

云芝糖肽的单糖组成分析

张 磊^{*}, 邹巧根¹, 宋 喆¹, 吴如金

(中国药科大学药物分析学教研室; 分析测试中心, 南京 210009)

摘要 目的 对多孔菌科真菌云芝的活性成分云芝糖肽的单糖组成进行研究。方法 采用薄层色谱法和高效液相色谱-蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)联用技术。结果 云芝糖肽的单糖组成及摩尔比为: 葡萄糖:D-甘露糖:半乳糖:木糖=1:0.074:0.067:0.0178。结论 建立了云芝糖肽的单糖组成的检测方法, 各单糖之间的比例与文献报道有所不同。

关键词 云芝糖肽; 单糖; 组成; 薄层色谱法; 高效液相色谱-蒸发光散射

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-5048(2001)02-0137-16

云芝又称彩云革盖菌^[1], 为多孔菌科真菌云芝(*Coriolus versicolor* (L.) Fr.)的子实体。云芝性微甘、寒, 能清热、消炎, 主治气管炎、肝炎、肿瘤等。云芝的主要活性成分是云芝糖肽(Polysaccharide, PSK), 系由15%蛋白质组成的蛋白多糖体^[2]。药理实验表明, 它具有明显的增强免疫活性、抗肿瘤、改善学习记忆和延缓衰老等作用^[3-4]。

据文献^[5], 云芝糖肽由葡萄糖、L-岩藻糖、D-甘露糖、半乳糖和 α -鼠李糖五种单糖组成。我们综合地运用TLC和HPLC方法, 测定了云芝糖肽的单糖组成, 并发现云芝糖肽中还含有木糖, 而且各单糖之间的比例与文献报道有所不同。并对云芝糖肽的单糖组成检测的方法学进行了探索。

1 仪器和试剂

UV-2100 & HPLC-10AT(日本Shimadzu公司), 涡旋混合器, YDP020D型电子天平(联邦德国), 800型离心沉淀器(上海手术器械厂), ELSD检测器(SEDEX55型, 法国)。

硅胶(化学纯); 异丙醇, 甲醇, 乙酸乙酯, 正丁醇, 乙酸, 磷酸二氢钠, 邻苯二甲酸, 苯胺, 三氟乙酸(以上均为分析纯); 乙腈(HPLC级); 重蒸水(自制); 单糖对照品: 半乳糖, D-甘露糖, 鼠李糖, L-岩藻糖(Fluka Chemie AG CH-9470 Buchs), 木糖(E Merck公司); 云芝糖肽粗品(昆山生物化学厂); 云

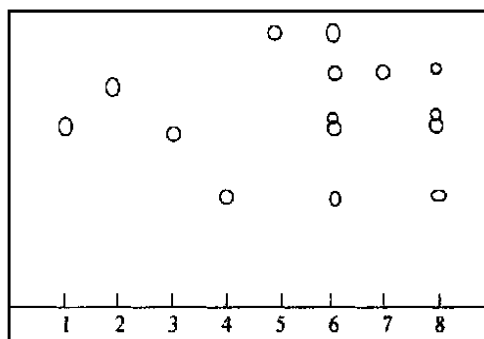
芝糖肽精品(从固体发酵的菌丝体, 由水提醇沉工艺得到的粗品精制而成, 自制)。

2 方法与结果

2.1 薄层色谱法

显色剂: 邻苯二甲酸-苯胺通用显色剂。

对照品溶液的配制: 精密称取葡萄糖、半乳糖、D-甘露糖、鼠李糖、L-岩藻糖各5.00 mg, 于5 ml容量瓶中用蒸馏水溶解, 稀释至刻度, 摇匀, 制成1.0 mg/ml的对照品溶液。再分别精密吸取标准单糖溶液各1.0 ml于5 ml的容量瓶中, 制成混合对照品溶液。



1. Glc; 2. Fru; 3. Man; 4. Gal; 5. Rha; 6. Complex of Five Sugars; 7. Xyl; 8. Hydrolysis Products of PSK

Fig 1. TLC of hydrolysis products of PSK

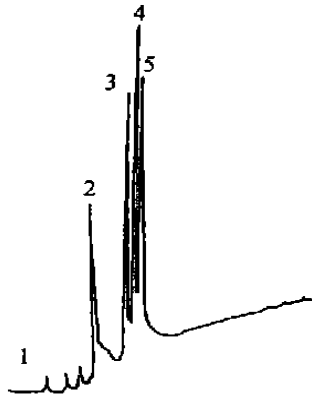
薄层板的制备: 0.7%的 CMC-Na 中加入磷酸二氢钠(使浓度为 0.2mol/L)与硅胶 G 铺制薄层板, 晾干, 110℃活化 1 h, 置干燥器中备用。展开系统: A: 丙酮-水(9:2); B: 异丙醇-乙酸乙酯-正丁醇-水(6:10:3.5:9)。

2.2 HPLC-ELSD

2.2.1 色谱条件 采用梯度洗脱, 可将各单糖分离, 分离条件为: 色谱柱: Licrospher 100 NH₂, 柱温: 20℃, 流速: 1 ml/min, 进样量: 10 μl, 检测器: ELSD (SEDEX 55), 蒸发温度: 90℃, 灵敏度: GAIN=7, 载气压力: 2.2×10⁵ Pa, 流动相: A: 重蒸水; B: 乙腈(梯度洗脱: 30 min 内乙腈由 15%升至 30%)。

2.2.2 糖肽的水解 精密称取云芝糖肽精品 25.00 mg, 加入 2 mol/L 三氟乙酸 2.0 ml, 于 100℃水浴水解 6 h, 取出, 冷却, 60℃水浴中用 N₂ 吹干。加流动相 2 ml (乙腈-水=80:20)溶解, 备用。

2.2.3 云芝糖肽的单糖组成 HPLC-ELSD 分离云芝糖肽精品的结果表明, 云芝糖肽精品中含有葡萄糖、L-岩藻糖、D-甘露糖、半乳糖、木糖。采用峰高定量, 得云芝糖肽中各种单糖的摩尔比, 与文献值^[5]比较结果见表 1。



1. Fru; 2. Xyl; 3. Man; 4. Glc; 5. Man

Fig 2. HPLC of hydrolysis of PSK

Tab 3. Recovery of PSK(n=5)

Monosaccharides	Blank (mg)	Added (mg)					Found (mg)					Mean recovery(%)
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
Glc	21.6	10.1	10.2	10.1	10.0	10.0	9.67	9.56	9.33	9.29	9.62	94.19
Man	5.1	5.1	5.2	5.4	5.1	5.0	4.35	4.78	4.95	4.55	4.37	89.10
Gala	1.45	5.2	5.1	5.3	5.3	5.3	4.09	4.10	4.00	4.41	4.53	80.64
Fru	0.025	5.3	5.2	5.1	5.1	5.2	4.09	4.15	3.96	3.68	4.22	77.59
Xyl	0.325	5.3	5.3	5.2	5.1	5.0	4.12	4.79	4.09	4.27	4.47	83.98

Tab 1. Mass ratios of monosaccharides in PSK

Catalogue	Glc	Man	Gala	Fru	Xyl
Molal ratio(Lab.)	1	0.074	0.067	-	0.0178
Mass ratio(Lab.)	0.864	0.064	0.058	0.001 ^a	0.013
Molal ratio(Ref.)	1	0.33	0.27	0.41	-

^aValue was got from the 10-fold condensed solution

2.2.4 云芝糖肽各单糖含量测定 以上述色谱条件, 对云芝糖肽的单糖含量进行了测定, 并同时对方法学进行了考察。

各单糖标准品溶液的制备 精密称取各单糖 10.0 mg, 置 10 ml 容量瓶中, 用乙腈-水=(85:15)的溶液溶解、定容, 即得。

线性关系考察 配置五种标准单糖的混合溶液, 配制浓度梯度为 0.02, 0.05, 0.1, 1.0, 5.0, 10.0, 15.0 mg/ml, 各进样 20 μl, 用峰高定量, 结果见表 2。

Tab 2. Linear equation of monosaccharides

Sample	Linear range (mg/ml)	Equations	r
Glc	0.1020	$Y = 123.9X + 69325.9$	0.9992
Man	0.0515	$Y = 602.6X + 25452.8$	0.9993
Gala	0.1010	$Y = 126.7X + 482.9$	0.9985
Xyl	0.1010	$Y = 91.9X - 103.5$	0.9919
Fru	0.025.0	$Y = 88.6X + 588.0$	0.9894

精密度考察 进样精密度用标准曲线中浓度为 1.0 mg/ml 溶液进行, 用峰高定量, 各单糖的精密度分别为: 葡萄糖: 0.9991, 甘露糖: 0.9995, 半乳糖: 0.9990, 岩藻糖: 0.9987, 木糖: 0.9990。

重复性考察 取云芝糖肽精品 5 份, 依法水解, 进样, 峰高定量, 各单糖组分的重复性为: 葡萄糖: 0.9915, 甘露糖: 0.9900, 半乳糖: 0.9878, 岩藻糖: 0.9856, 木糖: 0.9918。

加样回收率 为避免加入标准品后浓度超出标准曲线, 故将甘露糖、半乳糖、岩藻糖和木糖的加量调整为 5.0 mg。加样回收率见表 3。

3 讨 论

1) 对于组成中同时含有葡萄糖、半乳糖和甘露糖的多糖, 采用薄层色谱法分析, 分离度良好的报道不多^[9]。其原因是由于这三者分子量相同, 羟基数相同, 极性非常接近。本实验采用了双向展开和薄层固定相加盐相结合的方法, 增加了糖在固定相中的溶解度, 从而增加了硅胶薄层所承载的样品量。同时, 这种处理使得硅胶薄层吸附能力下降, 易获得分布集中的斑点, 较好地改善了分离。

2) 常用的糖衍生化气相色谱分辨率高, 但大多数单糖在衍生化后产生多峰^[7], 影响定性、定量分析。目前对于多糖中单糖组份的高效液相色谱法, 色谱柱使用离子交换树脂^[8-9], 进行离子交换色谱过程, 检测器使用脉冲电化学检测器或二极管阵列检测器^[10]。本文采用氨基键合相色谱柱梯度洗脱和 ELSD 检测, 对糖这一无紫外吸收的样品进行检测和定量。采用峰高进行定量原因是: (1) 用梯度洗脱时所产生的基线漂移给积分带来误差; (2) 甘露糖、葡萄糖和半乳糖均为六碳糖, 其分子结构中只因羟基位置不同而产生的保留行为差异不足以使他们达到基线分离; (3) 峰面积定量的进样精密密度没有峰高定量的良好。本文建立了云芝糖肽单糖组成的 HPLC 测定方法, 其精密度、重复性、加样回收率结果可靠、准确, 且操作方便。

3) *L*-岩藻糖含量很少, 只有样品浓度较高时才能检测到。而文献报道^[5]的岩藻糖含量较高, 可能是因为: 文献中的云芝糖肽来源不同; ELSD 的检测灵敏度较低, 不能检出含量低的组份; 或者岩藻糖的连接不紧密, 在提取过程中因脱链而被弃去。

4) 本文采用 TLC 和 HPLC 方法, 表明该云芝糖肽含有葡萄糖、*D*-甘露糖、半乳糖、木糖和少量的 *L*-岩藻糖(质量比为: 0.864 : 0.064 : 0.058 : 0.013 : 0.001), 其中木糖是首次在云芝糖肽中检测到的。

但可能由于样品来源不同, 样品量少, 水解物中含量极微, HPLC 检测限太低等原因, 此云芝糖肽检测不到鼠李糖, 这与文献报道^[5]的不符, 还需进一步验证。

参 考 文 献

- [1] 应建浙等编. 中国药用真菌图鉴[M]. 北京: 科学出版社, 1987, 12: 116-117.
- [2] Yang QY, Hu YJ, Li XY, *et al*. PSP international symposium[C], Hong Kong, 1993, Fudan University Press, 1993, 56-61.
- [3] 竺青(Zhu Q), 楚正绪(Chu ZX), 谭建权(Tan JQ)等. 云芝糖肽对环磷酰胺所致免疫功能低下的影响[J]. 中成药(*China Traditional Patent Medicine*), 1990, 12(11): 29-30.
- [4] 鲁进宇(Lu JY), 王汉涛(Wang HT), 田野苹(Tian YP)等. 云芝糖肽对小鼠免疫功能的影响[J]. 中国药理学杂志(*Chinese Pharmaceutical Journal*), 1995, 30(1): 10-11.
- [5] 陈海生(Chen HS), 廖时萱(Liao SX), 张学森(Zhang XS)等. 野生云芝两种糖肽的基本结构测定[J]. 第二军医大学学报(*Academic Journal of Second Military Medical University*), 1996, 17(1): 83-84.
- [6] 叶淳渠(Ye CQ), 方积年(Fang JN). 竹黄多糖 SB-III 及 SB-II 的组成研究[J]. 药学报(*Acta Pharmaceutica Sinica*), 1981, 16(7): 524-528.
- [7] 郭跃伟(Guo YW), 程培元(Cheng PY), 陈玉俊(Chen YJ)等. 槐耳菌丝体多糖的分离和分析[J]. 中国生化药物杂志(*Chinese Biochemical Pharmaceutical Journal*), 1993, (1): 56-60.
- [8] Hiederhauser TL, Halling J, Polson NA, *et al*. High-performance anion-exchange chromatographic separations of carbohydrates on a macrocycle-based stationary phase with eluents of relatively low pH and concentration[J]. *J Chromatogr A*, 1998, 804: 69-77.
- [9] Corradini C, Canali G, Cavazza A, *et al*. Compositional analysis of the major capsular polysaccharides of *Cryptococcus neoformans* by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD)[J]. *J Liq Chrom & Rel Technol*, 1998, 21(7): 941-9516.
- [10] Robles MD, Niell FX, Mates JM. Separation and determination of α and β -galactose from Agar-Type polysaccharides by liquid chromatography[J]. *J Chromatographic Science*, 1996, 34: 517-520.

Study of Monosaccharides in PSK by TLC and HPLC-ELSD

ZHANG Zhe, ZOU Qiao-Gen¹, SONG Zhe¹, WU Ru-Jin

Department of Pharmaceutical Analysis; ¹Center of Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

ABSTRACT **AIM** The aim is to study the monosaccharides in polysaccharidiopeptide (PSK) from the *Coriolus versicolor* (L) Fr.; **METHODS** TLC & HPLC-ELSD. **RESULTS** The Molal ratio and composition of the monosaccharides are: Glc :Man :Gala :Xyl= 1 :0.074 :0.067 :0.0178. A detection method of the composition of PSK's monosaccharides was established.

KEY WORDS Polysaccharidiopeptide from the *Coriolus versicolor* (L) Fr.; TLC; HPLC-ELSD; Monosaccharides; Composition

·书 评·

实时评述, 旨在创新 ——评《药物化学进展》(第一卷)

在即将进入 21 世纪的时候, 彭司勋院士主编的《药物化学进展》(第一卷), 已于 2000 年由中国医药科技出版社出版。正如书名所示, 该书旨在介绍国内外药物和新药创制的最新进展和主要成就, 使读者在浩瀚的信息和文献海洋中, 得以快捷地了解和把握药物化学和有关学科的现状与发展趋势, 是一本非常有用的教学和研究参考书。

分子生物学、组合化学和计算机科学向药物化学的融入和结合, 使近 20 年来药物研究和新药创制发生了深刻的变革, 新的策略、技术和方法改变着新药研究与开发的模式, 并取得了瞩目的进展与成果。该书的绪论介绍了这些内容。

该书对皮质激素、雌激素、维生素 D₃ 等受体调节剂(激动剂和拮抗剂)和生成酶抑制剂的进展和新药进行了讨论。并且以 5 α 还原酶、 α 肾上腺素能受体和芳构化酶为靶点, 设计合成治疗前列腺增生和抗肿瘤药物, 也在书中作了简明的叙述。第四章以含有蝶啶环的药物为重点, 讨论了含蝶啶环的抗肿瘤药物设计和合成。第五章和第九章讨论了新药研究的方法学——小分子组合库的构建策略和新药筛选中受体靶点的研究进展。第六章对紫杉烷的化学、结构特征以及药物研究的进展, 进行了较详尽的讨论, 提供了较翔实的文献, 对从事该领域的研究者有很好的参考价值。第十二章综述了丹参的化学成分、生源、结构修饰和活性成分的药理作用。该文对深入研究中药丹参有很好的参考意义。在第八章和第十章分别以一氧化氮合酶和离子通道为靶点, 对心血管和神经系统疾病的治疗药物进行了讨论。以离子通道为主线讨论影响心律的诸生理因素, 并以此作为研制抗心律失常药物的靶点。虽然阐明靶点与药物的关系和药物化学的篇幅较少, 但作者较详细地介绍了心脏的电生理学, 对药物化学家理解这类药物的作用特征和设计新药是有意义的。该书在叙述天然药物化学进展时, 提出了“本草化学”概念, 虽然作者未曾明确本草化学的含义和与中药化学和天然药物化学的异同, 但内容反映了作者试图从中药(无机和有机药物)炮炙过程和发生的化学变化, 把握和理解中药的有效成分和物质本质, 历史地回顾了中药的制作过程和化学本质, 我们相信并期望对我国特有的医药遗产的现代化研究中, 有更精彩的描述。

相信每年一卷的《药物化学进展》将对我国药物化学教学与研究、新药创制产生重要的影响。第一卷的问世是个良好的开端, 今后诸卷相信会更好, 例如增加中英文索引会更有利于检索和查找。

郭宗儒 研究员 博士生导师

中国医学科学院药物研究所