

雲芝 LH-1 的皂?分離純化與活性成份研究

陳俞臻、楊博文

E-mail: 345425@mail.dyu.edu.tw

摘要

雲芝為一種常見生長於腐木上的菇蕈類，成分主要含有蛋白質、多醣、多醣?、葡聚糖、木質素、氨基酸和多種無機鹽等。其中以多醣體PSK產品為癌症輔助用藥最為廣知，在靈芝子實體中以靈芝酸A、B、C、F...等三?類，其生理活性在抗氧化及延緩衰老有明顯效果，並有學者在靈芝發酵液中也發現有三?類皂?存在。雲芝LH-1發酵液由徐泰浩提供，雲芝皂?之分離與純化後具有的生理活性。實驗結果顯示，以HP-20樹脂分離純化後有五個訊號。其中訊號五之皂?含量最高，後續以正丁醇分離，可得到較高之皂?含量且生理活性更佳。具有清除DPPH自由基能力、清除OH 基能力測定及 -glucosidase 抑制等活性。取正丁醇層之物質進行Sepharose CL-6B離子交換樹脂層析後可分為兩個訊號，針對此兩個訊號進行組成份分析、UV全波長偵測、HPLC-RI偵測器分子量分析及FT-IR分析。此兩種訊號皆為三?皂?，且訊號2具有(1 3)- -D- glucan，後續可做為保健食品。

關鍵詞：雲芝；皂?；DPPH 自由基清除能力清除；OH 自由基能力； -glucosidase 抑制

目錄

封面內頁 簽名頁 中文摘要iii 英文摘要iv 誌謝v 目錄vi 圖目錄x 表目錄xi 1.前言1 2.文獻回顧3 2.1雲芝的簡介3 2.1.1雲芝的型態及生長分布3 2.1.2雲芝化學成分5 2.1.3雲芝液態培養6 2.2雲芝之活性成份介紹6 2.2.1腺?(Adenosine)6 2.2.2雲芝多醣7 2.2.3三?類(Triterpenoides)8 2.2.3.1?類的單體8 2.2.3.2菇類三?的基本結構9 2.2.4皂?簡介11 2.2.4.1皂?結構13 2.2.4.2三?類皂?18 2.3雲芝之功效成份介紹18 2.3.1腺?(Adenosine)18 2.3.2多醣體19 2.3.3三?類20 2.3.4皂?21 2.4分離方法介紹22 2.4.1離子交換層析法(Ion exchange chromatography, IEC)22 2.4.2凝膠樹脂24 2.4.3大孔樹脂25 2.4.3.1大孔吸附樹脂的吸附原理27 2.4.3.2大孔吸附樹脂的特性27 2.4.3.3大孔吸附樹脂吸附的影響因素28 2.5抗氧化活性之測定原理29 2.5.1 DPPH 自由基清除能力 (DPPH scavenging radical activity)29 2.5.2清除OH 自由基能力(Hydroxyl scavenging radical activity)30 2.5.3 -glucosidase 抑制(-glucosidase inhibition)之降血糖機制30 2.6試驗方法31 2.6.1樣品預處理試驗31 2.6.2大孔樹脂層析31 2.6.3正丁醇分層試驗32 3.材料與方法34 3.1試驗流程圖34 3.2試驗材料35 3.3儀器設備36 3.4藥品36 3.4.1化學試藥36 3.4.2分離用樹脂38 3.5樣品之前處理38 3.6大孔樹脂層析38 3.6.1樹脂前處理38 3.6.2各種樹脂對總皂?分離純化之影響-靜態39 3.6.3大孔樹脂層析條件分析39 3.7離子交換樹脂層析40 3.7.1離子樹脂前處理40 3.7.2離子交換樹脂層析40 3.8分析方法41 4.結果與討論44 4.1靜態吸附試驗44 4.2 HP20大孔樹脂層析46 4.3雲芝LH-1發酵液組成份分析並比較清除DPPH自由基、清除OH 基、抑制 -glucosidase48 4.4雲芝LH-1發酵液經HP20之分液(Fractions)F5液相-液相分配(Liquid-liquid partition)52 4.5 分液F5-B經DEAE-Sepharose CL-6B離子交換樹脂層析54 4.6 分液F5 -B-1及F5 -B-2組成份及分子量56 5.結論67 參考文獻69 圖目錄 圖1雲芝子實體野生照4 圖2雲芝在真菌門之分類5 圖3菌類三?的分類10 圖4角鯊烯的骨架環化各種皂?12 圖5皂?配糖體的三種主要構型14 圖6三?類與固醇類皂?合成路徑15 圖7Squalene-2, 3-epoxide環化形成三?類之過程16 圖8單醣皂?與雙醣皂?17 圖9抗氧化劑RH與DPPH 自由基反應之機制29 圖10HP20分離LH-1發酵液之訊號47 圖11DEAE-Sepharose CL-6B分離液F5-B55 圖12分液F5-B-1及 F5-B-2分子量分布59 圖13分液F5 -B-1及F5 -B-2紫外光全波長掃描60 圖14熊果酸、齊墩果酸及羅漢果甜?五的結構61 圖15熊果酸、齊墩果酸及羅漢果甜?V的FT-IR指紋圖譜62 圖16分液F5-B-1及F5-B-2的FT-IR指紋圖譜63 表目錄 表1各種纖維素交換樹脂及其活性基團23 表2三種凝膠樹脂的型號25 表3HP20與XAD-2樹脂吸附與解吸45 表4雲芝LH-1胞外發酵液之組成份49 表5雲芝發酵液活性成分分析50 表6雲芝發酵液分液活性成分分析51 表7分液F5-W 及F5 -B之組成份53 表8分液F5-W 及F5 -B活性成分分析53 表9分液F5-B-1及F5-B-2之組成份分析58 表10分液F5-B-1及F5-B-2分子量分析58 表11文獻回顧關於FT-IR三?皂?之官能基64 表12FT-IR偵測熊果酸、齊墩果酸及羅漢果甜?V之官能基65 表13FT-IR偵測分液F5-B-1及F5-B-2官能基66

參考文獻

- 1.刁治民、魏克家、吳保鋒。2006。食用菌學。青海人民出版社：591-593。
- 2.王伯徹、陳啟楨、華傑。1998。食藥用菇類的培養與應用。財團法人食品工業發展研究所。第 M87-019 號，187 頁。
- 3.王伯徹。1990。藥用真菌系列報導(八)雲芝。食品工業。22(10):59-62。
- 4.祁永青。2008。藥用真菌雲芝的研究概?。青海草業。17(3):26-29。
- 5.李宛蕓。2003。樟芝菌絲體培養與生理活性成分生成之研究。東海大學化學工程研究所。
- 6.李建武、余瑞元、陳麗蓉。1997。生物化學實驗原理與方法。第59-93頁。藝軒圖書出版社。台北，臺灣。
- 7.李俊峰。2003。雲芝的生物學特徵：藥理作用及應用前景。安徽農業科學。31(3):509-510。
- 8.李惠蓮。2001。省產青花菜之抗氧化性研究

。大葉大學食品工程學系。9.巫瑛撰。2009。綠藻水解物對 α -葡萄糖??與 α -澱粉?之抑制與活性物質的純化。海洋大學食品科學系。

10.肖崇厚與陳蘊如。1989。中藥化學。第323-360頁。上海科學技術出版社。上海，中國。11.呂淑芳。2002。靈芝之機能性與其分析方法。食品工業。34(11):3-10。12.沈雍智。2005。探討麩胺酸的添加對於液態發酵生產松杉靈芝菌多醣體和靈芝酸之研究。國立中央大學化學工程與材料工程所。13.林敬二，林宗義。1994。儀器分析第四版(上策)。第278頁。美亞書版股份有限公司。台北，臺灣。

14.林嘉隆。2006。培養條件對雲芝菌絲體生長與多醣生成之影響。東海大學化學工程研究所。15.陳建男。2007。啤酒花抗氧化成分之研究。大同大學生物工程研究所。16.黃健政。2005。油/水乳化系統中多酚化合物對兩價鐵離子的螯合作用與抗氧化能力的表現。行政院國家科學委員會專題研究計畫。21-22。17.黃鈺中。2010。雲芝子實體多醣分離純化及其抗氧化能力分析之研究。大葉大學生物產業科技學系。18.黃慧琪，張麗杰。皂素的生物活性與化學成分之探討。化學。67(1):1-12。19.馮杏儀。2010。大孔吸附樹脂在環境科學中的應用。華南師範大學。2-5。20.戴郁軌，朱凱俊。1982。真菌名詞辭典。第2467頁。名山出版社。台北，臺灣。21.Ainsworth, G. C., Sparrow, F. K. and Sussman, A. S. 1973. Vol. IVA. A Taxonomic Review with Keys:Ascomycetes and Fungi Imperfecti. Academic Press, Inc. The Fungi. p. 621. New York. 22.Cherng, I.H. and Chiang, H.C. 1995. Three new triterpenoids from *Antrodia cinnamomea*. J. Natural Products. 58:365-371. 23.Cherng, I.H., Wu, DP. and Chiang, H.C. 1996. Triterpenoids from *Antrodia cinnamomea*. Phytochemistry. 41:263-267. 24.Dai, Y.Y., Chuang C.H., Tsai, C.C., Sio, H.M., Huang, S.C., Chen, J.C., and Hu, M.L.2003. The protection of *Antrodia camphorata* against acute hepatotoxicity of alcohol in rats. J of Food and Drug Anal. 11:177-185. 25.Duduku K., Rosalam S.,and Rajesh N. 2010 .A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. Food and Bioproducts Processing. 157:17. 26.Gafner, S.G., Bergeron, C., McCollom, M.M., Cooper, L.M., McPhail, K.L., Gerwick, W.H., Angerhofer, C.K. 2004. Evaluation of efficiency of three different solvent systems to extract triterpene saponins from roots of *Panax quinquefolius* using high-performance liquid chromatography. Food Chem .52:1546-1550. 27.Halliwel, B., Gutteridge, J. M. C. and Aruoma, O. I. 1987. The deoxyribose method: A simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. Anal. Biochem. 165: 215-219. 28.Hostettmann K, Marston A. 1995. Saponins. New York: Cambridge University Press. p.548. 29.Jean-Paul, V., Lynn, H., Aede de, G., Harry, G. 2007. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. Phytochemistry 68:275-297. 30.Jian, C.and Yusuf, C. 2003. Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*:Ohsyio logical activity,uses,and production. Biotechnology Advances 21:109-122. 31.Jian-Guang ,L., Li, M. and Ling-Yi, K. 2008. New triterpenoid saponins with strong α -glucosidase inhibitory activity from the roots of *Gypsophila oldhamiana*. Bioorganic & Medicinal Chemistry .16:2912 – 2920. 32.Jie, L. 1995. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. Journal of Ethnopharmacology. 49 :57-68. 33.Kazuo, K., Zhonghua J., and Tamotsu N. 2001. New Triterpenoid Saponins from *Maesa tenera*. Chem. Pharm. Bull. 49(6): 758-761. 34.Keji, T., Ruixin N., Longjun J., Quansheng C. 2009. Anti-athletic fatigue activity of saponins (Ginsenosides)from American ginseng (*Panax quinquefolium* L.) . African Journal of Pharmacy and Pharmacology. 3(6):301-306. 35.Ki Sung, K., Hyun Young K., Noriko Y. and Takako Y. 2006. Stereospecificity in hydroxyl radical scavenging activities of four ginsenosides produced by heat processing .Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 16: 5028 – 5031. 36.Milgate, J. and Roberts, D.C.K. 1995. The nutritional and biological significance of saponins. Nutritiom Research. 15:1223-1249. 37.Moor, G.E, Gerner, RE, and Franklin, H.A. 1967. Culture of Normal Human Leukocytes. J. Amer. Med. Assn. 199:519. 38.Oleszek, W.A. 2006. Chromatographic determination of plant saponins. Journal of Chromatography A . 967:147-162. 39.Suheyli, K.and Huseyin, A. 2002. New Triterpenic Saponins from *Cephalaria transylvanica*. Turk J Chem. 26:947-954. 40.Sachie, O., Kaoru, K., Satoru, I., Kiyotaka, K., Hiroshi, Y., and Kunio T. 2011. Triterpenoid saponins from *Echinopsis macrogona* (Cactaceae). Phytochemistry. 72 :136-146 41.Sha hidi, F. and Wanasundara, P. K. J . P. D. 1992. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidat ion of soybean oil in cyclode xtrin emulsion . J . Agric . Food Chem. 40 : 945 -948. 42.Shobana, S., Sreerama, Y.N. and Malleshi, N.G. 2009. Composition and enzyme inhibitory properties of finger millet (*Eleusine coracana* L.) seedcoat phenolics: Mode of inhibition of α -glucosidase and pancreaticamylase. Food Chemistry 115: 1268 – 1273. 43.Simona, C. and Simona, C. 2005. Qualitative and quantitative aspects in analysis of Ginseng Pharmaceuticals using vibrational spectroscopy. Romanian Biophys. 15 (1-4) :61-66. 44.Sitki,C.B. , Karipta? E. , Nihal Y. A. 2007. Isolation of saponin from dried roots of *Gypsophila simonii* Hub. Mor. Pakistan journal of biological sciences10(11):1944-1946 45.Sone, Y., Okuda, R., Wada, N., Kishida, E., and Misaki, A. 1985. Structures and antitumor activaties of the polysaccharides isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*.Agric.Biol.Chem.49:2641-2645. 46.Stefan, G., Chantal B., Megan, M. M., Lorena, M. C., Kerry, L. M., William, H. G. and Cindy, K. 2004. Angerhofer Evaluation of efficiency of three different solvent systems to extract triterpene saponins from roots of *Panax quinquefolius* using high-performance liquid chromatography. Food Chem .52(6):1546-1550. 47.Thoma s, M. J . 1995. The role of free radicals and antioxidants: How do we know that they are working ? . Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 35: 21-39. 48.Ting, L. , Jianwen, Liu., Xiaodong, Z., Guang, J. 2007. Antidiabetic activity of lipophilic (-)-epigallocatechin-3-gallate derivative under its role of α -glucosidase inhibition. Biomedicine & Pharmacotherapy 61:91-96. 49.Turner, W. B. and Aldridge, D. C. 1983. Fungal Metabolites II. p.304-365. Academic Press, New York, USA. 50.Wang, G., Zhang, J., Mizuno, T., Zhuang, C., Ito, H., Mayuzumi, H., Okamoto, H., Li, J. 1993. Antitumor active polysaccharides from the Chinese mushroom Songshan lingzhi, the fruiting body of *Ganoderma tsugae*. Biosci Biotechnol Biochem. 57(6):894-900. 51.Willians, W. B., Cuvelier, M. E. and Berset, C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebe.-Wisse. Technol. 28: 25-30. 52.Xiao Feng, X., Jin Hui, Z.,Li Ming, W., Liang Hu, F., Jing Z. 2009. HPLC determination of adenosine in royal jelly.Food Chemistry 115:715-719. 53.Yamaguchi, T., Takamura, H., Matoba, T., Terao, J. 1998. HPLC method forevaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. Biosci. Biotechnol. Biochem., 62(6),1201-1204. 54.Yan, X., Rivero-Huguet Mario, E., Brianna Hughes, H. and William Marshall, D. 2008. Isolation of the sweet components from *Siraitia grosvenorii*. Food Chemistry 107:1022 – 1028. 55.Yang Q.Y., Yong S.C. and Yang X.T. 1987. The physio-chemical characteristics of the

polysaccharide-peptide(PSP) of *Coriolus versicolor* (Yun-zhi). In Report on the Polysaccharide-Peptide(PSP) of *Coriolus versicolor*, pp,1-6, Landford Press, China.