

真菌性中藥材水溶性多糖成分之分析

李俊賢 高寶璧 詹美華 蘇慶華

摘 要

本文以 SE-HPLC 為中心，分析包括茯苓，豬苓，雷丸，以及冬蟲夏草等真菌性藥材之水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為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 3×10^6 - 1×10^5 範圍之多糖，以及經由酵素水解後產生之小分子糖，得知一般真菌藥材之中性可溶性多糖成分為 3-5% (W/W) 之範圍。而屬於多孔菌綱(茯苓、豬苓雷丸)之真菌藥材在高分子 (2×10^6 以上) 多糖在組成與結構上並無太大之差異，均由葡萄糖之 1-6 及 1-3 β 價鍵組成，但在較低分子多糖 (2×10^5 以上) 之分配上則有顯著差異，其中以雷丸之高分子糖較多。來自子囊菌之冬蟲夏草則在組成上有異於腹菌綱及多孔菌綱，其係由半乳糖 (Galactose) 及甘露糖 (Mannose) 之複雜構造組成。

真菌產生之大分子多糖 (Polysaccharides) 常具有抗腫瘤或免疫增強之生理活性，此類多糖體在構造上有一定的特性，經常是以 β -1-3 為主鏈之六碳糖，並有一定比率之 β -1-6 短小側鏈組成之重覆單位，所構成之大分子 (M. W. $> 1 \times 10^5$)⁽⁶⁾。而真菌性中藥材如茯苓 (Porio cocos)、豬苓 (Polyporus umbellatus)、雷丸 (Polyporus mylittae)、及冬蟲夏草 (Cordyceps sinensis) 所產生之多糖亦有報告⁽⁷⁻⁸⁾，但是分析此多糖成分並無簡易的方法⁽⁹⁾，尤其是在經萃取後，經常利用澱粉或糊精 (Dextran) 當作付形劑時，多糖之分析常被掩蓋，而無法作正確之定量。因此本文乃利用分子篩高效液相層析法 (SEHPLC) 為中心，先測定不同真菌性水溶性碳水化合物之分子量分

佈，再以同法分離高分子部份，配合其它化學及酵素分析方法，證明真菌性藥材多糖體之單糖組成及化學構造，期能以較迅速的方式分析此類具有生理活性之物質。

而 SE-HPLC 已在蛋白質之分離及純化上廣為使用⁽¹⁰⁾，但在糖類上則因偵測技術之困難而受限制。本文乃利用過碘酸氧化法、加強 VU 吸光之訊號、配合 IR 偵測以及酚—硫酸比色法⁽¹⁰⁾ 進行色層分析，以較小之樣品量 (0.1 ml-1.0 ml) 在四十分鐘內完成一次分析或純化。

研究材料及方法

一、材料及前處理

真菌性藥材：茯苓(Porio cocos)、豬苓(Poyporus umbellatus)、雷丸(Polyporus mylittae)及冬蟲夏草(Cordyceps sinensis)購自中藥材行，取其乾燥品以磨粉機粉碎至1-10 μm 之菌絲片段，不以0.2 M 磷酸緩衝液 pH 7.0 於95°C，經12小時萃取，萃取液以紗布過濾後於 $1.5 \times 10^5\text{g}$ ，4°C離心十分鐘去除孢子及微小菌絲，上清液直接以SE-HPLC分析或純化後以其它化學分析方法鑑定其組成。

二、分子篩高效液相色層分析(SE-HPLC)

SE-HPLC之方法已如前文(Su, 1990)⁽¹¹⁾所述，主要利用Fructogel-TSK-HW-65(S) (Merck)自行填充膠體之層性(1.0×60 cm, Superformance, Merck)，配以LC幫浦(4 A, Shimadzu)、紫外線偵測器(SPD-6 AV, Shimadzu)、RI偵測器(R 401, Waters)，沖提液以串連管路再以段分收集器(FRAC-100, Pharmacia)配合酚—硫酸比色法測定碳水化合物，操作條件以去離子水為流動相，流速為3 ml/min，於室溫中進行，操作壓力為10-20 kg/cm²。樣品注入體積為0.1-1.0 ml，換算葡萄糖濃度為1-5 mg/ml。為增加紫外線於195-200 nm之強度，可經由0.001 M之過碘酸鈉於4°C處理2小時後進行分析。

三、分子量之標定及分佈校正

對用已知分子量之糊精(Dextran)對上述條件進行SE-HPLC之標定，糊精標準品(Merck)之分子量分別為 2×10^6 ， 5.1×10^5 ， 2.5×10^5 ， 1.38×10^5 及 6.3×10^4 ，另葡萄糖標準品之分子量為 1.8×10^2 。分子量之校正及標定圖已於前文所述(11)，所採用之座標亦標準化為 V_e/V_c ， V_c 為層柱填充體積等於120 ml， V_e 為沖提之體積。

四、其分析方法

經由SE-HPLC純化之部份經冷凍乾燥後，以0.2 M H₂SO₄100°C經12小時水解，以TLC (Kieselgel 60 F 254, Merck)分析，展開液為乙酸乙酯：異丙醇：水=1:2:1，以Anisal-

dehyde或Naphtharesorcinol呈色，或以乙醯化後經GC分析⁽⁹⁾。

史密斯降解法(Smith Degradation)沿用Pazur (1987)⁽⁹⁾之方法進行。

酵素水解法亦依照Pazur (1987)⁽⁹⁾之方法進行，酵素水解物再以SE-HPLC分析。

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、blue dextran及dextran分別利用UV (195 nm)及折射率測定器(RI)以化學比色法測定，顯示所用之層柱在分子量 2.0×10^6 至 2.0×10^5 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。標準品之出現順序及 V_e/V_c 值分別為0.28 (2×10^6)，0.52 (5.1×10^5)，0.62 (2.5×10^5)，0.68 (1.38×10^5)及0.70 (6.3×10^4)而葡萄糖則為0.80 (1.8×10^2)。

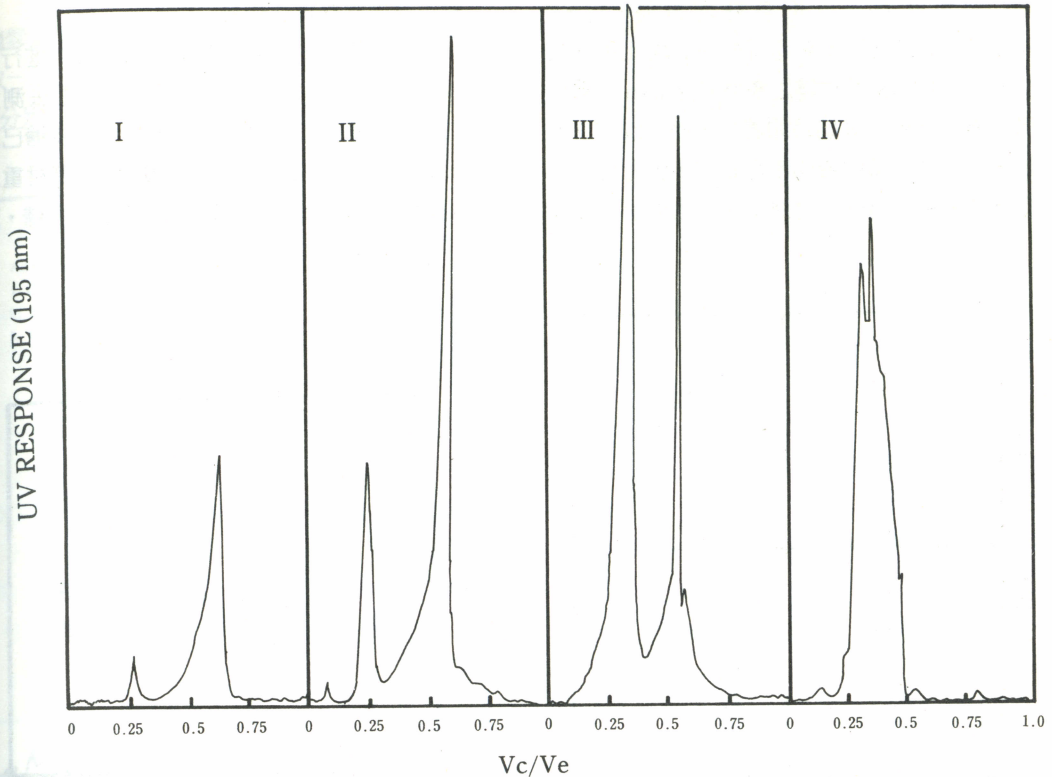
二、對藥用真菌萃取液進行SE-HPLC之結果

以蒸餾水或者pH 7.0之0.2 M 磷酸緩衝液進行藥用真菌多糖體之萃取，而以SE-HPLC分析之結果如圖一。由分子量校正曲線所計算出來的各種藥用真菌多糖體之分子量如表一所示，其分子量係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均具有兩個不同分子量之多糖。而冬蟲夏草則較為複雜之單一分佈。其所涵蓋之範圍在 2.0×10^6 至 1.2×10^6 之間。

根據過去文獻資料顯示，分子量在 5×10^5 以上之多糖較具免疫增強之生理活性，因此本研究乃進一步對分子量較大的進行F1純化(圖一)，以 3×10^5 之分子膜進行分割、經過冷凍乾燥後分別得到5 mg 高分子之多糖，進行注後之分析工作。

三、多糖含量之測定



圖一、利用SE-HPLC分析真菌性藥材多糖之層析圖(I. 茯苓II. 豬苓III. 雷丸IV. 冬蟲夏草)。

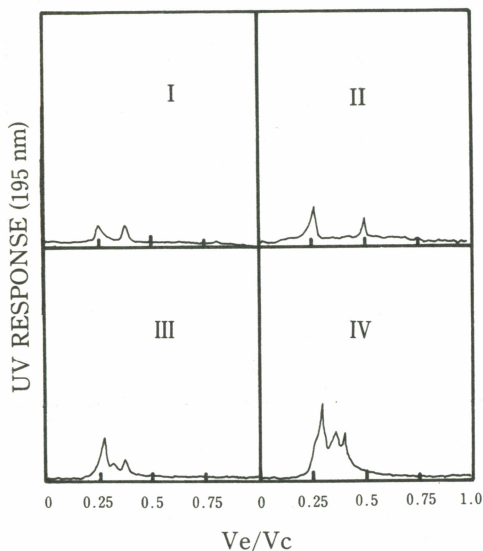
表一、由真菌性藥材萃取可溶性多糖之分子量。

	F ₁ *	F ₂ **		
	Ve/Vc	M. W.	Ve/Vc	M. W.
Poria cocos (Hoelen) 茯苓	0.270	4.6 × 10 ⁶	0.624	2.5 × 10 ⁵
Polyporus Umbel- latus (Fungus Umbel- latus) 豬苓	0.259	5.3 × 10 ⁶	0.675	2.0 × 10 ⁵
Polyporus mylittae 雷丸	0.288	3.9 × 10 ⁶	0.507	5.1 × 10 ⁵
Cordycpes sinen- sis 冬蟲夏草	0.25- 0.43	6.0 × 10 ⁶ 1.2 × 10 ⁶	---	---

*First peak area in Fig. 5.

**Second peak area in Fig. 5.

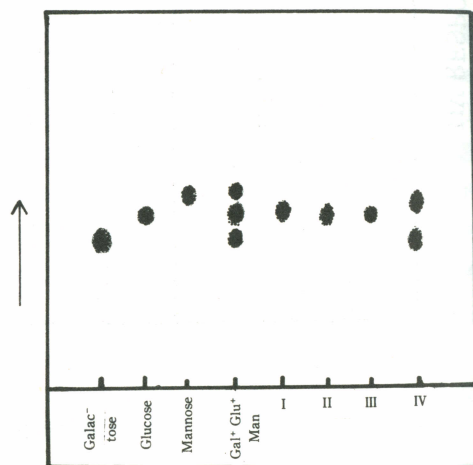
對水萃取液分析多糖含量時，以 SE-HPLC 流出液對多糖進行酚—硫酸比色法測定，並以 1-3-β 爲主鏈之多糖 Curdlan 作爲標準品進行比較，其結果如表二，而不論何種藥用真菌，其水萃取液均不含單糖，因此可以利用其萃取液進行含量之測定，其含量呈現於表二。



圖二、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. 冬蟲夏草)。

四、第二次萃取之結果

以等量之水對第一次萃取之不溶物進行萃取，再以 SE-HPLC 以酚—硫酸比色法測定之，發現在第二次萃取液中，所含之多糖已經很少 (圖二)，因此，如果以 100 倍於藥材重之緩衝溶液萃取多糖，可萃取約 95% 之多糖，而不必再行第二次萃取。



圖三、經鹽酸水解後之多糖以 TLC 分析單糖組成 (I. 茯苓 II. 豬苓 III. 雷丸 IV. 冬蟲夏草)。

表二 真菌性藥材之多糖體含量。

	F ₁	F ₂	Total	
			a**	b***
Poria cocos 茯苓	7.83	22.85	30.68	32.52
Polyporus umbellatus 豬苓	15.17	40.55	55.72	59.62
Polyporus mylittae 雷丸	39.33	10.75	49.75	49.75
Cordyceps sinensis 冬蟲夏草	35.72		35.72	35.09

*The carbohydrate content is expressed as glucose by phenol-H₂SO₄ method.

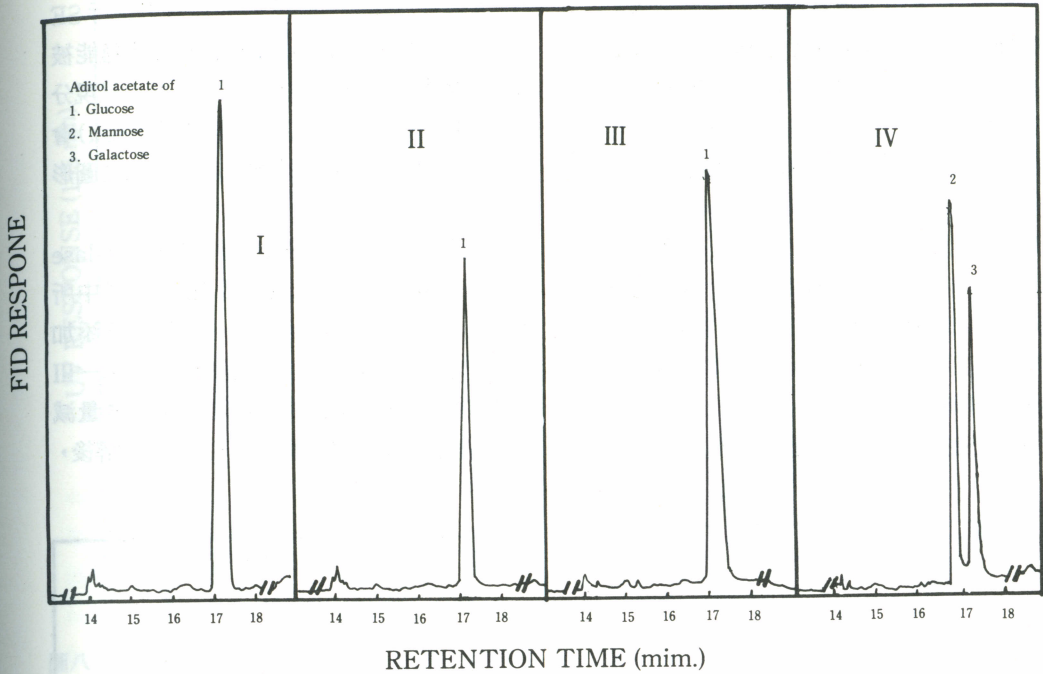
**calculated by the summation of F₁ and F₂.

***Determines directly to extract.

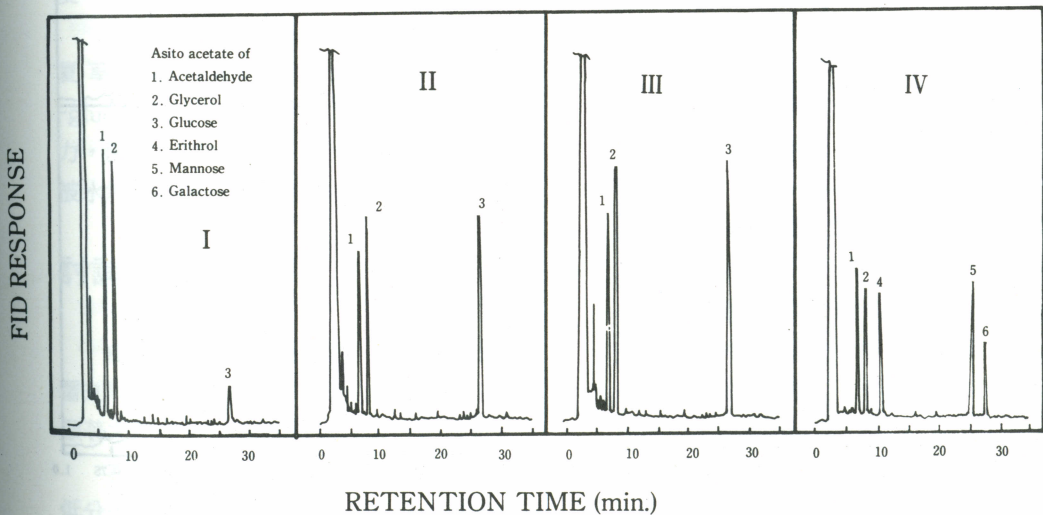
五、糖類之組成

取一毫克之多糖以鹽酸(0.2 N)進行糖類水解,分別以 TLC 及 GC 分析水解物,其結果

如圖三及圖四所顯示,在茯苓、豬苓以及雷丸所得到之結果均相同,係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



圖四、經鹽酸水解後之多糖乙醯化以GC分析單糖組成 (I. 茯苓 II. 豬苓 III. 雷丸 IV. 冬蟲夏草)。



圖五、史密斯降解後之GC層析圖 (I. 茯苓 II. 豬苓 III. 雷丸 IV. 冬蟲夏草)。

(Galactose)及甘露糖(Mannose)所組成，並且以甘露糖之含量較多，顯示冬蟲夏草之多糖成分與其它三種多糖在糖組成上有所不同。

六、史密斯降解法(Smith Degradation)結果

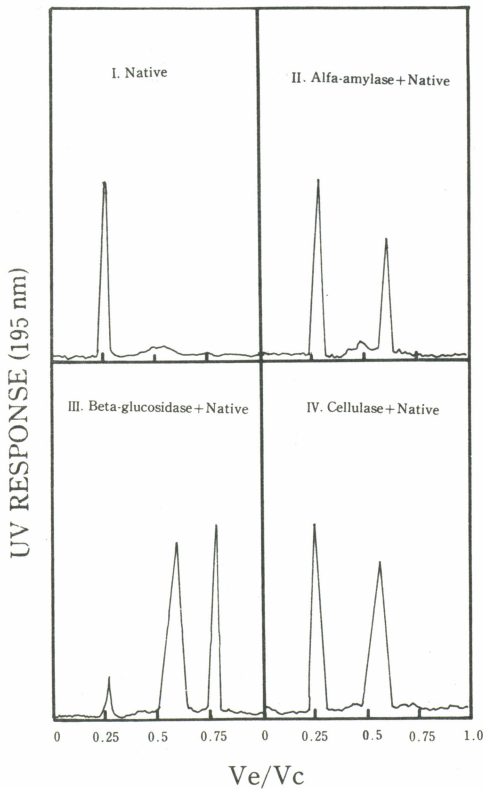
以 2 mg 之大分子多糖進行史密斯降解，再以鹽酸(0.1 N 水解，進行乙酰化(Acetylation)以 GC 分析，其結果如圖五，在茯苓水解物中含有較大量之二碳及三碳產物，並且具有較少量之葡萄糖，這種結果顯示，構造上，茯苓之多糖乃以 1-6 為主，並具有較少之 1-3 結合；而雷丸及豬苓則顯示在二碳、三碳及葡萄糖之比例十分接近，顯示其為以 1-3 為主之價鍵並有 1-6 之側鏈結構，與茯苓之結合方式不同。而冬蟲夏草之多糖則顯示出較為複雜之情況，其構造同時顯示具有 1-3, 1-4, 及 1-6 之結合，而由其 SE-HPLC 圖形也顯示其組成較為

複雜。

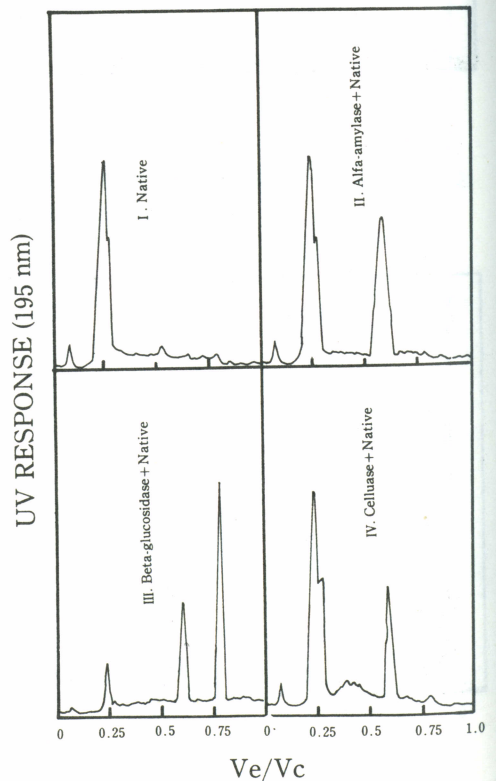
七、酵素之分解

本研究利用 α -amylase、 β -glucosidase 及 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 小時後再進行 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 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六至圖九。

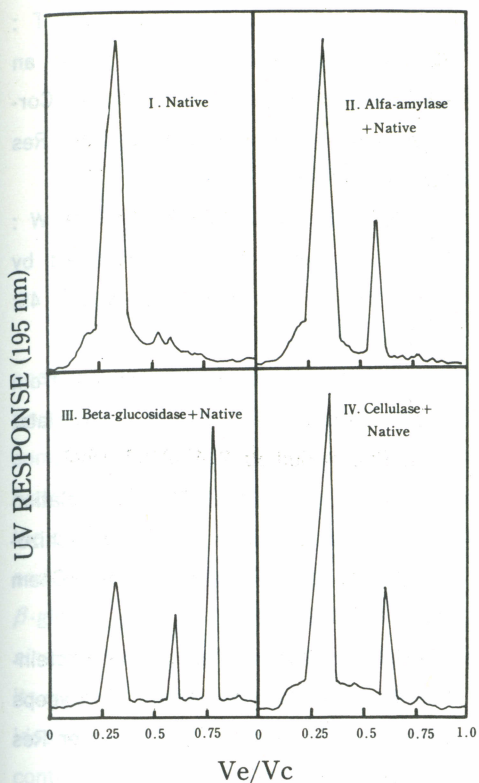
在圖六中，可見茯苓之多糖在 α -amylase 中並沒有發生位移的現象，而在圖六-II 中所多出之一峰，則為 α -amylase 中原本所添加作為安定性之糊精，並非水解物，而圖六一-III 中則可明顯看出原來的多糖經水解後含量減少，並多出一個單糖之測定峰，顯示經水解後，



圖六、以不同酵素水解茯苓多糖後以SE-HPLC分析之層析圖。



圖七、以不同酵素水解豬苓之多糖後以SE-HPLC分析之層析圖。



圖八、以不同酵素水解雷丸之多糖後以SE-HPLC分析之層析圖。

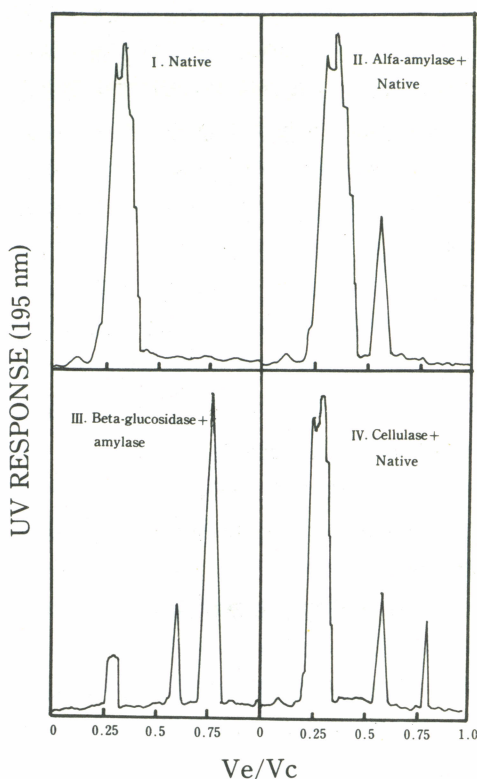
形成小分子糖，而在 cellulase 則無明顯之改變，以上情形顯示茯苓之多糖結合鍵為 β 型。

相同之情形亦發現在豬苓、雷丸以及冬蟲夏草之水解物中(圖七、八、九)，而 β -glucosidase 同時具有水解 β 型半乳糖之能力，因此，在圖九—III中，冬蟲夏草之多糖亦被水解而產生一寡糖測定峰。

討論及結論

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

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，在雷丸則含有較多的高分子多糖(圖一、表一及二)冬蟲夏草則



圖九、以不同酵素水解冬蟲夏草之多糖後以SE-HPLC分析之層析圖。

呈現一連續性分子量分佈之多糖。其次，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。基本上，茯苓、豬苓及雷丸這些屬於擔子菌亞腹菌綱及多孔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 β -1-6 為主， β -1-3 為副主鏈(圖四、五)，而在分類上屬於子囊菌之冬蟲夏草則由半乳糖及甘露糖所組成，其組成較為複雜，包括 β -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以史密斯降解之分析中，顯示為以葡萄糖為主之 1-3 連結鍵，而以 1-6 為副之側鏈結構則為多孔菌之主要結構。以上這些分析，足以顯示在腹菌綱、多孔菌綱以及子囊菌在多糖之組成中有所差異。

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 ml，所含之多糖濃度為 1-5 mg/ml。而以蒸餾水為分析時之移動相，在成本上即十分節省。如能配合鹽酸水解、史密斯降解以及酵素水解，可得到其醣組成、大致上結合鍵之情形以及其 α -或 β -之構造，所需之純化多糖在 5-10 mg 即已足夠。本研究所提供之方法，亦可利用少量的樣品加以快速的分析，分析一個樣品所需時間，在本研究中為 40 分鐘。

但採用本方法之限制在於：

一、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結果之準確度將會降低。

二、唯有可溶性多糖始適用本法進行分析。

三、對於分析之效率，仍比一般 HPLC 委差（一般在 20-30 分鐘），但此點可經由改變膠體之硬度加以改善。

本研究為行政院衛生署科技研究發展計畫（80-DOH-A 15）之一部份。

參考文獻

1. CHIHARA G, HAMURO J, MAEDA YY, et al. : Antitumor and metastasis-inhibitory activities of lentinan as an imunomodulator: An overview Cancer Detection and Prevention Supplement1: 423-443, 1987.
2. MIYAZAKI T, NISHIJIMA M: Studies on fungal polysaccharides. XXVII. Sturctural examination of water soluble, antitumor polysaccharide of Ganoderma lucidum. Chem Pharm. Bull 29: 3611-3616, 1981.
3. YAMADA H, NAKAGUCHI N, OHMORI T : Structure and antitumor activity of an alkaline-soublepolysaccharide from Cordyceps ophioglossoides. Carbohydrate Res 125:107-113, 1984.
4. KIKUMOTO S, MIYASJIMA T, KIMURA W : Studies on polysaccharides produced by Schizophyllum commune. Noge Kagaku 45: 162-167, 1970.
5. UKAIS, HARA C, KIHOT: A β -glucan from alkaline extract of Dictyophora indusiata. Chem Pharm Bull 30; 2147-2152, 1982.
6. YANAKI T, ITOH W, TABATA K: Correlation between the antitumor activity of schizophyllan and its triple helix. Agric Biol Chem 50; 2415-2416, 1986
7. OHMORI T: Antitumor activity of protein-bound polysaccharide from Cordyceps ophioglossides in mice. Jpn J Cancer Res 77:1256-1263, 1986.
8. MIYAZAKI T, et al : Study on Galactomannan of Cordyceps sinensis. Chem Pharm Bull 22: 3524-3328, 1977.
9. PAZUR JH: Neutral polysaccharide. (in Chaplin F, Kennedy JF (eds.), Carbohydrate analysis, Irl Press p.71-74, Oxford , 1987.
10. WELLING GW, WELLING-WESTER: Size - exclusion HPLC of protein. (in Oliver RWA (ed.) Macromolecules), Ir. press, p.77-89, Oxford, 1989.
11. SU CH, HSU LR, TUNG TC: Application of SE-HPLC on analyzing polysaccharides produced by mushrooms, (in Maher MJ (ed.), Science and cultivation of edible fungi), p.329-335. Balkema, 1991.

Analysis of Water Soluble Polysaccharides from Fungal Chinese Medicine

CHUN-HSIEN LEE, BAO-PI GAU, MEI-HWA JAN and CHING-HUA SU

ABSTRACT

Polysaccharides extracted by water from four medicinal fungi were subjected for SE-HPLC analysis and the fungi were *Poria cocos*, *Polyporus umbellatus*, *Polyporus mylittae* and *Cordyceps sinensis*. The finger print and molecular weight of these polysaccharides were obtained simultaneously, with a small sample size ranging from 0.1 to 1.0 ml within 40 minutes. The combined analysis of SE-HPLC with acid hydrolysis, Smith degradation and enzyme hydrolysis revealed the anomeric structure and linkage type of the polysaccharides. The results indicated that the polysaccharides from *Poria cocos* was glucans of 1-6 and 1-3 combined linkage type with β -from anomeric structure and that of *Polyporus* species were β -glucan in 1-3 linkage and 1-6 side chain. However, the polysaccharidous structure of *Cordyceps sinensis* was quite different from that of *Basidiomycetes* which contained mannose and galactose as its sugar component and in a more complex linkage form. The molecular weight of these polysaccharides were ranging from 6×10^6 to 2×10^5 and generally they were distributed into two categories. The content of polysaccharides was approximated 3 to 5% on a dry base of fruiting body or sclerotia of the fungi. The physiological meaning of these polysaccharides are still unclear especially for the relationship of different molecular size fractions and its immunological effects.