

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

北冬蟲夏草對細胞之造精能力與抗氧化功能評估之研究

子計畫(2)：北冬蟲夏草活性成分之研究

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CNPH94-03

執行期間：94年1月1日至94年12月31日

計畫總主持人：王四切 副教授

計畫主持人：黃秀琴 副教授

計畫參與人員：游慧美講師、蔡欣潔同學

執行單位：藥物科技研究所

中華民國 95 年 2 月 27 日

一、前言

中華冬蟲夏草(*Cordyceps sinensis*)為我國的一種名貴野生中藥材，具有補虛損、益精氣、保肺、益腎、止血化痰，滋補強壯之功效。近年研究發現有鎮靜、耐缺氧、抗炎、降壓、改善心肌缺血，增加人體免疫功能和有一定的抗炎效果。由於天然來源稀少，價格昂貴，因此，人們致力於尋找天然冬蟲夏草的代用品，一方面尋找同屬類似品，另一方面進行蟲草菌絲體的研究，以求能得到大量培養且成分類似之代用品。

北冬蟲夏草(*C. militaris* (L. ex Fr.) Link)又名蛹蟲草，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，及在藥性成分，藥理作用，功能及臨床之研究上發現與天然的冬蟲夏草基本一樣，而成為中華冬蟲夏草之代用品。

本研究是取材於國內自行培育成功之北冬蟲夏草子實體，經由多醣抽取及純化後以苯酚—硫酸比色法測定其含量，並提供與子計劃 1 及 3 之北冬蟲夏草對細胞之造精能力與抗氧化功能評估之研究。

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

1.葡萄糖標準品：購自 Sigma comp.，純度為 99.5%。

III. 試藥與溶媒

95% Etanol、Ether、Chloroform、Isopentanol、Naphthol、conc-Sulfuric acid。

IV. 儀器與設備

Soxhlet extractor、分光光度計(Hitachi U-2001)、離心機(Hitachi O5P-21)、定量量瓶、均質器(Vortex-2)。

(二)方法

I. 多醣抽提與精製

精秤約 25g
↓ 250ml Ether, Soxhlet extractor reflux 1hr.
取藥渣, 蒸發 Ether
↓ 80% EtOH 250ml, overnight
↓ reflux 2hrs, 2 次
↓ 過濾
取藥渣
↓ 400ml H₂O, 80°C 攪拌 2hrs.
↓ 離心, 重複 3 次
↓ 合併上清液
↓ 減壓濃縮至約 100ml
↓ Sevag 法 deprotein
↓ 過濾
取濾液
↓ +4 倍之 95% EtOH
↓ 靜置, overnight
↓ 離心
取沉澱物
↓ 以無水酒精; acetone; ether 依次洗滌
↓ 低溫減壓乾燥
CM 多醣(0.7397g)

II. 標準曲線製備

A. 葡萄糖標準貯存溶液製備

精稱葡萄糖標準品 13.2mg 於 100ml 量瓶中，加水稀釋至刻度，混均。作為葡萄糖標準貯存溶液。

B. 5% Naphthol 溶液製備

稱取 5g Naphthol 各加 50ml 之 H₂O 及 EtOH 溶解，即為 5% Naphthol 溶液。

C. 葡萄糖標準曲線製備

試劑	試管數							
	1	2	3	4	5	Blank	CM1 [※]	CM2 [※]
Glucose std. stock sol.(n	0.25	0.50	0.75	1.00	1.25	0.00	0.50	1.00
H ₂ O(ml)	1.25	1.00	0.75	0.50	0.25	1.50	1.00	0.50
5% Naphthol(ml)	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
c-H ₂ SO ₄ (ml)	6.50	6.50	6.50	6.50	6.50	6.50	6.50	6.50
mix.								
Stand 10min.								
mix.								
30°C, w.b.20min.								
Determ. Abs. at 490nm	0.289	0.523	0.638	0.822	0.975	0.00	0.419	0.654

※為 CM 多醣精稱 1.7mg，加水稀釋至 10ml。

D. 換算因子的測定

精確稱取 CM 多醣 1.7mg 置於 10ml 量瓶中，加水稀釋至刻度，混均。分別精確吸取此溶液 0.5 及 1.0ml，依葡萄糖標準曲線製備方法操作，測定吸光值，從回歸方程式中求出多醣供試液中葡萄糖濃度，依下式計算換算因子 $f = 1.634$

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

W 為多醣質量(mg)

C 為多醣稀釋液中葡萄糖濃度(mg/ml)

D 為多醣的稀釋因素

E. 樣品溶液製備及各樣品含量測定

a. 樣品溶液製備

CM 精確稱取約 5g

↓ 50ml H₂O w.b. 100°C, 1hr

↓ 過濾

取濾液

↓ 重覆上步驟 3 次

合併濾液

↓ 減壓濃縮至約 100ml

↓ 加 3 倍量 EtOH

↓ 靜置

↓ 離心

沉澱物

↓ 以無水酒精；acetone；ether 依次洗滌

↓ 低溫減壓乾燥至恆量

CM 粗多醣，精稱 CM 8mg/100ml

b. 樣品含量測定

精確吸取 CM 粗多醣各樣品溶液 1.0ml，

於 10ml 刻度試管中，依葡萄糖標準曲線繪製法操作，測定葡萄糖含量，依下式計算

CM 中多醣含量

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

C：樣品中葡萄糖濃度(mg/ml)

D：樣品的稀釋倍數

f：換算因子

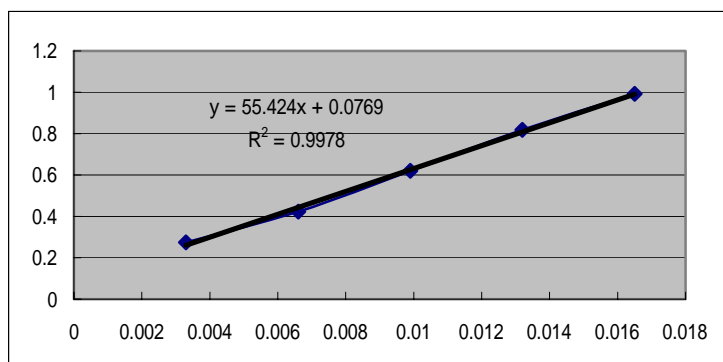
W：樣品重量

三、結果

I. 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

$$y = 55.424x - 0.0769 (R^2 = 0.9978, n=2)$$



II. CM(北冬蟲夏草)多醣含量

樣品	多醣含量(%)
CM	2.46

四、結論

國內自行研發成功之北冬蟲夏草(*Cordyceps militaris*)子實體，以 Sevag 法去除蛋白質之多醣萃取法抽取多醣，並利用苯酚－硫酸法測定多醣含量，提供子計劃(1)及(3)之對老鼠細胞之造精作用及肝細胞之抗氧化評估試驗。以了解北冬蟲夏草之造精及抗氧化活性作用。

五、參考文獻

1. D. Wang, L. Lin, C. L. Yuan, M. Xu, L. J. Wang, Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2002, 33(10), p.896~897。
2. 余曉斌、羅長才、繆靜, Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2002, 33(12), p.1086~1087。
3. 劉曉河、梁惠花、譚曉紅, Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2002, 34(6), p.519~520。
4. H. M. Yu, T. C. Tang, C. L. Chen, T. C. Wang, K. Ling, H. H. Lin and S. C. Huang, The 20th Symposium on Natural Products, 2005, p.72。
5. C. H. Chuang, H. M. Yu, S. C. Huang, T. C. Wang, C. L. Chen, K. Ling, T. C. Tang, The 20th Symposium on Natural Products, 2005, p.73。