

香菇子实体中单核苷类成分研究

唐庆九¹, 王淑蕾^{1,2}, 王晨光¹, 刘艳芳¹, 张忠¹, 周帅^{*1}, 梁敬钰²

(1. 上海市农业科学院 食用菌研究所, 上海 201403; 2. 中国药科大学 中药学院, 江苏 南京 210009)

摘要: 以离子交换柱层析为主要手段从香菇子实体的水提取物中分离得到 6 个单核苷类化合物, 经 EI-MS、¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 鉴定分析, 这 6 个化合物分别是: 尿苷、尿嘧啶、鸟苷、香菇嘌呤、腺苷和腺嘌呤, 其中腺嘌呤为首次从香菇中分离得到, 香菇嘌呤的核磁数据首次得到全面归属。

关键词: 香菇; 单核苷类化合物; 离子交换柱层析; 腺嘌呤; 香菇嘌呤

中图分类号: S 646.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2017)03-0283-04

Studies on Mononucleoside Components of *Lentinula edodes* Fruiting Bodies

TANG Qingjiu¹, WANG Shulei^{1,2}, WANG Chengguang¹, LIU Yanfang¹,
ZHANG Zhong¹, ZHOU Shuai^{*1}, LIANG Jingyu²

(1. Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China; 2. Traditional Chinese Medicine College, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: Six compounds were isolated and purified from aqueous extract of *Lentinula edodes* fruiting bodies by ion exchange column chromatography. These compounds were identified as uridine, uracil, guanosine, eritadenine, adenosine and adenine by EI-MS, ¹H-NMR and ¹³C-NMR. Adenine was isolated from *L. edodes* fruiting bodies for the first time. In addition, eritadenine was analyzed completely by NMR for the first time.

Keywords: *Lentinula edodes*, mononucleoside compounds, ion exchange column chromatography, adenine, eritadenine

香菇 (*Lentinula edodes*) 是世界第二大食用菌, 其子实体味道鲜美, 营养丰富^[1]。核苷类成分是生物细胞维持生命的重要物质, 具有免疫调节、改善脑细胞代谢以及调节中枢神经等多种生理活性, 人们已研究开发了多种核苷类产品^[2-3], 在医疗上一些核苷类药物用于抗肿瘤和抗病毒的治疗^[4-6]。食用菌中的一些核苷类物质具免疫调节、抗肿瘤、抗病毒、抗

炎、抗衰老等作用^[7-8]。香菇嘌呤是香菇中特有的一种核苷类成分, 具有降血脂、预防血栓及血管疾病、保肝等作用^[9-12]。而迄今为止, 国内外学者对香菇化学成分研究主要集中在香菇多糖及其营养成分^[13-14], 对香菇中核苷类化合物的研究很少, 还未见关于香菇中核苷类成分的报道。因此, 作者对香菇中的核苷类化学成分进行提取分离并对其化学结构进行

收稿日期: 2015-03-18

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目(2013BAD16B08-02)。

作者简介: 唐庆九(1969—), 女, 江苏盐城人, 医学博士, 研究员, 硕士研究生导师, 主要从事食用菌方面研究。E-mail: tangqingjiu@saas.sh.cn

* 通信作者: 周帅(1981—), 男, 江西景德镇人, 工学硕士, 副研究员, 主要从事食用菌中活性物质的检测分析和分离纯化以及工艺等方面的研究。E-mail: zhoushuai@saas.sh.cn

引用本文: 唐庆九, 王淑蕾, 王晨光, 等. 香菇子实体中单核苷类成分研究[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(03): 283-286.

鉴定,为香菇药理活性的研究提供理论基础,也为食用菌资源的开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料、仪器和试剂

香菇子实体(商品名金钱菇):购于上海百信食用菌科贸有限公司。50℃烘干至恒质量,粉碎机粉碎后过40目筛。

AKTA-prime plus 蛋白质纯化系统:美国 Amersham biosciences 公司;旋转蒸发仪:瑞士 Buchi 公司;Waters 600 系列高效液相色谱仪:美国 Waters 公司;Waters Micromass GCTOF 型质谱仪:美国 Waters 公司;VARIAN 400-MR 型核磁共振波谱仪:美国 Varian 公司;SP-Sepharose Fast Flow 和 DEAE-Sepharose Fast Flow 填料:美国 GE 公司;NKA-II 型大孔吸附树脂:天津海光化工有限公司;氯化钠、乙醇均为分析纯:国药集团化学试剂有限公司。

1.2 提取与分离

香菇子实体粉末 1.5 kg,用 15 L 蒸馏水 100℃ 提取 2 次,每次 2 h。合并提取液,用 NKA-II 型大孔吸附树脂吸附后以 75%乙醇解吸附,减压回收溶

剂,得到浓缩液 500 mL,反复经过 SP-Sepharose Fast Flow 阳离子交换柱及 DEAE-Sepharose Fast Flow 阴离子交换柱层析,以 NaCl 水溶液交换洗脱,根据 AKTA-prime plus 蛋白质纯化系统检测器 254 nm 波长下的紫外吸收峰合并洗脱液、浓缩、脱盐、反复重结晶,同时辅助应用硅胶柱层析等得到化合物 1(160 mg)、化合物 2(26 mg)、化合物 3(3.2 mg)、化合物 4(4.7 mg)、化合物 5(19.6 mg)、化合物 6(10.2 mg),其分离纯化流程见图 1。

1.3 纯度鉴定

用高效液相色谱法对各化合物进行纯度鉴定。色谱条件 Ultimate AQ-C₁₈ 柱(5 μm, 4.6 mm×250 mm);流动相:甲醇(A相)-磷酸盐缓冲液(B相)。0~10 min (0%A~100% B),10~20 min (0%~10% A),20~21 min (10%~20% A),21~30 min (20% A),30~31 min (20~0% A),31~40 min (0% A),柱温 40℃,检测波长 254 nm。

1.4 结构鉴定

对得到的 6 个化合物以 DMSO 为溶剂,四甲基硅烷为内标,对其 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 谱进行记录。核磁共振及 ES-MS 测定均委托中国科学院有机化学研究所完成。

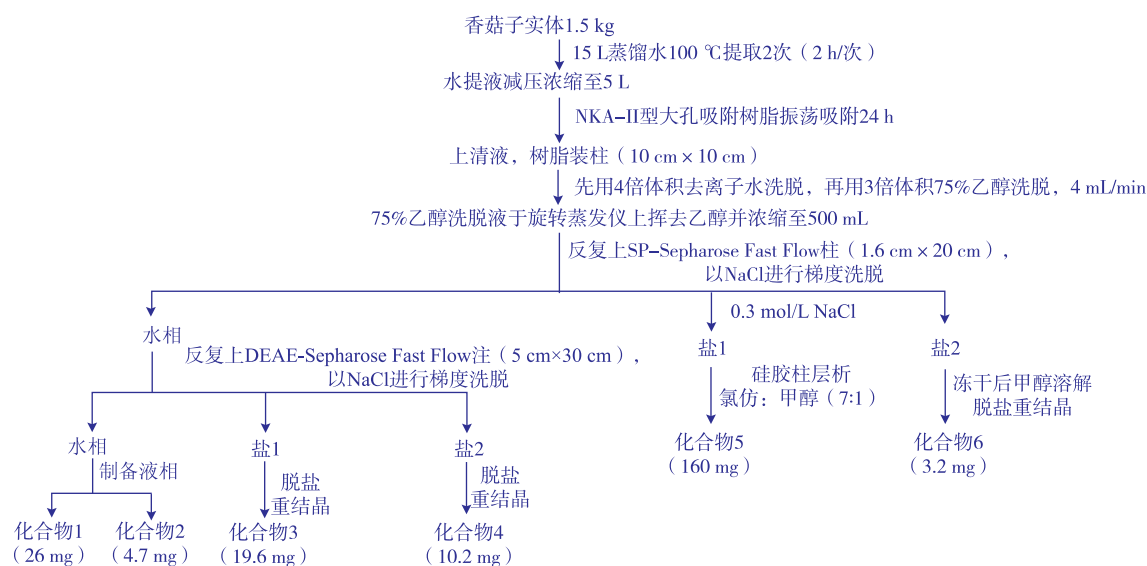


图 1 分离流程图

Fig. 1 Fractional procedure

2 结果与分析

化合物 1: 类白色结晶性粉末, EI-MS m/z : 244 [M]⁺。¹H-NMR (DMSO, 400 MHz) δ : 11.2 (1H, brs,

OH-4), 7.89 (1H, d, J =8.0 Hz, H-6), 5.77 (1H, d, J =5.2 Hz, H-1'), 5.64 (1H, d, J =8.0 Hz, H-5), 5.38 (1H, d, J =5.6 Hz, OH-2'), 5.10 (1H, m, OH-5'), 5.09 (1H, d, J =4.8 Hz, OH-3'), 4.03 (1H, dd, J =

10.0, 5.2 Hz, H-3'), 3.95 (1H, m, H-2'), 3.83 (1H, q, $J=3.6$ Hz, H-4'), 3.62 (1H, dt, $J=7.6, 4.4$ Hz, H-5'a), 3.54 (1H, dt, $J=7.6, 4.0$ Hz, H-5'b)。以上数据与蒋娟娟等报道的基本一致^[15-16], 故鉴定为尿苷(uridine)。

化合物 2: 白色粉末, EI-MS m/z : 112[M]⁺。¹H-NMR (DMSO, 400 MHz) δ : 11.01 (1H, brs, N-H), 10.82 (1H, brs, N-H), 7.38 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-6), 5.44 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-5)。以上数据与陆崇玉等报道的基本一致^[17], 故鉴定为尿嘧啶(uracil)。

化合物 3: 白色针状结晶(水), EI-MS m/z : 283 [M]⁺。¹H-NMR (DMSO, 400 MHz) δ : 10.65 (1H, brs, H-1), 7.94 (1H, s, H-8), 6.47 (2H, s, -NH₂), 5.69 (1H, d, $J=5.6$ Hz, OH-2'), 5.41 (1H, d, $J=4.8$ Hz, OH-3'), 5.14 (1H, brs, H-1'), 5.05 (1H, m, OH-5'), 4.39 (1H, m, H-2'), 4.08 (1H, brs, H-3'), 3.87 (1H, m, H-4'), 3.62 (1H, m, H-5'a), 3.53 (1H, m, H-5'b); ¹³C-NMR (DMSO, 100 MHz) δ : 156.76 (C-6), 153.63 (C-2), 151.29 (C-4), 135.58 (C-8), 116.63 (C-5), 86.29 (C-1'), 85.17 (C-4'), 73.66 (C-2'), 70.34 (C-3'), 61.36 (C-5')。以上数据与胡永美等报道的基本一致^[18], 鉴定为鸟苷(guanosine)。

化合物 4: 白色短针状或簇状结晶(水), EI-MS m/z : 253[M]⁺。¹H-NMR (DMSO, 400 MHz) δ : 8.10 (1H, s, H-2), 8.04 (1H, s, H-8), 7.12 (2H, s, -NH₂), 3.9-4.4 之间出现四组侧链氢信号, 与 Chibata 等报道一致^[19], 初步鉴定为香菇嘌呤。由于以往文献中香菇嘌呤高场区四组氢信号的核磁归属较粗略且无 ¹³C 核磁共振数据, 作者依照现有核磁图谱对其进行详细归属。4.30 (1H, dd, $J=3.2, 14.4$ Hz, H-1'a), 4.12 (1H, dd, $J=8.8, 14.4$ Hz, H-1'b), 4.00 (1H, m, H-2'), 3.90 (1H, d, $J=5.2$ Hz, H-3'), 3.31 (1H, s, OH-3'), 3.28 (1H, s, OH-2'); ¹³C-NMR (DMSO, 100 MHz) δ : 175.51 (C-4'), 155.77 (C-6), 152.13 (C-2), 149.63 (C-4), 141.68 (C-8), 118.35 (C-5), 71.22 (C-3'), 70.51 (C-2'), 46.54 (C-1')。所有碳氢信号均得到归

属, 故鉴定为香菇嘌呤(eritadenine)。

化合物 5: 白色柱状结晶, EI-MS m/z : 267[M]⁺。¹H-NMR (DMSO, 400 MHz) δ : 8.34 (1H, s, H-8), 8.13 (1H, s, H-2), 7.35 (2H, s, -NH₂), 5.88 (1H, d, $J=6.0$ Hz, H-1'), 5.44 (1H, d, $J=4.0$ Hz, OH-2'), 5.42 (1H, m, OH-5'), 5.18 (1H, d, $J=2.4$ Hz, OH-3'), 4.60 (1H, dd, $J=11.2, 6.0$ Hz, H-2'), 4.13 (1H, m, H-3'), 3.95 (1H, m, H-4'), 3.67 (1H, dt, $J=12, 3.6$ Hz, H-5'a), 3.54 (1H, ddd, $J=11.2, 7.2, 3.6$ Hz, H-5'b)。以上数据与吕子明等报道的基本一致^[20], 鉴定为腺苷(adenosine)。

化合物 6: 白色粉末, EI-MS m/z : 135[M]⁺。¹H-NMR (DMSO, 400 MHz) δ : 12.79 (1H, brs, H-9), 8.10 (1H, s, H-2), 8.08 (1H, s, H-8), 7.07 (2H, s, -NH₂)。以上数据与陈泉等报道的基本一致^[21], 鉴定为腺嘌呤(adenine)。

3 结 语

核苷类化合物的分离纯化大多用硅胶柱结合反相填料分离纯化获得^[22], 而大多数核苷类化合物如腺苷、鸟苷、尿苷等的极性较大, 在硅胶柱中的分离效果并不好。作者首次运用阴离子和阳离子交换树脂来分离纯化, 并根据紫外吸收峰来收集, 可以快速高效地分离纯化核苷类化合物。本研究从香菇子实体的水提液中分离得到了 6 个化合物, 分别是: 腺苷、尿苷、腺嘌呤、尿嘧啶、鸟苷、香菇嘌呤, 其中腺嘌呤为首次从香菇中分离得到。香菇嘌呤已被证实有很好的降血脂作用, 另外, 据报道嘌呤类物质在中枢神经系统损伤和退行性疾患中, 可以保护神经元和胶质细胞, 并促进神经元轴突的生长或再生, 其中腺苷和鸟苷就有很好的活性^[23]。本研究结果表明, 香菇子实体中含有多种核苷类化合物, 提示该菌可能具有较好的相关药理活性。因此, 对本研究中核苷类化合物或其衍生物的药理作用以及其他成分的分离纯化有必要进行更加深入的研究。

参考文献:

- [1] 黄年来, 林志彬, 陈国良. 中国食药菌学[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2005: 1244-1245.
- [2] KONG Deping, QIAN Dawei, GUO Sheng, et al. Determination of nucleosides compounds in nine tonic traditional Chinese medicines of fruit and seeds[J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2011, 17(4): 98-101. (in Chinese)
- [3] ZHANG Xuemei, YANG Fengqing, XIA Zhining. Recent advances in research on pharmaceutical functions of nucleosides and

- nucleotides in dietary foods[J]. **Food Science**, 2012, 33(9): 277-282. (in Chinese)
- [4] CHEN Li, SHEN Cuirong, PAN Hongying. Research progress of antiviral drugs combination for chronic hepatitis B [J]. **International Journal of Epidemiology Infectious Disease**, 2013, 40(4): 218-283. (in Chinese)
- [5] ZHANG Peng, ZHAO Qitao, YANG Peimin, et al. Experimental research of anti-tumor effect of nucleoside in *Hedyotis diffusa*[J]. **Lishizhen Medicine and Medica Research**, 2012, 23(8): 1901-1902. (in Chinese)
- [6] STEFANIA Merighi, PRISCO Mirandola, KATIA Varani. A glance at adenosine receptors: novel target for antitumor therapy[J]. **Pharmacology & Therapeutics**, 2003, 100(1): 31-48.
- [7] ZHU Lina, XUE Junjie, LIU Yanfang, et al. Isolation and purification of N6-(2-hydroxyethyl)-adenosine from *Cordyceps militaris* fruit bodies and inhibitory effect on K562 tumor cell proliferation[J]. **Acta Edulis Fungi**, 2013, 20(1): 62-65. (in Chinese)
- [8] YU Bocheng, TANG Yongfan, TANG Liang, et al. Advances in study on pharmacological effects of cordycepin[J]. **Drugs & Clinic**, 2011, 26(5): 349-352. (in Chinese)
- [9] SHIMADA Yoshiko, MORITA Tatsuya, SUGIYAMA Kimio. Dietary eritadenine and ethanolamine depress fatty acid desaturase activities by increasing liver microsomal phosphatidylethanol-amine in rats[J]. **The Journal of Nutrition**, 2003, 133(3): 758- 765.
- [10] SEKIYA Atsushi, FUKADA Shinichiro, MORITA Tatsuya. Suppression of methionine-induced hyperhomocysteinemia by dietary eritadenine in rats[J]. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, 2006, 70(8): 1987-1991.
- [11] TARO Yamada, JUNICHI Komoto, KAIYAN Lou, et al. Structure and function of eritadenine and its 3-deaza analogues: potent inhibitors of S-adenosylhomocysteine hydrolase and hypocholesterolemic agents[J]. **Biochemical Pharmacology**, 2007, 73(): 981-989.
- [12] WANG Shulei, LIANG Jingyu, TANG Qingjiu. Advances in studies of eritadenine[J]. **Mycosystema**, 2012, 31(2): 151-158. (in Chinese)
- [13] LV Guoying, FAN Leifa, ZHANG Zuofa, et al. Development of research on lentinan [J]. **Acta Agriculturae Zhejiangensis**, 2009, 21(2): 183-188. (in Chinese)
- [14] HE Yong, WU Yuming, GAO Hongdong, et al. Development of research on nutritional ingredient of *Lentinus edodes*[J]. **Modern Agricultural Sciences and Technology**, 2010, 23: 140-141. (in Chinese)
- [15] JIANG Juanjuan, XU Deran, PU Sheban, et al. Chemical constituents of roots of *Gynura segetum* (Lour.) Merr. [J]. **Pharmaceutical and Clinical Research**, 2008, 16(3): 178-180. (in Chinese)
- [16] FENG Weisheng, ZHU Bo, ZHOU Xiaoke. A new norlignan lignanoside from *Selaginella moellendorffii* Hieron [J]. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, 2011, 1(1): 36-39.
- [17] LU Chongyu, DENG Yun, MEI Lin, et al. Studies on chemical constituents of *Gracilaria lemaneiformis*[J]. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**, 2011, 42(6): 1069-1071. (in Chinese)
- [18] HU Yongmei, WANG Hao, YE Wencai, et al. Aqueous constituents from *Stellaria media* (L.) Cyr. [J]. **Journal of China Pharmaceutical University**, 2005, 36(6): 523-525. (in Chinese)
- [19] CHIBATA I, OKUMURA K, TAKEYAMA S, et al. Lentinacin: a new hypocholesterolemic substance in *Lentinus edodes* [J]. **Experientia**, 1969, 15(12): 1237-1238.
- [20] LV Zhiming, JIANG Yongtao, WU Lijun, et al. Chemical constituents from dried sorophore of cultured *Cordyceps militaris* [J]. **China Journal of Chinese Materia Medica**, 2008, 33(24): 2914-2917. (in Chinese)
- [21] CHEN Quan, WU Lijun, RUAN Lijun. Chemical studies on the constituents of *Lophatherum gracile* Brongn [J]. **Journal of Shenyang Pharmaceutical University**, 2002, 19(4): 257-259. (in Chinese)
- [22] JIANG Hong, LIU Ke, MENG Shu, et al. Chemical constituents of the dry sorophore of *Cordyceps militaris* [J]. **ACTA Pharmaceutica Sinica**, 2000, 35(9): 663-668. (in Chinese)
- [23] SHI Ming, YOU Siwei. Role of purine in central nerve system injury[J]. **Chinese Journal of Trauma**, 2005, 21(3): 236-239. (in Chinese)