

## 细茎石斛中 1 种中性多糖的纯化与结构分析

林先兵, 张旭锋\*, 王 宇, 孙丽芬

云南师范大学化学化工学院, 云南 昆明 650500

**摘要:** 目的 研究从细茎石斛 *Dendrobium moniliforme* 中得到的中性多糖 DMP2-A 的化学结构和在水溶液中的构象。方法 利用单糖组分分析、甲基化分析、红外光谱 (IR)、尺寸排除色谱-激光光散射仪联用等方法分析其结构特征和溶液构象。结果 DMP2-A 由阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖及半乳糖组成, 其中木糖残基主要以 1-链接的末端糖存在; 葡萄糖残基链接方式为 1,3-链接、1,4-链接和 1,3,6-链接; 半乳糖残基链接方式为 1,3-链接、1,4-链接和 1,3,6-链接; 阿拉伯糖残基以 1,3,5-链接; 甘露糖残基以 1,3,6-链接。该多糖在 0.15 mol/L 的  $\text{NaNO}_3$  水溶液中重均相对分子质量为  $1.07 \times 10^4$ , 存在少量聚集集体, 聚集数约为 38。结论 DMP2-A 为多分枝、结构复杂的多糖, 其化学结构及在水溶液中的聚集形态为首次报道。

**关键词:** 细茎石斛; 多糖; DMP2-A; 纯化; 单糖组成

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)23-5516-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.23.006

## Isolation and structural characterization of neutral polysaccharide from *Dendrobium moniliforme*

LIN Xian-bing, ZHANG Xu-feng, WANG Yu, SUN Li-fen

College of Chemistry and Chemical Engineering, Yunnan Normal University, Kunming 650500, China

**Abstract: Objective** To study the chemical structure and the conformation in the aqueous solution for a novel neutral polysaccharide (DMP2-A) purified from *Dendrobium moniliforme*. **Methods** The chemical structural characterization was determined with sugar analyses, methylation analyses, and IR spectroscopic methods. Moreover, the molecular weight and conformation in the aqueous solution were analyzed by size-exclusion chromatography (SEC) combined with laser light scattering (LLS). **Results** The polysaccharide DMP2-A consisted of 1-linked terminal xylosyl residue, 1,3-, 1,4-, and 1,3,6-linked glucosyl residues, 1,3-, 1,4-, and 1,3,6-linked galactosyl residues, 1,3,5-linked arabinosyl residue and 1,3,6-linked mannosyl group. Moreover, the weight-average molecular ( $M_w$ ) of polysaccharide DMP2-A was determined to be  $(1.07 \times 10^4)$ . A small amount of aggregates were formed with the aggregation number of approximately 38 in the 0.15 mol/L  $\text{NaNO}_3$  aqueous solution. **Conclusion** DMP2-A is a kind of polysaccharide with multi-branch and complicated structure. It's the first time that the polysaccharide DMP2-A was isolated and the chemical structure and conformation in aqueous solution were reported.

**Key words:** *Dendrobium moniliforme* (L.) Sw.; polysaccharide; DMP2-A; purification; monosaccharide composition

石斛为我国传统名贵中药材, 在民间更有“十大仙草之首”的称誉, 具有抗肿瘤、抗衰老、增强机体免疫力等作用<sup>[1-2]</sup>。较之石斛生物碱及其他小分子化合物, 石斛多糖的研究起步较晚, 研究报道也少。近年来, 植物多糖的研究逐渐受到人们的重视, 石斛的降血糖、抗肿瘤等生物活性一般认为与其多糖的生物活性有关<sup>[3-7]</sup>。陈云龙等<sup>[8-10]</sup>首次从细茎石斛中用热水提取分离得到 8 种水溶性多糖, 并对其

进行了结构分析, 其中细茎石斛多糖 DMP1a-1 对盐酸肾上腺素和四氧嘧啶引起的实验性糖尿病小鼠有防治作用。由于细茎石斛中含有的多糖种类繁多, 结构复杂, 特别对其热水提取后的残渣中多糖的研究目前尚未见报道, 这在很大程度上限制了对这种植物资源的开发和利用。很多菌类通过热水提取后, 其残渣采用强碱提取仍能得到多糖<sup>[11]</sup>。本实验借鉴了菌类多糖的提取方法, 从滇产细茎石斛热水提取

收稿日期: 2018-05-09

基金项目: 云南省应用基础研究面上项目 (2014FB139); 云南省教育厅科学研究基金项目 (2014Z046)

作者简介: 林先兵, 男, 制药工程本科生, 研究方向为中草药有效成分研究。E-mail: 791520894@qq.com

\*通信作者 张旭锋, 男, 博士, 讲师, 主要从事植物多糖的研究。Tel: 18487189817 E-mail: xfzhang\_ynnu@126.com

后的残渣中利用强碱提取,并对碱提多糖进一步分离纯化,获得了一种均一性的中性多糖 DMP2-A,并初步研究了该多糖的化学结构特征以及在 0.15 mol/L 的 NaNO<sub>3</sub> 水溶液中的构象。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

TG16-WS 台式离心机(湘仪离心机仪器有限公司); GJ-12 冷冻干燥机(北京松源华兴科技发展有限公司); UV-1780 紫外-可见分光光度计(日本岛津公司); 红外光谱仪(美国 Bruker 公司); 尺寸排除色谱-多角激光光散射仪(美国 Wyatt 公司); 核磁共振仪(美国 Bruker 公司); 气质联用仪(美国 Agilent 公司)。

细茎石斛购于云南昆明中药材市场,经云南师范大学化学化工学院陈业高教授鉴定为兰科石斛属植物细茎石斛 *Dendrobium moniliforme* (L.) Sw., 洗净后自然风干,粉碎成粗粉,备用。苯酚、浓硫酸、正丁醇、三氯甲烷、无水乙醇、醋酸酐、氯化钠等均为分析纯。标准品半乳糖、鼠李糖、果糖、甘露糖、葡萄糖、木糖均购自 Sigma 公司,质量分数均大于 99%。透析袋(截留相对分子质量 3 500,上海华美生物工程公司); DEAE-纤维素(美国 GE 公司)。

### 1.2 分离纯化

取粉碎的细茎石斛粉末样品 100 g,用 2 000 mL 的生理盐水(0.9% NaCl 水溶液)在 120 °C 高温提取 5 次,每次 30 min,残渣用 2 000 mL 的 1 mol/L NaOH 水溶液(含 0.5% NaBH<sub>4</sub>)在常温浸提 2 h,提取液用醋酸中和至中性后静置,离心得到上清液,加无水乙醇进行沉淀,静置后离心,将沉淀用水复溶,加入 0.5 倍体积 30%的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 脱色,采用 Sevag 法脱蛋白,重复 10 次,直至液面交界处无胶状物,透析除去小分子,浓缩后冷冻干燥得淡黄色粗多糖 2.5 g。

将粗多糖溶于水,经 DEAE-纤维素制备柱(300 mm×20 mm),依次用水及 0.1、0.2、0.5 mol/L NaCl 溶液洗脱,分部收集,苯酚-硫酸法检测,绘制洗脱曲线,合并水洗脱峰部分,减压浓缩、透析,冷冻干燥,得到白色细茎石斛多糖 DMP2-A 纯品(0.735 g)。

### 1.3 糖与蛋白质含量的测定

总糖和糖醛酸含量分别用苯酚-硫酸法<sup>[12]</sup>和间苯基苯酚法<sup>[13]</sup>测定,以葡萄糖和葡萄糖醛酸作为标准,蛋白质含量以牛血清白蛋白为标准,用 Bradford 法测定<sup>[14]</sup>。

### 1.4 纯度和相对分子质量测定

取 5 mg DMP2-A 溶于 2 mL 浓度为 0.1 mol/L 的 NaNO<sub>3</sub> 水溶液中,搅拌 24 h 使其充分溶解,用 0.2 μm 过滤器滤过后,采用尺寸排除色谱-激光光散射仪(SEC-LLS)分析。

激光光散射仪为美国的 Wyatt 技术公司 DAWN<sup>®</sup> DSP 多角度激光光散射仪,配置 He-Ne 激光光源( $\lambda=632.8$  nm),散射角度分别为 42°、49°、63°、71°、81°、90°、99°、109°、118°和 127°。尺寸排除色谱装置使用 P100 型泵(Thermo Separation Products, San Jose, 美国)和示差折光检测器(RI-150, 日本)。TSK-GEL PWXL G5000 和 G3000(300 mm×7.8 mm, Micropak, TSK)串用色谱柱用于水体系测试。测试温度 25 °C,流动相为 0.15 mol/L 的 NaNO<sub>3</sub> 水溶液(用 0.2 μm 滤膜滤过除尘,并且超声脱气),进样量 200 μL,体积流量 1.0 mL/min。光散射仪器校准用超纯甲苯。Astra 软件(Version 4.70.07)用于数据采集和分析。

### 1.5 糖组成分析

**1.5.1 单糖标准品衍生物的制备** 参照文献方法<sup>[15]</sup>进行改进。准确称取标准单糖样品 5 mg 于试管中,加入 1 mL 乙酸酐,在 100 °C 反应 1 h,冷却,然后加入 3 mL 甲苯,减压浓缩蒸干,重复 4~5 次,以除去多余的醋酐。将乙酰化后的产物用 3 mL 三氯甲烷溶解后转移至分液漏斗中,加入少量蒸馏水充分震荡后,除去上层水溶液,如此重复 4 次。三氯甲烷层以适量的无水硫酸钠干燥,定容至 10 mL 待 GC-MS 分析。

**1.5.2 DMP2-A 的水解及衍生化** 称取 DMP2-A 2 mg,加入 1 mL 的 2 mol/L 三氟乙酸(TFA)充氮气后封口,在 110 °C 加热水解 90 min,旋转蒸发仪蒸干,加入 2 mL 甲醇,蒸干,反复 2 次。加入 2 mL 双蒸水,60 mg 硼氢化钠还原 8 h,加入冰醋酸中和,旋蒸,加入甲醇 3 mL,反复 3 次,旋蒸至粉末,110 °C 烘箱烘干。将水解得到的单糖按照单糖衍生化方法依次加入各种试剂进行衍生化反应,衍生化产物进行 GC-MS 分析。

**1.5.3 气相色谱条件** HP-5 (Agilent 19091J-413) 色谱柱(30 m×0.25 mm, 320 μm); 程序升温条件:起始温度 120 °C,以 3 °C/min 升温至 250 °C;保持 5 min;进样口温度为 250 °C,检测器温度为 250 °C,氢气流量 30 mL/min,空气流量 400 mL/min;载气为氮气,体积流量 1 mL/min。

### 1.6 甲基化分析

甲基化采用 Needs 等<sup>[16]</sup>的方法进行改进。称取 10 mg 样品, 加入 1 mL DMSO, 快速加入 5 mg 干燥的 NaOH 粉末, 充入氮气, 密闭, 超声使样品溶解, 冰浴中加入 1 mL 碘甲烷, 避光反应 2 h, 加入 4 mL 水使反应终止, 用等量的三氯甲烷进行萃取, 三氯甲烷相减压浓缩蒸干, 得完全甲基化的样品。将甲基化样品加入 3 mL 88% 甲酸溶液中, 密塞, 100 °C 水解 3 h。减压抽干, 加甲醇再抽干 (3 次)。加 4 mL 2 mol/L 的 TFA 在 100 °C 水解 6 h。减压抽干, 加入 3 mL 蒸馏水溶解, 加入 20 mg 硼氢化钠还原, 用冰醋酸中和, pH 值在 4~5, 加入 3 mL 甲醇, 减压浓缩蒸干, 然后按单糖衍生化方法乙酰化, 制备部分甲基化的糖醇乙酸酯衍生物, 进行 GC-MS 分析。

### 1.7 红外光谱 (IR) 分析

取约 1 mg 干燥的多糖样品, 用 KBr 粉末压片进行 IR 分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 分离纯化及部分理化性质

100 g 细茎石斛通过高温 (120 °C) 浸提后, 残渣用 1 mol/L 氢氧化钠溶液常温提取后, 得到粗多糖 DMP2, 得率约为 2.5%, 说明高温浸提后的残渣中含有大量可碱提的多糖。碱提多糖 DMP2 经过 DEAE-纤维素柱进行阴离子交换色谱纯化, 用蒸馏水作为流动相洗脱, 用硫酸-苯酚法测定每管含量, 结果见图 1。在 30 mL 处开始出峰, 48 mL 处出现最大洗脱峰。蒸馏水洗脱峰为 1 个对称的单一峰, 大致可以判断该多糖为均一组分<sup>[15]</sup>。收集蒸馏水洗

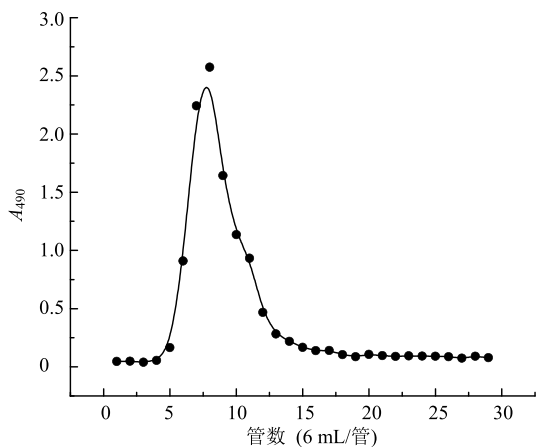


图 1 多糖 DMP2-A 在 DEAE 纤维素色谱柱上通过蒸馏水洗脱的色谱图

Fig. 1 Chromatography of polysaccharide DMP2-A on DEAE-cellulose column eluted by distilled water

脱级分, 冷冻干燥后得到一种中性多糖 0.75 g, 标记为 DMP2-A, 得率为 0.75%。间羟基联苯法测得该多糖的糖醛酸含量为 0.5%, 硫酸苯酚法测得其总糖含量为 98.25%, Bradford 法测得蛋白质总量为 0.25%。DMP2-A 多糖的红外谱图见图 2, 该多糖在 1 250 和 1 650  $\text{cm}^{-1}$  附近显示出多糖的特征吸收。在 897 和 845  $\text{cm}^{-1}$  处各有一较弱的吸收峰, 分别是  $\beta$ -D-葡聚糖和  $\alpha$ -D-葡聚糖的特征峰<sup>[17-18]</sup>。在 1 730  $\text{cm}^{-1}$  左右无糖醛酸的吸收峰<sup>[19-20]</sup>, 表明 DMP2-A 为一种中性多糖, 含有  $\alpha$ -D-葡萄糖和  $\beta$ -D-葡萄糖残基。

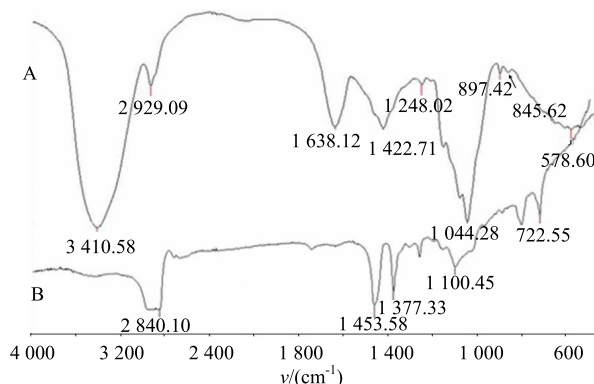


图 2 多糖 DMP2-A (A) 和甲基化 DMP2-A (B) 的红外光谱图  
Fig. 2 FT-IR spectra of polysaccharides DMP2-A (A) and methylated DMP2-A (B)

### 2.2 纯度及相对分子质量

尺寸排除色谱-激光光散射 (SEC-LLS) 联用装置不需要标样就可以同时测试高分子的纯度和相对分子质量。在激光光散射中, 浓度为  $C$  的高分子溶液在  $\theta$  角的散射光强用瑞利因子 ( $R_\theta$ ) 表示, 其与重均相对分子质量 ( $M_w$ ) 有以下关系<sup>[21]</sup>。

$$\frac{Kc}{R_\theta} = \frac{1}{M_w P(\theta)} + 2A_2c$$

其中,  $K$  为光学常数,  $K=4\pi^2 n_0^2 (dn/dc)^2 / (N_A \lambda_0^4)$ ;  $N_A$ 、 $n_0$  和  $\lambda_0$  分别为 Avogadro 常数、溶剂的折光指数和激光在真空中的波长。  $P(\theta)$  为粒子的散射函数, 其与粒子的  $z$ -均旋转半径 ( $\langle s^2 \rangle_z^{1/2}$ )、散射角 ( $\theta$ )、形状和结构有关。它的近似表达式为  $P(\theta)^{-1} = 1 + (1/3) (4\pi n_0 / \lambda)^2 \langle s^2 \rangle_z \sin^2(\theta/2)$

多糖 DMP2-A 在 0.15 mol/L 的  $\text{NaNO}_3$  水溶液中 25 °C 的 SEC-LLS 谱图见图 3, 其中激光信号仅显示了散射角度为 90° 的信号。SEC 谱图的检测信号为折光指数, 其主要为一个单一对称峰, 保留时间为 36.7 min, 表明多糖 DMP2-A 具有均一性。在保留时间 30.6 min 时有 1 个较小的肩峰, 表明存在

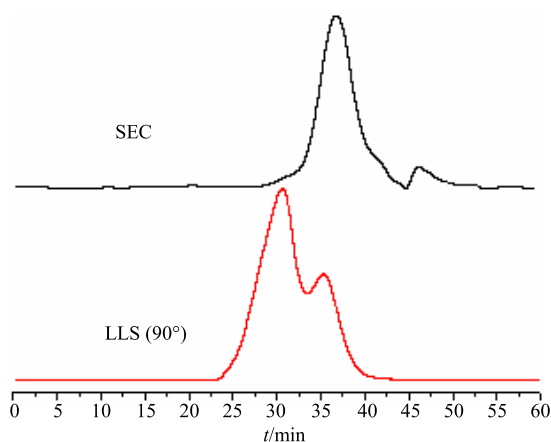


图 3 多糖 DMP2-A 在 0.15 mol·L<sup>-1</sup> 的 NaNO<sub>3</sub> 水溶液中 25 °C 时 SEC-LLS 谱图

Fig. 3 SEC-LLS chromatogram of polysaccharide DMP2-A in 0.15 mol·L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> aqueous solution at 25 °C

表 1 多糖 DMP2-A 在 0.15 mol·L<sup>-1</sup> 的 NaNO<sub>3</sub> 水溶液中 25 °C 时  $M_w$ ,  $\langle s^2 \rangle_z^{1/2}$ ,  $M_w/M_n$ ,  $[\eta]_w$  和质量分数的实验数据

Table 1 Experimental results of  $M_w$ ,  $\langle s^2 \rangle_z^{1/2}$ ,  $M_w/M_n$ ,  $[\eta]_w$  and mass fraction of polysaccharide DMP2-A in 0.15 mol·L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> aqueous solution at 25 °C

$t_R$ /min	$M_w$ ( $\times 10^{-4}$ )	$\langle s^2 \rangle_z^{1/2}$ /nm	$M_w/M_n$	$[\eta]_w$ /(mL·g <sup>-1</sup> )	质量分数/%
30.6	40.60	35.4	2.42	93.5	5.2
36.7	1.07	12.5	1.51	10.6	94.8

数为 5.2%。根据聚集体与单体的相对分子质量之比，计算得到该聚集体的聚集数约为 38。另外，Astra 软件得到其 Mark-Houwink-Sakurada 指数为 0.633，符合高度支化、球形构象多糖的特征<sup>[22]</sup>，表明多糖 DMP2-A 在 0.15 mol/L 的 NaNO<sub>3</sub> 水溶液中为柔顺链，以无规线团的球形构象形式存在。

### 2.3 结构分析

多糖 DMP2-A 的单糖组成通过强酸水解后乙酰化衍生物的气相色谱分析，其衍生物通过与标准单糖衍生物对比（图 4），证明 DMP2-A 由阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖及半乳糖组成，根据标准单糖峰面积的比值可以得出物质的量之比为 1 : 1.5 : 0.8 : 4.5 : 1.5，其中葡萄糖约占 48%。

为研究多糖 DMP2-A 中单糖的链接方式，对其进行甲基化分析。多糖 DMP2-A 经过 4 次甲基化反应后，得到完全甲基化的多糖，如图 2 所示，完全甲基化的多糖 DMP2-A 在 3 400 cm<sup>-1</sup> 附近的 -OH 特征吸收峰消失，2 900 cm<sup>-1</sup> 附近的 C-H 振动吸收峰增强，表明多糖 DMP2-A 的甲基化程度完全。经水解、还原、乙酰化，生成部分甲基化的糖醇乙酸酯衍生物，对其进行 GC 与 GC-MS 分析，气相色谱

另 1 个相对分子质量较大的级分，保留时间 40.1 min 处出现的峰为溶剂峰，不属于多糖级分。通过分析，保留时间为 36.7 min 的多糖质量分数为 94.8%。与 SEC 谱图中的折光指数信号只与浓度有关不同，MALLS 谱图中散射角度 90° 显示的光散射强度信号对大分子的  $M_w$  和尺寸更灵敏。保留时间 30.6 min 的级分虽然在 SEC 中信号很弱，但是在 MALLS 谱图（散射角度 90°）的光散射强度信号非常强，表明多糖 DMP2-A 在 0.15 mol/L 的 NaNO<sub>3</sub> 水溶液中很可能存在少量的聚集体。通过 Asrea 软件分析得到多糖 DMP2-A 与其聚集体的  $M_w$ 、 $\langle s^2 \rangle_z^{1/2}$ 、多分散度 ( $M_w/M_n$ )、重均特性粘数 ( $[\eta]_w$ ) 和质量分数，见表 1。通过数据分析，多糖 DMP2-A 在 0.15 mol/L 的 NaNO<sub>3</sub> 水溶液中的相对分子质量约为  $1.07 \times 10^4$ ，质量分数为 94.8%，聚集体  $M_w$  约为  $40.6 \times 10^4$ ，质量分

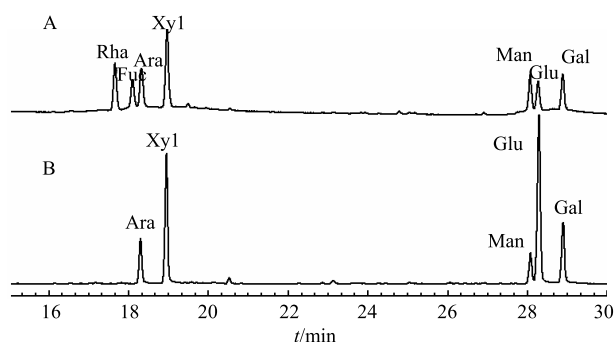


图 4 标准品 (A) 和多糖 DMP2-A (B) 的单糖衍生物 GC 色谱图

Fig. 4 Gas chromatograms of standard (A) and DMP2-A (B) monosaccharide derivatives

见图 5。DMP2-A 在 GC 中有 10 个峰，根据它们的保留时间及其在 GC-MS 中特征碎片离子峰，经与标准图谱对照，可以推断部分甲基化糖基的类型。根据部分甲基化糖基在 GC 中的峰面积与相应的响应因子，计算其物质的量比，结果见表 2。

从表 2 可以看出，多糖 DMP2-A 高度支化。木糖残基主要以 1-链接的末端糖存在；葡萄糖残基存

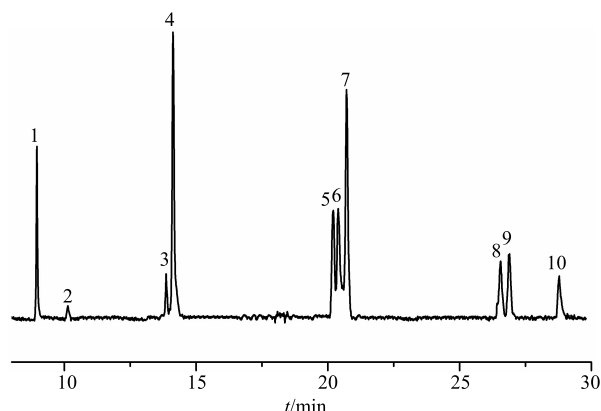


图 5 多糖 DMP2-A 甲基化的 GC-MS 总离子流图

Fig. 5 Total ion profile of methylated DMP2-A

表 2 多糖 DMP2-A 的甲基化分析

Table 2 Methylation analysis of DMP2-A

峰号	部分甲基化单糖	链接方式	相对物质的量比
1	2,3,4-Me <sub>3</sub> -Xyl	Xyl (1-	6.6
2	2,4-Me <sub>2</sub> Xyl	-3) Xyl (1-	痕量
3	2,4-Me <sub>2</sub> -Glc	-3,6) Glc (1-	1.0
4	2,4,6-Me <sub>3</sub> -Glc	-3) Glc (1-	9.3
5	2,4,6-Me <sub>3</sub> -Gal	-3) Gal (1-	3.9
6	2,3,6-Me <sub>3</sub> -Gal	-4) Gal (1-	3.8
7	2,3,6-Me <sub>3</sub> -Glc	-4) Glc (1-	7.3
8	2,4-Me <sub>2</sub> -Ara	-3,5) Ara (1-	1.4
9	2,4-Me <sub>2</sub> -Man	-3,6) Man (1-	1.7
10	2,4-Me <sub>2</sub> -Gal	-3,6) Gal (1-	1.0

在 3 种链接方式，即 1,3-链接、1,4-链接和 1,3,6-链接，其物质的量比约为 9.3 : 7.3 : 1；半乳糖残基也存在 3 种链接方式，即 1,3-链接、1,4-链接和 1,3,6-链接，其物质的量比约为 3.9 : 3.8 : 1；阿拉伯糖残基以 1,3,5-链接方式存在；甘露糖残基以 1,3,6-链接方式存在。

陈云龙等<sup>[8-10]</sup>在细茎石斛的热水提取物中分离纯化得到 8 种均一多糖，其中 DMP1a-1 和 DMP2a-1 均为中性多糖，主要由葡萄糖和甘露糖组成。本实验通过强碱提取得到的多糖 DMP2-A 与之相比，其单糖组成种类更多，葡萄糖含量下降，而新的单糖如甘露糖、木糖和半乳糖在 DMP2-A 中被发现。另外，他们发现的多糖 DMP4a-1 结构也非常复杂，主要由葡萄糖、甘露糖、鼠李糖、阿拉伯糖和半乳糖组成的酸性多糖。细茎石斛多糖 DMP2-A 是一种结构复杂的中性多糖，为首次从该植物中分离得到。

### 3 讨论

从滇产细茎石斛热水浸提后的残渣中，通过强

碱浸提多糖后，采用 DEAE-纤维素柱阴离子交换色谱分离纯化手段，分离得到 1 种均一中性多糖 DMP2-A，对其进行了初步的结构解析。DMP2-A 是一种高度支化的多糖，由阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖及半乳糖组成，其中葡萄糖约占 48%， $\alpha$ -D-葡萄糖和  $\beta$ -D-葡萄糖共存。木糖残基主要以 1-链接的末端糖存在；葡萄糖残基链接方式为 1,3-链接、1,4-链接和 1,3,6-链接；半乳糖残基链接方式为 1,3-链接、1,4-链接和 1,3,6-链接；阿拉伯糖残基以 1,3,5-链接；甘露糖残基以 1,3,6-链接。该多糖在 0.15 mol/L 的 NaNO<sub>3</sub> 水溶液中为柔顺链， $M_w$  为  $1.07 \times 10^4$ ，存在少量聚集体，聚集数约为 38。DMP2-A 具体的化学结构，如单糖之间的链接顺序，还需进一步研究。

### 参考文献

- [1] Lee Y H, Park J D, Baek N I, et al. In vitro and in vivo antitumoral phenanthrenes from the aerial part of *Dendrobium nobile* [J]. *Planta Med*, 1995, 61(2): 178-180.
- [2] Xing X, Cui S W, Nie S, et al. A review of isolation process, structural characteristics, and bioactivities of water-soluble polysaccharides from *Dendrobium* plants [J]. *Bioact Carbohydr Diet Fib*, 2013, 1(2): 131-147.
- [3] Luo J P, Deng Y Y, Zha X Q. Mechanism of polysaccharides from *Dendrobium huoshanense* on streptozotocin-induced diabetic cataract [J]. *Pharm Biol*, 2008, 46(4): 243-249.
- [4] Zha X Q, Luo J P, Luo S Z, et al. Structure identification of a new immunostimulating polysaccharide from the stems of *Dendrobium huoshanense* [J]. *Carbohydr Polym*, 2007, 69(1): 86-93.
- [5] Li Q, Xie Y, Su J, et al. Isolation and structural characterization of a neutral polysaccharide from the stems of *Dendrobium densiflorum* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2012, 50(5): 1207-1211.
- [6] Wang J H, Luo J P, Zha X Q. Structural features of a pectic polysaccharide from the stems of *Dendrobium nobile* Lindl. [J]. *Carbohydr Polym*, 2010, 81(1): 1-7.
- [7] Hua Y, Zhang M, Fu C, et al. Structural characterization of a 2-O-acetylglucosaminan from *Dendrobium officinale* stem [J]. *Carbohydr Res*, 2004, 339(13): 2219-2224.
- [8] 陈云龙, 何国庆, 华允芬, 等. 细茎石斛多糖的提取分离纯化和性能分析 [J]. *中国药学杂志*, 2003, 38(7): 494-497.
- [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): 1781-1783.

- [10] 徐程, 陈云龙, 张铭. 细茎石斛多糖 DMP2a-1 的结构分析 [J]. 中国药学杂志, 2004, 39(12): 900-902.
- [11] Zhang P, Zhang L, Cheng S. Chemical structure and molecular weights of  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucan from *Lentinus edodes* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1999, 63(7), 1197-1202.
- [12] 林颖, 吴毓敏, 吴雯, 等. 天然产物中的糖含量测定方法正确性的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 1996, 8(3): 5-9.
- [13] Blumenkrantz N, Asbose-Hansen G. New method for quantitative determination of uronic acids [J]. *Anal Biochem*, 1973, 54(2): 484-489.
- [14] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72(1/2): 248-254.
- [15] 陈历水, 马莺, 刘天一, 等. 一株抗氧化活性酵母菌产多糖的纯化与结构分析 [J]. 分析化学, 2010, 38(3): 409-412.
- [16] Needs P W, Selvendran R R. Avoiding oxidative degradation during sodium hydroxide/methyl iodide-mediated carbohydrate methylation in dimethyl sulfoxide [J]. *Carbohydr Res*, 1993, 245(1): 1-10.
- [17] Wang J, Ma Z, Zhang L, et al. Structure and chain conformation of water-soluble heteropolysaccharides from *Ganoderma lucidum* [J]. *Carbohydr Polym*, 2011, 86(2): 844-851.
- [18] 廖洪梅, 吕平, 戴玲. 丹皮多糖 PSM2bB 的结构研究 [J]. 中草药, 2011, 42(8): 1494-1497.
- [19] 张晓曼, 廖文锋, 丛启飞, 等. 桑白皮水提取多糖组分的分离纯化和结构特征 [J]. 化学学报, 2013, 71(5): 722-728.
- [20] 许子竞, 林翠梧. 滇桂艾纳香多糖 BRP 的结构解析 [J]. 化学学报, 2011, 69(9): 1101-1106.
- [21] Zimm B H. The scattering of light and the radial distribution function of high-polymer solutions [J]. *J Chem Phys*, 1948, 16(12): 1093-1099.
- [22] Huang Z, Huang Y, Li X, et al. Molecular mass and chain conformations of *Rhizoma Panacis Japonici* polysaccharides [J]. *Carbohydr Polym*, 2009, 78(3): 596-601.