hypoglycemic activities of water-soluble polysaccharides from millet bran [J]. Journal of Food Science, 2022, 87(12): 5263-5275.
- [24] LIU Q H, WU J, WANG P, et al. Neutral polysaccharides from *Hohenbuehelia serotina* with hypoglycemic effects in a type 2 diabetic mouse model [J]. Frontiers in Pharmacology, 2022, 13: 883653.
- [25] WANG X, XIU W Y, HAN Y, et al. Structural characterization of a novel polysaccharide from sweet corn cob that inhibits glycosylase in STZ-induced diabetic rats [J]. Glycoconjugate Journal, 2022, 39(3): 413-427.
- [26] ZHOU L Q, LI J N, DING C, et al. Mechanistic advances in hypoglycemic effects of natural polysaccharides: multi-target regulation of glycometabolism and gut microbiota crosstalk [J]. Molecules, 2025, 30(9): 1980.
- [27] JHA R, GOYAL K, MEHAN S, et al. Dual α -amylase and α -glucosidase inhibitors: recent progress from natural and synthetic resources

- [J]. Bioorganic Chemistry, 2025, 163: 108762.
- [28] HAN S, YOU L, HU Y, et al. Ginsenoside F2 enhances glucose metabolism by modulating insulin signal transduction in human hepatocarcinoma cells [J]. Journal of Ginseng Research, 2023, 47(3): 420-428.
- [29] WAN F, DANG J, HUANG S, et al. The beneficial effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on insulin resistance and hepatic glucose production in diabetes [J]. Analytical Cellular Pathology, 2025, 2025: 3176140.
- [30] 王洁,毕金峰,吴群军,等.拐枣不同部位多糖的结构特征及活性分析[J].现代食品科技,2023,39(9):252-260.
- [31] 刘世锋,董文静,杨兰,等.灵芝多糖及其菌群代谢产物对HepG2 细胞胰岛素抵抗的改善作用及机制[J].食品工业科技,2023,44(23):314-321.
- [32] DENG A, WANG Y, HUANG K, et al. Artichoke (*Cynara scolymus* L.) water extract alleviates palmitate-induced insulin resistance in HepG2 hepatocytes via the activation of IRS1/PI3K/AKT/FoxO1 and GSK-3 β signaling pathway [J]. BMC Complementary Medicine and Therapies, 2023, 23(1): 460.