

利用光谱技术确定银耳多糖中糖醛酸的连接位点与连接方式

罗浩铭¹, 陈英红², 韩威³, 周婷婷², 姜瑞芝², 王颖^{2*}¹长春中医药大学, 长春 130117; ²吉林省中医药科学院中医药基础所; ³吉林天药科技有限公司, 长春 130012

摘要: 为确定银耳酸性杂多糖结构中糖醛酸的连接位点, 对银耳多糖进行了部分酸水解, 并采用 Sephadex LH-20 凝胶柱纯化, 得到银耳寡糖部分。对寡糖 PMP 衍生化后的 MSⁿ 分析表明, 该寡糖均为酸性糖, 主要含有银耳二糖和少量三糖, 结合组成糖、甲基化和 NMR 结果分析, β -D-葡萄糖醛酸残基作为非还原末端以(1 \rightarrow 2)-连接方式与甘露糖相连。

关键词: 银耳多糖; 部分酸水解; MSⁿ; NMR; 糖醛酸链接位点

中图分类号: Q932

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.1.007

Determination of Linked Site and Linkage of Uronic Acid in *Tremella fuciformis* Polysaccharide by Spectral Technique

LUO Hao-ming¹, CHEN Ying-hong², HAN Wei³, ZHOU Ting-ting², JIANG Rui-zhi², WANG Ying^{2*}

¹Changchun university of Chinese Traditional Medicine, Changchun 130117, China; ²Jilin Academy of Chinese Medicine and Material Medica Science; ³Natural Pharmatech Co., Ltd, Changchun 130012, China

Abstract: The aim of this study was to determine the binding site of uronic acid in the structure of *Tremella fuciformis* polysaccharide (TP). TP was partially acid hydrolyzed and further purified by Sephadex LH-20 column to afford oligosaccharide. The PMP derivative of oligosaccharide was analyzed by MSⁿ, the results showed that it was acidic saccharide (mainly disaccharide and minor trisaccharide). Combined with the results of sugar composition, methylation and NMR analysis, it was indicated that β -D-glucopyranosyluronic acid residue was linked to the α -D-mannopyranose by (1 \rightarrow 2)-linkage as non-reducing end.

Key words: *Tremella fuciformis* polysaccharide; partial acid hydrolysis; MSⁿ; NMR; linked site of uronic acid

银耳(*Tremella fuciformis*), 又称为白木耳, 为传统的药食两用真菌和滋补珍品被广泛应用^[1]。银耳中主要化学成分为酸性杂多糖, 因其具有免疫调节、抗肿瘤、抗衰老、降血糖血脂、抗凝血血栓、抗溃疡、促进蛋白质合成等多方面的生物活性^[2-4]被广泛关注。

银耳多糖结构较为复杂, 以往对其结构的研究多采用部分酸水解、组成糖分析、甲基化分析来推断。有文献报道^[5,6], 银耳多糖的平均结构为主链由(1 \rightarrow 3)-连接的甘露糖构成, 其中的木糖、葡萄糖、阿拉伯糖、岩藻糖和葡萄糖醛酸均位于侧链, 糖链接位点和方式一般根据甲基化后 GC-MS 检测出的碎片峰所占的比例, 再结合组成糖结果进行推断, 由于中性糖和酸性糖在甲基化过程中存在还原性难异的差异, 以及酸性糖的甲基化结果最终显示的是相对

应中性糖的碎片峰, 如葡萄糖醛酸经甲基化后是以葡萄糖的峰值出现, 这样对酸性糖的链接方式的判断容易出现误差。本研究采用将银耳酸性杂多糖经水解后的产物分离纯化出寡糖部分, 通过对寡糖进行 PMP 衍生化后的 ESI-MS² 检测, 可判断糖的非还原末端和糖的还原末端, 经甲基化分析及 NMR 结果的综合分析, 准确地确定了葡萄糖醛酸在银耳酸性杂多糖中的连接位点及连接方式, 该研究方法为银耳多糖结构的确定及其阐述构效关系具有十分重要的意义。

1 材料与仪器

银耳子实体(产自福建省古田县), 购自市场; 单糖标准品: 岩藻糖(Fuc, 批号 39F0008)、阿拉伯糖(Ara, 批号 240H0400)、木糖(Xyl, 批号 105C0006)、甘露糖(Man, 批号 SL08455)、葡萄糖(Glc, 批号 LB60595)、半乳糖(Gal, 批号 SL08403)及葡萄糖醛

酸(GlcA,批号 101K5309)均购自美国 Sigma 公司,半乳糖醛酸(GalA,批号 14068-200602)购自中国食品药品检定研究所;衍生化试剂:1-苯基-3-甲基-5-吡啶酮(PMP)和三氟乙酸(TFA)购自国药集团化学试剂有限公司;乙腈为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为国产分析纯。

LC-10AT 高效液相色谱仪(日本岛津),RID-10A 示差检测器(日本岛津);LC-2010C 高效液相色谱仪(日本岛津),SPD-M10A 检测器;LCQ 喷雾离子阱质谱仪(FTICRMS 7. OT, IonSpec, USA);Bruker AV600 型核磁共振仪;GC-MS(Trace-MS, Fingan, USA)。

2 实验方法

2.1 银耳多糖的水解与纯化

取银耳子实体 10 g,去蒂,加 20 倍量的水,煎煮两次,每次 6 h,合并滤液,浓缩至一定体积,加 5 倍量乙醇沉淀,静置过夜,离心(3000 rpm),沉淀加少量水溶解,冻干,得银耳粗多糖。

称取银耳粗多糖 200 mg,置具塞试管中,加 20 mL 2 mol/L TFA,100 °C 水解 8 h。加 0.3 mol/L NaOH 溶液调节 pH 至中性终止反应,浓缩后冻干,得银耳多糖水解产物。

取银耳多糖水解产物 100 mg,经 Sephadex LH-20 凝胶层析柱(Φ 2 cm \times 60 cm)分离纯化,以甲醇:水=3:7(v/v)为流动相,洗脱液通过部分收集器收集,采用苯酚-硫酸法间管监测,以吸收值(A)作为纵坐标,以收集管数作为横坐标,绘制曲线图。根据洗脱曲线分别合并洗脱液,浓缩后冻干,得银耳寡糖。

2.2 纯度与分子量分析

采用 HPLC,示差检测器,OHPaK SB-802.5HQ 凝胶色谱分析柱(8 mm \times 300 mm),流动相为 0.7% 硫酸钠溶液,流速:0.5 mL/min,柱温:35 °C,GPC 软件分析。

2.3 单糖组成分析

称取银耳寡糖 10 mg,置螺帽试管中,加入 2 mL TFA,置于 110 °C 烘箱中水解 15 h,加入 6 mL 0.5 mol/L 的 PMP 甲醇溶液和 5 mL 0.3 mol/L NaOH 溶液,混匀,70 °C 水浴反应 30 min,取出,冷却,加 5 mL 0.3 mol/L HCl 中和,等体积氯仿萃取,重复 3 次,取水层静置过夜作为 TPS-2PMP 衍生物。同时制备各

单糖 PMP 衍生物^[7]。

HPLC 色谱条件:色谱柱:Agilent C₁₈(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m);流动相:A—磷酸盐缓冲液(pH 6.8):乙腈=85:15(V/V),B—磷酸盐缓冲液(pH 6.8):乙腈=60:40(V/V);梯度洗脱比例在 0 min \rightarrow 10 min \rightarrow 50 min,A:92% \rightarrow 84% \rightarrow 60%;流速:0.9 mL/min;检测波长:250 nm;进样量 10 μ L。

2.4 串联质谱分析

取微量样品,加 2 μ L 去离子水,用 200 μ L 甲醇稀释后进行 MSⁿ 分析。质谱分别采用正、负离子模式,质量扫描范围 m/z:50-2000,样品通过流动注射泵进样,流速 4 μ L/min,电喷雾电压 4kV,毛细管温度 200 °C,鞘气为氮气,碰撞气为氦气,碰撞诱导解离(CID)的碰撞能量 20% ~ 30%。

2.5 甲基化分析

称取银耳寡糖 20 mg,置螺帽试管中,P₂O₅ 保干器中真空干燥 24 h,加入脱水 DMSO 0.5 mL,充氮气密封搅拌过夜。加入 0.5 mL NaOH-DMSO 混悬液,0.3 mL 碘甲烷,充氮气密封搅拌 15 min。加 2 mL 水终止反应。加 3 mL 氯仿,振荡离心,弃去水层,氯仿层加入 2 mL 水,振荡离心,弃去水层,重复此操作两次以洗脱氯仿层,吹干氯仿层。再进行水解、还原、乙酰化制备成部分甲基化部分乙酰化衍生物^[8]。

GC-MS 条件:HP5 石英毛细管柱(30 m \times 0.32 mm,0.25 μ m),进样口温度 250 °C。柱温 120 °C 保持 5 min,以 5 °C/min 升到 220 °C,保持 20 min。进样量 0.2 μ L。离子化模式:EI(70 kV)。数据分析采用美国 Fingan 公司的 Xcalibur 数据处理系统。

3 实验结果

3.1 银耳寡糖的纯化与 HPLC 分析

银耳多糖水解后,经 Sephadex LH-20 柱分离纯化,得到两部分,分别命名为 TPH-1 与 TPH-2(如图 1 所示)。纯度与分子量分析结果显示,此两部分均为单一峰,GPC 软件测定 TPH-1 与 TPH-2 的重均分子量分别为 493 Da 和 160 Da。由于 TPH-2 多为单糖或盐类成分,因此,下面仅对 TPH-1 做进一步的研究。

3.2 单糖组成分析

单糖组成分析结果显示(如图 2 所示),TPH-1 由甘露糖(Man)和葡萄糖醛酸(GlcA)组成,摩尔比

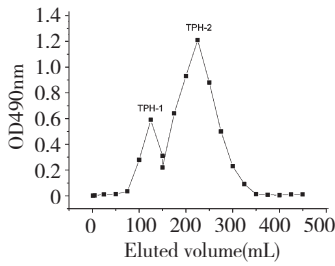


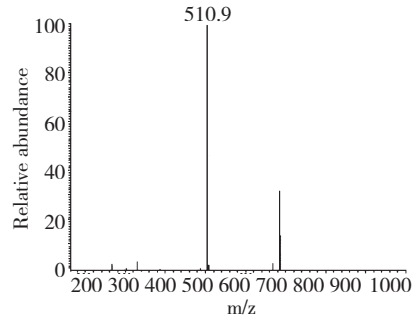
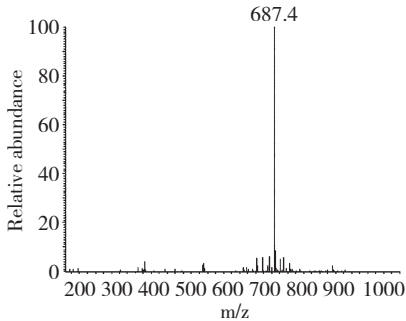
图1 Sephadex LH-20 洗脱曲线

Fig. 1 Elution profile of Sephadex LH-20

约为 1.3:1。

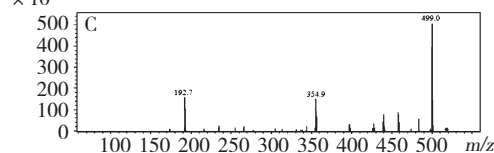
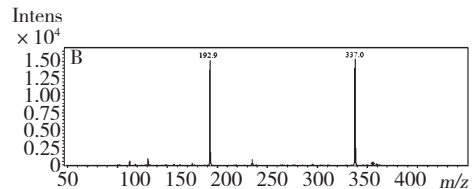
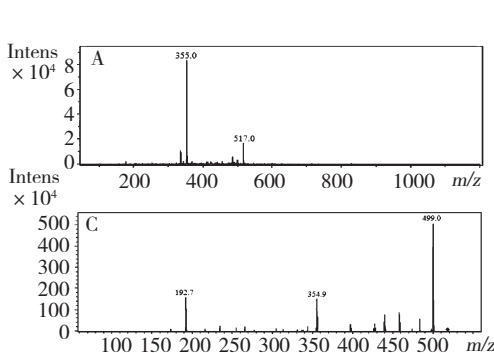
3.3 ESI-MS 分析

在 MS 分析中,为确定糖的还原末端和非还原末端,试验采用了 TPH-1 和衍生物 PH-1-PMP 两种样品进行测试对比。TPH-1-PMP 是由 TPH-1 经糖的还原末端与 PMP 连接后的衍生物,ESI-MS 结果

图3 TPH-1 的 PMP 衍生物正离子模式一级全扫描质谱图 (A) 及 m/z 687.1 的 MS^2 质谱图 (B)Fig. 3 Full-scan mass spectrum (A) and MS^2 mass spectrum of m/z 687.1 (B) of PMP derivative of TPH-1 in positive mode

试验对于样品 TPH-1 进一步通过负离子模式再次验证,结果见图4。在图4A中, m/z 355.0 ($[M-H]^-$) 为二糖 GlcA-Man 的分子离子峰,此结果与正离子模式相符。 m/z 517.0 为三糖 GlcA-Man-Man

的分子离子峰。对 m/z 355.0 进行 MS^2 ,见图4B,图中 m/z 337.0 为此二糖分子脱去一分子水而形成的 ($[M-H-H_2O]^-$) 分子离子峰, m/z 192.9 为 GlcA 分子离子峰。对 m/z 517.0 进行 MS^2 图(图4C),图中

图4 TPH-1 的负离子模式一级全扫描质谱图 (A)、 m/z 355.0 的 MS^2 质谱图 (B) 及 m/z 517.0 的 MS^2 质谱图 (C)Fig. 4 Full-scan mass spectrum (A), MS^2 mass spectrum of m/z 355.0 (B) and MS^2 mass spectrum of m/z 517.0 (C) of TPH-1 in negative mode

m/z 499.0 为三糖失去一分子水而形成的, m/z 354.9 为三糖失去一分子甘露糖而形成的, m/z 192.7 为 GlcA。此结果表明,TPH-1 不仅含有二糖,还含有三糖。

3.4 甲基化分析

TPH-1 的部分甲基化部分乙酰化衍生物进行

表1 GC-MS 分析结果

Table 1 Analysis results of GC-MS

保留时间 Retention time (min)	甲基化单糖 Methyl monosaccharide	摩尔比 Mole ratio
18.022	2,3,4,6-Me ₄ -Glc	3.9
19.858	3,4,6-Me ₂ -Man	4.6
20.088	2,4,6-Me ₂ -Man	1

3.5 NMR 分析

TPH-1 的¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) 和¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) 结果见表2, 结果显示, 在高场处(δ :5.22 ~ 4.45) 出现两个特征信号, 表明含有二糖。由 GlcA 的 H-1 与 H-2 耦合常数 $J_{1,2} = 7.8$

Hz, 可判断其异头碳为 β 构型。Man 的¹H 谱中 H-5 信号 δ :3.75 和¹³C 谱中 C-5 信号 δ :71.42, 表明 Man 异头碳为 α 构型。在¹³C 谱中, Man 的 C-2 向低场移动(δ :77.19), C-3 向高场移动(δ :68.31), 表明 Man 以(1 \rightarrow 2)-连接方式与 GlcA 相连。

表2 TPH-1 的¹H- and ¹³C-NMR 化学位移

Table 2 ¹H and ¹³C NMR chemical shifts of TPH-1

糖残基 Sugar residue	化学位移 Chemical shift (ppm)					
	H1	H2	H3	H4	H5	H6
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
β -GlcA-(1 \rightarrow	4.45	3.45	3.44	3.31	3.66	-
	100.45	70.66	74.13	71.19	74.82	174.73
-2)- β -Man	5.22	4.01	3.82 3.80	3.65	3.75	3.76 3.75
	90.97	77.19	68.31	65.85	71.42	59.36

综合上述结果, 可推断出二糖结构为 β -D-GlcA-(1 \rightarrow 2)- α -D-Man (如图5所示)。

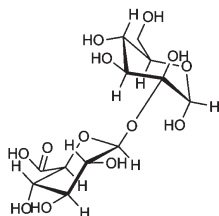


图5 二糖的化学结构

Fig. 5 Chemical structure of disaccharide

4 结论

银耳酸性杂多糖经水解分离纯化后得到银耳寡糖, 组成糖分析为由 GlcA 与 Man 组成, 通过多级串

联质谱分析, 确定此寡糖主要含有银耳二糖(GlcA-Man) 和少量的三糖(GlcA-Man-Man), 且还原末端为 Man。甲基化分析进一步确定了, 非还原末端为 GlcA, 且 GlcA 以(1 \rightarrow 2)-连接 Man 方式存在, (1 \rightarrow 3)-连接应为主链 Man 与 Man 的链接方式存在于结构中。NMR 测定结果表明, GlcA 异头碳为 β 构型, Man 异头碳为 α 构型, Man 以(1 \rightarrow 2)-连接方式与 GlcA 相连。因此, 在银耳多糖中 GlcA 作为非还原末端, 通过(1 \rightarrow 2)-连接方式与 Man 相连。

参考文献

- Zhao XN, Hu YL, Wang DY, *et al.* Optimization of sulfated modification conditions of tremella polysaccharide and effects of modifiers on cellular infectivity of NDV. *Int J Biol Macromol*, 2011, 49:44-49.

- 2 Kiho T, Morimoto H, Sakushima M, *et al.* Anti-diabetic activity of an acidic polysaccharide from the fruiting bodies of *Tremella aurantia*. *Biol Pharm Bull*, 1995, 18:1627-1629.
- 3 Kiho T, Morimoto H, Kobayashi T, *et al.* Effect of a polysaccharide (TAP) from the fruiting bodies of *Tremella aurantia* on glucose metabolism in mouse liver. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, 64:417-419.
- 4 Ma SY (马素云), He L (贺亮), Yao LF (姚丽芬). Research advances on structural characteristics and bioactivity of *Tremella fuciformis* polysaccharides. *Food Sci* (食品科学), 2010, 31:411-416.
- 5 Kiho T, Kobayashi T, Morimoto H, *et al.* Structural features of an anti-diabetic polysaccharide (TAP) from *Tremella aurantia*. *Chem Pharma Bull*, 2000, 48:1793-1795.
- 6 Jiang RZ (姜瑞芝), Chen HY (陈怀永), Chen YH (陈英红), *et al.* Structure and biological activity of *Tremella fuciformis* polysaccharide. *Chin J Nat Med* (中国天然药物), 2006, 4:72-75.
- 7 Yang XB (杨兴斌), Zhao Y (赵燕), Zhou SY (周四元), *et al.* Analysis of monosaccharide composition in angelica polysaccharides by precolumn derivatization high performance liquid chromatography. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2005, 33:1287-1290.
- 8 Wang HJ, Wei GD, Liu F, *et al.* Characterization of two homogalacturonan pectins with immunomodulatory activity from green tea. *Int J Mol Sci*, 2014, 15:9963-9978.

(上接第 171 页)

- 52 Jeong FIM, *et al.* Saponins from the roots of *Platycodon grandiflorum* stimulate osteoblast differentiation via p38 MAPK- and ERK-dependent Runx2 activation. *Food Chem Toxicol*, 2010, 48:3362-3368.
- 53 Cui L (催燎), *et al.* Preventing cancellous bone loss in steroid-treated rats and stimulating bone formation by water extract of *Salvia miltiorrhiza* and danshensu. *Chin Pharm Bull* (中国药理学通报), 2004, 20:286-291.
- 54 Dai JX (戴娟秀), *et al.* Study on the effects of ginseng water extraction to the bone mass of osteoporosis male rats model induced by D-galactose. *Chin J Gerontol* (中国老年学杂志), 2010, 30:784-785.
- 55 Li CM (李春梅), *et al.* The effect of cohosh extract to the osteoporosis in ovariectomized rats. *Chin Tradit Herb Drug* (中草药), 2005, 36:1686-1688.
- 56 Xu BL (许碧莲), *et al.* Preliminary study on mechanism of protective effect of taurine in NRK-52E cells induced by hypoxia/reoxygenation injury. *Chin Pharm Bull* (中国药理学通报), 2011, 27:965-970.
- 57 Cai WM (蔡伟明), *et al.* Effects of anti-osteoporosis of cucumber seeds polypeptide on rats. *Chin Hosp Pharm J* (中国医院药学杂志), 2011, 31:1333-1335.
- 58 Wu Y (吴鹰), *et al.* Effects of Geraniin on experimental osteoporosis and survival rate of osteoclast. *J Kunming Med Coll* (昆明医学院学报), 2006, 6(5):9-15.
- 59 Zeng GF (曾高峰), *et al.* Effect and mechanism of polysaccharide intervention in a rat model of osteoporosis. *Chin J Tissue Eng Res* (中国组织工程研究), 2012, 16:9471-9478.
- 60 Li YQ (李银清), *et al.* Prevention and therapeutic effect of Sika Deer velvet collagen hydrolysate on osteoporosis in ovariectomized rats. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2010, 22:578-581.
- 61 Gong W (龚伟), *et al.* Quality evaluation on different specifications of Cervi Cornu Pantotrichum with its effect on ovariectomized osteoporosis model rats. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2014, 39:2326-2329.
- 62 Cai JZ (蔡嘉振), *et al.* Observation on the clinical effects of Haigui Zhuanggu powder to 30 case geriatrics osteoporosis. *Asia Pacific Tradit Med* (亚太传统医药), 2014, 10:107-109.
- 63 Zhu J (祝捷), *et al.* Effects of bionic tiger bone on serum BGP and TRACP 5b in patients with primary osteoporosis. *Chin J Clin Health* (中国临床保健杂志), 2012, 12:162-165.
- 64 Jung WK, *et al.* Effect of chito ligosaccharides on calcium bioavailability and bone strength in ovariectomized rats. *Life Sci*, 2006, 78:970-971.