

- [3] Zhang H P, Wang L Q, Qin G W. Grayanane diterpenoids from the leaves of *Craibiodendron yunnanense* [J]. *Bioorg Med Chem*, 2005, 13: 5289-5298.
- [4] Mahato S B, Kundu A P. Anti-inflammatory triterpene saponins of *pithecellobium dulce*: Characterization of an echinocystic acid bisdesmoside [J]. *Phytochemistry*, 1987, 34(9): 1389-1397.
- [5] Adnyana I K, Tezuka A, Banskota H, et al. Quadranside, new triterpene glucoside from the seed of *Combretum quadrangulare* [J]. *J Nat Prod*, 2000, 63(4): 496-500.
- [6] Cateni F, Zilic J, Falsone G, et al. Preliminary biological assay on cerebroside mixture from *Euphorbia nicaeensis* All. Isolation and structure determination of five glucocerebroside [J]. *IL Farmaco*, 2003, 58(9): 809-817.
- [7] Xu B A, Su H, Zhang M Z. Flavonoids from *Craibiodendron yunnanense* [J]. *Acta Scient Nat Univ Pekinen*, 1996, 32(6): 700-702.
- [8] Markham K R, Ternai B, Stanley R, et al. Carbon-13 NMR studies of flavonoids: Naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives [J]. *Tetrahedron*, 1978, 34(9): 1389-1397.
- [9] Hongxiang L, Yoshimitsu Y, Tsutomu S, et al. A-type proanthocyanidins from peanut skins [J]. *Phytochemistry*, 1999, 51(2): 297-308.

## 块菌多糖的相对分子质量测定和单糖组成分析

刘娟, 屈效源\*

(佳木斯大学化学与药学院, 黑龙江 佳木斯 154007)

**摘要:**目的 测定从块菌菌丝体中分离得到的均一多糖 KJB-1 的平均相对分子质量, 并分析其单糖组成。方法 块菌菌丝体通过水提醇沉, 再以 Sevage 法去除蛋白质, 得到粗多糖 KJB。经 Sepharose CL6B 柱色谱分离纯化得到均一多糖 KJB-1。利用高效液相色谱法测定 KJB-1 的平均相对分子质量; 三氟乙酸完全酸水解后进行糖醇衍生化, 之后运用气相色谱法, 与标准品对照后分析其单糖组成。结果 KJB-1 在高效液相下呈单一对称峰, 其平均相对分子质量大于  $2 \times 10^6$ , 单糖组成分析该多糖是由单一组分葡萄糖组成。结论 KJB-1 为分子质量大于  $2 \times 10^6$  的葡聚糖。

**关键词:**块菌; 多糖; 气相色谱; 单糖组成

**中图分类号:**R284.1

**文献标识码:**A

**文章编号:**0253-2670(2009)09-1380-02

块菌属于囊菌亚门盘菌纲块菌目块菌科, 是生长在森林地下的最为珍贵的一类药食两用真菌, 又称“松露”。其中一些种类如黑块菌、白块菌在欧美被誉为“厨房里的钻石”、“地下黄金”, 具有极大的经济价值, 故有“真菌王子”之称。块菌是一种典型的共生菌, 其主要活性成分有  $\alpha$ -雄烷醇、神经酰胺、块菌多糖等成分<sup>[1]</sup>, 块菌多糖具有抗肿瘤并参与免疫调节等功能。为了寻找块菌多糖的活性部位, 本实验对块菌的水热提多糖进行了分离并纯化, 得到 KJB-1, 测定其平均相对分子质量, 并分析其单糖组成, 旨在为后续的结构和功能的进一步研究提供科学依据。

### 1 材料与仪器

1.1 材料与试剂: 块菌菌丝体(购于云南誉成隆经贸有限公司), 由北京大学医学部韩晓强博士鉴定。标准单糖对照品(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)均为分

析纯, 购于 Merck 公司。多糖相对分子质量测定用标准品 Dextran T 系列, 均为 Pharmacia 公司产品。肌醇为国产生化试剂, 三氟乙酸(TFA)、醋酸酐、氯仿、四氢硼钠、甲醇均为分析纯。

1.2 仪器: Agilent HP6890N 型气相色谱仪, 氢火焰离子检测器(FID), HP-5 毛细管色谱柱(30 m  $\times$  0.32 mm); Agilent 1100 series 高效液相色谱系统, 蒸发光散射检测器(ELSD), Shodex KS-805 凝胶色谱柱。

### 2 实验方法

2.1 块菌多糖的分离纯化: 块菌经乙醇脱脂后沸水浸提, 减压浓缩后醇沉, 再经 Sevage 法去蛋白<sup>[2]</sup>得到粗多糖。再经 CL6B 凝胶细分后得 KJB-1, HPLC 示单一对称峰。

2.2 相对分子质量测定<sup>[3,4]</sup>: 先采用标准葡聚糖 Dextran T 系列制作标准曲线, 然后根据多糖样品在相同色谱条件下的洗脱体积或保留时间, 用标准

\* 收稿日期: 2009-02-18

作者简介: 刘娟 Tel: (0454) 8610828 E-mail: liujuan1949@163.com

曲线计算该样品的平均相对分子质量。流动相为蒸馏水,体积流量为 1 mL/min,柱温为 60。

2.3 多糖的完全酸水解:取多糖 5 mg 置于安瓿瓶中,加 4 mL TFA 封管,110 反应 2 h。将水解液减压蒸干,再加 2~3 mL 甲醇溶解后减压蒸干,反复 3 次以上直至除尽残余的 TFA。

2.4 多糖水解物的还原:将样品加水 1 mL,加入 20 mg NaBH<sub>4</sub> 于室温中还原 3 h,后用 25% 冰醋酸调节 pH 值至 4~5。减压蒸干,反复 3 次,80~90 真空干燥 12 h 以除尽水分。

2.5 阿尔迪醇酯的制备:样品干燥后加 2 mL 醋酐,封管,100 反应 2 h,减压蒸干,加 2 mL 甲醇再蒸干,反复 3 次,制成阿尔迪醇酯。将乙酰化后的产物用氯仿 3~5 mL 转移到分液漏斗中,再加等体积的水,洗涤 3 次,去除水层,蒸干待检。

2.6 气相色谱条件:色谱柱为 HP-5 毛细管色谱柱 (30 m × 0.32 mm),FID 检测器,进样口温度为 280,升温程序为 170~215 (每分钟升高 2)。氢气为燃气,20 mL/min;氮气体积流量为 30 mL/min;AIR 体积流量为 200.0 mL/min;进样量为 1.0 μL。

2.7 标准单糖相对校正因子测定:精确称取上述标准单糖,分别加入相同量的内标物。按上述方法制备样品的糖醇乙酸酯衍生物并进行气相色谱分析,计算相对校正因子<sup>[5]</sup>。

2.8 多糖中各单糖物质的量之比的计算:根据各单糖的相对校正因子计算出多糖中单糖的含量。

### 3 结果与分析

3.1 KJB-1 的性状:KJB-1 为棕褐色粉末,HPLC 分析结果为单一对称峰(图 1),表明其为均一多糖。通过紫外和 Lowry 法<sup>[6]</sup>测定,表明其不含蛋白质。

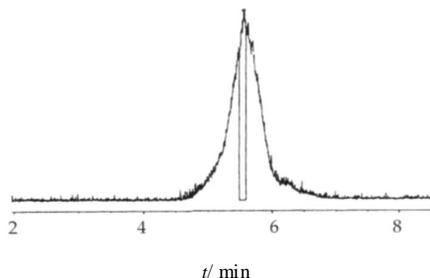


图 1 KJB-1 的 HPLC 图

Fig 1 HPLC Chromatogram of KJB-1

3.2 回归方程的制备:用标准葡聚糖 Dextran T 系列进行高效液相检测,得系列数据(表 1),并制作矫正曲线,得回归方程为  $Y = -1.1801 X + 16.382$  ( $R = 0.9696$ )。测得 KJB-1 平均相对分子质量大于  $10^6$ 。

表 1 Dextran T 系列 HPLC 检测结果

Table 1 HPLC Results of Dextran T series

Dextran T 系列	Mw	lgMw	t <sub>R</sub> /min
Glu	182	2.255	11.722
T-10	1 × 10 <sup>4</sup>	4.000	10.795
T-40	4 × 10 <sup>4</sup>	4.602	10.184
T-70	7 × 10 <sup>4</sup>	4.845	9.73
T-110	1.1 × 10 <sup>5</sup>	5.041	9.481
T-500	5 × 10 <sup>5</sup>	5.699	8.96
T-2000	2 × 10 <sup>6</sup>	6.301	8.56

3.3 KJB-1 的组成:将 KJB-1 完全酸水解产物,并制备阿尔迪醇酯衍生物,同法制备各标准单糖的阿尔迪醇酯衍生物,进行 GC 分析,结果各标准单糖的混标与样品多糖的 GC(图 2)相对照,表明该多糖主要是由葡萄糖组成。

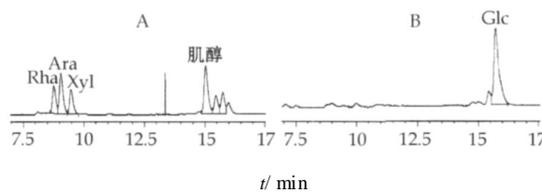


图 2 各标准单糖(A)和 KJB-1(B)的 GC 图谱

Fig 2 GC Chromatograms of monosaccharide (A) and KJB-1 (B)

### 4 讨论

近年来,随着波谱解析技术的不断发展,真菌多糖,尤其是药食两用真菌多糖的研究也取得了长足的进步。多糖类的活性与其相对分子质量大小、聚合度、分支度以及溶液中高级构象等都有关系,多糖相对分子质量太大或太小均会引起活性的下降。多糖结构研究的主要内容有相对分子质量测定、多糖的单糖组成、糖苷键构型、聚合度、分支度等基本结构以及多糖的溶液构象等<sup>[7]</sup>。而相对分子质量测定和单糖组成的分析可为后期的研究工作提供一定的指导。要分析 KJB-1 的化学结构,还需进一步的研究。

#### 参考文献:

- [1] 汤亚杰,孔国平,朱伶俐,等. 块菌活性成分及其人工栽培研究进展 [J]. 中草药, 2007, 38(4): 629-632.
- [2] Navarini L, Gilli R, Gombac V, et al. Polysaccharides from hot water extracts of roasted coffea arabica beans: isolation and characterization [J]. Carbohydrate Polymers, 1999, 40: 71-81.
- [3] 魏远安,方积年. 高效凝胶渗透色谱法测定多糖纯度及分子量 [J]. 药学学报, 1989, 24: 532-536.
- [4] Alsop R M, Vlachogiannis GJ. Determination of the molecular weight of clinical dextran by gel chromatography on TSK PW YTPC columns [J]. Chromatogr, 1982, 246: 227-240.
- [5] 宋学伟,任磊,韩泳平,等. 大花红景天多糖 RCPS 分离纯化及单糖组成分析 [J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 3: 642-644.
- [6] Andre B, David W. Assay of proteins in the presence of interfering materials [J]. Anal Biochem, 1975, 250: 6-19.
- [7] Kitamura S. An antitumor branched (1-3)-D-glucan from a water extract of fruiting bodies of cryptoporus volvatus [J].