

灵芝多糖的分离纯化及结构鉴定

黄静涵¹, 艾斯卡尔·艾拉提², 毛健^{2,*}

(1. 中国医学科学院阜外心血管病医院心血管病研究所, 北京 100037;

2. 江南大学食品学院, 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 运用 DEAE-Sephadex A25 离子色谱和 Sepharose CL-6B 凝胶色谱分离纯化得到一种灵芝多糖组分 GLPS1a。高效液相凝胶渗透色谱法(high-performance gel-permeation chromatography, HPGPC)法测得其呈单一峰, 重均分子质量为 1.8×10^5 D。GLPS1a 经单糖组成分析、红外、核磁共振等手段分析, 结果表明单糖组成为阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖和木聚糖, 物质的量比率为 4:2:10:1。GLPS1a 具有一条以 $\beta \rightarrow (1,3)$ 位键合的吡喃葡萄糖主链, 同时存在 $\beta \rightarrow (1,3)$ 阿拉伯糖、 β -D-(1,4) 半乳糖、 α -D-(1,2) 木糖和 α -D-(1,6) 葡萄糖的分支残基。

关键词: 灵芝多糖; 分离; 纯化; 结构

Purification and Structural Identification of a Bioactive Polysaccharide Fraction from *Ganoderma lucidum*

HUANG Jing-han¹, AISIKAER Ailati², MAO Jian^{2,*}

(1. Fuwai Hospital and Cardiovascular Institute, Chinese Academy of Medicine Science, Beijing 100037, China; 2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: A novel *Ganoderma lucidum* polysaccharide GLPS1a was purified sequentially by column chromatographies on DEAE-Sephadex A25 and Sepharose CL-6B gel. GLPS1a was eluted as a single symmetrical narrow peak on high-performance gel-permeation chromatography (HPGPC) and the average molecular weight was 1.8×10^5 D. The chromatographic analysis of absolute acid hydrolysate of GLPS1a suggested that its monosaccharide composition was composed of arabinose, galactose, glucose and xylose with a molar ratio of 4:2:10:1. Fourier-transform infrared (FT-IR), ¹H and ¹³C NMR spectroscopy analyses revealed that GLPS1a had a backbone consisting of β -D-(1,3)-linked-D-glucopyranosyl residues with glycosyl residues composed of $\beta \rightarrow (1,3)$ linked arabinose, β -D-(1,4)-galactose, α -D-(1,2)-xylose and (1 $\rightarrow$ 6) linked α -D-glucose residues.

Key words: *Ganoderma lucidum* polysaccharide; separation; purification; structural

中图分类号: Q815

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)12-0301-04

多糖及其复合物具有多方面生物活性和功能, 是一类重要的生物反应调节剂^[1]。真菌类生物可以大规模生产多糖, 而多糖结构复杂, 具有合成困难、成本高、收率低等原因^[2-3], 因此从食药用菌中提取多糖是其重要来源之一。多糖结构是多糖生物活性和功能的基础, 解析出多糖结构有利于多糖的利用和开发。近现代分析技术飞速发展, 多学科和手段联合应用对于多糖结构解析已经普遍实现^[5-10]。目前从灵芝及其发酵体系中分离到数百种多糖, 但由于原料、生产方式、发酵方法以及提取方式不同, 不同学者得到的灵芝多糖的结构也不尽相同。本实验在前期灵芝多糖深层发酵和分离提取的研究基础上^[11-12], 进一步纯化得到灵芝多糖组分 GLPS1a, 同时对该组分的基本结构进行研究, 灵芝为深层发酵多

糖开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

灵芝多糖 实验室制备^[11]; Sepharose CL-6B、DEAE-Sephadex A-25 美国 Pharmacia 公司; Dextran T 系列 美国 Sigma 公司; 苯酚、三氯乙酸、硫酸国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

BSZ-100 自动部分收集器、TH-1000 型梯度混合器 上海青浦沪西仪器厂; HL-2S 型恒流、HD-5 电脑紫外检测仪 上海沪西分析仪器厂; 722 光栅分光光度计 无锡科达智能仪器厂; 高效液相色谱仪 美国 Waters 公

收稿日期: 2011-05-31

作者简介: 黄静涵(1979—), 研究实习员, 硕士, 主要从事冠心病和心律失常研究。E-mail: huangjinghan@sohu.com

* 通信作者: 毛健(1970—), 男, 教授, 博士, 主要从事食品生物技术研究。E-mail: biomao@263.net

司;微量分析天平 上海精密科学仪器有限公司;Delta-320 型酸度计 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;NICOLET NEXUS 470 傅里叶变换红外光谱仪 美国 Thermo Nicolet 公司;AVANCE III 400MHz 全数字化核磁共振谱仪 瑞士 Bruker 公司;Trace MS 气质联用仪 美国热电公司。

1.3 方法

1.3.1 灵芝多糖的分离纯化

称取灵芝粗多糖样品 1.0g,溶于 10mL 磷酸缓冲液中,上 DEAE-Sephadex A-25 柱,蒸馏水、0.3、0.5mol/L NaCl 溶液阶段洗脱,流速 1.5mL/min,每管收集 9mL,苯酚-硫酸法隔管检测多糖含量。各组分浓缩透析除盐、冷冻干燥,得灵芝多糖 GLPS1、GLPS2、GLPS3 和 GLPS4 四个组分(图 1),其中组分 GLPS1 多糖含量占总糖的 75.6%,将 GLPS1 样品复溶,上 Sepharose CL-6B 柱,0.1mol/L pH7.6 的 PBS 缓冲液洗脱,流速 0.5 mL/min,得两个主要峰,收集各主要峰组分,冷冻干燥,得 GLPS1a 和 GLPS1b。

1.3.2 多糖分子质量的测定和纯度鉴定

采用高效液相凝胶渗透色谱法(high-performance gel permeation chromatography, HPGPC)测定 GLPS1a 纯度和分子质量。TSK 及 Ultrahydrogel linear(7.8 × 300mm)双柱串联, Waters-2410 型示差折光检测器,流动相 0.1mol/L 硝酸钠,流速 0.9mL/min,进样量 20 μL,柱温 45℃,记录色谱图。按照 HPLC 相同条件进样 7 种相对分子质量为 6100、16500、26290、40000、84000、158000 和 291000 的标准 Dextran,记录每样品保留时间(T_R),以 T_R 为横坐标,lgM 为纵坐标,绘制标准曲线。相同条件下得样品 GLPS1a 的色谱图,根据峰型分布判断样品纯度,并采用 Millennium 2010 软件分析 GLPS1a 保留时间和相对分子质量。

1.3.3 多糖含量及单糖组成分析

以葡萄糖为标准品,苯酚-硫酸法^[13]测定 GLPS1a 中多糖含量。单糖组成分析:(1)水解:将灵芝多糖样品 GLPS1a 10mg 加入 1.0mol/L H₂SO₄ 2mL,100℃ 封管水解 10h, BaCO₃ 中和至 pH7.0,离心取上清液。(2)衍生物的制备:将上清液浓缩至干,分别加入 10mg 肌醇、10mg 盐酸羟胺、0.5mL 吡啶,90℃ 水浴 30min,加入乙酸酐 0.5mL,乙酰化 30min,反应结束取样。(3)分析检测:GLPS1a 进行气相分析,进样量 0.5 μL;色谱条件:OV1701 30m 柱,载气为 N₂,流速 1.5mL/min,氢火焰检测器,气化室 260℃,检测 250℃,程序升温:180℃ (3min)→240℃ (30min)。根据标准单糖与 GLPS1a 保留时间,确定组成单糖种类,并根据标准单糖、GLPS1a 中单糖及内标峰面积计算物质的量比。

1.3.4 红外光谱测定

GLPS1a 用 KBr 压片,通过 Necolit 5D × B 型红外光谱仪扫描,扫描范围 4000 ~ 400cm⁻¹,次数 32 次,分辨率 4cm⁻¹。

1.3.5 核磁共振测定

GLPS1a 用 D₂O 配成 30mg/mL 溶液,室温下通过 AVANCE 型核磁共振仪测定。

2 结果与分析

2.1 灵芝多糖的分离纯化

灵芝粗多糖通过去除杂质、复溶,DEAE-Sephadex A-25 离子交换柱层析,蒸馏水、0.3、0.5mol/L NaCl 溶液阶段洗脱,得到四个多糖组分 GLPS1、GLPS2、GLPS3 和 GLPS4(图 1)

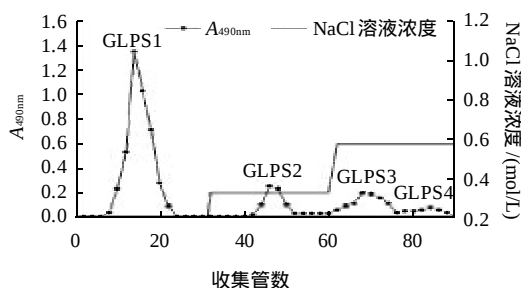


图1 灵芝多糖 DEAE-Sephadex A-25 层析柱洗脱曲线
Fig.1 Anion-exchange elution curve showing the separation of GLPS1a on DEAE-Sephadex A-25

由图 1 可以看出,各组分中多糖含量不同,其中组分 GLPS1 含量最高,占总糖含量的 75.6%,GLPS2、GLPS3 和 GLPS4 的多糖含量分别占总糖含量的 8.3%、11.7% 和 4.4%。由于组分 GLPS1 的多糖含量最高,因此将 GLPS1 继续纯化。GLPS1 经 Sepharose CL-6B 柱层析结果见图 2。

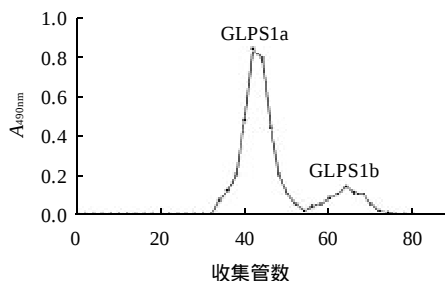


图2 GLPS1 经 Sepharose CL-6B 进一步纯化结果
Fig.2 Further purification of GLPS1 by gel filtration on Sepharose CL-6B

从图 2 可以看出,GLPS1 经再次柱层析后得到两组分 GLPS1a 与 GLPS1b,其中 GLPS1a 含量较大(82.24%),

因此将继续深入研究 GLPS1a 的化学结构。

2.2 灵芝多糖组分 GLPS1a 的纯度鉴定及分子质量测定

HPGPC 结果显示 GLPS1a 峰型单一对称(图3),说明 GLPS1a 为相对单一组分,应用 Millennium 软件分析得出 GLPS1a 相对重均分子质量(M_w)为 1.8×10^5 D。

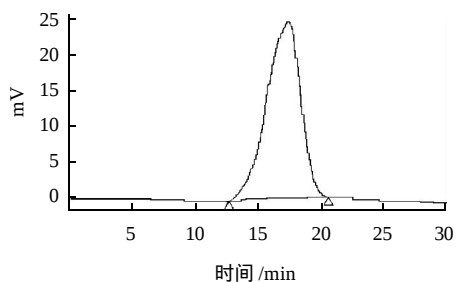
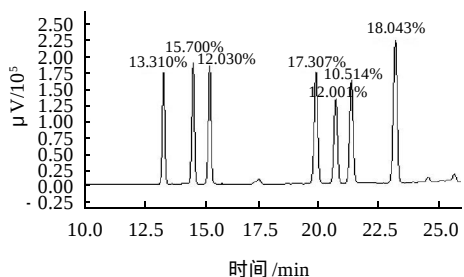


图3 GLPS1a 的 HPGPC 色谱图
Fig.3 HPGPC chromatography of GLPS1a

2.3 GLPS1a 单糖组成分析

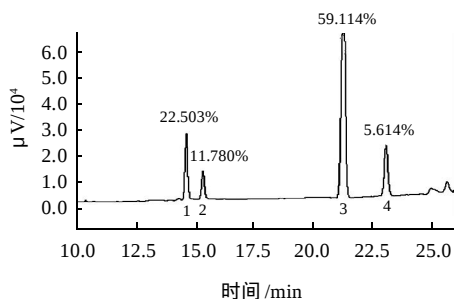
6 种单糖和 GLPS1a 水解产物气相色谱如图 4 和图 5 所示,结果在 GLPS1a 水解产物 GC 图谱上可见到 4 个峰,4 个峰的保留时间与单糖标准品阿拉伯糖、木糖、葡萄糖、半乳糖的结果基本一致,说明 GLPS1a 主要由阿拉伯糖、木糖、葡萄糖和半乳糖四种单糖组成,经计算,4 个峰(4 种单糖)的物质的量比约为 4:2:10:1。



1.鼠李糖, 2.阿拉伯糖, 3.木糖, 4.甘露糖, 5.葡萄糖, 6.半乳糖, 7.肌醇。

图4 单糖标准品糖腈乙酰化气相色谱图

Fig.4 Gas chromatographic patterns of acetylated aldonoitriles of six monosaccharide standards



1.阿拉伯糖, 2.木糖, 3.葡萄糖, 4.半乳糖。

图5 GLPS1a 单糖腈乙酰化气相色谱图

Fig.5 Gas chromatographic patterns of acetylated aldonoitriles of GLPS1a

2.4 GLPS1a 的红外光谱分析

2.4.1 糖类的官能团分析

从样品 GLPS1a 的红外光谱图(图6)中可看到, 3240cm^{-1} 处的吸收峰是糖分子内或分子间氢键 O—H 伸缩振动的结果,说明 GLPS1a 存在分子内和分子键氢键; 2937cm^{-1} 与 1431cm^{-1} 处的吸收峰分别是 C—H 的变角振动和伸缩振动结果,以上吸收峰共同构成多糖特征吸收峰。 1077cm^{-1} 是由 C—O—H 和是糖环的 C—O—C 的 C—O 伸缩振动形成。 1733cm^{-1} 附近为羧基特征吸收峰, 1652cm^{-1} 处为—CHO 的 C=O 伸缩振动峰。

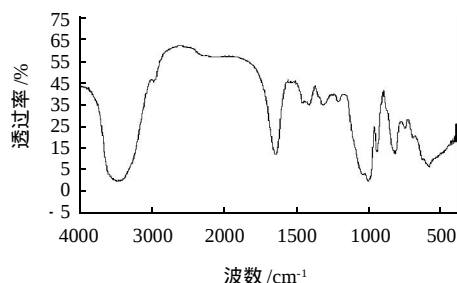


图6 GLPS1a 红外吸收光谱
Fig.6 FT-IR spectra of GLPS1a

2.4.2 糖的吡喃环的振动谱

糖的 α -和 β -端基差向异构体主要由端基的 C—H 变角振动引起。 α -型的差向异构体 C—H 取平伏键,在 850cm^{-1} 处有一吸收峰; β -型的差向异构体 C—H 取直立键,在 890cm^{-1} 处有一吸收峰。从图 6 可以看出,灵芝多糖 GLPS1a 属于 β -端基差向异构体。

2.5 GLPS1a ^1H 和 ^{13}C 核磁共振分析

为了获得更多的 GLPS1a 结构信息,深入了解其化学结构,对其进行核磁共振分析。GLPS1a 的 ^{13}C -NMR 图谱和 ^1H -NMR 图谱见图 7。

由图 7 可知, GLPS1a 的 ^{13}C -NMR 的化学位移数据显示,在 $\delta < 70$ 有 4 个碳信号,证明该多糖有 4 个重复单位存在;在 $\delta 96 \sim 110$ 区域之间的振动分别是由阿拉伯糖、木糖、葡萄糖和半乳糖的异头碳原子引起的,物质的量比率约为 4:2:10:1,与单糖组成分析结果一致。在 $\delta 100$ 和 $\delta 104$ 分别分别有异头碳信号,证实 α 和 β 构型存在。

GLPS1a 的 ^{13}C -NMR 谱在异头碳共振范围内($\delta 98 \sim 110$)内出现 7 个共振信号,说明该 GLPS1a 有 7 个残基(异头碳)组成。 $\delta 98.7$ 与 78.4 分别是异头碳和连接碳位移,说明 GLPS1a 中存在 α -1,2-糖苷键,由于 O 取代发生在 C2 位上,因而连接碳的共振信号向低磁场位移($\delta 70 \sim 75 \rightarrow \delta 76 \sim 85$);同时说明分子中有以 α -1,2-糖苷键连接的侧链存在^[14-15]。 $\delta 102.4$ 和 $\delta 83.7$ 两处的共振信号说明灵芝多糖分子中存在 α -1,4-糖苷键相连接的侧链; $\delta 104.3$

和86.7的共振信号进一步肯定了GLPS1a存在 β -1,3-糖苷键,根据前述红外结果综合判断, β -1,3-糖苷键构成了GLPS1a的主链结构。 δ 105.4和71.8两处的共振信号说明多糖分子中存在 β -1,6-糖苷键相连的侧链;通过分析,GLPS1a中存在 β -D-阿拉伯糖的结构可以用 δ 107.1的共振信号证实; δ 110.4和80.5两处的共振信号说明GLPS1a中存在 β -D-半乳糖的侧链结构; δ 94.5和71.1是 α -D-木糖的C1和链接碳的化学位移。参考文献[16-17]可以将 ^1H 谱的 δ 4.9~5.8异构区域与具有己糖重复单位的GLPS1a特征峰归属。

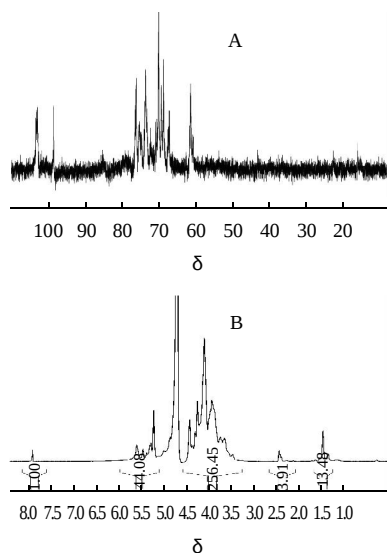


图7 GLPS1a的 ^{13}C -NMR图谱(A)和 ^1H -NMR图谱(B)
Fig.7 ^{13}C -NMR (A) and ^1H -NMR (B) spectrum of GLPS1a

GLPS1a通过一系列结构分析表明,GLPS1a分子质量为 $1.8 \times 10^5\text{D}$,其单糖组成主要有Ara、Xyl、Glc和Gal,其物质的量比率为4:2:10:1,具有一条以 $\beta \rightarrow (1,3)$ 位键合的吡喃葡萄糖主链。综合分析推断GLPS1a的结构重复单元见图8。

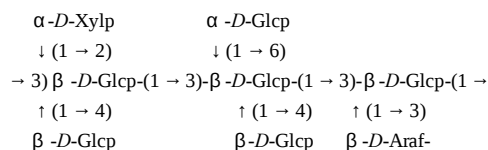


图8 GLPS1a糖链的结构
Fig.8 Possible structure of GLPS1a

3 结 论

采用DEAE-Sephadex A25离子色谱和Sephadex CL-6B凝胶色谱分离纯化得到一种灵芝多糖组分GLPS1a。

HPGPC法测得其呈单一峰,分子质量为 $1.8 \times 10^5\text{D}$ 。通过单糖组成分析、红外、核磁共振等手段分析GLPS1a的糖链结构,结果表明GLPS1a的单糖组成为阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖和木聚糖,物质的量比率为4:2:10:1。GLPS1a具有一条以 $\beta \rightarrow (1,3)$ 位键合的吡喃葡萄糖主链,同时存在 $\beta \rightarrow (1,3)$ 阿拉伯糖、 β -D-(1,4)半乳糖、 α -D-(1,2)木糖和 α -D-(1,6)葡萄糖的分支残基。该灵芝多糖组分结构未见文献报道,为一种新的灵芝多糖。

参 考 文 献 :

- [1] 余工. 糖生物学研究的现状与展望[J]. 生物学教学, 2002, 27(10): 47-49.
- [2] MCGINNIS C D. Preparation of aldonoitrite acetates using *N*-methylimidazole as catalyst and solvent[J]. Carbohydrate Research, 1982, 108(2): 284-292.
- [3] CIUANU I, KEREK F. Analysis of the linkage positions in *D*-fructofuranosyl residues by the reductive-cleavage method[J]. Carbohydrate Research, 1984, 131(2): 209-217.
- [4] 吕金顺. 植物多糖的凹形结构与生物活性关系[J]. 天然产物研究与开发, 2001, 15(4): 79-82.
- [5] USUI T, YOKOYAMA M, YAMOKA N. Proton magnetic resonance spectra of *D*-gluco-oligosaccharides and *D*-glucans[J]. Carbohydrate Research, 1974, 33(1): 105-116.
- [6] WANISKA R D, KINSELLA J E. Comparison of methods for separating oligosaccharide: ultrafiltration, gel permeation and adsorption chromatography[J]. Journal of Food Science, 1980, 45(5): 1259-1261.
- [7] MATHLOUTHI M, KOENIG J L. Vibrational spectra of carbohydrates [J]. Advances in Carbohydrate Chemistry & Biochemistry, 1986, 44: 77-89.
- [8] KOGANG, ALFLÖLDI J, MASLER L. ^{13}C -NMR spectroscopic investigation of two yeast cell wall β -D-glucans[J]. Biopolymers, 1988, 27(7): 1055-1063.
- [9] ENGLYST H N, QUIGLEY M E, HUDSON C J. Determination of dietary fibre as non-starch polysaccharides with gas-liquid chromatographic, high-performance liquid chromatographic or spectrophotometric measurement of constituent sugars[J]. Analyst, 1994, 119(7): 1497-1509.
- [10] 朱淮武. 有机分子结构波谱解析[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [11] 毛健, 马海乐. 应用膜过滤提取灵芝多糖的研究[J]. 食品科学, 2010, 31(4): 123-126.
- [12] 毛健, 马海乐. 灵芝菌体液态深层发酵条件的优化[J]. 食品科学, 2010, 31(23): 377-382.
- [13] DUBOIS M, GILLES K A, HAMILTON J K, et al. Colorimetric method for determination of sugar and related substances[J]. Analytical Chemistry, 1956, 28(3): 350-356.
- [14] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江工业大学出版社, 1999.
- [15] MONDAL S, CHAKRABORTY I, PARMANIL M, et al. Structure studies of water-soluble polysaccharide of an edible mushroom *Termitomyces eurhizus*. A reinvestigation[J]. Carbohydrate Research, 2004, 339(6): 1135-1140.
- [16] 赵桂梅, 张丽霞, 于庭敏, 等. 灵芝孢子粉水溶性多糖分离、纯化及结构分析[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(2): 182-185.
- [17] 林志彬. 灵芝的现代研究[M]. 3版. 北京: 北京大学医学出版社, 2007: 125-144; 195-306.