

# Comparison of Techniques for the Extraction of Components from *Coriolus versicolor* Fruiting Body

黃凱煜、楊博文

E-mail: 9805938@mail.dyu.edu.tw

## ABSTRACT

*Coriolus versicolor* is an obligate aerobe that is commonly found year-round on dead logs. The polysaccharides were found to be active components in it. The polysaccharides also contain some of polysaccharopeptides. The polysaccharopeptides produced by *Coriolus versicolor* are effective immune-potentiators, which are used to a supplement of chemotherapy and radiotherapy for cancers and various infectious diseases. Experiments were carried out based on the L25 and L9 orthogonal arrays of Taguchi method. Experimental factors such as extraction solvent, temperature, time and solid/solvent ratio, were used to investigate their yield of active components on the different extraction conditions. The goals of this research is to extract and analyze active components of total saccharides, adenosine, total triterpenoids from *Coriolus versicolor* fruiting body as well as to compare the amount of total saccharides, adenosine, total triterpenoids from different extraction techniques.

In comparison of different extraction techniques by water as solvent, at 100 °C, 30 minutes extraction time and the ratio of solid to liquid of 1 : 20, the yield of total saccharides by using microwave-assisted extraction (MAE) were superior to those using ultrasonic-assisted extraction (UAE) and heating reflux extraction (HRE). As water was using for solvent, at 100 °C, 30 minutes extraction time and the ratio of solid to liquid of 1 : 25, the yield of adenosine by using microwave-assisted extraction (MAE) were superior to those using heating reflux extraction (HRE) and ultrasonic-assisted extraction (UAE). As 75 % ethanol was using for solvent, at 80°C, 30 minutes by extraction time and the ratio of solid to liquid of 1 : 30, the yield of total triterpenoids by using microwave-assisted extraction (MAE) were superior to those using ultrasonic-assisted extraction (UAE) and heating reflux extraction (HRE).

Keywords : *Coriolus versicolor*、polysaccharide、polysaccharopeptide、total saccharides、adenosine、total triterpenoids、microwave-assisted extraction、ultrasonic-assisted extraction、orthogonal arrays of Taguchi method

## Table of Contents

封面內頁
簽名頁
授權書iii
中文摘要iv
英文摘要v
誌謝vii
目錄viii
圖目錄xii
表目錄xiv
附錄xvi

1.前言1
2.文獻回顧3
2.1 雲芝的簡介3
2.1.1 雲芝的分類3
2.1.2 別名3
2.1.3 分布4
2.1.4 雲芝的形態和特徵6
2.1.5 成分和藥理7
2.2 雲芝之有效成分8
2.2.1 多醣體8
2.2.2 雲芝多醣9

- 2.2.3 雲芝多醣的生理活性11
- 2.2.4 雲芝醣?14
- 2.2.5 腺?18
- 2.2.6 腺?臨床研究與生理活性20
- 2.2.7 三?類22
- 2.2.8 三?的近代藥理研究24
- 2.3 不同萃取方法之介紹28
  - 2.3.1 微波輔助萃取28
  - 2.3.2 微波輔助萃取的特點28
  - 2.3.3 微波輔助萃取應用實例29
  - 2.3.4 超音波輔助萃取原理30
  - 2.3.5 超音波輔助萃取的特點30
  - 2.3.6 熱迴流萃取原理31
- 3.材料與方法32
  - 3.1 實驗材料32
    - 3.1.1 植物來源32
    - 3.1.2 藥品清單32
    - 3.1.3 儀器清單32
  - 3.2 實驗方法33
    - 3.2.1 樣品前處理33
    - 3.2.2 不同萃取方式之條件探討34
      - 3.2.2.1 微波輔助萃取(Microwave-assisted extraction, MAE)34
      - 3.2.2.2 超音波輔助萃取(Ultrasonic-assisted extraction, UAE)36
      - 3.2.2.3 熱迴流萃取法(Heating reflux extraction, HRE)37
    - 3.2.4 成分分析38
      - 3.2.4.1 總醣分析38
      - 3.2.4.2 總醣標準品製備38
      - 3.2.4.3 粗三?分析38
      - 3.2.4.4 熊果酸標準品的製備39
      - 3.2.4.5 腺?分析39
      - 3.2.4.6 腺?標準品製備40
    - 3.2.5 統計分析40
- 4.結果與討論41
  - 4.1 微波輔助萃取雲芝子實體L25(45)分析結果41
    - 4.1.1 微波萃取總醣之L25(45)分析結果43
    - 4.1.2 微波萃取總醣較佳條件L25直交表的探討45
    - 4.1.3 微波萃取腺?-之L25(45)分析結果46
    - 4.1.4 微波萃取腺?較佳條件L25直交表的探討46
    - 4.1.5 微波萃取總三?-之L25(45)分析結果48
    - 4.1.6 微波萃取三?較佳條件L25直交表的探討49
    - 4.1.7 直交試驗法L25(45)試驗結果探討50
    - 4.1.8 總三?分析方法的修定50
  - 4.2 微波輔助萃取雲芝子實體L9(33)表分析結果51
    - 4.2.1 微波萃取總醣L9(33)直交試驗結果51
    - 4.2.2 微波萃取總醣L9(33)直交表較佳條件的探討54
    - 4.2.3 微波萃取腺?L9(33)直交試驗結果57
    - 4.2.4 微波萃取腺?L9(33)直交表較佳條件的探討60
    - 4.2.5 微波萃取總三?L9(33)直交試驗結果62
    - 4.2.6 微波萃取總三?L9(33)直交表較佳條件的探討65
  - 4.3 超音波輔助萃取雲芝子實體之分析結果68
    - 4.3.1 探討超音波萃取雲芝子實體-萃取時間對總醣產量之影響68
    - 4.3.2 探討超音波萃取雲芝子實體-萃取時間對腺?產量之影響72
    - 4.3.3 探討超音波萃取雲芝子實體-萃取時間對總三?產量之影響75

4.4 熱迴流萃取雲芝子實體之分析結果	79
4.4.1 探討熱迴流萃取雲芝子實體-萃取時間對總醣產量之影響	79
4.4.2 探討熱迴流萃取雲芝子實體-萃取時間對腺?產量之影響	83
4.4.3 探討熱迴流萃取雲芝子實體-萃取時間對總醣產量之影響	86
4.4.4 微波、超音波、熱迴流在不同萃取時間上之總醣、腺?、粗三?產量差異性的比較	90
5. 結論	92
參考文獻	94

## 圖目錄

圖2.1 雲芝葶體(子實體)	5
圖2.2 雲芝多醣的分子結構	8
圖2.3 具有抗腫瘤活性之多醣體結構	10
圖2.4 雲芝醣?的回收與純化方式	17
圖2.5 腺?的化學結構	18
圖2.6 三磷酸腺?的代謝降解	19
圖2.7 腺?降解結構流程圖	19
圖2.8 腺?往返細胞內與細胞外的路徑	20
圖2.9 自然界中常見的10種三?類化合物	23
圖2.10 羊毛脂烷型三?-之結構	24
圖4.1 微波萃取總醣L25(45)的S/N比主要效應試算圖	45
圖4.2 微波萃取腺?L25(45)的S/N比主要效應試算圖	47
圖4.3 微波萃取總三?L25(45)的S/N比主要效應試算圖	49
圖4.4 微波萃取總醣L9(33)的S/N比主要效應試算圖	53
圖4.5 以微波最適萃取條件進行對雲芝子實體連續萃取十次總醣	56
圖4.6 微波萃取腺?L9(33)的S/N比主要效應試算圖	59
圖4.7 以微波最適萃取條件進行對雲芝子實體連續萃取五次腺?	61
圖4.8 微波萃取總三?L9(33)的S/N比主要效應試算圖	64
圖4.9 以微波最適萃取條件進行對雲芝子實體連續萃取十次腺?	67
圖4.10 超音波輔助萃取雲芝子實體-時間對總醣產量的影響	68
圖4.11 以超音波最適萃取條件進行對雲芝子實體連續十次萃取總醣之依序產量	71
圖4.12 超音波輔助萃取雲芝子實體-時間對腺?產量的影響	72
圖4.13 以超音波最適萃取條件進行對雲芝子實體連續十次萃取腺?-之依序產量	74
圖4.14 超音波輔助萃取雲芝子實體-時間對總三?產量的影響	75
圖4.15 以超音波最適萃取條件進行對雲芝子實體連續十次萃取總三?-之依序產量	78
圖4.16 熱迴流萃取雲芝子實體-時間對總醣產量之影響	79
圖4.17 熱迴流最適萃取條件進行對雲芝子實體連續十次萃取總醣之依序產量	82
圖4.18 熱迴流萃取雲芝子實體-時間對腺?產量之影響	83
圖4.19 熱迴流最適萃取條件進行對雲芝子實體連續五次萃取腺?-之依序產量	85
圖4.20 熱迴流萃取雲芝子實體-時間對總三?產量之影響	86
圖4.21 熱迴流最適萃取條件進行對雲芝子實體連續十次萃取總三?-之依序產量	89

## 表目錄

表2.1 PSK和PSP兩種多醣?的回收來源差異性	16
表4.1 微波輔助萃取雲芝子實體L25(45)直交表	41
表4.2 微波輔助萃取雲芝子實體L25(45)直交實驗設計表及實驗數據	42
表4.3 微波萃取總醣L25(45)直交表的訊號雜訊(S/N)比值	44
表4.4 微波萃取腺?L25(45)直交表的訊號雜訊(S/N)比值	46
表4.5 微波萃取總三?L25(45)直交表的訊號雜訊(S/N)比值	48
表4.6 微波輔助萃取雲芝子實體中總醣L9(33)直交表	51
表4.7 微波輔助萃取雲芝子實體總醣L9(33)直交實驗設計表及實驗數據	52
表4.8 微波萃取總醣L9(33)直交表的訊號與雜訊(S/N)比值	53

- 表4.9 以微波萃取雲芝子實體中總醣之效率55
- 表4.10 微波輔助萃取雲芝子實體中腺?L9(33)直交表57
- 表4.11 微波輔助萃取雲芝子實體腺?L9(33)直交實驗設計表及實驗數據58
- 表4.12 微波萃取腺?L9(33)直交表的訊號與雜訊(S/N)比值59
- 表4.13 微波輔助萃取雲芝子實體中的總三?L9(33)直交表62
- 表4.14 微波輔助萃取雲芝子實體總三?L9(33)直交實驗設計表及實驗數據63
- 表4.15 微波萃取總三?L9(33)直交表的訊號與雜訊(S/N)比值64
- 表4.16 以微波萃取雲芝子實體中總三?-之效率66
- 表4.17 以超音波萃取雲芝子實體中總醣之效率70
- 表4.18 以超音波萃取雲芝子實體中總三?-之效率77
- 表4.19 以熱迴流萃取雲芝子實體中總醣之效率81
- 表4.20 以熱迴流萃取雲芝子實體中總三?-之效率88
- 表4.21 萃取時間、溶劑、溫度、固液比對不同萃取技術之總醣、腺?及總三?-產量比較91

## 附錄

附錄1 腺?標準品和雲芝萃取物HPLC層析圖100

附錄2 總醣和腺?的標準曲線圖101

附錄3 總三?(熊果酸)的標準曲線圖102

## REFERENCES

- 1.元英進, 劉明言, 董岸杰。2002。中藥現代化生產關鍵技術。第114-117頁。化學工業出版社。北京。中國。2.文詩雅。2008。菇蕈多醣體之細胞免疫提升作用之研究。臺灣大學生命科學院漁業科學研究所碩士論文。3.尤蓉、余曉斌。2005。雲芝胞內多醣CVP-II得分離與粗步鑑定。華南師範大學學報(自然科版)1:82-85。4.王伯徹、陳啟楨。1994。常見食藥用菇介紹。第33-34頁。食品工業發展研究所。新竹。台灣。5.牛曉暉、紀風蘭、張傳。2006。雲芝多糖對小鼠細胞因子的影響。中國免疫學雜誌(22):1124-1127。6.白冰、劉?華、王勇、李明靜。2008。懷山藥化學成分研究(II)。化學研究19(3):67-69。7.江紹琳、江紹玫、曾令聰。2006。酚光光度法快速測定靈芝中總三?-含量。江西農業大學學報28(4):634-636。8.?元芳、騰曉妹、劉宗英。1993。雲芝多糖對艾氏腹水癌影響的研究。中西醫結合雜誌6(1):37。9.李平作、徐柔、夏結紅、章克昌。2000。靈芝深層發酵生產四環三?酸的研究。工業微生物30(1): 15-17。10.李宛蓁。2003。樟芝菌絲體培養與生理活性成分生成之研究。私立東海大學化學工程研究所碩士論文。11.李思樺。2000。松杉靈芝 -葡聚醣純化及特性。大葉大學食品工程學研究所碩士論文。12.肖培根。2006。新編中藥志第五版。第61-63頁。北京化學工業出版社。北京。中國。13.周文能、張東柱。2005。野菇圖鑑Mushrooms of Taiwan。第269頁。遠流出版事業。台北。台灣。14.周海華、馬海樂。2008。雲芝多糖得體外抗氧化活性研究。食品研究與開發29(3)44-48。15.林政妤。2007。三?類化合物調節脂肪細胞糖類吸收之研究。國防醫學院生物化學研究所碩士論文。16.邱年永, 張光雄。1992。原色台灣藥用植物圖鑑(3)。第12頁。台北南天書局。台北。台灣。17.?偉棋。2008。不同萃取方法對段木及發酵培養牛樟芝活性成份產量分析之研究。大葉大學生物產業科技學系碩士論文。18.南鳳仙、邵傳。2005。雲芝多醣對小鼠抗衰老作用的研究。寧夏大學學報(自然科學版)26(3):264-267。19.姚中磊、孟慶平、汪以真。2008。雲芝多醣的生物學功能及應用前景。浙江大學飼料科學研究所。飼料研究FEED RESEARCH 7:20-22。20.胡月娟、周弘、方軍。1998。雲芝糖?(PSP)的初步藥理。中成藥10(11):29。21.胡月娟、金若敏。1990。雲芝糖?的抗潰瘍作用。中成藥12(11):22。22.孫設宗、盧娟、官守濤、趙杰、張紅梅。2008。雲芝多糖對實驗性肝損傷抗氧化?、自由基及一氧化氮含量的影響。湖北隕陽醫學院。時珍國醫國藥19(6):1439-1440。23.徐惠波、牛曉暉、紀風蘭。2006。雲芝多醣對小鼠NK細胞與單核吞噬細胞系統的影響。中藥藥理與臨床22(5):25-26。24.晏愛立、季生發。1998。雲芝多糖對乳腺癌術後化療病人免疫功能影響。蘇州醫學院學報18(1):14-15。25.祝絢、鮑依稀、李進、劉靖、王宏萍。2008。雲芝糖?、丹參酮IIA對荷瘤小鼠的抗腫瘤及免疫調節作用。中國免疫學雜誌24(6):526-529。26.婁寧、陳瑗。1995。雲芝多醣對實驗性動脈粥狀硬化家兔脂質過氧化損傷的保護作用。第一軍醫大學學報15(2):111。27.婁佳寧、周曾同。2008。雲芝糖?對金地鼠夾囊白斑癌變過程中端粒?活性化學預防作用研究。臨床口腔醫學雜誌24(6):372-375。28.婁寧、周玫、陳瑗。1996。雲芝多醣對小鼠心肝腎皮和紅細胞抗氧化能力之影響。中國藥理學通訊12(5):425-426。29.張宏、徐惠波、丁濤、溫富春、張殿文、孫曉波。2008。雲芝多醣的藥理研究。長春中醫藥大學學報24(1):24-25。30.張雁冰、王克讓、劉宏民。2006。馬桑葉中總三?酸的含量測定。時珍國醫國藥17(4):529-530。31.梁英嬌、楚桐麗、丁平。2007。赤芝中三?類成分及其藥理作用研究進展。中藥新藥與臨床藥理18(2):168-172。32.陳永佳。2008。腺?與厚朴酚刺激大鼠腎上腺皮質細胞分泌皮質酮機制之探討。臺灣大學醫學院解剖學暨生物細胞學研究所博士論文。33.陳志輝、?萍、薛璟花、魏孝義。2005。兩株多孔菌屬擔子菌菌絲體中的三?成分。熱帶亞熱帶植物學報13(5):399-402。34.陳海生、譚建權。1996。野生雲芝兩種多醣的基本構造測定。第二軍醫大學學報17(1):83。35.萊梭(Thomas Laessoe)。2006。世界菇類圖鑑。貓頭鷹出版。謝文全。2002。台灣常見藥用植物圖鑑第一冊第15頁。行政院衛生署中醫藥委員會。36.黃書銘、楊新林、王幫武、朱鶴孫、徐建蘭。2004。靈芝醇溶酸性組分的抗腫瘤作用。天然產物研究與開發16(2):146-148。37.謝振傳、但德忠、趙燕、周娜。2005。超聲波輔助萃取技術在樣品預處理中的應用。四川大學環境科學與工程系。化學通報68:1-11。38.藤井喜一郎、伊藤均、成瀨千助。1974。?子菌類?抗潰瘍作用?????子

菌??????生??多糖体?抗腫瘍作用。日藥理誌 70:571-577。39.譚建權、楚正緒。1995。彩雲多醣對大鼠的毒性研究。中成藥17(8):46。40.Aiko, M., Katsuaki, K., Yoshinori, F. and Nobuo, I. 1986. Angiotensin Converting Enzyme-Inhibitory triterpenes from *Ganoderma lucidum*. Chemical & Pharmaceutical bulletin 34(7):3025-3028.41.Chu, K. K., Ho, S. S. and Chow, A. H. 2002. *Coriolus versicolor*: a medicinal mushroom with promising immunotherapeutic values. J. Clin Pharmacol 97(6):976-984.42.Jian, C. and Yusuf, C. 2003. Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: physiological activity, uses, and production. Biotechnology Advances 21:109-122.43.John, C. S. and Luiz, B. 1997. Adenosine and Adenosine Receptors in the Cardiovascular System: Biochemistry, Physiology and Pharmacology. The American Journal of Cardiology 79(12A): 2-10.44.Kazuho, A. and Hirosh, S. 1998. Adenosine Stimulates Stellation of Cultured rat cortical astrocytes. Brain Research 804:63-71.45.Kenji Iwatsuki, Toshihiro Akihisa, Harukuni Tokuda, Motohiko Ukiya, Manabu Oshikubo, Yumiko Kimura, Takeshi Asano, Atsushi Nomura, and Hoyoku Nishino.2003. Lucidenic Acids P and Q, Methyl Lucidenate P, and Other Triterpenoids from the Fungus *Ganoderma lucidum* and Their Inhibitory Effects on Epstein-Barr Virus Activation. Journal of Natural Products 66(12):1582-1585.46.Li, Y. Q., Wang S. F. .2006. Anti-hepatitis B activities of Ganoderic acid from *Ganoderma lucidum*.Biotechnology Letter 28(11):837-841.47.Lin, C.N., Tome W. P., Won, S. J.1991.Novel cytotoxic principles of Formosan *Ganoderma lucidum*. Journal of Natural Products 54(4):998-1002.48.Liu, J., Liu, Y., Mao, Q. and Curtis, D. K. 1994. Effects of 10 Triterpenoid Compounds on Experimental Liver Injury in Mice. Fundamental and Applied Toxicology 22:34-40.49.Ma, L. J., Yao, R. H. 1998. Application of *Ganoderma* in Pharmaceutical and Food. Food and Fermentation Industries 24(1):62-66.50.Min, B.S., Gao, J. J., Hattori, M., Lee, H. K. and Kim Y. H. 2001. Anticomplement activity of terpenoids from the spores of *Ganoderma lucidum*. Planta Medica 67 (9) :811-814。51.Punithavathi, D., Venkatesan, N., Babu, M..2003. Protective effects of curcumin against amino darone-induced plumonary. British Journal of Pharmacology 19(9):1342-1350.52.Robert D. L., Robert M. M., 1995. Protective Effects of Adenosine in the Reversibly Injured Heart. Ann Thorac Surg 60:843-846.53.Tarja, P. H., Lauri, A., Anna, K. and Dag, S. 2002. Adenosine and Sleep. Sleep Medicine Review 6(4):321-332.54.Toth, J. O., Luu, B. and Guy, O. 1983. Les acides ganoderiques Ta Z: triterpenes cytotoxiques de *Ganoderma lucidum* (Polyporace). Tetrahedron Lett 24(10): 1081.55.Tsang, K. W., Lam, C. L., Yan, C., Mak, J. C., Ooi, G. C., Ho, J. C., Lam, B., Man, R., Sham, J. S. and Lam, W. K. 2003.*Coriolus versicolor* polysaccharide peptide slows progression of advanced non-small cell lung cancer. [J]. Respiratory medicine 97(6):618-624.56.Xiao, F. X., Jin H. Z., Li, M. W., Liang H. F. and Jing, Z. 2009. HPLC determination of adenosine in royal jelly. Food Chemistry 115:715-719.57.Yang, M. M., Chen, Z., Kwok, J. S. 1992. The anti-tumor effect of a small polypeptide from *Coriolus versicolor* (SPCV). The American Journal of Chinese Medicine 20(3-4): 221-32.58.Yoshiyuki, M., Naoko, T., Linda, H., Hiroyuki, K., Yasuaki, E., Jun, U., Fumio, S., and Kengo, S. 2003. Lucidenic Acid O and Lactone, New Terpene Inhibitors of Eukaryotic DNA Polymerases from a Basidiomycete, *Ganoderma lucidum*. Bioorganic & Medicinal Chemistry 7 (9)2047-2052.59.Zhu, M., Chang, Q., Wong, L. K., Chong, F. S., Li, R. C. 1999. Triterpene Antioxidants from *Ganoderma lucidum*. Phytotherapy Research 13:529-531.