

致^[8],故证明该化合物为蒲公英萜醇乙酸酯。

化合物 I:白色针晶(石油醚),mp 136.0~137.0℃,Liebermann-Burchard 反应呈阳性,10%硫酸乙醇溶液显紫色。与β-谷甾醇对照品混合后熔点不下降,Rf 值在多种溶剂系统中与对照品一致,故确定该化合物为β-谷甾醇。

化合物 II:白色粉末(石油醚),mp 245.0~246.0℃,Liebermann-Burchard 反应呈阳性,10%硫酸乙醇溶液显紫色。¹H-NMR和¹³C-NMR与文献报道一致^[9],故证明该化合物为熊果酸。

化合物 III:浅黄色液体,三氯化铁-铁氰化钾反应呈阳性,示有酚羟基存在。¹H-NMR(CDCl₃)δ: 1.25(3H, T, J=7.1 Hz, -CH₃), 3.53(2H, s, -CH₂-CO-), 4.14(2H, q, J=7.1 Hz, -CH₂-O-), 6.78(2H, d, J=8.5 Hz, H-3', 5'), 7.15(2H, d, J=8.5 Hz, H-2', 6')。 ¹³C-NMR(CDCl₃)δ: 14.2(-CH₃), 40.5(-CH₂-CO-), 60.8(-CH₂-O-), 115.4(C-3', 5'), 126.4(C-1'), 130.5(C-2', 6'), 154.6(C-4')。以上数据与文献报道一致^[10],故证明该化合物为对-羟基苯醋酸乙酯。

化合物 IV:无色针晶(石油醚),mp 82.0~84.0℃,三氯化铁-铁氰化钾反应呈阳性,示有酚羟基存在;Gibb's 反应显示酚羟基对位有取代基的存在。¹H-NMR(CDCl₃)δ: 3.98(3H, s, -OCH₃), 6.15(1H, s, -OH), 7.04(1H, d, J=8.5 Hz, H-5), 7.42(1H, br. s, H-2), 7.44(1H, br. d, J=8.5 Hz, H-6), 9.83(1H, s, -CHO)。 ¹³C-NMR(CDCl₃)δ: 56.1(-OCH₃), 108.7(C-2), 114.3(C-5), 127.6(C-6), 129.9(C-1), 147.1(C-4), 151.6(C-3), 190.9(-CHO)。以上数据与文献报道一致^[11],故证明化合物为香草醛。

化合物 V:白色颗粒状结晶(甲醇-氯仿),mp 294.0~296.0℃,Liebermann-Burchard 反应呈阳性,10%硫酸乙醇溶液显紫色,Molish 反应呈阳性。与胡萝卜苷对照品混合后熔点不下降,Rf 值在多种溶剂系统中与对照品一致,故确定该化合物为胡萝卜苷。

致谢:NMR 谱由本校测试中心测定。

References:

- [1] Ch P [S]. Vol 1. 2000.
- [2] Lin C C, Lin C H, Chiu H F, et al. The pharmacological and pathological studies on Taiwan folk medicine (IV): The effects of *Echinops grijisii* [J]. *Am J Chin Med*, 1990, 18(3-4): 113-120.
- [3] Lin C C, Yen M H, Chiu H F, et al. The pharmacological and pathological studies on Taiwan folk medicine (IV): The anti-inflammatory effect of *Echinops grijisii* [J]. *Am J Chin Med*, 1992, 20(2): 127-134.
- [4] Marles R J, Hudson J B, Graham E A, et al. Structure-activity studies of photoactivated antiviral and cytotoxic tricyclic thiophenes [J]. *Photochem Photobiol*, 1992, 56(4): 479-487.
- [5] Mares D, Romagnoli C, Rossi R, et al. Antifungal activity of some 2, 2':5', 2'-terthiophene derivatives [J]. *Mycoses*, 1994, 37(9-10): 377-383.
- [6] Sharma A, Goel H C. Some naturally occurring phytophototoxins from mosquito control [J]. *Indian J Exp Biol*, 1994, 32(10): 745-751.
- [7] Lu H C, Wang S X, Zhu T R. Studies on the chemical constituents of Yuzhou Loulu [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1989, 20(11): 2-5.
- [8] Lou H X, Zuo C X. Studies on the chemical components of *Rhodiola henryi* (Diels) Fu [J]. *J Shenyang Coll Pharm* (沈阳药学院学报), 1990, 7(2): 145-146.
- [9] Wu Z J. Lipid chemical constituents of *Salvia sochifolia* C. Y. Wu [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2001, 26(4): 264-265.
- [10] Kisiel W, Zielinska K. Sesquiterpenoids and phenolics from *Lactuca perennis* [J]. *Fitoterapia*, 2000, 71(1): 86-87.
- [11] Song Z Z, Jia Z J, Zhu Q X. Studies on the chemical components of *Bupleurum sibiricum* Vest (I) [J]. *Chem J Chin Univ* (高等学校化学学报), 1991, 12(11): 1469-1472.

姬松茸多糖的分离纯化与理化性质研究

孙培龙^{1,2},魏红福²,杨开²,吴学谦³,何国庆^{1*}

(1. 浙江大学生物系统工程与食品科学学院,浙江 杭州 310029; 2. 浙江工业大学生物与环境工程学院,浙江 杭州 310032; 3. 浙江益圣菌物发展有限公司,浙江 丽水 323000)

姬松茸 *Agaricus blazei* Murill 又叫巴西蘑菇,是一种珍贵的药食兼用真菌^[1],其子实体中含有多

种具有高抗肿瘤活性^[2~5]和刺激 T 细胞作用^[6]的多糖。但热水浸提得到的是各种多糖组分的混合物,而

收稿日期:2005-04-24

基金项目:浙江省科技厅重大科技攻关项目(2003C12018)

作者简介:孙培龙(1964-),男,教授,浙江衢州人,浙江大学在职博士,主要研究方向为生物活性物质的分离与提取。

Tel:(0571)88320779 E-mail:sun_pl@zjut.edu.cn

* 通讯作者 何国庆 Tel:(0571)86971166 E-mail:gqhe@zjut.edu.cn

不同的多糖的生物活性是不同的,为了研究各种多糖组分的性质,本研究采用分级醇沉、凝胶色谱等分离方法从姬松茸子实体水提粗多糖中分离出多种均一多糖组分,并对其中 3 个主要组分的理化性质进行了研究,采用酸水解和光谱法初步研究了其中一个组分的化学结构。

1 材料与方法

1.1 材料:姬松茸子实体由浙江省益圣菌物发展有限公司提供。凝胶柱 Sepharose 6 fast flow (2.6 cm×60 cm), Superdex 200 prep grade (2.6 cm×60 cm), Dextran 标准品均为 Pharmacia 公司产品;单糖对照品:鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、半乳糖、葡萄糖、葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸均为 Fluka 产品,其余试剂均为国产分析纯。仪器设备:高压液相色谱仪为 Agilent 1100 型配示差检测器,液相柱为日本 Shodex 多糖凝胶柱 SB 804 HQ、SB 803 HQ,单糖柱为 Shodex sugar SP0810,旋光仪为 WZZ-T₁ 投影式自动指示旋光仪,德国 Bruker Vector 22 傅里叶红外光谱仪, Bruker AM 400 超导核磁共振仪。

1.2 方法

1.2.1 姬松茸多糖的提取:干燥的姬松茸子实体粉碎后 60 目过筛,称取一定量的子实体粉末,按料水比 1:30 在 100℃ 下浸提 3 h,离心后上清液减压蒸馏浓缩至原体积的 1/5,然后加入 3 倍体积的 95% 乙醇过夜,离心得到粗多糖^[7]。

1.2.2 粗多糖脱蛋白:将粗多糖样品溶解于一定量的蒸馏水中,加入 0.2 倍体积的 Sevag 试剂(氯仿-正丁醇=5:1)振荡均匀后置于分液漏斗中静置分层,分液除去蛋白质后继续加入 Sevag 试剂,重复 3 次,然后减压蒸馏去除残留的 Sevag 试剂,冻干备用。

1.2.3 多糖分级醇沉:用分级醇沉对粗多糖进行初步分离,将一定量的多糖样品溶解在蒸馏水中,加入 95% 乙醇至质量体积分数为 30%,4℃ 醇析 12 h,15 000 r/min 离心,沉淀为粗多糖,然后依次向上清液继续加入 95% 的乙醇至终质量分数分别为 40%、50%、60%、70% 和 80%,每次操作同前。

1.2.4 多糖的凝胶色谱:分级醇沉得到的粗多糖采用 FPLC 色谱系统分离,采用 Sepharose 6 fast flow (2.6 cm×60 cm)、Superdex 200 prep grade (2.6 cm×60 cm) 等凝胶柱分离,示差检测器检测,蒸馏水洗脱,体积流量 2.0 mL/min,示差检测器检测,分部收集器按峰分部收集。

1.2.5 多糖纯度分析:高效液相色谱法分析^[8]。

1.2.6 多糖组分离理化性质分析:多糖组分旋光度测定:多糖样品配成 2.0% 的水溶液,用 WZZ-T₁ 旋光仪于室温(25℃)下测定。凝胶过滤法测定多糖相对分子质量:Agilent 1100 高压液相色谱仪配 SB 804 HQ 多糖液相柱测定多糖相对分子质量,流动相为双重纯蒸水,体积流量 0.8 mL/min,示差检测器检测,标准品为 Dextran T-10、T-20、T-40、T-70、T-500 和 T-2000。

1.2.7 多糖组分结构分析:采用凯氏定氮法^[9]测定蛋白质。多糖组成分析:液相色谱法测定多糖组成,多糖样品 20 mg,溶于 20 mL 2.0 mol/L H₂SO₄,沸水浴水解 6 h,经 BaCO₃ 中和,抽滤后进行 HPLC 分析。Agilent 1100 液相色谱仪配 SHODEX SP-0810 单糖分析柱分析,流动相为双重纯蒸水,体积流量 0.8 mL/min,示差检测器检测。红外光谱分析:样品用溴化钾压片,在 Bruker Vector 22 傅里叶红外光谱仪上测定。核磁共振分析:样品溶解于 D₂O 中,在 Bruker AM 400 超导核磁共振仪上测定。

2 结果与讨论

2.1 多糖分级醇沉:在本实验所采用的不同体积分数的乙醇都有部分多糖沉淀下来。但当乙醇体积分数低于 20% 时,没有多糖沉淀出来,当乙醇体积分数为 40% 时,沉淀出多糖的量最大。经液相分析各部分多糖沉淀可知,当乙醇体积分数低于 40% 或高于 50% 时,子实体粗多糖能够被很好地分为两个部分,30% 和 40% 乙醇沉淀多糖差别很小,从相对分子质量标准曲线可知,都属于相对分子质量较大的部分(>50 万),因此可以将这两部分多糖沉淀合并为一个部分;当乙醇体积分数从 50% 依次增加时,各部分多糖沉淀有一些差别,相对分子质量逐渐减小,但彼此之间不能明显分离开来,因此可以将这几部分多糖合并为一部分,虽然 50% 乙醇的多糖沉淀中有部分与 40% 乙醇相同,但量很低。

从以上实验结果可以看出,乙醇分级沉淀能够很好地将粗多糖粗略分为两个部分,本实验将 30% 和 40% 乙醇多糖沉淀合并为一部分,命名为粗多糖 I;将 50%~80% 乙醇多糖沉淀合并为一部分,命名为粗多糖 II,然后用于凝胶色谱分离。

2.2 多糖组分的凝胶色谱:粗多糖 I 相对分子质量较大,因此选用排阻较大的凝胶 Sepharose 6 F. F. 分离,收集到 2 个洗脱峰,纯度检测表明两者都是均一多糖组分,分别命名为 ABM-I 和 ABM-II,紫外检测发现 ABM-I 有紫外吸收,估计存在一定量的结合蛋白,而 ABM-II 不存在结合蛋白。粗多糖 II 相对分子质量

较小,选用排阻限较小的 Superdex 200 prep grade 分离,收集到 3 个洗脱峰,纯度分析表明都是均一多糖组分,其中第一个洗脱峰物质命名为 ABM-Ⅲ,其他 2 个组分相对分子质量都小于 5 000,未作进一步研究,紫外检测 3 个组分都没有紫外吸收。

2.3 多糖组分物理性质:ABM-I 为白色固体,ABM-I 和 ABM-Ⅲ 为黄色固体,3 者都易溶于水、甲酸、氨水和稀盐溶液等,不溶于乙醇、乙醚和丙酮等有机溶剂,部分理化性质见表 1。

从表 1 中可以看出,3 个组分的碘-碘化钾和味

表 1 ABM-I、ABM-I 和 ABM-Ⅲ 的部分理化性质

Table 1 Partial physicochemical property of ABM-I, ABM-I, and ABM-Ⅲ

理化性质	性状	水溶性	苯酚-硫酸 反应	吡啶-硫酸 反应	碘-碘化钾 反应	紫外吸收 (280 nm)	比旋度 [α] _D ²⁵	相对分子质量 (×10 ⁵)	占粗多糖的 百分比/%
ABM-I	白色粉末	可溶	+	-	-	吸收	+62.5	>20	28.96
ABM-I	淡黄色粉末	可溶	+	-	-	不吸收	+44.3	14	16.2
ABM-Ⅲ	淡黄色粉末	可溶	+	-	-	不吸收	+5.5	3.8	8.7

“+”:阳性,“-”:阴性

“+”: positive,“-”: negative

唑-硫酸反应都为阴性,表明其中不含有淀粉和糖醛酸;ABM-I 有紫外吸收,说明它是一个糖蛋白组分,蛋白量为 1.5%,其相对分子质量超过了标准曲线的上限(2.0×10⁶),现有条件不能准确测出其相对分子质量。

2.4 ABM-I 的结构分析

2.4.1 组成分析:HPLC 分析 ABM-I 的完全水解产物可知,水解产物只含有葡萄糖,表明 ABM-I 是一个单一多糖组分。

2.4.2 红外光谱解析:ABM-I 的红外光谱在 3 385.77 cm⁻¹处有一强且宽的吸收峰,系多糖上-O-H 形成的分子间、内氢键;2 924.89 cm⁻¹附近的肩峰为饱和 C-H 伸缩振动的信号,中等强度;1 643.83 cm⁻¹为酰胺羰基特征吸收峰,弱,推测样品中少量存在的蛋白质可能为糖结合蛋白;在 1 300~1 250 cm⁻¹和 1 240 cm⁻¹处无吸收峰,表明无磷酸基和磺酸基取代;1 154.07、1 079.88、1 022.39 cm⁻¹ 3 个峰为吡喃糖环特征吸收峰,是其糖苷键 C-O-C 的非对称振动峰,强;红外光谱在 890 cm⁻¹附近无吸收峰,而在 850 cm⁻¹附近存在吸收峰表明组成的单糖为 α-D-吡喃葡萄糖,另外在 875 和 810 cm⁻¹无吸收峰,表明不含甘露吡喃糖、半乳吡喃糖,这与完全酸水解产物分析结果一致;在 770 cm⁻¹附近为吡喃糖环 C-O-C 的对称振动峰。

2.4.3 核磁共振谱解析:在 ABM-I 的¹H-NMR 谱中,δ 5.338 71 处有异头碳 C-1 上质子的氢位移,表明这些葡萄糖残基均为 α 型吡喃糖,这与红外光谱分析一致。在¹³C-NMR 谱中,δ 100.278 处化学位移表明 C-1 发生取代;δ:77.747,73.773,71.639 处化学位移表明有未发生取代的 C-2、C-3、C-4;δ 78~85 内无化学位移,表明不存在发生取代的 C-2、C-3、

C-4;δ 69 附近的化学位移表明有发生取代的 C-6;δ:60.987,62.928 的化学位移表明还存在未取代的 C-6,因此可能还具有 α 分支结构,但是由于所测定组分相对分子质量巨大,以及扫描时间不充分,在 δ 78~85 没有形成可见峰。

综合以上各项分析可知,ABM-I 糖链的主链结构应为 α-(1→6)吡喃型 D-葡聚糖,并含有少量结合蛋白(1.5%)。本研究只对 ABM-I 的结构进行了初步研究,要完全阐述其结构还要采用高碘酸氧化、Smith 降解和 GC-MS 联用等分析方法进一步研究,ABM-I 和 ABM-Ⅲ 结构以及 3 个组分的药理作用也有待进一步研究。

References:

- [1] Chen Z Y, Li Q B, Wu Y M. The medical value of *Agaricus blazei* Murill [J]. *Edib Fungi China* (中国食用菌), 2001, 20(4): 4-6.
- [2] Chen L, Shao H J, Su Y B. Coimmunization of *Agaricus blazei* Murill extract with hepatitis B virus core protein through DNA vaccine enhances cellular and humoral immune responses [J]. *Int J Immunopharmacol*, 2004, 4: 403-409.
- [3] Lu L X, Gu W Y, Ding X L. Immunological competence and antitumor effect of polysaccharides from *Agaricus blazei* Murill *in vitro* [J]. *Pharm Biotechnol* (药物生物技术), 2002, 9(6): 326-329.
- [4] Takeshi T, Yoshiyuki K, Hiromichi O. Isolation of an anti-tumor compound from *Agaricus blazei* Murill and its mechanism of action [J]. *J Nutr*, 2001, 131(5): 1409-1413.
- [5] Yoshiyuki K, Tadashi K, Takeshi T, et al. Isolation of an anti-angiogenic substance from *Agaricus blazei* Murill: Its antitumor and antimetastatic actions [J]. *Cancer Sci*, 2004, 95(9): 758-764.
- [6] Mizuno M, Morimoto M, Minato K, et al. Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte T-cell subsets in mice [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1998, 62(3): 434.
- [7] Yang K. Extraction, Purification and structure analysis of polysaccharides from *Agaricus blazei* Murill [J]. *Dissertation of Master Degree of Zhejiang University of Technology* (浙江工业大学硕士论文) [D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2003.
- [8] Alsop P M. Determination of the molecular weight of clinical dextran by gel permeation chromatography on TSK PW type columns [J]. *J Chromatogr*, 1982, 246: 227.
- [9] Huang R B, Ding C Y, Ling H Y. *The Experimental Guide of Biochemistry* (生物化学实验教程) [M]. Beijing: The World Publishing Corporation, 1995.