

- 3422-3424.
- [6] 李国玉,王金辉,李 锐. 苦马豆果皮的甾醇类成分研究[J]. 中草药, 2003, 34(5): 392-393.
- [7] 田景奎,邹忠梅,刘 安,等. 黄连花化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(4): 283-284.
- [8] 王 莉,肖红斌,梁鑫淼. 天麻化学成分研究[J]. 中草药, 2003, 34(7): 584-585.
- [9] 刘明滔,韩志超,章 漳,等. 龙胆的化学成分研究[J]. 沈阳药科大学学报, 2005, 22(2): 103-104.
- [10] Abe F, Yamauchi T, Saharan S. Minor iridoids from *Thevetia peruviana* [J]. *Phytochemistry*, 1995, 38: 793-794.
- [11] 徐任生,叶 阳,赵维明. 天然产物化学[M]. 北京: 科学出版社, 2004.

银耳孢子多糖TFA 结构的研究

徐文清^{1,2},高文远^{1*},王雪姣²

(1. 天津大学药学院,天津 300070; 2. 中国医学科学院放射医学研究所,天津 300192)

摘 要:目的 研究从银耳孢子粉 *Tremella fuciformis* 中提取分离所得中性多糖银耳孢子多糖 A(TFA) 的结构特征。方法 利用糖组成分析、甲基化、还原水解乙酰化及 GC-MS、NMR 分析,确证其结构。结果 TFA 的相对分子质量为 73 000,糖组成分析显示由半乳糖、甘露糖、葡萄糖和 2 个七碳糖组成。多糖 TFA 的甲基化产物,经水解、还原、乙酰化,通过 GC-MS 分析表明,主要含有 1,6 连接的半乳糖,不同位置连接的甘露糖,另外还有 2 个七碳糖,末端为端基连接的甘露糖和葡萄糖。结论 TFA 为一多分支的结构复杂的新结构杂多糖,为首次发现。

关键词: 银耳;多糖;七碳糖;甲基化分析

中图分类号: O636.1; Q539

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)08-1140-03

银耳 *Tremella fuciformis* Berk. 是一种高等真菌,属于有隔担子菌亚纲银耳科。银耳是世界公认的珍贵食用菌和重要药材,具有润肺滋阴的作用。银耳的现代研究起步较晚,从 20 世纪 60 年代晚期才有报道。从 20 世纪 70 年代开始,国内外对银耳化学成分的研究主要集中在多糖上。目前从银耳子实体中得到银耳多糖有酸性杂多糖、中性杂多糖^[1~4]。大量生物实验表明,银耳多糖具有提高免疫功能,抑制肿瘤、抗放射等生物活性^[5~8]。从银耳孢子粉中,我国学者吴梧桐提取得到 3 种多糖,仅对其单糖组成进行了研究,对其详细结构未见报道^[9,10]。本实验从银耳孢子粉中水提得到一种均一体中性多糖,与以往报道相比,其单糖组成不同,笔者对其结构进行了详细研究,发现该多糖为一多分支的结构复杂的新结构杂多糖,为首次发现。药理实验表明该多糖具有预防放射损伤的作用。

1 实验部分

1.1 材料和仪器:单糖对照品葡萄糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖、岩藻糖、木糖、鼠李糖均为 Pharmacia 公司出品。多糖相对分子质量分布测定所用的标准品为 Dextran 系列, Sephadex G-200 和 DEAE-Dextran gel A-25 均为 Pharmacia 公司出品。硼氢化

钠、三氟乙酸、碘甲烷、二甲基亚砷均为国产试剂(AR)级。二甲基亚砷,加 4A 的分子筛干燥后重蒸,碘甲烷用前重蒸。

气相色谱仪为 Shimadzu-9A 型。气质联用仪为 Shimadzu GC-MS-OP2010。核磁共振仪为 Unity-Plus400,红外光谱仪为 MAGNA-560 FT-IR,旋光仪为 MC241,高效液相色谱仪为 Shimadzu LC-10A,柱 TSK G 4000PWXL(300 mm×6 mm),监测器 Shodex。银耳孢子粉由中国医学科学院生物技术研究所药厂提供,由天津中医药大学张丽娟教授鉴定。

1.2 提取与分离:取 150 g 银耳孢子发酵粉,用 3 L 水煮提 5 h,冷却至室温后,将提取液离心。提取后的残渣再用水煮提,冷却后离心,合并 2 次上清液,浓缩至微黏稠,加 3 倍量乙醇,静置后抽滤取沉淀。沉淀用少许乙醚洗,置真空干燥器中干燥,得粗多糖 80 g。取 10 g 粗多糖,加 500 mL 蒸馏水,加热溶解,Sevage 法除蛋白质,茚三酮法检测至无蛋白质为止。取除蛋白质的溶液浓缩,加 3 倍量乙醇,静置后抽滤取沉淀,得精制银耳多糖 5.25 g。取 3 g 精制银耳多糖,经 DEAE-Dextran gel A-25 分离,得到 2 个银耳多糖,分别经 Sephadex G-150 分离后,透析,

收稿日期:2007-11-26

基金项目:天津市科技发展计划应用基础重点项目(033801711)

作者简介:徐文清,女,研究员。Tel:(022)85683049 E-mail:xuwenqing67@yahoo.com.cn

* 通讯作者 高文远 Tel:13312076345 E-mail:pharmgao@tju.edu.cn

得到2个多糖,分别为TFA和TFB。多糖TFA 0.56 g;多糖TFB 1.62 g。多糖TFA经HPLC检测为单一对称峰。

1.3 纯度及相对分子质量测定^[11]:样品TFA及标准品多糖分别经HPLC分离,根据峰型判断样品纯度,由标准品多糖的相对分子质量对数与洗脱体积求得标准曲线,再由标准曲线求得样品的重均相对分子质量。

1.4 糖组成分析^[12,13]

1.4.1 水解及纸色谱:TFA 5 mg用2 mol/L三氟乙酸封管于120℃水解2 h,除去三氟乙酸后溶于水。用纸色谱检测样品所含的糖组分。纸色谱: (Whattman Nol) 色谱滤纸,展开剂:正丁醇-冰醋酸-水(4:1:5),显色剂:苯胺-邻苯二甲酸。

1.4.2 还原、乙酰化、气相色谱分析:将水解后的样品溶于3 mL蒸馏水中,加入20 mg硼氢化钠于室温还原2 h,用冰醋酸破坏过量的硼氢化钠,减压蒸干。加Ac₂O和无水吡啶各1 mL,100℃反应1 h进行乙酰化。反应完成后减压蒸除过剩的醋酐和吡啶。衍生物溶于CHCl₃后进行气相色谱分析。

1.5 甲基化分析^[14]:10 mg TFA充分干燥后,溶于3 mL DMSO中,搅拌溶解后加入50 mg干燥的粉末状NaOH,搅拌至大部分溶解后,水浴下缓慢加入2 mL CH₃I,室温搅拌1 h。减压蒸去过量的CH₃I,用蒸馏水透析3 d。取透析带内的溶液冷冻干燥。如此重复4次,至红外光谱检测无羟基吸收峰为止。对上述甲基化完全的多糖,先用90%的甲酸解聚6 h,再用2 mol/L三氟乙酸封管于120℃水解2 h,按1.4.2还原、乙酰化方法制备其甲基化的糖醇乙酰化衍生物。衍生物溶于CHCl₃后进行气相-质谱联用分析。

1.6 部分酸水解^[15]:100 mg TFA用0.1 mol/L三氟乙酸,于100℃水解1 h,减压蒸干。将水解产物溶于水中,透析3 d。透析带内的溶液浓缩,冷冻干燥。用糖组成分析法检测其单糖组成。

1.7 NMR分析:TFA溶于D₂O中,在D₂O中加两滴丙酮为内标,于核磁共振仪上测定。

1.8 红外光谱和旋光度测定:TFA用KBr压片,甲基化的多糖用石蜡油压片在红外光谱仪上测定红外吸收。旋光度的测定是将TFA配成一定浓度的水溶液,于数字旋光仪上测定旋光度。

2 结果与讨论

2.1 银耳孢子多糖的色谱分离:银耳孢子多糖经DEAE-Dextran gel A-25分离,用NaCl为洗脱液,苯酚-硫酸法检测糖的质量分数。如图1,得到两部

分,先流出的组分为TFA,经Sephadex G-150反复分离后,得到分布均一的多糖。

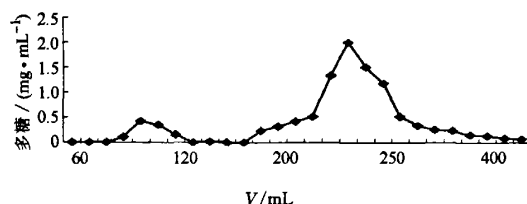


图1 DEAE-Dextran gel A-25分离粗多糖的色谱

Fig. 1 Chromatogram of crude polysaccharide by DEAE-Dextran gel A-25

2.2 银耳孢子多糖TFA的分布和相对分子质量测定:在HPLC中呈现为单一对称的尖峰,表明其为均一多糖组分。根据标准曲线 $\lg M = 9.399\ 653 - 0.291\ 596\ 1\ T$,确定TFA重均相对分子质量为73 000。

2.3 银耳孢子多糖TFA的理化性质:比旋度 $[\alpha]_D^{20} + 154.4 (0.01, H_2O)$,该多糖能溶于水和二甲基亚砜,不溶于乙醇等有机溶剂。元素分析结果,C 39.77%,H 6.68%,符合多糖的组成比例,不含N、P等。紫外扫描未见蛋白质的特征吸收峰。红外光谱在3 406 cm⁻¹的强宽峰为分子间及分子内羟基吸收峰,2 928 cm⁻¹为C-H键伸缩振动,1 421~1 155为C-H键的变角振动。1 000~1 155为糖环上C-O-C醚键的不对称伸缩振动。

2.4 TFA完全水解分析:TFA经2 mol/L三氟乙酸完全水解,所得产物经纸色谱和气相色谱表明含有半乳糖、甘露糖、葡萄糖、2个七碳糖,未见葡萄糖醛酸。经硫酸-吡啶反应^[16],证明不含糖醛酸。核磁共振碳谱未见低场羰基的化学位移,由此可以证明是中性糖。几种单糖的摩尔比经气相分析确定接近为7:3:1:1:1。

2.5 TFA部分酸水解分析:TFA部分酸水解后,透析带内的次级糖经纸色谱和气相色谱分析,由半乳糖和甘露糖组成。

2.6 TFA甲基化分析:TFA甲基化后GC-MS数据见表1。经过NIST数据库检索和分析,结果表明,TFA主要连接方式为1,6连接的半乳糖。同时含有端基连接的甘露糖;1,3,6连接的甘露糖和少量1,2,4连接的甘露糖。葡萄糖仅以端基连接一种方式。同时还有2,3,1,7连接的glycer-D-glucosylheptopyranoside和1,3,5,7连接的glycer-D-mannoheptopyranoside 2个七碳糖。此结果表明TFA主链由1,6连接的半乳糖和1,3,6连接的甘露

表1 甲基化的TFA糖醇乙酰化衍生物的气相-质谱分析结果

Table 1 GC-MS Analysis of alditol alditols derived from methyl TFA

甲基化糖	相对摩尔比	连接方式	质谱碎片
2,3,4,6-四甲基-1,5-二-氧-乙基-山梨醇	0.8	葡萄糖(1-	43,73,88,101
2,3,4,6-四甲基-1,5-二-氧-乙基-甘露醇	0.8	甘露糖(1-	43,101,117,129
3,6-二甲基-1,2,4,5-四-氧-乙基-甘露醇	0.5	-1,2)甘露糖(4-	43,87,99,129
2,3,4-三甲基-1-1,5,6-三-氧-乙基-半乳	5.2	-1)半乳糖(6-	43,87,101,117
4,6-二甲基-1,5,2,3,7-五-O-氧-乙基-葡庚糖七醇	0.7	-2,3)葡庚糖(1,7-	43,101,129,161
2,4-二甲基-1,3,5,6-四-氧-乙基-甘	1	-1,3)甘露糖(6-	43,87,117,129
1,3,5,7-四甲基-2,4,6-三-氧-乙基-甘露糖醇	0.8	-1,3)甘露糖(5,7-	43,97,117,129
六乙酰化-甘露糖醇	1.4	-1,2,3)甘露糖(4,6-	73,103,115,14

糖组成。分枝点在甘露糖上。侧链分枝由1,2,4连接的甘露糖、2个七碳糖组成。末端为端基连接的甘露糖和端基葡萄糖组成。根据上述结果推测TFA主链的结构如下:

$[-^1\text{Gal}^6-^1\text{Gal}^6-^1\text{Gal}^6-^1\text{Gal}^6-^1\text{Gal}^6-^1,3\text{Man}^6-]_n-^1\text{Gal}^6-$

2.7 TFA核磁共振分析: TFA核磁共振, ^1H -NMR仅能提供是糖类物质的化学位移。但在 ^{13}C -NMR谱中,异头碳区在 δ 104处有一较强的信号,归属为含量较高半乳糖的C-1的信号, δ 71.904为1,6连接的半乳糖C-6向低场移动的信号。 δ 77.691归属为C-2的信号; δ 79.686为C-4的信号; δ 76.483为C-3的信号; δ 75.865为C-5的信号,表明半乳糖为 α -D-半乳糖。同时还出现了甘露糖C-6在 δ 63.7的信号。

2.8 活性分析:对于7.5 Gy ^{137}Cs γ 射线照射的放射损伤小鼠,提前3天预防给予TFA,可明显减轻射线对小鼠造血系统的损伤,脾结节、脾指数以及股骨DNA量与对照组比较,差异显著。表明TFA可预防射线对小鼠的损伤。

参考文献:

- [1] 袁伟,张永祥. 银耳多糖的药理学研究概况[J]. 中药药理与临床, 2000, 16(4): 44-46.
- [2] Ukai S, Kazuo H, Tadashi K, et al. Polysaccharides in fungi. I. Purification and characterization of acidic heteroglycans from aqueous extract of *Tremella Fuciformis* Berk. [J]. *Chem Pharm Bull*, 1974, 22(5): 1102-1107.
- [3] Ukai S, Tadashi K, Chihiro H, et al. Polysaccharides in fungi. II. A neutral heteroglycans from alkaline extract of *Tremella fuciformis* Berk. [J]. *Chem Pharm Bull*, 1978, 26(6): 1707-1712.
- [4] Shigeo U, Hirose K, Kiho T. Isolations and characterizations of polysaccharides from *Tremella fuciformis* Berk. [J]. *Chem Pharm Bull*, 1972, 20(6): 1347-1348.
- [5] Gao Q, Seljelid R, Chen H, et al. Characterization of acidic heteroglycans from *Tremella fuciformis* Berk. with cytokine stimulating activity [J]. *Carbohydr Res*, 1996, 288: 134-142.
- [6] Gao Q, Killie M K, Chen H, et al. Characterization and cytokine-stimulating activities of acidic heteroglycans from *Tremella fuciformis* [J]. *Planta Med*, 1997, 63(5): 457-460.
- [7] 周爱如, 吴彦坤. 银耳多糖抗肿瘤作用的研究[J]. 北京医科大学学报, 1987, 19(3): 150-153.
- [8] 夏尔宁, 陈琼华. 银耳子实体多糖的分离、分析及生物活性[J]. 真菌学报, 1988, 7(3): 166-174.
- [9] 吴梧桐, 余品华. 银耳孢子多糖TF-A、TF-B、TF-C的分离、纯化及组成单糖的鉴定[J]. 生物化学与生物物理学报, 1984, 16(4): 393-397.
- [10] Hage L. Comparison of some soft gels for the molecular weight distribution analysis of dextran at enhanced flowrates [J]. *J Chromatogr*, 1978, 160: 59-71.
- [11] Hordq A, Takai T. Analysis of the monosaccharide compositions of total non-dialyzable urinary glyconjugates by the dithioacetal method [J]. *J Chromatogr A*, 1981, 226: 341-350.
- [12] 王展, 方积年. 莼丝子多糖H3的研究[J]. 药学学报, 2001, 36(3): 192-195.
- [13] Need P W, Selvendran R R. Avoiding oxidative degradation during sodium hydroxide/methylidodidemmediated carbohydrate methylation in dimethyl sulfoxide [J]. *Carbohydr Res*, 1993, 245: 1-10.
- [14] Anna B S, Berit S P, Jens K W, et al. Characterization of a biologically active arabinogalactan from the leaves of *Plantago major* L. carbohydrate polymers [J]. 1998, 35: 145-153.
- [15] Cui W W, Eskin M N A, Biliaderis C G, et al. NMR characterization of a 4-O-methyl- β -D-glucuronic acid containing rhamnagalacturonan from yellow mustard (*Sinapis alba* L.) mucilage [J]. *Carbohydr Res*, 1996, 292: 173-183.
- [16] 姜瑞芝, 陈英红, 杨勇杰, 等. 银耳多糖中糖醛酸含量的测定[J]. 中草药, 2004, 35(9): 991993

银耳孢子多糖TFA结构的研究

作者：[徐文清](#)，[高文远](#)，[王雪姣](#)
作者单位：[徐文清\(天津大学药学院, 天津, 300070; 中国医学科学院放射医学研究所, 天津, 300192\)](#)，[高文远\(天津大学药学院, 天津, 300070\)](#)，[王雪姣\(中国医学科学院放射医学研究所, 天津, 300192\)](#)
刊名：[中草药](#)  
英文刊名：[CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS](#)
年，卷(期)：2008, 39(8)
被引用次数：1次

参考文献(16条)

1. 聂伟;张永祥 [银耳多糖的药理学研究概况](#)[期刊论文]-[中药药理与临床](#) 2000(04)
2. Ukai S;Kazuo H;Tadashi K [Polysaccharides in fungi.I.Purification and characterization of acidic heteroglycans from aqueous extract of Tremella Fuciformis Berk](#) 1974(05)
3. Ukai S;Tadashi K;Chihiro H [Polysaccharides in fungi.II.A neutral heteroglycans from alkaline extract of Tremella fuciformis Berk](#) 1978(06)
4. Shigeo U;Hirose K;Kiho T [Isolations and characterizations of polysaccharides from Tremella fuciformis Berk](#) 1972(06)
5. Gao Q;Seljelid R;Chen H [Characterization of acidic heteroglycans from Tremella fuciformis Berk.with cytokine stimulating activity](#) 1996
6. Gao Q;Killie M K;Chen H [Characterization and cytokine-stimulating activities of acidic heteroglycans from Tremella fuciformis](#) 1997(05)
7. 周爱如;吴彦坤 [银耳多糖抗肿瘤作用的研究](#) 1987(03)
8. 夏尔宁;陈琼华 [银耳子实体多糖的分离、分析及生物活性](#) 1988(03)
9. 吴梧桐;余品华 [银耳孢子多糖TF-A、TF-B、TF-C的分离、纯化及组成单糖的鉴定](#) 1984(04)
10. Hage L [Comparison of some soft gels for the molecular weight distribution analysis of dextran at enhanced flowrates](#) 1978
11. Hordq A;Takai T [Analysis of the monosaccharide compositions of total non-dialyzable urinary glyconjugates by the dithioacetal method](#) 1981
12. 王展;方积年 [菟丝子多糖H3的研究](#)[期刊论文]-[药理学报](#) 2001(03)
13. Need P W;Selvendran R R [Avoiding oxidative degradation during sodium hydroxide/methylidodidemediated carbohydrate methylation in dimethyl sulfoxide](#) 1993
14. Anna B S;Bet-it S P;Jens K W [Characterization of a biologically active arabinogalactan from the leaves of Plantago major L.carbohydrate polymers](#) 1998
15. Cui W W;Eskin M N A;Biliaderis C G [NMR characterization of a 4-O-met hyl-β-D-glucuronic acid containing rhamnogalacturonan from yellow mustard \(Sinapis alba L.\)mucilage](#) 1996
16. 姜瑞芝;陈英红;杨勇杰 [银耳多糖中糖醛酸含量的测定](#)[期刊论文]-[中草药](#) 2004(09)

本文读者也读过(7条)

1. 孙元琳. 申瑞玲. 汤坚. 顾小红. SUN Yuan-Lin. SHEN Rui-Ling. TANG Jian. GU Xiao-Hong [当归多糖ASP3的甲基化分析](#)[期刊论文]-[高等学校化学学报](#)2008, 29(7)

2. [李波, 许时婴](#) [难溶于二甲亚砒多糖的甲基化方法研究](#)[期刊论文]-[天然产物研究与开发](#)2004, 16(3)
3. [季宇彬, 汲晨锋, 孙剑楠, 李杰女](#) [羊栖菜多糖 \(SPFS-B2\) 的甲基化分析](#)[会议论文]-2008
4. [陆榕, 孙立崧, 王仲孚, 田庚元, 吉田孝](#) [细脚拟青霉多糖I的化学结构](#)[期刊论文]-[中草药](#)2001, 32(10)
5. [王展, 方积年, Wang Zhan, FANG Ji-nian](#) [菟丝子多糖H3的研究](#)[期刊论文]-[药学报](#)2001, 36(3)
6. [杨真威, 姜瑞芝, 陈英红, 高其品, YANG Zhen-wei, JIANG Rui-zhi, CHEN Ying-hong, GAO Qi-pin](#) [耙齿菌糖蛋白 I 1-2-1 的化学研究](#)[期刊论文]-[中草药](#)2005, 36(8)
7. [刘四光, 李文权, 邓永智, 郑啸, 梁燕茹, LIU Si-guang, LI Wen-quan, DENG Yong-zhi, ZHENG Xiao, LIANG Yan-ru](#) [自养小球藻中多糖PCA1的化学结构研究](#)[期刊论文]-[厦门大学学报 \(自然科学版\)](#) 2007, 46(5)

引证文献(2条)

1. [韩英, 徐文清, 杨福军, 沈秀, 洪阁, 黄洁, 周则卫](#) [银耳多糖的抗肿瘤作用及其机制](#)[期刊论文]-[医药导报](#) 2011(7)
2. [马素云, 贺亮, 姚丽芬](#) [银耳多糖结构与生物活性研究进展](#)[期刊论文]-[食品科学](#) 2010(23)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200808008.aspx