

灵芝多糖提取及性质分析

郑 静, 韩宏义, 常乃涛, 白 鹏

(丹东农科院, 辽宁 凤城 118100)

摘 要: 从赤灵芝子实体原粉中分离提纯得到 2 种均一多糖 GLP1-1 和 GLP2-2, 并应用 HPLC、SephadexG-100 凝胶层析、IR、UV 等方法对分离得到的 2 种多糖进行纯度鉴别、组分测定及结构分析。结果表明: 多糖 GLP1-1 是由木糖、D-半乳糖、D-葡萄糖、鼠李糖组成, UV 光谱和 IR 光谱显示 GLP1-1 和 GLP2-2 均有多糖的特征吸收, 并且具有 β -吡喃多糖糖基的特征吸收峰; 推断 GLP1-1 和 GLP2-2 为 β -吡喃杂多糖。

关键词: 赤灵芝; 活性多糖; 构效关系; 纯化; 凝胶层析

中图分类号: S 567.3⁺1 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-0009(2011)06-0043-03

赤灵芝(*Ganoderma lucidum*)属担子菌纲(Basidiomycetes)多孔菌科(Polyparaceae)灵芝属(*Ganoderma*)的一种药、食两用高等真菌^[1], 别名红芝、木灵芝。研究证明, 灵芝含有多糖、氨基酸、蛋白质、多肽、甾类、萜类、有机酸挥发油、油脂、生物碱、链烷烃以及多种酶和无机离子等。其中灵芝多糖是灵芝中最有效的成分之一, 与灵芝的多种药理活性有关, 因此也特别受到医药科技工作者的重视, 研究报导也最多。试验采用水提、乙醇分级沉淀的方法得到了 2 个粗多糖级分, 进一步用 DEAE-纤维素和凝胶渗透色谱反复层析, 得到了 2 种均一多糖 GLP1-1、GLP2-2, 并通过多种化学方法及光谱方法对各纯化多糖的化学结构及糖链构象进行了初步鉴定。

1 材料与方法

1.1 试验材料

赤灵芝, 购于沈阳于宏区灵芝栽培基地。

1.2 试验方法

1.2.1 灵芝子实体多糖的分离纯化 灵芝子实体粉的脱脂: 称取灵芝子实体粉 200 g, 加入氯仿: 甲醇(体积比 2:1)混和液 600 mL, 置于 45℃恒温水浴, 冷凝回流 6 h。如此回流脱脂 3 次, 滤出溶剂, 滤渣置烘箱中 40℃烘干。灵芝子实体粉的脱低聚糖: 将经过脱脂的灵芝子实体粉, 按料液比 1:3 加入 80%乙醇 600 mL, 85℃回流 6 h, 滤出溶剂, 如此重复 3 次, 将滤渣烘干保存, 作为以下多糖提取试验的原料。灵芝粗多糖的提取: 将所得滤渣中加入蒸馏水 1 000 mL, 95~100℃提取 6 h, 过滤出溶液, 浸提 4~5 次, 合并滤液, 然后用旋转蒸发仪, 于 40℃将

其浓缩至 500 mL, 5 000 r/min 离心 20 min, 收集沉淀, 沉淀再依次用无水乙醇和乙醚离心洗涤, 最后加沉淀置于真空干燥器抽真空干燥。

1.2.2 总糖的测定 采用苯酚-硫酸法^[2]。

1.2.3 粗多糖的脱蛋白 采用 Sevage 法脱蛋白。

1.2.4 分级沉淀 在粗多糖溶液中边搅拌边滴加冷无水乙醇。至体积比为 1:3, 即乙醇的终浓度为 66%, 置 4℃冰箱中沉淀过夜, 5 000 r/min 离心 20 min, 分别收集沉淀和上清液, 然后将沉淀冷冻干燥的 66%级份(GLP1), 在上清液中加入冷无水乙醇至 1:3(乙醇终浓度为 75%)得到 75%级份(GLP2)。

1.2.5 离子交换柱层析提纯 装柱: 将样品装上处理好的 DEAE-纤维素层析柱中, 以双蒸馏水为洗脱, 分布收集, 洗脱速度为 24 mL/h。苯酚-硫酸法检测。

1.2.6 分离型凝胶柱层析提纯 将样品装上处理好的葡聚糖凝胶 SephadexG-100 层析, 用双蒸馏水洗脱, 用部分收集器收集, 每管/4min(约 2~3 mL/管), 收集约 1~30 管。用苯酚硫酸法测各管多糖含量, 合并洗脱峰各管洗脱液, 旋转蒸发浓缩后, 冷冻干燥精制多糖粉末 GLP1-1。GLP2 按上述步骤纯化得到 GLP2-2。

1.2.7 灵芝多糖的单糖组成及其百分比测定 高效液相法: Sugar-pakTM (4.6×250 mm)氨基柱; 对照样: D-葡萄糖、D-半乳糖、木糖、D-果糖、核糖、鼠李糖、D-甘露糖; 动相: 乙腈: 水= 75:15 (V:V); 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 20 μ L。

1.2.8 紫外扫描 将粗灵芝多糖经 DEAE-纤维素纯化所得到的纯品用双蒸馏水溶解后, 用紫外光谱仪在 190~400 nm 的波长下进行紫外扫描, 测定其最大吸收峰。

1.2.9 红外光谱测定^[3] 溴化钾压片法, 分别取少量经 SephadexG-100 纯化后所得的精多糖, 分别置于玛瑙

第一作者简介: 郑静(1976-), 女, 辽宁丹东人, 硕士, 研究方向为生物技术。E-mail: fcj8824@163.com。

收稿日期: 2011-01-07

研钵中,再加入适量溴化甲粉末载体 研磨后放入压片模具中加压 400 kg, 3 min 后取出样片放入仪器的样品槽中进行测试。

2 结果与分析

2.1 灵芝子实体多糖的分离纯化

2.1.1 离子交换柱层析及所得 GLP1、GLP2 的凝胶层析 GLP66 经过离子交换柱层析,用双蒸馏水进行洗脱。洗脱速度为 60 mL/h, 收集器收集, 每管 4~5 mL, 共 80 管, 洗脱液用苯酚-硫酸显色, 选择波长 495 nm 进行比色分析。分离结果见图 1, 收集一主糖峰, 经浓缩、真空干燥后的 GLP1 1.95 g, 得率为 39%。GLP75 同样经过上述过程 分离结果见图 2, 收集一主糖峰, 经浓缩、真空干燥后的 GLP2 1.35 g, 得率为 27%。将经离子交换层析分离得到的 2 个级分多糖 GLP1 和 GLP2 各 2 g, 配成 10 mg/mL 溶液, 取 10 mL 上样, 用双蒸馏水进行洗脱, 洗脱流速为 0.5 mL/min, 收集器收集, 每管 3~4 mL, 共 100 管, 苯酚-硫酸法于 495 nm 处比色。分离结果见图 3~4。由图 3~4 可知, 经 DEAE-纤维素柱层析、Sephadex G-100 凝胶柱层析 2 种不同性质的层析柱分离后, GLP1、GLP2 分别得到单一对称窄峰 GLP1-1、GLP2-2 可以说明该多糖为单一的多糖组分。经真空干燥称得质量分别为 1.6、1.45 g, 得率分别为 80%、72.5%。

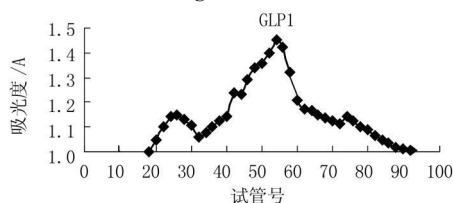


图 1 DEAE-纤维素柱层析分离结果

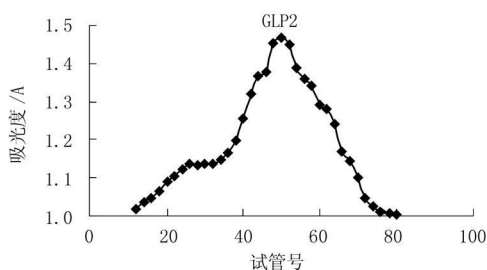


图 2 DEAE-纤维素柱层析

2.1.2 灵芝多糖单糖组成及百分比测定 66%乙醇沉淀多糖 GLP1-1 的单糖组成测定: 66%乙醇浓度沉淀多糖, 经 DEAE-纤维素柱层析、Sephadex G-100 葡聚糖凝胶柱, 收集含糖量高的部分, 蒸干, 称取多糖 5 mg, 溶于 20 mL 蒸馏水中, 取 1 mol/L H₂SO₄ 2 mL 溶解样品, 封管, 100℃水解 10 h, 冷却, BaCO₃ 中和, 离心, 上清液备用。HPLC 法分析单糖组成, 结果如图 5。由表 1 可知, 7 种单糖木糖、D-半乳糖、核糖、果糖、D-葡萄糖、甘露糖、鼠李糖在糖柱中的保留时间分别为 6.967、5.158、6.048、

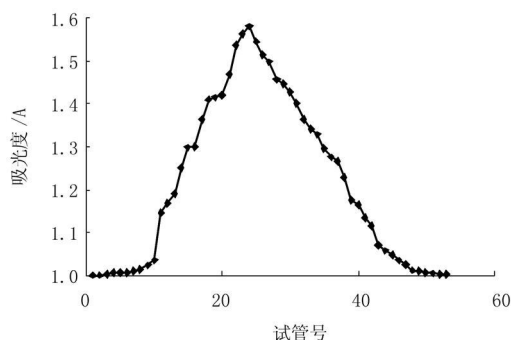


图 3 GLP1 凝胶柱层析结果

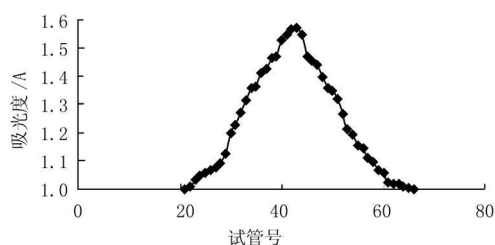


图 4 GLP2 凝胶柱层析结果

7.982、9.190、8.498、5.663 min 结合图 5 分析结果可知该多糖由木糖、D-半乳糖、D-葡萄糖、鼠李糖组成, 其中 D-葡萄糖的含量最高约为 40.26%, 鼠李糖次之为 22.03%、半乳糖为 18.45%、木糖为 12.23%, 说明该多糖不是葡聚糖而是杂多糖。

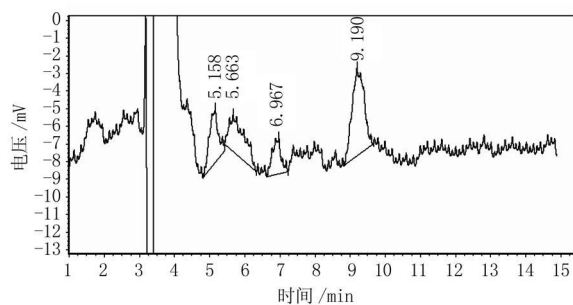


图 5 GLP1-1 浓硫酸水解产物的液相色谱图

表 1 高效液相色谱法单糖组成分析结果

单糖	保留时间/min	峰高	峰面积	含量/%
半乳糖	5.158	3 044.735	54 241.26	18.4466
鼠李糖	5.663	2 074.804	64 771.21	22.0277
木糖	6.967	2 043.657	35 966.41	12.2316
D-葡萄糖	9.190	5 001.189	118 380.50	40.2594

注: % 为质量百分数。

2.1.3 紫外光谱扫描 将灵芝多糖 GLP1-1 和 GLP2-2 用双蒸馏水溶解后, 用岛津紫外分光光度计在 190~600 nm 的波长下进行紫外扫描, 进行紫外光扫描, 结果见图 6~7。从图 6~7 可看出, 2 种不同级份的多糖成分 GLP1-1 和 GLP2-2 在 195 nm 附近有多糖的特征吸收峰, 而在 260 nm 和 280 nm 附近无核酸和蛋白质的吸收峰。

2.1.4 不同级份精多糖的红外光谱鉴定 取精多糖

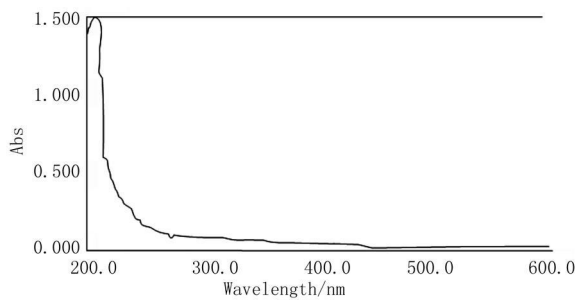


图6 GLP1-1 的紫外吸收光谱

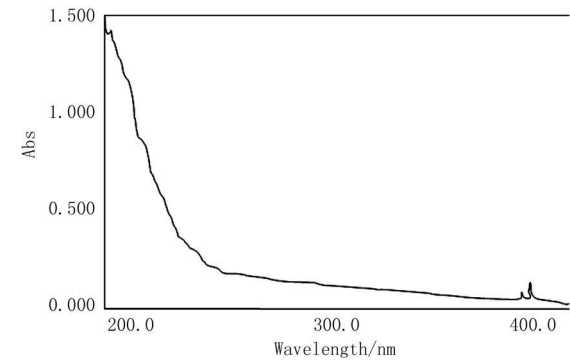


图7 GLP2-2 的紫外吸收光谱

GLP1-1、GLP2-2 各 1 mg 与 KBr 压片,以 KBr 为参照物,用红外光谱仪进行分析,红外光谱分析结果见图 8~9。从图 8~9 可看出,2 种不同的乙醇浓度分级沉淀的多糖,其红外吸收光谱均为典型的多糖吸收谱线,即在 1 400~1 200 cm^{-1} 是 C-H 变角振动,2 930 cm^{-1} 为 C-H 伸缩振动区,3 400 cm^{-1} 出现吸收宽峰,这是 O-H 伸缩振动,1 200~1 030 cm^{-1} 处有吸收峰,这是 C-O 伸缩振动。另外 1 110 cm^{-1} 附近有吸收峰,表明该多糖的单糖为六元杂环,1 640~1 600 cm^{-1} 是乙酰氨基的特征峰。

3 结论与讨论

试验从灵芝子实体原粉中,分离提纯得到 2 种均一多糖 GLP1-1 和 GLP2-2。66%、75%乙醇浓度沉淀精多糖的红外光谱在 1 075 cm^{-1} 处有吸收,1 075 cm^{-1} 为 β -

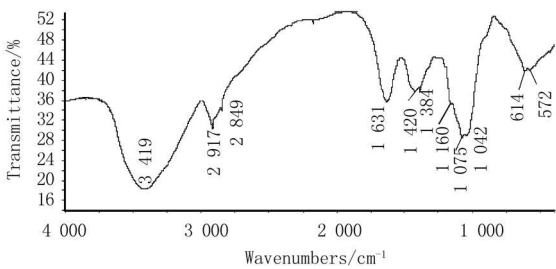


图8 GLP1-1 的红外光谱

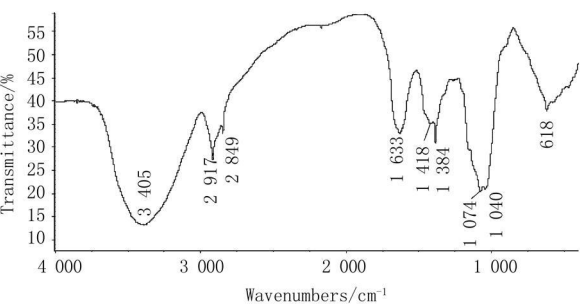


图9 GLP2-2 的红外光谱

吡喃多糖糖基的特征吸收峰,可推断这 2 种多糖为 β -吡喃多糖。说明灵芝子实体多糖以 β -糖苷键相连接,单糖以六元杂环形式存在,含有乙酰氨基基团。

试验通过完全酸水解、紫外光谱以及红外光谱得到了一些初步信息。还可以通过甲基化反应、核磁共振、质谱等方法得出和更详细的结构信息,同时还应进一步验证其药理活性及多糖分子在体内生理活性的机理,探讨多糖的结构 GLP1-1 与 GLP2-2 活性的关系,为新药的筛选和开发做指导。

参考文献

[1] 黄芳,蒙义文.活性多糖的研究进展[J].天然产物研究与开发,1999,11(5):90-98.
[2] 李刚.发酵灵芝菌粉和灵芝子实体中灵芝多糖含量比较[J].中国食用菌,1999,19(1):35-36.
[3] 梁宗岩,张翼伸.斜顶菌水溶性多糖化酶的构效研究[J].生物化学杂志,1985(1):114-117.

Purification and Characterization Analysis of Polysaccharide from *Ganoderma lucidum*

ZHENG Jing, HAN Hong-yi, CHANG Nai-tao, BAI Peng
(Dandong Academy of Agricultural Sciences Fengcheng, Liaoning 118109)

Abstract: The polysaccharides of GLP1-1 and GLP2-2 were extracted and purification from fruitbody *Ganoderma lucidum* by DEAE-cellulase column and gel chromatography. The purity was identified by gel chromatography. It was the sole polysaccharide component. GLP1-1 and GLP2-2 were analyzed by acid hydrolysis and HPLC and structures were studied by infrared spectrum and Ultra-Violet spectrophotometry. The results showed that polysaccharide existed as β -furan sugar and contained no protein and nucleic acid. GLP1-1 was composed of D-galactose, D-xylose, D-glucose, D-rhamnose.
Key words: *Ganoderma lucidum*; active polysaccharide; structure-activity relationship; purification; gel chromatography