

云芝胞内糖肽的糖类含量测定和指纹图谱研究

张圆¹, 孙玉娣², 刘璇¹, 石蓓佳¹, 陆益红^{1*} (1.江苏省食品药品监督检验研究院, 南京 210019; 2.中国药科大学药学院, 南京 210000)

摘要: 目的 建立云芝胞内糖肽的游离糖和水解单糖指纹图谱和含量测定的检测方法。方法 游离糖测定以水为溶剂超声提取后 PMP 衍生化, 水解单糖测定酸水解后 PMP 衍生化, 采用 HPLC 对来自不同企业的云芝胞内糖肽原料、中间体的游离糖和水解单糖进行定性和定量分析。通过化学计量学分析对指纹图谱进行了分析, 探讨不同生产企业生产的云芝胞内糖肽差异性。结果 2 种方法均通过方法学验证; 不同企业的样品分别聚类, 有 3 种游离糖和 2 种水解单糖对云芝胞内糖肽的质量差异贡献较大。结论 建立的分析方法可有效用于云芝胞内糖肽中游离糖和水解后的单糖的测定和指纹图谱研究, 采用的化学计量学研究方法对云芝胞内糖肽的质量控制提供了指导意义。

关键词: 云芝胞内糖肽; 游离糖; 水解单糖; 含量测定; 指纹图谱; 化学计量学分析

中图分类号: R284.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2023)21-2936-09

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20223615

引用本文: 张圆, 孙玉娣, 刘璇, 等. 云芝胞内糖肽的糖类含量测定和指纹图谱研究[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(21): 2936-2944.

Study on Content Determination and Chromatographic Fingerprints of Sugars in Intracellular Glycopeptide of *Coriolus Versicolor*

ZHANG Yuan¹, SUN Yudi², LIU Xuan¹, SHI Beijia¹, LU Yihong^{1*} (1.Jiangsu Institute for Food and Drug Control, Nanjing 210019, China; 2.School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a detection method for fingerprints and content determination of free sugar and hydrolyzed monosaccharide of intracellular glycopeptides in *Coriolus versicolor*. **METHODS** PMP derivatization after ultrasonic extraction with water as solvent was determined for free sugars, and PMP derivatization after acid hydrolysis was determined for hydrolyzed monosaccharides. The free sugars and hydrolyzed monosaccharides of raw materials and intermediates of intracellular glycopeptides from different manufacturers were analyzed by HPLC qualitatively and quantitatively. The fingerprints were analyzed by chemometrics analysis, and the differences between intracellular glycopeptides produced by different manufacturers were discussed. **RESULTS** Both two methods were validated by methodology. The samples from different manufacturers were clustered separately, and three free sugars and two hydrolyzed monosaccharides contributed greatly to the quality difference of intracellular glycopeptides of *Coriolus versicolor*. **CONCLUSION** The established analytical method can be effectively used for the determination of free sugars and hydrolyzed monosaccharides in the intracellular glycopeptide of *Coriolus versicolor* and the study of fingerprints. The adopted chemometrics research method provides guidance for the quality control of the intracellular glycopeptide of *Coriolus versicolor*.

KEYWORDS: intracellular glycopeptide of *Coriolus versicolor*; free sugars; hydrolyzed monosaccharides; content determination; chromatographic fingerprints; chemometrics analysis

云芝胞内糖肽是运用现代生物工程技术, 将杂色云芝菌[*Polystictus versicolor*(L).Fr.]经深层培养, 从菌体提取获得的糖肽类物质, 主要应用于慢性乙型肝炎、肝癌及老年免疫功能低下者的辅助治疗^[1-3]。糖肽是一种多糖与蛋白质分子结合的复杂大分子^[4], 含有多种多糖、蛋白质、脂肪、氨基酸和无机盐^[5-7], 而糖类是云芝胞内糖肽最主要的组成部分, 糖类的质量对云芝胞内糖肽整体的

质量具有关键影响。云芝胞内糖肽中糖的分析需要从多个方面进行, 包括游离的寡糖和其水解单糖组成。在中国现行药品标准中^[8], 采用硫酸苯酚法测定总糖, 该方法不能避免游离糖的干扰, 而游离糖的存在有导致血糖升高等安全风险^[9], 因此本研究尝试建立一种更加有效的糖含量测定方法。

根据国家药品标准, 云芝胞内糖肽原料应由云芝菌的菌体提取获得。调研发现, A 企业将菌

基金项目: “重大新药创制” 国家科技重大专项(2015ZX09303001)

作者简介: 张圆, 女, 硕士, 副主任药师 E-mail: circlecpu@126.com
yihonglu@163.com

*通信作者: 陆益红, 女, 博士, 主任药师 E-mail:

丝部分经水煮提取滤液,与培养液滤液合并。合并的滤液经浓缩、醇沉、减压干燥制得,与药品标准不符。Q 企业工艺则是按照药品标准,由云芝菌的菌体提取获得原料。为了研究这种制备方式对云芝胞内糖肽质量的影响,本研究将 A 企业生产的云芝胞内糖肽原料与 Q 企业生产的进行比较分析,期望找出 2 个不同生产方式的企业间云芝胞内糖肽的质量差异。

本研究采用水为溶剂超声提取样品分析游离糖,用三氟乙酸切断糖链分析水解单糖^[10-11]。样品经 PMP 试剂衍生^[12-15],HPLC 分析。PMP 为 1-苯基-3-甲基-5-吡啶酮,具有较强的紫外吸收(245~250 nm),在碱性条件下可以与单糖和寡糖定量结合,增强其疏水性,提高紫外吸收,同时使衍生化产物带电荷,可以提高糖类在质谱中的检测灵敏度。本研究采用化学计量学方法对 2 家企业的云芝胞内糖肽游离糖和水解单糖进行统计分析^[16-17],期望根据游离糖和水解单糖的组成综合判断云芝胞内糖肽的质量。

1 仪器与药品、试剂

LC-20AB 高效液相色谱仪-紫外检测器(UV)(日本岛津);SCIEX Triple TOF 5600+高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱仪(美国 AB SCIEX);XS205 电子天平(梅特勒-托利多公司)。

ChemPattern2020 版化学计量学软件[科迈恩(北京)科技有限公司]。

对照品:甘露糖(批号:140651-201805;纯度:100.0%)、核糖(批号:140668-202003;纯度:99.6%)、葡萄糖醛酸(批号:140648-202005;纯度:99.8%)、鼠李糖(批号:111683-201502;纯度:100.0%)、半乳糖醛酸(批号:111646-201702;纯度:95.1%)、葡萄糖(批号:110833-201908;纯度:99.8%)、半乳糖(批号:100226-201807;纯度:100.0%)、木糖(批号:111508-201605;纯度:99.9%)、阿拉伯糖(批号:111506-200202;纯度:100.0%)、岩藻糖(批号:112014-201902;纯度:95.9%)均来自于中国食品药品检定研究院。麦芽十一糖(批号:N05GB164731)、麦芽十糖(批号:N05GB164730)、麦芽九糖(批号:N05GB164729)、麦芽八糖(批号:Y13M11K109136)、麦芽七糖(批号:Y25S11K124856)、麦芽六糖(批号:S08J12D137082)、麦芽五糖(批号:J29GB152743)、麦芽四糖(批号:H19D11C133840)、麦芽三糖(批

号:K20F10S80993)、麦芽糖(批号:RM0331FC14)对照品均来源于上海源叶生物科技有限公司,纯度均>98%。

样品:云芝胞内糖肽对照品(中国食品药品检定研究院,批号:140692-200301,Q 企业原料精制得,Q3);云芝胞内糖肽原料(Q 企业 3 批 Q1、Q2、Q4,A 企业 8 批 A1~A8);A 企业提供菌丝体水提醇沉产物(P1)和培养液滤液醇沉产物(P2)。Q 企业提供的原料中仅含有菌丝体水提醇沉产物。

试剂:乙腈(MERCK 公司,HPLC 级);乙酸铵(Sigma-Aldrich 公司,HPLC 级);水为 Milli-Q 纯水仪制备去离子水;氢氧化钾(色谱纯)、磷酸二氢钾(色谱纯)、氢氧化钠(分析纯)、盐酸(分析纯)、三氟乙酸(分析纯)、PMP(分析纯)均购自国药集团化学试剂有限公司。

2 方法与结果

2.1 游离糖样品的制备

精密称取云芝胞内糖肽样品 20 mg,加水溶解并稀释至 2 mL,摇匀,22 000 ×g 离心 10 min,取上清液,得供试品溶液。精密称取葡萄糖和麦芽糖系列对照品适量,加水溶解并稀释成每毫升含葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖、麦芽四糖、麦芽五糖、麦芽六糖、麦芽七糖、麦芽八糖 10, 20, 50, 100, 150, 200 μg,含麦芽九糖、麦芽十糖、麦芽十一糖 5, 10, 25, 50, 75, 100 μg 的对照品溶液。

取供试品溶液和对照品溶液各 200 μL,加 0.6 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 200 μL,0.4 mol·L⁻¹ PMP 溶液 400 μL,混匀,置 70 °C 水浴避光反应 1 h,取出,冷却至室温,加 0.3 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 400 μL 使成中性,加 800 μL 三氯甲烷萃取 3 次,22 000 ×g 离心 10 min,取上清液进样^[18-19]。

2.2 水解单糖样品的制备

精密称取云芝胞内糖肽样品 10 mg,置 20 mL 顶空瓶,加 0.1 mol·L⁻¹ 三氟乙酸 4 mL,110 °C 反应 6 h,取出,水浴蒸干,加水定容至 2 mL,摇匀,22 000 ×g 离心 10 min,取上清液,得供试品溶液。精密称取 10 种单糖对照品适量,加水溶解并稀释制成每毫升中各含单糖 1, 2, 5, 10, 25, 50 μg(葡萄糖制成每 1 mL 中各含 10, 20, 50, 100, 250, 500 μg)的对照品溶液。PMP 衍生化过程同“2.1”项下游离糖样品。

2.3 色谱条件

2.3.1 HPLC-UV 分析条件 色谱柱为 TechMate

ST-C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相 A 为 0.05 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾(氢氧化钾溶液调节 pH 至 7.0), 流动相 B 为乙腈, 梯度洗脱(0~40 min, 84%→80%A; 40~45 min, 80%→75%A; 45~46 min, 75%→84%A; 46~55 min, 84%A)。紫外检测波长为 248 nm, 流速为 1 mL·min⁻¹; 柱温为 40 ℃; 取衍生化后的对照品溶液、供试品溶液各 20 μL 注入高效液相色谱仪, 记录色谱图。按标准曲线法以峰面积计算各游离糖和水解单糖含量。

2.3.2 HPLC-DAD-Q-TOF-MS/MS 分析条件 色谱条件: 色谱柱为 XBridge-C₁₈ 柱(4.6 mm×150 mm, 3.5 μm); 流动相 A 为 0.01 mol·L⁻¹ 乙酸铵, 流动相 B 为乙腈, 梯度洗脱(0~20 min, 84%→80%A; 20~25 min, 80%→75%A; 25~30 min, 84%A)。DAD 检测波长为 248 nm, 流速为 1 mL·min⁻¹; 柱温为 40 ℃; 进样量为 20 μL。质谱条件: ESI 模式, 喷雾电压-4 500 V, 雾化气温度 350 ℃, 扫描范围 TOF-MS: 100~2 500; TOF-MS/MS: 100~2 000。气帘气: 30 psi; GAS1: 50 psi; GAS2: 50 psi。

2.4 数据处理

采用 ChemPattern 软件的多元统计分析技术对云芝胞内糖肽样品指纹图谱进行分类, 评价云芝胞内糖肽的质量。

3 结果

3.1 样品中游离寡糖和水解单糖的鉴定

采用 HPLC-DAD-Q-TOF-MS/MS 进行分析, 游离糖样品中, A 企业的 TOF/MS 总离子流图中出现 *m/z* 为 509.203 6, 671.257 7, 833.310 3, 995.362 4, 1 157.411 5, 1 319.466 2, 1 481.523 0, 1 643.570 3, 1 805.630 1, 1 967.678 0, 2 129.732 4 的系列色谱峰, 见图 1A 和表 1。其中 *m/z* 为 509.203 6 为葡萄糖 PMP 衍生化后色谱峰, 各化合物 *m/z* 均比前一个峰+162, 推测为多聚己糖结构的化合物。考虑到 A 企业生产工艺中含有培养基成分, 而培养基中含有淀粉, 在水解后可生成麦芽糖和麦芽多糖, 与上述质荷比相对应, 故推测系列色谱峰为麦芽糖和麦芽多糖。取葡萄糖和麦芽寡糖(含麦芽糖、麦芽三糖、麦芽四糖、麦芽五糖、麦芽六糖、麦芽七糖、麦芽八糖、麦芽九糖、麦芽十糖、麦芽十一糖)混合对照品溶液(图 1B)进行同法处理, A 企业提取的各离子峰的保留时间与对照品中葡萄糖和麦芽寡糖一致, 各峰 MS 图鉴定结果见表 1。因此确定 A 企业未水解样品色谱图中

的未知峰为葡萄糖和麦芽寡糖。同法分析 Q 企业样品(图 1C), Q 企业仅含有少量葡萄糖、麦芽糖和麦芽三糖。

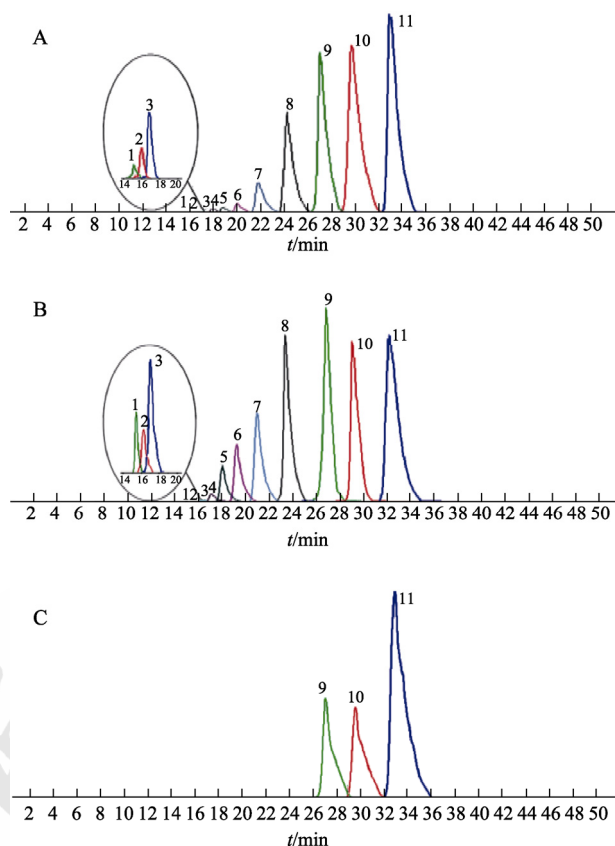


图 1 TOF-MS 提取离子流图

A—葡萄糖、麦芽寡糖混合对照品提取离子流图; B—A 企业游离糖样品提取离子流图(A1); C—Q 企业游离糖样品提取离子流图(Q1)。1—麦芽十一糖; 2—麦芽十糖; 3—麦芽九糖; 4—麦芽八糖; 5—麦芽七糖; 6—麦芽六糖; 7—麦芽五糖; 8—麦芽四糖; 9—麦芽三糖; 10—麦芽糖; 11—葡萄糖。

Fig. 1 Extract ion chromatograms(TICs) of TOF-MS

A—TICs of mixed standards of glucose, maltooligosaccharides; B—TICs of free sugar sample from enterprise A; C—TICs of free sugar sample from enterprise Q. 1—maltoundecaose; 2—maltodecaose; 3—maltononaose; 4—maltooctaose; 5—maltoseptaose; 6—maltohexaose; 7—maltopentaose; 8—maltotetraose; 9—maltotriose; 10—maltose; 11—glucose.

将“2.2”项下处理的样品按“2.3.1”项下色谱条件进行分析, 通过对照品的相对保留时间(以葡萄糖为参比峰)来确定样品中含有的游离糖和单糖种类。结果显示, A 企业未水解的云芝胞内糖肽中含有麦芽寡糖与葡萄糖, Q 企业含有少量葡萄糖、麦芽糖和麦芽三糖, 与质谱结果一致。P1 中未检出游离糖, P2 中与 A 企业一致, 检出葡萄糖及麦芽寡糖, 见图 2A。水解后样品中, A 企业和 Q 企业的云芝胞内糖肽中均含有甘露糖、核糖、无水葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖、岩藻糖 7 种单糖, 见图 2B。

表 1 A 企业游离糖样品中游离糖峰的 TOF/MS 鉴定结果

Tab. 1 TOF/MS identification results of free sugar peaks in free sugar samples of enterprise A

保留时间/ min	实测母离子质荷比 (<i>m/z</i>)	实测子离子质荷比 (<i>m/z</i>)	预测分子式(PMP 衍生化后)	理论母离子质荷比 (<i>m/z</i>)	相对偏差	推测分子式 (原形)	鉴定化合物
33.46	509.203 6	509.203 6	C ₂₆ H ₃₀ N ₄ O ₇	509.204 17	1.119 4	C ₆ H ₁₂ O ₆	葡萄糖
29.92	671.257 7	509.204 1	C ₃₂ H ₄₀ N ₄ O ₁₂	671.257 00	-1.042 8	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	麦芽糖
27.35	833.310 3	509.203 7	C ₃₈ H ₅₀ N ₄ O ₁₇	833.309 82	-0.576 0	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	麦芽三糖
24.89	995.362 4	509.203 9	C ₄₄ H ₆₀ N ₄ O ₂₂	995.362 64	0.241 1	C ₂₄ H ₄₂ O ₂₁	麦芽四糖
21.86	1 157.411 5	509.204 0	C ₅₀ H ₇₀ N ₄ O ₂₇	1 157.415 47	3.430 1	C ₃₀ H ₅₂ O ₂₆	麦芽五糖
19.95	1 319.466 2	509.203 6	C ₅₆ H ₈₀ N ₄ O ₃₂	1 319.468 29	1.584 0	C ₃₆ H ₆₂ O ₃₁	麦芽六糖
18.78	1 481.523 0	509.203 8	C ₆₂ H ₉₀ N ₄ O ₃₇	1 481.521 11	-1.275 7	C ₄₂ H ₇₂ O ₃₆	麦芽七糖
17.87	1 643.570 3	509.203 9	C ₆₈ H ₁₀₀ N ₄ O ₄₂	1 643.573 94	2.214 7	C ₄₈ H ₈₂ O ₄₁	麦芽八糖
17.12	1 805.630 1	509.203 7	C ₇₄ H ₁₁₀ N ₄ O ₄₇	1 805.626 76	-1.849 8	C ₅₄ H ₉₂ O ₄₆	麦芽九糖
16.17	1 967.678 0	509.203 8	C ₈₀ H ₁₂₀ N ₄ O ₅₂	1 967.679 59	0.808 1	C ₆₀ H ₁₀₂ O ₅₁	麦芽十糖
15.36	2 129.732 4	509.204 0	C ₈₆ H ₁₃₀ N ₄ O ₅₇	2 129.732 41	0.469 5	C ₆₆ H ₁₁₂ O ₅₆	麦芽十一糖

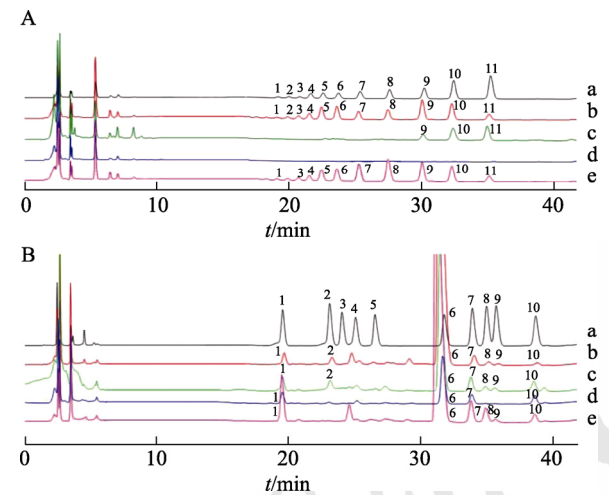


图 2 云芝胞内糖肽 HPLC 指纹图谱

a-混合对照品; b-A 企业原料; c-Q 企业原料; d-菌丝体提取物; e-培养基滤液。A-游离糖样品 HPLC 图谱。1-麦芽十一糖; 2-麦芽十糖; 3-麦芽九糖; 4-麦芽八糖; 5-麦芽七糖; 6-麦芽六糖; 7-麦芽五糖; 8-麦芽四糖; 9-麦芽三糖; 10-麦芽糖; 11-葡萄糖。B-水解单糖样品 HPLC 图谱。1-甘露糖; 2-核糖; 3-葡萄糖醛酸; 4-鼠李糖; 5-半乳糖醛酸; 6-葡萄糖; 7-半乳糖; 8-木糖; 9-阿拉伯糖; 10-岩藻糖。

Fig. 2 HPLC fingerprint of *Coriolus versicolor* intracellular glycopeptide

a-Mixed standards; b-enterprise A raw materials; c-enterprise Q raw materials; d-mycelium extract; e-medium filtrate. A-HPLC chromatogram of free sugar sample. 1-maltoundecaose; 2-maltodecaose; 3-maltononaose; 4-maltooctaose; 5-maltoheptaose; 6-maltohexaose; 7-maltopentaose; 8-maltotetraose; 9-maltotriose; 10-maltose; 11-glucose. B-HPLC chromatogram of hydrolyzed monosaccharide sample. 1-mannose; 2-ribose; 3-glucuronic acid; 4-rhamnose; 5-galacturonic acid; 6-glucose; 7-galactose; 8-xylose; 9-arabinose; 10-fucose.

3.2 游离糖和水解单糖的定量分析

采用 HPLC-UV、标准曲线法对 11 种游离糖和 7 种水解单糖的进行含量测定。精密性、重复性、24 h 稳定性结果见表 2。加样回收率、线性范围、检测限(limit of detection, LOD)和定量限(limit of quantitation, LOQ)结果见表 3。11 种游离糖和

7 种水解单糖的回归系数具有良好的线性关系($R^2>0.993$), 灵敏度良好, 回收率良好。结果表明, 11 种游离寡糖和 7 种单糖的定量方法是有效和可靠的。云芝胞内糖肽样品中 11 种游离糖的含量和 7 种单糖含量见表 4~5。

这些数据显示, 未水解的云芝胞内糖肽样品中, 培养液滤液和 A 企业的原料中含有较多的游离寡糖, Q 企业的原料只含有少量的葡萄糖、麦

表 2 指纹图谱的精密性、重复性和稳定性

Tab. 2 Precision, repeatability and stability of fingerprinting chromatograms %

HPLC 指纹图谱	峰号	精密性(<i>n</i> =6)		重复性(<i>n</i> =6)		稳定性(0, 2, 4, 8, 12, 24 h)	
		RRT RSD	RPA RSD	RRT RSD	RPA RSD	RRT RSD	RPA RSD
游离糖 样品	1	0.73	1.63	1.26	1.59	0.92	1.15
	2	0.25	1.46	1.03	2.45	0.46	2.03
	3	0.26	1.82	0.80	2.96	0.62	1.62
	4	0.11	0.78	1.94	2.77	0.99	1.36
	5	0.09	0.80	2.01	2.84	0.18	1.02
	6	1.01	2.23	0.97	3.47	0.53	1.76
	7	0.16	0.76	1.15	3.16	0.85	0.62
	8	0.07	1.22	1.04	1.17	1.06	0.67
	9	0.23	1.46	1.98	1.02	1.08	0.98
	10	0.17	0.89	0.87	1.96	0.19	0.73
	11	1.55	1.36	1.32	2.26	0.51	0.49
水解单糖 样品	1	0.09	0.29	0.21	4.32	0.25	2.39
	2	0.28	0.26	0.39	4.45	0.69	2.48
	3	0.95	0.26	0.16	3.20	0.58	2.40
	4	0.67	0.41	0.66	4.82	1.17	2.10
	5	0.33	0.22	1.14	2.78	0.29	0.90
	6	1.04	1.25	1.29	4.71	0.63	3.49
	7	0.84	0.90	0.06	3.51	0.84	3.92

注: RRT-相对保留时间; RPA-相对峰面积(均以葡萄糖峰为参比峰)。

Note: RRT-relative retention time; RPA-relative retention area(glucose as the reference peak).

表 3 游离糖和水解单糖方法验证结果

Tab. 3 Method validation results of free sugars and hydrolyzed monosaccharides

类型	化合物	校正曲线	回归系数 R^2	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	LOD/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	LOQ/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	回收率($n=6$)	
							平均/%	RSD/%
游离糖	麦芽十一糖	$Y=1\ 813.7X-11\ 659$	0.993 7	5.45~109.00	481.59	1 605.30	90.26	4.89
	麦芽十糖	$Y=2\ 023.6X-10\ 165$	0.995 2	5.85~117.00	436.78	1 455.95	89.79	3.72
	麦芽九糖	$Y=1\ 891.6X-11\ 042$	0.999 0	5.05~101.00	412.13	1 373.78	94.73	4.42
	麦芽八糖	$Y=3\ 881X-16\ 514$	0.997 6	10.75~215.00	227.55	758.48	98.68	5.58
	麦芽七糖	$Y=4\ 474.5X-16\ 240$	0.998 9	10.10~202.00	189.93	633.11	107.70	3.09
	麦芽六糖	$Y=4\ 678.5X-5\ 532.8$	0.999 7	9.85~197.00	170.56	568.54	111.77	3.41
	麦芽五糖	$Y=7\ 210.5X-5\ 970.5$	0.999 6	10.60~212.00	132.14	440.46	107.91	5.44
	麦芽四糖	$Y=8\ 874.4X+55\ 854$	0.999 6	10.30~206.00	97.51	325.04	100.94	3.54
	麦芽三糖	$Y=10\ 819X+4\ 551.9$	0.999 7	10.55~211.00	86.20	287.32	95.82	4.56
	麦芽糖	$Y=18\ 790X-6\ 184.5$	0.999 8	10.15~203.00	47.83	159.42	98.17	5.72
水解单糖	葡萄糖	$Y=35\ 248X-5\ 849.5$	0.999 7	10.08~201.60	234.82	782.73	86.31	5.59
	甘露糖	$Y=43\ 410X+390.86$	0.999 3	1.02~50.87	10.55	35.16	96.88	4.45
	核糖	$Y=47\ 523X-9\ 802.7$	0.999 6	1.06~52.80	10.47	34.91	94.74	4.22
	葡萄糖	$Y=35\ 717X+140\ 866$	0.999 5	10.12~505.90	7.04	23.46	101.35	3.57
	半乳糖	$Y=41\ 128X-23\ 258$	0.999 4	1.01~50.69	13.03	43.42	91.01	3.68
	木糖	$Y=45\ 961X-56\ 055$	0.999 5	1.03~51.50	17.13	57.09	98.52	2.35
	阿拉伯糖	$Y=51\ 845X-81\ 079$	0.999 4	1.10~54.76	16.40	54.65	106.05	4.44
	岩藻糖	$Y=39\ 189X+19\ 000$	0.999 5	1.02~51.00	18.68	62.27	102.67	2.91

表 4 云芝胞内糖肽样品中游离糖含量测定结果

Tab. 4 Free sugar content determination results in *Coriolus versicolor* intracellular glycopeptide samples

样品 ID	葡萄糖	麦芽糖	麦芽三糖	麦芽四糖	麦芽五糖	麦芽六糖	麦芽七糖	麦芽八糖	麦芽九糖	麦芽十糖	麦芽十一糖
Q1	0.23	1.64	1.33	/	/	/	/	/	/	/	/
Q2	0.36	1.90	1.49	/	/	/	/	/	/	/	/
Q3	0.35	1.82	1.53	/	/	/	/	/	/	/	/
Q4	0.38	1.59	1.44	/	/	/	/	/	/	/	/
A1	0.48	2.13	4.38	2.59	2.59	5.96	5.55	2.72	2.75	1.83	1.46
A2	0.47	2.00	4.20	2.32	2.26	5.66	5.58	2.70	1.60	0.87	2.70
A3	0.38	2.02	4.21	2.40	2.27	5.77	5.43	2.49	1.51	1.26	2.49
A4	0.36	1.94	4.01	2.30	2.30	5.49	5.23	2.44	1.26	0.84	2.44
A5	0.38	1.99	4.09	2.34	2.34	5.60	5.33	2.53	1.59	1.41	2.53
A6	0.37	1.95	4.01	2.29	2.19	5.48	5.24	2.51	1.55	1.38	2.51
A7	0.44	2.03	4.20	2.31	2.28	5.60	5.56	2.79	1.69	1.19	2.79
A8	0.47	2.55	4.57	2.04	2.57	6.36	6.34	2.16	2.02	1.63	2.16
P1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
P2	1.07	6.54	7.47	3.83	1.09	5.74	2.43	0.71	3.09	0.27	0.54

表 5 云芝胞内糖肽样品中水解单糖含量测定结果

Tab. 5 Hydrolyzed monosaccharides content determination results in *Coriolus versicolor* intracellular glycopeptide samples

样品 ID	甘露糖	核糖	葡萄糖	半乳糖	木糖	阿拉伯糖	岩藻糖
Q1	0.877	0.452	16.82	0.956	0.307	0.586	0.835
Q2	1.084	0.733	11.95	1.397	0.701	0.286	0.712
Q3	1.003	0.643	13.75	1.029	0.741	0.299	0.932
Q4	0.905	0.792	12.28	1.701	0.670	0.280	0.817
A1	0.874	0.185	17.72	0.827	0.261	0.119	0.156
A2	0.519	0.255	22.36	0.678	0.079	0.071	0.138
A3	1.020	0.266	28.21	0.712	0.332	0.094	0.287
A4	0.998	0.225	30.01	0.676	0.289	0.087	0.290
A5	0.611	0.315	26.08	0.620	0.192	0.081	0.194
A6	0.642	0.330	27.38	0.651	0.202	0.085	0.204
A7	0.826	0.251	22.76	0.910	0.238	0.121	0.156
A8	0.903	0.239	25.47	0.748	0.247	0.084	0.296
P1	2.170	0.360	11.38	2.370	/	/	1.640
P2	2.356	/	28.62	1.390	0.776	0.148	0.498

芽糖和麦芽三糖, 菌丝体提取物中不含有游离寡糖。样品水解后, Q 企业的原料的葡萄糖含量较小, 而岩藻糖含量较大, 与 A 企业的样品在含量上有一定差异。A 企业葡萄糖含量高于 Q 企业的可能原因是样品中的寡糖经水解后转化为葡萄糖。

3.3 指纹图谱的建立

在“2.3”项下色谱方法的基础上测定云芝胞内糖肽样品游离糖和水解单糖 HPLC 指纹图谱的精密性、重复性和稳定性。分别以游离糖样品 11 个已知成分(葡萄糖, 麦芽寡糖)为共有指纹峰和水解单糖样品 7 个已知成分(甘露糖、核糖、无水葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖、岩藻糖)为共有指纹峰建立指纹图谱, 通过对同一样品连续进样 6 次来评估精密性, 通过使用相同方法制备分析 6 个样品来评估重复性, 通过分析同一天不同时间间隔(0, 2, 4, 8, 12, 24 h)的样品溶液进行稳定性试验。以葡萄糖为参比峰, 游离糖 11 个共有指纹峰和水解单糖的 7 个共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值结果见表 2。

采用 ChemPattern 软件进行分析, 叠加指纹图谱见图 3。以 A1 和 Q1 样品为代表性样品, 建立共有模式, 计算云芝胞内糖肽样品相似度, 结果

见表 6。云芝胞内糖肽样品(除 P1、P2 外)游离糖相似度值 >0.94 , 水解单糖相似度 >0.97 , 说明不同来源的样品具有相似的成分。使用化学计量学方法对这些样品进行了分析, 包括主成分分析(principal component analysis, PCA)和偏最小二乘法判别分析(partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)^[20-21]。

3.4 化学计量学分析

3.4.1 PCA 采用 PCA 方法研究了游离糖和水解单糖含量的相似性和差异性, 对原始数据进行 UV 标度化处理。

根据 PCA 得分散点图, A 企业来源的样品与 Q 企业来源的样品有较明显的区分, 表明 2 个来源的云芝胞内糖肽样品质量差异较大, 见图 4A~B。菌丝体提取物(P1)与云芝胞内糖肽质量相近, 而培养基滤液(P2)与云芝胞内糖肽样品质量差异较大。

由 PCA 得分散点图可知, 游离糖第一个主成分对总方差的累积贡献率为 75.85%, 水解单糖第 1 个主成分对总方差的累积贡献率为 82.54%; 由自变量主成分累积解释方差表可知, 麦芽糖和葡萄糖为游离糖样本区分的主要因素, 而半乳糖和甘露糖为水解单糖样本区分的主要因素, 见表 7~8。

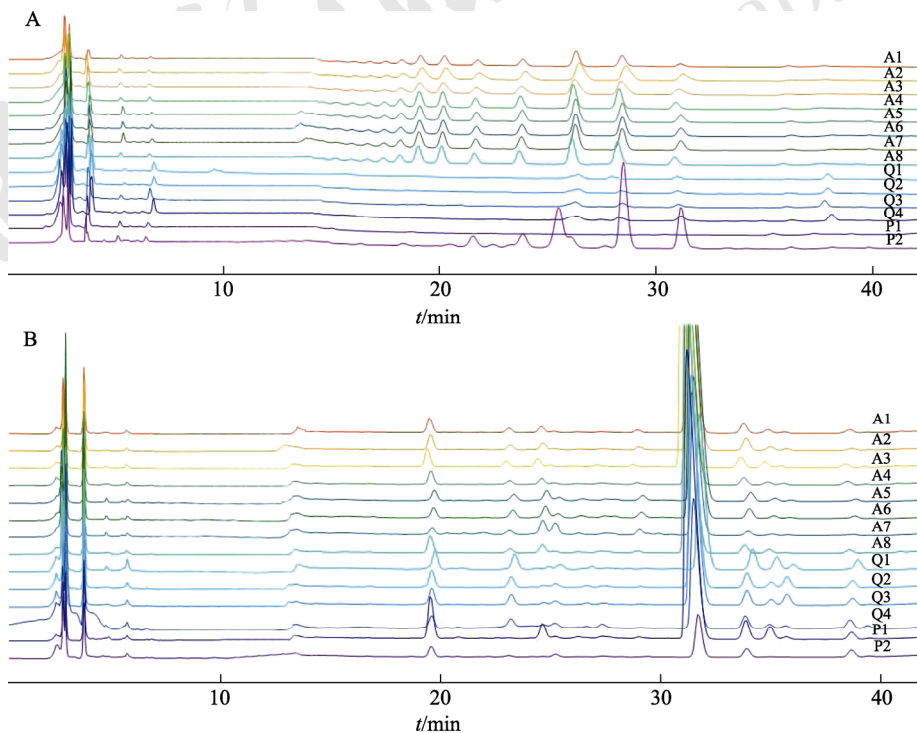


图 3 HPLC 指纹图谱

A-游离糖样品指纹图谱; B-水解单糖样品指纹图谱。

Fig. 3 HPLC fingerprinting chromatograms

A-fingerprinting chromatograms of free sugar samples; B-fingerprinting chromatograms of hydrolyzed monosaccharide samples.

表 6 HPLC 指纹图谱相似度分析

Tab. 6 HPLC fingerprinting chromatograms similarity analysis

样品 ID	游离糖样品	水解糖样品
共有模式	1.000 0	1.000 0
Q1	0.970 6	0.998 2
Q2	0.971 3	0.994 1
Q3	0.983 1	0.998 0
Q4	0.972 8	0.998 3
A1	0.967 2	0.999 9
A2	0.956 1	0.999 9
A3	0.951 8	0.973 4
A4	0.953 7	0.998 9
A5	0.957 5	0.993 2
A6	0.954 7	0.999 9
A7	0.956 9	0.999 1
A8	0.946 0	0.999 5
P1	0.000 0	0.874 3
P2	0.488 4	0.998 2

总体来说,游离糖样品中,A企业来源的样品因添加了培养液而使麦芽糖与葡萄糖含量升高,从而与Q企业来源的样品产生差异;在样品

水解后,A企业来源的样品因半乳糖和甘露糖含量的差异而与Q企业来源的样品产生区分。

3.4.2 PLS-DA PLS-DA 可以提高组内样品的分离度,降低分散度^[22-23],PLS-DA的结果见图5。根据 PLS-DA 的预测变量重要性(VIP)值,筛选出影响分类的主要成分。一般认为,VIP>1的成分在分类中起着关键作用^[24]。游离糖的麦芽糖、麦芽三糖和葡萄糖,水解单糖中的半乳糖和甘露糖VIP值都>1,结果见表9~10。因此,在云芝胞内糖肽的质量控制过程中,应高度关注游离的麦芽糖、麦芽三糖和葡萄糖,及水解后的半乳糖和甘露糖的含量。

4 讨论

本研究建立了指纹图谱测定了2种不同来源的云芝胞内糖肽的游离糖和水解单糖,以评价2种云芝胞内糖肽的质量差异。通过对比对照品和样品的HPLC-UV图谱确定了云芝胞内糖肽中含

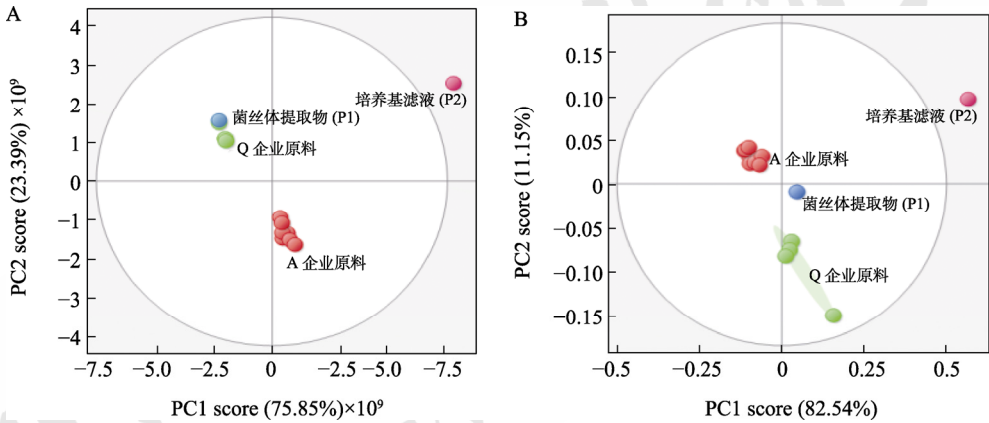


图 4 云芝胞内糖肽样品 PCA 图

A-游离糖样品 PCA 得分散点图; B-水解单糖样品 PCA 得分散点图。

Fig. 4 PCA of *Coriolus versicolor* intracellular glycopeptide samples

A-scatter plot of PCA score of free sugar samples; B-scatter plot of PCA scores of hydrolyzed monosaccharide samples.

表 7 游离糖样品 PCA 自变量主成分累积解释方差

Tab. 7 Cumulative interpretation variance of PCA independent variables of free sugar samples

自变量	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10
麦芽十一糖	0.007 3	0.119 7	0.132 6	0.271 0	0.661 6	0.769 2	0.965 9	0.999 2	0.999 9	1.000 0
麦芽十糖	0.244 8	0.921 9	0.944 7	0.945 0	0.955 5	0.979 1	0.996 1	0.996 6	0.998 5	1.000 0
麦芽九糖	0.055 4	0.941 8	0.960 3	0.962 3	0.965 8	0.996 7	0.999 3	0.999 6	0.999 6	1.000 0
麦芽八糖	0.013 8	0.768 4	0.925 7	0.996 7	0.999 4	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0
麦芽七糖	0.054 2	0.989 0	0.995 4	0.996 1	0.999 3	0.999 7	0.999 8	1.000 0	1.000 0	1.000 0
麦芽六糖	0.049 8	0.989 2	0.998 0	0.999 0	0.999 8	0.999 8	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0
麦芽五糖	0.627 4	0.992 1	0.997 7	0.998 3	0.999 6	0.999 7	0.999 7	0.999 7	1.000 0	1.000 0
麦芽四糖	0.102 1	0.988 2	0.996 4	0.997 5	0.999 8	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0
麦芽三糖	0.123 7	0.985 7	0.999 6	0.999 7	0.999 8	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0
麦芽糖	0.993 2	0.999 1	0.999 9	0.999 9	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0
葡萄糖	0.936 3	0.987 3	0.998 1	0.998 4	0.999 9	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0

表 8 水解单糖样品 PCA 自变量 PCA 累积解释方差表
Tab. 8 Cumulative interpretation variance of PCA independent variables of hydrolyzed monosaccharide samples

自变量	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7
甘露糖	0.980 1	0.983 9	0.989 7	0.998	0.999 7	1.000 0	1.000 0
核糖	0.162 2	0.238 2	0.874 8	0.898	1.000 0	1.000 0	1.000 0
葡萄糖	0.589 8	0.971 2	0.987 1	0.988 6	0.998 8	0.999 5	1.000 0
半乳糖	0.990 5	0.990 5	0.991 9	0.997 3	0.999 8	1.000 0	1.000 0
木糖	0.000 7	0.723 3	0.835 6	0.933 4	0.981 6	0.999 9	1.000 0
阿拉伯糖	0.006 3	0.674 8	0.926 9	0.978 3	0.999 5	1.000 0	1.000 0
岩藻糖	0.019 8	0.871 1	0.927 4	0.991 7	0.998 6	1.000 0	1.000 0

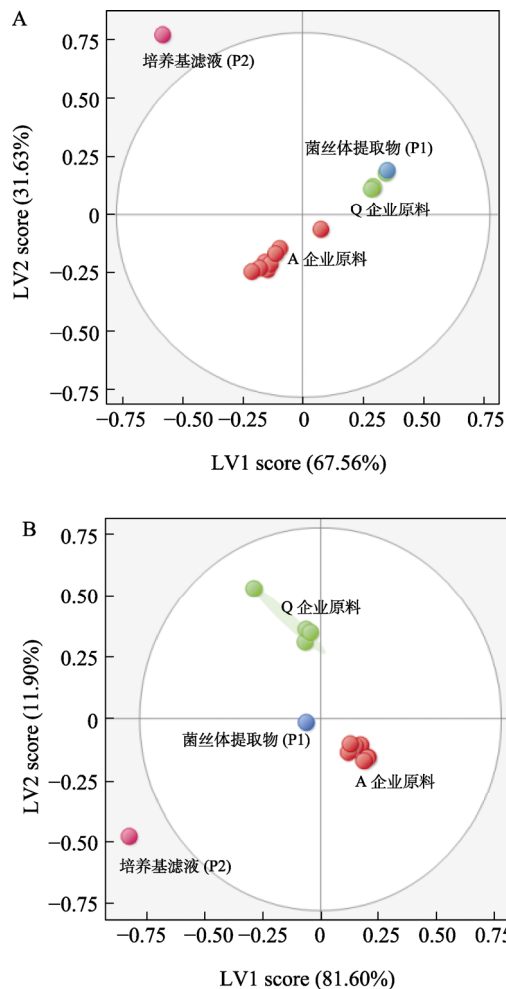


图 5 云芝胞内糖肽样品 PLS-DA 结果
A-游离糖样品 PLS-DA 得分散点图; B-水解单糖样品 PLS-DA 得分散点图。
Fig. 5 PLS-DA result of *Coriolus versicolor* intracellular glycopeptide samples
A-Scatter plot of PLS-DA score of free sugar samples; B-scatter plot of PLS-DA score of hydrolyzed monosaccharide samples.

有甘露糖、核糖、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖、岩藻糖 7 种单糖; 进而进行了游离糖和水解单糖的含量测定。与现有国家标准^[8]采用费林试液反应-硫代硫酸钠滴定液进行氧化还原滴定测定单糖、硫酸-苯酚显色法测定总糖的方法相比,

表 9 游离糖样品偏最小二乘法判别分析 VIP 值
Tab. 9 VIP value of free sugar samples by partial least squares discriminant analysis

自变量	预测 VIP 值	正交 VIP 值	总 VIP 值
麦芽十一糖	0.018 3	0.097 1	0.069 8
麦芽十糖	0.074 2	0.129 0	0.105 3
麦芽九糖	0.168 5	0.195 5	0.182 5
麦芽八糖	0.341 6	0.356 8	0.349 3
麦芽七糖	0.753 5	0.512 9	0.644 5
麦芽六糖	0.938 8	0.703 0	0.829 3
麦芽五糖	0.216 2	0.516 8	0.396 1
麦芽四糖	0.709 3	0.605 6	0.659 5
麦芽三糖	1.213 3	0.947 4	1.088 5
麦芽糖	1.535 9	2.478 9	2.062 0
葡萄糖	1.009 5	1.272 8	1.148 7

表 10 水解单糖样品偏最小二乘法判别分析 VIP 值
Tab. 10 VIP value of hydrolytic monosaccharide samples by partial least squares discriminant analysis

自变量	预测 VIP 值	正交 VIP 值	总 VIP 值
甘露糖	1.776 5	2.620 2	2.238 5
核糖	0.014 2	0.916 1	0.647 9
葡萄糖	0.461 4	0.823 1	0.667 2
半乳糖	1.571 6	3.302 7	2.586 3
木糖	0.264 5	0.724 8	0.545 5
阿拉伯糖	0.209 7	1.227 1	0.880 3
岩藻糖	0.217 0	1.485 2	1.061 4

本方法专属性更强, 重现性好, 更能反映云芝胞内糖肽的各单糖组成和游离糖的含量, 对原料的质量工艺起到更好的监控作用。

利用高分辨质谱 Q-TOF MS/MS 获得的 XIC 图, 通过各化合物精确分子量首次推测并鉴定了云芝胞内糖肽中含有的游离糖为葡萄糖、麦芽寡糖, 为确定复杂药物成分、产品质量控制提供可靠的科学依据, 可比较不同生产企业生产的云芝胞内糖肽差异性, 为糖肽类药物的定性研究提供了技术参考。限于糖类物质在质谱中的响应不佳等原因, 本研究尚未鉴定云芝胞内糖肽中的其他糖类, 未来需进一步进行研究。

将 PCA 和 PLS 化学计量分析法应用于 2 个企业的 12 批云芝胞内糖肽样品的指纹分析, 清晰地揭示 2 个企业样品间产生差异的影响因素。质量差异提示, A 企业将培养液滤液与菌丝体提取物合并后生产的方法会增加游离寡糖的含量, 而寡糖含量增加对人体的影响未可知, 在用药安全性上存在一定风险, 应加强监管。本研究所建立的

指纹分析方法与多元统计分析相结合,为监测和评价云芝胞内糖肽的质量一致性提供了一个高效、可靠和实用的参考工具,为不同工艺生产菌丝体多糖产物的质量监控提供了有效的方法。

REFERENCES

- [1] ZHONG L D, YAN P J, LAM W C, et al. *Coriolus versicolor* and *Ganoderma lucidum* related natural products as an adjunct therapy for cancers: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Front Pharmacol*, 2019(10): 703.
- [2] WANG K L, LU Z M, MAO X, et al. Structural characterization and anti-alcoholic liver injury activity of a polysaccharide from *Coriolus versicolor* mycelia[J]. *Int J Biol Macromol*, 2019(137): 1102-1111.
- [3] REN Y L, GENG Y, CHEN H D, et al. Polysaccharide peptides from *Coriolus versicolor*: A multi-targeted approach for the protection or prevention of alcoholic liver disease[J]. *J Funct Foods*, 2018(40): 769-777.
- [4] KAN C, DANISHEFSKY S J. Recent departures in the synthesis of peptides and glycopeptides[J]. *Tetrahedron*, 2009, 65(45): 9047-9065.
- [5] DOU H, CHANG Y, ZHANG L. *Coriolus versicolor* polysaccharopeptide as an immunotherapeutic in China[J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2019(163): 361-381.
- [6] SKNEPNEK A, TOMIĆ S, MILETIĆ D, et al. Fermentation characteristics of novel *Coriolus versicolor* and *Lentinus edodes* kombucha beverages and immunomodulatory potential of their polysaccharide extracts[J]. *Food Chem*, 2021(342): 128344.
- [7] SUN X W, SUN Y P, ZHANG Q B, et al. Screening and comparison of antioxidant activities of polysaccharides from *Coriolus versicolor*[J]. *Int J Biol Macromol*, 2014(69): 12-19.
- [8] 国家药品监督管理局国家药品标准. WS₁-XG-021-2002[S]. 16: 296-297.
- [9] ARNONE D, CHABOT C, HEBA A C, et al. Sugars and gastrointestinal health[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2022, 20(9): 1912-1924.e7.
- [10] LIU Y T, LEI F H, HE L, et al. Comparative study on the monosaccharides of three typical galactomannans hydrolyzed by different methods[J]. *Ind Crops Prod*, 2020(157): 112895.
- [11] LIU D, TANG W, YIN J Y, et al. Monosaccharide composition analysis of polysaccharides from natural sources: Hydrolysis condition and detection method development[J]. *Food Hydrocoll*, 2021(116): 106641.
- [12] WANG Q, FANG Y. Analysis of sugars in traditional Chinese drugs[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2004, 812(1/2): 309-324.
- [13] ZHANG X, CAI Z Y, MAO H Y, et al. Isolation and structure elucidation of polysaccharides from fruiting bodies of mushroom *Coriolus versicolor* and evaluation of their immunomodulatory effects[J]. *Int J Biol Macromol*, 2021(166): 1387-1395.
- [14] SOYSEVEN M, SEZGIN B, ARLI G. A novel, rapid and robust HPLC-ELSD method for simultaneous determination of fructose, glucose and sucrose in various food samples: Method development and validation[J]. *J Food Compos Anal*, 2022(107): 104400.
- [15] HUANG W, PAN Y, JIANG H J, et al. A comprehensive quality evaluation method of *Corydalis yanhusuo* by HPLC fingerprints, chemometrics, and correlation analysis[J]. *J Sep Sci*, 2021, 44(10): 2054-2064.
- [16] JALALVAND A R. Chemometrics in investigation of small molecule-biomacromolecule interactions: A review[J]. *Int J Biol Macromol*, 2021(181): 478-493.
- [17] LIU J, ZHOU J, ZHANG Q Q, et al. Monosaccharide analysis and fingerprinting identification of polysaccharides from *Poria cocos* and *Polyporus umbellatus* by HPLC combined with chemometrics methods[J]. *Chin Herb Med*, 2019, 11(4): 406-411.
- [18] XIE J Z, ZOU L H, XIE Y F, et al. Analysis of the monosaccharide composition of water-soluble *Coriolus versicolor* polysaccharides by ultra-performance liquid chromatography/photodiode array detector[J]. *Chromatographia*, 2021, 84(7): 615-622.
- [19] WANG W Z, WANG Y Q, CHEN F, et al. Comparison of determination of sugar-PMP derivatives by two different stationary phases and two HPLC detectors: C₁₈ vs. amide columns and DAD vs. ELSD[J]. *J Food Compos Anal*, 2021(96): 103715.
- [20] ZHANG Y L, WU M Q, XI J R, et al. Multiple-fingerprint analysis of *Poria cocos* polysaccharide by HPLC combined with chemometrics methods[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2021(198): 114012.
- [21] HUANG Y, WANG T J, YIN G, et al. High-performance liquid chromatography-based fingerprint analysis with chemical pattern recognition for evaluation of *Mahonia bealei* (Fort.) Carr[J]. *J Sep Sci*, 2020, 43(18): 3625-3635.
- [22] QI P, ZHENG Y Y, SHEN Y, et al. Characterization and discrimination of steroidal saponins in *Tribulus terrestris* L. and its three different aerial parts by chemical profiling with chemometrics analysis[J]. *J Sep Sci*, 2018, 41(22): 4212-4221.
- [23] LU Y Y, GUO S, ZHANG F, et al. Nutritional components characterization of Goji berries from different regions in China[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2021(195): 113859.
- [24] HUANG Q, QIAN H Y, FENG D, et al. Quality consistency evaluation of commercial transfer factor injections by chromatographic fingerprint combined with multivariate statistical analysis[J]. *J Sep Sci*, 2020, 43(11): 2042-2052.

收稿日期: 2022-10-21

(本文责编: 李艳芳)