

草栽与段木栽培的灵芝活性成分的分离与鉴定

I. 多糖肽成分的提取、纯化及性质

林树钱¹, 王赛贞¹, 林志彬², 林跃鑫^{3*}

(1. 福州绿谷生物药业技术研究所, 福建 福州 350003; 2. 北京大学医学部 药理系, 北京 100083; 3. 福建师范大学, 福建 福州 350007)

摘要: 目的 研究草栽和段木栽培灵芝的多糖性质和含量; 考察以草代木栽培灵芝的可行性的研究。方法 提取、分离、逆相透析方法研究二者子实体多糖。应用气相色谱、凝胶渗透色谱法测定多糖的组成、摩尔比和相对分子质量。IR, ¹H-NMR和¹³C-NMR等光谱确定多糖肽化合物结构。结果 草栽灵芝多糖肽(GLPG)和段木多糖肽(GLPW)的重均相对分子质量(*M_w*)分别为 5.13×10^5 和 5.85×10^5 ; 黏均相对分子质量(*M_v*)分别为 6.2×10^5 和 6.96×10^5 , 二者具有相同的相对分子质量分布及光谱数据。从光谱分析中看出各单糖间的苷键构型相似, 均以β苷键为主; 糖肽部分均含有相同的 16种氨基酸, 糖的组份为鼠李糖、木糖、果糖、半乳糖、葡萄糖等, GLPW还含有微量甘露糖。结论 草栽灵芝与段木灵芝多糖肽的主要理化特性相似, 其提取率比段木灵芝约高 2.8倍, 为草栽灵芝的综合开发与药用提供了科学依据。

关键词: 草栽灵芝多糖肽; 段木灵芝多糖肽; 提取; 纯化; 光谱鉴定

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)10-0872-03

Isolation and identification of active components of *Ganoderma lucidum* cultivated with grass and wood log I. Extraction, purification and characterization of glycopeptide

LIN Shu-qian¹, WANG Sai-zhen¹, LIN Zhi-bin², LIN Yue-xin³

(1. Fuzhou Green Valley Institute of Bio-pharmaceutical Technology, Fuzhou 350003, China; 2. Department of Pharmacology, School of Basic Medical Science, Peking University, Beijing 100083, China; 3. Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China)

Abstract Object To study the amount and properties of glycopeptide of *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst. cultivated with grass (GLPG) and wood log (GLPW); to investigate the feasibility of substitution of grass for wood log to cultivate *G. lucidum*. **Methods** Glycopeptides were extracted and isolated from the fruit body of *G. lucidum* followed by dialysis; the monosaccharid constituent and relative molecular weight of polysaccharides were examined by GC and gel filtration; structure of glycopeptide was determined by IR, ¹H-NMR and ¹³C-NMR. **Results** Relative molecular weights of GLPW and GLPG glycopeptides were (*M_w*) 5.13×10^5 and 5.85×10^5 , (*M_v*) 6.2×10^5 and 6.96×10^5 , respectively; the glucosidic bonds of both glycopeptides were β-type; both glycopeptides consist 16 amino acids and Rha, Xyl, Fru, Gal and Glc (there was trace amount of Man in GLPW). **Conclusion** There are less physical and chemical difference between GLPG and GLPW. The purification rate of GLPG is 2.8 times to GLPW.

Key words glycopeptide of *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst. with grass (GLPG); glycopeptide of *G. lucidum* with wood log (GLPW); extraction; purification; spectrum identification

我国是世界上生产食(药)用菌的大国。每年栽培食(药)用菌消耗大量的木材, 影响生态环境。目前, 市场上应用的段木灵芝 *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst., 每年要消耗十几万立方米

木材。为此, 笔者对福建农林大学菌草研究生生产的草栽灵芝^[1]与段木灵芝中的多糖成分的提取、纯化与特性进行了比较研究, 为进一步研究草栽灵芝多糖与活性的关系, 用草栽灵芝代替段木灵芝应用奠定

* 收稿日期: 2002-09-29

基金项目: 上海绿谷(集团)有限公司专项科研资金全额资助项目

作者简介: 林树钱(1935-), 男, 福建人, 副研究员, 1959年毕业于福建师范学院生物系(现福建师范大学), 现任福州绿谷生物药业技术研究所常务副所长, 主要从事灵芝等药用真菌药物的研究与开发。 Tel (0591) 3799944 E-mail lsq2020@sohu.com

了基础。

1 材料与仪器

1.1 材料: 草栽灵芝子实体来自福建农林大学菌草研究所; 段木灵芝子实体来自福建省泰宁县段木灵芝生产基地。子实体经中国科学院微生物研究所卯晓岚研究员鉴定。

1.2 仪器与设备: Perkin- Elmer 980红外光谱仪 (KBr 压片); UNRTY- 500核磁共振仪; 日立 835-5(氨基酸自动分析仪); 岛津 Lc- 6A 高压液相色谱仪; RID- 5A 示差折射检测器; 岛津 GC- 16A 型气相色谱仪。

2 实验方法与结果

2.1 多糖肽提取、分离和纯化

2.1.1 粗多糖提取与分离^[2]: 将灵芝子实体用粗颗粒粉碎机破成 10 目左右, 称取 300 g 用 10 倍量的 95% 乙醇, 加热回流 3 h, 醇提残渣经风干后, 分别用 15 倍水加热回流提取 3 次 (2.5, 2, 1 h), 滤过后的水提取液合并, 经减压浓缩至原体积的 1/10, 3 000 r/min 离心 15 min, 上清液再浓缩相当于每毫升含灵芝生药量 1 g, 然后加浓缩液体积的 3 倍量 95% 乙醇作多糖沉淀剂, 置于 5℃ 冰箱内静置过夜, 沉淀物离心 (3 000 r/min, 15 min), 再溶于蒸馏水 300 mL 中, 用 95% 乙醇 2~ 3 倍量沉淀多糖, 依此反复提纯 2 次, 最后将沉淀的多糖分别用 95% 乙醇、丙酮和乙醚各洗涤 3 次后, 置低温 (5℃) 干燥至恒重, 即得黄灰色的粗多糖。草栽灵芝粗多糖的平均提取率为 6.48%, 段木灵芝粗多糖的提取率为 2.34%。

2.1.2 多糖肽的分离、纯化^[3,4]: 将上述粗多糖肽溶于蒸馏水中, 置透析袋内 (截留相对分子质量 5 000 以上), 逆流透析 48 h, 取出透析液在 80℃ 下减压浓缩, 加入多糖浓缩液体积的 3 倍量 95% 乙醇, 搅拌静置, 然后离心 (3 000 r/min, 15 min), 沉淀物为透析后截留的大分子部位多糖, 分别用 95% 乙醇、丙酮和乙醚各洗 3 次, 离心, 沉淀物置低温干燥至恒重, 分别得草栽灵芝多糖肽 (GLPG) 和段木灵芝糖肽 (GLPW), 并求大分子部位多糖肽各占粗多糖含量比。结果表明, GLPG, GLPW 约占粗多糖 35%~ 36%。而低聚糖和色素等低分子杂质约占 64%。

2.1.3 糖肽分离——除去蛋白^[5]: 称取 10 g 草栽灵芝粗多糖溶于蒸馏水中, 采用 Sev ag 法除去蛋白, 即加入多糖溶液体积 0.2 倍氯仿和 0.04 倍正丁醇混合摇振 30 min, 离心分离, 除去沉淀部分, 依此反复处理至氯仿和水的界面无沉淀为止。通过 Sev ag 法对草栽灵芝多糖肽分离以除去蛋白, 经 55 次的反

复处理纯化后的样品, 其氨基酸总量为 4.37%, 比处理前 5.16% 仅减少 15.3%; 肽部分仍有 15 种氨基酸组成, 比处理前仅减少 1 种异亮氨基酸 (表 1), 说明灵芝多糖肽中蛋白质与多糖键结合相当牢固, 故本试验样品称为多糖肽。

2.1.4 多糖肽的氨基酸分析: 取一定量 GLPG 和 GLPW 以及 Sev ag 法处理后的 GLPG, 加 1: 1 HCl, 封管, 110℃ 水解 24 h, 浓缩, 调 pH 值为中性, 用 0.02 mL/L HCl 定量, 经氨基酸自动分析仪测定, 结果见表 1。从表 1 可见 GLPG 和 GLPW 具有相同的氨基酸组成, 其氨基酸总量基本一致。

表 1 GLPG 和 GLPW 的氨基酸组成 mg/g

Table 1 Composition of amino acids

in GLPG and GLPW mg/g

氨基酸名称	GLPG	GLPW	GLPG-Sev ag 处理
天门冬氨酸	8.49	9.49	4.49
苏氨酸	3.58	5.32	4.08
丝氨酸	3.93	4.88	4.43
谷氨酸	5.81	8.10	4.20
甘氨酸	3.50	4.71	3.04
丙氨酸	3.84	4.63	2.96
胱氨酸	1.06	1.82	1.01
缬氨酸	2.68	3.70	2.17
蛋氨酸	5.33	7.44	9.61
异亮氨酸	0.25	0.54	—
亮氨酸	1.50	2.56	1.04
酪氨酸	—	—	—
苯丙氨酸	1.99	3.05	1.32
赖氨酸	3.30	2.22	1.24
组氨酸	1.21	1.23	0.82
精氨酸	3.94	3.47	1.92
脯氨酸	1.22	1.76	1.43
总量	51.63	64.92	43.68

2.2 相对分子质量测定与相对分子质量分布^[6]: 采用凝胶渗透色谱法 (GPC) 测定, 利用示差折射检测器和 HW 色谱工作站, 色谱柱为 Shimpack DIO L-300, 流动相为 H₂O, 流速 1 mL/min, 进样量为 50 μL。根据已知标准葡聚糖相对分子质量和其相对应的出峰时间绘出标准曲线, GLPG 和 GLPW 的相对分子质量分布由色谱工作站根据所绘出标准曲线计算, 分别得出 GLPG 和 GLPW 相对分子质量与分布, 其相对应的相对分子质量分布数据见表 2。

表 2 GLPG 和 GLPW 的相对分子质量分布数据

Table 2 Relative molecular weight distribution of glycopeptide in GLPG and GLPW

组份	重均 (M _w)	相对分子质量 (M _n)	黏均 (M _v)	分布宽度指数 (n = M _w /M _n)
GLPG	512 583	262 301	620 558	1.95
GLPW	584 931	366 268	695 755	1.60

由图 1 和表 2 可见, 两者具有非常相似的相对

分子质量分布。GLPG的 M_w 为 5.13×10^5 , M_n 为 6.21×10^5 ; GLPW 的 M_w 为 5.85×10^5 , M_n 为 6.96×10^5 。

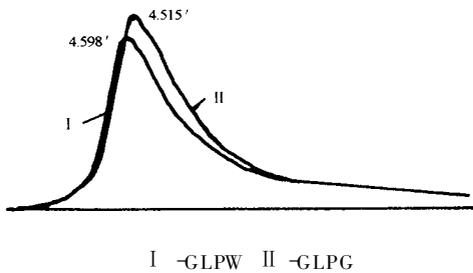


图 1 GLPG和 GLPW相对分子质量分布

Fig. 1 GPC spectra of glycopeptides

from GLPW and GLPG

2.3 多糖肽组份及摩尔比^[7,8]: 取单糖标准样品 5 mg和样品水解后冷冻干燥,称重,分别制备成单糖三甲基硅烷样品,注入气相色谱,确定各出峰时间及峰面积。色谱条件:岛津 GC-16A,OV-17,2.1 m 直径 3.3 mm 填充柱,柱温 130℃,进样器温度 230℃,检测器温度 230℃,载气 $N_2=40$ mL/min, $H_2=40$ mL/min, AIR=400 mL/min 进样量为 0.4 μ L。根据单糖质量 峰面积之比,求出水解多糖中各单糖质量,转化为物质的量除以各自的相对分子质量为摩尔比。气相色谱分析表明, GLPG和 GLPW 均由 D-葡萄糖 (Glc)、D-半乳糖 (Gal)、果糖 (Fruct)、D-木糖 (Xyl)、D-鼠李糖 (Rha) 组成, GLPW 尚含有微量甘露糖 (Man),说明二者组份中单糖构成基本一致。GLPG摩尔比为 Rha : Xyl : Fruct : Gal : Glc = 0.549 : 3.614 : 3.167 : 0.556 : 6.89; GLPW 的摩尔比为 Rha : Xyl : Fruct : Gal : Man : Glc = 0.793 : 0.964 : 2.944 : 0.167 : 0.387 : 7.94。

2.4 波谱分析鉴定: GLPG 和 GLPW 的 IR, ^1H-NMR , $^{13}C-NMR$ 光谱基本一致,说明两者具有相同的结构^[2,3,8-10]。

3 讨论

草栽灵芝多糖肽提取率是段木灵芝子实体的 2.8 倍左右。经透析截留大分子部位多糖肽分别为

GLPG和 GLPW 两者均占粗多糖的 35%~36%, 均由葡萄糖 (Glc)、半乳糖 (Gal)、果糖 (Fruct)、木糖 (Xyl)、鼠李糖 (Rha) 组成,凝胶色谱和高效液相色谱证明均为一样的生物高分子化合物。从光谱数据可看出两者化学构型相似,均以 β -型糖苷键为主外,尚有 α -型糖苷键。

草栽灵芝多糖得率受灵芝栽培季节和子实体收成期影响较大,其规范化栽培技术显得十分重要。由于灵芝多糖种类多而复杂,同时受到分离条件与分析方法的限制,草栽灵芝多糖肽的肽键与糖的连接方式尚未最终确定,以及该结构和其药理作用关系尚待进一步研究。

致谢:光谱由中国科学院福建物质结构研究所测定,相对分子质量和多糖组成由福建师范大学实验中心和生物工程学院测定,氨基酸由国家医药管理局福建省微生物研究所测定。

References

- [1] Lin ZX. *Jun tao Technology* (菌草学) [M]. Beijing: Chinese Agricultural Technology Press, 2000.
- [2] Lin S Q. *Medicinal Mushroom Production and Product Development in China* (中国药用菌生产与产品开发) [M]. Beijing: Chinese Agricultural Press, 2000.
- [3] Lin Z B. *Modern Research on Ganoderma* (灵芝的现代研究) [M]. 2nd ed. Beijing: Beijing Medical University Press, 2001.
- [4] He Q Y, Li R Z, Cai T W, et al. Chemical research on glycopeptides of *Ganoderma* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1994, 25(8): 195-197.
- [5] Zhang J S, Han W W. Studies on chemical structure of polysaccharides from *Ciulus versicolor* (I) [J]. *Edib Fungi* (食用菌), 1996, 3(2): 28-30.
- [6] Andrews P. The gel-filtration behavior of proteinins related to their molecular weights over a wide reange [J]. *Biochemistry*, 1965, 96-595.
- [7] Zhang Y S. Determination of polysaccharides structure [J]. *Acta North-east Teachers Univ-Nat Sci* (东北师范大学学报·自然科学版), 1982, (3): 19-20.
- [8] Fang J N. Structural analysis of polysaccharides [J]. *Med Res*, 1979, 25-36.
- [9] Agrawal P K. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides [J]. *Phytochemistry*, 1992, 31(10): 3307.
- [10] Fang J N. Application of $^{13}C-NMR$ to structural analysis of polysaccharides [J]. *Abroad Med*, 1982, 3(2): 107.

《中国中西医结合杂志》2004年征订启事

《中国中西医结合杂志》是由中国科协主管,中国中西医结合学会和中国中医研究院主办的,全国性中西医结合综合性学术期刊,1981年创刊,主要报道我国中西医结合在临床、科研、预防、教学等方面的经验和成果,探讨中西医结合思路和方法,介绍国内外有关本专业的进展。本刊设有:述评、专题笔谈、临床论著、实验研究、博士之窗、论著摘要、学术探讨、思路与方法学、基层园地等栏目。本刊为大 16开本,月刊,国内外公开发行;2004年页码增加至 96页,全部用铜版纸印刷,国内定价为 10.00元/期,全年定价 120.00元。国内邮发代号:2-52,国外代号:M 640。

本社还有英文版《CHINESE JOURNAL OF INTEGRATIVE MEDICINE》,为季刊,大 16开,80页,国内外公开发行,国内定价 25.00元/期,全年定价 100.00元,国内邮发代号:82-825,国外代号:1521(QR)。也可直接汇款至本社邮购。

地址:北京西苑操场 1号中国中西医结合杂志社 邮编:100091 电话:(010)62886827 传真:(010)62877592