

南海海洋红树林真菌 2560 号多糖 A2 的研究^{*}

陈东森¹, 余志刚¹, 郭志勇¹, 林永成¹, 刘晓红¹, 尹文清¹, 陆慧宁²

(1. 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275;

2. 中山大学测试中心, 广东 广州 510275)

摘要: 从南海海洋红树林真菌 2560 号真菌的菌体中提取到多糖 A2, 通过完全酸水解、糖腈乙酸酯衍生化以及 GC/MS 研究分析表明, A2 多糖由岩藻糖、木糖、甘露糖、葡萄糖以及半乳糖组成, 摩尔比为 2:2:17:5:2。

关键词: 多糖; 糖腈乙酸酯衍生化; 红树林真菌

中图分类号: O636.1 文献标识码: A 文章编号: 0529-6579 (2004) 04-0124-02

多糖作为天然大分子同核酸、蛋白质一样广泛存在于陆地和海洋生物中。在已发现的海洋生物活性物质中, 多糖是其中一大类重要物质。人们已从海洋动物、海藻、海洋微生物等海洋生物中发现大量多糖化合物。由于海洋生态环境与陆地不同, 海洋生物多糖与陆地生物多糖有差异, 且资源丰富, 是开发新药的宝贵源泉, 同时也是揭示多糖在生命活动过程中作用的切入点, 也为糖的化学和生物学研究提供了可贵的资料来源^[1]。有文献报道真菌多糖有体外以及体内抗肿瘤、抗突变、降血糖、抗病毒、抗氧化、抗辐射等等作用^[2-4]。所以真菌多糖目前具有开发成为新药的巨大潜力。从海洋真菌 2560 号里面分离得到一种新的多糖 A2, 并对该多糖进行单糖组分分析。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂 美国 Finnigen 公司 Vayager GC/MS 气相色谱质谱连用仪; 三氟乙酸为 Merck 公司产品; Sephadex gel-75 为 Sigma 公司产品; 盐酸羟胺 (AR、广州化学试剂厂); 乙酸酐 (AR、广东汕头新宁化工厂); 三氯甲烷 (AR、天津市百世化工有限公司); D 葡萄糖、D 木糖、L 鼠李糖 (中国医药集团上海化学试剂公司); D 来苏糖 (Sigma 公司); D 半乳糖、D 甘露糖 (上海试剂二厂); L 岩藻糖 (Fluka 公司); 吡啶 (AR、天津市大茂化学试剂厂); 2560 号菌种由香港城市大学 Vriegoed 和 Jones 教授提供, 由尹文清培养, 经热甲醇脱脂, 得到干燥的菌体。

1.2 分离提取 取 200 g 已经脱脂的干燥菌体, 用粉碎机粉碎, 用热水浸提 8 次, 合并 8 次提取液,

浓缩、抽滤滤去沉淀, 加 3 倍体积乙醇沉淀多糖, 于冰箱放置过夜, 离心收集沉淀。用去离子水充分溶解, 调节 pH 值 9~10, 加 1/10 体积 $\varphi=30\%$ 的双氧水, 氧化脱色, 于室温放置 3 d, 并保持 pH 值 9~10, 直到无气泡放出为止; 以 Sevag 法脱蛋白 12 次; 加 1 倍体积乙醇沉淀多糖, 于冰箱过夜, 离心收集沉淀。沉淀经 $\varphi=95\%$ 乙醇、无水乙醇、丙酮、无水乙醚脱水, 得到浅黄色的粗多糖。

1.3 纯化 称取 80 mg 浅黄色的粗多糖溶解于 2 mL 二重蒸馏水, 过 Sephadex G 75 凝胶柱, 以硫酸—苯酚法检测, 收集主峰部分, 冷冻干燥得到白色蓬松状 A2 多糖。

1.4 酸水解以及糖腈乙酸酯衍生化^[5] 称取 3 mg 冷冻干燥的多糖 A2, 加入 3 mL 2 mol/L 三氟乙酸溶解, 封管于 120 °C 水解 3 h, 减压蒸干, 分别用 1 mL 二重蒸馏水洗涤 3 次, 减压蒸干。分别于装有 10 mg 标准单糖和已水解的多糖 A2 的 25 mL 小圆底烧瓶中加入 10 mg 盐酸羟胺、0.5 mL 吡啶, 于 90 °C 水浴中加热 30 min 并不断振荡。取出冷却到室温, 加入 0.5 mL 乙酸酐, 于 90 °C 继续反应 30 min 进行乙酰化, 冷却到室温, 减压蒸馏至溶剂不能被蒸出来为止, 加入 2 mL 二重蒸馏水破坏乙酸酐, 分 3 次加入 9 mL 氯仿萃取, 每次 3 mL, 合并氯仿层, 减压蒸至剩有少量液体为止, 就可进行 GC/MS 分析。GC/MS 结果见图 1。

1.5 GC/MS 条件 取上清液 0.6 μ L 进样。GC 条件: INNOWAX 石英毛细管柱 (0.25 mm $\times$ 30 m), 进样口温度 220 °C, 程序升温 200 °C, 保持 3 min, 以 8 °C/min 升至 240 °C, 保持 0 min, 以 12 °C/min

^{*} 收稿日期: 2004-04-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20072058); 广东省自然科学基金重点基金资助项目 (021732); 国家科技攻关 863 资助项目 (2003AA624010); 广东省重大专项资助项目 (2003A3040501)

作者简介: 陈东森 (1979 年生), 男, 硕士研究生; 通讯联系人: 林永成, 余志刚; E-mail: ceslyc@zsu.edu.cn

升至 260 ℃, 保持 0 min。MS 条件: 接口 235 ℃, 离子源 EI⁺, Energy: 70 eV, 检测器电压: 500 V, 质谱扫描 19.00 ~ 447.00。对标准单糖和多糖 A2 酸水解后的单糖的糖腈乙酸酯衍生物进行 GC MS 分析。

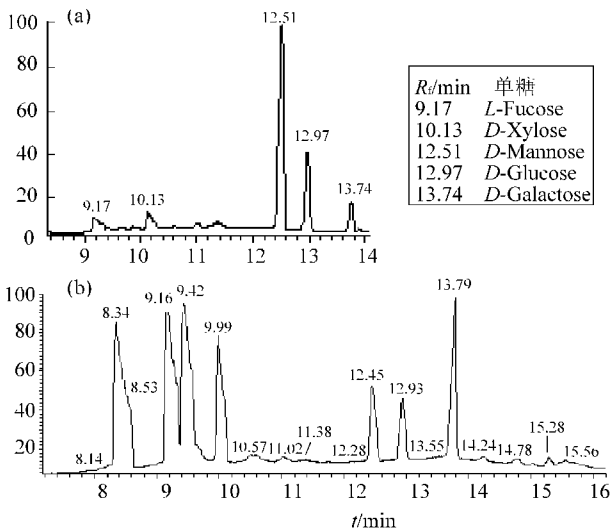


图 1 A2 水解后糖腈乙酸酯衍生物 (a) 和各种标准单糖 (b) 的 GC 总离子图

Fig 1 GC of aldonitrile acetate derivatives after acidic hydrolysis (a) and moncarbohydrates as standard (b)

2 结果与讨论

多糖水解后进行衍生化的方法有多种, 如三甲基硅醚衍生化、糖腈乙酸酯衍生化、糖醇乙酸酯衍生化等, 曾用三甲基硅醚化衍生物进行多糖组分的测定^[6], 三甲基硅醚衍生化后的衍生物相对容易气化, 但是由于单糖在衍生化时会出现 α 和 β、呋喃、吡喃构型及其直链构型等 5 种异构体, 因此在质谱中每种单糖就可能有 1 ~ 5 个峰, 所以多种单糖的异构峰会重叠在一起, 也就有可能对测试的结

果有影响。单糖的糖腈乙酸酯衍生化只是出现一个峰, 所以根本不存在这种问题, 也就是刚好能解决三甲基硅醚化衍生物所带来的问题, 因而分析测试的结果相对比较准确。但是糖腈乙酸酯衍生化也存在一个问题, 就是数据库里面的数据有的时候不能正确解出每个峰对应的是哪种糖腈乙酸酯, 所以在进行该实验的时候, 必须先对标准糖进行 GC MS 分析, 找到一个条件使得每个不同标准糖的糖腈乙酸酯衍生物的出峰时间不同, 并确定每个不同的标准糖的糖腈乙酸酯衍生物的出峰时间, 然后再对经酸水解后的 A2 糖腈乙酸酯化后的糖腈乙酸酯衍生物进行 GC MS 分析, 通过和不同标准糖的糖腈乙酸酯衍生物的出峰时间对比就可以得出多糖 A2 是由哪些单糖组成。这样就可以得出正确的结果。

由图 1 的分析结果表明, 多糖 A2 由岩藻糖、木糖、甘露糖、葡萄糖以及半乳糖组成, 它们的摩尔比分别为 2 : 2 : 17 : 5 : 2。

参考文献:

[1] 林永成. 海洋微生物及其代谢产物[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 354—360.

[2] 余志刚, 胡谷平, 等. 南海红树林真菌(1356 号) 真菌多糖的分离提取及甲醇解研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2001, 40(6): 123—124.

[3] 周永. 055 多糖类抗肿瘤作用的研究进展[J]. 国外医学卫生学分册, 2002, 28(3): 129—132.

[4] 王常青, 等. 多糖的生物活性及其研究进展[J]. 山西食品工业, 1995, 2: 16—18.

[5] 张维杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 第 2 版. 杭州: 浙江大学出版社, 1999.

[6] 郭志勇, 余志刚, 陈东淼, 等. 南海海洋红树林种子内生真菌 2508 号多糖 G-22a 的研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2003, 42(4): 127—128.

The Polysaccharide A2 from the Marine Mangrove Endophytic Fungus No. 2560 from the South China Sea

CHEN Dong miao¹, SHE Zhi gang¹, GUO Zhi yong¹, LIN Yong cheng¹,
LIU Xiao hong¹, YIN Wen qing¹, LIU Hui ning²

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China;
(2. Instrumental Analysis and Research Center, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: A polysaccharide A2 from mangrove endophytic fungus No. 2560 from the South China Sea was isolated. Analyses by complete acid hydrolysis and aldonitrile acetate derivatives and GC MS indicated that it was composed of L fucose, D xylose, D mannose, D glucose, and D galactose with molar ratio of 2 : 2 : 17 : 5 : 2.

Key words: ploysaccharide; aldonitrile acetate; marine mangrove fungus