

[研究简报]

猴头菌寡糖的分离及其结构确定

姜瑞芝¹, 王颖², 陈英红¹, 高阳¹, 黄恩喜¹, 高其品³

(1. 吉林省中医中药研究院, 长春 130021; 2. 吉林大学生命科学学院, 长春 130023;
3. 长春中医药大学研发中心, 长春 130061)

关键词 猴头菌浸膏; 寡糖; 电喷雾多级串联质谱

中图分类号 O629; O657

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2007)07-1313-03

猴头菌(*Hericium erinaceu Pers*)属于担子菌门猴头菌科, 是名贵的药食兼用菌. 市场上已有的药品胃乐新冲剂是由猴头菌发酵浸膏制得的制剂, 对慢性萎缩性胃炎、胃溃疡等多种消化道疾病有较好的疗效^[1].

到目前为止, 对猴头菌活性成分的报道主要有多糖类^[2]和甾醇类^[3]化合物. 近年来, 我们采用中空纤维超滤, 将猴头菌浸膏分离成超滤内液和外液两部分, 理化性质测定和 HPLC 凝胶柱层析分析结果表明, 超滤内液为糖蛋白部分, 分子量分布在 $2.0 \times 10^4 \sim 7.8 \times 10^3$ 之间. 超滤外液为寡糖部分, 分子量分布在 $1.3 \times 10^3 \sim 3.0 \times 10^2$ 之间. LC-MS 分析结果进一步证明, 超滤外液为猴头菌寡糖的混合物. 猴头菌寡糖和糖蛋白两部分的活性实验结果表明, 猴头菌寡糖能较明显地改善动物胃粘膜病变, 并可以抑制胃固有腺体减少, 对慢性萎缩性胃炎具有显著的治疗作用, 且优于糖蛋白和胃乐新冲剂, 是一类重要的生物活性物质.

本文报道从猴头菌浸膏中分离出猴头菌二糖和三糖, 并确定了其化学结构.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂 高效液相色谱系统(日本岛津): 示差折光检测器, NUCLEOSIL100-5NH₂ 色谱分析柱(250 mm × 4.6 mm), 凝胶柱(分子量 10000), GPC 软件; Trace-MS 气质联用仪(美国 FINGAN); Finnigom MATLCQ 点喷雾质谱仪(San Jose, CA, USA), 喷雾电压 ±4.8 kV, 金属毛细管温度 200 °C, 壳气(N₂)流量 60 mL/min, 离子规压力 2.5×10^{-3} Pa, 流动注射泵进样, 进样量 2 μL/min, 中空纤维柱(截流分子量 10000)(北京旭邦膜设备有限责任公司).

猴头菌发酵浸膏(吉林大学白求恩医学部制药有限公司提供), 所用试剂均为分析纯.

1.2 猴头菌寡糖的制备 将 5 kg 猴头菌浸膏加 1 倍量的水稀释, 搅拌均匀, 加乙醇至乙醇体积分数为 80%. 离心, 收集沉淀, 干燥, 得猴头菌多糖 50 g. 将猴头菌多糖用 500 mL 蒸馏水溶解, 通过中空纤维柱, 分别收集超滤内液(32 g)和超滤外液(15 g).

1.3 总糖、蛋白质、糖醛酸的测定 采用苯酚-硫酸法^[4]、Lowry 法^[5]、间羟基联苯法^[4]分别测定超滤内液和外液的总糖、蛋白质、糖醛酸含量.

1.4 分子量分布测定 采用 HPLC 凝胶柱层析, 分别测定超滤内液和外液的分子量分布. 色谱条件: 样品质量浓度 5 mg/mL; 进样量 20 μL; 柱温 30 °C; 流速 0.5 mL/min; 流动相为质量分数为 0.7% 的 Na₂SO₄ 水溶液, 用 GPC 软件分析.

1.5 组分分析 采用 LC-MS 进行组分分析.

色谱条件: 样品浓度、进样量、柱温、流速均同上, 流动相: V(乙腈): V(水) = 67: 33.

1.6 猴头菌二糖和三糖的制备及组成糖(GC)分析 采用 HPLC 氨基柱分离, 富集纯化猴头菌二糖和

收稿日期: 2006-09-11.

基金项目: 国家科技部振兴东北老工业基地专项基金(批准号: 2004BA907A15)资助.

联系人简介: 高其品(1952 年出生), 男, 博士, 研究员, 从事多糖和寡糖研究. E-mail: gaoqipin@sina.com

三糖.

取 5 mg 猴头菌二糖和三糖各, 按完全酸水解方法^[4]操作, 通过与标准单糖 GC 色谱峰保留时间的比较, 确定寡糖中的单糖组成.

色谱条件: 质量分数为 1% 的 OV-225 填充柱(2 m); 进样器和检测器温度均为 250 °C; 柱温 195 °C; N₂ 气流速为 10 mL/min; 进样量 1 μL.

1.7 猴头菌二糖、三糖的甲基化(GC-MS)分析 取猴头菌二糖和三糖各 15 mg, 按改良的 Hakomori 法^[4]进行甲基化, 制成部分甲基化的乙酰化衍生物, 加入丙酮溶解, 进行 GC-MS 分析. 色谱条件: HP5 石英毛细管柱(30 m × 0.32 mm); 进样口温度 250 °C; 柱温程序升温 120 → 220 °C; 进样量 0.2 μL.

1.8 猴头菌三糖 ESI-MS 及 MSⁿ 分析 参考文献[6~9]方法, 取微量猴头菌三糖, 加 2 μL 去离子水, 用 200 μL 甲醇稀释后进行 ESI-MS 及 MSⁿ 分析.

2 结果与讨论

2.1 猴头菌寡糖的理化性质 超滤外液的总糖和蛋白质含量分别为 87% 和 2.1%. HPLC 凝胶柱层析结果表明, 超滤外液的分子量分布在 $1.3 \times 10^3 \sim 3.0 \times 10^2$ 之间. LC-MS 分析结果表明, 超滤外液是由猴头菌二糖~七糖组成的系列化合物, 而且猴头菌二糖、四糖、五糖均存在 2 个不同保留时间的相同分子离子峰, 说明有 2 种结构形式, 三糖和七糖均存在 1 种结构形式, 六糖有 3 种结构形式存在. 猴头菌二糖的组成糖及摩尔比[$n(\text{Glu}):n(\text{Man}) = 11:1$]分析结果表明, 两种二糖应存在 Glu-Glu 和 Glu-Man(或 Man-Glu)结构形式, 且两种形式之比为 5:1; 糖苷键的连接方式及摩尔比分析结果(表 1)表明, 两种猴头菌二糖的非还原末端均为 Glu, 而还原末端为 Glu 或 Man, 可排除 Man-Glu 的结构, 糖苷键存在 1→4 和 1→6 两种连接方式, 其摩尔比为 4.4:1. 根据组成糖的分析结果给出的两种结构的比例关系, 可确定 Glu-Glu 应为 1→4 连接, 即 Glu1→4Glu; 而 Glu-Man 应为 1→6 连接, 即 Glu1→6Man.

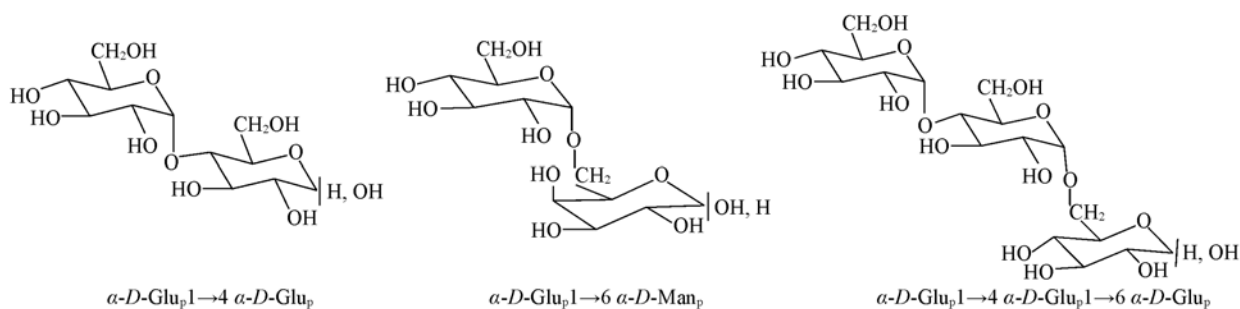
Table 1 Analysis of methylated dioligosaccharide and trioligosaccharide

Fragment	Dioligosaccharide configure	$n(\text{Glu-Glu}):n(\text{Glu-Mn})$	Trioligosaccharide configure	$n(\text{Glu-Glu}):n(\text{Glu-Mn})$
2,3,4,6-Me ₄	1→	5.32	1→	1.03
2,3,6-Me ₃	1→4	4.40	1→4	1.00
2,3,4-Me ₃	1→6	1.00	1→6	1.13

猴头菌三糖的组成糖分析结果表明, 三糖只由一种 Glu 糖组成. LC-MS 的分析结果显示出只有一个分子离子峰, 说明只存在一种结构形式; 甲基化结果表明, 三糖存在 1→4 和 1→6 两种糖苷键, 其摩尔比为 1:1, 所以三糖结构可为 Glu1→4Glu1→6Glu 或 Glu1→6Glu1→4Glu. 为了进一步确定三糖的结构, 进行了 ESI-MS 分析.

2.2 猴头菌三糖的 ESI-MS 分析 Domon 和 Costello^[10]对寡糖的质谱裂解规律进行了研究, 通过 ESI-MS³的序列结果确定寡糖的连接位点. 在猴头菌三糖的 ESI-MS³中, 可产生较多的碎片离子 Y₂(m/z 203), B₁(m/z 185), A₂(^{0.2}A₂: m/z 305, ^{0.4}A₂: m/z 245), 其中碎片离子 Y₂(m/z 203)为 C2 离子丢失 1 个六碳糖基碎片(质量数 162)产生的, 碎片离子 B₁(m/z 185)为 Y₂ 离子的互补离子, 其组成与 [Hex + Na]⁺(Hex 表示六碳糖基)相吻合. 因而, C 型和 B 型(或 Y 型)离子可给出寡糖连接序列的信息, 由猴头菌三糖的 m/z 527 离子的 C2 和 B₁碎片离子(或 Y₂ 离子)可推断出 [M + Na]⁺的序列及组成为 Hex-Hex-Hex, ^{0.2}A₃(m/z 305)离子碎片的出现, 可以推断还原末端的糖基不可能是 2 位连接. 同理, ^{0.4}A₂(m/z 245)离子的产生说明还原末端的糖不可能是 3 位或 4 位连接, 所以还原末端的糖只能是 6 位连接. 结合电喷雾多级串联质谱分析结果, 可以确定该三糖的连接方式为 Glu1→4Glu1→6Glu.

猴头菌二糖电喷雾多级串联质谱的分析结果与前面所推出的结构相同, 进一步证明了二糖是以 Glu1→4Glu 和 Glu1→6Man 两种连接形式存在. 结合对猴头菌中多糖和寡糖构型的研究^[4], 两种二糖和三糖的结构分别为 $\alpha\text{-D-Glu}_p\text{1} \rightarrow 4\alpha\text{-D-Glu}_p$, $\alpha\text{-D-Glu}_p\text{1} \rightarrow 6\alpha\text{-D-Man}_p$ 和 $\alpha\text{-D-Glu}_p\text{1} \rightarrow 4\alpha\text{-D-Glu}_p\text{1} \rightarrow 6\alpha\text{-D-Glu}_p$. 结构式分别为:



参 考 文 献

- [1] YANG Yan(杨炎), ZHOU Chang-Yan(周昌艳), BAI Yun-Qin(白韵琴), *et al.*. *Mycosystem*(菌物系统)[J], 2001, **20**(3): 397—402
- [2] YANG Yong-Jie(杨勇杰), JIANG Rui-Zhi(姜瑞芝), CHEN Ying-Hong(陈英红), *et al.*. *Natural Product Research and Development* (天然产物研究与开发)[J], 2004, **16**(3): 194—197
- [3] LI Jie-Li(李洁莉), LU Ling(陆玲), DAI Chuan-Chao(戴传超), *et al.*. *Chin. J. Chin. Mat. Med.* (中国中药杂志)[J], 2001, **26**(12): 831—834
- [4] ZHANG Wei-Jie(张惟杰). *Biochemical Research Techniques of Complex Carbohydrate*(糖复合物生化研究技术)[M], Hangzhou: Zhejiang University Publishing House, 1999: 11—12; 21; 40; 142
- [5] LI Jian-Wu(李建武), XIAO Neng-Geng(萧能赓), YU Rui-Yuan(余瑞元). *Theories and Methods of Biochemical Experiment*(生物化学实验原理方法)[M], Beijing: Beijing University Publishing House, 1994
- [6] Duffin K. L., Welply J. K., Huang E., *et al.*. *Anal. Chem.* [J], 1992, **64**: 1440—1448
- [7] GUO Ming-Quan(郭明全), SONG Feng-Rui(宋凤瑞), CHEN Mao-Lian(陈貌连), *et al.*. *Chem. J. Chinese Universities*(高等学校化学学报)[J], 2003, **24**(9): 1577—1581
- [8] Solouki T., Reinhold B. B., Costello C. E., *et al.*. *Anal. Chem.* [J], 1998, **70**: 857—864
- [9] Fura A., Leary J. A.. *Anal. Chem.* [J], 1993, **65**: 2805—2811
- [10] Domon B., Costello C. E.. *Glycoconjugate J.* [J], 1998, **5**: 397—40

Separation and Structural Identification of *Hericium Erinaceur* Oligosaccharide

JIANG Rui-Zhi¹, WANG Ying², CHEN Ying-Hong¹, GAO Yang¹, HUANG En-Xi¹, GAO Qi-Pin^{3*}

(1. *Academy of Chinese Medicine and Material Medical of Jilin Province, Changchun 130021, China;*

2. *School of Life Science, Jilin University, Changchun 130023, China;* 3. *Chinese Medicine and Material Medical University of Changchun, Centre of Study and Development, Changchun 130062, China)*

Abstract It has been reported that the polysaccharide is the main active constituent of *Hericium erinaceur*. A series of oligosaccharide (mixtures of disaccharide and heptasaccharide of *Hericium erinaceur*) were separated from *Hericium erinaceur* by empty-fibrin filtration. Disaccharide and trisaccharide were purified *via* HPLC with NH₂ column. Component sugars and glycosidic linkage ways were analysed *via* GC and GC-MS. Electrospray ionization tandem mass spectrometry (MSⁿ) was used for the oligosaccharides structure study and the result shows that the disaccharide has two kind of structural styles and trisaccharide has one kind of structural style.

Keywords *Hericium erinaceur*; Oligosaccharide; Electrospray ionization tandem mass spectrometry

(Ed.: H, J, Z)