

碱提水溶性安络小皮伞多糖的研究 ——B₁与B₂的分离纯化及结构研究

白日霞 张翼伸

(东北师范大学生物系,长春)

摘要 从曾用水提取过水溶性多糖的安络小皮伞残渣中用稀碱液提取了二种水溶多糖B₁和B₂。它们分别给 Sepharose 4B 柱, 2B 柱层析, 超离心分析, 醋酸纤维薄膜电泳鉴定, 表明 B₁ 和 B₂ 均为纯多糖。采用气相色谱, 红外光谱, 淀粉酶解, 甲基化分析等方法确定了它的基本结构。

关键词 小皮伞; 小皮伞多糖。

陈西广、张翼伸(1989)曾对安络小皮伞 [*Marasmius androsaceus* (L.:Fr.) Fr.] 水溶性多糖进行过研究, 我们在用水提出全部水溶性多糖后的残渣中, 再用稀碱(0.1 N NaOH) 在 N₂ 流保护下, 热提出一部分多糖, 从中分离分级为碱提水溶多糖与碱提碱溶多糖, 它们均有各自的特点与结构, 本文仅报告其中碱提水溶的 B₁ 与 B₂ 的分离纯化与结构确定。

材料与方法

(一) 材料来源

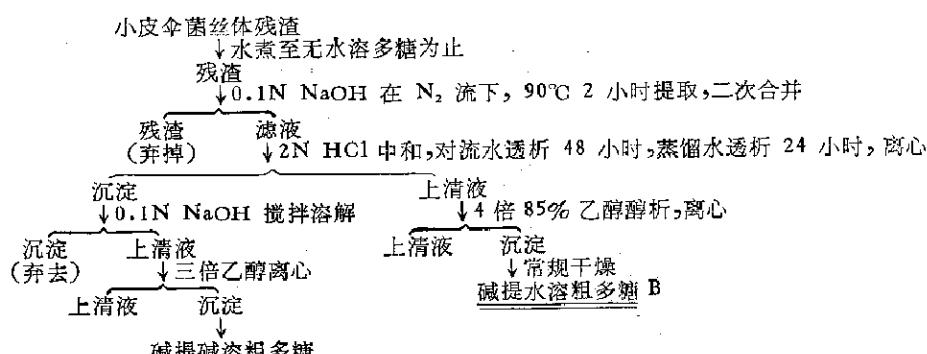
取自吉林省集安制药厂液体培养安络小皮伞菌丝体, 经酒精提取皂甙后的残渣。

(二) 多糖的提取与纯化

1. 提取: 如流程图。(梁忠岩、张翼伸, 1985)

2. 分级: 碱提水溶粗多糖 B, 热水溶解, 冷却, 离心弃沉淀, 滤液加 1 倍甲醇, 醇析得 B₁, 滤液加 1 倍乙醇得 B₂。

3. 脱色和脱蛋白与陈西广、张翼伸方法同。



1988-12-16 收稿。

本研究为科学基金资助项目。

(三) 测试方法

1. 糖量与糖组分分析, 多糖的纯度检查, 多糖结构测定所用的高碘酸氧化、Smith 降解、完全甲基化、GC 与 GC-MS、红外光谱分析, 比旋光度测定等均与陈酉广、张翼仲(1990)相同。

2. ^{13}C -NMR 与 H-NMR 测定: 20 mg 样品溶于 0.5 ml DO, 制成饱和溶液, 室温 15°C, 5 mm 管径, 观察频率 25.00 MHz, 累加次数 40K。

3. 酶降解: 20 mg 多糖加水 2 ml, 加入 1 ml 唾液淀粉酶及少量 NaCl, 37°C 保温 24 小时, 补加一次酶, 再保温 24 小时, 稍浓缩, 上琼脂糖凝胶 4B 柱, 分别收集各峰, 减压浓缩干燥作 GC 分析。

实验与结果

(一) 多糖的分离与纯化

按上流程得碱提水溶粗多糖 B, 经脱色脱蛋白后, 总糖含量达 96.1%, 经 GC 分析 B 组成为甘露糖 (Man) 葡萄糖 (Glc) 木糖 (Xyl), 摩尔比为 1:1.4:0.12。多糖 B 按甲醇、乙醇醇析分级后, 分别两次重醇析, 得 B_1 与 B_2 。纯度经醋酸纤维薄膜电泳检查呈单一带, 超速离心分析呈单一峰, 琼脂糖凝胶 4B 柱层析为单一对称峰。

(二) 多糖 B_1 与 B_2 物理性状与组成

B_1 , B_2 为乳白色粉末, 易溶于热水。经 GC 分析 B_1 的组成为 GLC:Man = 2:1, B_2 的组成为 GLC:Man = 1:1。均无结合蛋白质。比旋光值 B_1 的 $[\alpha]_{D}^{25} = 54.38^\circ$, B_2 的 $[\alpha]_{D}^{25} = 42.44^\circ$

(三) B_1 与 B_2 的结构研究

1. ^{13}C -NMR 分析(见图 1-2)

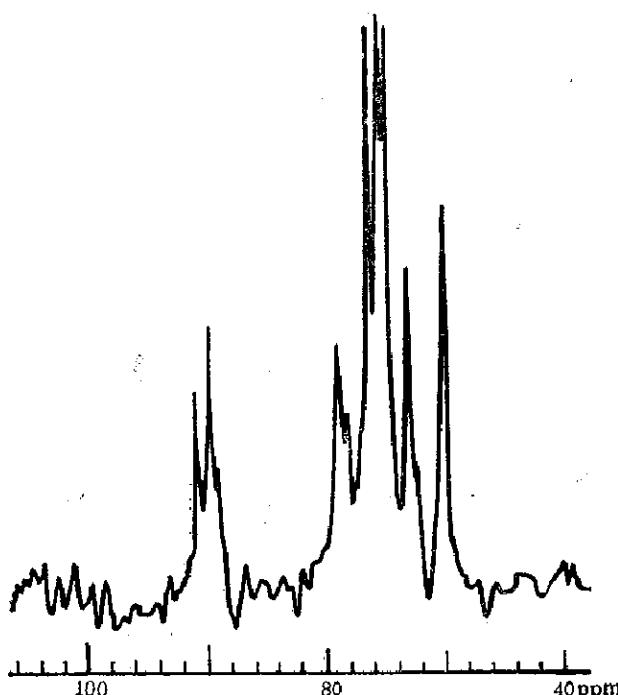
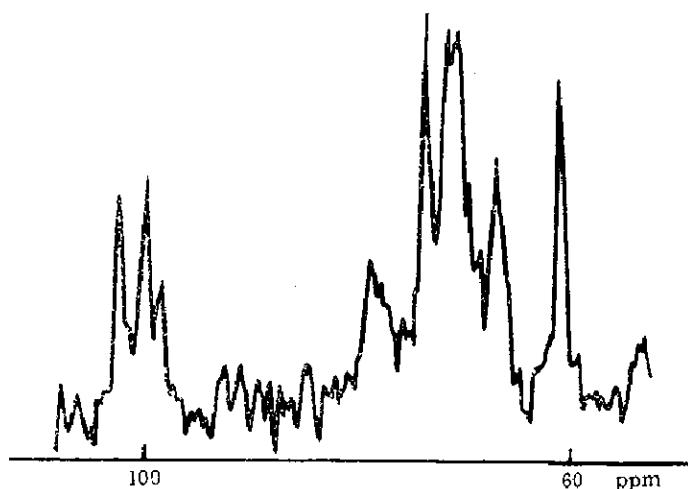


图 1 B_1 的 ^{13}C -NMR 谱

Fig. 1 ^{13}C -NMR spectra of B_1

图 2 B_2 的 ^{13}C -NMR 谱Fig 2 ^{13}C -NMR spectra of B_2

B_1 与 B_2 的化学位移值见表 1

表 1 B_1 与 B_2 的化学位移值Table 1 The chemical shift value in B_1 and B_2

峰 Peak No.	化学位移 Chemical Shift				峰 Peak No.	化学位移 Chemical Shift				
	测得值 Exper. value		校正值 Corr. value			测得值 Exper. value		校正值 Corr. value		
	B_1	B_2	B_1	B_2		B_1	B_2	B_1	B_2	
1	102.15	102.26	103.0	103.1	10	71.261	73.367	72.93	74.64	
2	100.04	99.69	101.0	100.59	11	70.91	71.26	72.46	72.54	
3	99.81	98.70	100.7	99.9	12	70.442	70.79	72.11	72.07	
4	98.52	98.28	99.8	99.6	13	70.208	70.44	71.64	71.72	
5	78.86	78.97	80.14	80.2	14	69.623	70.20	71.41	71.48	
6	79.51	78.74	79.9	80.0	15	66.932	69.50	68.13	70.78	
7	76.99	78.51	78.30	79.8	16	61.198	66.69	62.4	67.97	
8	72.08	77.69	74.57	78.97	17	60.613	61.19	61.81	62.5	
9	71.73	74.30	73.28	75.58	18		60.84		62.0	

表中值在 15°C 下测得, 按文献(方积年, 1982, 1987)用校正因子 $\Delta\delta/\Delta T = 0.017$ 得到表中的校正值。所得数据较多, 分别说明。

异头碳区(98—103 ppm), B_1 与 B_2 均有四个峰, 结合文献比较如表 2。

从上表中可以看出 B_1 、 B_2 中 Man 主要以 1→2 方式存在, 均有侧键, 分支点在 6 位。 B_1 与 B_2 不同的是 B_1 中的 GLc 主要是(1→4)键形式, B_2 中的 GLc 主要为(1→3)形式。另外还可看出 GLc 的异头碳可能为 α 型。

表 2 中的 70—76 ppm 区为取代 C-2, C-3 和 C-4, C-5 区, 比较复杂, 不易解析。60—70 ppm 区为 6 位游离的或取代的 C-6 区, 解析如表 3。

由表 3 看到 B_1 的分支点残基的共振讯号强度增加比 B_2 多, 可估计 B_1 的支链比

表 2 B_1 , B_2 中的 C-1 的化学位移
Table 2 The chemical shift of C-1 in B_1 and B_2

	糖 单 位 Sugar unit	碳 原 子 Carbon atom	化 学 位 移 Chemical shift	文 献 值 reported ^[5, 3]
B_1	$\rightarrow 2)-\text{Man}-(1 \rightarrow$	C-1	103.0	103.0
	$\rightarrow 4)-\alpha-\text{D-Glc}- (1 \rightarrow$	C-1	101.0	101.0
	$\alpha-\text{D-Glc}- (1 \rightarrow$	C-1	99.8	
	$\rightarrow 2)-\text{Man}-(1 \rightarrow$ 6 \uparrow	C-1	100.7	100.2
	$\rightarrow 4)-\beta-\text{D-Glc}- (1 \rightarrow$	C-1		103.9
	$\alpha-\text{D-Man}-(1 \rightarrow$	C-1		103.7
B_2	$\rightarrow 2)-\text{Man}-(1 \rightarrow$	C-1	103.1	103.0
	$\rightarrow 3)-\alpha-\text{D-Glc}- (1 \rightarrow$	C-1	99.90	99.80
	$\alpha-\text{D-Glc}- (1 \rightarrow$	C-1	99.6	
	$\rightarrow 2)-\text{Man}-(1 \rightarrow$ 6 \uparrow	C-1	100.59	100.2
	$\rightarrow 3)-\beta-\text{D-Glc}- (1 \rightarrow$	C-1		103.9
	$\alpha-\text{D-Man}-(1 \rightarrow$	C-1		103.7

表 3 在 B_1 与 B_2 中 60-70 ppm 的化学位移
Table 3 The chemical shift of 60-70 ppm in B_1 and B_2

	糖 单 位 Sugar unit	碳 原 子 Carbon atom	化 学 位 移 chemical shft	文 献 值 reported ^[5, 3]
B_1	Glc-(n \rightarrow)	free. c-6	61.81	61.9
	Man-(n \rightarrow)	free. c-6	62.4	62.6
	$\rightarrow 2)-\text{Man}-(1 \rightarrow$ 6 \uparrow	subst. c-6	68.13	
B_2	Glc-(n \rightarrow)	free. c-6	62.0	61.9
	Man-(n \rightarrow)	free. c-6	62.5	62.6
	$\rightarrow 2)-\text{Man}-(1 \rightarrow$ 6 \uparrow	subst. c-6	67.97	

(其中 n 可为 1, 2, 3, 4)

B_2 的支链长。

2. $^1\text{H-NMR}$ 分析

B_1 与 B_2 的 H-NMR 谱图的有效数据为:

B_1 : 5.43 ppm, 5.13 ppm, 4.80 ppm。 B_2 : 5.44 ppm, 4.80 ppm。

参考文献得知 B_1 的 5.43 ppm 和 B_2 的 5.44 ppm 为 $\alpha-(1 \rightarrow 2)-\text{Man}$ 的 C-1 上质子的 δ 值, B_2 的 5.13 ppm 为 $\alpha-(1 \rightarrow 4)-\text{Glc}$ 上质子的 δ 值。

综合红外光谱与核磁共振谱, 再结合 B_1 和 B_2 摩尔比, 可得 B_1 , B_2 的结构单元如下(图 3):

B_1 , B_2 的 Glc, Man 构型均为 α -型。

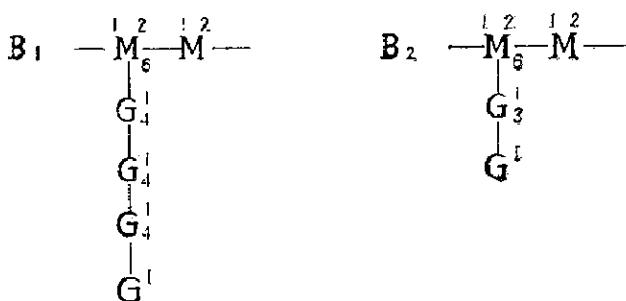


图3 B_1 和 B_2 的结构
Fig. 3 Structures of B_1 and B_2

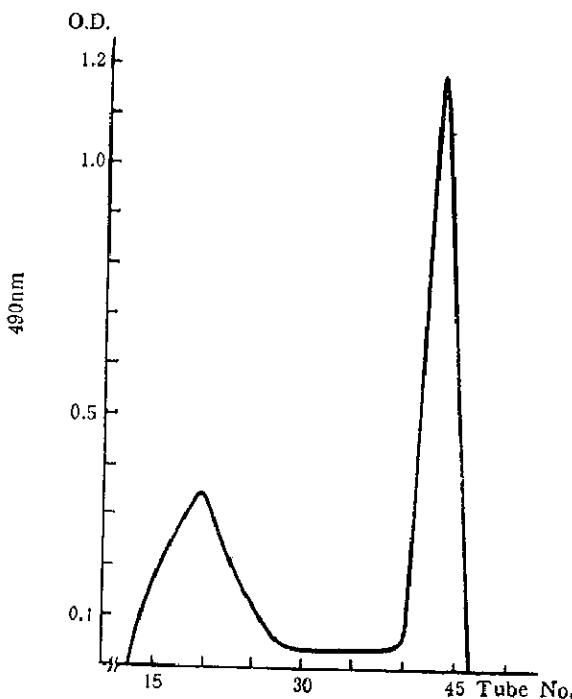


图4 B_1 经淀粉酶降解后在琼脂糖凝胶 4B 柱上层析
Fig. 4 Chromatogram of amylase degraded B_1 on Sepharose 4B column

3. 甲基化分析(见表 4)

说明 Glc 以 $(1\rightarrow 3)$ 键可能连接在侧链上。

5. 淀粉酶降解

经酶降解后重上琼脂糖凝胶 4B 柱检查,结果 B_1 得两个峰(图 4),第一峰较原多糖轻微后移,第二峰较大,说明 B_1 被降解,分子量减小,但主干并未破坏,说明 $1\rightarrow\text{Glc}$ 不在主干上(GC 分析第二峰仅为 Glc)。 B_2 经酶解则看不到明显降解。

综上实验结果及其一致性可得到 B_1B_2 的可能基本结构如下(图 5):

表 4 B₁ 与 B₂ 的甲基化分析Table 4 Methylation analyses of B₁ and B₂

	峰 数 peak No (scan)	甲基化糖 Methylated sugar	摩尔比 Molar ratio	离子碎片 (m/e) primary fragment (m/e)	键 型 Mode of linkages
B ₁	1(49)	2,3,4,6-G	1	43,45,71,87,101,117,129,145,161,205	1→
	2(82)	3,4,6-M	1	43,45,87,99,101,129,161,189	1→2
	3(96)	2,3,6-G	3	43,45,87,99,101,113,117,233	1→4
	4(131)	3,4-M	1	43,87,99,129,189	1→2,6
B ₂	1(158)	2,3,4,6-G	1	43,45,71,87,101,117,129,145,161,205	1→
	2(197)	3,4,6-M	1	43,45,87,99,101,129,161,189	1→2
	3(197)	2,4,6-G	1	43,45,87,101,117,129,161	1→3
	4(211)	2,3,6,-G	0.1	43,45,87,99,101,113,117,233	1→4
	5(258)	3,4-M	1	43,87,99,129,189	1→2,6

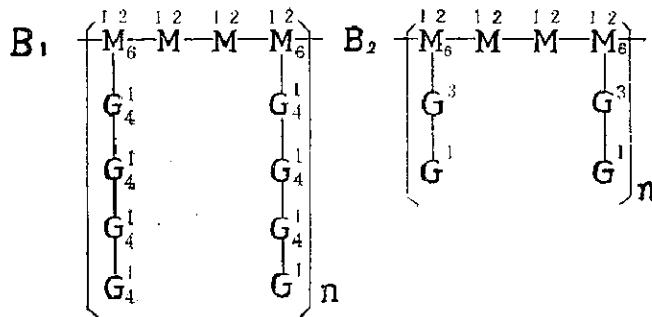


图 5

参 考 文 献

- [1] 陈素明, 许丹枫 (1986) 用 ¹³C 和 ¹H 核磁共振方法考察肠膜明串珠菌合成的右旋糖酐的结构。微生物学报 26(2): 160—163
- [2] 陈酉广, 张翼伸 (1990) 安络小皮伞中水溶性多糖的研究。真菌学报 9(2): 155—160
- [3] 方积年 (1982) ¹³C-NMR 在多糖结构分析上的应用。国外药学(抗生素分册) 2: 107—125
- [4] 方积年 (1987) ¹H 和 ¹³C-NMR 在多糖上的应用。复合多糖生化研究技术。上海科学技术出版社。150—154 页
- [5] 梁忠岩, 张翼伸 (1985) 碱提水溶斜顶菌多糖的分离鉴定与结构确定。东北师大学报(自然科学版) 4: 65—71

STUDY OF WATER SOLUBLE POLYSACCHARIDE FROM *MARASMIUS ANDROSACEUS* (L.:FR.)FR.— ISOLATION, PURIFICATION, AND STRUCTURAL STUDY OF B₁ AND B₂

BAI RI-XIA ZHANG YI-SHEN

(Department of Biology, Northeast Normal University, Changchun)

ABSTRACT The water soluble polysaccharides BB are isolated by alkaline extraction from the *Marasmius androsaceus* L. : Fr. residue after water extraction. Theirs homogeneity are proved by gel filtration on sepharose 4B and 2B column, ultracentrifugal analysis, cellulose acetate film electrophoresis. The structures of B₁ and B₂ have been determined by GC, IR, ¹³C-NMR, ¹H-NMR, periodate oxidation, Smith degradation, amylase degraded, methylation analysis, GS-MS etc.

KEY WORDS *Marasmius*; *Marasmius* polysaccharide