

利用分子篩—高效液態層析儀 (SE-HPLC) 分析真菌性中藥材之 1-3-BETA 多糖體

台北醫學院·中藥醫學研究中心

蘇慶華

中文摘要：

本研究以 SE-HPLC 爲中心，分析包括茯苓、豬苓、雷丸以及冬虫夏草等真菌性藥材之可溶性多糖之分子量及含量分佈，並配合酸水解，酵素水解以及史密斯降解法作爲糖組成及構造上之佐證，說明 SE-HPLC 在可溶性多糖分析上與傳統方法相比較，可達迅速分析之效果，並且說明不同真菌性藥材之多糖所呈現之差異。利用此一方法可分析分子量在 $30 \times 10^6 - 1 \times 10^5$ 範圍之多糖以及經由酵素水解後產生之小分子糖，並得知一般真菌藥材之中性可溶性多糖成分爲 3-5 % (W/W) 之範圍。而屬於腹菌綱之真菌藥材在高分子 (2×10^6 以上) 多糖在組成及結構上無太大之差異，均由葡萄糖之 1-6 及 1-3-beta 價鍵組成，但在與低分子多糖 (2×10^5 以上) 之分配上則有顯著之差異，其中以雷丸之高分子糖較多。來自子囊菌之冬虫夏草則在組成上有異於腹菌綱及多孔菌，其係由 GALACTOSE 及 MANNOSE 之複雜構造組成。

一、前言：

以真菌爲材料之中藥材，舉凡冬虫夏草、茯苓、豬苓及雷丸等，均有報告顯示，是以 1-3-BETA- 多糖爲主鍵，並具 1-6-BETA 結合之聚合物，具有免疫上之功能，但此類多糖易與澱粉、糊精等不具生理活性之物質相混合，而造成分析時相互干擾之現象，尤其在許多靈芝產品中即有添加大量澱粉之情形。而以往分析 1-3-BETA- 多糖之方法主要以酒精 (50-75 %) 沉降物再溶解，以層柱 (離子交換低壓分子層柱) 分離，再以化學方法如甲基化 (METHYLATION)，SMITH 降解，再以氣相層析分析其糖之組成，糖鍵結合 (1-2, 1-3, 1-4, 或 1-6)，而 ALFA 或 BETA 之結合要用核磁共振儀或酵素水解

法來加以證明。本研究則擬用分子篩—高效液相層析法之特性，快速而穩定得達到分子量分析的目的。並結合化學方法與酵素水解法來證明 1-3- 多糖之存在，並利用 SE-HPLC 可得到分子量分佈之特性得知其含量。

HPLC 為目前各研究案較為普遍之儀器，因此，如能發展出一種能為多數實驗室所普遍採用之方法，將對於此類物質之分析有所助益，而 SE-HPLC 與其它種類 HPLC 之差異，僅在層柱 (COLUMN) 上有所不同。而且所用之流動相亦只用去離子水 (DEIONIZED WATER)，適合例長之分析，故 SE-HPLC 已逐漸應用於質之分離及純化，並利用作為分子量之決定（誤差小於 10 %）上採行。而在多糖方面則因偵測方法較為困難，則較少採用。本研究將利用紫外線 (UV)-195NM，RI 及 PHENOL-H₂SO₄ 法，混合偵測可得到相當良好之效果。

至於分析的理論上 SE-HPLC (Size-exclusion, 或 gel-filtration, 或 gel-permeation 或 molecular-sieving 之 HPLC) 及因一些堅硬度強並足以支撐膠體之孔洞，適合在較高壓力下對於不同分子大小進行分離之填充物質業已開發，故以高速下得到可再現之層析圖，並且分析之樣品量可至數 mg，如配合適當之偵測器則可以快速的進行定性及定量之工作。當然配合其他前處理及其他酵素、化學方法則更有效的決定多糖之性質。

二、研究材料及方法：

真菌性中藥材將如圖一進行分析。

(一)藥材：選擇真菌性中藥材，豬苓、冬蟲夏草、茯苓、雷丸為材料進行分析。

(二)粉碎：以磨粉機將藥材粉碎至 10-10um 之菌絲片段。

(三)萃取：以 0.01 M phosphate buffer, pH 7.0 萃取中性多糖。

萃取溫度 95 度 C, 12 hr，萃取比率取 1:200 可用 1-2 克材料進行。

(四)過濾、離心：除去藥材之菌絲片段、並以高速除去真菌包子。

(五)上清液直接注入 HPLC 分析，或進行酵素，酵素或酸水解。

(六)-1 酵素水解依 Pazur (1987) 方法進行，可知是否為 alfa 或 beta form 或糖組成。

(六)-2 酸水解依 Chaplin (1987) 方法進行，可知單糖組成，分析由層柱純化之樣品。

- (六)-3 Smith 降解，依 Pazur (1987) 方法進行，可知是否為 1-3- 結合鍵。
- (七)移動項基本上為去離子，將依需要改變 pH 及離子強度。
- (八)HPLC-pump 為 Shimadzu 4A，流速 3-4ml/min. 壓力為 30-40kg/cm²。
- (九)注入器：附有 1ml 之 100p，可注入 0.1 - 1.0ml 之樣品，視分析或純化而定。
- (十)層柱為基本上以 Fructogel-TSK-HW-65(S)20-40UM 之膠體為填充物，自行充填密度及緩衝液視實驗而定，管柱以耐壓達 100KG/CM² 之 superformance column 1.6cm-2.6cm I. D × 30-60 cm L 為原則。
- (十一)UV 偵測器：以 195nm 為測定碳水化合物之波長。
- (十二)RI 以放大信號比 1/82 進行偵測，RI 為非特異性之偵測器，故可作為相對量之參考值。
- (十三)Fraction collector 將收集每次之 eluent 進行 (14) phenel-H₂SO₄ 之碳水化合物測定 (Chaplin 1987) 以決定是否為糖類如純化進行時，可收集進行 (6-2) 及 (6-3) 之方法，偵測單糖組成及 1-3 結合鍵，或進行 (6-1) 之酵素水解。

三、研究結果：

(一)分子量之標準曲線及分子量分佈校正

由已知分子量之糊精對本研究所採用之層柱進行標準曲線及分子量校正之工作，所採用之糊精為 BLUE DEXTRAN (分子量 2×10^6)，DEXTRAN 四種分別為分子量 5.1×10^5 ， 2.5×10^5 ， 1.38×10^5 ， 6.3×10^4 (購自 Sigma) 以及葡萄糖 (Glucose)，其結果如圖二及圖三，分別利用 UV (195NM) 及折射率測定器 (RI) 以及化學比色法測定，顯示所用之層柱在分子量 5.0×10^4 至 2×10^6 之範圍內具有相當良好之分離效果，而單糖亦可在分離之尾端呈現出來。

本研究乃根據本特性進行多糖體之分析工作，而 SE-HPLC 之儀器配置及操作條件，則如圖四所顯示。

(二)對藥用真菌萃取液進行 SE-HPLC 之結果

以蒸餾水或者 pH7.0 之 0.2M 磷酸緩衝液進行藥用真菌多糖體之萃取，而以 SE-HPLC 分析之結果如圖五。由圖五所計算出來的各種藥用真菌多糖體之分子量於 (表一) 表示，其分子量則以平均分子量來表示。

基本上，在茯苓、豬苓及雷丸之水萃取液中，顯示，具兩個不同分

子量之多糖。而冬蟲夏草則為較複雜之單一分佈，其所涵蓋之範圍由 $6.0 \times 10^6 - 1.2 \times 10^6$ 。

一般而言，在分子量在 5×10^5 以上在文獻上具有免疫增強之生理活性，因此本研究乃對分子量較大的 F1 進行純化，以 3×10^5 之分子膜進行分割、經過冷凍乾燥後分別得到 5mg 之多糖，進行往後之分析工作。

(三) 多糖含量之測定

對水萃取液分析多糖含量時，以 SE-HPLC 流出液對多糖進行 PHENOL- H_2SO_4 測定，並 1-3-BETA 為主鏈之多糖 CURDLAN 作為標準品進行比較，其結果如（表二），而不論何種藥用真菌，其水萃取液均不含低分子糖，因此可以利用其萃取液進行含糖量之測定，其間差異甚小。（表二）

(四) 第二次萃取之結果

以等量之水進行，對第一次萃取之不溶物進行萃取，再進行 SE-HPLC 以及 PHENOL- H_2SO_4 測定發現，在第二次萃取液中，所含之多糖已經很少（圖六），因此，如果以 100 倍溶液萃取多糖，可萃取約 95 % 之多糖，而不必再行第二次萃取。

(五) 糖類之組成

取一毫克之多糖以鹽酸 (0.2N) 進行糖類水解，分別以 TLC 及 GC 分析水解物，其結果如圖七、及圖八、所顯示，在茯苓、豬苓以及雷丸所得到之結果均相同，是由單一葡萄糖所組成，而冬蟲夏草所得到之結果則由半乳糖 (GALACTOSE) 及 MANNOSE 組成，並且以 MANNOSE 之含量較多，顯示冬蟲夏草所組成之多糖與其它三種多糖在糖的組成上有所不同。

(六) 史密斯降解法 (SMITH DEGRADATION) 之結果

以 2mg 之 F1 進行史密斯降解，再以鹽酸水解，進行乙酰化 (ACETYLATION) 以 GC 分析，其結果如圖九，在茯苓水解物中含有較

大量之二碳及三碳產物，並且具有較少量之葡萄糖，這種結果顯示，構造上，茯苓之多糖乃以 1-6 為主，並且具有較少之 1-3 結合；而雷丸及豬苓則顯示在二碳、三碳及葡萄糖之比例十分接近，顯示其為以 1-3 為主之價鍵並有 1-6 之側鏈結構，與茯苓之結合方式不同。而冬蟲夏草之多糖則顯示出較為複雜之情況，其構造同時顯示具有 1-3，1-4，及 1-6 之結合，而由其 SE-HPLC 圖形也顯示其組成較為複雜。

(七) 酵素之水解

本研究利用 α -amylase, β -glucosidase 以 cellulase 分別對茯苓、豬苓、雷丸及冬蟲夏草之多糖進行水解，經過 44 小時後再行 SE-HPLC 分析，理論上，如果真菌性之多糖能被以上三種酵素分解，則在 HPLC 之圖譜上呈現分子量改變之情形，也就是說原來的峰 (PEAK) 會有右移的現象，此四種多糖在處理前後之圖形分別列於圖十至圖十三。

在圖九中，可見茯苓之多糖在 α -AMYLASE 中並沒有發生位移的現象，而在圖十一 II 中所多出之一峰，則為 α -AMYLASE 中原本所添加做為安定性之糊精，並非水解產物，而圖十一 III 中則可顯看出原來的多糖經水解後含量減少，並多出一個單糖之測定峰，顯示經水解後，形成小分子糖，而在 CELLULASE 則無明顯之改變，這顯示茯苓之多糖結合鍵為 BETA 型。

相同之情形亦發現在豬苓、雷丸以及冬蟲夏草之水解物中（圖十、十一、十二），而 β -GLUCOSIDASE 同時具有水解 BETA 型 GALACTOSE 之能力，因此，在圖十三 - III 中，冬蟲夏草之多糖亦被水解而產生一寡糖測定峰。

四、討論：

由以上之分析結果顯示，在茯苓、豬苓、雷丸以及蟲及夏草之多糖，在結構及組成上有顯著之差異，包括：

(一) 在分子量之分佈上，茯苓及豬苓含有較多低分子量之多糖 ($2.2-2.5 \times 10^5$) 而含較少高分子多糖 (1×10^6)；相反的，在雷丸則含較多的高分子多糖（圖

五，表一及二），冬蟲夏草則呈現一連續性分子量分佈之多糖。

(二)在含量上則以豬苓之含量稍高，但可溶性多糖則佔真菌性藥材之3-5 % (W/W)左右。

(三)基本上，茯苓、豬苓及雷丸這些屬於擔子菌亞腹菌綱之真菌具有共同性質之多糖，均由單一葡萄糖所組成，而以BETA-1-6為主，BETA-1-3為副之主鏈（圖八、九）而在分類上屬子囊菌之冬蟲夏草則由GALACTOSE及MANNOSE所組成，其組成較為複雜，包括BETA-1-3,1-4,及1-6之連結鍵，必需用更進一步的分析才能得到其詳細之構造，因此，本研究之分析亦可看出多糖成分與分類學上的一些關係。另外，由以前所作之分析亦可看出在靈芝多糖中，由史密斯降解之分析中，顯示為以GLUCOSE為主之1-3連結鍵，而以1-6為副之側鏈構（圖十四）則為多孔菌之主要結構。

以上這些分析足以顯示在腹菌綱，多孔菌，以及子囊菌在多糖之組成中有所差異。

(四)本研究中所採用之方法主要是利用SE-HPLC進行分析，其優點在於：

1. 以極少量之樣品即可快速得知分子量之分佈，本研究所用之分析量為0.2毫升，所含之多糖濃度為1-5mg/ml。
2. 以蒸餾水為分析時之移動相，在成本上十分節省。
3. 配合鹽酸水解，史密斯降解，以及酵素水解，可以得到其醣組成、大致上結合鍵之情形以及其 α -或 β -之構造，其所用的純化多糖在5-10毫克即已足夠。
4. 對於多糖之純化程度，可利用少量的樣品加以快速的分析，分析一個樣品，在本研究中為四十分鐘。

但本方法之限制在於：

1. 所分析的多糖分子量在 $3.5 \times 10^6 - 1 \times 10^5$ 之範圍，超出此一範圍則分析之結果準確度降低。
2. 具有對可溶性的多糖可進行分析。
3. 對於分析之效率，仍比一般HPLC稍差（一般在20 - 30分鐘），但此點

可經由改變膠體之硬度加以改善。

五、結論與建議：

利用 SE-HPLC 分析真菌性中藥材中之多糖成分可以達成：

1. 對可溶性多糖分子量，含量之分佈做迅速的分析。
2. 如配合酵素之水解，可以得知其糖類結合的形成。
3. 配合酸水解及史密斯降解則可更充分得知多糖構造上之資料。
4. 由以上分析可以區分不同真菌種類多糖之來源為腹菌綱（茯苓），多孔菌科（豬苓、雷丸、靈芝）或子囊菌（冬蟲夏草）。
5. 可利用 SE-HPLC 做為分離、純化多糖之良好工具。

根據以上方法之分析，建議除以 SE-HPLC 作為分析工具外，可進一步測試不同分子量之真菌性多糖，在生理活性上之功能。例如，抗腫瘤之活性與其分子量及糖結構上之差異，則可更進一步利用 SE-HPLC 來分析生理活性物質之可行性。

1. Chaplin, M. F. 1987 Monosaccharide. In M. F. Chaplin & J. F Kennedy (eds.), "Carbohydrate analysis", p.1-50. Irl press, Oxford.
2. Chihara, G. et al 1987. "Antitumor and metastasis-inhibitory activities of lentinan as an immunomodulator". Cancer Detection and Prevention Supplement. 1:423-443.
3. Miyazaki, T., et al 1974 "Chemical structure of antitumor polysaccharide, Coriolan, produced by Coriolus versicolor". Chem. Pharm. Bull. 22:1739.
4. Miyazaki, T. et al 1974. Studies on fungal polysaccharides. XX. "Galactomannan of cordyceps sinensis". Chem. Pharm. Bull. 25:3524-3328.

5. Miyazaki, T. and M. Ishijima 1981 "Studies on fungla polysaccharides". XXVII. "Sturctural examination of a water-soluble antitumor polysaccharide from Cordycpes ophioglossoides in mice". Jpn. J. Cancer Res. Chemi. Pharm. Bull 29:3611.
6. Ohmori, T. et al 1986 "Antitumor activity of protein-bound polysaccharide from Cordyceps sphioglossoides in mice". Jpn. J. Cancer Res. 77:1256-1263.
7. Pazur, J. H. 1987 "Neutral polysaccharide". In M. F. Chaplin & J. F. Kennedy (eds.) Carbohydrate analysis, p.71-74. Irl press, oxford.
8. Su, C. H., L.R. Hsu and T. C. Tung 1991 "Application of SE-HPLC on analyzing polysaccharides produced by mushrooms". In Maher(ed.)Science and Cultivation of Edible Fungi,p329-335. Balkema, Rotterdam.
9. Usi, T.et al 1981 "Antitumor activity of water sobluble beta-glucan elaborated by ganoderma applanatum". Agric. Biol. Chem. 45:323.
10. Welling, G. W. and J. F. Welling-Waster 1989 "Size-exlusion HPLC of protein". In Oliver (ed.), HPLC of macromolecules, p.77-89. Irl Press, Oxford.
11. Yamada, H. et al 1984 "Structure of a galactosaminoglycan from Cordyceps ophioglossoides", Carbohydrate Research 134:275-282.
12. Yanki, T. , et all 1986 "Correlation between the antitumor activity of Schizophyllan and its triple helix". Agr. Biol. Chem. 50:2415-2416.

表一、由真菌性藥材萃取可溶性多糖之分子量

Table 1. Average molecular weight of polysaccharides from medicinal fungi

	F_1^e		$F_2^{\#}$	
	Ve/Vc	M.W.	Ve/Vc	M.W.
<u>Poria cocos</u> Hoelen	0.270	4.6×10^6	0.624	2.5×10^5
<u>Polyporus Umbellatus</u> Fungus Umbellatus	0.259	5.3×10^6	0.675	2.0×10^5
<u>Polyporus mylittae</u>	0.288	3.9×10^6	0.507	5.1×10^5
<u>Cordyceps sinensis</u>	0.25- 0.43	6.0×10^6 1.2×10^6	---	---

^e First peak area in Fig. 5.

[#] Second peak area in Fig. 5.

表二、真菌性藥材之多糖體含量

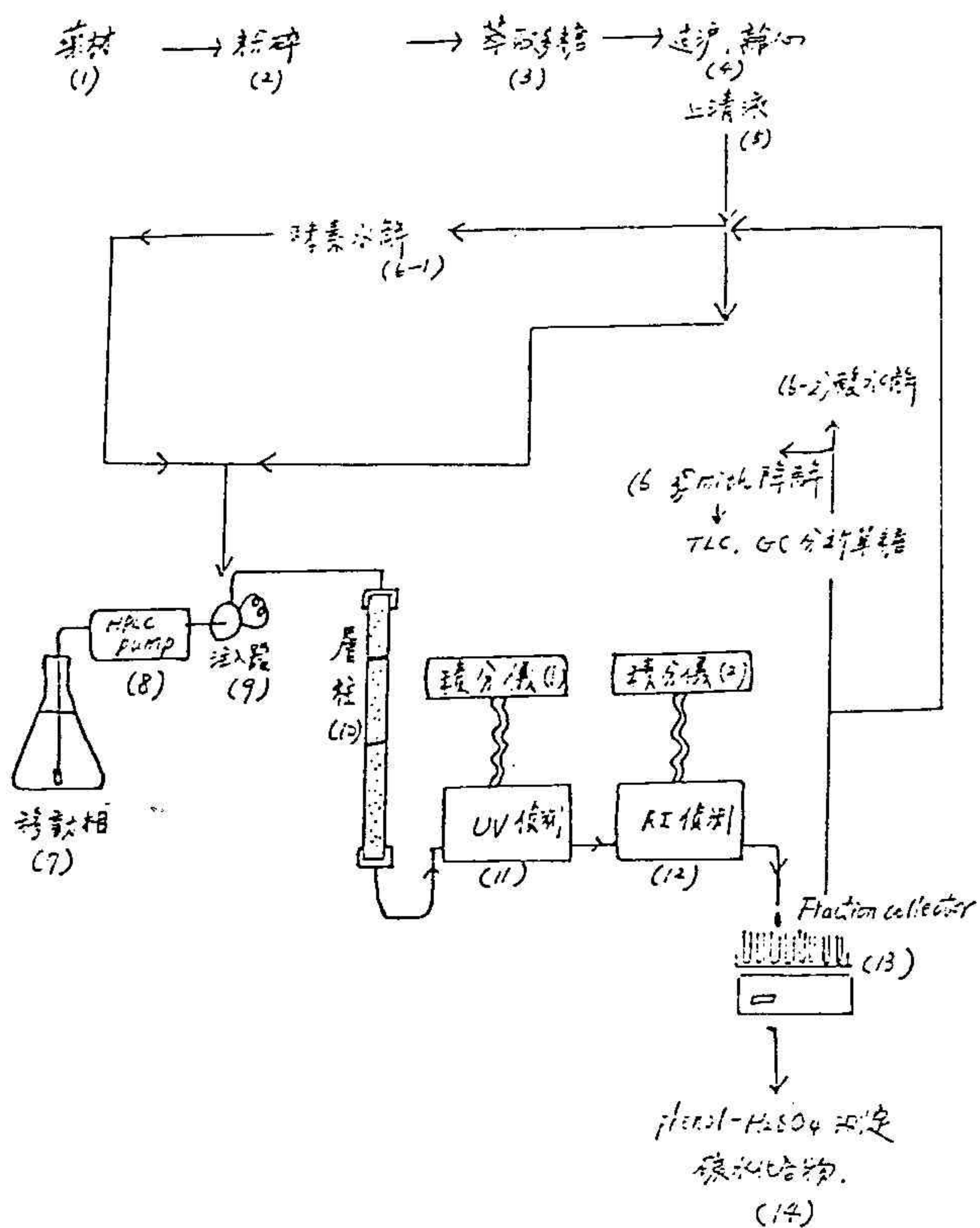
Table 2. Water soluble polysaccharide content of medicinal fungi

	F_1	F_2	(mg/g)@	
			Total a#	bc
<i>Poria cocos</i>	7.83	22.85	30.68	32.52
<i>Polyporus umbellatus</i>	15.17	40.55	55.72	59.62
<i>Polyporus mylittae</i>	39.33	10.75	49.75	50.31
<i>Cordyceps sinensis</i>	35.72		35.72	35.09

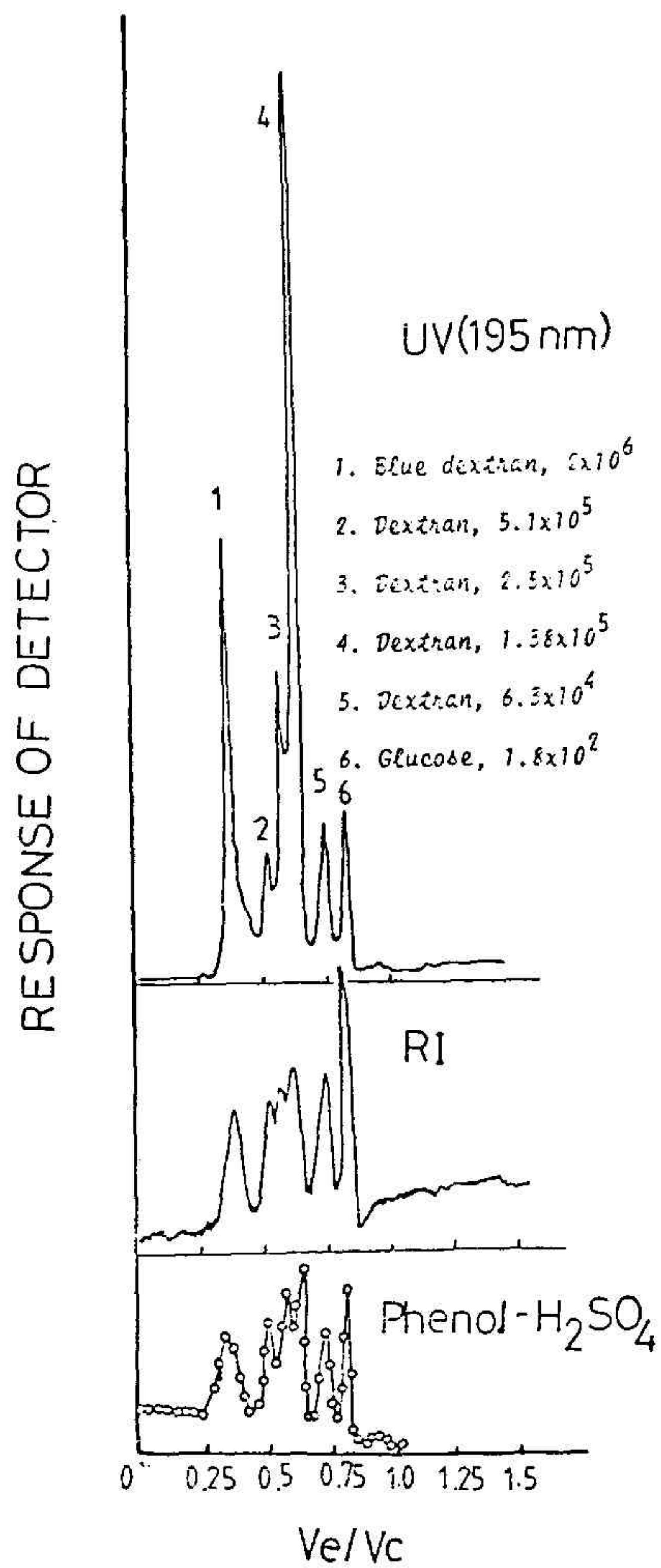
@The carbohydrate content is expressed as glucose by phenol- H_2SO_4 method.

#Calculated by the summation of F_1 and F_2 .

^Determined directly to extract.



圖一、實施之方法及步驟



圖二 已知分子量之糊精在本研究方法中之分佈圖

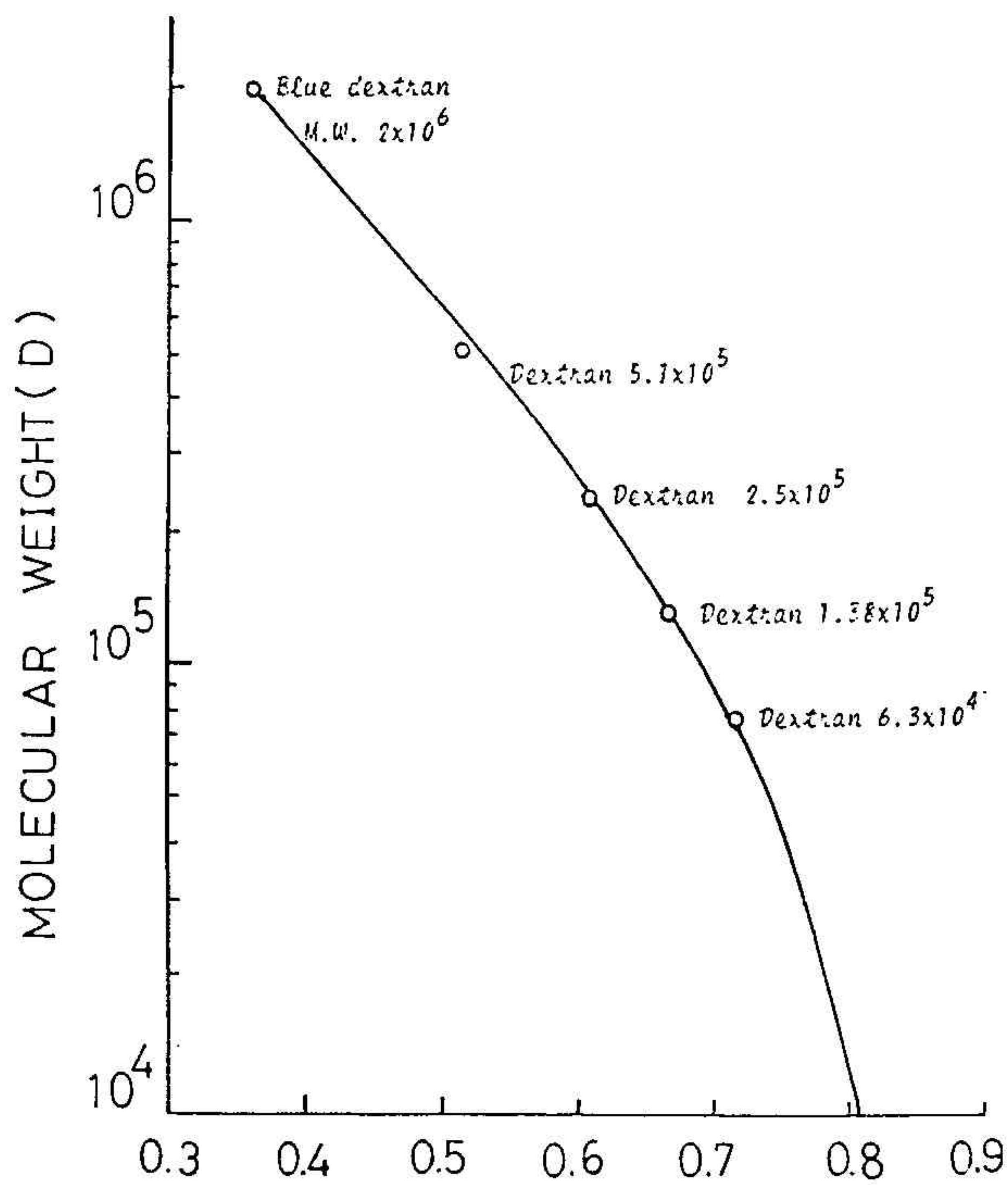
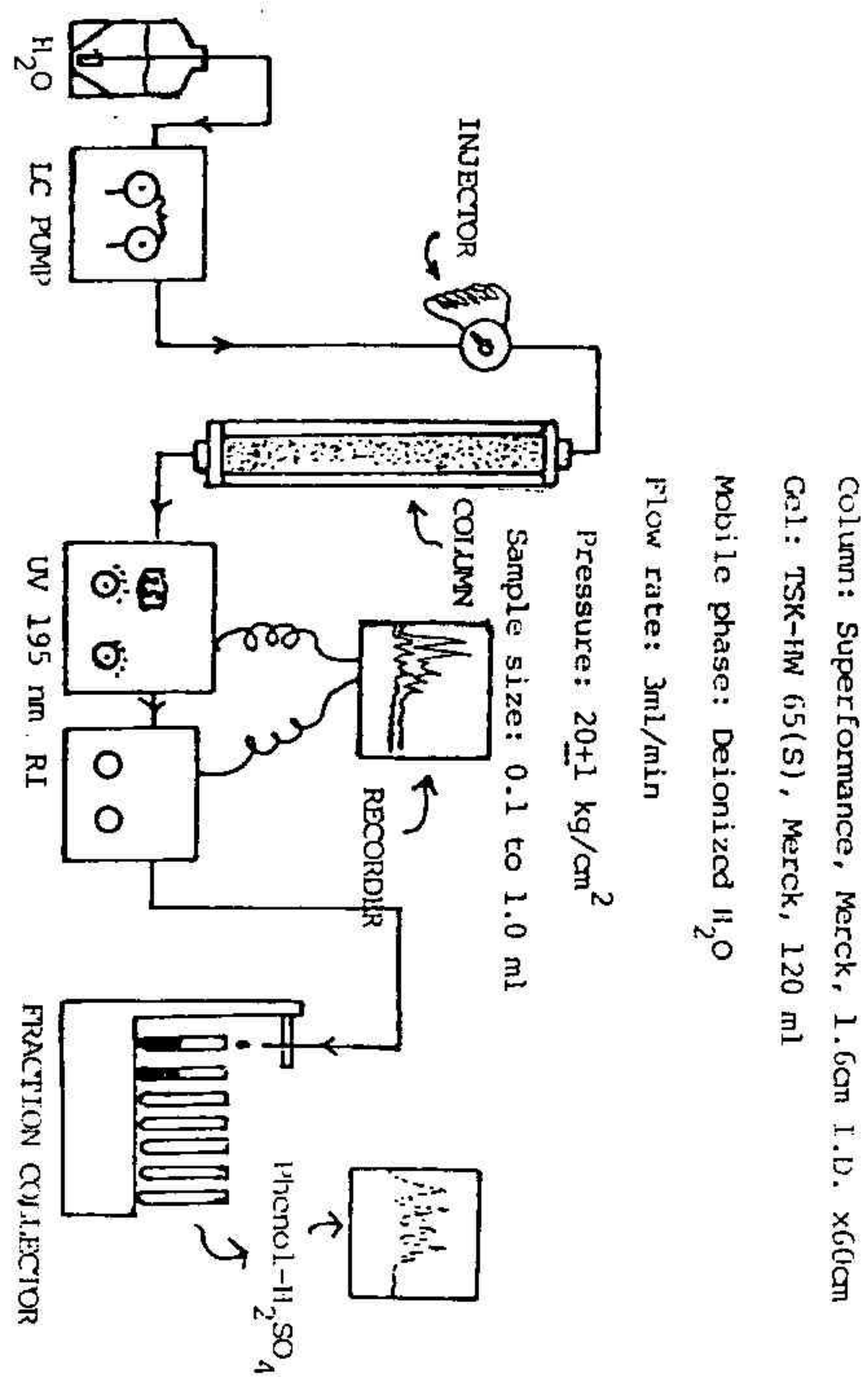


Fig. 2 Calibration curve of standard dextrans for Fructogel TSK-HW-65(S) V_e/V_c

圖三 利用 TSK-HW(S) 膠體之多糖校正曲線



圖四 SE—HPLC 之條件及配置

UV RESPONSE (195 nm)

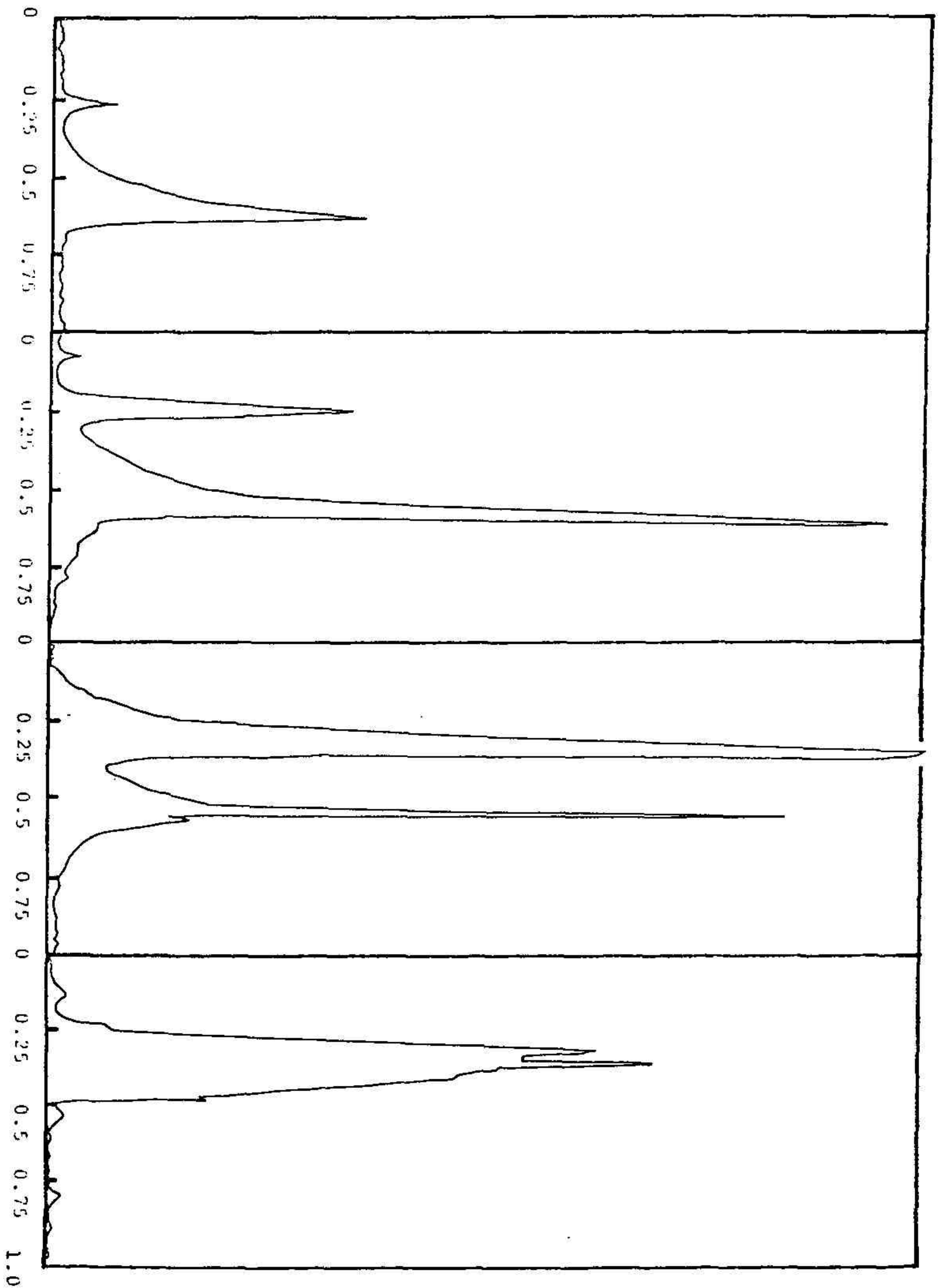
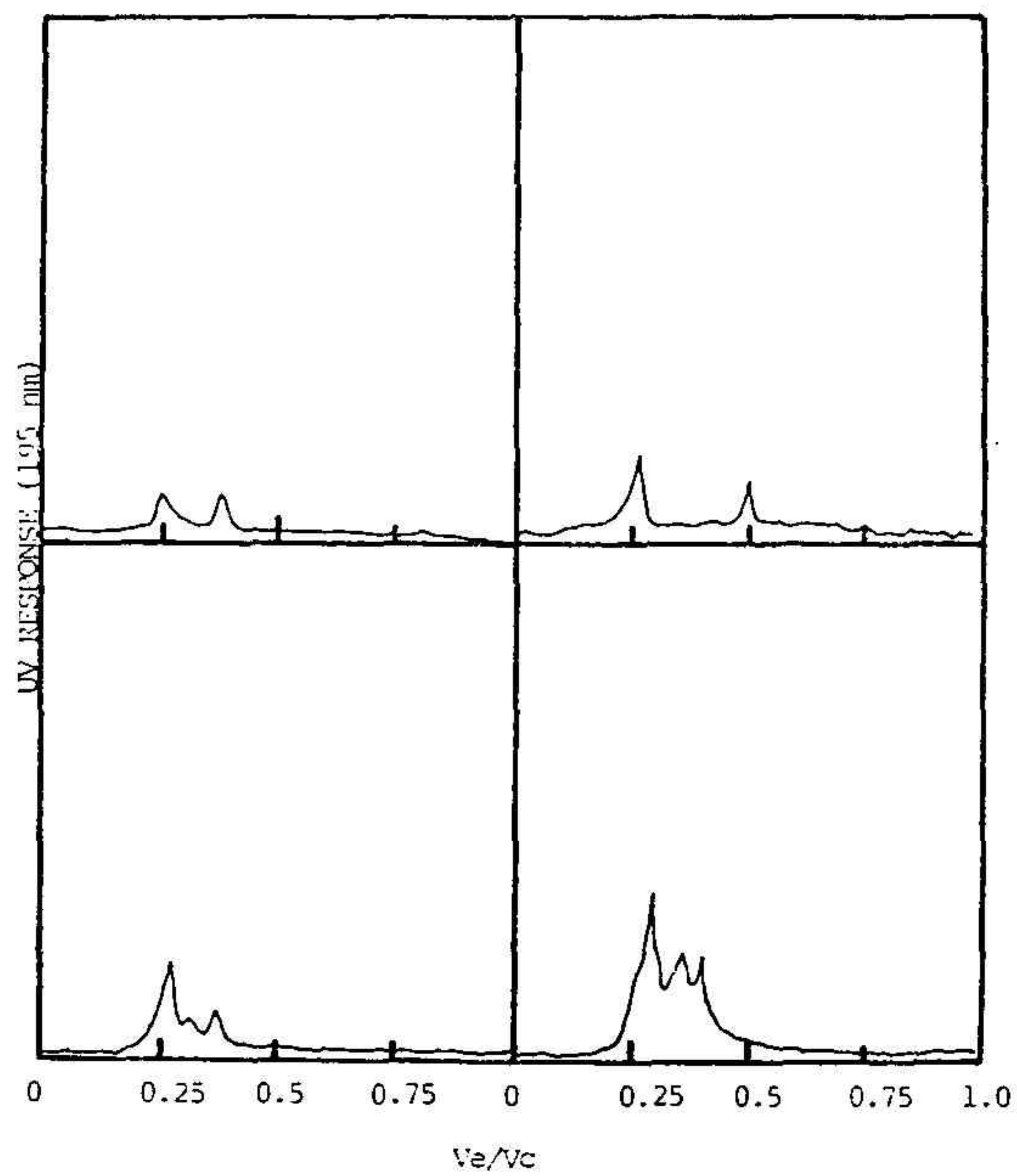
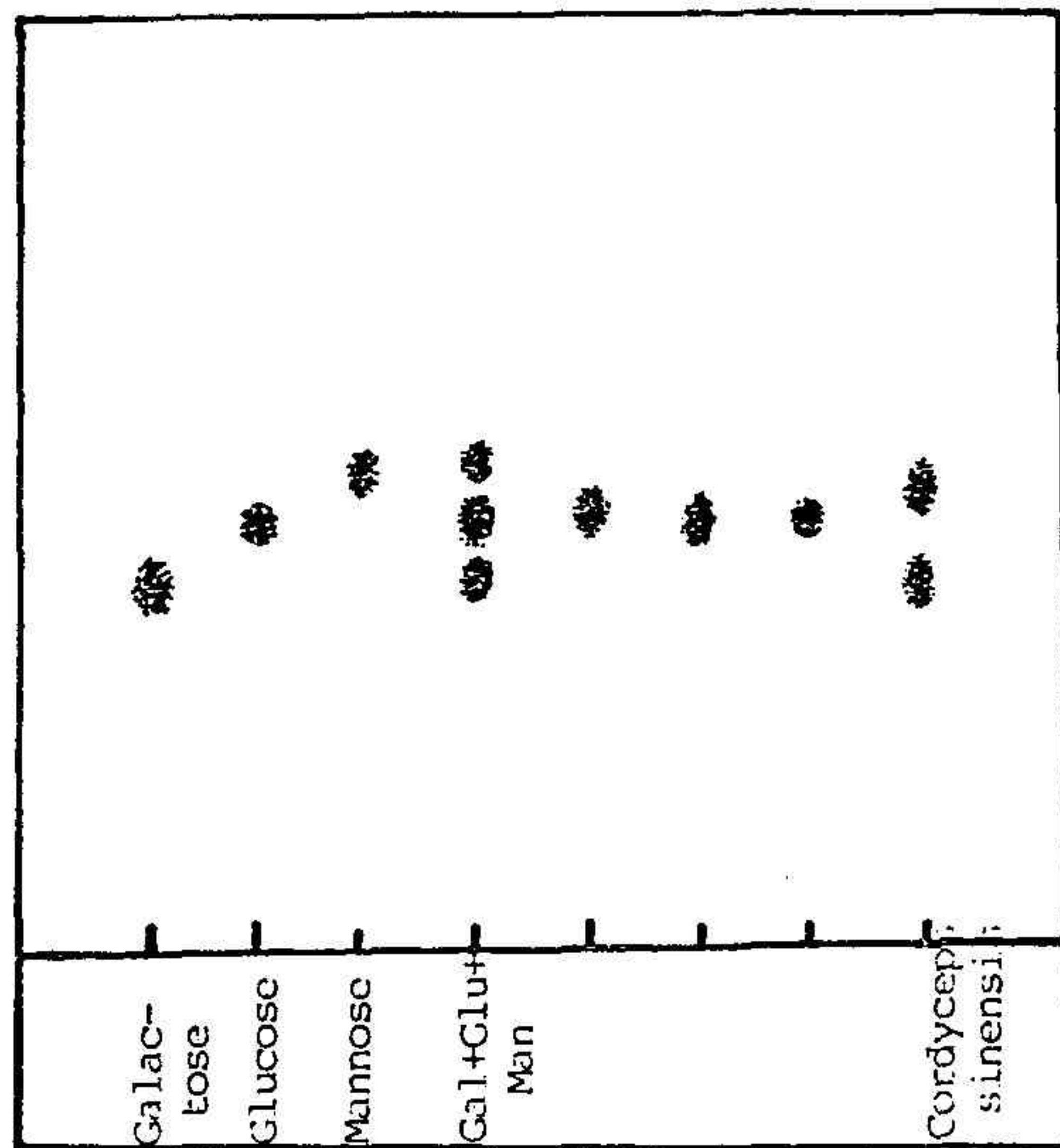


圖 26 利用 SE-HPLC 分析以值性藥材多聚之層析圖
(I. 依琴 II. 猪琴 III. 雷九 IV. 冬東夏草)

VC / Ve

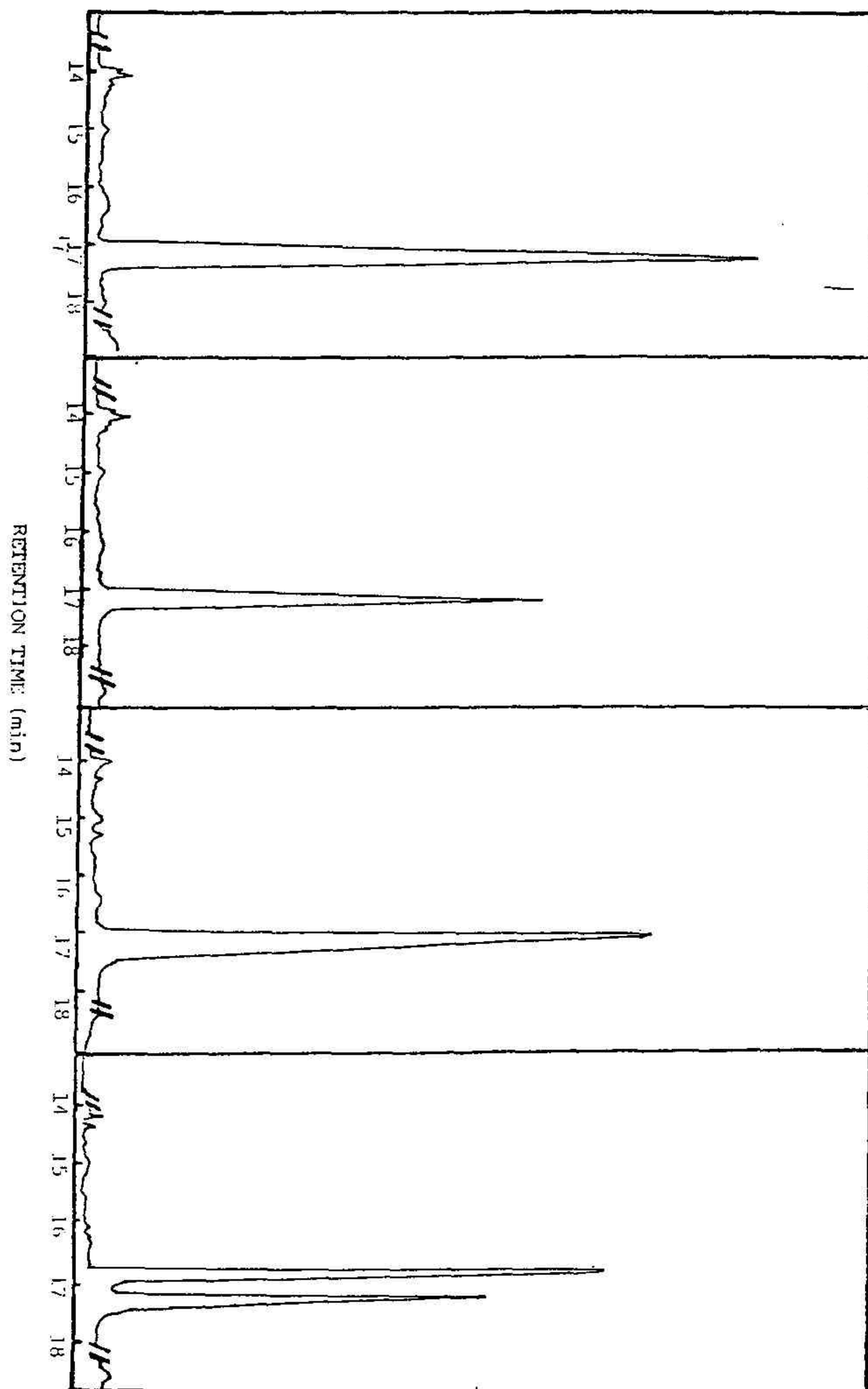


圖六 經第二次萃取後利用 SE-HPLC 分析多糖之層析圖
(I. 茯苓 II. 豬苓 III. 雷丸 IV. 冬虫夏草)

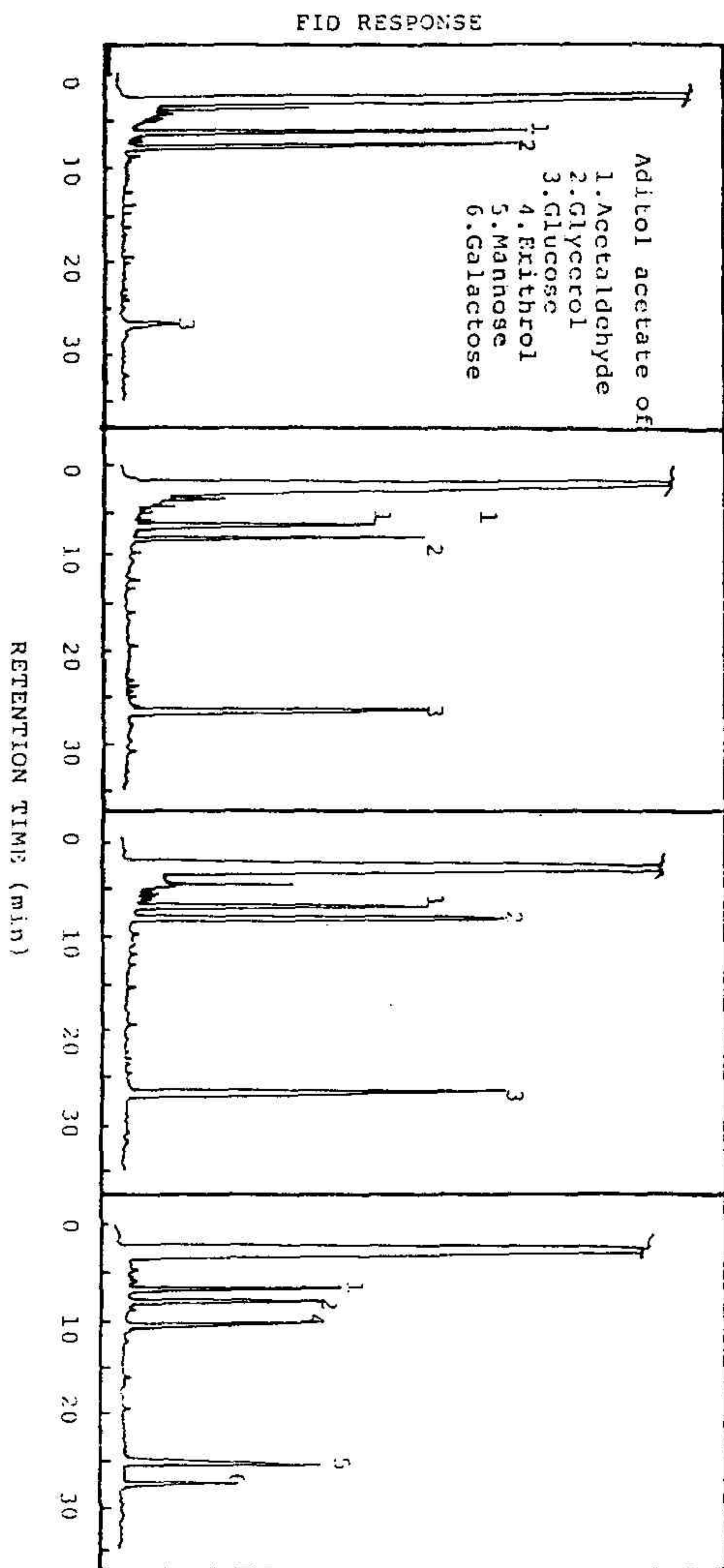


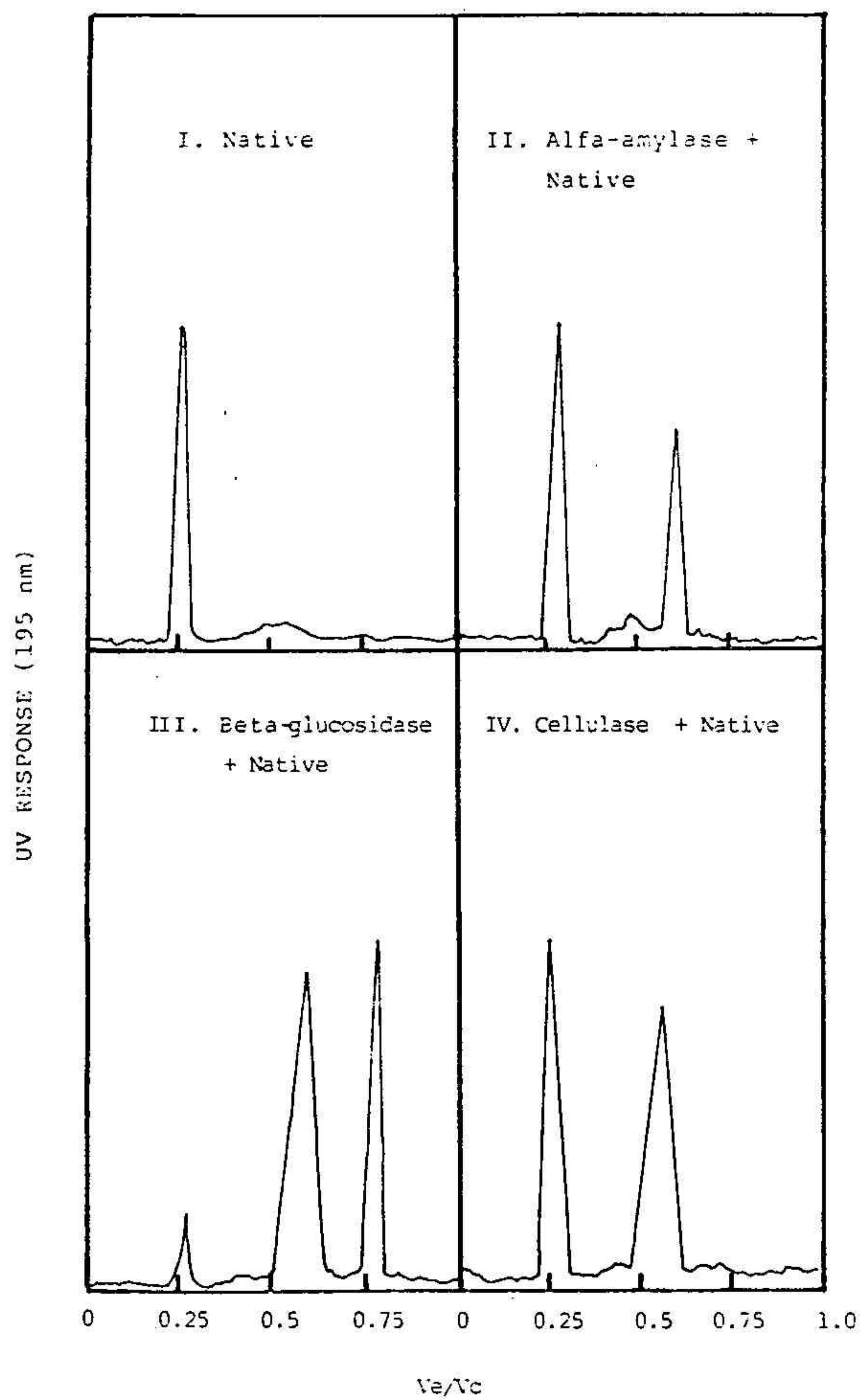
圖七 經鹽酸水解後之多糖以 TLC 分析單糖組成
(I. 扶苓 II. 豬苓 III. 雷丸 IV. 冬虫夏草)

FID RESPONSE

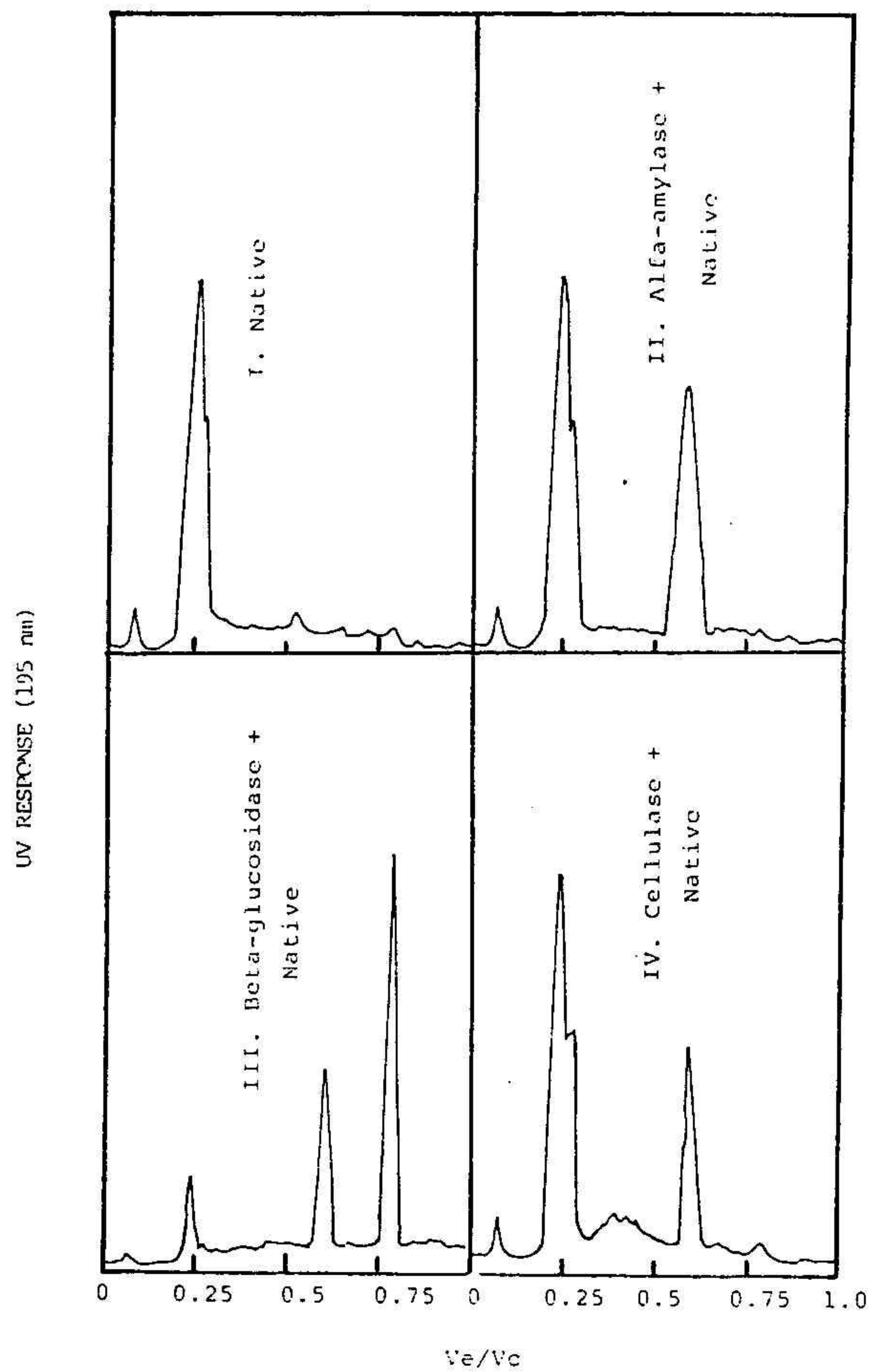


圖八 經鹽酸水解後之多糖乙酯化以 GC 分析單糖組成
(I. 茯苓 II. 豬苓 III. 雷丸 IV. 冬蟲夏草)

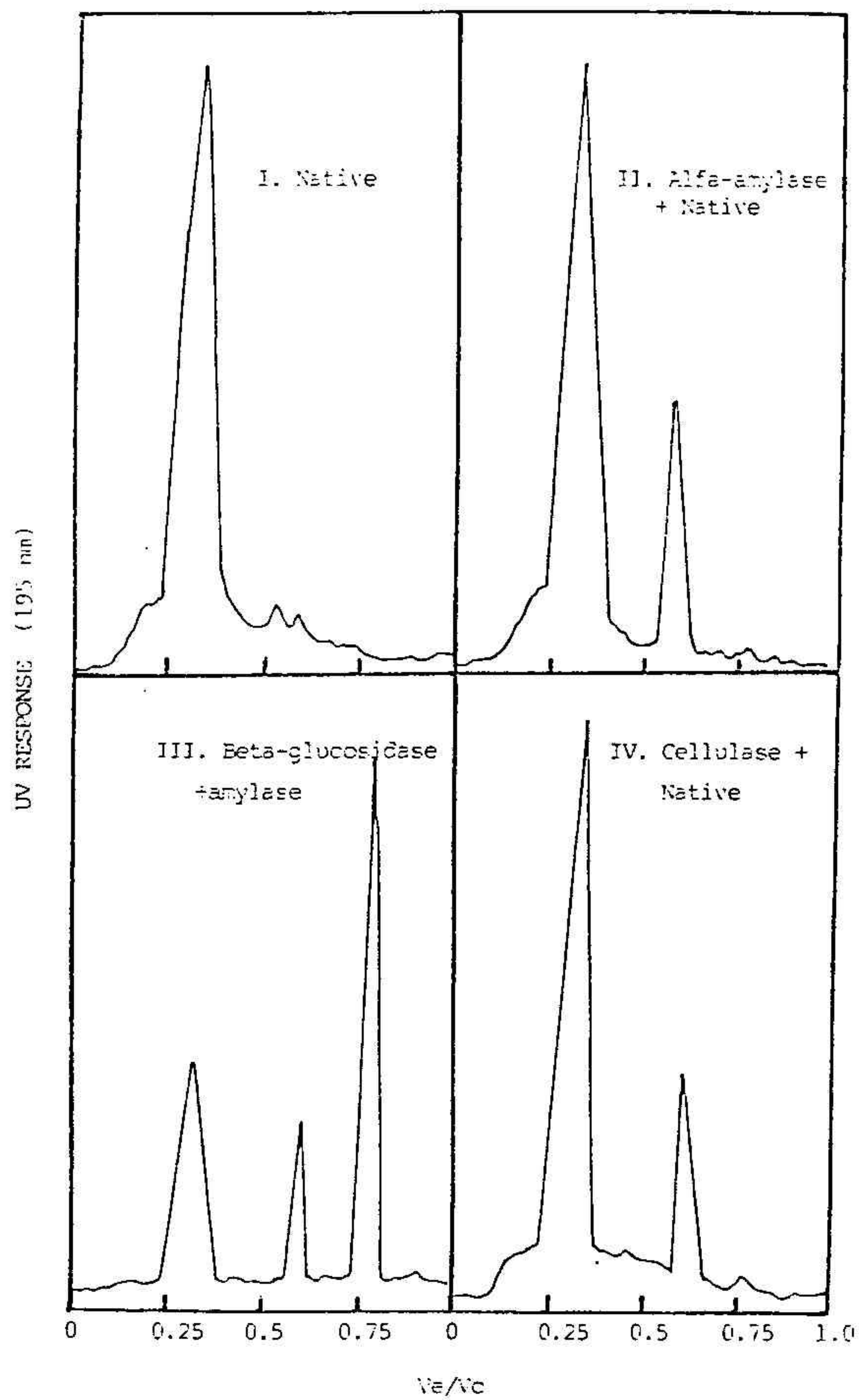




圖十、以不同酵素水解茯苓多糖後以 SE-HPLC 分析之層析圖



圖五 以不同酵素水解豬苓之多糖後以 SE-HPLC 分析之層析圖



圖式 以不同酵素水解雷丸之多糖後以 SE-HPLC 分析之層析圖

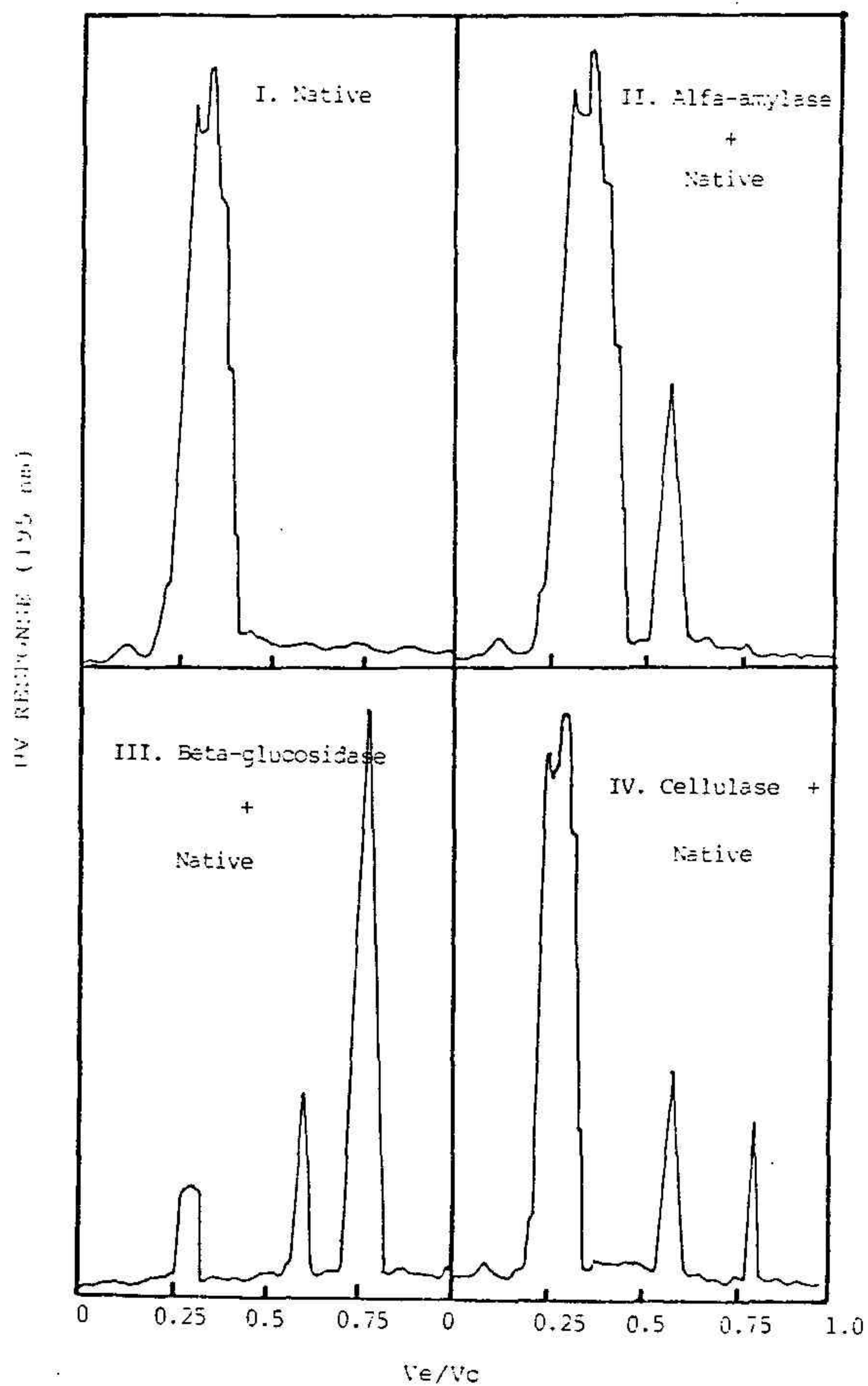


圖 4 以不同酵素水解冬蟲夏草之多糖後以 SE-HPLC 分析之層析圖

1. Chaplin, M. F. 1987
Monosaccharide. In M. F. Chaplin & J. F. Kennedy (eds.),
Carbohydrate analysis, p.1-50. Irl Press, Oxford.
2. Chihara, G. et al 1987.
Antitumor and metastasis-inhibitory activities of lentinan
as an immunomodulator. Cancer Detection and Prevention
Supplement. 1:423-443.
3. Miyazaki, T., et al 1974
Chemical structure of antitumor polysaccharide, Coriolan,
produced by *Coriolus versicolor*. Chem. Pharm. Bull.
22:1739.
4. Miyazaki, T. et al 1977.
Studies on fungal polysaccharides. XX. Galactomannan of
Cordyceps sinensis. Chem. Pharm. Bull. 25:3524-3328.
5. Miyazaki, T. and M. Ishijima 1981
Studies on fungla polysaccharides. XXVII. Sturctural
examination of a water-soluble antitumor polysaccharide
from *Cordycpes ophioglossoides* in mice. Jpn. J. Cancer Res.
Chemi. Pharm. Bull 29:3611.
6. Ohmori, T. et al 1986
Antitumor activity of protein-bound polysaccharide from
Cordyceps sphioglossoides in mice. Jpn. J. Cancer Res.
77:1256-1263.
7. Pazur, J. H. 1987
Neutral polysaccharide. In M. F. Chaplin & J. F. Kennedy
(eds.) Carbohydrate analysis, p.71-74. Irl Press,
Oxford.
8. Su, C. H., L.R. Hsu and T. C. Tung 1991
Application of SE-HPLC on analyzing polysaccharides
produced by mushrooms. In Maher(ed.) Science and Cultivation
of Edible Fungi, p329-335. Balkema, Rotterdam.
9. Usi, T. et al 1981
Antitumor activity of water sobluble beta-glucan elaborated
by *Ganoderma applanatum*. Agric. Biol. Chem. 45:323.
10. Welling, G. W. and J. F. Welling-Waster 1989
Size-exclusion HPLC of protein. In Oliver (ed.), HPLC
of macromolecules, p.77-89. Irl Press, Oxford.
11. Yamada, H. et al 1984
Structure of a galactosaminoglycan from *Cordyceps*
ophioglossoides, Carbohydrate Research 134:275-282.
12. Yanki, T. , et al 1986
Correlation between the antitumor activity of Schizophyllan
and its triple helix. Agr. Biol. Chem. 50:2415-2416.

4406-35