

灵芝子实体水溶性多糖的分离和分子量测定*

张俐娜 陈敬华

(武汉大学化学系 武汉 430072)

摘 要 用磷酸盐缓冲液、热水、碱和热碱水分别从灵芝子实体分离出五种水溶性杂多糖 GL1、GL2、GL3、GL4 和 GL5。紫外光谱、红外光谱、气相色谱和硫酸咔唑分析结果表明,它们主要由葡聚糖、木糖、甘露糖、半乳糖组成, GL3、GL4 和 GL5 含葡萄糖醛酸。由粘度、光散射和膜渗透压法测定了特性粘度 $[\eta]$ 、重均分子量 M_w 及数均分子量 M_n , GL2、GL3 和 GL5 多糖的 M_w 值分别为 124×10^4 、 12.8×10^4 和 5.8×10^4 。实验结果表明这些杂多糖含水溶性 D-葡聚糖,并且初步推断,用磷酸盐缓冲液提取出的杂多糖 GL2 中包含刚性链 β -D-葡聚糖。

关键词 灵芝子实体, 多糖, 分子量

近年对灵芝多糖的研究已证明^[1-4],它具有抗肿瘤、抗衰老、抗高血压、抗血脂等生物活性,是理想的药物和保健品。尤其用热水提取的灵芝子实体多糖含带支链的 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖,对抗肿瘤有明显的效果。灵芝多糖的分离、鉴定和结构研究已有不少报道^[1-6]。Sone 等人^[2]用水和碱从灵芝子实体中提取出几种不同支化度的水不溶 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖和水溶性杂多糖,这些杂多糖由 50~85% D-葡萄糖, 5~25% D-半乳糖, 7~16% D-甘露糖, 3~9% D-木糖, 1~3% L-鼠李糖和 L-岩藻糖组成,有的组分含少量阿拉伯糖或葡萄糖醛酸,但未报道它们的分子量。Saito 等人^[6]用碱水提取出一种由葡萄糖和葡萄糖醛酸组成的酸性多糖,同时用凝胶色谱法测得其分子量为 2.7×10^4 。Miyazaki 等人^[7]则从碱提取液中分离出水溶性杂多糖(含岩藻糖、木糖和甘露糖),其分子量为 3.8×10^4 。Usui 等人^[3]由热水提取液通过色谱柱分离得到分子量为 1.01×10^6 和 3.02×10^5 (沉降分析法)两种水溶性 β -D-葡聚糖,并且它们的¹³C-NMR 谱类似裂褶菌聚糖。这些结果表明灵芝多糖组成较复杂,不同作者所分离出的产物不完全相同,而且其组成和分子量数据相差甚大。我们曾从黑木耳子实体分离出两种酸性杂多糖和三种带不同支链的 β -D-葡聚糖,并确定其中一种 β -D-葡聚糖为单螺旋链^[8-10]。灵芝多糖的组成比黑木耳多糖复杂,其分离也更困难。为此本工作首先按照 Sone 等人报道的方法^[2]进行分离,然后用光散射、膜渗透压和粘度法研究它们的分子量和特性粘度。

1 材料和方法

1.1 多糖的分离和纯化

灵芝子实体为市售东北产。按照 Sone 等人报道的方法^[2]进行分离和纯化。分离产物经脱蛋白去色素进一步精制、透析后冷冻干燥得五种多糖,均为淡黄色薄片状。由紫外光度计(UV-160A, Shimadzu)检测,在 200 nm 处有吸收峰,无蛋白质(280 nm)及其它杂质

* 1995-05-26 收稿, 1995-11-03 修稿;国家自然科学基金资助课题

峰.由磷酸缓冲液提取出两种水溶性产物(GL1 和 GL2),由热水、碱和热碱水溶液提取的产物依次为 GL3、GL4 和 GL5.上述五种水溶性多糖精品的产率分别为 0.002%、1.3%、1.1%、0.06%、0.85%.

1.2 多糖成份分析方法

用红外光谱仪(IR-400, 170SX-FT, Nicolet Co.),由溴化钾压片制样测定多糖的特征吸收峰.用毛细管气相色谱法检测多糖中各种单糖的组成,按照我们以前报道的方法^[4],首先将多糖及单糖标样水解和乙酰化,然后用气相色谱仪(GC-7 型)配置开链冠醚色谱柱(28 m× ϕ 0.25 mm)进行检测^[11].多糖中糖醛酸含量按 Bitter 等人报道的硫酸咔唑法检测^[12].

1.3 粘度测定

用日本东京大学生产技术研究所提供的一种改良型粘度计测定多糖在水中 25±0.5℃的粘度,为抑制糖醛酸基引起的静电排斥效应,以 0.5 mol/L NaCl 水溶液为溶剂.由逐步稀释法按 Huggins 和 Kraemer 方程式计算特性粘数 $[\eta]$ 和 Huggins 常数 k' .

1.4 光散射测量

由动态光散射仪(DLS-700, Otsuka Electronics Co.),波长为 633 nm,温度为 25℃下测定 30°到 150°角的散射光强.溶剂为 10% 镭乙二醇(Cadoxen)水溶液,多糖溶液在配制 24 h 之内测量.该溶液的光学纯化:首先用砂芯漏斗过滤,然后通过孔径为 0.2 μ m 的过滤器(MILLEX-HJV)直接过滤到散射池中.GL2、GL3 和 GL5 三种试样在上述溶剂和条件下的折光指数增量分别为 0.347、0.145 和 0.347($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$).由 Zimm 图用外推法计算重均分子量 M_w 、第二维利系数 A_2 和均方旋转半径 $\langle S^2 \rangle$.

1.5 膜渗透压

多糖水溶液的渗透压 π 采用改良型 Bruss 膜渗透计按我们以前所报道的快速静态平衡法^[13]在 25±0.05℃下测量.半透膜为本实验室自制的再生纤维素膜 CN8,平均孔径为 120 nm.数均分子量 M_n 和第二维利系数 A_2 按下式计算:

$$\pi/c = RT(1/M_n + A_2c + \cdots) \quad (1)$$

式中 R 为气体常数, T 为绝对温度(K).

2 结果和讨论

由灵芝子实体分离的五种多糖红外光谱结果表明 GL2、GL3、GL4 和 GL5 四种多糖均在 3400 cm^{-1} 、1650 cm^{-1} 和 1250 cm^{-1} 处有多糖的特征吸收峰而 GL1 试样的多糖特征吸收峰不明显且有大量其它峰.GL3 和 GL5 在 1625 cm^{-1} 和 1425 cm^{-1} 处有吸收,表明含有糖醛酸.GL2、GL3 和 GL4 多糖在 890 cm^{-1} 处有吸收峰,尤其 GL2 的吸收较强,表明它们含 β -D-葡聚糖^[2].此外, GL2、GL3 和 GL4 在 800 cm^{-1} 有甘露糖的特征吸收.四种多糖的气相色谱结果列于表 1. GL1 试样的谱图与红外谱图一样,出现大量其它峰,难以鉴别,故未在此列出.由于该气相色谱难以分辨出糖醛酸,因此我们采用硫酸咔唑法检测得出 GL3 含有 3% 以上糖醛酸, GL4 含有少量糖醛酸.以上结果示出 GL2、GL3、GL4 和 GL5 四种水溶性多糖均由葡聚糖和杂多糖组成.表 1 示出的结果与文献报道^[2,4,5]基本一致. GL1 多糖量较少且组成尚未完全弄清,故未作进一步实验.

Table 1 Components of polysaccharides from fruiting body of *Ganoderma lucidum* (mol ratio)

Samples	Xyl	Man	Glu	Gal	Fuc	Rham	Ara	GluA
GL2	1	0.7	5.8	2.2	0.3	1	-	-
GL3	1.3	1	7.4	-	-	0.2	1	>0.3
GL4	1	1.3	26	0.7	0.3	-	4	少量
GL5	1	-	4.8	-	-	-	-	少量

四种多糖(GL2、GL3、GL4 和 GL5)在水溶液中的比浓粘度 η_{sp}/c 和比浓对数粘度 $\ln \eta_r/c$ 对浓度 c 的关系示于图 1, 由外推法得到的特性粘度 $[\eta]$ 值和 k' 列于表 2. GL3 和 GL5 多糖未显示聚电解质粘度行为, 表示它们所含有的少量糖醛羧基引起的静电排斥效应被抑制. GL2 的 $[\eta]$ 值远远高于一般柔顺链高分子的值, 表明它不属于柔顺链, 例如柔顺链茁霉聚糖 PF803 试样在水溶液中测得 $M_w = 108 \times 10^4$ 、 $[\eta] = 223(\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1})^{[14]}$. 上述红外光谱已指出有 β -D-葡聚糖, 由此初步推断 GL2 多糖中的 β -D-葡聚糖为刚性链, 因为 β -式可形成链有序构象. 此外, 图 1 和表 2 示出分子量较低的多糖(GL3、GL4 和 GL5)其 k' 很大且 β 为正值. 值得注意的是 k' 值随多糖试样粘度降低而增加, 我们认为这几种杂多糖可能在粘度计壁上产生吸附而引起残液效应^[15], 从而表现出异常行为.

Table 2 Experimental results of molecular weights and viscosities of polysaccharides from fruiting body of *Ganoderma lucidum*

Samples	$M_w \times 10^{-4}$	$\langle S^2 \rangle^{1/2}$ (nm)	$M_n \times 10^{-4}$	$A_2 \times 10^4$ ($\text{cm}^3 \text{mol}^{-1} \text{g}^{-2}$)	$[\eta]$ ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)	k'	M_w/M_n
GL2	124	101	6.23	550	804	0.28	20
GL3	12.8	-	2.14	18.3	148	2.5	6
GL4	-	-	-	-	95	5.2	-
GL5	5.8	18.4	-	-	90	5.4	-

由光散射测定得到 GL2、GL3 和 GL5 在水溶液中的 M_w 和 $\langle S^2 \rangle$ 值汇集于表 2. GL2 多糖的 Zimm 图示于图 2, 表现出正常的溶液行为, 但其 $\langle S^2 \rangle$ 值远远高于具有相同分子量

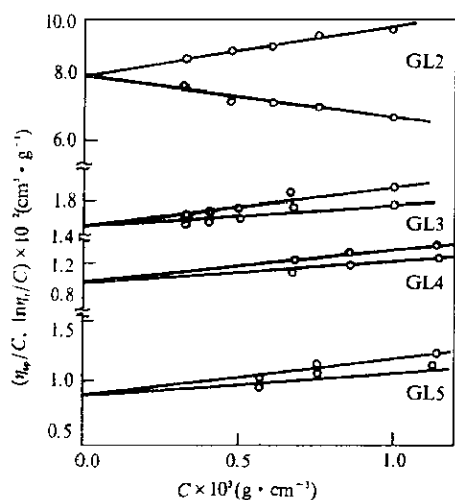


Fig.1 η_{sp}/c versus c and $\ln \eta_r/c$ versus c plots of GL2, GL3, GL4 and GL5 polysaccharides in 0.5 mol/L NaCl aqueous at 25°C

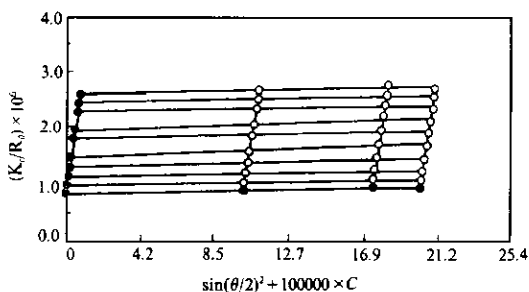


Fig.2 Zimm Plot of GL2 polysaccharide in 10% cadoxen aqueous solution at 25°C

的柔顺链茁霉聚糖(α -葡聚糖)的值^[14],而略低于三螺旋链的裂褶菌聚糖(β -D-葡聚糖)^[16],证明有刚性链存在,支持以上推断.由膜渗透压法测定的 GL2 和 GL3 多糖的 $\pi/c \sim c$ 关系示于图 3,按(1)式得出的 M_n 和 A_2 列于表 2. GL2 试样的 A_2 值异常大,其原因尚未完全弄清,按经验估计与其分子量多分散性过大有关.此外,表 2 示出 GL2 和 GL3 多糖的 M_w/M_n 值较高,并且明显高于黑木耳多糖的结果^[9],说明不仅仅是天然多糖分子量分散性较大,而更主要归结于它们是葡聚糖和杂多糖的混合物.值得注意的是 GL2 多糖的 M_w 、 M_w/M_n 和 $[\eta]$ 值都远远高于其它组分,而且 M_w 值与 Usui 等人^[8]报道的 β -D-葡聚糖的值(1.03×10^6)接近.由此认为 GL2 杂多糖中所包含的 β -D-葡聚糖不仅为刚性链而且分子量较大,因而使该多糖 M_w 增大,明显超过一般文献报道的杂多糖分子量值.

据 Sone 等人报道^[2]灵芝多糖中的 β -D-葡聚糖均为水不溶的,但 Usui 等人已分离出水溶性 β -D-葡聚糖^[3],说明有水溶性葡聚糖存在.由本工作得出的灵芝多糖成份和分子量结果分析, GL2、GL3 和 GL4 水溶性杂多糖中包含部分水溶性 D-葡聚糖(刚性或柔顺链), GL2 杂多糖中包含刚性链的 β -D-葡聚糖.由此认为文献报道的分子量不一致是由于分离方法不同,因而得出多糖的混合组成不同所致, Sone 等人分出的三种多糖都可能包含水溶性 β -D-葡聚糖.因此下一步的工作将研究对这些多糖进一步分离的有效方法,以便继续研究灵芝多糖和 β -D-葡聚糖的分子量和链构象.

致谢 光散射数据由国家标准物质研究中心周以华先生测定,特此致谢.

REFERENCE

- 1 Yoshiko T, Toshio H. Jpn. Kokai Tokkyo Koho, JP patent, 03, 143, 384. 1991-06-18
- 2 Sone Y, Okuda R, Wada N, et al. Agric Bio Chem, 1985, 49(9): 2461 ~ 2653
- 3 Usui T, Iwasaki Y, Mizuno T, et al. Carbohydr Res, 1983, 115: 273 ~ 280
- 4 Wang G, Zhang J, Mizuno T, et al. Biosci Biotech Biochem, 1993, 57(6): 894 ~ 900
- 5 Liang Zhongyan(梁忠岩), Zhang Yishen(张翼伸). Acta Biochimica et Biophysica Sinica(生物化学与生物物理学报), 1993, 25(1): 59 ~ 63
- 6 Saito K, Nishijima M, Miyazaki T, et al. Chem Pharm Bull, 1989, 37(11): 3134 ~ 3136
- 7 Miyazaki T, Nishijima M. Carbohydr Res, 1982, 109: 290 ~ 294
- 8 Zhang Lina(张俐娜), Chen Hesheng(陈和生). Chemical Journal of Chinese Universities(高等学校化学学报), 1993, 14(9): 1320 ~ 1325

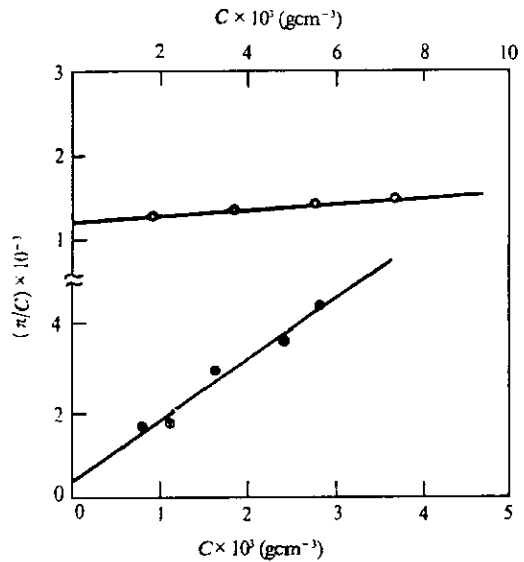


Fig. 3 π/c versus c plot of GL2 in water (●) and GL3 in 0.15 mol/L NaCl aqueous solution (○) at 25°C

- 9 Zhang L, Yang L, Ding Q, et al. Carbohydr Res, 1995, 270:1~10
- 10 Zhang L, Yang L. Biopolymers, 1995, 36:695~700
- 11 Cai L, Wu C, Han H, et al. J Microcolumn Separations, 1995, 7(2):137~144
- 12 Bitter T, Muir H M. Anal Biochem, 1962, 4:330~334
- 13 Zhang Lina(张俐娜), Huang Aihui(黄爱辉), Xu Jingjuan(徐静娟). Chemical Journal of Chinese Universities(高等学校化学学报), 1991, 12(8):1126~1129
- 14 Kato T, Okamoto T, Tokuya T, et al. Biopolymers, 1982, 21:1623~1633
- 15 Shao Yuefang(邵毓芳), Diao Beibei(刁蓓蓓), Cheng Rongshi(程谔时). Acta Physico-Chimica Sinica(物理化学学报), 1986, 2(4):350~355
- 16 Kashiwagi Y, Norisuye T, Fujita H, et al. Macromolecules, 1981, 14:1220~1225

ISOLATION AND DETERMINATION OF MOLECULAR WEIGHTS OF WATER-SOLUBLE POLYSACCHARIDES FROM FRUITING BODY OF GANODERMA LUCIDUM

ZHANG Lina, CHEN Jinghua

(Department of Chemistry, Wuhan University, Wuhan 430072)

Abstract Five water-soluble heteropolysaccharides (GL1, GL2, GL3, GL4 and GL5) were isolated from phosphate buffer, hot water, alkali and hot alkali extracts of the fruiting body of *Ganoderma lucidum*. The results analysed by UV, IR, gas chromatography and uronic acid carbazole reaction showed that they were mainly composed of glucose, xylose, mannose and galactose, and GL3, GL4 and GL5 contained glucuronic acid. The intrinsic viscosities $[\eta]$, weight average molecular weights M_w , number average molecular weights M_n were determined by viscometry, light scattering and membrane osmometry. The values of M_w for samples of GL2, GL3 and GL5 are 124×10^4 , 12.8×10^4 and 5.8×10^4 respectively. From analysis of the data, we deduced roughly a conclusion that these heteropolysaccharides contained water-soluble D-glucan, and GL2 extracted from phosphate buffer included a β -D-glucan with stiff chains.

Key words *Ganoderma lucidum*, Polysaccharide, Molecular weight