

## 茯苓菌丝体多糖的分离及结构分析\*

丁 琼 张俐娜\*\*

张志强

(武汉大学化学系 武汉 430072) (香港中文大学生物系 香港)

**摘 要** 由茯苓菌种在培养基中于 25℃ 下培养一周得茯苓菌丝体. 分别用 0.9% NaCl 水溶液、热水、0.5mol/L NaOH 和 88% 甲酸从该茯苓菌丝体中提取出四种多糖, 编号为 PCM1, PCM2, PCM3 和 PCM4. 用红外光谱(IR), 高效液相色谱(HPLC), 气相色谱(GC)及<sup>13</sup>C-核磁共振(<sup>13</sup>C-NMR)等方法分析了它们的组成和结构. 结果表明, PCM1, PCM2 为酸性杂多糖由 D-鼠李糖、D-木糖、D-甘露糖、D-半乳糖、D-葡萄糖及葡萄糖醛酸组成. PCM3 主要为线型 β-(1→3)-D-葡聚糖, 其产率占茯苓菌丝体总量的 55.8%. PCM4 由 D-葡萄糖和葡萄糖醛酸组成. 茯苓菌丝体化学组成和结构基本同于茯苓菌核多糖, 随提取过程进行葡萄糖含量逐渐增加的变化规律也相同.

**关键词** 茯苓菌丝体, 多糖结构, NMR

茯苓属担子菌纲真菌, 作为我国传统中药, 具利尿, 安神, 益脾等药用价值. 通过真菌的菌丝体培养生产药物不仅能充分利用农业副产品, 促进资源循环, 而且可以减少化学制药中的环境污染问题, 是环境友好材料——再生资源利用与开发的一个重要发展方向. 近年已报道, 茯苓中提取的茯苓多糖或茯苓异多糖具有促进细胞分裂、补体激活<sup>[1]</sup>、抗诱变<sup>[2]</sup>、抗肿瘤<sup>[3,4]</sup>、抗癌<sup>[5]</sup>、增强免疫性<sup>[6]</sup>等生物活性.

从茯苓菌核中提取的 β-(1→3)-D-葡聚糖, 含少量(1→6)链接的 D-葡聚糖支链<sup>[7,8]</sup>. 而 Kanayama 等从茯苓菌丝体中分离出的四种多糖有三种是由葡萄糖、半乳糖、木糖、甘露糖组成的杂多糖, 只有一种是 β-(1→3)-D-葡聚糖, 且含较多(1→6)链接的 D-葡聚糖基支链(4:1)<sup>[9]</sup>. 然而, Narui 等报道从茯苓菌丝体中分离出的多糖与天然菌核中的多糖结构几乎相同, 主要为 β-(1→3)-D-葡聚糖, 带少量支链<sup>[10]</sup>. 我们从新鲜茯苓菌核中提取出五种多糖, 其中三种是由 D-葡萄糖、D-木糖、D-甘露糖和 D-半乳糖组成, 一种为线型 β-(1→3)-D-葡聚糖, 占茯苓菌核总量 51%, 其重均分子量  $M_w$  为  $9 \times 10^4$ <sup>[11-13]</sup>, 另一种为含少量支链和葡萄糖醛酸的 β-(1→3)-D-葡聚糖<sup>[14]</sup>. 本文试图从实验室培养的茯苓菌丝体中分离出各种多糖, 对其组成和结构进行分析, 并与茯苓菌核多糖进行比较.

## 1 实验部分

### 1.1 茯苓菌丝体的培养

按照文献[9]的方法培养菌丝体. 茯苓菌种购自华中农业大学. 培养基组成为 D-葡萄糖(25g), 玉米浆(7mL), 酵母膏(3.2g), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(1g), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O(0.5g), CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O(0.06g), 柠檬酸铁(5mg), MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O(5mg), ZnCl<sub>2</sub>(4mg), 维生素 B1(0.1mg), 蒸馏水(1L). 菌种接种后于 25℃ 培养 7 天后, 过滤收集菌丝体, 用冷水洗涤 5 次, 然后在 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 存在下真空干燥, 干菌丝体粉碎后得到茯苓菌丝体黄色粉末.

### 1.2 茯苓菌丝体多糖的分离和纯化

茯苓菌丝体粉末分别以乙酸乙酯、丙酮进行索氏提取 4h, 除去脂肪, 然后将它浸在 0.9% NaCl 水溶液中过夜, 经匀浆, 离心并重复三次, 上层清液编号为 PCM1 多糖. 剩余的残渣在高压锅中于 120℃ 提取 30min, 离心并重复三次, 清液为 PCM2 多糖. 用 0.5mol/L NaOH 水溶液于 4℃ 从以上残渣中提取清液, 并用 36% 乙酸中和得白色胶状沉淀, 用水洗涤得到 PCM3 多糖. 最后剩余的残渣用 88% 甲酸提取后用水沉淀, 得到 PCM4 多糖. 每种多糖按以前报道的方法<sup>[15]</sup>进一步纯化, 然后冷冻干燥制得多糖纯品. PCM1 和 PCM2 为棕色粉末, PCM3 和 PCM4 为白色粉末. 经紫外分光光度计(UV-160Shimadzu, 日本)检测这些多糖仅在 200nm 处有多糖特征峰, 无蛋白质

\* 1999-01-08 收稿, 1999-03-16 修稿; 国家自然科学基金和香港 PGC 基金资助课题(基金号 29374170 和 CUHK 4161/99M); \*\* 通

讯联系人



的单糖组分通过与单糖标样的图谱对比以及其 MS 谱确定, 它们的组成和含量结果汇集于表 1. PCM1, PCM2 主要由 *D*-鼠李糖、*D*-岩藻糖、*D*-木糖、*D*-甘露糖、*D*-半乳糖、*D*-葡萄糖/葡萄糖醛酸组成, 与 Kanayama 所报道的茯苓菌丝体多糖<sup>[9]</sup>以及前文报道的茯苓菌核多糖<sup>[14]</sup>相比, 除 *D*-鼠李糖、*D*-岩藻糖外, 其它组成类似. PCM3, PCM4 主要为 *D*-葡聚糖. 随提取过程的进行, 各种多糖的 *D*-葡萄糖含量逐渐增加, 与茯苓菌核多糖的规律相同. 图 3 示出茯苓菌丝体四种多糖的 HPLC 谱图. HPLC 分辨率不如 GC, 故部分单糖组分被

包在其它单糖峰内.

图 4 为 PCM3 的 <sup>13</sup>C-NMR 谱. PCM3 的化学位移与对照试样 Curdlan(一种线型  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-*D*-葡聚糖, Sigma 公司),  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-*D*-葡聚糖 PC3 在 DMSO 中的 <sup>13</sup>C-NMR 谱<sup>[11]</sup>, 完全切除支链后的线型  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-*D*-葡聚糖在 DMSO 中的数据<sup>[18]</sup>, 以及线型  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-*D*-葡聚糖的固体 NMR 谱<sup>[19]</sup>十分接近(比较结果见表 2), 由此确定 PCM3 为线型  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-*D*-葡聚糖, 与茯苓菌核多糖 PC3 的化学结构相同.

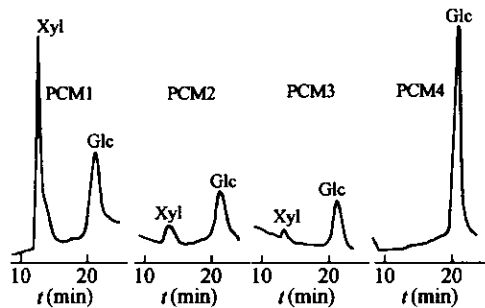


Fig. 3 HPLC traces of polysaccharides from *poria cocos* mycelia  
Xyl: xylose; Glc: glucose

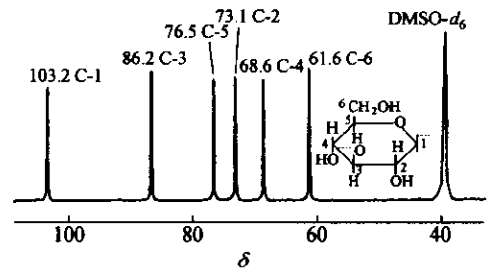


Fig. 4 <sup>13</sup>C-NMR spectrum of PCM3 in DMSO-*d*<sub>6</sub> solution

Table 2 <sup>13</sup>C-NMR chemical shifts of several polysaccharides

| Sample           | Chemical shift |      |      |      |      |      | Source    |
|------------------|----------------|------|------|------|------|------|-----------|
|                  | C-1            | C-2  | C-3  | C-4  | C-5  | C-6  |           |
| PCM3             | 103.2          | 73.1 | 86.2 | 68.6 | 76.5 | 61.6 | This work |
| Curdlan          | 102.9          | 72.6 | 86.1 | 68.2 | 76.1 | 60.8 | This work |
| PC3              | 103.0          | 72.8 | 86.2 | 68.4 | 76.3 | 60.9 | [11]      |
| Debrached glucan | 102.9          | 72.8 | 86.2 | 68.3 | 76.2 | 60.8 | [18]      |
| Pachyman         | 103.6          | 73.2 | 89.3 | 69.3 | 75.0 | 61.6 | [19]      |

最近, 用光散射法测得茯苓菌丝体葡聚糖 PCM3 的重均分子量  $M_w$  为  $1.68 \times 10^5$ , 分散系数  $d$  为  $1.9^{[20]}$ , 均高于茯苓菌核的 PC3 ( $M_w = 9.15 \times 10^4$ ,  $d = 1.8$ )<sup>[12]</sup>, 由此表明不同来源提取

的茯苓多糖化学结构基本相同但分子量不同. 文献中报道的茯苓多糖分子量相差较大, 主要归结为茯苓葡聚糖在水溶液中易形成不同尺寸的聚集体<sup>[12~14]</sup>, 此外这也与它不同的来源有关.

## REFERENCES

- 1 Yamada H, Kiyohara H, Takemoto N, Zhao J, Kawamura H, Komatsu Y, Cyong J C, Aburada M, Hosoya E. *Planta Med*, 1992, 58(2): 166~170
- 2 Nunoshita T, Ohtsuka A, Nishioka H, Suemitsu R. *Sci Eng Rev Doshisha Univ*, 1990, 30(4): 266~272
- 3 Hamuro J, Maeda Y Y, Arai Y, Fukuoka F, Chihara G. *Chem Biol Interactions*, 1971, 3(1): 69~71
- 4 Chihara G, Hamuro J, Maeda Y, Arai Y, Fukuoka F. *Nature*, 1970, 225: 943~944
- 5 Japan Synthetic Rubber Co Ltd, Jpn Kokai Tokkyo Koho, JP 82 38, 794(CI C07G1/00). 1982-03-03
- 6 Wang S X, Wen Y Y, Hu C X. *Phytother Res*, 1995, 9(6): 448~451

- 7 Saito H, Misaki A, Harade T. *Agr Biol Chem*, 1968, 32(10): 1261 ~ 1269.
- 8 Hoffman G C, Simson B W, Timell T E. *Carbohydr Res*, 1971, 20(11): 185 ~ 188
- 9 Kanayama H, Adachi N, Fukai Y. *Yakugaku Zasshi*, 1986, 106(3): 199 ~ 205
- 10 Narui T, Takakashi K, Kobayashi M, Shibata S. *Carbohydr Res*, 1980, 87: 161 ~ 163
- 11 Zhang L, Ding Q, Zhang P, Feng H. *Chem J Chinese Univ*, 1997, 6: 990 ~ 993
- 12 Ding Q, Jiang S, Zhang L, Wu C. *Carbohydr Res*, 1998, 308: 339 ~ 343
- 13 Zhang L, Ding Q, Zhang P, Zhu R, Zhou Y. *Carbohydr Res*, 1997, 303: 193 ~ 197
- 14 Zhang L, Ding Q, Meng D, Ren L, Yang G, Liu Y. *J Chromatogr A*, 1999, 839: 49 ~ 55
- 15 Zhang L, Yang L, Ding Q, Chen X. *Carbohydr Res*, 1995, 270: 1 ~ 10
- 16 Blakeney A B, Harris P J, Henry R J, Stone B A. *Carbohydr Res*, 1983, 113: 291 ~ 299
- 17 Bitter T, Muir H M. *Anal Biochem*, 1962, 4: 330 ~ 334
- 18 Misaki A, Kakuta M, Sasaki T, Tanaka M, Miyaji H. *Carbohydr Res*, 1981, 92: 115 ~ 129
- 19 Saito H, Taketa T, Sasaki T, Yoshioka Y. *Bull Chem Soc Jpn*, 1986, 59: 2093 ~ 2101
- 20 Ding Q, Zhang L, Wu C. *J Polym Sci: Part B: Polym Phys*, 1999, 37: 3201 ~ 3207

## ISOLATION AND STRUCTURAL ANALYSIS OF POLYSACCHARIDES FROM PORIA COCOS MYCELIA

DING Qiong, ZHANG Lina

(Department of Chemistry, Wuhan University, Wuhan 430072)

CHEUNG Peter Chi Keung

(Department of Biology, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong)

**Abstract** The poria cocos mycelia samples were cultured in media at 25℃ for one week. Four polysaccharides coded as PCM1, PCM2, PCM3 and PCM4 were isolated from the poria cocos mycelia by using 0.9% NaCl aqueous solution, hot water, 0.5mol/L NaOH aqueous solution and 88% formic acid, respectively. The components and structure of the polysaccharides were analyzed by infrared, gas chromatography, high performance liquid chromatography and <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance. The results show that PCM1 and PCM2 consist of D-rhamnose, D-fucose, D-xylose, D-mannose, D-galactose, D-glucose and D-glucuronic acid, and the D-glucose content increases with the progress of isolation. PCM3 is mainly linear β-(1→3)-D-glucan and the major fraction of polysaccharides from the poria cocos mycelia (yield 55.8%). PCM4 is composed of D-glucose with a few glucuronic acids. It is summarized that the component and structure of the polysaccharides from poria cocos mycelia are similar to those from poria cocos sclerotium.

**Key words** Poria cocos mycelia, Polysaccharide, Structure, <sup>13</sup>C-NMR