

DOI: 10.3724/SP.J.1096.2010.00372

灵芝多糖的结构特征分析

何晋浙 邵平 孟祥河 孙培龙*

(浙江工业大学生物与环境工程学院食品系, 杭州 310032)

摘 要 采用沸水回流法从灵芝子实体中提取多糖,经 *Sevage* 法除蛋白,乙醇沉淀,离心、透析、膜分离,浓缩、冻干后得灵芝多糖。经 HIO_4 氧化、Smith 降解及甲基化反应,并利用多糖及刚果红混合液在碱性溶液中的波长的红移变化,通过 UV-VIS, IR, GC, GC-MS, NMR 对灵芝水提多糖的结构特征及三螺旋体结构进行分析研究。结果表明:灵芝多糖含有三螺旋体构型,GC-MS 分析灵芝多糖的主要单糖组分为葡萄糖,还有少量的半乳糖、甘露糖、木糖和艾杜糖,IR 及 ^1H NMR 分析多糖为 β -构型, HIO_4 氧化、Smith 降解和甲基化分析表明:多糖主要为(1 $\rightarrow$ 3)糖苷键连接构型,并伴有少量的 1 $\rightarrow$ 6 位支链键连接的结构,灵芝多糖是由 D-葡萄糖单元通过 β -(1 $\rightarrow$ 3)糖苷键连接葡聚多糖,其主要构型特征为(1 $\rightarrow$ 3) β -D-线性连接的骨架结构。

关键词 灵芝多糖; 结构特征; β -葡聚糖; 三螺旋体

1 引言

灵芝是中国名贵的中药材,具有滋补强身、扶正固本、轻身延年之功效,属多孔菌科类真菌^[1],其水提物的主要活性组分是多糖。近年来,越来越多的研究表明,真菌多糖具有强烈的抗肿瘤、抗病毒、抗衰老、抗氧化、降血糖及免疫活性作用^[2]。而真菌多糖的生物活性与多糖的结构存在重要的构效关系^[3]。目前,虽然对灵芝多糖的活性研究报道较多,但对其多糖结构作全面深入的分析研究报道鲜见。蒋志国等^[4]采用高速逆流色谱方法分离纯化香菇中的多糖;孙元琳等^[5]采用红外光谱和 GC 方法分析当归多糖水解后的单糖组成。本研究主要对赤灵芝多糖结构进行提取与纯化,采用膜分离,并经 HIO_4 氧化及甲基化反应,通过紫外可见光谱(UV-VIS)、红外光谱(IR)、气相色谱-质谱(GC-MS)、核磁共振(NMR)对灵芝多糖三螺旋体结构及多糖的结构特性进行了全面的分析研究,以促进灵芝多糖的药理作用及其构效关系的研究。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Labscale 小型切向流超滤系统(美国 Millipore 公司);UV2450 紫外分光光度计(日本岛津公司);Nicolet 6700 型红外光谱仪(美国尼高力公司);6890N 气相色谱仪(美国 Agilent 公司),DB-1701 毛细管色谱柱;Finnigan trace DSQII 气相色谱-质谱联用仪(美国热电公司),DB-1 色谱柱;ANANCE III 500 M 核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司)。三氟乙酸、赤鲜醇、岩藻糖、阿拉伯糖为进口试剂,其余单糖与试剂均为国产分析纯试剂,*Sevage* 试剂为氯仿-正丁醇(4:1, V/V)混合溶液。

2.2 实验方法

2.2.1 多糖的提取与纯化 灵芝子实体为灵芝(金华寿谷药业有限公司提供)。灵芝子实体切片后粉碎,分多次称取 60 g,按料液比 1:10 在微沸状态下回流 2 h,取上清液,残渣反复提取 3 次,合并上清液,真空浓缩。并以 *Sevage* 法除蛋白,在每 100 mL 浓缩液中加 20 mL *Sevage* 试剂,剧烈振荡 30 min,以 4000 r/min 离心 15 min,取上清液,加无水乙醇至溶液含量达 95%,静置过夜,收集沉淀物。再依次用 95% 乙醇、乙醚、丙酮洗涤各两次,得粗多糖。再用蒸馏水溶解,经 Millipore 超滤器和采用 10 K 膜包蒸馏水透析 8 h,分别取 10, 30, 50 和 100 K 膜包下载流组分,浓缩、以乙醇沉淀提取,冷冻干燥制得灵

2009-07-05 收稿;2009-09-29 接受

本文系国家高技术研究发展计划 863 计划(No. 2007AA10Z337)和浙江省科技厅项目(No. 2008C32030)资助

* E-mail: sunpeil@163.com

芝多糖。

2.2.2 甲基化反应 以改良 Hakmori 法进行多糖甲基化反应^[6]。经 P_2O_5 充分干燥的 15 mg 灵芝多糖样品置于反应瓶中,在充 N_2 及磁力搅拌下,以 6 mL 除水的二甲亚砜(DMSO)充分溶解多糖样品,加入 240 mg NaOH 搅拌 30 min,在室温下避光过夜,随后置于冰浴中,缓慢加入 3.6 mL CH_3I ,在常温超声浴中反应 8 min 后,通 N_2 驱赶剩余的 CH_3I ,重复 2 次甲基化,12 K MWCO 透析袋流水透析 24 h,浓缩和冻干,至多糖甲基化,IR 图谱在 3400 cm^{-1} 处无羟基吸收峰。

2.2.3 多糖乙酰化反应 在 6 mg 甲基化多糖样品中加入 2 mL 甲酸,100 °C 密闭水解 6 h,减压蒸发至干,再加入 4 mL 2 mol/L 三氟乙酸,110 °C 密闭水解 6 h,减压蒸发至干,加 3 mL 甲醇,减压蒸发至干,如此重复 3 次。溶解于 5 mL 蒸馏水中,加 30 mg $NaBH_4$,于室温下还原 3 h,然后用冰醋酸中和过量的 $NaBH_4$,加入少量甲醇,减压浓缩蒸干,重复 3 次。真空干燥过夜后,加 12 mL 醋酸酐,100 °C 反应 1 h。再加入少量甲苯,减压浓缩蒸干,溶于 3 mL 氯仿中,用少量蒸馏水充分振荡洗涤,如此重复 3 次。氯仿层以适量无水 Na_2SO_4 干燥过夜后,过滤,用氯仿定容至 10 mL,供 GC-MS 分析。

2.2.4 多糖 HIO_4 氧化 分别取 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 和 4.0 mL 15 mmol/L $NaIO_4$ 标准溶液蒸馏水定容至 4 mL,取 0.1 mL,稀释 250 倍后,在 223 nm 下测定其光密度,制作标准曲线。称取灵芝多糖 25 mg,用少量水溶解后,再加入 15 mmol/L $NaIO_4$ 溶解并定容至 25 mL,置于暗处,室温下进行反应,间隔 6 h 取样 0.1 mL,蒸馏水稀释 250 倍后测定直至光密度达稳定值,加乙二醇终止反应,由 $NaIO_4$ 标准曲线,计算 HIO_4 消耗量,同时取 2 mL 反应液测定甲酸消耗量。剩余部分进行 Smith 降解:12 K MWCO 透析袋流水透析 48 h,未透出液减压蒸馏浓缩至约 30 mL,置小烧瓶中,加 150 mg $NaBH_4$ 避光还原 28 h,然后用醋酸中和反应液至中性,浓缩、蒸干,如此重复 3 次,获多聚糖醇。称取 10 mg 多聚糖醇,再加入 2 mL 2 mol/L 三氟乙酸,同上述乙酰化方法进行水解、乙酰化反应,供 GC-MS 分析。

2.2.5 三螺旋体结构分析 由多糖和刚果红混合物在 NaOH 介质下,由可见光谱的最大吸收波长的漂移变化进行分析。

2.2.6 色谱操作条件 检测器为火焰检测器(FID)。气相色谱条件为:柱温初温 150 °C,以 10 °C/min,升至 220 °C,恒温 30 min。进样口温度 230 °C,分流比 1:25,检测器温度 250 °C,氢气 35 mL/min,空气 350 mL/min,尾吹气 35 mL/min。气质色谱条件:以 2 °C/min 升温,其它操作条件与 GC 同。

3 结果与讨论

3.1 多糖的红外光谱(IR)分析

多糖分别经 10, 30, 50 和 100 K 膜包分离后,以 100 K 以上的膜分离多糖截留组分含量最高,以该组分多糖进行特性分析研究。图 1 显示了灵芝多糖(GLP)的红外光谱,其特征谱带分别在 3419.1 , 2926.1 , 1623.2 , 1400.3 , 1078.4 和 894 cm^{-1} ,具有明显的多糖特征谱带^[7], 3419 cm^{-1} 是由于 O—H 的伸缩振动引起的, 2926 cm^{-1} 较弱的峰是 C—H 键伸缩振动引起的, 1623 cm^{-1} 处出现的较强的峰是 C—O 伸缩振动引起的, 1400 cm^{-1} 附近出现的峰是由于 C—H 的变角振动引起的, 1078 cm^{-1} 附近出现的峰是常见的吡喃糖环内酯和羟基的吸收产生的吸收峰,是由于糖环上 C—O—O 醚键的不对称伸缩振动,构成了糖类的特征吸收峰,也是葡聚糖典型的红外光谱信号。此外, 894.8 cm^{-1} 是典型的吡喃葡聚糖和 β -型糖苷键连接特征吸收峰^[8]。说明灵芝多糖是 β -型葡聚糖构型。

3.2 HIO_4 氧化及 Smith 降解

灵芝多糖经 HIO_4 氧化 100 h 稳定后,用紫外分光光度法于 223 nm 波长检测反应终止产物,测得每摩尔己糖消耗 0.035 mmol IO_4^- ,释放 0.017 mmol 甲酸。分析结果显示, HIO_4 消耗量极低,说明灵芝多糖很可能主要存在一些不可被 HIO_4 氧化的 1 $\rightarrow$ 3 糖苷键,

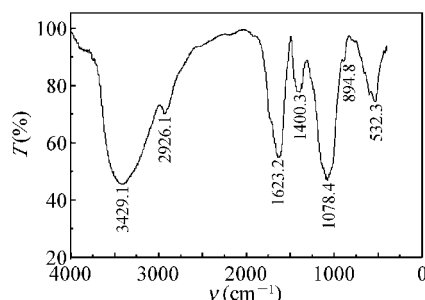


图1 灵芝多糖的红外光谱

Fig. 1 FT-IR spectrum of ganoderma lucidum polysaccharide(GLP)

而 HIO_4 的消耗量与甲酸的释放量约为 2:1 提示可能存在少量的以 1→6 糖苷键或非还原末端基(1→)连接的糖苷键。由于 1→2, 1→4 位键合的糖基经 HIO_4 氧化后, 每个糖基仅消耗一分子 HIO_4 , 并不释放甲酸, 结合 Smith 降解产物 GC 及 GC-MS 的分析, 定量测定的主要单糖糖醇产物为葡萄糖, 及少量的半乳糖、甘露糖和木糖, 并有极少量的甘油。生成的降解产物中未测得赤藓糖, 推测可能不存在 1→2, 1→4 位键, 说明多糖主干结构为 1→3 葡聚糖。

3.3 甲基化反应

灵芝多糖甲基化产物的 GC-MS 总离子图如图 2 所示, 灵芝多糖的主要组分为葡萄糖(Glc, $t_R = 18.78 \text{ min}$, 气相色谱外标定量分析得到同样结果)。甲基化分析结果如表 1 所示, 糖链的骨架结构主要是由→3) Glup→1 组成, 并存在少量 1→3 链接的半乳糖(Gal)、甘露糖(Man)、木糖(Xyl)、艾杜糖(Idi), 和少量以 1→6 位键连接的葡萄糖和艾杜糖, 产生的其它单糖数量非常低, 可忽略不计。离子碎片见图 3, 质谱中的 m/z 43 是甲基化乙酸糖酯(PMAA) 的基峰, 是失去乙酰基离子(CH_3CO^+) 形成的, m/z 145, 259 和 289 的碎片是己糖质谱图的特征峰, PMAA 的次级碎片离子主要为 CH_3COOH (60), CH_3OH (32), CH_2O (30)。分析结果与 HIO_4 氧化、Smith 降解和部分酸水解等结果一致。

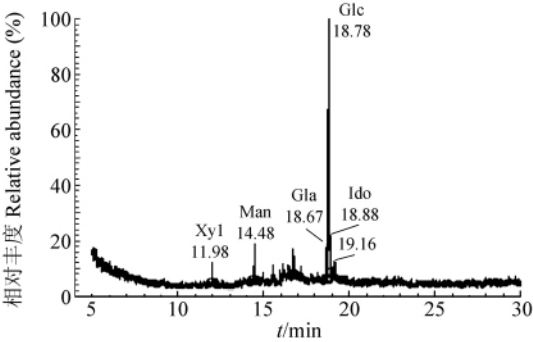


图 2 甲基化糖醇 GC-MS 总离子图

Fig. 2 GC-MS total ion graph for methylated alditol

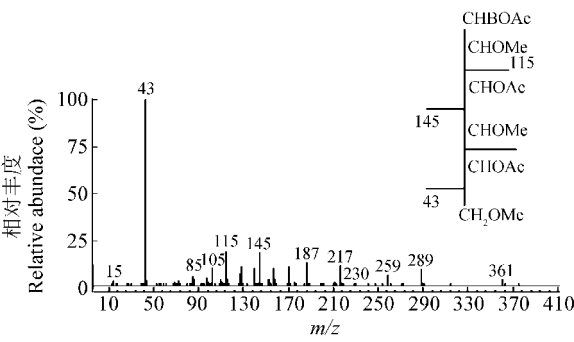


图 3 甲基化乙酰基葡萄糖醇离子碎片

Fig. 3 Methylation acetyl glucitol ion fragments map

表 1 灵芝多糖 GC-MS 主要甲基化糖分析数据

Table 1 GC-MS data for methylated sugar of GLP

甲基化糖醇 Methylated alditol	主要离子碎片 Main ion fragment (m/z)	连接类型 Type of linkage	摩尔比 Molar ratio
2 β -tri- <i>O</i> -methyl galactitol	43, 85, 103, 115, 139, 187, 217, 259, 289	→3) Glap→1	5.79
2 β -tri- <i>O</i> -methyl glucitol	43, 85, 103, 115, 145, 187, 217, 259, 289	→3) Glup→1	70.13
2 β -tri- <i>O</i> -methyl mannitol	43, 85, 103, 115, 145, 187, 217, 259, 289	→3) Manp→1	8.55
2 β -tri- <i>O</i> -methyl iditol	43, 85, 103, 115, 145, 161, 187, 259	→6) Idip→1	7.15
2 β -tri- <i>O</i> -methyl glucitol	43, 85, 103, 115, 145, 161, 187, 259	→6) Glup→1	8.73

3.4 核磁共振(NMR) 分析

核磁分析 ^1H 谱和 ^{13}C 谱分别见图 4a 和图 4b。 ^1H NMR 谱显示, 质子信号几乎都出现在 δ 3.30 ~ 4.89 区间内, 提示是典型的多糖信号, 且 H-1 质子化学位移 $\delta < 4.95$, 可判断为 β 型-链接的吡喃糖苷键构型^[9, 10]。此外, ^{13}C NMR 谱显示有 6 个清晰的碳信号, 表明共有 6 个碳, 推测该化合物为单糖, 其中化学位移 $\delta > 104$ 异头碳信号 1 个, 是 β 型-糖苷键构型, 为 β -D-葡聚糖的异头碳^[11], 而且碳信号在 δ 110 ~ 90 之间只有一个信号, 这进一步说明每个重复糖单位中有 1 个糖基单元的存在^[12], 从而可确认每个重复单位中 1 个糖基单元都是六碳糖, 其它的碳信号化学位移在 δ 105.19, 78.54, 76.72, 72.25, 70.75 和 62.63 处, δ 62.63 ~ 78.54 是糖环碳, 据碳谱信号、 δ 位移及结合 GC-MS 分析, 该糖信号为葡萄糖构型, 6 个碳信号化学位移分别相应于 C-1 (δ 104.7), C-3 (δ 78.54), C-5 (δ 76.72), C-2 (δ 72.25), C-4 (δ 70.75) 和 C-6 (δ 62.63), 而未发生取代的 C-2, C-3, C-4 的化学位移通常在 δ 70.0 ~ 77.0, 如在 78 以上有信号表示肯定有一个碳发生取代^[4], 说明 C-3 发生了取代。在多糖结构中, 异头碳 C-1 信号出现在 δ 105.19 是由(1→3)- β -D-吡喃葡萄糖连接构型产生的, C-3 和 C-6 信号分别出现在 δ 78.54 和

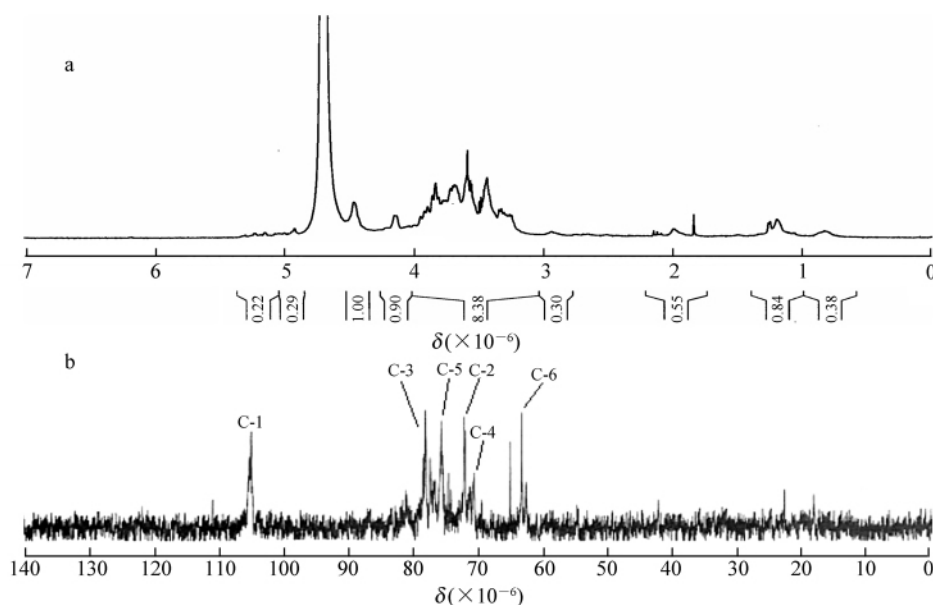


图4 灵芝多糖¹H NMR谱图(a)和¹³C谱图(b)

Fig.4 ¹H NMR spectrum(a) and ¹³C NMR spectrum(b) of GLP

δ 62.63 处,是由于β-吡喃葡萄糖基的存在,碳谱的信息给出了非常明显的灵芝多糖是由β-(1→3)-D-糖苷键连接的葡聚糖结构信号。这与红外及GC-MS分析相一致。以上结果表明,灵芝多糖的结构是一个主链为线性骨架结构(1→3)-连接的β-D-Glcp多糖,并伴有少量的1→6位键连接的,其主要结构为下列构型:

这也与许多真菌多糖结构为β-(1→3)-链接为主链,伴有β-(1→6)支链—的D-葡聚糖结构报道相一致^[13]。

3.5 三螺旋体结构分析

文献[14]报道,葡聚糖的抗氧化性和免疫性与三螺旋体结构的存在具有重要的相关性。三螺旋体结构分析主要采用刚果红及刚果红多糖混合液在碱性溶液中的其紫外光谱会发生位移变化而进行分析。图5显示,刚果红溶液和刚果红-多糖混合液在0.2 mol/L NaOH中,其紫外波长发生了18 nm的位移,刚果红溶液波长在500 nm处,刚果红-多糖混合液波长在518 nm处,随着NaOH浓度增加至0.6 mol/L,多糖的三螺旋体结构被破坏,红移消失,说明了多糖结构由于碱浓度的增加将从有序结构破坏至无序结构,这也是一个典型的(1→3)-β-D-Glcp的三螺旋体结构性质。因为卷链能影响线性分子间氢键的稳定性^[15]。

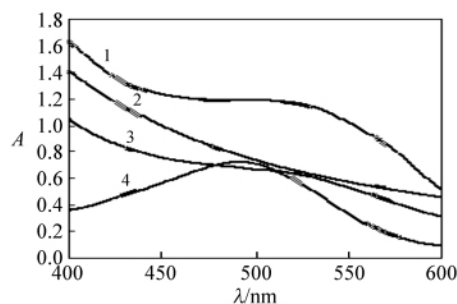


图5 不同碱浓度下刚果红与多糖混合液的波长变化

Fig.5 Absorption wavelength change of Congo red-polysaccharide complex at different NaOH solutions

1. 0.2 mol/L NaOH 刚果红与多糖混合液 (Congo red-polysaccharide complex at 0.2 mol/L NaOH); 2. 0.2 mol/L NaOH 多糖溶液 (Polysaccharide at 0.2 mol/L NaOH); 3. 0.6 mol/L NaOH 刚果红与多糖混合液 (Congo red-polysaccharide complex at 0.6 mol/L NaOH); 4. 0.2 mol/L NaOH 刚果红溶液 (Congo red at 0.2 mol/L NaOH)。

References

- 1 JIANG Yan(江艳), WANG Hao(王浩), LÜ Long(吕龙), TIANG Geng-Yuan(田庚元). *Acta Pharmaceutica Sinica* (药学报), **2005**, 40(4): 347~350
- 2 Russell R, Paterson M. *Phytochemistry*, **2006**, 69: 1469~1495
- 3 GAO Xiao-Rong(高小荣), LIU Pei-Xun(刘培勋). *Chinese Traditional and Herbal Drugs* (中草药), **2004**, 35(2): 229~231

- 4 JIANG Zhi-Guo(蒋志国) , DU Qi-Zhen(杜琪珍) , SHENG Li-Yi(盛利赅) . *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学) , **2009** , 37(3) : 412 ~ 416
- 5 SUN Yuan-Lin(孙元琳) , SHEN Rui-Ling(申瑞玲) , TANG Jian(汤 坚) , GU Xiao-Hong(顾小红) , LI Yuan-De(李远德) . *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学) **2008** , 36(3) : 348 ~ 352
- 6 ZHANG Wei-Jie(张惟杰) . *Techniques of Sugar Complex Biochemistry*(糖复合物生化研究技术) . Hangzhou(杭州) : Zhejiang University Press(浙江大学出版社) , **1994**: 140 , 142 , 204 , 244
- 7 KANG Xue-Jun(康学军) , QU Jian-Song(曲见松) , GU Zhong-ZE(顾忠泽) . *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学) , **2006** , 34(4) : 533-535
- 8 Virkki L , Johansson L , Ylinen M , Maunu S , Ekholm P. *Carbohydrate Polymers* , **2005** , 59(3) : 357 ~ 366
- 9 Wu Y L , Pan Y J , Sun C R. *International Journal of Biological Macromolecules* , **2005** , 36(4) : 241 ~ 245
- 10 LIU Yu-Hong(刘玉红) , WANG Feng-Shan(王凤山) . *Food and Drug*(食品与药品) , **2007** , 9(8) : 39 ~ 43
- 11 SHI Lei(石 磊) , CHEN Kao-San(陈靠山) , DONG Qun(董 群) , FANG Ji-Nian(方积年) , DING Kan(丁 侃) . *Chem. J. Chinese Universities*(高等学校化学学报) , **2007** , 28(6) : 1088 ~ 1091
- 12 CAI Meng-Shen(蔡孟深) , LI Zhong-Jun(李中军) . *Carbohydrate Chemistry Fundamentals , Reactions , Synthesis , Isolation and Structures*(糖化学 基础、反应、合成、分离及结构) , Beijing(北京) : Chemical Industry Press (化学工业出版社) , **2007**: 374
- 13 Frank S , Bruce A S , Robert T C B , Barbara M M , Robert J S. *Carbohydrate Research* , **2006** , 341(3) : 365 ~ 373
- 14 Mao C F , Hsu M C , Huang W H. *Carbohydrate Polymers* , **2007** , 68(3) : 502 ~ 510
- 15 Dilip R , Soumitra M , Indranil C , Syed S I. *Carbohydrate Research* , **2008** , 343(5) : 982 ~ 987

Analysis of Structural Characteristics of Polysaccharide from *Ganoderma Lucidum*

HE Jin-Zhe , SHAO Ping , MEN Xiang-He , SUN Pei-Long^{*}

(Food Department , College of Biology and Environmental Engineering , Zhejiang University of Technology , Hangzhou 310032)

Abstract Polysaccharide was extracted by boiling water reflux method from the fruiting body of *Ganoderma lucidum*. Additionally , the purified polysaccharide was obtained by removing protein with Sevage way , ethanol precipitation , centrifugation , run water dialysis , membrane separation , concentration and frozen-drying. The structural characteristics , chain conformation and triple-helix conformation of *ganoderma lucidum* polysaccharide (GLP) were distinguished by Smith degradation , methylation analysis , and the wavelength change of the red shift of the mixture of polysaccharide and Congo red in alkaline solution , as well as IR , GC-MS , NMR , and visible spectrometry. The results indicated that GLP was a linear (1→3) β -D-Glcp main chain linkage. Its monosaccharide component was predominantly composed of D-Glc , and small amount of galactose , mannose , xylose and idose , residues of branches terminated with substituted at 1→6 by a small number of single-unit β -D-Glcp side-chains , it's also observed that the (1→3) -linked β -D- glucan contained a triple-helical conformation , which was composed of a repeating unit with a structure as below:

Keywords *Ganoderma lucidum* polysaccharide; Structural characteristics; β -Glucosan; Triple-helix conformation

(Received 5 July 2009; accepted 29 September 2009)