

^{13}C -NMR (DEPT) δ 117.4(CH), 139.8(C) 示分子结构中存在⁷⁽⁸⁾; 红外光谱 1716 处吸收及 ^{13}C -NMR (DEPT) δ 10.3(C) 示分子结构中 C-3 位有 C=O 存在; ^1H -NMR 中 δ 0.60 (3H, s), 0.86 (6H, d, J = 6.5 Hz), 0.96 (3H, d, J = 6.3 Hz), 1.05 (3H, s) 处的吸收, 结合 ^{13}C -NMR (DEPT) δ 11.7 (CH₃), 12.1 (CH₃), 18.7 (CH₃), 21.8 (CH₃), 22.3 (CH₃) 的信号, 确定这 5 个甲基的归属为 C-18, C-19, C-21, C-26, C-27。光谱数据显示化合物 VI 为 3 位羰基, 7, 8 位双键的甾酮。该化合物的 mp、EIMS、NMR 及 IR 与文献^[8]报道的胆甾-7-烯-3-酮一致, 故化合物 VI 为胆甾-7-烯-3-酮。

References

- [1] Lin A P, Tu P F, Zheng J H. Studies on the pharmacognosy of the resin of *D. racaena cochinchinensis* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1994, 19(11): 648-650.
- [2] Amolak C J, Sushil K G. Isolation of lanosta-8, 25-dien-3 β -ol from the fungus *Fomes fastuosus* [J]. *Phytochemistry*, 1984, 23(10): 2392-2394.
- [3] Pratap S, Rangaswami S. Occurrence of O-methyl-drosophilin A in *Fomes fastuosus* Lev. [J]. *Tetrahedron Lett*, 1966, 7(11): 1229-1231.
- [4] Taichi O, Keiji I, Takeo C. Studies on the constituents of Pollen. X. on the constituents of Pollen Grains of *Ambrosia elatior* Linne. [J]. *Chem Pharm Bull*, 1982, 30: 2780-2786.
- [5] Tang R J, Wen D X, Wei H. Constituents in petroleum ether and ethyl acetate extracts fractions of *D. racaena cochinchinensis* (Lour.) S. C. Chen [J]. *China Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1995, 20(7): 421-423.
- [6] Carl D, Krakower G W, Lem A J, et al. The neutral constituents of the *Cactus Lophococcus Schollii*. The structure of lophenol-4 α -methyl-⁷-cholesten-3 β -ol - a link in sterol biogenesis [J]. *J Am Chem Soc*, 1958, 80: 6284-6292.
- [7] Mobarak Z, Bieniek D, Korte F. Studies on Non-cannabinoids of Hashish isolation and identification of some hydrocarbons [J]. *Chemosphere*, 1974, 1: 5-8.
- [8] Frederic D, Charles H, Jean-Pierre R, et al. Synthesis of a tritiated 3-dehydroecdysteroid putative precursor of ecdysteroid biosynthesis in *Loscusta migratoria* [J]. *Tetrahedron*, 1991, 47(34): 7067-7080.

火菇素蛋白的红外和拉曼光谱研究

薛久刚, 陈 畅, 李 彦, 蒋 瑛, 张晗星, 张长铠*

(山东大学 微生物技术国家重点实验室, 山东 济南 250100)

摘要:目的 研究抗癌活性蛋白火菇素的二级结构。方法 Fourier 变换红外光谱和显微共焦拉曼光谱法。结果 火菇素蛋白的二级结构中含有较多的 β 折叠和 α 螺旋而无规则卷曲含量较少, “埋藏”和“暴露”的酪氨酸残基为 34% 和 66%, C-C-S-S-C-C-侧链为反式-扭曲-反式构型。结论 红外和拉曼光谱法可以准确地反映火菇素蛋白在溶液中的二级结构。

关键词: 火菇素; 红外光谱; 拉曼光谱; 二级结构

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)07-0730-03

Conformation of flammulin by FTIR and Raman spectra

XU E Jiu-gang, CHEN Chang, LI Yan, JIANG Ying, ZHANG Han-xing, ZHANG Chang-kai

(State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract: **Object** To determine the spatial structural properties of flammulin, an anti-tumor protein purified from the aqueous extract of basidiomes of *Flammulina velutipes* (Curt. ex Fr.) Sing. **Methods** The FTIR and Raman spectroscopic analysis methods were employed. **Results** It is found that protein of this sample contains predominantly β pleated sheet and α -helix. The majority of tyrosyl residues is exposed 66% and a few are buried 34%. This protein has *trans*-gauche-*trans* configuration of C-C-S-S-C-C linkage. **Conclusion** The FTIR and Raman spectroscopic analysis methods can be used to accurately determine the secondary structural properties of flammulin.

Key words: flammulin; FTIR; Raman spectroscopy; secondary structure

* 收稿日期: 2003-10-15

基金项目: 国家自然科学基金项目 (3037014)

作者简介: 薛久刚 (1978-), 男, 黑龙江牡丹江市人, 硕士, 研究方向为真菌蛋白的分子生物学。

* 通讯作者 Tel: (0531) 8364427 E-mail: ckzhang@life.sdu.edu.cn

火菇素是从金针菇子实体中分离出的一种具有抗癌活性的简单蛋白^[1], 对实验动物移植肿瘤抑瘤作用的研究表明, 火菇素对小鼠内瘤 S₁₈₀ 和艾氏腹水瘤有明显的抑制作用, 能够延长小鼠的生存周期, 且无明显的不良反应^[2], 具有良好的抗肿瘤药物的开发前景。本实验利用红外、拉曼光谱技术对火菇素蛋白进行了研究, 获得了火菇素分子的二级结构信息, 为进一步阐明火菇素结构与功能的关系, 以及利用结构化学等手段改造火菇素分子, 减少其毒副作用满足临床药用标准, 打下良好的基础。

1 实验方法

1.1 火菇素蛋白的提取: 按周凯松等报道的方法^[3] 选取 2 kg 金针菇风干子实体洗净切碎, 用 0.5% 冰醋酸酸化水浸提过夜, 滤过, 于滤液中加硫酸铵至体积分数 66%, 离心弃上清液, 沉淀经透析脱盐加入预冷的乙醇至体积分数 50%, -20℃ 下沉淀, 离心, 上清液中再加入预冷的乙醇至体积分数 75%, -20℃

沉淀, 离心, 沉淀用 0.02 mol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲液 (pH 6.6) 透析平衡后, 上 DEAE-Sephadex 离子交换色谱柱 (1.3 cm × 15 cm), 收集穿过峰, 穿过峰经聚乙二醇浓缩后, 用 0.02 mol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲液 (pH 7.8) 平衡后, 过 CM-Sephadex 离子交换色谱柱, 以相同的缓冲液洗脱洗去穿过峰, 改用 NaCl 梯度 (0~1.0 mol/L) 洗脱, 体积流量为 14 mL/h, 部分收集每管 2.4 mL, 收集活性洗脱峰。

1.2 红外波谱的测定: 取约 2 mg 的火菇素真空冷冻干燥样品, KBr 混合研磨压片制样, 利用美国 Nicolet 公司 FT-IR 20SX 型傅里叶变换红外光谱仪, 透射光谱法测定。波数扫描范围 400~4 000 cm⁻¹。

1.3 显微共焦拉曼光谱的测定: Microscopic confocal raman spectrometer RM 2000 型, 英国 RENISHAW 公司产品, 由 586 型微机联动控制。激光光源为 Coherent 公司的 Innova 70 型氩离子激光器。激光波长 514.5 nm, 显微尺寸 ≤ 1 μm, 分辨率 1 cm⁻¹, 拉曼位移范围 100~4 000 cm⁻¹。

双单色仪狭缝宽 500 μm, 波数扫描速度 1 cm⁻¹/s, 峰值误差不超过 ±1 cm⁻¹, 激光初射功率为 50 mW。实验为 90° 方向散射几何装置, 实验时室温 (20 ± 1)℃。样品直接放入毛细管内 (蜡膜封口) 进行测试。重复扫描 5 次, 由计算机作累加平均和基线校正, 绘图输出。

2 结果与讨论

2.1 火菇素的红外扫描: 在蛋白质的红外图谱中,

主要由光谱的酰胺 I 区 (amide I, 1 600~1 720 cm⁻¹) 和酰胺 III 区 (amide III, 1 220~1 330 cm⁻¹) 的吸收带来表征分子的二级结构^[4]。各种二级结构的酰胺 I 带红外光谱范围为: α 螺旋 1 645~1 662 cm⁻¹; β 折叠 1 615~1 638 cm⁻¹; 无规卷曲 1 638~1 645 cm⁻¹。各种二级结构的酰胺 III 带振动区域为: α 螺旋结构 1 340~1 290 cm⁻¹; 无规则卷曲 1 288~1 255 cm⁻¹, β 折叠结构 1 248~1 220 cm⁻¹。且有序结构酰胺 III 带强度较弱, 而无规卷曲则有相对较强的酰胺 III 带^[5,6]。从火菇素冷冻干燥制品的红外图谱可见, 在 1 653 cm⁻¹ 处有明显的酰胺 I 带, 表明纯化地火菇素分子中较多的 α 螺旋。在 1 252 cm⁻¹ 处有微弱的酰胺 III 带, 表明火菇素的二级结构中也含有少量无规卷曲。

2.2 火菇素显微共焦拉曼光谱: 显微共焦拉曼光谱是没有任何遮蔽效应的不破坏样品的振动分子光谱技术。可以在溶液或粉末状态下测定蛋白质的二级结构, 提供蛋白的结构信息。火菇素拉曼光谱的主要峰的指认和图谱示于表 1, 对图谱的解析可得火菇素的空间构象的如下信息。

表 1 火菇素拉曼光谱中各主要峰的归属指认

Table 1 Tentative assignments of flammulin in Raman spectrum

波长/cm ⁻¹	推测的构型	波长/cm ⁻¹	推测的构型
487	Val, Gly	1655	amide I
826	Tyr	1658	amide I
848	Tyr	1624	βpleated sheet
862	Val	1631	βpleated sheet
997	Phe	1637	coil&turn
1 283	Amide III	1654	αhelix
1 429	δ(N-H)	1663	βpleated sheet
1 472	CH ₂ , δCH ₃	1668	βpleated sheet
1 489	δCH ₂	1685	turn
1 540	δCH ₂ , δCH ₃	1700	turn

2.2.1 蛋白的主链构象: 拉曼光谱中酰胺 I 和酰胺 III 谱带对蛋白质的主链构象是灵敏的, 蛋白质的主链构象主要依据酰胺基团的振动频率来进行分析判断。由文献可知^[7], α 螺旋由在 (1 654 ± 5) cm⁻¹ 处的酰胺谱带和 1 270~1 300 cm⁻¹ 处的酰胺谱带及 (935 ± 5) cm⁻¹ 处的 [C-C(N)] 伸缩振动谱带来表征; β 折叠由 (1 670 ± 5) cm⁻¹ 处的酰胺谱带和在 1 225~1 245 cm⁻¹ 处的酰胺谱带所表征; 无规则卷曲结构是由 (1 665 ± 5) cm⁻¹ 处的酰胺谱带和在 1 241~1 251 cm⁻¹ 处的酰胺谱带及 (960 ± 5) cm⁻¹ 处的 [C-C(N)] 伸缩振动谱带来表征。由火菇素拉曼图谱, 可以看到在酰胺 I 区域有明显的表征 α 螺旋的 1 661 cm⁻¹ 峰和表征 β 折叠的强锐的 1 676

cm^{-1} 峰。在酰胺III区域有明显的表征 α 螺旋的 $1\,293\text{ cm}^{-1}$ 峰。在表征C-C骨架伸缩振动的 $870\sim 960\text{ cm}^{-1}$ 区域有 924 cm^{-1} 的强峰,表明 α 螺旋的存在。综上所述,火菇素蛋白的二级结构主要为 α 螺旋和 β 折叠,而无规则卷曲含量较少。

2.2.2 火菇素蛋白的侧链环境:酪氨酸在约 830 和 850 cm^{-1} 出现由环吸收振动和面弯曲振动产生的费米共振双峰。由这对谱带的强度比可以反映出蛋白质中酪氨酸所处的环境。当其强度比为 $0.3\sim 0.5$ 时,表示酪氨酸残基“埋藏”在疏水环境并在其OH基和负电荷受体之间形成强氢键,当强度比为 $1.25\sim 1.40$ 时,则表明酪氨酸残基全部暴露于溶剂中。对火菇素蛋白,测得 $I_{848}/I_{826}=1.01$ 。据这对谱带强度比值及Craig等确定的方程^[8],定量计算出“埋藏”和“暴露”的酪氨酸残基占酪氨酸残基总数的34%和66%。

2.2.3 S-S键的空间结构:在拉曼光谱中,S-S和C-C伸缩振动的谱带出现在 $500\sim 700\text{ cm}^{-1}$;两个半胱氨酸侧链形成的二硫桥,其C-C-S-S-C-C键可能有3种构型,可由S-S键的振动频率进行判断: 510 cm^{-1} 谱带属于扭曲-扭曲-扭曲式构型, 525 cm^{-1} 谱带属于扭曲-扭曲-反式构型, 540 cm^{-1} 谱带属于反式-扭曲-反式构型。在火菇素蛋白的拉曼图

谱中,S-S振动频率出现在 537 cm^{-1} 处,表明火菇素蛋白的C-C-S-S-C-C侧链为反式-扭曲-反式构型。

References

- [1] Komatsu N, Terakawa H, Nakanishi K. Flammulin, a basic protein of *Flammulina velutipes* with antitumor activities [J]. *J Antibiot Ser A*, 1963, 16(3): 139-143.
- [2] Watanabe Y, Nakanishi K, Komatsu N. Flammulin, an anti-tumor substance [J]. *Bull Chem Soc*, 1964, 37(5): 747-750.
- [3] Zhou K S, Peng J F, Zhang C K. A new method of separation and bioactivity assay of flammulin [J]. *Chin J Biochem Mol Biol* (中国生物化学与分子生物学学报), 2003, 19(2): 234-239.
- [4] Prestrelski S J, Arakawa T, Carpenter J F, et al. Separation of freezing-and drying-induced denaturation of lyophilized proteins using stress-specific stabilization II. Structural studies using infrared spectroscopy [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1993, 303(2): 465-473.
- [5] Byler D M, Susi H. Examination of the secondary structure of proteins by deconvoluted FTIR spectra [J]. *Biopolymers*, 1986, 25(3): 469-487.
- [6] Griebenow K, Klibanov A M. Lyophilization-induced reversible changes in the secondary structure of proteins [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(24): 10969-10976.
- [7] Shie M, Dobrov E N, Tikhonenko T I. A comparative study of the structure of tobacco mosaic virus and cucumber virus 4 by laser Raman spectroscopy [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1978, 81(3): 907-914.
- [8] Craig W S, Gaber B P. Laser Raman scattering from an enzyme of well-documented structure, human carbonic anhydrase B [J]. *J Am Chem Soc*, 1977, 99(12): 4130-4134.

Chemical constituents of *Rheum glaberrimum* (I)

WEI Yu-hui, ZHANG Cheng-zhong, LI Chong, TAO Bao-quan*

(Department of Natural Drugs, Lanzhou Medical College, Lanzhou 730000, China)

Abstract: **Object** To study the chemical constituents in the root of *Rheum glaberrimum*. **Methods** Compounds were isolated by various column chromatographies with silica gel. Their structures were elucidated by spectral analysis (MS, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$) and chemical evidence. **Results** Five compounds were isolated from the chloroform part, which were identified as chrysophanol (I), physcion (II), alo-emodin (III), emodin (IV), and β -sitosterol (V). **Conclusion** All above compounds are obtained from this plant for the first time.

Key words: Polygonaceae; *Rheum glaberrimum* G. Sam; anthraquinones

光茎大黄的化学成分研究 (I)

魏玉辉, 张承忠*, 李冲, 陶保全

(兰州医学院药学院 天然药物教研室, 甘肃 兰州 730000)

摘要: **目的** 对光茎大黄根部的化学成分进行研究。 **方法** 采用硅胶柱色谱分离、重结晶、MS、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 等技术进行分离、鉴定结构。 **结果** 从该植物中分离并鉴定了5个化合物, 分别是大黄酚(chrysophanol,

* 收稿日期: 2003-10-05

作者简介: 魏玉辉, 男, 兰州医学院 2002 级研究生, 主要从事天然药物化学研究。 E-mail: stonewyh@2911.net

* 通讯作者 Tel: (0931) 8289512