

# 嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

北冬蟲夏草子實體的醇萃取物活性成分分析

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：CNIP9503

執行期間：95 年 1 月 1 日至 95 年 12 月 31 日

計畫主持人：黃秀琴 副教授

執行單位：藥物科技研究所

中華民國 96 年 2 月 27 日

## 一、前言

冬蟲夏草(*Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.)又稱中華冬蟲夏草，為麥角菌科(Clavicipitaceae)真菌冬蟲夏草的子座及其寄主蝙蝠蛾科昆蟲虫草蝙蝠蛾(*Hepialus armoricanus* Oberthur)等幼蟲體(菌核)的複合體<sup>1)</sup>。主產於四川、青海、西藏、雲南等地。始載於清朝吳儀洛的「本草從新」，具甘平保肺益腎，止血化痰，已勞嗽作用，為我國名貴滋補強壯中藥之一。由於冬蟲夏草的生長環境嚴苛，天然冬蟲夏草產量有限，且呈逐年下降的趨勢，價格逐年飆漲，偽品充斥，為難取得之珍貴藥材。近十年來之臨床藥理試驗證明冬蟲夏草具有降血脂、降血壓、活化自然殺手細胞<sup>2)</sup>，抗氧化<sup>3)</sup>、自由基清除<sup>4)</sup>、抗血小板凝集<sup>5)</sup>等作用，常用於治療呼吸系統、腎臟<sup>6)</sup>、肝臟、心血管及免疫系統等疾病之治療<sup>7)</sup>。因此更促使人們致力於尋找天然冬蟲夏草的代用品，一方面進行蟲草菌絲體的研究，另一方面尋找同屬類似品，以求能得到大量培養且成分類似之代用品。至目前尚未有成功之人工培養冬蟲夏草子實體，因此只有利用液體發酵培養方法得到菌絲體應用。

北冬蟲夏草(*C. militaris* (L. ex Fr.) Link)又名蛹蟲草、北蟲草，為真菌蛹蟲草的菌核及子實體，寄生於鱗翅目(Lepidoptera)昆蟲的死蛹上，所成蛹體及子實體之複合體。近十年來，經人工培養成功出子實體，並經由成分分析發現與中華冬蟲夏草具有類似的成分<sup>8)、9)、10)</sup>；如 cordycepin、adenosine、adenine、 $\beta$ -sitosterol、ergosterol and D-mannitol，甚至有報告<sup>11)</sup>指出 cordycepin 及 adenine 之成分比中華冬蟲夏草高出 3 倍。藥理試驗也證明北冬蟲夏草具有抗發炎<sup>12)</sup>、抗腫瘤細胞<sup>13)</sup>、抗脂質氧化<sup>14)</sup>、降血糖<sup>15)</sup>等作用。因此成為中華冬蟲夏草之代用品。

申請者曾接受國內廠商委託，進行建教合作，分析廠商自行人工培養成功之北冬蟲夏草子實體之 cordycepin<sup>16)</sup>、adenosine、D-mannitol<sup>17)</sup>及多醣<sup>18)</sup>等成分，發現皆比中華冬蟲夏草高。更證明國內有能力能培養出優質之北冬蟲夏草子實體。為進一步了解北蟲草之活性成分，發現文獻報導之成分研究，大都屬高極性之 adenosine 類生物鹼<sup>19)</sup>、多醣<sup>20)</sup>、脂肪酸<sup>21)</sup>等成分，中低極性之成分少有報告<sup>22)、23)</sup>，本研究擬將進行北蟲草的乙醇抽取部分進行成分分析，並配合本校藥學系陳秋蘭老師進行腫瘤細胞之細胞毒性評估、小鼠造精功能之活性評估，以分離出有效之活性成分，提供學術界及產業界的完整之成分分析及生理活性評估試驗等相關之重要參考依據。

## 二、材料與方法

### (一)材料

I.由富享生技公司培育之北冬蟲夏草(*Cordyceps militaris* (L.ex Fr.) Link)子實體

粉末，以 CM 表示。

## II. 標準品

D-葡萄糖(D-Glucose)：購自 Chem Service，純度 98%。

## III. 試藥與溶媒

Naphthol(GR 級)、 $H_2SO_4$ (GR 級)、95%EtOH、無水酒精、Acetone(GR 級)、Ether(GR 級)。

## IV. 儀器與設備

分光光度計：Hitachi UV-2001

水浴器：台製

離心機：Hitachi Centrifuge O5P-21

試管震盪器：Vortex-2 genie

索氏提取器(Soxhlet extractor)

### (二) 方法

#### 1. 北蟲草多醣之抽取與精製

精確秤取北冬蟲夏草(*Cordyceps militaris*)子實體 24.9997g 置於索氏提取器中，加入乙醚 250ml，迴流抽取 1 小時脫脂。殘渣將乙醚溶劑揮發乾後，加 80% 250ml EtOH 浸泡過夜後，迴流抽取 2 次，每次 2 小時，過濾。取殘渣加水 500ml，於 80°C 攪拌提取 3 次，每次 2 小時，過濾，合併濾液。將濾液減壓濃縮至約 100ml，用  $CHCl_3$  : Isopentanol(4 : 1)，每次約 100ml 去除蛋白質。水溶液中加 4 倍量 95%EtOH，靜置過夜，離心，沉澱物以無水乙醇、丙酮、乙醚依次洗滌多次。減壓冷凍乾燥至恆量，秤重共 0.9691g，即得北蟲草多醣純品。

#### 2. 標準曲線繪製

##### a. 葡萄糖標準溶液製備

精確秤取 105°C 乾燥至恆重的 D-葡萄糖標準品 12mg，於 100ml 量瓶中，加水稀釋至刻度，混均。

##### b. 5% 苯酚溶液製備

取苯酚 5g 加入 50ml 水，再加入 EtOH 溶解，並定容至 100ml，混均，避光貯存。

##### c. 葡萄糖標準曲線繪製

分別精確吸取葡萄糖標準溶液 0.25、0.50、0.75、1.00 及 1.25ml，置於 10ml 刻度試管中分別加水至 1.5ml，另取 1.5 蒸餾水作空白對照每管加入 5% 苯酚溶液 2.0ml，混均加濃硫酸 6.5ml，搖勻後放置 10ml，置於 30°C 水浴，

恆溫 20 分，取出，放置至室溫，混均。於 490nm 處測定吸光值，求得葡萄糖標準曲線回歸方程式。

#### d. 換算因子的測定

精確秤取經減壓冷凍乾燥至恆量的北蟲草多醣純品 1.7mg，置於 100ml 量瓶中，加水溶解，並稀釋至刻度，混均。精確吸取此溶液 1.0ml，依葡萄糖標準曲線繪製方法操作，測定北蟲草多醣純品吸光值，以葡萄糖標準曲線回歸方程式中求出北蟲草多醣純品溶液中葡萄糖濃度，依下式計算換算因子  $f$ ，測得  $f=1.634$

$$f = W / (C \times D)$$

W 為多醣的質量(mg)

C 為多醣稀釋液中葡萄糖濃度(mg/ml)

D 為多醣的稀釋倍數

### 3. 北冬蟲夏草樣品溶液製備

精確秤取北冬蟲夏草子實體樣品 5g 於圓底燒瓶中，分別加入 50ml H<sub>2</sub>O 於水浴器中，煮沸 1 小時提取，過濾，取濾液。重複上步驟 3 次，合併濾液，減壓濃縮至約 100ml，加三倍量乙醇沉澱，靜置過夜，離心，取沉澱物。分別用無水乙醇、丙酮及乙醚依序多次洗滌沉澱物，減壓冷凍乾燥至恆量，秤重，即為水溶性粗多醣。精秤上述所得粗多醣 8mg 於 100ml 量瓶中，加水溶解，並定容至刻度，混均，即為北冬蟲夏草樣品溶液。

### 4. 北冬蟲夏草樣品含量測定

精確吸取北冬蟲夏草檢品品溶液 1.0ml，置於 10ml 刻度試管中，依葡萄糖標準曲線繪製方法操作，測定檢品溶液中葡萄糖含量，依下式計算樣品中多醣含量。

$$\text{多醣含量(\%)} = C \times D \times f / W \times 100$$

C 為樣品中葡萄糖濃度(mg/ml)

D 為樣品的稀釋倍數

$f$  為換算因子

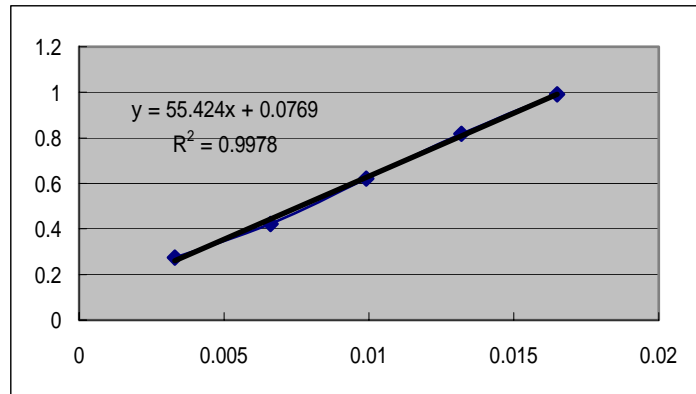
W 為樣品重量

## 三、結果

### 1. 葡萄糖標準曲線圖

葡萄糖標準品 0.003~0.015mg/ml 濃度範圍標準曲線方程式為：

$$Y = 55.424x - 0.0769 \quad (R^2 = 0.9978, n=2)$$



## 2.北冬蟲夏草樣品多醣含量

樣品	多醣含量(%)
北冬蟲夏草	8.74

## 四、結論

富享生物科技公司自行研發成功之北冬蟲夏草(*Cordyceps militaris*)子實體，經分析多醣成分之含量為 8.74%。本抽取得之多醣將提供陳老師進行腫瘤細胞之細胞毒性評估、小鼠造精功能之活性評估。以了解北冬蟲夏草之活性成分。

## 五、參考文獻

- 1) 國家中醫藥管理局編委會，中華本草，(1999)，上海科學技術出版社，第一冊，p.494-495。
- 2) Zhu, J. S., Halpern, G. M., Jones, K., (1998), *Part I. Journal of Alternative and Complementary Medicine*, **4**, 289-303.
- 3) Li, S. P., Li, P., Dong, T. T., Tsim, K. W., (2001), *Phytomedicine*, **8**, 207-212.
- 4) Wang, B. J., Won, S. J., Yu, Z. R., Su, C. L., (2005), *Food and Chemical Toxicology*, **43**, 543-552.
- 5) Shiao, M. S., Wang, Z. N., Lin, L. J., Lien, J. Y., Wang, J. J., (1994), *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, **35**, 261-267.
- 6) Zhen, F., Tian, J., Li, L. S., (1992), *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*, **12**, 288-291.
- 7) Zhu, J. S., Halpern, G. M., Jones, K., (1998), *Part I. Journal of Alternative and Complementary Medicine*, **4**, 429-457.
- 8) Gao, H., Chen, S., Wang, L., Zhang, L., Li, J., (1987), *Zhongyao Tongbao*, **12**(2), 108-9.

- 9) Liu, J., Zhong, Y., Yang, Z., Cui, S., Wang, F., (1989), *Zhongguo Zhongyao Zazhi*, **14**(10), 608-9.
- 10) He, L., Ma, B., Zhang, J., Jin, Y., Gu, H., Yuan, G., Li, J., Liang, M., Chen, D., (1993), *Zhongguo Yaoxue Zazhi*(Beijing, China), **28**(5), 279-80.
- 11) Gong, C., Wu, W., Xu, C., Yang, K., Chen, G., (2002), *Canye Kexue*, **28**(2), 168-172.
- 12) Won, S. Y., Park, E. H., (2005), *Journal of Ethnopharmacology*, **96**, 555-561.
- 13) Yoo, H. S., Shin, J. W., Cho, J. H., Son, C. G., Lee, Y. W., Park, S. Y., Cho, C. K., (2004), *Acta Pharmacologica Sinica*, **25**(5), 657-665.
- 14) Shen, Q., Su, C., (2002), *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa*, **14**(2), 22-25.
- 15) Kwon, Y. M., Cho, S. M., Kim, J. H., Lee, J. H., Lee, Y. A., Lee, M. W., (2001), *Saengyak Hakhoechi*, **34**(4), 327-329.
- 16) Yu, H. M., Tang, T. C., Chen, C. L., Wang, T. C., Ling, K., Lin, H. H., Huang, S. C., (2005), *The 20<sup>th</sup> Symposium on Natural Products*, p.130.
- 17) Chuang, C. H., Yu, H. M., Huang, S. C., Wang, T. C., Chen, C. L., Ling, K., Tang, T. C., (2005), *The 20<sup>th</sup> Symposium on Natural Products*, p.130.
- 18) 游惠美、唐自強、陳秋蘭、王四切、凌雲琪、林恆弘、黃秀琴, (2005), 94 年度中國藥學會年會暨學術研討會, p.113。
- 19) Jiang, H., Liu, K., Meng, S., Chu, Z., (2000), *Yaoxue Xuebao*, **35**(9), 663-668.
- 20) Yu R., Wang L., Zhang H., Zhou C., Zhao Y., (2004), *Fitoterapia*, **75**(7-8), 662-6.
- 21) He, L., Ma, B., Zhang, J., Jin, Y., Gu, H., Yuan, G., Li, J., Liang, M., Chen, D., (1993), *Zhongguo Yaoxue Zazhi*(Beijing, China), **28**(5), 279-80.
- 22) Rukachaisirikul, V., Pramjit, S., Pakawatchai, C., Isaka, M., Supothina, S., (2004), *Journal of Natural Products*, **67**(11), 1953-1955.
- 23) Choi, M. A., Lee, W. K., Kim, M. S., (1999), *Journal of Food Science and Nutrition*, **4**(1), 18-22.