

灵芝多糖肽 GL-PPSQ₂ 结构研究及其应用

林冬梅¹, 罗虹建^{1#}, 王赛贞^{1*}, 林占禧¹, 林树钱¹, 林志彬²

1. 国家菌草工程技术研究中心, 福建 福州 350002

2. 北京大学基础医学院 药理学系, 北京 100191

摘要: **目的** 从灵芝 *Ganoderma* 水提物中分离纯化活性多糖肽, 对其进行结构研究, 并作为对照品用于灵芝产品中多糖肽含量测定。 **方法** 采用热水提取、膜超滤技术和凝胶过滤色谱等方法进行分离纯化, 根据理化测定及波谱数据分析鉴定化合物结构。检测多糖肽含量采用高效液相色谱仪附紫外检测器, 以水作为流动相, 体积流量为 1 mL/min。 **结果** 灵芝多糖肽相对分子质量为 5.0×10^4 , 质量分数 97% 以上, 得率为 0.49%, 多糖含量达 87.17%, 单糖组成以葡萄糖为主和少量甘露糖组成的多糖, 其物质的量比为 31.85 : 1.00, 含有 16 种氨基酸, 氨基酸总量为 5.04%。依据甲基化、一维和二维核磁谱图, GL-PPSQ₂ 结构重复单元为主链由 $\rightarrow 3$ - β -D-Glcp-(1 $\rightarrow$) 构成, 每 4 个 $\rightarrow 3$ - β -D-Glcp-(1 $\rightarrow$) 在 O-6 位连接一个长支链, 该支链由 α -D-Glcp-(1 $\rightarrow$), $\rightarrow 4,6$ - β -D-Glcp-(1 $\rightarrow$), $\rightarrow 4$ - β -D-Glcp-(1 $\rightarrow$) 和 $\rightarrow 6$ - β -D-Glcp-(1 $\rightarrow$) 依次相连构成。 **结论** 通过膜技术和凝胶色谱分离纯化得到活性多糖肽, 该方法简便、快速, 为灵芝提取物及其产品中多糖肽质量控制提供了科学依据。

关键词: 灵芝; 赤芝; 多糖肽; 结构研究; 膜超滤技术; 质量控制

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2019)02-0336-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.02.011

Structure and application of *Ganoderma* polysaccharide peptide GL-PPSQ₂

LIN Dong-mei¹, LUO Hong-jian¹, WANG Sai-zhen¹, LIN Zhan-xi¹, LIN Shu-qian¹, LIN Zhi-bin²

1. National Engineering Research Center of JUNCAO Technology, Fuzhou 350002, China

2. Department of Pharmacology, School of Basic Medical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China

Abstract: Objective To study the structure of active polysaccharide peptide purified from *Ganoderma lucidum* aqueous extract, and used as a reference substance for the determination of polysaccharide peptide content in *G. lucidum* products. **Methods** GL-PPSQ₂ was obtained by hot water extraction, separation and purification with membrane ultrafiltration and gel-filtration chromatography. The physicochemical determination and spectral data were used for structural identification. The content of polysaccharide peptide was detected by HPLC with UV detector, water was used as mobile phase and the flow rate was 1 mL/min. **Results** GL-PPSQ₂ was a pure polysaccharide peptide with purity above 97%, molecular weight of 5.0×10^4 , polysaccharide content of 87.17%, and yield of 0.49%. The monosaccharides composition analysis showed that GL-PPSQ₂ was glucose-based polysaccharide with a small amount of mannose, which contained 16 kinds of amino acids with the total amount of amino acids of 5.04%. Based on the methylation analysis, 1D and 2D NMR spectroscopy, the repeating unit of GL-PPSQ₂ was composed of $\rightarrow 3$ - β -D-Glcp-(1 $\rightarrow$) backbone, with four repeating units connected a long chain branch at O-6 which was composed of α -D-Glcp-(1 $\rightarrow$), $\rightarrow 4,6$ - β -D-Glcp-(1 $\rightarrow$), $\rightarrow 4$ - β -D-Glcp-(1 $\rightarrow$) and $\rightarrow 6$ - β -D-Glcp-(1 $\rightarrow$) in sequence. **Conclusion** The active polysaccharide peptide was isolated and purified by membrane technology and gel chromatography. The method was simple and rapid, which provided a scientific basis for the quality control of polysaccharide peptide in *G. lucidum* extract and its products.

Key words: *Ganoderma*; *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst.; polysaccharide peptide; structural characterization; membrane ultrafiltration technology; quality control

收稿日期: 2018-07-03

基金项目: 国家科技部国家菌草工程技术研究中心组建项目 (2011FU125X11)

作者简介: 林冬梅 (1975—), 女, 博士, 从事药用菌活性成分研究和产品开发。E-mail: lzxjuncao@163.com

*通信作者 王赛贞 (1946—), 女, 高级工程师, 从事药用菌活性成分研究和产品开发。E-mail: wangszh46@163.com

#并列第一作者 罗虹建 (1987—), 女, 硕士, 从事食药菌活性成分分离纯化和质量控制。E-mail: 569958895@qq.com

灵芝 *Ganoderma* 为一种重要真菌,是补益强壮、扶正固本的珍贵药材,具有多种生理活性与药理作用。灵芝主要化学成分有多糖类、三萜类、核苷类、生物碱类和呋喃类等。灵芝多糖(肽)是灵芝重要生物活性物质之一,也是灵芝产品质量控制的指标之一。灵芝多糖(肽)提取与分离的经典方法是采用热水提取,将水提液浓缩后,加入3倍乙醇使多糖沉淀析出。因有蛋白质存在,通常又采用 Sevag 法或用蛋白酶法与正丁醇-氯仿(1:1)联合脱蛋白,分离纯化所得纯多糖成分与原有多糖肽结构显然不同。Hikino 等^[1]从日本 Kanagawa 产的灵芝中分离葡聚糖肽(peptidoglycans),临床观察有降糖的活性。何云庆等^[2]从灵芝子实体中分离一种肽含量为5.4%、由12种氨基酸组成的多糖(polysaccharide BN₃C),其具有促进核酸蛋白质合成代谢作用,改善造血功能。

本课题组从灵芝中分离出一种活性多糖肽 GL-PP,药理活性研究证明,灵芝多糖肽具有对氧自由基损伤巨噬细胞的保护作用^[3]、抗氧化作用^[4]、在体外可抑制人肺癌 PG 细胞的侵袭性^[5]。在此基础上,本实验对 GL-PP 进行凝胶渗透色谱分离,获得灵芝多糖肽 GL-PPSQ₂ 纯品,并对其化学结构进行研究。同时将灵芝多糖肽 GL-PPSQ₂ 作为一种灵芝活性对照品,建立高效液相色谱法测定灵芝产品中多糖肽含量,为灵芝产品品质评价提供依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

灵芝由国家菌草工程技术研究中心提供,由中国科学院微生物研究所卯晓岚研究员鉴定为赤芝 *Ganoderma lucidum* (Leyss.ex Fr.) Karst. 的干燥子实体。系列已知相对分子质量的右旋糖酐(Dextran)来自中国食品药品检定研究院;单糖标准品葡萄糖和甘露糖,质量分数99%(Sigma公司);透析袋截留相对分子质量7000,购自北京宏达生物技术有限公司;甲醇(色谱醇)、三氟乙酸(TFA)与二甲亚砜(DMSO)购自德国默克公司;其余试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器

AKTAflux6 中空纤维膜分离系统(GE公司);Bruker AVANCE III 600 MHz 高分辨质谱仪,使用5 mm CYBBFO 的超低温宽带探头;Trace2000/MS,色谱柱:DB-5MS(30 m×0.25 mm, 0.25 μm), (Thermo 菲尼根公司);L-8900 氨基酸自动分析仪

(日本日立公司);Waters2515 输液泵、2424 蒸发光散射检测器、2414 示差检测器、waters 色谱工作站及数据处理系统[沃特世科技(上海)有限公司];电子天平 XP105DR [梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司];Millipore-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司)。

2 方法与结果

2.1 灵芝多糖肽提取、分离和纯化

称取适量鹿角状灵芝切片,按料液比为1:10→1:15的热水提取2次,合并2次获得的提取液,进 AKTAflux6 中空纤维膜分离系统分离纯化^[6],先后通过 7.5×10^5 中空纤维柱,表面积: $100 \text{ cm}^2 \sim 1\,400 \text{ cm}^2$,管道内径: $3.2 \text{ mm} \sim 6.4 \text{ mm}$,进口压力(pf): $0.00 \sim 2 \times 10^5 \text{ kPa}$;进口体积流量: $100 \sim 6\,000 \text{ mL/min}$;回流压力(Pr): $0.01 \sim 1 \times 10^3 \text{ kPa}$;输送体积流量: $20 \sim 1\,000 \text{ mL/min}$;滤出体积流量: $20 \sim 1\,000 \text{ mL/min}$;膜通量(TMP): $30 \sim 4 \times 10^3 \text{ kPa}$ 。利用该参数弃除 7.5×10^5 以上的溶液(细小杂质),继而将留下的溶液通过 1.0×10^4 柱分离,截留相对分子质量为 1.0×10^4 以上溶液,浓缩,3倍乙醇沉淀、洗涤和干燥,获得灵芝多糖肽(得率为原料的1.90%),命名为 GL-PP^[7]。

称取灵芝多糖肽 GL-PP,加水微热溶解,配成一定浓度溶液,过 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜,滤液采用凝胶渗透色谱法分离纯化。色谱条件:高效制备液相附紫外检测器;制备柱采用凝胶柱,以流动相为超纯水等度洗脱;收集到的液体上 HPLC 检测追踪,收集含单一组分的物质,浓缩,乙醇沉淀得到灵芝多糖肽纯品 GL-PPSQ₂ (得率0.49%)。

2.2 GL-PPSQ₂ 理化性质研究

2.2.1 GL-PPSQ₂ 质量分数的测定 采用面积归一法测定 GL-PPSQ₂ 的质量分数。Waters2535 液相色谱仪,配以紫外检测器,色谱条件:TSK G4000PW 柱,流动相为水;体积流量 1.0 mL/min ,进样量 $10 \mu\text{L}$,柱温 $35 \text{ }^\circ\text{C}$ 。上机分析 GL-PPSQ₂ 显示的色谱峰,计算 GL-PPSQ₂ 所占全部峰面积的百分比。高效凝胶渗透色谱法(HPGPC)分析结果显示 GL-PPSQ₂ 是单一对称峰,表明它是一种均一多糖(图1-a)。

2.2.2 GL-PPSQ₂ 相对分子质量的测定 采用高效体积排除色谱法(HPSEC)法,实验使用 Waters1515 液相色谱附示差检测器。色谱条件:TSK G4000PW 柱,柱温 $35 \text{ }^\circ\text{C}$,0.05%叠氮钠水溶液为流动相,体

积流量 1.0 mL/min, 进样量 10 μ L。用系列已知相对分子质量的右旋糖酐 (dextran) 为对照, 测定 GL-PPSQ₂ 水溶液的峰位相对分子质量。以标准相对分子质量的对数值为纵坐标, 相应色谱峰的保留

时间为横坐标作图, 经 Empower 软件三阶校正拟合, 其方程为 $\log \text{ 相对分子质量} = 20.80 - 5.98T^1 + 8.20 T^2 - 0.04 T^3$, $r = 0.999 3$, 峰位相对分子质量 (M_p) = 5.0×10^4 。(图 1-b)。

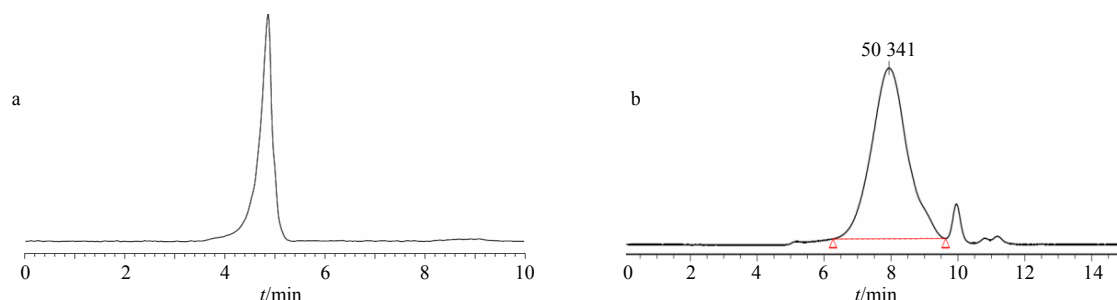


图 1 GL-PPSQ₂ 质量分数 (a) 和相对分子质量 (b) 的测定图谱

Fig. 1 Chromatogram of purity (a) and molecular weight (b) of GL-PPSQ₂

2.2.3 单糖组成分析 采用亲水作用色谱-蒸发光散射检测法 (HILIC-ELSD) 测定单糖的组成。色谱条件: ACQUITY BEH Amide 柱, 流动相为乙腈-0.2%氨水 75:25。体积流量 1.0 mL/min, 进样量 10 μ L, 柱温 35 $^{\circ}$ C。ELSD 的参数: 飘移管温度 50 $^{\circ}$ C; 雾化器 (空气) 压力 275.8 kPa; Empower 软件计算。样品前处理: 经 2 mol/L TFA 完全水解的 GL-PPSQ₂, 蒸干水解液, 用流动相溶解, 通过 0.45 μ m 滤膜, 滤液上机测定。结果显示, 经前处理的 GL-PPSQ₂ 试液与标准的葡萄糖和甘露糖的色谱图比较, 确定 GL-PPSQ₂ 是以葡萄糖为主和少量甘露糖组成的多糖, 其物质的量比为 31.85:1.00 (图 2-a)。采用苯酚-硫酸法测定总糖含量为 87.17%。

2.2.4 氨基酸分析 称取 2 份 GL-PPSQ₂, 分别为

10.83 mg 和 13.17 mg, 置于安瓿瓶中, 每份加 1:1 盐酸 10 mL, 混匀封口, 100 $^{\circ}$ C 水解 22 h, 放冷, 滤过水解液并蒸干, 用水定容至 5 mL, 该液通过 0.45 μ m 滤膜, 滤液供氨基酸分析仪测定。测定结果表明 GL-PPSQ₂ 由 16 种氨基酸组成, 分别为天冬氨酸 (Asp)、苏氨酸 (Thr)、丝氨酸 (Ser)、谷氨酸 (Glu)、甘氨酸 (Gly)、丙氨酸 (Ala)、半胱氨酸 (Cys)、缬氨酸 (Val)、蛋氨酸 (Met)、异亮氨酸 (Ile)、亮氨酸 (Leu)、酪氨酸 (Tyr)、苯丙氨酸 (Phe)、赖氨酸 (Lys)、组氨酸 (His)、精氨酸 (Arg), 其总量为 5.04% (图 2-b)。

2.3 甲基化分析

参考文献报道的方法^[8]进行实验分析。干燥的 GL-PPSQ₂ 溶于无水 DMSO (0.5 mL) 中, 然后加

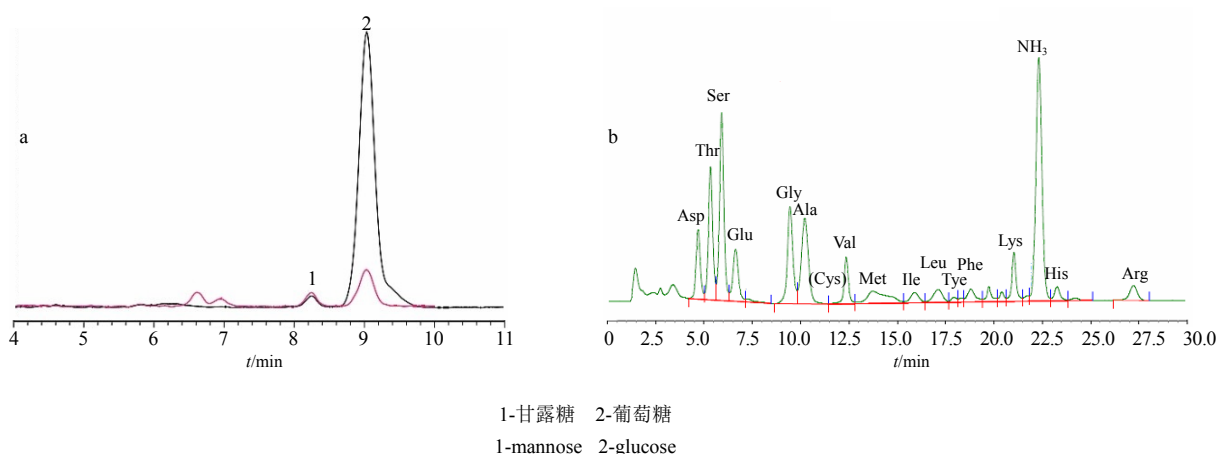


图 2 GL-PPSQ₂ 单糖组成 (a) 和氨基酸组成 (b) 分析图谱

Fig. 2 HPLC chromatogram of monosaccharide composition (a) and amino acid composition (b) of GL-PPSQ₂

入干燥的 NaOH (20 mg) 并将混合物在室温下搅拌 3 h, 搅拌 2.5 h 加入 0.3 mL 甲基碘进行甲基化。甲基化多糖用 3 mL 二氯甲烷萃取, 然后通过氮气流蒸发。IR 光谱中 -OH 带 ($3\ 200\sim3\ 700\text{ cm}^{-1}$) 消失证实了完全甲基化。甲基化多糖用 0.5 mL 4.0 mol/L 三氟乙酸 (TFA) 在 100 °C 水解 6 h。在室温下用硼氢化钠 (3 mg) 还原水解产物 12 h, 然后在 100 °C 下用乙酸酐 (0.5 mL) 乙酰化 2 h。所得部分甲基化的糖醇乙酸酯 (PMAA) 通过 GC-MS 分析 (30 m $\times$ 0.25 mm, 0.25 μ m) 的 DB-5MS 柱 (Thermo Finnigan TRACE 2000/MS), 以 180~270 °C, 20 °C/min 的速率程序升温, 在 270 °C 保温 25 min。通过 GC 中的质谱和相对保留时间鉴定 PMAA 的个别峰和碎裂模式, 将甲基化糖的百分比估计为峰面积的比率。甲基化分析结果表明多糖 GL-PPSQ₂ 中存在 6 种葡萄糖残基, 其糖苷键类型和物质的量比见表 1。

2.4 一维、二维核磁共振分析

将 50 mg 多糖肽 GL-PPSQ₂ 溶解于 0.5 μ L 的重水中, 振荡 5 min, 放置在 60 °C 恒温箱内 30 min。

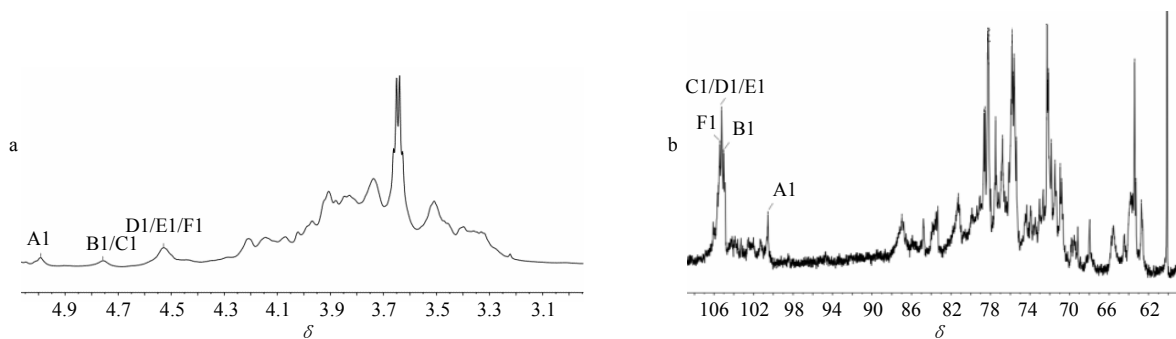
表 1 GL-PPSQ₂ 甲基化分析

t_R /min	甲基化碎片	糖苷键类型	物质的量比
12.794	2,3,4,6-Me4-Glcp	Glcp-(1 $\rightarrow$	5.32
13.999	2,4,6-Me3-Glcp	$\rightarrow$ 3)-Glcp-(1 $\rightarrow$	2.85
14.133	2,3,6-Me3-Glcp	$\rightarrow$ 4)-Glcp-(1 $\rightarrow$	3.79
14.461	2,3,4-Me3-Glcp	$\rightarrow$ 6)-Glcp-(1 $\rightarrow$	1.54
15.853	2,3-Me2-Glcp	$\rightarrow$ 4,6-Glcp-(1 $\rightarrow$	0.41
15.973	2,4-Me2-Glcp	$\rightarrow$ 3,6-Glcp-(1 $\rightarrow$	1.00

¹H-NMR、¹³C-NMR、COSY、TOCSY、HSQC、HMBC 和 NOESY 均使用 5 mm CYBBFO 的超低温宽带探头, 在 Bruker AVANCE III 600 MHz 高分辨谱仪上完成。

2.4.1 GL-PPSQ₂ 一维分析 从 ¹H-NMR (图 3-a) 谱中可以发现, 异头氢区 δ 4.40~5.80, 有 3 个信号分别为 δ 4.99、 δ 4.76 和 δ 4.53; 在 ¹³C-NMR 谱中, 异头区 δ 90~112 范围内, 有 4 个信号 δ 105.42、 δ 105.23、 δ 105.02 和 δ 100.52。根据异头区的碳氢信号可知, δ 4.99 处的糖残基为 α 构型的吡喃葡萄糖残基; δ 4.76 和 δ 4.53 处的糖残基为 β 构型的吡喃葡萄糖残基。根据甲基化分析可知 GL-PPSQ₂ 中共有 6 种葡萄糖残基组成, 推测 δ 4.76 和 δ 4.53 处由于信号重叠严重可能含有多种葡萄糖残基信号^[9]。通过 ¹³C-NMR (图 3-b) 谱分析可知, δ 4.76 处含有 2 种葡萄糖残基, δ 4.53 处含有 3 种葡萄糖残基; 将 GL-PPSQ₂ 中 6 种葡萄糖残基的异头氢从低场到高场排列分别命名为残基 A、B、C、D、E 和 F。

2.4.2 GL-PPSQ₂ 二维分析 结合 2D-NMR 谱对 GL-PPSQ₂ 的结构进行分析鉴定, 在 COSY 谱 (图 4-c) 中, 从 H-1 出发根据交叉峰信号可以依次确定其他氢的化学位移; 在 TOCSY 谱 (图 4-g) 中, 同一自旋体系中所有氢原子会在一条直线上出现相关信号, 可以对氢的化学位移进行进一步验证和归属; 在 HSQC 谱 (图 4-e) 中, 可以显示碳氢之间的相关信号, 根据氢的化学位移对其碳的化学位移进行一一归属, 多糖 GL-PPSQ₂ 中葡萄糖残基的碳氢化学位移归属见表 2。根据文献报道糖苷键连接的碳化学位移会向低场强偏移 δ 7~10, 从而得

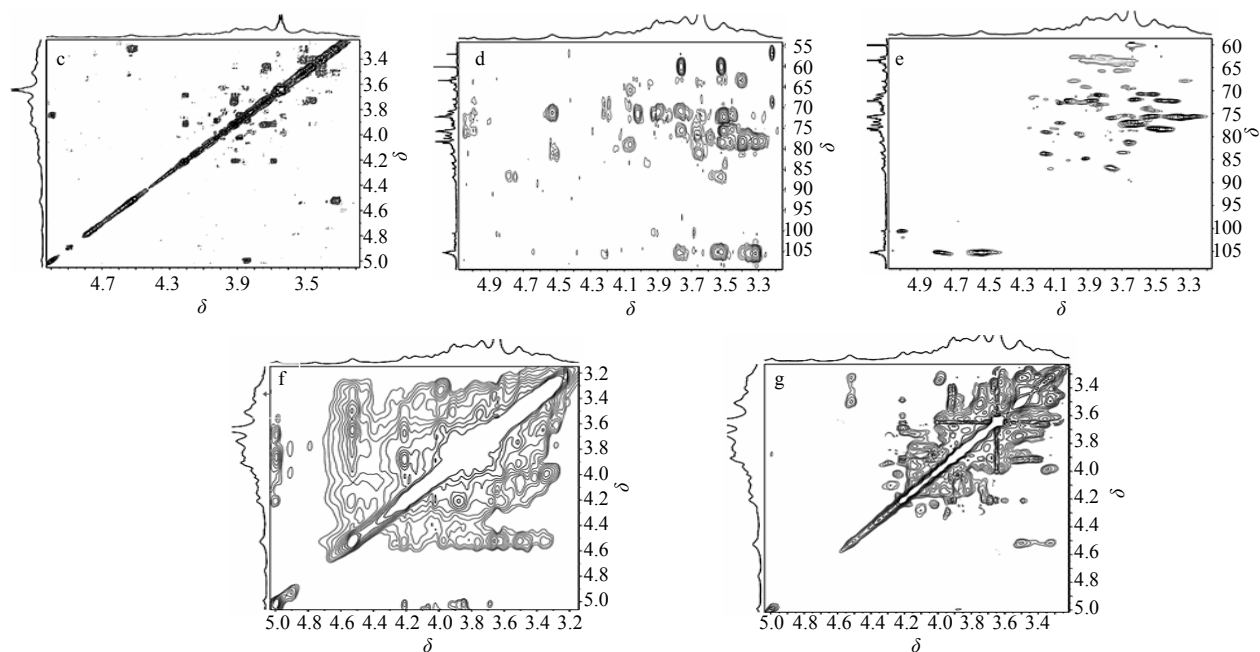


A1~E1 代表相应残基的 1 号位氢或者碳的化学位移

A1—E1 represent chemical shift of hydrogen or carbon at position 1 of corresponding residue

图 3 GL-PPSQ₂ ¹H-NMR (a) 和 ¹³C-NMR (b) 谱图

Fig. 3 ¹H-NMR (a) spectrum and ¹³C-NMR (b) spectrum of GL-PPSQ₂



c~g 分别代表 COSY、HMBC、HSQC、NOESY、TOCSY 谱

c~g represent COSY, HMBC, HSQC, NOESY, and TOCSY spectrum, respectively

图 4 GL-PPSQ₂ 的二维谱图Fig. 4 2D NMR spectra of GL-PPSQ₂表 2 GL-PPSQ₂ 葡萄糖残基的化学位移Table 2 Chemical shift of glucose residues in GL-PPSQ₂

糖残基	糖苷键类型	H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6a, H6b/C6
A	α -Glc _p -(1→	4.99/100.52	3.85/72.98	3.89/72.29	3.66/69.81	3.42/75.92	3.81, 3.97/62.80
B	→3)-β-Glc _p -(1→	4.76/105.02	3.56/75.74	3.76/86.98	3.63/71.86	3.53/75.59	3.73, 3.91/63.48
C	→3,6)-β-Glc _p -(1→	4.76/105.02	3.37/75.61	3.76/86.98	3.63/71.86	3.69/76.83	3.69, 3.91/69.12
D	→4)-β-Glc _p -(1→	4.53/105.23	3.33/75.83	3.49/75.79	3.66/81.27	3.55/75.46	3.73, 3.91/63.48
E	→4,6)-β-Glc _p -(1→	4.53/105.23	3.52/75.83	3.75/75.98	3.68/76.72	3.55/75.46	3.69, 3.91/69.12
F	→6)-β-Glc _p -(1→	4.53/105.42	3.33/75.83	3.49/75.69	3.52/70.79	3.55/75.46	3.86, 4.21/71.48

到 A 残基为 α -Glc_p-(1→、B 残基为 →3)-β-Glc_p-(1→、C 残基为 →3,6)-β-Glc_p-(1→、D 残基为 →4)-β-Glc_p-(1→、E 残基为 →4,6)-β-Glc_p-(1→、F 残基为 →6)-β-Glc_p-(1→。

GL-PPSQ₂ 的结构重复单元中糖残基的连接顺序可以通过 HMBC 谱(图 4-d)中异头氢和碳的交叉峰信号进行推断,并可以通过 NOESY 谱(图 4-f)中异头氢和其他氢的交叉峰信号进一步的确认。

多糖 GL-PPSQ₂ 中葡萄糖残基的 HMBC 谱分析结果见表 3,由结果可知残基 A 和残基 E 的 C-6 和 C-4 相连;残基 B 和残基 B/C 的 C-3 相连;残基 C 和残基 B 的 C-3 相连;残基 D 和残基 D 的 C-4 以及残基 F 的 C-6 相连;残基 E 和残基 D 的 C-4 相连;

残基 F 和残基 F 的 C-6 以及残基 C 的 C-6 相连。

多糖 GL-PPSQ₂ 中葡萄糖残基的 NOESY 谱分析结果见表 4,从中可知残基 A 和残基 E 的 C-6 和 C-4 相连;残基 D 和残基 D 的 C-4 以及残基 F 的 C-6 相连;残基 E 和残基 D 的 C-4 相连;残基 F 和残基 F 的 C-6 以及残基 C 的 C-6 相连,这一结果进一步验证了 HMBC 的分析结果^[10-11]。

2.5 HPLC 法测定灵芝多糖肽含量

2.5.1 色谱条件 色谱柱为 TSK G4000PW 柱(300 mm×7.5 mm, 17 μm);流动相为水,体积流量 1 mL/min,进样量 10 μL,紫外检测波长 280 nm。在此色谱条件下,多糖肽分离较好,色谱图见图 5。

2.5.2 对照品储备液的制备 精密称取干燥至恒定

表 3 GL-PPSQ₂ 中葡萄糖残基的 HMBC 谱分析结果

Table 3 Results of HMBC spectrum analysis of glucose residues in GL-PPSQ₂

糖残基	糖苷键类型	H-1 化学位移	相关碳信号		
			碳化学位移	糖残基	碳原子
A	α -Glc p -(1 $\rightarrow$	4.99	69.12, 76.72	E, E	C-6, C-4
B	$\rightarrow$ 3)- β -Glc p -(1 $\rightarrow$	4.76	86.98	B/C	C-3
C	$\rightarrow$ 3,6)- β -Glc p -(1 $\rightarrow$	4.76	86.98	B	C-3
D	$\rightarrow$ 4)- β -Glc p -(1 $\rightarrow$	4.53	81.27, 71.48	D, F	C-4, C-6
E	$\rightarrow$ 4,6)- β -Glc p -(1 $\rightarrow$	4.53	81.27	D	C-4
F	$\rightarrow$ 6)- β -Glc p -(1 $\rightarrow$	4.53	71.48, 69.12	F, C	C-6, C-6

表 4 GL-PPSQ₂ 中葡萄糖残基的 NOESY 谱分析结果

Table 4 Results of NOESY analysis of glucose residues in GL-PPSQ₂

糖残基	糖连接方式	H-1 化学位移	NOE 相关氢信号		
			氢化学位移	糖残基	氢原子
A	α -Glc p -(1 $\rightarrow$	4.99	3.69, 3.91, 3.68	E, E, E	H-6a, H-6b, H-4
D	$\rightarrow$ 4)- β -Glc p -(1 $\rightarrow$	4.53	3.66, 3.86, 4.21	D, F, F	H-4, H-6a, H-6b
E	$\rightarrow$ 4,6)- β -Glc p -(1 $\rightarrow$	4.53	3.66	D	H-4
F	$\rightarrow$ 6)- β -Glc p -(1 $\rightarrow$	4.53	3.86, 4.21, 3.69, 3.91	F, F, C, C	H-6a, H-6b, H-6a, H-6b

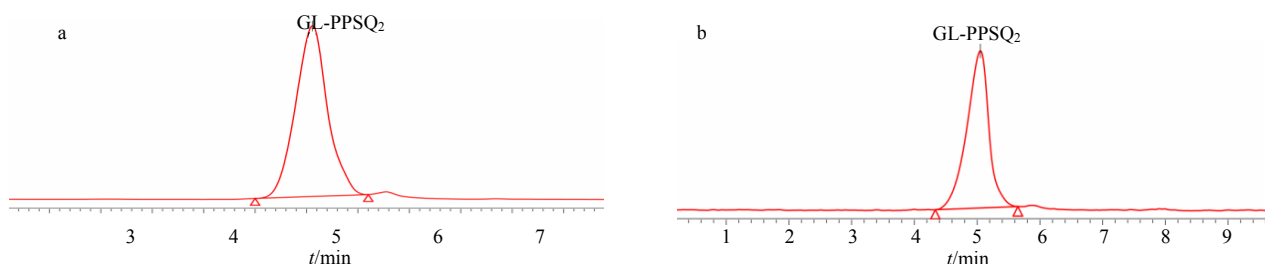


图 5 灵芝样品 (a) 与 GL-PPSQ₂ 对照品 (b) 的 HPLC 色谱图

Fig. 5 HPLC chromatograms of *G. lucidum* sample and GL-PPSQ₂

质量的多糖肽对照品 2.15 mg 于 5 mL 量瓶中,用流动相溶解并定容,得到质量浓度为 0.43 mg/mL 的多糖肽对照品储备液。

2.5.3 供试品溶液的制备 精确称取灵芝提取物 50 mg,加水微热溶解并定容至 5.0 mL,10 000 r/min 离心 10 min。取上清液 1 mL,加 3 倍无水乙醇于 10 000 r/min 离心 10 min,沉淀用流动相溶解并定容至 10 mL,过 0.22 μ m 滤膜后得供试品溶液,备用。

2.5.4 线性关系考察 分别取 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.8、1.0 mL,用水定容至 1 mL,得质量浓度分别为 43、86、129、172、215、258、344、430 μ g/mL 的工作液,以质量浓度为横坐标 (X),峰面积为纵坐标 (Y),绘制质量浓度-峰面积标准曲

线,得线性回归方程 $Y=1.28 \times 10^3 X-1.42 \times 10^4$, $r^2=0.999$ 1。结果表明,组分在 43~430 μ g/mL 与峰面积呈良好线性关系。

2.5.5 精密度试验 精密吸取多糖肽对照品质量浓度为 430 μ g/mL 的溶液,连续进样 6 次,峰面积的 RSD 为 0.7%,表明仪器精密度良好。

2.5.6 重复性试验 精确称取 6 份灵芝样品,按“2.5.3”项下方法制备供试品溶液,在上述色谱条件进样测定。结果表明,峰面积的 RSD 为 2.2%,保留时间的 RSD 为 0.1%,表明本方法的重复性良好。

2.5.7 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于制备后 0、2、4、6、8、10 h 时进样,结果表明,样品溶液在 10 h 内保留时间和峰面积无明显的变化,

样品保留时间和峰面积的 RSD 均为 0.4%，表明样品溶液在 10 h 内稳定性良好。

2.5.8 加样回收试验 分别取已知含量的灵芝样品，精密加入与样品中含有量相当的多糖肽对照品，按供试品溶液制备方法制备待测溶液，按上述色谱条件测定，计算平均回收率为 98.86%，RSD 为 2.42%。

2.5.9 样品含量测定 称取全国主要灵芝产地的灵芝提取物（编号 1~6）和灵芝胶囊（编号 7~10）各 50 mg，按“2.5.3”项下方法制备供试品溶液进行测定，计算多糖肽含量，结果见表 5。

3 讨论

GL-PPSQ₂ 是一种多糖肽纯品，质量分数 97% 以上，得率为 0.49%。多糖含量达 87.17%，单糖组成分析显示 GL-PPSQ₂ 主要为葡萄糖和少量甘露糖组成的多糖，其物质的量比为 31.85:1，含有 16 种氨基酸，氨基酸总量为 5.04%，其峰位相对分子质量 (M_p) 为 5.0×10^4 。综合核磁共振分析、单糖组成和甲基化分析，可知多糖肽 GL-PPSQ₂ 结构重复单元主链由 $\rightarrow 3$ - β -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 构成，每

4 个 $\rightarrow 3$ - β -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 在 O-6 位连接一个长支链，该支链由 α -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow 4,6$)- β -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow 4$)- β -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 和 $\rightarrow 6$)- β -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 依次相连构成。其可能的结构见图 6。

AKTAflux6 中空纤维膜分离系统，是根据分子与膜孔径大小，利用滤膜将目标物和杂质分开的一种物

表 5 灵芝提取物和胶囊中多糖肽的含量 ($n=3$)

Table 5 Polysaccharide peptide content in *G. lucidum* extracts and capsules ($n=3$)

样品	编号	产地及批号	GL-PPSQ ₂ /%
灵芝提取物	1	山东济宁 (170805)	32.93
	2	福建三明 (170909)	28.05
	3	四川益城 (170621)	22.05
	4	浙江龙泉 (170805)	25.61
	5	吉林蛟河 (170812)	27.04
	6	福建福州 (170907)	19.46
灵芝胶囊	7	湖南怀化 (170101)	16.92
	8	安徽宿州 (170322)	15.39
	9	重庆 (170315)	13.92
	10	河南郑州 (170106)	20.35

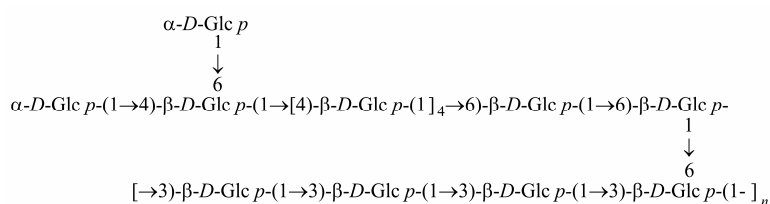


图 6 多糖肽可能的结构

Fig 6 Possible structure of polysaccharide peptide

理操作方法。依据这原理，用开放式孔道未经离心和预过滤，即可截留 7.5×10^5 以上杂质，再采用膜分离截留相对分子质量 1.0×10^4 以上的灵芝多糖肽，快速完成多糖肽的富集和纯化，简化复杂的分离纯化程序。

探讨 GL-PPSQ₂ 的结构，目的是采用明确结构的活性多糖肽作为灵芝产品测定对照品来衡量灵芝产品质量。它较现行的测定灵芝多糖采用葡萄糖或葡聚糖做对照品所具有的优势为：（1）检验方法简单，快速准确可靠；（2）灵芝产品在生产过程中添加淀粉或糊精等辅料，对本检验工作不存在测定干扰问题，确保产品检验数据的可信度^[12]；（3）该对照品可作为活性成分表征产品质量，为评价灵芝产品的质量提供科学依据。

参考文献

- [1] Hikion H, Konno C, Mirin Y. *et al.* Isolation and hypoglycemic activity of ganoderane A and B, glycans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies [J]. *Planta Med*, 1985, 51(4): 339-340.
- [2] 何云庆, 李荣芷, 陈琪, 等. 灵芝扶正固本有效成分灵芝多糖的化学研究 [J]. *北京医科大学学报*, 1989, 21(3): 225-227.
- [3] You Y H, Lin Z B. Protective effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides peptide on injury of macrophages induced by reactive oxygen species [J]. *Acta Pharm Sin*, 2002, 23(9): 787-791.
- [4] 游育红, 林志彬. 灵芝多糖肽的抗氧化作用 [J]. *药学报*, 2003, 38(2): 85-88.
- [5] 曹琦珍, 林树钱, 王赛贞, 等. 灵芝多糖肽对人肺癌细

- 胞侵袭的影响 [J]. 北京大学学报: 医学版, 2007, 39(6): 653-656.
- [6] 陈 灵, 罗九甫. 利用中空纤维超滤分离和浓缩灵芝多糖 [J]. 上海交通大学学报, 1996, 30(11): 114-117.
- [7] 王赛贞, 丁 侃, 林树钱, 等. 赤芝多糖肽 GL-PP-3A 的分离纯化和结构研究 [J]. 药学学报, 2007, 42(10): 1058-1061.
- [8] Guo Q, Cui S W, Wang Q, *et al.* Fractionation and physicochemical characterization of psyllium gum [J]. *Carbohydr Polymers*, 2008, 73(1), 35-43.
- [9] Wang P Y, Zhu X L, Lin Z. Antitumor and immunomodulatory effects of polysaccharides from broken-spore of *Ganoderma Lucidum* [J]. *Frotiers Pharmacol*, 2012, 3(135): 1-8.
- [10] Agrawal P K. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides [J]. *Phytochemistry*, 1992, 31(10): 3307-3330.
- [11] Wang Y T, Liu Y F, Yu H Z, *et al.* Structural characterization and immune-enhancing activity of ahighly branched water-soluble β -glucan from the spores of *Ganoderma lucidum* [J]. *Carbohydr Polymers*, 2017, 167: 337-344.
- [12] 陈 颖, 王赛贞, 林树钱. 用 Folin-酚法测定灵芝产品中多糖肽含量 [J]. 海峡药学, 2007, 19(7): 37-39.