

以模擬移動床(SMB)連續純化北冬蟲夏草之蟲草素(cordycepin)技術可行性研究

龔信傑^a、梁克源^b、黃柏文^c、張簡國平^{b,d*}

^a 正修科技大學觀光遊憩系

^b 正修科技大學超微量研究科技中心

^c 正修科技大學機械工程系

^d 正修科技大學環境毒物與新興污染物研究所

*通訊作者 E-mail: guoping@gcloud.csu.edu.tw, Tel: +886-7735-8800

摘要

本研究是利用模擬移動床連續分離純化蟲草素(cordycepin) 達純度 60%~90%。研究中使用的模擬移動床具備 6 支 ID10 × L250 mm 的 C18 層析管柱，並基於三角理論預測模擬移動床的操作條件。結果顯示，當模擬移動床進出口流速設定為移動相(Desorbent) 6.0 mL/min；進料(Feed) 0.6 mL/min；萃出液(Extract) 2.5 mL/min；萃餘液(Raffinate) 4.1 mL/min，切換時間為 3 分 10 秒時，可獲得最佳純化條件，純度可由萃取物中的 4.06% 提高到 65.67%。蟲草素具有抗發炎、抗腫瘤及抗衰老等功效。因此在生技、醫藥及美妝產品的應用上，預期能有很大的發展潛力。根據食品藥物管理署公告，北蟲草萃取物每日使用量以蟲草素計算，不得超過 3.6 毫克，但若服用量太少則無顯著效果。因此，若是能將蟲草素提純，就能輕易控制使用劑量。模擬移動床是一種連續式的層析裝置，能提高蟲草素的純度，去除多餘雜質。如能取得較高純度蟲草素的原料能夠幫助生產者將成本降低及進行產品成分開發。此設備可解決傳統純化設備僅能批次式進行及消耗許多溶劑和耗材的問題。所使用之溶劑不像傳統方法使用大量有機溶劑，而是容易取得的水與乙醇，對環境不會額外產生污染。另外模擬移動床使用電腦控制並且能夠 24 小時連續運轉，可大幅度的降低人力成本。未來亦能運用在其他天然物的純化應用。

關鍵詞：冬蟲夏草、北冬蟲夏草、蟲草素、純化、模擬移動床



The study of purification the cordycepin from the *Cordyceps militaris* by using the Simulated moving bed(SMB) system

Hsin-Chieh Kung¹, Ko-Yuan Liang², Bo-Wun Huang³,
Guo-Ping Chang-Chien^{2,4*}

¹ Department of Tourism and Recreation, Cheng Shiu University

² Super Micro Mass Research and Technology Center, Cheng Shiu University

³ Department of Mechanical Engineering, Cheng Shiu University

⁴ Institute of Environmental Toxin and Emerging-Contaminant, Cheng Shiu University

*Corresponding author. E-mail: guoping@gcloud.csu.edu.tw, Tel: +886-7735-8800

Abstract

In this study, a simulated moving bed was used to continuously separate and purify cordycepin to a purity of 60% to 90%. The simulated moving bed used in the study is equipped with 6 chromatography columns (C18, ID10 × L250 mm), and the operating conditions of the simulated moving bed are predicted based on the triangle theory. The results show that when the inlet and outlet flow rate of the simulated moving bed is set to the Desorbent 6.0 mL/min; Feed 0.6 mL/min; Extract 2.5 mL/min; Raffinate 4.1 mL/min, when the switching time is 3 minutes and 10 seconds, the best purification conditions can be obtained, and the purity can be increased from 4.06% in the extract to 65.67%. Cordycepin effects is anti-inflammatory, anti-tumor and anti-aging et al. Therefore, the application of biotechnology, medicine and beauty products, it is expected to have great development potential. According to the Food and Drug Administration's announcement, the daily usage of *Cordyceps militaris* extract is calculated based on cordycepin, which should not exceed 3.6 mg, but if the amount is too small, it will not have a significant effect. Therefore, if the cordycepin can be purified, the dosage can be easily controlled. Simulated moving bed is a continuous chromatography device that can improve the purity of cordycepin and remove excess impurities. The raw materials with higher purity cordycepin can help producers reduce costs and develop product ingredients. This equipment can solve the problem that traditional purification equipment can only perform in batches and consumes many solvents and consumables. The solvent used is water and ethanol that are easily available different from the traditional method using a large amount of organic solvents which will not cause additional pollution to the environment. In addition, the simulated moving bed is controlled by a computer and can run continuously for 24 hours, which can greatly reduce labor costs. It can also be used in the purification of other natural materials in the future.

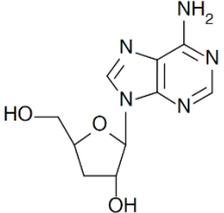
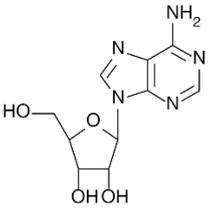
Keywords : *Caulerpa racemose*, *Caulerpa lentillifera*, caulerpin, marine drugs simulated moving bed



一、緒論

蟲草素 (Cordycepin) 的化學結構如表 1 所示，是野生冬蟲夏草和北冬蟲夏草中，所含有的特有活性物質，具有抗腫瘤、提升白細胞數量等功效。蟲草素藥物可用於治療白血病，目前已被美國 FDA 批准，進入三期臨床實驗[1,2]。蟲草素發現於 1951 年，是德國 Cunningham 等人，由北冬蟲夏草（蛹蟲草）培養液中分離出，屬於核苷類抗生素，為一種生物鹼[3-4]，自此醫界與學界，開始對蟲草素各項藥理作用的研究與開發，包括萃取製備、生物活性、藥用價值、功能作用、作用機理以及利用開發。在 70 年代時，蟲草素就已發現具有抑制腫瘤、抗瘧原蟲和抑制 mRNA 翻譯的作用[5-6]。在抗腫瘤方面，研究顯示蟲草素對乳腺癌[7]、肺癌[8]、乳腺癌[9]、口腔癌、肝癌[2,10]等，具有顯著的抑制作用。其他如免疫調節、抗病毒、抗菌、抗真菌、抗炎、抗衰老、改善記憶、降血脂血糖、抗血栓等，均有文獻顯示其相關的藥理活性[2,11-12]。近年更進一步確認出蟲草素對於 DNA 以及 RNA 的合成抑制作用的機轉，主要蟲草素(3'脫氧腺苷)為近似於腺嘌呤化合物，當 DNA 及 RNA 合成時，會被使用於新的合成序列上，當下次合成時，碰到錯誤的遺傳密碼，就會使得複製停止，進而使細胞發生凋亡，無法產生新細胞。由於人體的正常細胞，因為有 DNA 修復機制，可以去除錯誤的遺傳密碼，對正常細胞不會發生影響，但大多數腫瘤細胞、病毒(包括 HIV)、及細菌，缺乏這類機制，就會發生細胞凋亡[6]。因此很適合做為抗菌、抗病毒或抗腫瘤的新藥開發。

表 1 蟲草素(Cordycepin)及腺苷(Adenosine)化學結構

蟲草素—Cordycepin	腺苷—Adenosine
	

二、文獻探討

2.1 北冬蟲夏草與蟲草素

北冬蟲夏草 (*Cordyceps militaris*) 又稱北蟲草、蛹蟲草、東北蟲草，主要寄生於鱗翅目和鞘翅目等昆虫蛹體上的真菌，與冬蟲夏草 (*Cordyceps sinensis*) 為同屬異種的近緣種[13]。兩者的營養成分及藥用功能相似，但研究陸巍傑等人發現北冬蟲夏草的蟲草素含量，遠高於野生冬蟲夏草，如表2[14]。相較於冬蟲夏草，北冬蟲夏草更容易以人工培育，因此近年皆以人工栽培之北冬蟲夏草，作為藥用保健或是取得蟲草素來源的標的[15]。

蟲草素在促使腫瘤細胞凋亡的方式，主要在其核糖部分的3'位置沒有氧，因此DNA及RNA合成時，遺傳密碼鏈將因摻入蟲草素導致延長終止，當DNA及RNA複製停止時，就會導致細胞凋亡，達到殺死腫瘤細胞的目的。此外，在蟲草素治療人類白血病機制，被韓國同惠大學的Jin-Woo Jeong所發表出來，研究顯示蟲草素促使了活性氧產生，使得細胞色素c由粒腺體釋放到細胞質，進一步活化胱天蛋白酶級聯反應，最後導致細胞死亡[16]。K. Nakamura等人以細胞實驗發現，蟲草素對B16-BL6小鼠黑素瘤 (IC₅₀ = 39 μM)，和小鼠Lewis肺癌 (IC₅₀ = 48 μM) 的生長曲線顯



示出顯著的抑制作用[8]。Hogyong Kim等人，研究發現蟲草素可有效抑制PARP阻斷與肺損傷相關的炎症，並可以抑制PARP-1對BRCA1缺乏性乳腺癌細胞的殺傷[9]。Ying Xiong MD. 等人研究了免疫抑制的效果蟲草素對T細胞活化的體外和體內及其相關機制。發現蟲草素顯著抑制了ConA誘導的脾細胞增殖，Th1和Th2細胞因子的產生以及CD4⁺和CD8⁺T淋巴細胞的數量，並刺激NF- κ B和NFAT信號轉導途徑[17]。在國內相關研究方面，大仁科技大學黃郁婷利用老鼠游泳耐力試驗（Endurance Exercise）作為模式，結果顯示，老鼠攝食北蟲草產品可以提高抗疲勞情形並對持久性之運動具有改善生理功能之作用[18]。大葉大學潘孟均證實北蟲草醇類萃取物，具有抑制組織胺能力[19]。虎尾科技大學蔡博宇證實將北蟲草菌株以黃豆粉100%當氮來源時，菌孢子實體之萃取物具有抗氧化特性[20]。國立臺灣海洋大學何思妍證實，人工栽培之北蟲草具有良好的抗腫瘤能力[21]。另外在病毒的抑制相關研究，蟲草素對新城疫病毒[22]、西方馬腦炎病毒[23]、Semliki 森林病毒[24]、漢他病毒[25]等均具有顯著的抑制作用。由於蟲草素在臨床研究顯示具有抗病毒活性，在2020年時，Akalesh Kumar Verma及Rohit Aggarwal以蟲草素抗SARS-CoV-2活性，治療48小時後，可使病毒複製抑制率達為65%（E基因）和42%（N基因）。因此證實了蟲草素對COVID-19治療的潛力[26]。

表 2 北冬蟲夏草和真菌中腺苷和蟲草素的測定結果[14]

樣品	部位	腺苷%	蟲草素%
北冬蟲夏草 (批號 20100511)	全	0.069	1.307
北冬蟲夏草 (批號 20091218)	全	0.070	1.225
北冬蟲夏草 (批號 20100407)	全	0.062	1.528
野生北冬蟲夏草	全	0.075	0.124
野生冬蟲夏草	子座	0.069	0.019
	幼蟲	0.023	0.009
姬松茸	傘	0.096	
	柄	0.086	
美味牛肝菌	傘	0.094	
	柄	0.046	
灰樹花	傘	0.034	
	柄	0.022	
猴頭菇	傘	0.044	
	柄	0.019	
羊肚菌	全	0.13	



2.2 模擬移動床分離純化

由於目前現階段蟲草素的純化除結晶法外，大多數以大孔樹脂提純[27]、高速逆流層析法等，需要使用大量的溶劑、甚至毒性較高的有機溶劑，而結晶法往往需要粗萃物先以其他的方式，提高蟲草素的濃度，才適合進行。因此本研究採用模擬移動床，期望能以毒性低的乙醇水溶液作為移動相分離純化蟲草素，達到連續式生產的綠色製程。

模擬移動床(simulated moving bed, SMB)是一種利用層析來分離物質的裝置，該裝置具備多管柱，而固定相的流動，係透過改變進料及出料的位置，達成模擬真實移動床的目的。模擬移動床的原理，如圖 1 顯示，是一個具備移動相(Desorbent)向右流動，而固定相(Solid)向左流動的裝置，當注入含有 A B 兩種成分的進料(Feed)時，滯留性強的 A 將會被固體吸附劑往左帶，而滯留性弱的 B 將會隨流動相往右移動，藉此方式，將 A B 兩種成分分開，分別由萃取端(Extract)及萃餘端(Raffinate)流出。相較於批次式的層析製程，模擬移動床是連續式的製程，因此分離效率高，可獲得產物濃度高，溶劑使用較少。但要達到連續式的分離純化，製程設計較為複雜，因此需用數學模型，計算出可能的操作條件，再進行實驗。模擬移動床的數學模型主要分為 SMB 模型及 TMB 模型。SMB 模型是以動態的方式描述模擬移動床的分離過程，TMB 模型則是把模擬移動床假設為如同 TMB (真實移動床)固定相與移動相流動的操作，簡化了模型計算。雖然這兩種計算模型計算結果有細微的差別，但 TMB 模型也能很好的預測模擬移動床分離純化條件[28]。

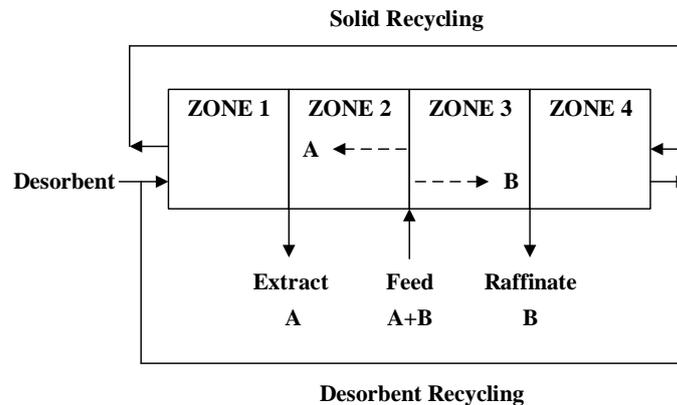


圖 1 模擬移動床分離純化雙成分物質示意圖

三角形理論是 TMB 數學模型中重要的一個理論，可用於模擬移動床中，各分區流速設定以及管柱切換時間的估算。三角理論的數學模型，則需要管柱中固定相孔隙度(void fraction, ϵ)以及物質 A 及 B 在固定相中等溫吸附亨利常數(Henry constants) K_A 及 K_B ，假設 Q 為各區塊移動相流速， t 為切換時間， V 為固定相體積，則可以獲得關係式(1) [28-39]:

$$\epsilon = \frac{t_0 Q}{V}; K_i = \frac{t_i^R - t_0}{t_0} \frac{\epsilon}{(1-\epsilon)} \quad (i = A, B) \quad (1)$$

在三角理論中各區的定義如式(2)，且 K_A 及 K_B 必須滿足式(3) [35-39]:

$$m_j = \frac{Q_j^{SMB} t^* - V \epsilon}{V(1-\epsilon)} \quad (j = 1, \dots, 4) \quad (2)$$



$$\begin{cases} K_A \leq m_1 \\ K_B \leq m_2 \leq K_A \\ K_B \leq m_3 \leq K_A \\ m_4 \leq K_B \end{cases} \quad (3)$$

若達上述關係式條件，可根據圖 2 三角理論圖，擬合並推估出閥件切換時間、移動相流速及 Feed 流速等分離純化操作條件。

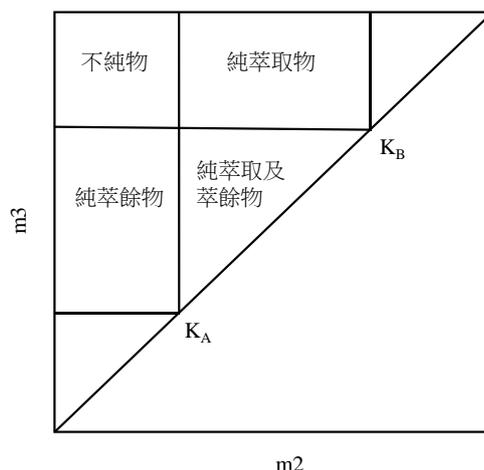


圖 2 三角理論可操作條件範圍

三、研究目的與方法

3.1 研究目的

本研究目的是使用模擬移動床分離純化北冬蟲夏草之萃取物中蟲草素。並利用三角理論擬合出模擬移動床的操作條件，使蟲草素純度達 60-90%。

北冬蟲夏草萃取物的來源，係將乾燥的北冬蟲夏草粉碎再放入超音波萃取槽中，以 95% 乙醇於 75°C 萃取後，濃縮所獲得。由於萃取物中除了含有蟲草素外，還有許多其他雜質，因此研究中以模擬移動床，將蟲草素提純，但模擬移動床為連續式分離純化製程，操作參數的設定相對複雜，因此需借助三角理論的計算，擬合出可操作的條件範圍，再經實驗確認出最佳的操作參數。

3.2 蟲草素研究流程

模擬移動床連續純化蟲草素的研究流程如圖 3 所示，其流程分述如下：

1. 將乾燥的北冬蟲夏草置於粉碎機，進行粉碎。
2. 將粉碎後的北冬蟲夏草，加入 95% 乙醇，使乙醇液體高於北冬蟲夏草的粉碎物，以 75°C 震盪 4 小時。
3. 以 6 μ m 濾紙過濾殘渣，獲得北冬蟲夏草乙醇粗萃液。
4. 將北冬蟲夏草乙醇粗萃液，置入旋轉蒸發儀進行減壓濃縮，以去除乙醇及水分，真空度為 640mmHg，溫度由最初 45°C 去除大部分乙醇後，再逐步調整至 75°C 以去除水分。
5. 將減壓濃縮完成後的北冬蟲夏草粗萃物，取 0.5g 加入 95% 乙醇 5mL，經離心過濾後，注入 HPLC 分析，並比較標準品，確認蟲草素的波峰。



6. 將蟲草素標準品，以不同濃度，注入 HPLC，製作檢量線，以利後續模擬移動床產出物分析蟲草素濃度。
7. 將北冬蟲夏草萃取物溶解在甲醇水溶液，過濾後，注入連接模擬移動床管柱之 HPLC 進行分析，得到蟲草素濃度及層析圖譜，確認蟲草素在模擬移動床管柱的滯留時間，計算亨利常數 K_A 及 K_B 。
8. 以 1000 mg/L 之硝酸鈉水溶液，作為連接模擬移動床管柱之 HPLC 樣品，並以不同移動相流速 0.5、1、1.5、2、3、5 及 7 mL/min，獲得不同滯留時間，並計算管柱之孔隙度 ϵ 。
9. 以步驟 7 及 8 所獲得之孔隙度及亨利常數，代入三角理論進行數值擬合，推估出模擬移動床管柱切換時間及各出入口流量。
10. 根據步驟 9 所求得之數值，將步驟 1 所配製之北冬蟲夏草粗萃物溶液泵入模擬移動床試做。
11. 將步驟 10 模擬移動床試做所收集到萃取端(Extract)及萃於端(Raffinate)之分離溶液進行 HPLC 分析。

表 3 蟲草素 HPLC 梯度分析條件

Time(min)	Flow rate mL/min	Ratio	
		A%	B%
0	1	15	85
15	1	15	85
16	0.75	85	15
19	0.75	85	15
20	1	15	85
25	1	15	85

A: Methanol; B: 0.02M KH_2PO_4
 Column: Phenomenex Luna C18, 5 μm ,
 4.6mm \times 25cm
 Wavelength: 254nm

3.3 蟲草素分析

實驗進行時，北冬蟲夏草粗萃物及模擬移動床分離純化的收集液，需以 HPLC 檢測蟲草素濃度才能進一步確認分析物是否達到純化的目標，HPLC 的分析條件如表 3 所示。HPLC 使用的管柱為 Phenomenex Luna C18 (5 μm , 4.6mm \times 25cm)，移動相為甲醇及磷酸二氫鉀水溶液，當層析進行時，移動相先以 15%的甲醇進行沖提 15 分鐘，使蟲草素等極性較高的成分脫附，再以 85%甲醇沖提 3 分鐘，使低極性成分由管柱中脫附出來，防止管柱發生阻塞，之後回復原本 15%甲醇，使管柱平衡。



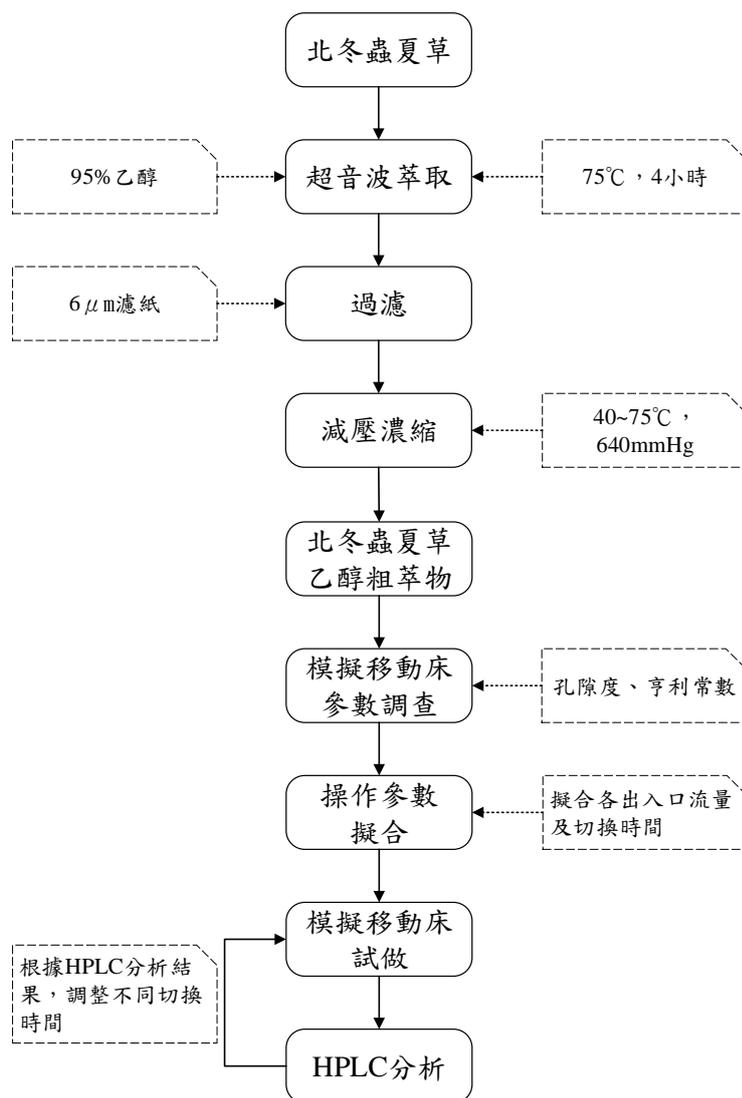


圖 3 模擬移動床純化蟲草素研究流程圖

表 4 北冬蟲夏草之萃出率

項目	北冬蟲夏草
原料重(g)	39,300
樣品乾重(g)	34,977
含水率 ^a	0.89
萃出物重(g)	4,460
萃出率 ^b	0.113
^a 含水率=(樣品濕重-樣品乾重)/樣品濕重	
^b 萃出率=萃出重/樣品乾重	



四、結果與討論

4.1 蟲草素萃取

研究中用來提純蟲草素的原料北冬蟲夏草共 39.3kg，經 40°C 乾燥後。粉碎至 20 mesh 以上，再以 95% 乙醇做為萃取溶劑經超音波萃取、過濾及減壓濃縮後獲得北冬蟲夏草粗萃物共 4460g，萃出率約為 0.113，如表 4 所示。萃出物再經 HPLC 分析與標準品比對，如圖 4，可以發現蟲草素萃出物，具有相當顯著的蟲草素(Cordycepin)的波峰，表示萃取物中蟲草素含量相對高，有利於模擬移動床分離純化後的鑑識。

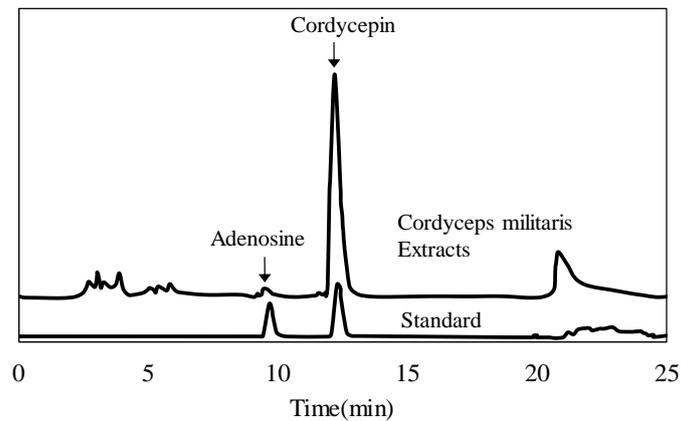


圖 4 北冬蟲夏草萃取物與蟲草素及腺苷層析圖譜

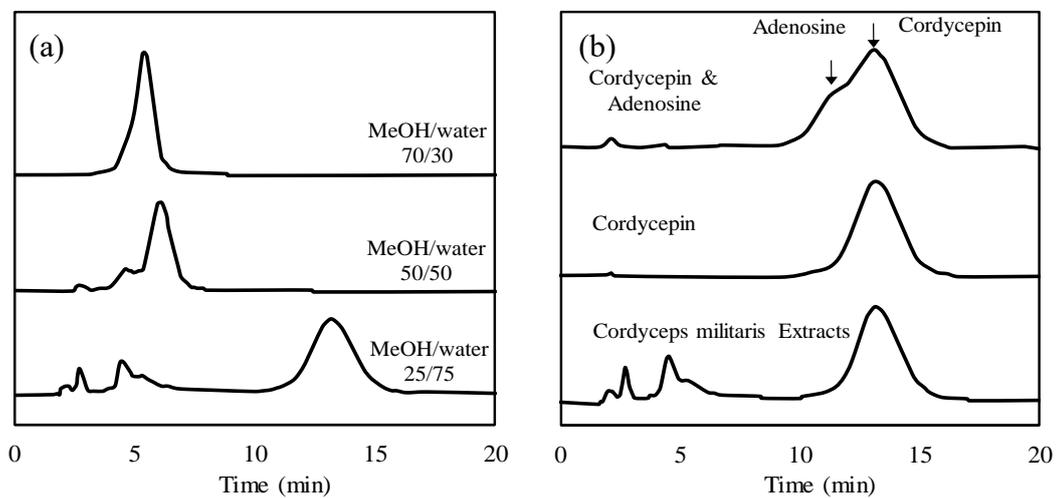


圖 5 (a)不同體積比的甲醇水溶液，對蟲草素層析時影響；(b)甲醇水的比例為 25/75 時北冬蟲夏草粗萃物及標準品圖譜。

4.3 模擬移動床參數調查及試做結果

4.3.1 單一管柱測試

模擬移動床在進行實機操作前，須先以單一管柱，進行孔隙度及亨利常數的調查，實驗中採



用一個預先填充好的管柱，規格為 $10 \times 250 \text{ mm}$ 的不鏽鋼管柱，填充固定相為璞捷科技的產品 Purject 水性 C18 ($40\sim 70 \mu\text{m}$)，移動相則是甲醇及水的混合溶液，流速設定為 2.5 mL/min ，UV 的吸收波長設定為 254nm 。圖 5(a) 為不同體積比的甲醇水溶液移動相，對蟲草素層析時影響。圖中可以發現，蟲草素的滯留時間，隨甲醇濃度的降低而變長，不純物與蟲草素的滯留時間差也相對變長，當甲醇水溶液的體積比為 25/75 時，可以獲得最佳的解析度。為了確認以 25/75 甲醇水溶液沖提時，滯留時間 13 分鐘的成分為蟲草素，研究中也使用 25/75 甲醇水溶液的移動相條件，對市售標準品做層析，如圖 5(b)。由圖 5(b) 中可以發現，北冬蟲夏草粗萃物中，蟲草素的滯留時間為 13 分鐘，與標準品的滯留時間相同，並非北冬蟲夏草中可能存在的另一成分的腺苷(滯留時間為 11.5 分鐘)。因此，研究中可以使用 25/75 的甲醇水溶液作為模擬移動床移動相。

4.3.2 三角理論擬合

研究中管柱的孔隙度，以硝酸鈉做為測試樣品，再以不同的移動相流速沖提，所獲不同的滯留時間代入式(1)，可獲得孔隙度數值為 0.306。另外，再根據圖 5(a) 中單一管柱測試結果，可以將蟲草素及腺苷的滯留時間，代入式(1)獲得亨利常數 K_A 為 0.320、 K_B 為 3.590。將所獲得管柱的孔隙度以及亨利常數 K_A 、 K_B ，代入式(2)及式(3)，求得不同模擬移動床切換時間的 m_2 及 m_3 ，然後再以 K_A 、 K_B ，繪製出的三角理論圖，推估模擬移動床的切換時間及各出入口的流速值，是否落在三角理論的操作範圍內，如圖 6 所示。在圖 6 中，三角形的區域是三角理論中，純萃取物及純萃餘物的操作區域。當三角理論擬合時，設定移動相(Desorbent) 6 mL/min ；進料(Feed) 0.6 mL/min ；萃出液(Extract) 2.5 mL/min ；萃餘液(Raffinate) 4.1 mL/min ，切換時間為大約在 3 分鐘左右，可以使擬合值落入三角形的區域，代表該條件的設定值，可能可以分離純化蟲草素。因此可以此條件，進行模擬移動床實機操作。

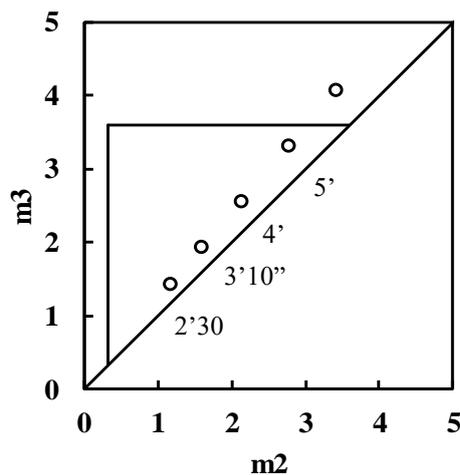


圖 6 三角理論擬合圖

4.3.3 模擬移動床組態設計

模擬移動床的設計，是採用多個層析管柱作為固定相，並且定時地切換流道，使得固定相及



移動相得以逆向流動所構成的製程技術。在本研究中，所採用的管柱數為 6 個，流道與管柱的相對位置如圖 7，固定相的流動，是藉著移動相流道進出口的改變，模擬出固定相的流動。因此固定相與移動相的逆向接觸，使得極性低的蟲草素有效率地被分離，由萃取端流出，且高極性的雜質由萃餘端流出。

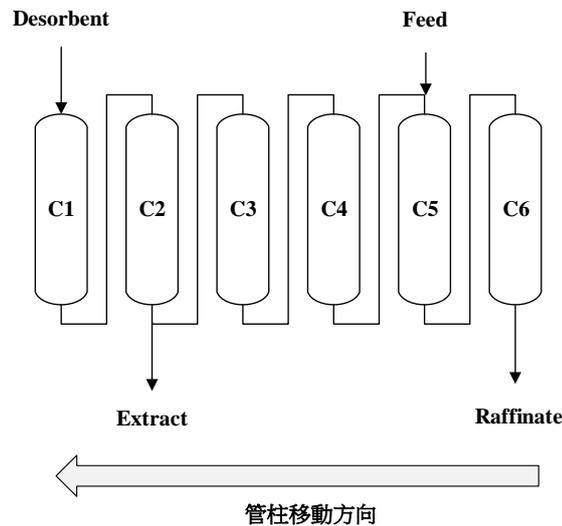


圖 7 模擬移動床組態設計

4.3.4 模擬移動床實驗與結果

根據單一管柱的實驗結果，再搭配使用三角形理論設定模擬移動床實機操作條件。模擬移動床採用 6 個 I.D.10 mm x 100 mm 填充管柱，填料為 Purject 水性 C18 (40~70 μ m)。進出口的流速條件分別為：移動相(Desorbent) 6.0 mL/min；進料(Feed) 0.6 mL/min；萃出液(Extract) 2.5 mL/min；萃餘液(Raffinate) 4.1 mL/min，在固定各出入口的流速條件下，進行不同切換時間的實驗，再觀察模擬移動床萃出及萃於端兩個出口的 HPLC 圖譜變化，如圖 8。

根據圖 8(a) 結果可知，當切換時間分別為 5 分鐘時，大部分物質及蟲草素從萃餘端被沖提出來，僅少部分的物質由萃取端流出，這說明模擬移動床的切換時間過長，固定相的流速相對於移動相的速度過慢，使得大部分物質從萃餘端脫附。

當切換時間縮短為 4 分鐘時，如圖 8(b)。可以發現，位於滯留時間 13 分鐘的蟲草素波峰，有部分由萃出端流出，部分蟲草素及大部分的滯留時間 13 分鐘前的物質由萃餘端萃出。

若繼續縮短切換時間至 3 分 10 秒時，如圖 8(c)，此時蟲草素已經全部從萃出端流出，而且現腺苷也開始從萃出端被沖提出來。另外在圖中也發現，滯留時間在 2~8 分鐘的弱滯留性雜質全部由萃餘端被沖提出，這顯示蟲草素及雜質，已被模擬移動床分別分離制萃出端及萃餘端。在此條件下，蟲草素在萃出端所收集的重量百分比已經從進料的 4.06% 提高到 65.67%，已達預期目標的 60%。另外，腺苷的重量百分比也從進料的 0.11% 提高 0.91%。



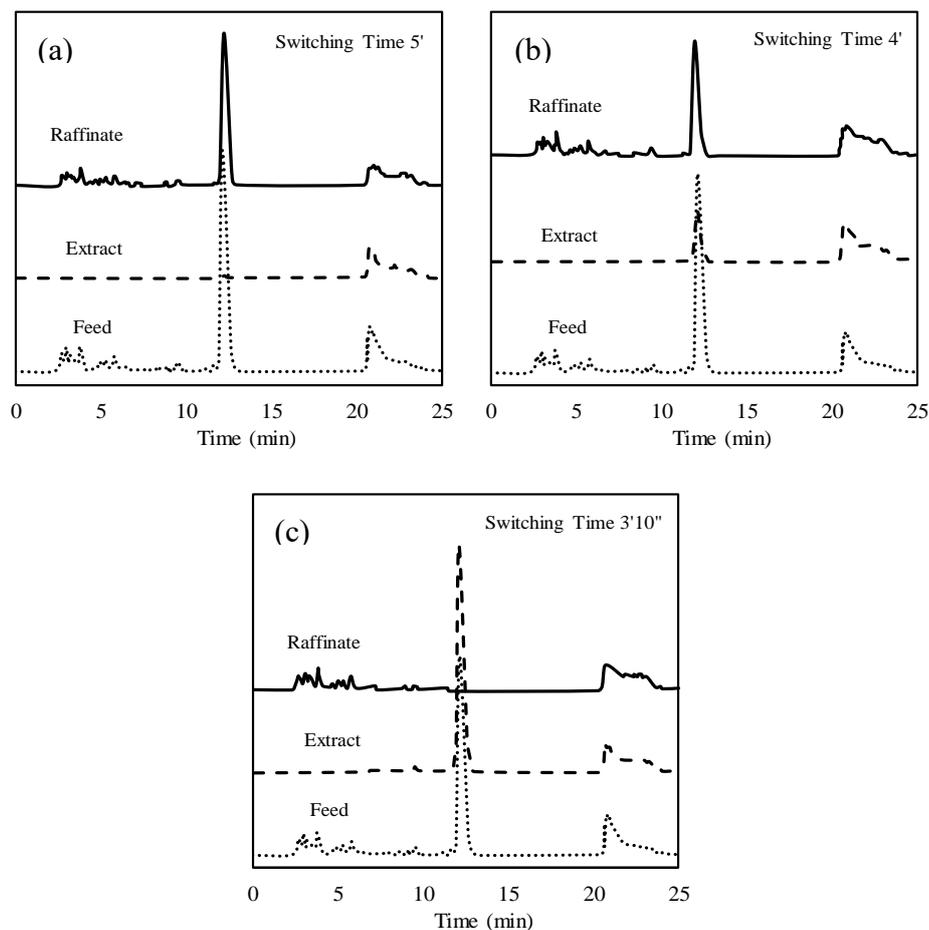


圖 8 模擬移動床萃出及萃於液的層析圖(a) 切換時間 5 分；(b) 切換時間 4 分；(c) 切換時間 3 分 10 秒。

五、結論

本研究以模擬移動床連續純化蟲草素，可獲致以下結論：

1. 北冬蟲夏草乾燥處理後，再以超音波乙醇萃取，萃出率可達 0.113。
2. 模擬移動床採用的固定相為 Purject 水性 C18 (40~70 μm)，單一管柱測試時，可獲得亨利常數 K_A 為 0.320、 K_B 為 3.590。
3. 根據三角理論擬合結果，模擬移動床進出口流速分別為移動相(Desorbent) 6.0 mL/min；進料(Feed) 0.6 mL/min；萃出液(Extract) 2.5 mL/min；萃餘液(Raffinate) 4.1 mL/min。
4. 當進出口固定三角理論擬合之流速條件，根據模擬移動床實機操作結果，切換時間為 3 分 10 秒時，可獲得最佳純化條件。
5. 研究中以模擬移動床提純蟲草素，純度可由萃取物中的 4.06% 提高到 65.67%。

致謝

感謝科技部專題研究計畫研究經費補助（計畫編號：MOST 109-2637-E-230-001）。



參考文獻

- [1] Ni, H., Zhou, X.H., Li, H.H. and Huang, W.F., "Column chromatographic extraction and preparation of cordycepin from *Cordyceps militaris* waster medium," *Journal of Chromatography B*, Vol. 877, No. 22, pp. 2135-2141, 2009.
- [2] 魏思亦、崔琳琳、王瑩、姬素萍，「蟲草素抗腫瘤作用的機制研究」，*廣東化工*，第45卷，第371期，pp. 124-125，2018。
- [3] Cunningham, K., "Cordycepin, a metabolic product from cultures of *Cordyceps militaris* (Linn) Link. Part I. Isolation and characterization," *Journal of the Chemical Society*, Vol. 2, pp. 2299-2302, 1951.
- [4] 孫明詳，「蟲草屬產物抑制腫瘤與免疫提升之功能性評估」，碩士論文，南台科技大學，台南市，2007。
- [5] Tuli, H. S., Sharma, A. K., Sandhu, S. S. and Kashyap, D., "Cordycepin: a bioactive metabolite with therapeutic potential," *Life sciences*, Vol. 93, No. 23, pp. 863-869, 2013.
- [6] Frederiksen, S., Malling, H. and Klenow, H., "Isolation of 3'-deoxyadenosine (cordycepin) from the liquid medium of *Cordyceps militaris* (L. ex Fr.) Link," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*, Vol. 95, No. 2, pp. 189-193, 1965.
- [7] 都興范、李軍、王林美，「蛹蟲草中蟲草素的研究進展」，*食用菌*，第6卷，第3期，pp. 3-5，2012。
- [8] Nakamura, K., Yoshikawa, N., Yamaguchi, Y., Kagota, S., Shinozuka, K., and Kunitomo, M., "Antitumor effect of cordycepin (3'-deoxyadenosine) on mouse melanoma and lung carcinoma cells involves adenosine A3 receptor stimulation," *Anticancer research*, Vol. 26, No. 1A, pp. 43-47, 2006.
- [9] Kim, H., Naura, A. S., Errami, Y., Ju, J. and Boulares, A. H., "Cordycepin blocks lung injury-associated inflammation and promotes BRCA1-deficient breast cancer cell killing by effectively inhibiting PARP," *Molecular medicine*, Vol. 17, No. 9, pp. 893-900, 2011.
- [10] Ng, T. and Wang, H., "Pharmacological actions of *Cordyceps*, a prized folk medicine," *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Vol. 57, No. 12, pp. 1509-1519, 2005.
- [11] 余伯成、唐永范、唐亮、崔星明，「蟲草素的藥理作用研究進展」，*現代藥物與臨床*，第26卷，第5期，pp. 349-352，2011。
- [12] Nakamura, K., Shinozuka, K. and Yoshikawa, N., "Anticancer and antimetastatic effects of cordycepin, an active component of *Cordyceps sinensis*," *Journal of pharmacological sciences*, Vol. 127, No. 1, pp.53-56, 2015.
- [13] 倪賀、李海航、黃文芳、李玲，「北冬蟲及其活性成分的研究與開發」，*科技導報*，第25卷，第15期，pp. 75-79，2007。
- [14] 陸巍傑、唐永范、高瑞棟，「HPLC 法測定北冬蟲夏草和常見食用菌中腺苷和蟲草素」，*現代藥物與臨床*，第26卷，第4期，pp. 313-315，2011。
- [15] 詹歡，「蛹蟲草的有效成分和藥用價值及其在食品中的應用」，*糧食流通技術*，第16期，.



- pp. 56-61, 2016。
- [16] Jeong, J.W., Jin, C.Yun., Park, C., Hong, S.H., Kim, G.Y., Jeong, Y.K., Lee, J.D., Yoo, Y.H. and Choi, Y.H., "Induction of apoptosis by cordycepin via reactive oxygen species generation in human leukemia cells," *Toxicology in Vitro*, Vol. 25, No. 4, pp. 817-824, 2011.
- [17] Xiong, Y., Zhang, S., Xu, L., Song, B., Huang and G., Lu, J., "Guan, Shuang Suppression of T-cell activation in vitro and in vivo by cordycepin from *Cordyceps militaris*," *Journal of surgical research*, Vol. 185, No. 2, pp. 912-922, 2013.
- [18] 黃郁婷, 「探討北冬蟲夏草之培養條件及其抗疲勞作用」, 碩士論文, 大仁科技大學, 屏東, 2013。
- [19] 潘孟均, 「北蟲草萃取物抗過敏活性研究」, 碩士論文, 大葉大學, 彰化, 2011。
- [20] 蔡博宇, 「蜂子粉對人工蛹蟲草子實體之抗氧化活性分析」, 碩士論文, 虎尾科技大學, 雲林, 2011。
- [21] 何思妍, 「米基栽植蛹蟲草子實體抑制肺癌生長之研究」, 碩士論文, 國立臺灣海洋大學, 基隆, 2010。
- [22] Weiss, S., and Bratt, M., "Effect of cordycepin (3'-deoxyadenosine) on virus-specific RNA species synthesized in Newcastle disease virus-infected cells," *Journal of virology*, Vol. 16, NO. 6, pp. 1575-1583, 1975.
- [23] Hashimoto, K., and Simizu, B., "Effect of cordycepin on the replication of western equine encephalitis virus," *Archives of virology*, Vol. 52, No. 4, pp. 341-345, 1976.
- [24] Wittek, R., Koblet, H., Menna, A. and Wyler, R., "The effect of cordycepin on the multiplication of Semliki Forest virus and on polyadenylation of viral RNA," *Archives of virology*, Vol. 54, No. 1, pp. 95-106, 1977.
- [25] Xu, F.L., Lee, Y.L., Tsai, W.Y., Lin, S.J., Yang, Z.Q., Yang, C.C., Liu, H.Y., Cheng, L., Xiao, H. and Wen, L., "Effect of cordycepin on Hantaan virus 76-118 infection of primary human embryonic pulmonary fibroblasts--characterization of apoptotic effects," *Acta virologica*, Vol. 49, pp. 183-193, 2005.
- [26] Verma, A. K. and Aggarwal, R., "Repurposing potential of FDA approved and investigational drugs for COVID-19 targeting SARS-CoV-2 spike and main protease and validation by machine learning algorithm," *Chemical biology & drug design*, Vol. 00, pp. 1-18, 2020.
- [27] 周靖, 吐爾尼散·吐地, 張忠, 張冕, 劉豔芳, 周帥, 王晨光, 唐慶九, 「大孔吸附樹脂聯用KB-2微球柱層析法」, *食用菌學報*, 第26卷, 第2期, pp.65-71, 2019。
- [28] 吳獻東、金曉明、蘇宏業, 「基於 NSGA-II 的模擬移動床色譜分離過程多目標操作優化」, *化工學報*, 第58卷, 第8期, pp. 2038-2044, 2007。
- [29] 蔡宇傑、丁彥蕊、張大兵、戴軍、石貴陽、須文波, 「模擬移動床色譜技術及其應用」, *色譜*, 第22卷, 第2期, pp. 111-115, 2004。
- [30] 李凌、井元偉、袁德成, 「模擬移動床吸附分離技術及其應用」, *電腦與應用化學*, 第24卷, 第4期, pp. 441-444, 2007。
- [31] 萬紅貴、方煜宇、葉慧, 「模擬移動床技術分離纈氨酸和丙氨酸」, *食品與發酵工業*, 第31



卷，第12期，pp. 50-53，2005。

- [32] 余書奇、包曉青、梁明在、金晨鐘、田蔚，「超臨界流體萃取與模擬移動床色譜純化靈芝三萜類化合物」，食品科學，第40卷，第20期，pp. 286-292，2019。
- [33] 林智雄，「超臨界流體與模擬移動床層析技術於五味子木酚素萃取與純化之應用」，博士論文，義守大學，高雄，2019。
- [34] 曾柏澍，「利用超臨界流體模擬移動床技術從超臨界流體粗萃物分離丹參酮之研究」，碩士論文，義守大學，高雄，2019。
- [35] Liang, M.T., Liang, R.C., Huang, L.R., Liang, K.Y., Chien, Y.L., and Liao, J.Y., "Supercritical fluids as the desorbent for simulated moving bed—Application to the concentration of triterpenoids from *Taiwanofugus camphorate*," *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, Vol. 45, No. 4, pp. 1225-1232, 2014.
- [36] Denet, F., Hauck, W., Nicoud, R.M., Di Giovanni, O., Mazzotti, M., Jaubert, J.N., and Morbidelli, M., "Enantioseparation through Supercritical Fluid Simulated Moving Bed (SF-SMB) Chromatography," *Industrial & Engineering Chemistry Research*, Vol. 40, No. 21, pp. 4603-4609, 2001.
- [37] Rajendran, A., Paredes, G., and Mazzotti, M., "Simulated moving bed chromatography for the separation of enantiomers," *Journal of Chromatography A*, Vol. 1216, No. 4, pp. 709-738, 2009.
- [38] Pedferri, M., Zenoni, G., Mazzotti, M., and Morbidelli, M., "Experimental analysis of a chiral separation through simulated moving bed chromatography," *Chemical engineering science*, Vol. 54, No. 17, pp. 3735-3748, 1999.
- [39] Santos, M., Veredas, V., Silva Jr, I., Correia, C., Furlan, L., and Santana, C., "Simulated moving-bed adsorption for separation of racemic mixtures," *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, Vol. 21, No. 1, pp.127-136, 2004.

