師大學報：數理與科技類
民國 92 年，48(1,2)，13-24

蠶蛹蟲草具有顯著之抗氧化性與自由基清除能力

莊曉莉* 李祥麟** 黃檀溪*

*中央研究院 植物所 **蘇州應用藻類研究所

蠶蛹蟲草在自然界中之產量很少，故以生技方法將蛹蟲草菌株 *Cordyceps militaris* LS901 感染家蠶大量培育蠶蛹蟲草，本文對此新產品之萃取液的抗氧化力及其相關活性加以探討。供測樣品之種類包括 100℃水、40 %乙醇溶液和 100 %乙醇等三種萃取液。分析結果，顯示以上各萃取液之抗油脂氧化能力與清除 DPPH 所生自由基的能力，均相當於人工合成之抗氧化劑 BHT。對亞鐵離子之螯合力則與 EDTA 一樣強。藉由普魯士藍之生成量做爲還原力之指標，比較各種萃取液與 BHT 之還原力，在最佳劑量時其相對還原力均達到 BHT 的 80%到 90%。綜合以上之結果，證明蠶蛹蟲草具有顯著之抗氧化力與清除自由基之能力。

關鍵詞：蛹蟲草(北冬蟲夏草)、抗氧化性、螯合能力、清除自由基、還原力

緒 言

氧是維持多數生命所必需的基本成分，但氧在體內代謝時會形成活性氧(reactive oxygen species, ROS)或自由基（free radical），如超氧陰離子自由基(superoxide anion radical, $O_2^{\cdot}$-)、羥基自由基(hydroxyl radical, $OH^{\cdot}$)與過氧化氫(非自由基型態之活性氧)等。過多的自由基或活性氧對人體是有害的，因爲這些成份具有高化學反應性，可造成細胞內蛋白質、核酸及脂質過氧化，進而破壞細胞、組織及生物體的正常功能（陳惠英、顏國欽，1998；Gutteridge, 1993；Kehrer, 1993；Halliwell et al., 1992）。故自由基對健康之傷害是多方面的，例如細胞膜上之不飽和脂肪酸被自由基氧化會傷害細胞膜之功能，進而影響細胞之蛋白與核酸之正常作用（Halliwell et al., 1992）；破壞眼睛水晶體，造成白內障（Spector et al., 1995）；破壞胰島素細胞，引起糖尿病（Paolisso et al., 1994）；破壞血管中的脂肪，引起動脈硬化、阻塞，進而造成高血壓、腦中風及心肌梗塞（Giugliano et al., 1995； Jialal & Devaraj, 1996），以及破壞細胞，加速人體老化，甚至基因突變引起癌症（Ames, 1990; Kenseler & Trush, 1984; Troll & Wiesner, 1985）。

爲了降低自由基的傷害，細胞有許多抗氧化之防禦系統，包括非酵素性的抗氧化劑(non-enzymatic antioxidants)如維生素 C、維生素 E 和麩胱甘肽(glutathione；GSH)等，及酵素性的抗氧化劑(enzymatic antioxidants)如超氧化歧化酶(superoxide dismutase，SOD)、觸酶(catalase)及麩胱甘肽過氧化酶(glutathione peroxidase)等。在正常狀態下生物體之抗氧化系統會與自由基對抗取得一種動態的平衡以維持正常的生理狀況(陳惠英、顏國欽，1998)。然而隨著年齡增長，此種防禦系統的能力會隨之降低，而導致體內氧化還原失衡。因此爲了彌補體內抗氧化能力的損失，一方面可強化體內之抗氧化系統，如提高 SOD 之活性或 GSH 之含量等，另一方面則可補充體內之抗氧化物，故營養學家一直希望找到具有抗氧化性的天然物以期

能用以維持體內氧化還原之平衡（Ramarathnam et al., 1995；Su, 1992；葉佳聖、蘇正德，1993；劉柏康等，1999）。

冬蟲夏草或蛹蟲草均被認爲可能具有減緩老化的功效（沈均、陶榮芬，1999），而抗氧化或消除自由基能力之強弱往往又與抗衰老有關，故有關蟲草之抗氧化功效一直受到重視(Zhu et al., 1998)，實驗結果也證實人工培養之冬蟲夏草的菌絲體或子實體可以加強體內之 SOD 活性（Yamaguchi et al., 2000），蛹蟲草菌絲體之抽出物對小鼠之肝、腎、心、腦等初代細胞(Primary culture)之氧化傷害亦有保護作用(管代義等，1993)。至於蟲草本身抗氧化力之強弱，則由於各報告取材不同，往往得到不同的結果(Li et al., 2001)。蠶蛹蟲草是最近發展成功之科技產品，故相關之研究還很少，根據對 *C. militaris* LS901 所培養之蠶蛹蟲草的分析結果(莊曉莉等，2003)，發現這類產品含有多量冬蟲夏草所無之類胡蘿蔔素(carotenoids)，由於類胡蘿蔔素爲天然之抗氧化物，因此本文就蠶蛹蟲草之水萃取液及乙醇萃取物的抗氧化力及自由基清除能力加以研究。

材料與方法

一、實驗材料

蠶蛹蟲草是以蛹蟲草菌株 *Cordyceps militaris* LS901 感染蠶蛹培育而成(莊曉莉等，2003)。此菌株由李祥麟教授採自甘肅烏鞘嶺，經多次單胞(利用其分生孢子)分離，純化後接種到蠶蛹，再從所發育之子實體分離培養，並經反覆求證所接種之菌株與再分離之菌株完全相同。

二、溶劑與藥品

無水乙醇(ethanol)、二丁基甲苯(butylated hydroxytoluene, BHT)與甲醇(CH_3OH)是購自台灣默克(MERCK)。亞麻油酸(linoleic acid)，硫氰酸銨(NH_4SCN)，氯化亞鐵($FeCl_2 \cdot 4H_2O$)，磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)，α,α-β-picrylhydrazyl radical(DPPH)，赤血鹽($K_3Fe(SCN)_6$)，三氯醋酸(trichloroacetic acid)，Ferrozine [3-(2-pyridyl)-5 , 6-diphenyl-1 , 2,4-triazine-4',4''-disulfonic acid sodium salt]是購自 Sigma 公司。

三、實驗方法

(一)樣品萃取

精秤蠶蛹蟲草樣品 20 克，以研缽磨成粉末，加入蒸餾水 100 mL，水滾煮沸 20 分鐘後，經 3M Whatman 濾紙過濾後，濾液以 8000g 離心 10 分鐘，收集上清液(濃度爲 42 mg/mL)冷凍乾燥，所得之乾燥物儲存於-20℃備用。進行實驗前以蒸餾水調整萃取物至各試驗所需之濃度進行測試，此爲水萃取液(WE)；過濾後所得之濾渣，再加入 100 mL 的 100%乙醇，放置隔夜，以 8000g 離心 10 分鐘，收集上清液(濃度爲 10 mg/mL)以減壓冷凍乾燥，所得之乾燥物儲存於-20℃備用，進行實驗前以 100%乙醇溶液調整萃取物至各試驗所需之濃度進行測試，此爲乙醇萃取液(AE-100)。另外，取蠶蛹蟲草樣品 20 克，以研缽磨成粉末，加入 40%乙醇溶液於室溫下放置 3 小時後，經 3M Whatman 濾紙過濾後，濾液以 8000g 離心 10 分鐘，收集上清液(濃度爲 66 mg/mL)以減壓冷凍乾燥，所得之乾燥物儲存於-20℃備用，進行實驗前以 40%乙醇溶液調整萃取物至各試驗所須知濃度進行測試，此爲 40%乙醇萃取液(AE-40)。

(二)抗油脂過氧化力測定

抗氧化力之測定是以抑制油質之過氧化爲指標，其步驟是綜合參考 Osawa 和 Namiki(1981)及 Zainol 等(2003)所述的方法。取 4 mL 的亞麻油酸乳化液(亞麻油酸 2.51 mL，乙醇溶液 100 mL，0.05M pH 7.0 磷酸鹽緩衝溶液 8 mL 與 3.9 mL 蒸餾水混合後以超音波震盪 30 分鐘)及 0.02 mL 樣品萃取液於裝有透氣蓋之 25 mL 試管中，均勻混合後於 40℃震盪培養(每分鐘約 80 次)，每隔 24 小時取出樣品 0.1 mL，依序加入 9.7 mL 75%乙醇溶液(v/v)，0.1 mL 30%硫氰酸銨(NH_4SCN)及 0.1 mL 20 mM 氯化亞鐵($FeCl_2 \cdot 4H_2O$)，震盪均勻後反應 3 分鐘，使用分光儀檢測 500 nm 之吸光值，吸光值越低表示樣品的抗氧化性越佳。實驗中以 BHT 作爲標準品，並分別以 0.02 mL 的蒸餾水、40%乙醇溶液或 100%乙醇取代樣品做爲對照組。

(三)清除 DPPH 自由基能力之測定

自由基能力的清除是參考 Yamaguchi 等(1998)所述的方法，取 0.03 mL 的樣品萃取液於 96 孔之酵素免疫分析盤(ELISA plate)之孔中，加入 0.12 mL 之 100 mM 的 Tris-HCl 緩衝液(pH7.4)混合均勻，再加入 0.15 mL 之 500 mM 的 DPPH 乙醇溶液，均勻混合後在室溫下靜置 20 分鐘，使用盤式光譜分析儀(BIO-TEK Power Wave X340)檢測 517 nm 的吸光值，吸光值越低表示樣品清除自由基的能力越強。實驗中以 BHT 作爲標準品，以水、40%乙醇溶液或 100%乙醇取代樣品做爲對照組。

(四)還原力測定

還原力之測定是參考 Oyaizu(1986)所述之方法。取 0.2 mL 樣品萃取液，加入 0.2 mL 0.2 M 磷酸緩衝溶液(pH 6.6)及 0.2 mL 1%的赤血鹽($K_3Fe(SCN)_6$)於 1.5 ml 離心管中混合均勻後，於 50℃靜置 20 分鐘，再加入 0.2 mL 的 1%三氯醋酸(trichloroacetic acid)溶液，6000g 離心 10 分鐘，取上清液 0.1 mL 於 96 孔之酵素免疫分析盤之孔中，加入 0.1 mL 的蒸餾水及 0.02 mL 之 0.1%氯化鐵($FeCl_3$)溶液，混合均勻後於室溫下反應 10 分鐘，使用盤式光譜分析儀檢測 700 nm 的吸光值，吸光值越高表示樣品還原力越強，實驗中以 BHT 作爲標準品。

(五)螯合亞鐵能力的測定

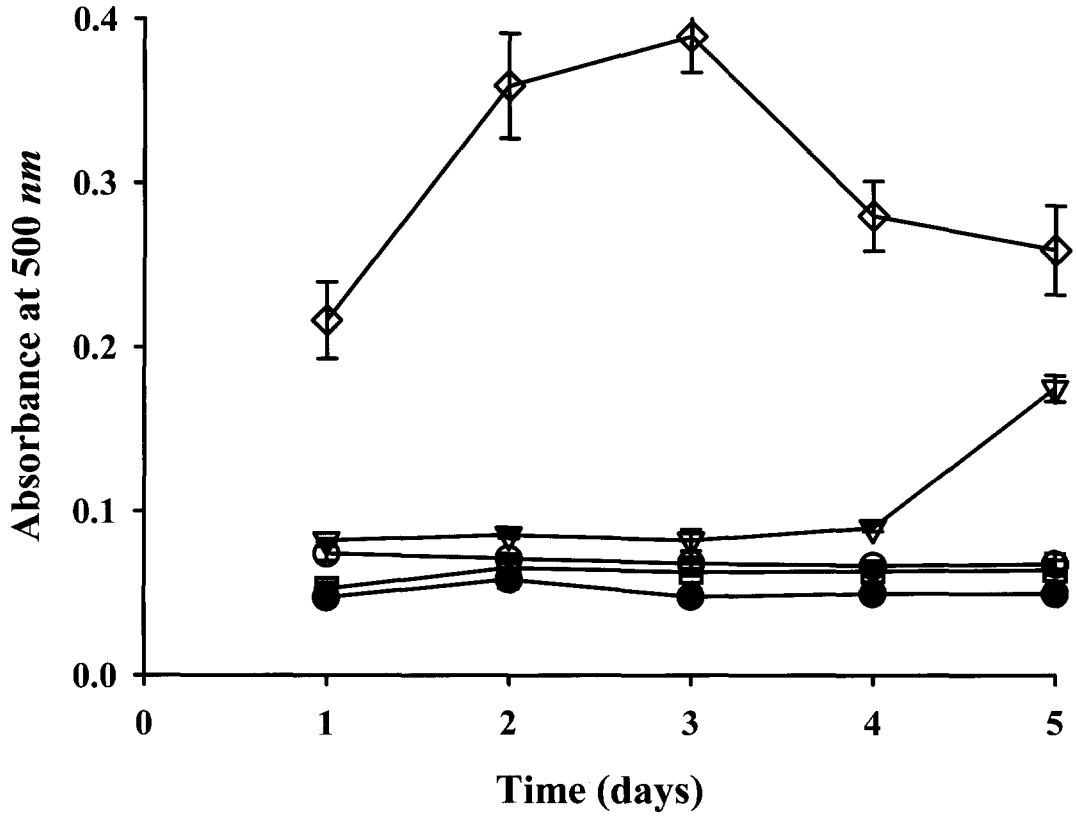
參考 Boyer 和 McCleary(1987)所述的方法加以修改，取 0.05 mL 的樣品萃取液於 96 孔之酵素免疫分析盤之孔中，加入 0.18 mL 的甲醇及 0.05 mL 之 2 mM 的氯化亞鐵($FeCl_2 \cdot 4H_2O$)溶液，混合均勻 30 秒後再加入 0.01 mL 之 5 mM Ferrozine，反應 10 分鐘後，使用盤式光譜分析儀檢測 562 nm 的吸光值，吸光值越低表示樣品螯合亞鐵的能力越強。實驗中以 EDTA 作爲標準品，以水、40%乙醇溶液或 100%乙醇取代樣品做爲對照組。

結果與討論

一、抗油脂之過氧化能力

以硫氰酸鐵法測定鱷蜥蟲草不同萃取物及 BHT 抗亞麻油酸之過氧化情形，發現沒有添加抗氧化物之亞麻油酸在第三天過氧化物之累積即達到高峰(圖一)。由於過氧化物並不安定，在氧氣充份供應下，會再進一步生成複雜之二次代謝產物而減緩過氧化物之累積，故於第四天濃度開始下降，

然後維持在一個平衡點上。如在亞麻油酸中添加人工合成之抗氧化劑 BHT(3 mg/mL)，則油脂之過氧化現象明顯被抑制，經過五天其抑制效果仍然沒有改變(圖一)。以蠶蛹蟲草之不同萃取物(分別爲 3 mg/mL)取代 BHT，發現水萃取物與 100%乙醇萃取物之抑制效果與 BHT 幾乎相同，而且經過五天後仍然維持相同抑制效果(圖一)，顯示水萃取物和 100%乙醇萃取物不但具有極佳之抗氧化力，而且其抗氧化之有效成分很安定。40%乙醇萃取物之效果也很好，只是於第四天開始有減弱之現象，表示 40%乙醇萃取物之抗氧化性成分比較不安定。



圖一：蠶蛹蟲草不同萃取物及 BHT 之抗氧化性比較

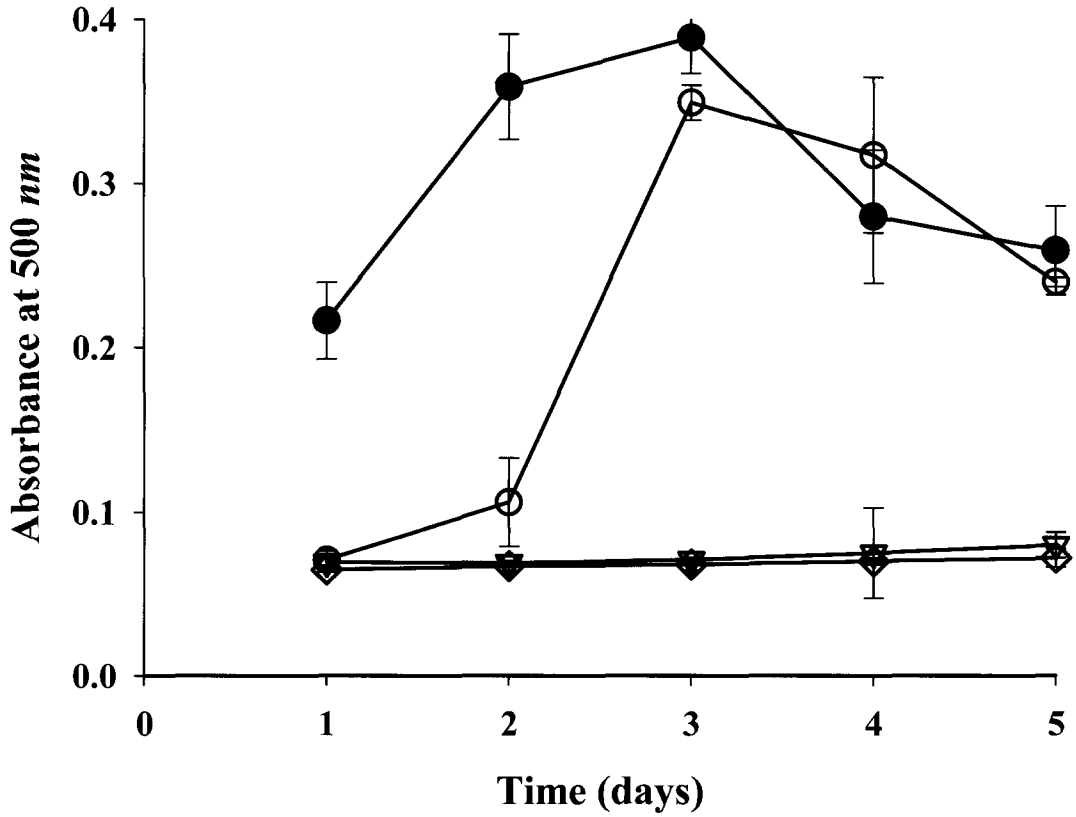
註：各萃取物與 BHT 之濃度均爲 3mg/mL。

●：BHT；◇：對照組；○：100%乙醇；▽：40%乙醇；□：水萃。

數據爲 4 重複(n=4)之平均值。

由於 BHT 爲純化合物，在本測定條件下，其劑量在 1 mg/mL 即可達到最佳抑制效果，但是蠶蛹蟲草之各種萃取物均爲混合物，其中有些成分與抗氧化無關，故所需之最佳濃度應高於 BHT，爲瞭解各萃取物之最佳劑量的範圍，於是進一步比較不同濃度之水萃取物(1 mg/mL；3 mg/mL 與 5 mg/mL)的抗氧化效果。如圖二所示，5 mg/mL 與 3 mg/mL 之抗氧化力都很好，而且兩者之差別非常有限，至

於 1 mg/mL 則可能由於有效成分之濃度不足而無明顯之抗氧化效果，故水萃取物 3 mg/mL 以上爲抗氧化之有效濃度。乙醇萃取物之最佳濃度亦在 3 mg/mL 以上，因其結果與水萃取物相似，故圖示從略。

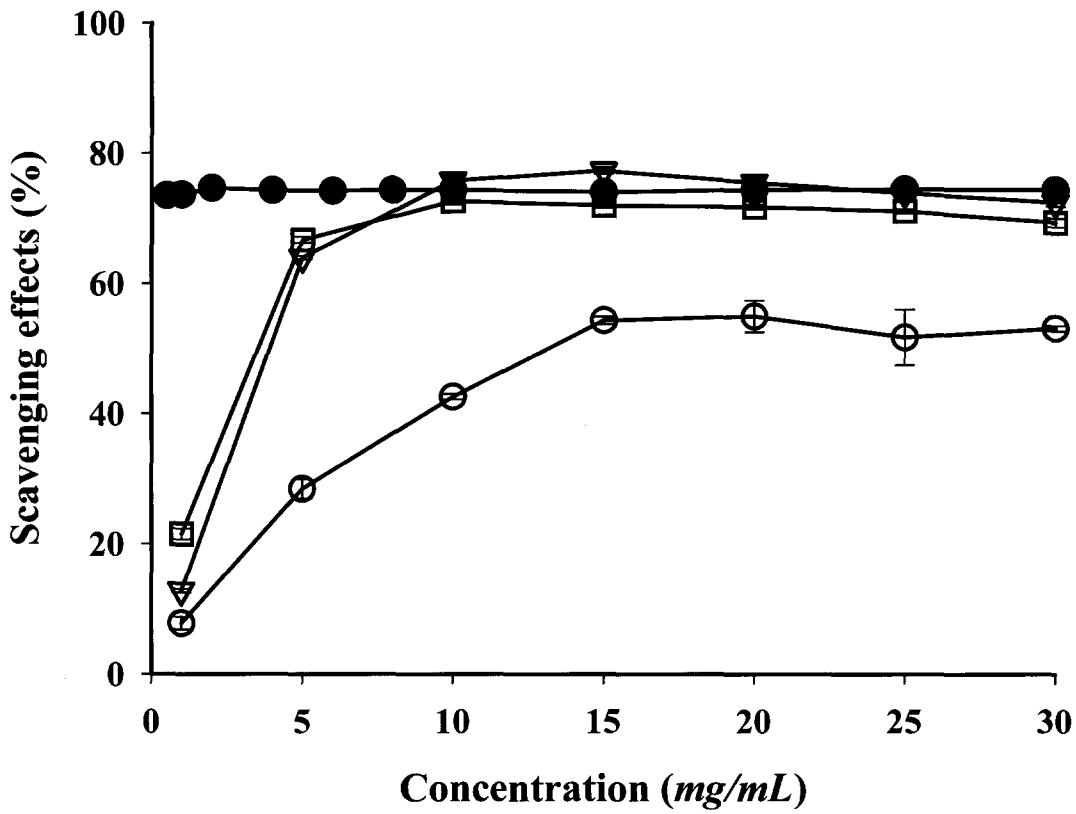


圖二：不同濃度水萃取物之抗氧化性比較

註：●：對照組；○：1mg/mL；▽：3mg/mL；◇：5mg/mL
數據爲 4 重複(n=4)之平均值。

二、清除 DPPH 自由基之能力

在含有 1 μmol DPPH 自由基的反應系統中，分別添加不同濃度之 BHT 及各種蠶蛹蟲草的萃取液，如圖三所示，蠶蛹蟲草之水萃取液與 40%乙醇萃取液在濃度達到 10 mg/mL 時，其自由基之清除能力與 BHT 相同，顯示其萃取液中含有清除自由基之良好化合物，只是含量不足，故需要較高的濃度。至於 100%乙醇萃取液之清除能力則略差，在最佳劑量下約可達到 BHT 之 70%。

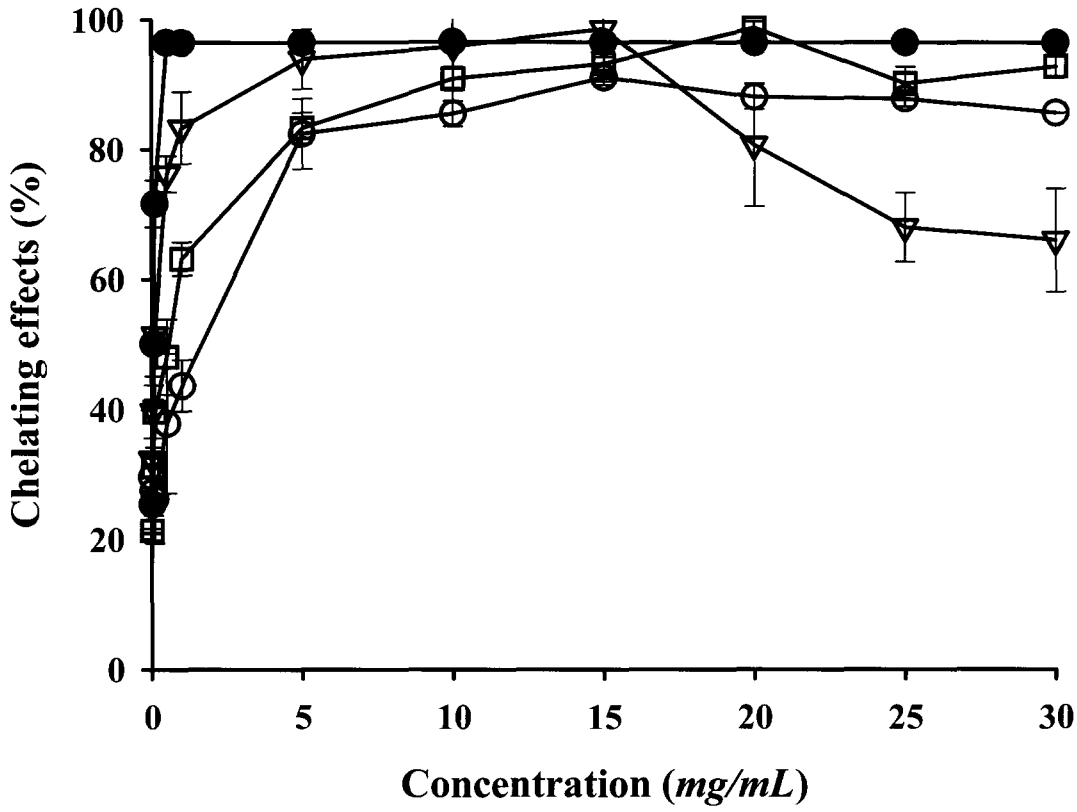


圖三：比較蠶蛹蟲草不同萃取物及 BHT 對 DPPH 自由基之清除能力

註：● ：BHT；○ ：100%乙醇；▽ ：40%乙醇；□ ：水萃
數據爲 4 重複(n=4)之平均值。

三、亞鐵離子螯合效果

金屬離子的促氧化作用經常是造成脂質過氧化的主要原因之一，藉由 redox cycyle 反應，只要少量的金屬離子便可有效的產生自由基，並加速脂質氧化的進行(Gordon, 1990)。在多種金屬離子中，Fe^{2+}經常是最具影響力的促氧化劑，它會促進脂質氧化作用的進行(Yamaguchi et al., 1988)，因此化合物對亞鐵離子的螯合力往往與其抗氧化有密切的關係。由圖四顯示，蠶蛹蟲草之水萃取物與乙醇萃取物在 5 mg/mL 就具有很好的亞鐵離子螯合力，當濃度達到最佳劑量時均與標準品 EDTA 相同。圖四亦顯示這些萃取物中以 40%乙醇萃取物最強，只是我們不清楚爲何其濃度在高於 15 mg/mL 時會有下降的趨勢。

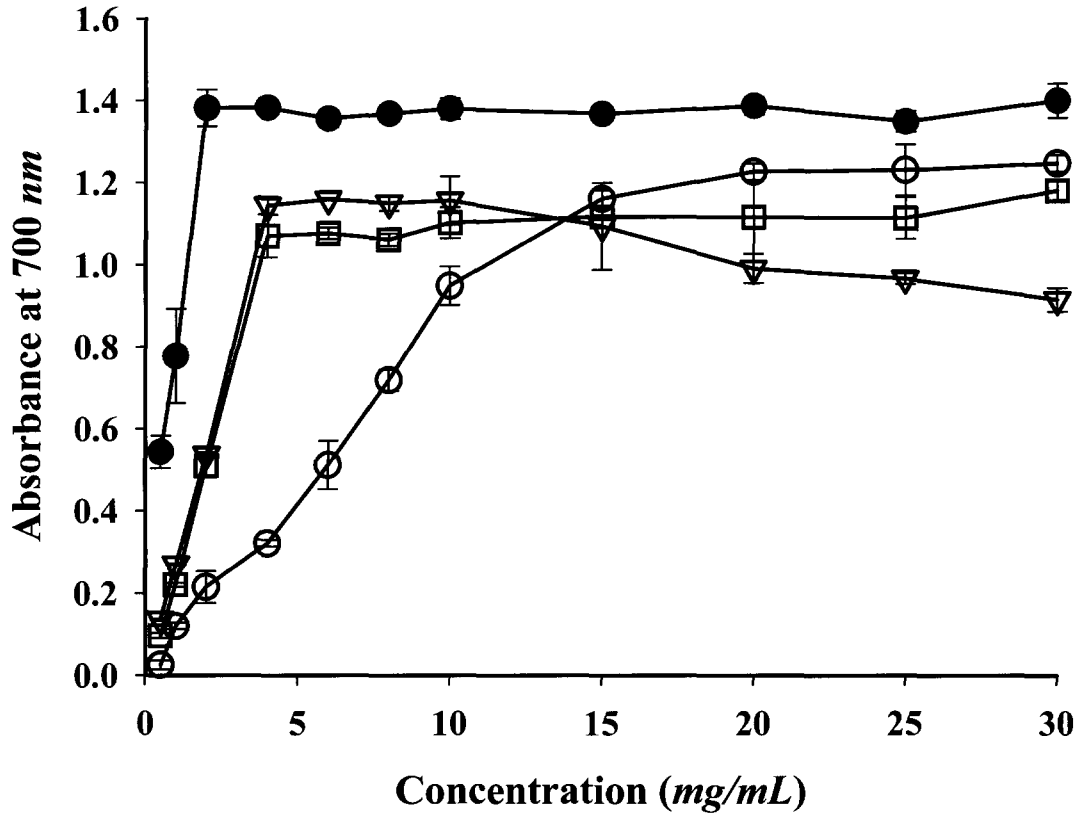


圖四：蠶蛹蟲草不同萃取物及 EDTA 對亞鐵離子之螯合效應

註：● ：EDTA；○ ：100%乙醇；▽ ：40%乙醇；□ ：水萃
數據爲 4 重複(n=4)之平均值。

四、還原力

還原力的測定是以樣品能否做爲良好電子供應者爲指標。根據圖五所示，標準品 BHT 的劑量在 2 mg/mL 以上時其還原力的表現即達高峰且呈現穩定狀態。蠶蛹蟲草之水萃取物與 40%乙醇萃取物約在 3 mg/mL 時即達最佳濃度，其中水萃取物在濃度從 3 mg/mL 到 30 mg/mL 之間並無明顯的變化，而 40%乙醇萃取物則在 15 mg/mL 以上時略有下降現象。100%乙醇萃取液約在 20 mg/mL 接近高峰，然後呈穩定狀態。以上結果顯示各種萃取物之最佳濃度雖然不同，但其還原力都不錯，與標準品 BHT 相比，在最佳濃度時其相對還原力約在 80%到 90%之間。



圖五：蠶蛹蟲草不同萃取物及 BHT 之還原力比較

註：● : BHT；○ : 100%乙醇；▽ : 40%乙醇；□ : 水萃
數據爲 4 重複(n=4)之平均值。

做爲一種保健藥材，蠶蛹蟲草在使用上通常是與肉類燉煮，或以白酒沖泡飲用，本實驗所用之萃取條件如 100℃水或 40%乙醇萃取等，基本上與實際使用情況相似。根據以上之結果，水萃取液或乙醇萃取液均具有極佳而且穩定之抗氧化或清除自由基之能力，這些有效成分是否來自蠶蛹蟲草所特有之類胡蘿蔔素，或尚包括其他化合物，值得進一步探討。

參考文獻

沈均、陶榮芬(1999)：蛹蟲草治療老年性痴呆療效觀察。**現代中西醫結合雜誌，** 8, 1958-1959。

陳惠英、顏國欽(1998)：自由基、抗氧化防禦與人體健康。*Nutritional Sciences Journal, 23*, 105-121.

莊曉莉、李祥麟、陳香蘭、黃檀溪(2003)：蠶蛹蟲草之特點與安全性。*Fun.Sci. 18,* 151-161.

葉佳聖、蘇正德(1993)：補骨脂抗氧化成分之研究。**食品科學，** 20, 574-585.

管代義、陳春華、孫璐西、孫蓮玉、張秀琴、張援平、陳順志、吳佩杰、劉毅、王永杰(1993)：北冬蟲夏草抗氧化作用的實驗研究。**中國藥學雜誌，** 28, 473-475.

劉伯康、陳惠英、顏國欽(1999)：數種傳統之食用植物甲醇萃取物抗氧化性之研究。**中國農業化學會誌，** 37, 105-116.

Ames, B. N. (1990). Endogenous DNA damage as related to cancer and aging. *Mutation Research, 214*, 41-46.

Boyer, R. F., & McCleary, C. J. (1987). Superoxide ion as a primary reductant in ascorbate-mediated ferritin iron release. *Free Radical Biology & Medicine, 3*, 389-395.

Giugliano, D., Ceriello, A., & Paolisso, G. (1995). Diabetes mellitus, hypertension, and cardiovascular disease: which role for oxidative stress. *Metabolism: Clinical and Experimental, 44*, 363-368.

Godron, M. H. (1990). The mechanism of antioxidant action in vitro. In B. J. F. Hudson (ed), *Food antioxidants* (Chaper 1. pp. 1-18). London and New York: Elsevier Applied Science.

Gutteridge, J. M. C. (1993). Free radicals in disease process: A complication of cause and consequance. *Free Radical Research Communications, 19*, 141-158.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., & Cross, C. E. (1992). Free radicals, Antioxidants, and human disease: Where are we now? *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 119*, 598-620.

Jialal, I., & Devaraj, S. (1996). Low-density lipoprotein oxidation, antioxidants, and atherosclerosis: a clinical biochemistry persperctive. *Clinical Chemistry, 42*, 498-506.

Kehrer, J. P. (1993). Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical Reviews in Toxicology, 23*, 21-48.

Kenseler, T. W., & Trush, M. A. (1984). Role of oxygen radicals in tumor promotion. *Environmental and Molecular Mutagenesis, 6*, 593-616.

Li, S. P., Li, P., Dong, T. T. X., & Tsim, K. W. (2001). Anti-oxidation activity of different types of natural *Cordyceps sinensis and cultures Cordyceps mycelia. Photomedicine, 8*, 207-222.

Osawa, T., & Namiki, M. (1981). A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of *Eucalyptus leaves. Agricultural. and Biological Chemistry, 45*, 735-739.

Oyaizu, M. (1986). Antioxidative activities of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 35*, 771-775.

Paolisso, G., Amore, A., Volpe, C., Balbi, V., & Saccomanno, F. (1994). Evidence for a relationship between oxidative stress and insulin action in non-insulin-dependent (typeII) diabetic patients. *Metabolism: Clinical and Experimental, 43*, 1426-1429.

Ramarathnam, N., Osawa, T., Ochi, H., & Kawakishi, S. (1995). The contribution of plant food antioxidants to human health. *Trends in Food Science and Technology, 6*, 75-77.

Spector, A., Wang, G. M., Wang, R. R., Li, W. C., & Kleiman, N. J. (1995). A brief photochemically induced oxidative insult causes irreversible lens damage and cataract. II. Mechanism of action. *Experimental Eye Research, 60*, 483-493.

Su, J. D. (1992). Investigation of antioxidative activity and Tocopherol contents on Chinese crude drugs of fruits or seeds. *Food Science, 19*, 12-24.

Troll, W., & Wiesner, R. (1985). The role of oxygen radicals as a possible mechanism of tumor promotion. *Annual Review of Pharmacology and toxicology, 25*, 509-528.

Yamaguchi, Y., Kagota, S., Nakamura, K., Shinozuka, K., & Kunitomo, M. (2000). Antioxidant activity of the extracts from fruiting bodies of cultured *Cordyceps sinensis. Phytotherapy Research, 14*, 647-649.

Yamaguchi, T., Takamura, H., Matoba, T., & Terao, J. (1998). HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 62*, 1201-1204.

Zainol, M. K., Abd-Hamid, A., Yusof, S., & Muse, R. (2003). Antioxidative activity and total phenolic compounds of leaf, root and petiole of four accessions of Centella asiatica (L.) Urban. *Food Chemistry, 81*, 575-581.

Zhu, J. S., Halpern, G. M., & Jones, K. (1998). The scientific rediscovery of a precious ancient Chinese Herbal regimen: Cordyceps sinensis. Part II. *Journal of Alternative Complementary Medicine*, 4, 429-457.

作者簡介

莊曉莉，台灣大學微生物與生化學研究所博士班學生
Hsiao-Li Chuang is a student in the Institute of Microbiology and Biochemistry of National Taiwan University.
e-mail: p650214@ms24.hinet.net

黃檀溪，中央研究院植物研究所研究員
Tan-Chi Huang is a Researcher in Institute of Botany, Academia Sinica.

李祥麟，蘇州應用藻類研究所研究員
Xiang-Ling Lee is a Researcher in Applied Algaelogical Institute in Suzhou.

收稿日期：92 年 09 月 18 日
修正日期：92 年 10 月 28 日
接受日期：92 年 11 月 03 日

Journal of Taiwan Normal University:
Mathematics, Science & Technology
2003, 48(1,2), 13-24

Extracts of Tsarm Yung Chung Tsao which Exhibit Remarkably Antioxidative and Free-Radical Scavenging Activities

Hsiao-Li Chuang* Xiang-Ling Lee** Tan-Chi Huang*

*Institute of Botany, Academia Sinica

**Applied Algaelogical Institute in Suzhou

Abstract

The Chinese herbal medicine "Yung Chung Tsao" is formed in nature when a species of lepidopteran pupae is infected with *Cordyceps militaris*. Since wild Yung Chung Tsao is rare and difficult to collect, we have developed a method of cultivating a similar product by inoculating the silkworm pupae with *Cordyceps militaris* LS901; we name this product "Tsarm Yung Chung Tsao." The antioxidative activities and other related properties of extracts (including hot water, a 40% alcohol solution and 100% alcohol solution) taken from the new product were investigated. Results indicated that the antioxidative action against lipid peroxidation and the scavenging action of the DPPH free radical were just as efficient and effective as when the synthetic antioxidant butylated hydroxytoluene (BHT) is used. The chelating capacity of Fe^{2+} was as good as that of the synthetic metal chelater EDTA. As for the reducing actions of the extracts of Tsarm Yung Chung Tsao and BHT as indicated by the formation of Prussian blue, extracts of optimum concentration displayed relative activity at 80% to 90% of BHT.

Keywords: antioxidative activity, chelating capacity, free radical, reducing action, Yung Chung Tsao