

破壁与不破壁灵芝孢子粉多糖的分析

黄晓兰, 吴惠勤, 黄芳, 林晓珊

(中国广州分析测试中心 广东省化学危害应急检测技术重点实验室, 广东 广州 510070)

摘要:目的 研究灵芝孢子粉多糖的组成、相对分子质量及相对分子质量分布, 比较破壁与不破壁灵芝孢子粉多糖的异同。方法 用不同提取方法提取灵芝孢子粉多糖, 采用气相色谱-质谱(GC-MS)、高效液相色谱(HPLC)分析灵芝孢子粉多糖的单糖组成, 用凝胶渗透色谱(GPC)分析灵芝孢子粉多糖的相对分子质量及其分布。结果 不同提取方法所得灵芝孢子粉多糖的得率不同, 破壁后灵芝孢子粉含的多糖是不破壁的1.7倍; 灵芝孢子粉多糖是由鼠李糖、阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖组成的杂多糖, 破壁与不破壁的多糖组成完全相同, 其相对质量分数略有区别; 破壁灵芝孢子粉多糖的GPC有两个多糖峰, 相对分子质量分别为 7.80×10^4 和 1.17×10^4 , 而不破壁灵芝孢子粉多糖只有相对分子质量为 7.80×10^4 的一个峰。结论 破壁与不破壁孢子粉多糖的单糖组成相同, 但破壁灵芝孢子粉多糖较不破壁孢子粉的多糖高出70%, 增加部分为相对分子质量较小的多糖。这可以解释破壁灵芝孢子粉的功效好于不破壁灵芝孢子粉的原因。

关键词: 灵芝孢子粉; 多糖; 相对分子质量; 凝胶渗透色谱(GPC)

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)06-0813-04

Analysis of polysaccharide from broken cellular wall and unbroken spore of *Ganoderma lucidum*

HUANG Xiao-lan, WU Hui-qin, HUANG Fang, LIN Xiao-shan

(Guangdong Key Laboratory of Chemical Emergency Test, China National Analysis Center of Guangzhou, Guangzhou 510070, China)

Abstract: **Objective** To study the consists of polysaccharide from *Ganoderma lucidum* spore, its relative molecular weight (MW), and the distribution of the relative MW, then to compare the broken cellular wall spore with unbroken one in their physical and chemical properties. **Methods** The polysaccharides were extracted by different methods, the monosaccharide compositions in the polysaccharide from *G. lucidum* were determined by HPLC and GC-MS; the relative MW and its distribution of the polysaccharide were examined by gel permeation chromatography (GPC). **Results** The amount of the polysaccharide of broken spore is 1.7 times of unbroken one; both polysaccharide of broken and unbroken spore consist of rhamnose, alabinose, mannose, glucose, and galactose, there is a little difference in their relative contents; the polysaccharide of unbroken spore has only one GPC peak, its MW was 7.80×10^4 , and the broken one has two GPC peaks, their MW were 7.8×10^4 , and 1.17×10^4 , respectively. **Conclusion** There are same composition and different MW between the broken and unbroken spore polysaccharides. The broken spore polysaccharide has smaller MW than that of the unbroken one, it can be used to explain why the broken spore has better curative effect than the unbroken one.

Key words: *Ganoderma lucidum* spore; polysaccharide; relative molecular weight; gel permeation chromatography (GPC)

灵芝孢子粉以其具有抗肿瘤、调节人体免疫功能等功效正风靡全国, 乃至海外。一般认为灵芝孢子粉的抗肿瘤功效主要是因为孢子粉中多糖的作

用^[1,2]。目前对灵芝孢子粉的成分分析大多是针对其中的氨基酸、脂肪酸、萜类、核苷类等化合物的研究^[3,4], 对灵芝孢子粉多糖只局限于对多糖总量的提

收稿日期: 2005-05-19

基金项目: 广州市重点科技攻关资助项目(NO2000J01001)

作者简介: 黄晓兰(1964-), 女, 广东潮州人, 高级工程师, 主要从事药物及食品分析工作。

Tel: (020)87686536 (020)37656312 E-mail: wenhxl@21cn.com

取和测定^[3~6]。林树钱等^[7]比较了草栽和段木栽灵芝多糖的性质和量。而对灵芝孢子粉多糖的组成及相对分子质量等性质的研究未见报道。本实验采用气相色谱-质谱(GC-MS)、高效液相色谱(HPLC)、凝胶渗透色谱(GPC)等手段对灵芝孢子粉多糖的组成、相对分子质量及其分布等进行了研究,并比较了破壁灵芝孢子粉和不破壁灵芝孢子粉多糖的异同,对探讨灵芝孢子粉多糖的药理作用,以及灵芝孢子粉的进一步开发利用具有重要的意义。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器:Agilent 1100 高效液相色谱仪,美国安捷伦公司;Agilent 6890GC/5973MS 气相色谱/质谱联用仪,美国安捷伦公司;721N 型分光光度计,上海分析仪器厂。

1.1.2 试剂:乙腈,Merck 公司,HPLC 级;KH₂PO₄、H₃PO₄、硫酸、盐酸羟胺、吡啶、醋酸酐等试剂,AR 级;试验用 Millipore 超纯水。

1.2 灵芝孢子粉多糖的提取:分别取 100 g 破壁及不破壁灵芝孢子粉,加入 500 mL 水,分别采用超声振荡和回流法提取,过滤除去残渣。上清液于 60 ℃ 水浴浓缩至 100 mL,加入无水乙醇 400 mL 使乙醇体积分数为 80%,沉淀出多糖。再用 80%乙醇反复洗涤沉淀,于 60 ℃ 水浴烘干得灵芝孢子粉多糖。

1.3 灵芝孢子粉多糖质量分数测定:多糖的质量分数采用苯酚-硫酸分光光度法测定^[6]。

1.4 灵芝孢子粉多糖的 HPLC 分析

1.4.1 多糖的水解:取 200 mg 灵芝孢子粉多糖,加入 2 mol/L H₂SO₄ 38 mL 加热回流 6 h,冷却,用饱和 Ba(OH)₂ 溶液中和至中性,过滤,清液浓缩定容至 10 mL,进行 HPLC 分析。

1.4.2 HPLC 条件:色谱柱为 Kromasil NH₂ (250 mm×4.6 mm),柱温 45 ℃;流动相:乙腈-水(80:20);体积流量:1.2 mL/min;示差折光检测器,恒温 45 ℃;进样量 20 μL。

1.5 灵芝孢子粉多糖的 GC-MS 分析

1.5.1 多糖水解产物的乙酰化:取 1.4.1 项水解后的灵芝孢子粉多糖,彻底蒸干其中水分,加入 70 mg 盐酸羟胺,5 mL 吡啶,于 90 ℃ 水浴加热 1 h;取出稍冷,加入 5 mL 醋酸酐,再于 90 ℃ 水浴加热 1 h;冷却,加 10 mL 水破坏醋酐,用氯仿萃取乙酰化产物,氯仿萃取液用水洗涤,无水硫酸钠脱水,清液通氮气浓缩定容至 1 mL,进行 GC-MS 分析。

1.5.2 GC-MS 条件:色谱柱为 DB-1 (15 m×0.2

mm, 0.33 μm)弹性石英毛细管柱,柱温初温 100 ℃,以 10 ℃/min 程序升温至 280 ℃,保持 10 min。载气 He,柱前压 70 kPa,分流比 10:1,溶剂延迟 2 min,进样量 1.0 μL。EI 离子源,电子能量 70 eV,四极杆温度 150 ℃,离子源温度 230 ℃,电子倍增器电压 2 300 V,GC-MS 接口温度 280 ℃,质量扫描范围 29~500 amu。

1.6 灵芝孢子粉多糖的 GPC 分析

1.6.1 GPC 条件:色谱柱为 TSK-GEL G3000 SWXL, 300 mm×7.8 mm,柱温 35 ℃;流动相:0.05 mol/L NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ 缓冲液(pH=6.7,加 0.05% NaN₃);体积流量:0.5 mL/min;示差折光检测器,恒温 35 ℃;进样量 20 μL。

1.6.2 GPC 校正曲线的建立:取已知相对分子质量为 738、5 800、1.22×10⁴、2.37×10⁴、4.8×10⁴、1.0×10⁵、1.86×10⁵、3.8×10⁵、8.35×10⁵ 的多糖标样,用 0.05 mol/L NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ 缓冲液(pH 6.7,加 0.05% NaN₃)溶解,经 0.45 μm 滤膜滤过,进行 GPC 分析。以多糖标样的保留时间为横坐标,多糖相对分子质量的对数为纵坐标作 GPC 的普适校正曲线。

1.6.3 样品分析:取一定量灵芝孢子粉多糖样品,用 0.05 mol/L NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ 缓冲液(pH=6.7,加 0.05% NaN₃)溶解,经 0.45 μm 滤膜滤过,进行 GPC 分析。根据样品的出峰时间在校正曲线上求得多糖峰的平均相对分子质量及其分布。

2 结果与讨论

2.1 多糖的得率和质量分数:考察了用不同方法提取灵芝孢子粉多糖的情况,不同提取方法的多糖得率见表 1。实验表明,回流法提取的灵芝孢子粉多糖得率最高。而无论何种提取方法,破壁与不破壁孢子粉的多糖得率比值基本恒定在 1.69 左右,说明不破壁孢子粉中的多糖中有一部分位于细胞内部,无论何种方法都无法溶出;而破壁后灵芝孢子粉的多糖可溶出,量显著增加。因此破壁灵芝孢子粉功效确实好于不破壁的灵芝孢子粉。用不同方法提取得到的灵芝孢子粉多糖的质量分数在 65%~75%。

2.2 灵芝孢子粉多糖的组成分析

2.2.1 HPLC 分析:灵芝孢子粉多糖水解后用 HPLC 分析其单糖组成,并与单糖标样进行对照。结果表明,灵芝孢子粉多糖可能由葡萄糖和甘露糖组成,破壁灵芝孢子粉和不破壁灵芝孢子粉多糖组成相同。

2.2.2 GC-MS 分析:灵芝孢子粉多糖水解并乙酰化后用 GC-MS 分析其单糖组成,将单糖标样同时

表 1 不同提取方法的孢子粉多糖得率及质量分数

Table 1 Yield and content of spore polysaccharide with various extracting methods

样 品	室温超声波提取 2 h		45℃ 浸 2 h, 超声波提取 2 h		回流提取 4 h	
	得率/%	质量分数/%	得率/%	质量分数/%	得率/%	质量分数/%
破壁灵芝孢子粉	0.578	75.4	0.929	67.0	1.68	64.9
不破壁灵芝孢子粉	0.343	68.5	0.545	71.5	1.00	70.0
破壁/不破壁	1.69		1.70		1.68	

乙酰化进行对照。结果表明,灵芝孢子粉多糖主要是由鼠李糖、阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖组成的杂多糖。破壁灵芝孢子粉和不破壁灵芝孢子粉多糖的组成完全相同,只是相对量略有区别(表 2)。

表 2 灵芝孢子粉多糖的单糖组成及相对质量分数

Table 2 Monosaccharide composition and relative contents of polysaccharides from *G. lucidum* spore

样 品	相对质量分数/%				
	鼠李糖	阿拉伯糖	甘露糖	葡萄糖	半乳糖
破壁灵芝孢子粉	9.78	10.84	11.86	39.62	27.90
不破壁灵芝孢子粉	11.53	7.12	11.89	50.12	19.33

2.3 灵芝孢子粉多糖的相对分子质量及其分布:破壁灵芝孢子粉和不破壁灵芝孢子粉多糖的凝胶色谱见图 1。多糖是由一个个单糖基连接而成的天然大分子化合物。用高效液相色谱法分析多糖,需要将多糖水解成单糖后进行;而气相色谱或气相色谱/质谱法除了要将多糖水解成单糖外,还需要将单糖衍生成易气化的物质再进行分析。这两种方法都破坏了多糖的原有结构,它们只分析多糖中单糖基的组成。凝胶色谱法根据大分子化合物的体积及相对分子质量的大小进行分离,可以不破坏大分子化合物的原有结构和性质直接进行分析,因此最适合分析多糖。在凝胶色谱中相对分子质量大的先出峰,相对分子质量小的后出峰。凝胶色谱图的每个峰都反映了大分子化合物的相对分子质量分布,通过已知相对分子质量的多糖标样所作的普适校正曲线求得相对分子质量。

由图 1 可见,破壁灵芝孢子粉多糖在 12.3 及 18.0 min 处有两个多糖峰,而不破壁灵芝孢子粉多糖只有 12.3 min 一个峰。由多糖的校正曲线可以得到,12.3 min 多糖峰的数均相对分子质量为 7.80×10^4 ,重均相对分子质量为 2.91×10^5 ,分布宽为 3.74;18.0 min 多糖峰的数均相对分子质量为 1.17×10^4 ,重均相对分子质量为 2.71×10^4 ,分布宽为 2.32。因此,破壁后灵芝孢子粉多糖得率增加的部分主要是相对分子质量较低的多糖。一般认为相对分子质量较小的多糖其生物活性较强,药用价值也较好,因此破壁灵芝孢子粉功效好于不破壁的灵芝孢子粉。

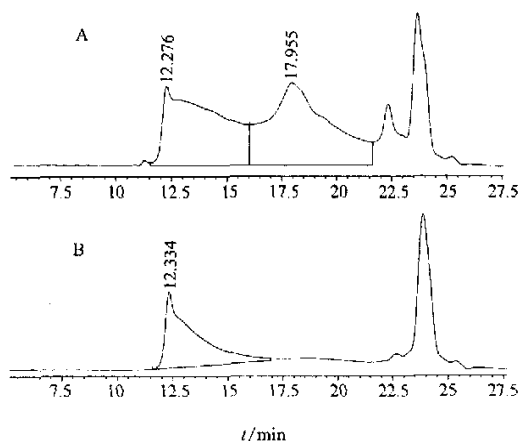


图 1 破壁(A)及不破壁(B)灵芝孢子粉多糖的凝胶色谱图

Fig. 1 GPC Chromatogram of polysaccharide from broken (A) and unbroken (B) spore

3 结论

不同提取方法所得灵芝孢子粉多糖的得率不同,破壁后灵芝孢子粉的多糖量增加 1.69 倍,增加部分主要是相对分子质量较低的多糖;灵芝孢子粉多糖主要是由鼠李糖、阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖组成的杂多糖,破壁与不破壁的多糖组成完全相同;破壁灵芝孢子粉多糖主要有两个多糖峰,数均相对分子质量分别为 7.80×10^4 和 1.17×10^4 ,而不破壁灵芝孢子粉多糖只有相对分子质量为 7.80×10^4 的一个峰。这些分析结果表明,破壁灵芝孢子粉的功效应好于不破壁灵芝孢子粉。

致谢:灵芝孢子粉样品由广东省科学院微生物研究所章卫民博士馈赠。

References:

- [1] Tang Q J, Zhang J S, Pan Y J, et al. Activation of mouse macrophages by the alkali-extracted polysaccharide from spore of *Ganoderma lucidum* [J]. *Chin J Cell Mol Immunol* (细胞与分子免疫学杂志), 2004, 20(2): 142-144.
- [2] Yu Y. Clinical observation of malignant tumor patients treated with *Ganoderma lucidum* Karst cystocarp powder in 94 cases [J]. *J Liaoning Coll Tradit Chin Med* (辽宁中医学院学报), 2000, 2(1): 16-17.
- [3] Mao Q M, Ye F Y, Wu Q, et al. Compare cultivated *Ganoderma lucidum* with the spore powder in the contents of its active components [J]. *J Pharm Pract* (药学实践杂志), 1997, 15(3): 172-173.
- [4] Zhang N R, Zhang X Y. Analysis of vitamins and polysaccharide in the spore powder of *Ganoderma lucidum* (Leyss.

- ex Fr.) Karst [J]. *Chin Biotech Pharm* (中国生化药物杂志), 1997, 18(1): 37-38.
- [5] Ni J H, Song B S, Li H B, et al. The effects of the broken cellular wall for *Ganoderma lucidum* spore on the efficiency of extracted polysaccharide [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(5): 422.
- [6] Xing Z T, Jiang H H, Zhou C Y, et al. Compare with different *Ganoderma lucidum* in the contents of its crude polysaccharide [J]. *Edib Fungi* (食用菌), 2001(6): 4-5.
- [7] Lin S Q, Wang S Z, Lin Z B, et al. Isolation and identification of active components of *Ganoderma lucidum* cultivated with grass and woodlog I. Extraction, purification and characterization of glycopeptide [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(10): 872-874.

山杨的化学成分研究

陈佩东¹, 梁敬钰²

(1. 南京中医药大学 药物化学教研室, 江苏 南京 210029; 2. 中国药科大学 天然药化教研室, 江苏 南京 210038)

摘要:目的 研究产于中国东北山杨 *Populus davidiana* 树皮的化学成分。方法 用色谱方法分离山杨树皮的乙醇提取物。结果 共分离得到 16 个化合物, 用波谱法和化学方法鉴定了其中的 12 个。分别是 3 β -乙酰氧基-12-乌苏烯-28 酸(3 β -acetoxyurs-12-en-28-oic acid, I)、 β -谷甾醇(β -sitosterol, II)、对甲氧基苯酚(4-methoxyphenol, III)、间甲氧基苯酚(3-methoxyphenol, IV)、樱花素(sakuranetin, V)、东莨菪素(scopoletin, VI)、7-甲氧基-2R,3R-二氢山奈酚(2R,3R-dihydro-7-methoxykaempferol, VII)、7-水杨酰颤杨苷(salicyloyltremuloidin, VIII)、颤杨苷(tremuloidin, IX)、 β -胡萝卜苷(β -sitosterol-3-O-glucoside, X)、匍匐柳苷(salireposide, XI)、樱花苷(sakuranin, XII)。结论 化合物 I、V、VI、XII 是从杨属植物中首次分得。

关键词:山杨; 酚苷; 樱花素; 樱花苷

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2006)06-0816-03

Chemical constituents in *Populus davidiana*

CHEN Pei-dong¹, LIANG Jing-yu²

(1. Department of Pharmaceutical Chemistry, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China; 2. China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China)

Abstract: Objective To investigate the chemical constituents in the barks of *Populus davidiana*.

Methods The constituents were isolated by column chromatography and their structures were determined on the basis of chemical and spectral data. **Results** Sixteen compounds were isolated and twelve of them were identified as 3 β -acetoxyurs-12-en-28-oic acid (I), β -sitosterol (II), 4-methoxyphenol (III), 3-methoxyphenol (IV), sakuranetin (V), scopoletin (VI), 2R,3R-dihydro-7-methoxy-kaempferol (VII), salicyloyltremuloidin (VIII), tremuloidin (IX), β -sitosterol-3-O-glucoside (X), salireposide (XI), and sakuranin (XII). **Conclusion** Compounds I, V, VI, and XII are isolated from the plants of *Populus* L. for the first time.

Key words: *Populus davidiana* Dode; phenolic glycosides; sakuranetin; sakuranin

山杨 *Populus davidiana* Dode 是广泛分布于我国东北、华北、西北、内蒙及日本、朝鲜等地的杨属植物, 以皮入药称白杨, 始载于《唐本草》, 列于木部下品。功效为祛风活络、散瘀止痛。用于风痹、四肢不遂、龋齿、疼痛损伤、瘀血肿痛等症。山杨树皮的提取物中有很强的抗肿瘤活性物质, 然而对山杨的化学研究却很少。为寻找新的天然抗癌物质, 本研究对产

于中国东北的山杨树皮的化学成分进行了化学研究, 用色谱方法分离山杨树皮的乙醇提取物, 共分离得到 16 个化合物。用波谱法、化学方法、标准品对照等方法鉴定了其中的 12 个。其中有 3 个酚苷类化合物: 7-水杨酰颤杨苷(salicyloyltremuloidin, VIII)、颤杨苷(tremuloidin, IX)、匍匐柳苷(salireposide, XI); 3 个黄酮类化合物: 樱花素(sakuranetin, V)、7-甲

收稿日期: 2005-09-27

作者简介: 陈佩东(1970-), 2000 年毕业于中国药科大学, 获硕士学位, 现工作于南京中医药大学药物化学教研室, 讲师, 在读博士, 主要从事天然药物化学成分研究工作。 Tel: 13851948464(手机) E-mail: cpd@njutcm.edu.cn