

灵芝肽多糖的化学研究[△]

北京医科大学药学院(100083) 何云庆* 李荣芷 蔡廷威 吴家文** 庞吉海***

摘要 从灵芝子实体热水提取物中分得2种葡聚糖肽GLSP₂及GLSP₃, 凝胶层析及高效液相层析法证明均为单一的多糖均一体, 测得分子量分别为12800及14100。完全酸水解、过碘酸盐氧化、Smith降解、光谱分析、气相色谱及甲基化分析证明, GLSP₂为含有 β -(1→3)(1→6)及(1→4)甙键的葡聚糖肽, 肽的含量占26.6%; GLSP₃为含有 β -(1→6)及(1→4)甙键的葡聚糖肽, 两类甙键糖基组成比例为1:1, 并有分枝, 肽的含量占12.3%。碱性 β -消除反应证明, 2种葡聚糖肽的糖基与肽键中的丝氨酸及苏氨酸以O-糖甙键相连接。

关键词 灵芝 灵芝肽多糖 葡聚糖肽 化学研究

中医临床应用灵芝有悠久的历史, 历代医药学家视为磁补强壮、扶正固本的珍品。现代药理学和临床研究表明, 灵芝具有多种生理活性^[1]。作者与基础医学、药理学、免疫学、分子生物学、细胞生物学紧密配合, 证明灵芝多糖为灵芝扶正固本有效成分^[2]。现从具有免疫调节作用及抗氧自由基活性的灵芝多糖GLA中^[3], 分离2种葡聚糖肽进行结构研究, 深入探讨多糖的构效关系。

1 试剂和仪器

1.1 原料: 灵芝购自北京市药材公司, 为人工栽培赤芝 *Ganoderma lucidum* (Leyss. x Fr.) Karst子实体, 外形呈鹿角状。

1.2 试剂: 葡聚糖凝胶G-50、G-100, 标准多糖Dextran及标准单糖均为Pharmacia Sweden产品, DEAE离子交换纤维素为Budapest Hungary产品, 其它化学试剂为国产分析纯。

1.3 仪器: 岛津UV-260型紫外光谱仪, Perkin-Elmer 983型红外光谱仪, P-E240C型元素分析仪, SQ-206型气相色谱仪, Waters 244型高效液相层析仪, VG20-253 GC/MS/DS气质联用仪, 配有HP-5890A型GC仪, PDP 11/73型微机及VG 11-250数据处理系统。日立835-50型氨基酸自动分析仪。

2 实验部分

2.1 肽多糖的分离、纯化: 赤芝子实体热水提取, 乙醇分级沉淀, 大分子部位经透析、Sevag法除游离蛋白质, 得灵芝多糖GLA。取1.7g GLA以硼酸型DEAE纤维素柱层分离, 水-硼砂-氢氧化钠溶液梯度洗脱, 0.08mol/L洗脱部分经透析、Sephadex G-50脱盐, 冷冻干燥, 得GLSP₂60mg。0.05mol/L氢氧化钠洗脱部分, 除透析脱盐外, 再用过氧化氢脱色^[4], 透析, 冷冻干燥, 得GLSP₃233mg。

2.2 纯度及分子量测定:

2.2.1 凝胶过滤法测定纯度: Sephadex G-100柱(1.0cm×40cm)层析, 0.1%氯化钠洗脱, 上样量1~2mg。

2.2.2 高效液相层析法测定纯度及分子量^[5]: Shodex Ionpak S-804柱, 进样量50 μ g, 流动相0.2mol/L硫酸钠, 流量0.8ml/min, 标准分子量葡聚糖系列: 49.4×10^4 , 22.1×10^4 , 7.9×10^4 , 7.3×10^4 , 4.0×10^4 , 1.0×10^4 及 0.97×10^4 。

*Address: He Yunqing, School of Pharmacy, Beijing Medical University, Beijing

** 现在天津市氨基酸总公司

*** 北京医科大学波谱分析室

△ 国家自然科学基金及国家教委博士点基金资助项目

2.3 肽链的氨基酸组分定性定量分析:精确称取肽多糖各2~3mg,加6mol/L盐酸,氮气保护下110℃加压水解40h。

2.4 完全酸水解及水解产物鉴定:精确称取肽多糖各10mg,2mol/L硫酸加压100℃水解11h。水解产物进行以下鉴定:纸层析 a) 正丁醇-乙酸-乙醇-水(4:1:1:2) b) 乙酸乙酯-乙醇-吡啶-水(5:2:2:1);气相层析:水解产物硼氢化钠还原,醋酐-吡啶乙酰化。气层条件:石英毛细管柱SE54,OV-1,7.5m×0.3mm。

2.5 过碘酸盐氧化反应:取2~3mg肽多糖溶于0.00722mol/L过碘酸钠中,4℃暗处放置,每24h取样,分光光度法^[6]测定过碘酸钠消耗量。以0.01086mol/L氢氧化钠测定甲酸生成量。

2.6 Smith降解反应:上述氧化完全的多糖加入2ml乙二醇,放置30min,透析,硼氢化钠还原,乙酸调pH至5,再透析,冷冻干燥,并依上述水解,纸层析[溶剂系统:正丁醇-乙醇-水(4:1:2)]检识,溴甲酚紫显色。另取水解物制成乙酰化衍生物,气相层析检识。

2.7 甲基化反应:以改良的Hakomori法^[7]並以正丁基锂代替氢化钠^[8],分别对GLSP₂及GLSP₃进行甲基化,红外光谱检识在3400cm⁻¹处无羟基吸收,加90%甲酸100℃水解8h,再加2mol/L三氟乙酸水解10h,除尽酸,硼氢化钠还原,乙酰化,产物进行气相层析及气质联用分析。条件:GC条件:OV-101石英毛细管柱,25m×0.25mm,柱温130~280℃,进样口250℃,GC/MS接口温度170℃。MS条件:EI,源温200℃,70eV,质量范围50~350amu,扫描速度1s/全程。

2.8 碱性β-消去反应^[9,10]:

2.8.1 稀碱反应后紫外光谱分析:各取2mg GLSP₂及GLSP₃,加0.2mol/L 10ml氢氧化钠,45℃保温30min,测定紫外吸收光谱,同时测定相同浓度肽多糖水溶液的紫外吸收光谱。

2.8.2 氨基酸测定:各取2~3mg肽多糖,溶于0.2mol/L氢氧化钠(内含1mol硼氢化钠)中,在氮气保护下45℃保温24h,加2ml浓盐酸,通氮气后封管,110℃水解30h,水解物进行氨基酸定量分析。

3 结果与讨论

3.1 从赤芝子实体中分离得到具有抗衰老活性的多糖GLA,从中分取总肽多糖进行混合淋巴细胞培养(MLCR)反应,结果发现具有较强的活性(药理结果另文发表)。GLA中共分离得到3种肽多糖:GLSP₁,经鉴定为杂多糖肽;GLSP₂及GLSP₃为葡聚糖肽。它们均溶于水,凝胶层析及高效液相层析证明为均一组分。GLSP₂及GLSP₃元素分析除含碳氢外尚含氮,完全酸水解的水解产物分析,仅检出葡萄糖,说明它们为水溶性葡聚糖肽。肽键的氨基酸组成类似,含量不同。

3.2 GLSP₂白色粉末状结晶,分子量12800,红外光谱在890cm⁻¹处有吸收峰,表明有β-甙键特征峰,並有3410、1631、1450cm⁻¹吸收峰,提示有酰胺基存在。水解产物鉴定为葡萄糖,经过碘酸盐氧化,需100h完成,並有甲酸生成。Smith降解反应产物经纸层析及气相层析检识,有丙三醇、赤藓醇、葡萄糖存在,表明含有(1→6)、(1→4)及(1→3)甙键。GLSP₂在氮气保护下加压水解,氨基酸定性定量分析结果证明,肽键由16种氨基酸组成(mol%),其中以谷氨酸(17.3)、缬氨酸(12.4)、亮氨酸(10.6)、丙氨酸(9.2)、甘氨酸(8.6)、异亮氨酸(7.8)为主,並含有丝氨酸(5.5)、苏氨酸(4.7),肽占总糖肽的26.6%。经稀碱β-消去反应,紫外吸收光谱测定在240nm处有明显吸收峰,定量氨基酸测定结果,丝氨酸由1.24%降到0.25%,苏氨酸由1.20%降到0.14%。以上证明,GLSP₂是含有β-(1→

3) (1→6) 及 (1→4) 甙键的葡聚糖肽, 肽链中以丝氨酸及苏氨酸以 O-甙键与糖基相连接。

3.3 GLSP₃ 为白色片状结晶, 分子量 14100, 红外光谱在 895cm⁻¹ 处有吸收峰, 表明有 β-甙键, 而不存在 α-甙键吸收峰。并在 3394、1609、1415cm⁻¹ 处有酰胺基特征峰。完全酸水解仅检出葡萄糖, 过碘酸盐氧化, 100h 完成, 并有甲酸生成, Smith 降解产物检出丙三醇和赤藓醇, 说明含有 (1→6) 及 (1→4) 甙键的糖基组成, 肽链的氨基酸组成 (mol%) 以谷氨酸 (16.2)、缬氨酸 (13.1)、亮氨酸 (10.5)、丙氨酸 (9.3)、甘氨酸 (9.2)、天冬氨酸 (7.6) 等为主, 亦有丝氨酸 (5.6) 及苏氨酸 (5.0) 存在, 肽含量占总糖肽的 12.3%。β-消去反应证明, 除在紫外光谱 240nm 处出现吸收峰外, 氨基酸定量分析结果, 丝氨酸由 0.59% 降到 0.26%, 苏氨酸由 0.60% 减少到微量。GLSP₃ 按改良的 Hakomori 法甲基化, 全甲基化多糖产物经水解、还原、乙酰化, 进行气相层析及气质联用分析, 与标准品对照, 可见有 2,3,4,6-Me₄-Glc (质谱碎片峰 m/z: 205, 161, 145, 129, 117, 101, 87, 71)、2,3,6-Me₃-Glc (233, 117, 113, 101, 99, 87) 及 2,3,4-Me₃-Glc (189, 161, 129, 117, 101, 99, 87) 主要产物, 并以峰面积校正后计算其摩尔质量比为 3:1:1。以上证明 GLSP₃ 为含有 β-(1→6) 及 (1→4) 甙键的葡聚糖肽, 2 种甙键糖基组成比例为 1:1, 且有分枝存在。肽链与糖的连接方式为以丝氨酸及苏氨酸以 O-甙键方式相结合。

致谢: 北京医科大学药学院实验仪器中心测光谱及元素分析; 军事医学科学院放射医学研究所测分子量; 北京市中药研究所作氨基酸分析。

参 考 文 献

- 林志彬, 等. 灵芝. 第二版. 北京: 科学出版社, 1985. 93
 - 李荣芷, 等. 北京医科大学学报, 1987, 19(6): 431
 - 李荣芷, 等. 北京医科大学学报, 1991, 23(6): 473
 - 张翼仲, 等. 吉林师范大学学报, 1979(2): 80
 - 方积年. 药物研究, 1979, 25: 23
 - Dixon J S, et al. Anal Chem, 1954, 26: 1092
 - Hakomori S I. J Biochem, 1964, 55: 205
 - Anthony B, et al. Carbohydr Res, 1985, 140: 319
 - Nakajama J, et al. J Biol Chem, 1974, 249: 7697
 - 戈苏国, 等. 微生物学报, 1983, 23(3): 265
- (1993-04-20 收稿)

辛夷花有效成分研究

军事医学科学院毒物药物研究所 (北京 100850)

顾国明 周宇红 于桂华 贾玲

辛夷为木兰科植物辛夷 *Magnolia liliflora* Desr. 的花蕾, 具有祛风通窍的作用, 用于治疗头痛, 鼻塞, 鼻塞不通等症。化学成分主含挥发油 (江苏新医学院. 中药大辞典. 下册. 1977. 2345)。早在 50 年代, 国外曾对木兰属植物的树皮及根皮进行生物碱成分的研究, 近年来对辛夷花蕾中木脂素成分的研究, 国内外报道较多。但对该花蕾水溶性成分的研究, 国内外未见报道。作者从辛夷花蕾的乙醇提取物中分出一种水溶性生物碱, 经紫外、红外、氢谱、碳谱、质谱等光谱分析, 确定其为水溶性季铵碱—木兰碱 (magnoflorine) [Nakano,

Chem Pharm Bull, 1954, 2(2): 329]。药理实验表明, 该化合物具有显著的肌肉松弛的作用。

1 提取和分离

辛夷花蕾粗粉, 以乙醇回流提取。提取液减压浓缩后, 用 2% 酒石酸溶解。酒石酸提取液以氨水碱化至 pH 9~10, 乙醚萃取。母液减压浓缩至小体积, 加乙醇至醇浓度为 90%, 得醇溶和醇不溶 2 部分。取上清乙醇溶液, 减压浓缩至干, 水溶后经反复硅胶柱层析 [溶剂为甲醇-氨水 (94:6)], 制备性纸层析 [溶剂为正丁醇-冰醋酸-水 (4:1:5)] 最后将制备液冷冻干燥得类白色粉状物。该物

(下转第 411 页)

ABSTRACTS OF ORIGINAL ARTICLES

Chemical Studies on Peptide-Polysaccharides of Lingzhi (*Ganoderma lucidum*)

He Yunqing, Li Rongzhi, Cai Tingwei, et al

Two glycan peptides, GLSP₁ and GLSP₂, were obtained from the hot-water extract of the fruit-body of *Ganoderma lucidum*. Gel chromatography and HPLC showed that they are both homogeneous polysaccharides, with molecular weights of 12800 and 14100 respectively. Through the procedures of total acidic hydrolysis, periodate oxidation, Smith degradation, and spectral determination, GLSP₁ proved to be a glycan peptide with β -(1 $\rightarrow$ 3) (1 $\rightarrow$ 6) and (1 $\rightarrow$ 4) linkage, 26.6% of which is peptide; while GLSP₂ proved to be a glycan peptide with β -(1 $\rightarrow$ 6) and (1 $\rightarrow$ 4) linkage, and the sugar residue ratio in these two bonds is 1:1. The chain of GLSP₂ has branches, and peptide takes 12.3% of it. Basic β -elimination reaction indicated that the sugar residues in the two glycan peptides are linked with O-bond to serine and threonine on the peptide chain.

(Original article on page 395)

Studies on the Chemical Constituents of Chinese Sealavender (*Limonium sinense*)

Guo Hongzhu, Yuan Jiurong

Four known flavonoids were isolated from the aerial part of *Limonium sinense* (Girald) -Kuntze. On the basis of UV, ¹HNMR, ¹³CNMR and FAB-MS spectroscopic analysis, they were identified as myricetin-3-O- β -D-glucoside (I), myricetin-3-O- α -L-rhamnoside (II), quercetin-3-O- α -L-rhamnoside (III) and quercetin (IV). This seemed to be the first report describing their isolation from *L. sinense*.

(Original article on page 398)

Studies on the Release Rates of Xinluning Tablet in Vitro

Chen Xingcan, Yu Xishui, et al

The main active component of Xinluning tablet, an antiarrhythmic preparation, are matrine, oxymatrine, sophoranol, anagyine, baptifoline etc. In this study, total alkaloids in the tablet were determined by acid complexing, and their release rate from the tablet determined in artificial gastric juice.

(Original article on page 405)

Determination of Paeoniflorin in "Moluo Granules" by Reversed Phase HPLC

Li Yang

Paeoniflorin in Chinese traditional patent medicine "Moluo granules" was determined by reversed phase HPLC. Optimum separation was achieved by employing C₁₈ column as the stationary phase, MeOH-(CH₃)₂CHOH-36% HOAc-H₂O (25:2:2:71) as the mobile phase. The average recovery is 99.06%, and the coefficient of variation is 1.04%. The extraction is simple, the analytical method is rapid and accurate with good reproducibility.

(Original article on page 407)