

灵芝多糖肽中单糖的组成

王赛贞¹, 林树钱¹, 林志彬^{1,2}, 陈颖¹

(1. 福州绿谷生物药业技术研究所, 福建 福州 350002; 2. 北京大学医学院 药理学系, 北京 100083)

摘要:目的 从灵芝 *Ganoderma lucidum* 子实体中分离得到的 GL-PPT₂、GL-PPT₃ 和 GL-PPT₄ 3 种多糖肽, 对其单糖组成和摩尔比进行比较。方法 多糖肽经三氟乙酸水解后, 用 1-苯基-3-甲基-5-吡啶酮(PMP)衍生化, 在高效液相 245 nm 紫外检测, 使用 KH₂PO₄ (pH 5.0)-乙腈 (83.5 : 16.5) 等度洗脱, 9 种单糖的色谱峰分离清晰, 大多呈基线分离。结果 经实验确定 GL-PPT₂、GL-PPT₃ 和 GL-PPT₄ 均由甘露糖、核糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖、木糖、岩藻糖和葡萄糖醛酸等 9 种单糖组成。结论 灵芝子实体活性成分多糖肽中的核糖系属首次报道。

关键词: 灵芝; 灵芝多糖肽; 单糖**中图分类号:** R284.1**文献标识码:** A**文章编号:** 0253-2670(2007)02-0174-03Monosaccharide composition of *Ganoderma lucidum* polysaccharide peptidesWANG Sai-zhen¹, LIN Shu-qian¹, LIN Zhi-bin^{1,2}, CHEN Ying¹

(1. Fuzhou Green Valley Institute of Biopharmaceutical Technology, Fuzhou 350002, China; 2. Department of Pharmacology, School of Basic Medical Science, Peking University, Beijing 100083, China)

Abstract: **Objective** To compare the monosaccharide composition and molar ratio of GL-PPT₂, GL-PPT₃, and GL-PPT₄, which are three polysaccharide peptides isolated from the fruit body of *Ganoderma lucidum*. **Methods** The polysaccharide peptides were hydrolyzed by trifluoroacetic acid, then derivatized by trichloro-aldehyde-1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP), and determined by HPLC method with the 245 nm detection wavelength. Gradient elution with the solution of KH₂PO₄ (pH 5.0)-acetonitrile (83.5 : 16.5) resulted in baseline separation of nine monosaccharides, of which the chromatographic peaks were very clear. **Results** GL-PPT₂, GL-PPT₃, and GL-PPT₄ comprise the nine monosaccharides of mannose, ribose, rhamnose, glucose, galactose, arabinose, xylose, galactose, and glucuronic acid. **Conclusion** The ribose in polysaccharide peptides of *G. lucidum* is first reported.

Key words: *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst.; *Ganoderma lucidum* polysaccharide peptides; monosaccharides

灵芝在我国已有千年的药用历史, 现代药理研究表明, 灵芝具有抗肿瘤、免疫调节、降血糖、抗衰老等广泛药理活性^[1]。在探讨灵芝抗肿瘤和免疫调节作用的同时, 发现灵芝多糖肽 GL-PPT₂、GL-PPT₃ 和 GL-PPT₄ 是其有效成分^[2]。本研究报道这 3 个组分中单糖的组成。

1 仪器与试剂

Waters 2695 型高效液相色谱仪; Waters 2487 紫外检测器, Waters 色谱工作站。衍生化试剂: 1-苯基-3-甲基-5-吡啶酮(PMP, Sigma 公司), 三氟乙酸(C 级, 上海化学试剂公司)。单糖对照品: 葡萄糖 (Glu, Service 公司)、甘露糖 (Man, Dr.

Ehrentorfer)、半乳糖 (Gal, GioSharp 公司)、鼠李糖 (Rham, BioSharp 公司)、阿拉伯糖 (Gal, BioSharp 公司)、核糖 (Rib, 国药集团化学试剂公司)、木糖 (Xyl, 上海化学试剂二厂产品)、岩藻糖 (Fuc, Fluka Biochemika 公司)、葡萄糖醛酸 (GlcuA, 国药集团化学试剂有限公司); 乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

2 实验方法^[3~7]

2.1 提取: 经乙醇回流提取过的破碎灵芝, 用水加热提取并浓缩至 1 g/mL, 醇沉, 离心收集沉淀物, 即为粗多糖, 其得率为药材的 2.3%。将粗多糖溶于水, 透析 48 h, 浓缩袋内液, 醇沉多糖, 即得 GL-PP,

收稿日期: 2006-04-28

基金项目: 上海绿谷集团有限公司科研基金资助项目

作者简介: 王赛贞 (1946-), 女, 福建人, 高级工程师, 主要从事药用真菌化学成分的研究和灵芝产品质量控制工作。

E-mail: WSZ1010@sohu.com

得率为 0.72%。

2.2 分离纯化:1% GL-PP 水溶液,进行乙醇分级沉淀,收集 33%乙醇沉淀物,即得 GL-PP-1 多糖肽。用 DEAE-Cellulose 和 Bio-Gel P-10 柱色谱,先后用 pH 5.6, 0.2 mol/L 醋酸缓冲液-NaCl (0.1、0.3、0.5、1.0 mol/L)依次洗脱,收集 4 个组分的洗脱液。经透析醇沉,即得 GL-PPT₁~GL-PPT₄。由于 GL-PPT₁ 为多糖,将另作报道。

2.3 纯度鉴定:用北京龙智达公司提供 GPC 凝胶色谱软件(药典版),TSK-gel G3000 SWXL 柱,面积归一化法计算,纯度在 87%~95%。

2.4 色谱条件:色谱柱 Noua-Pak C₁₈ (150 mm × 3.9 mm, 4 μm);流动相:0.05 mol/L KH₂PO₄ (pH 5.0)-乙腈 (83.5 : 16.5),检测波长:245 nm;体积流量:1.0 mL/min;进样体积:10 μL,柱温:45 °C。

2.5 多糖的水解:取 GL-PPT₂、GL-PPT₃ 和 GL-PPT₄ 各 10 mg 于安瓿瓶中,分别加 1 mL 水溶解和 1 mL 4 mol/L 三氟乙酸,封管后于 110 °C 烘箱中水解 3 h,得水解液。

2.6 供试品的衍生化标记:各取上述 50 μL 水解液置试管中,真空 55 °C 抽干,向干燥试管中依次加入 0.5 mol/L PMP 甲醇液 20 μL 和 0.3 mol/L NaOH 20 μL,混匀后置 70 °C 水浴中加热反应 30 min,取出,室温放置 10 min;再加入 25 μL 盐酸 (0.3 mol/L) 中和,混匀后用 0.5 mL 乙酸异戊酯萃取,涡旋 3 min,离心 15 min,弃去有机层,再萃取 1 次得到下层,加水 150 μL 混匀并离心 15 min。溶液过 0.45 μm 微孔滤膜,取滤液 10 μL,用于 HPLC 分析。与甘露糖、核糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖、木糖、岩藻糖和葡萄糖醛酸 9 种标准品衍生化色谱图比较确定单糖的种类。

3 结果

3.1 标准单糖 PMP 衍生物的 HPLC 分离:9 种标准单糖经 PMP 衍生化后,进行等度洗脱,仪器运行 35 min。结果各单糖的色谱峰分离清晰,除阿拉伯糖、木糖外,其余基本成基线分离(图 1)。

3.2 GL-PPT₂、GL-PPT₃ 和 GL-PPT₄ 多糖肽的单糖组成分析:GL-PPT₂、GL-PPT₃ 和 GL-PPT₄ 的 PMP 衍生物,用上述色谱条件检测,对照标准糖的色谱峰表明,3 种多糖肽中单糖均由葡萄糖、核糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、甘露糖、半乳糖、阿拉伯糖、木糖和岩藻糖组成。其摩尔比为 GL-PPT₂: Man-Rib-Rha-GlcA-Glu-Gal-Ara-Xyl-Fuc = 2 : 0.64 : 0.092 : 0.44 : 26 : 1 : 0.11 : 0.36 : 0.24;

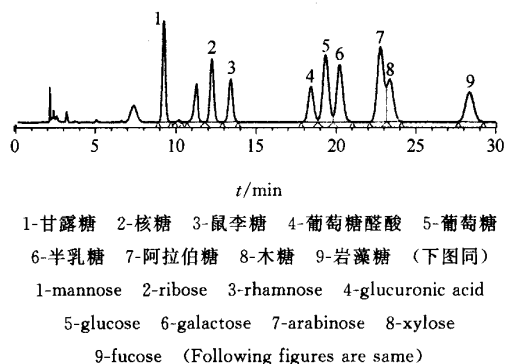


图 1 单糖对照品 PMP 衍生物的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatogram of PMP derivatives of monosaccharide reference substances

GL-PPT₃: Man-Rib-Rha-GlcA-Glu-Gal-Ara-Xyl-Fuc = 2.62 : 0.64 : 0.088 : 0.33 : 28.57 : 1 : 0.95 : 0.43 : 0.31; GL-PPT₄: Man-Rib-Rha-GlcA-Glu-Gal-Ara-Xyl-Fuc = 3.1 : 0.8 : 0.26 : 0.15 : 20 : 1 : 0.12 : 0.32 : 0.34 (色谱图见图 2~4)。该结果显示,3 种多糖肽具有类似的单糖组成,尤以葡萄糖量为最高,达 78%~85%,其次为甘露糖 7%~12%,两种糖的量高达 90%~92%,其余 7 种糖仅含 8%~10%。因此,灵芝多糖肽中单糖系以葡萄糖为主的杂多糖。

4 讨论

GL-PPT₂、GL-PPT₃ 和 GL-PPT₄ 是从 GL-PP

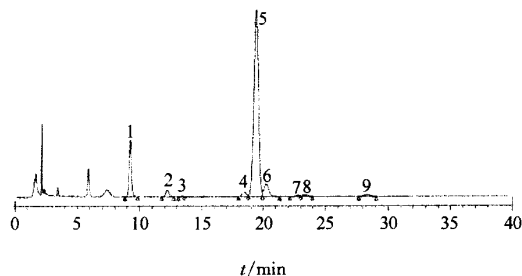


图 2 GL-PPT₂ 酸水解样品 PMP 衍生物的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC Chromatogram of PMP derivatives of acid hydrolysates of GL-PPT₂

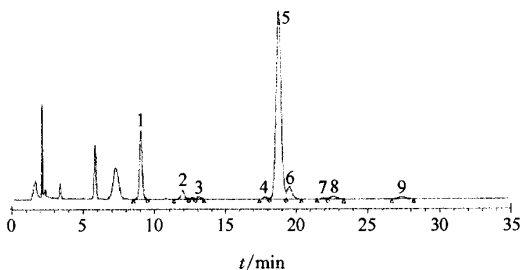


图 3 GL-PPT₃ 酸水解样品 PMP 衍生物的 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC Chromatogram of PMP derivatives of acid hydrolysates of GL-PPT₃

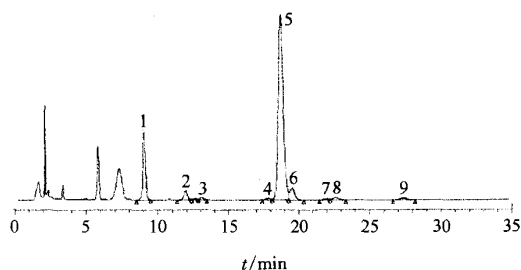


图 4 GL-PPT₄ 酸水解样品 PMP 衍生物的 HPLC 色谱图

Fig. 4 HPLC Chromatogram of PMP derivatives of acid hydrolysates of GL-PPT₄

中提取分离出的多糖肽,系灵芝的活性成分之一。用柱前衍生化高效液相色谱法分析多糖中的单糖组成结果表明,3 种多糖肽均由 9 种单糖组成。经文献查新对比,灵芝多糖肽中单糖组成含有核糖为首次报道。这可能由于灵芝子实体表面附有灵芝孢子,在提取分离过程中,也带入孢子多糖肽所致。

从灵芝子实体中分离出灵芝活性成分, GL-PPT₂、GL-PPT₃ 和 GL-PPT₄ 的水解物与 PMP 衍生化,所得单糖衍生物具有很强的紫外吸收。采用高压液相 245 nm 紫外检测,使用等度洗脱方法,实现

较好的分离并具有良好的峰形,可以一次性完成由杂单糖组成多糖的分析工作。

References:

- [1] Lin Z B. *Modern Studies on Ganoderma* (灵芝的现代研究) [M]. Beijing: Peking Union Medical College, 2001.
- [2] Cao Q Z, Lin Z B. Antitumor and anti-angiogenic activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharides peptide [J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 2004, 25(6): 833-838.
- [3] Lin S Q, Wang S Z, Lin Z B, *et al.* Isolation and identification of active components of *Ganoderma lucidum* cultivated with grass and wood log I. Extraction, purification and characterization of glycopeptide [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(10): 872-874.
- [4] Yu S L. *HPLC Method and Application* (高效液相色谱方法及应用) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2000.
- [5] Zhang W J. *Biochemical Technology of Compound Polysaccharide* (复合多糖生化技术) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1987.
- [6] Wei Y A, Fang J N. Determination of homogeneity and molecular weight of polysaccharides by HPGPC [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学报), 1989, 24(7): 532-536.
- [7] Ma D Y, Chen J, Li P, *et al.* Analysis of monosaccharide compositions in polysaccharides by pre-column derivatization high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2002, 30: 702-705.

岷山红三叶草化学成分的研究

陈学福, 隗惠玲, 史高峰, 王金波

(兰州理工大学石油化工学院, 甘肃 兰州 730050)

红三叶 *Trifolium pratense* L. 又名红车轴、红花苜蓿、红荷兰翘翘等,为豆科三叶草属多年生草本植物,原产于小亚细亚与东南欧,广泛分布于温带及亚热带地区,我国也有大面积种植,主要分布于甘肃、湖北、重庆等地。民间用其花序煎剂治感冒和肺结核、祛痰、利尿和消炎,外敷治脓肿、烧伤和眼疾等,并有应用花、种子、植株及根部制膏、浸膏、糊剂、煎剂和泡茶饮用,来治疗肠胃疾病^[1]。近期研究发现,红三叶还具有抗癌,抗氧化,调节人体激素平衡,改善骨质疏松、妇女更年期综合征,清除自由基等作用^[2~4]。鉴于其独特的药理功效及广阔的应用前景,笔者对岷山红三叶草的化学成分进行了系统的分析和研究,从中分离得到 8 个化合物,运用现代波谱分析技术,确定其结构分别为:正二十四烷(tetra-

cosane, I)、十四烷酸(myristic acid, II)、 β -谷甾醇(β -sitosterol, III)、胡萝卜苷(daucosterol, IV)、芒柄花素(formononetin, V)、鹰嘴豆芽素 A(biochanin A, VI)、芒柄花苷(ononin, VII)、D-3-甲基基-手-肌醇(D-3-O-methyl-chiro-inositol, VIII)。其中化合物 I~IV 和 VIII 为首次从该植物中分离得到。

1 仪器和材料

X-4 型显微熔点测定仪,温度计未校正; Nexus 670 FT-IR 型傅里叶变换红外光谱仪; LCQ Deca XP plus 型质谱仪(ESI 源); Varian INOVA-400 型核磁共振波谱仪, TMS 为内标。色谱用硅胶(青岛海洋化工厂, 160~200 目, 200~300 目), 薄层色谱硅胶 GF₂₅₄(青岛海洋化工厂)。岷山红三叶草由甘肃省岷县牧草研究所提供。

收稿日期: 2006-06-18

作者简介: 史高峰(1963—), 男, 博士, 教授, 现主要从事天然药物研究与开发、天然有机合成、生物化工等方面工作。

Tel: 13109391608 E-mail: shigaofeng@lut.cn