

大苞鞘石斛中多糖 DWW-1 的提纯及其结构与性质分析

秦玉川, 王丽玲, 王衍彬, 贺 亮, 刘本同, 钱 华, 童晓青

(浙江省林业科学研究院, 浙江 杭州 310023)

摘要: 从大苞鞘石斛 *Dendrobium wardianum* 中分离纯化得到一种均一多糖组分 DWW-1, 采用化学和光谱学的方法对其理化性质及初步结构进行研究。首先采用水提醇沉方法制备大苞鞘的粗多糖, 经过 Sevag 法除蛋白, DEAE-Cellulose 和 Sephadex G-75 柱层析分离纯化得到均一多糖 DWW-1 纯品。其次利用化学法、高效凝胶过滤色谱法、液相色谱法, 并结合红外光谱, 对 DWW-1 进行性质及结构分析。结果显示 DWW-1 为白色絮状固体, 易溶于水, 分子量为 6.479×10^4 , 糖基组成为葡萄糖、糖醛酸、甘露糖、岩藻糖四种单糖; 多糖糖苷键以 1→4 连接键为主, 1→3 为次; 其次 DWW-1 具有较强 DPPH 自由基清除活性。初步研究结果表明从大苞鞘石斛中分离到的一种具有抗氧化活性多糖, 并简称为 DWW-1。

关键词: 大苞鞘石斛; 多糖; 分离; 理化性质; 结构分析

中图分类号: S567.5 文献标识码: A 文章编号: 1001-3776(2018)04-0015-06

Purification and Analysis of DWW-1 from *Dendrobium wardianum*

QIN Yu-chuan, WANG Li-ling, WANG Yan-bin, HE Liang, LIU Ben-tong, QIAN Hua, TONG Xiao-qing

(Zhejiang Academy of Forestry, Hangzhou 310023, China)

Abstract: Crude polysaccharides from *Dendrobium wardianum* were extracted by water and precipitated by ethanol. Deproteinization with Sevage method, DWW-1 was separated and purified by DEAE-Cellulose and Sephadex G-75 column chromatography. Analysis of properties and structure was performed by using chemical method, HPGPC, HPLC, GC-MS and IR. The results showed that DWW-1 was a white flocculent solid after vacuum freeze-drying, soluble in water, with relative molecular mass of 6.479×10^4 . It was composed of glucose, glucuronic acid, mannose and fucose. DWW-1 showed strong scavenging ability on DPPH free radicals.

Key words: *Dendrobium wardianum*; polysaccharide; isolation; physicochemical properties; structure analysis

大苞鞘石斛 *Dendrobium wardianum*, 又名腾冲石斛, 为兰科 Orchidaceae 石斛属 *Dendrobium* 多年生附生兰, 生于海拔 1 350 ~ 1 900 m 的山地疏林中树干上。产云南东南部至西部(金平、勐腊、镇康、腾冲、盈江), 在中国周边国家不丹、缅甸、泰国、越南也有分布。目前关于大苞鞘石斛的研究主要集中在化学成分小分子^[1]、种子萌发^[2]、组培快繁^[3]和低温保存^[4]等方面。

石斛中的活性物质主要是多糖, 为此国内外的一些专家学者已开始对石斛多糖进行分离、纯化和结构

收稿日期: 2017-12-11; 修回日期: 2018-03-05

基金项目: 浙江省科技计划项目: 观赏用石斛水培关键技术与示范(2014F50020)

作者简介: 秦玉川, 工程师, 从事动植物保护与利用工作; E-mail: hzqinchuan@126.com。通信作者: 童晓青, 副研究员, 从事药用植物栽培工作; E-mail: 81918735@qq.com。

分析^[5-9],但是到目前为止对于大苞鞘石斛化学成分方面的研究较少,仅有报道大苞鞘石斛多糖含量较高,但生物碱含量较少^[10];同时有学者从大苞鞘石斛中分离到钩状石斛素、愉悦石斛素、4',5',7'-三羟基-3',5'-二甲氧基黄烷酮、 β -胡萝卜素和 β -谷甾醇这5种活性成分^[11]。为了研究大苞鞘石斛中多糖的主要结构,本研究对大苞鞘石斛水溶性多糖成分进行提取、分离和纯化,并着重对大苞鞘石斛多糖 DWW-1 的化学结构进行研究,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为大苞鞘石斛,采自浙江省杭州园林青山湖石斛基地,经鉴定为成熟未开花的大苞鞘石斛。取成熟3年生秋季未开花大苞鞘石斛假鳞茎若干,切成1~2 cm的小段,蒸馏水洗净,105℃杀青15 min,60℃烘干至恒质量,粉碎成粉末后过0.25 mm筛,置于干燥器备用。

1.2 试验仪器与试剂

DG120 型药材粉碎机(浙江省瑞安市春海药材器械厂);二列四孔水浴 HH-2K4(巩义市予华仪器责任公司);U-1900 型可见分光光度计(日本 HITACHI 公司);CL31R 型多功能高速离心机(美国 Thermo 公司);U-1900 型可见分光光度计等。单糖对照品 D-葡萄糖、D-木糖、D-半乳糖、L-鼠李糖、D-甘露糖、L-阿拉伯糖、D-核糖、D-葡萄糖醛酸(上海阿拉丁生化科技股份有限公司);其余试剂均为分析纯。

1.3 试验方法

1.3.1 大苞鞘石斛粗多糖的提取 称取干燥的大苞鞘石斛粉末 50.00 g,加入 30 倍质量的蒸馏水,90℃水浴加热 2 h。冷却后 7 200 r·min⁻¹离心、抽滤,获得滤液 1 500 mL。将滤液真空浓缩至原有体积的 1/6(旋蒸仪温度 90 度)约为 340 mL,加入 4 倍体积的乙醇,静置 12 h,7 200 r·min⁻¹离心分离,得到沉淀。将沉淀物真空干燥,即为粗多糖。

1.3.2 粗多糖的分离与纯化 采用 Sevag 法^[12]除去游离的蛋白质。取粗多糖 5.00 g,加 60 mL 蒸馏水溶解。配制有机溶剂混合液(氯仿:正丁醇 = 4:1),向粗多糖溶液中加入 1/4 体积的有机溶剂混合液,充分震荡混匀,经离心机 13 200 r·min⁻¹离心 1 min,将水相和氯仿相分开,操作过程中,蛋白质多出现于两相界面处。在水相中加入 1/4 体积的氯仿-正丁醇溶液,重复 3~5 次,直到震荡后水层上不再有白色泡沫为止。

将除蛋白后的多糖溶液约 20 mL(浓稠棕色)放入真空干燥箱(50℃,压力为 1.0×10^{-4} Mpa)中干燥(除去有机溶剂)。干燥后用蒸馏水溶解,浓度为 20.1 g·L⁻¹,以 8 000 r·min⁻¹,离心 5 min,除去不溶物后为大苞鞘石斛粗多糖组分 I。

将大苞鞘石斛粗多糖组分 I 通过 DEAE-纤维素柱,用梯度氯化钠洗脱,流速 12 mL·h⁻¹,每 4 mL 收集 1 管,并用苯酚-硫酸法检测,收集第一峰,得到的液体再经过浓缩、透析、冷冻干燥,得多糖 DWW-1。

1.3.3 单糖组成分析 多糖水解:称取多糖 DWW-1 3 mg,加入 4 mol·L⁻¹TFA(三氟乙酸)1 mL,置于具塞试管中、氮气封口,121℃下水解 6 h,结束后,冷却至室温,并加入 200 μ L 甲醇,60℃真空,以 8 000 r·min⁻¹,5 min 离心浓缩,反复 3 次,待衍生化。

每种单糖(5 mM),按照邵双双等^[13]方法处理后,待高效液相色谱(HPLC);

吹干的多糖水溶液,按上述同样的方法处理后,待 HPLC。

RP-HPLC 条件:检测波长 245 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹;柱温:室温,上样条件:10 μ L,流动相 A(乙腈):流动相 B(0.05 mol·L⁻¹磷酸缓冲液, pH 6.9)=17:83。

1.3.4 分子量测定 采用静态光散射和动态光散射系统(SEC-MALLS)进行测定,获得多糖 DWW-1 的重均分子量(Mw)。

1.3.5 红外光谱测定 取多糖样品 DWW-1 1~2 mg,运用溴化钾(KBr)压片法,将适量多糖样品与干燥的溴化钾粉末在玛瑙研钵中研磨均匀,经压片机压制成透明薄片,在红外光谱仪下进行测定。红外光谱仪测定参数

如下: 背景扫描 32 次; 扫描范围 $400 \sim 4\,000\text{ cm}^{-1}$; 分辨率 4.0 cm^{-1} ; 检测器: DTGS。

1.3.6 高碘酸氧化 称取多糖样品 DWW-1 50 mg, 然后加入 30 mM 高碘酸钠 (NaIO_4) 25 mL, 蒸馏水定容, 使 NaIO_4 终浓度为 15 mM, 在 4°C 暗处搅拌。于 4, 8, 12……24, 48 h 间隔时间分别吸取反应液 0.1 mL, 蒸馏水稀释 250 倍后, 以蒸馏水为对照在 223 nm 处测其光密度值, 直至高碘酸的消耗量达到稳定。用 $0.015\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaIO_4 和 $0.015\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 碘酸钠 (NaIO_3) 稀释 250 倍后的光密度值作标准。反应结束后, 取出反应液 5 mL 于锥形瓶中加 1 mL 乙二醇搅拌 30 min 以终止反应, 加入几滴酚酞, 用 0.01 N 的 NaOH 滴定释放的甲酸量。

1.3.7 DPPH 自由基清除活性 用无水乙醇配制 $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 DPPH 溶液, 避光保存。配制 $0.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 Vc 溶液 (作为对照)。将测试样品梯度稀释。将 2 mL 待测样品溶液和 2 mL DPPH 溶液加入到同一试管中, 充分摇匀, 室温下避光静置 30 min 后测定其吸光度 A_i , 同时测定 2 mL DPPH 溶液与 2 mL 蒸馏水混合后的吸光度 A_c , 以及 2 mL 测试样品与 2 mL 无水乙醇混合后的吸光度 A_b 。自由基清除能力的表示为:

$$\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_i - A_b}{A_c}\right) \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 大苞鞘石斛多糖的分离纯化

将多糖溶液通过 DEAE-纤维素柱, 得到 44 管分离溶液。用苯酚-硫酸法测定其多糖含量, 绘制曲线图 1。从图 1 可以看出, 第 6 管中多糖含量最高, 且只有 1 个吸收峰, 说明大苞鞘石斛的多糖只有 1 种。对第 3 至第 16 管进行收集, 浓缩透析, 冷冻干燥, 得到 0.809 6 g 多糖。

2.2 单糖组成分析

对 DDW-1 和对照品 HPLC 的测定结果见图 2、图 3 和表 1。由图表可知, 主要出现 4 个峰, 分别为葡萄糖 (Glc)、甘露糖 (Man)、葡萄糖醛酸 (GalUA) 和岩藻糖 (Fuc), 其中甘露糖的含量为 82.06%, 葡萄糖为 15.42%, 葡萄糖醛酸为 0.81% 和岩藻糖为 1.72%。因此, 大苞鞘石斛的多糖中单糖的组成比例: Man:Glc:GlcUA:Fuc = 101.3:19:1:2.1。

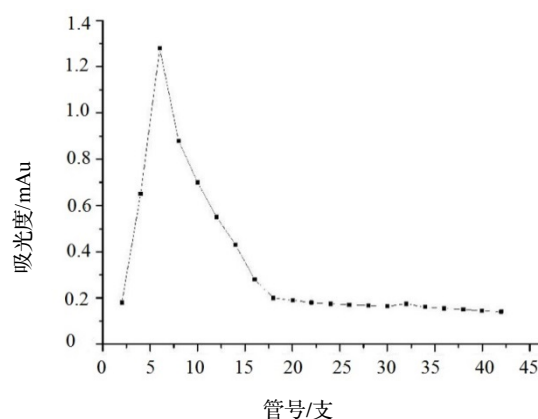


图 1 DWW-1 的 DEAE-纤维素柱层析曲线

Figure 1 DWW-1 content determined by DEAE-cellulose chromatogram

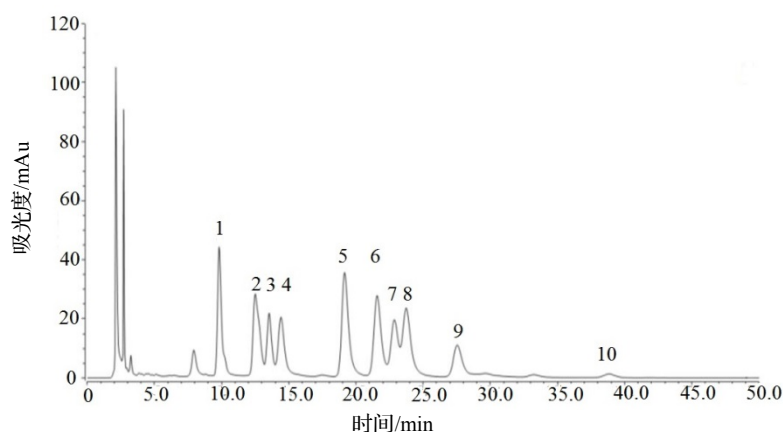


图 2 单糖标准品的 HPLC 曲线

Figure 2 Monosaccharides in the control by HPLC

注: 峰: 1-甘露糖 (Man);
2-核糖 (Rib);
3-鼠李糖 (Rham);
4-半乳糖醛酸 (GalUA);
5-葡萄糖 (Glc);
6-葡萄糖醛酸 (GlcUA);
7-半乳糖 (Gal);
8-木糖 (Xyl);
9-阿拉伯糖 (Ara);
10-岩藻糖 (Fuc)。

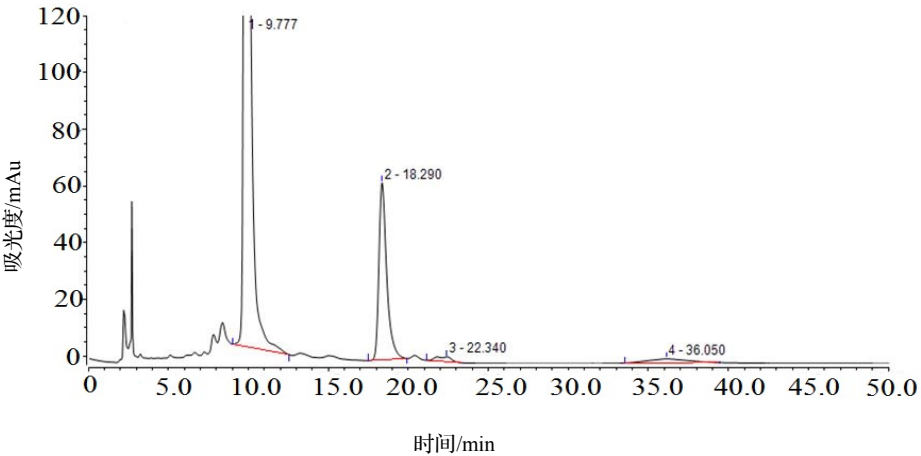


图3 样品单糖的HPLC曲线

Figure 3 Monosaccharides from DWW-1 by HPLC

表1 样品HPLC结果
Table 1 Results of DWW-1 by HPLC

序号	出峰时间/min	峰面积/(mAu)	含量/%
1	9.777	188.551 0	82.06
2	18.290	35.424 6	15.42
3	22.340	1.861 3	0.81
4	36.050	3.944 8	1.72

2.3 纯度分析及分子量测定

如图4所示，DDW-1的峰出现在第10 min至第18 min之间，90°光散射和示差检测器RI所产生的峰形具有相似大小和形状，几乎完全重叠，并且显示多糖呈现单一对称峰，因此DWW-1为均一性的纯多糖。同时，测得DWW-1多糖纯度达到99.82%。此外，Mw/Mn表示样品的分散度，分子量分布越宽，分散度就越大^[14]。测得Mw/Mn值为1.178，比较接近1，表明DWW-1是一个低分散度的多糖，其分子量Mw=6.479×10⁴。

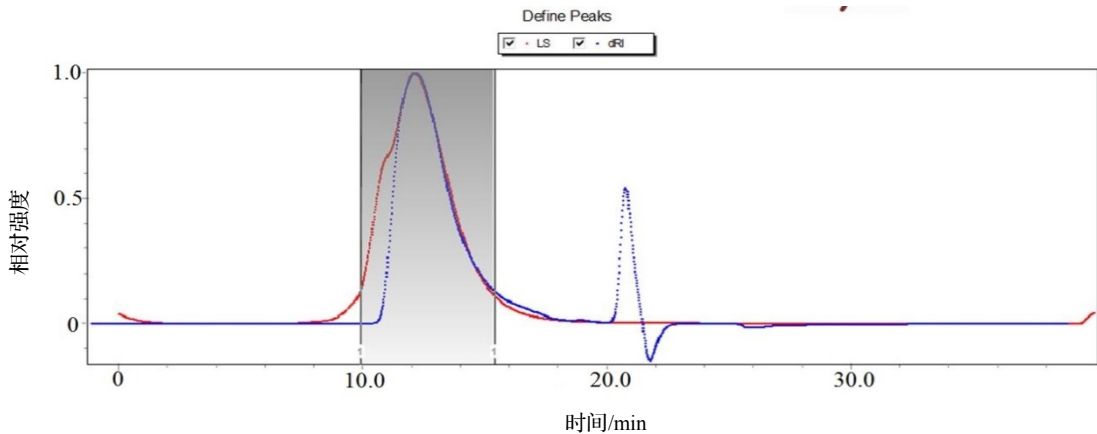


图4 DWW-1的SEC-MALLS尺寸排阻色谱图

Figure 4 SEC chromatogram of DWW-1 detected by SEC-MALLS

2.4 红外光谱分析

DWW-1在400~4 000 cm⁻¹区具有多糖类物质的一般特征（图5）。在3 430 cm⁻¹附近的强吸收峰是糖分子中羟基的伸缩振动吸收峰；2 928 cm⁻¹附近的吸收峰是C-H的伸缩振动峰；在1 735 cm⁻¹，1 637 cm⁻¹，1 382 cm⁻¹，1 248 cm⁻¹，1 028 cm⁻¹，1 730 cm⁻¹附近有糖醛酸的特征吸收峰，表明该多糖中可能存在有糖醛酸，这一测定结

果与单糖衍生化的结果相一致, 表明该多糖是酸性多糖。

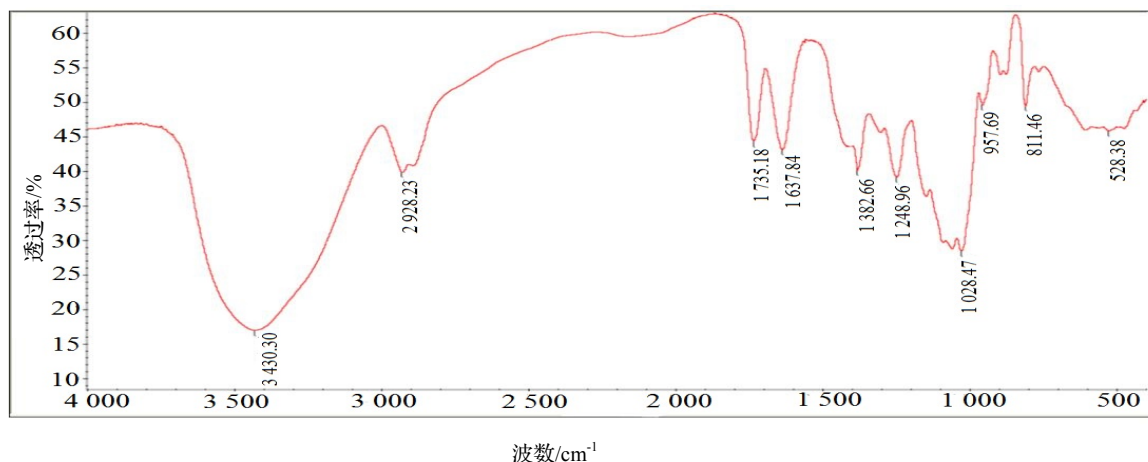


图 5 DWW-1 的红外图谱

Figure 5 Infrared spectrogram of DWW-1

2.5 高碘酸氧化反应

根据实验结果, 经过 108 h 后高碘酸氧化最终吸光度稳定在 0.556。由 NaIO_4 标准曲线可知, 高碘酸的总消耗量为 0.188 5 mmol, 甲酸的总释放量为 0.023 2 mmol。

通过标准曲线, 平均 0.1 mol 己糖残基 (每个己糖残基的分子量以 162 计算) 消耗 0.018 85 mol 高碘酸, 同时有 0.002 32 mol 的甲酸产生。己糖残基、消耗的高碘酸钠和生成的甲酸之间的摩尔比为 1:0.188 5:0.023 2。由此推算, 多糖中以 1→6 键相连的残基或非还原末端基 1→5 占 2.32%, 可被高碘酸氧化, 以不产生甲酸的 1→2 或 1→4 键相连的残基占 14.21%, 不被高碘酸氧化的 1→3 键连接的残基占 83.47%。

2.6 抗氧化活性

通过实验, $800 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Vc 的自由基清除率为 98.31%, 符合实验的要求。由图 6 所示, 石斛多糖的抗氧化活性随浓度的增加逐渐增强。但是, 由于实验中的多糖是通过水提醇沉的方法得到的, 乙醇对其有一定的沉淀作用。故当多糖溶液达到一定的浓度时, 有部分多糖会沉淀, 从而影响实验的进行, 导致自由基清除率降低。

从图 6 可以看出, 石斛多糖的自由基清除能力随多糖浓度的增加逐渐增强, 在多糖浓度为 $650 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 自由基的清除率最高达 44.5%, 根据鲍素华的铁皮石斛多糖体外抗氧化活性的研究中四种石斛多糖的抗氧化活性^[15], 大苞鞘石斛多糖 DWW-1 的抗氧化能力较强, 并且对剂量有较为明显的依赖性。

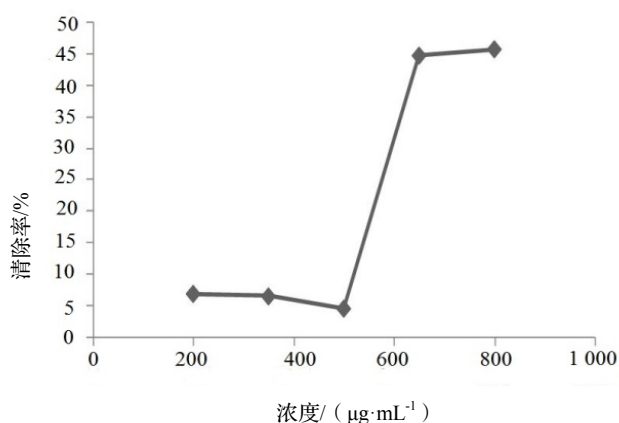


图 6 DWW-1 自由基清除率

Figure 6 Hydroxyl radical scavenging rate of DWW-1

3 结论与讨论

大苞鞘石斛采用水提醇沉方法提取多糖, 采用 Sevag 法对提取的粗多糖进行初步处理, 除去游离的蛋白质, 处理后的粗多糖经 DEAE-纤维素柱洗脱得到 1 种多糖 DWW-1。通过 PMP (1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮) 衍生化-HPLC 法测定石斛多糖的单糖组成, 可以得出多糖 DWW-1 主要由甘露糖、葡萄糖、葡萄糖醛酸和岩藻糖构成。

其中甘露糖的含量为 82.06%，葡萄糖为 15.42%，葡萄糖醛酸为 0.81%和岩藻糖为 1.72%。在对大苞鞘石斛多糖 DWW-1 的内部分子结构通过高碘酸氧化和红外光谱检测进行分析,初步了解了多糖 DWW-1 的分子结构特征及其抗氧化活性。这一单糖组成与目前发现的石斛属其他单一多糖结构上有很大差别,如金钗石斛 *Dendrobium nobile* Lindl DNP-W1B 由葡萄糖、阿拉伯糖和半乳糖 3 种单糖组成,摩尔比为 6.2:3.1:0.9^[16]。与药用铁皮石斛原球茎多糖 D-02C^[17], DCPPIa-1^[18], DCPPI3c-1^[19]在结构和组成上也有很大不同,这说明此次发现的大苞鞘石斛多糖在功能活性上与之前发现的多糖有差异,因此其生物学活性有待于进一步的深入研究。

参考文献:

- [1] FAN W W, XU F Q, DONG F W, *et al.* Dendrowardols A and B, two new sesquiterpenoids from *Dendrobium wardianum* Warner[J]. Tetrahedron Lett, 2013, 54: 1928 – 1930.
- [2] 陈娜, 方炎明, 程磊. 大苞鞘石斛种子萌发过程中形态变化研究[J]. 安徽农业科学, 2013, 41 (3): 1038 – 1040.
- [3] 王伟. 大苞鞘石斛 (*Dendrobium wardianum*) 离体培养与快速繁殖的研究[D]. 杭州: 浙江林学院, 2009.
- [4] 吴元玲, 申晓辉. 大苞鞘石斛原球茎玻璃化超低温保存技术的研究[J]. 中国细胞生物学学报, 2011, 33 (3): 279 – 287.
- [5] 黄民权, 黄步汉, 蔡体育. 铁皮石斛多糖的提取、分离和分析[J]. 中草药, 1994, 25 (3): 128.
- [6] 赵永灵, 王世林, 李晓玉. 兜唇石斛多糖的研究[J]. 云南植物研究, 1994, 16 (4): 392.
- [7] 陈云龙, 张铭, 华允芬, 等. 细茎石斛不同部位有效成分及分布规律研究[J]. 中国中药杂志, 2001, 26 (10): 709.
- [8] 徐程, 陈云龙, 张铭. 细茎石斛多糖 DMP2a-1 的结构分析[J]. 中国中药杂志, 2004, 39 (12): 900.
- [9] 陈璋辉, 陈云龙, 吴涛, 等. 细茎石斛多糖 DMP4a-1 的结构特性及免疫活性研究[J]. 中国药学杂志, 2005, 40 (23): 1781.
- [10] 章金辉, 王再花, 李杰, 等. 大苞鞘石斛与铁皮石斛主要活性成分比较分析[J]. 热带作物学报, 2015, 36 (12): 2192 – 2197.
- [11] 李安华, 周志宏, 沈妍, 等. 大苞鞘石斛化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2012 (24): 479 – 480.
- [12] STAUB A M. Removal of protein-Sevag method[J]. Methods Carbohydr Chem, 1965, 5: 5 – 6.
- [13] 邵双双, 贺亮, 韦朝阳, 等. 新型中国被毛胞内多糖 HSIPS2 链构象及抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37 (04): 200 – 227.
- [14] 张森, 刘平怀, 王丽波, 等. 氮对纤维藻生长、油脂积累及营养吸收的影响[J]. 食品工业科技, 2014, 35 (01): 155 – 159.
- [15] 鲍素华. 铁皮石斛多糖抗氧化活性的研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2009.
- [16] 王军辉, 查学强, 潘利华, 等. 金钗石斛免疫活性多糖 DNP-W1B 的结构特征[J]. 高等学校化学学报, 2013, 34 (4): 881 – 885.
- [17] 林宏, 施松善, 王顺春. 铁皮石斛原球茎多糖 D-02C 的结构特征及其抗补体活性[J]. 福建中医药, 2012, 43 (3): 54 – 57.
- [18] 何铁光, 杨丽涛, 李杨瑞, 等. 铁皮石斛原球茎多糖 DCPPIa-1 的理化性质及抗肿瘤活性[J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19: 578 – 583.
- [19] 何铁光, 杨丽涛, 李杨瑞, 等. 铁皮石斛原球茎多糖 DCPPI3c-1 的分离纯化及结构初步分析[J]. 分析测试学报, 2008, 27 (2): 143 – 147.