

靈芝子實體中之有機銻成份研究

姜宏哲

化學研究所

摘 要

以含有 0.6、63、126、252 ppm 銻(添加二氧化銻配製)等不同濃度之太空包栽培赤芝，結果所生長的赤芝中之銻含量分別為 2.1, 45.2, 82.3, 116.8 ppm。由含有 82.3 ppm 銻之赤芝，經 95% 乙醇回流萃取後，以矽藻土管柱層析法分離 2 次，獲得含有 21,739.8 ppm 銻之部分。

關鍵詞：銻，靈芝，赤芝加銻栽培。

緒 言

1974 年淺井在通俗醫藥書「銻與我」上發表⁽¹⁾民間認為有治癌或保健效用之靈芝、人參等之銻含量特別多，即靈芝內含 800~2000ppm，人參內含 250~320ppm。因此引發對銻之醫療效果的進一步探討。近年來有關銻對慢性病（如癌症、高血壓、糖尿病等）之醫療效用有許多報導⁽²⁻⁴⁾。淺井合成之雙羧酸乙基二二氧化銻 (Carboxyethyl-Germanium sesquioxide, Ge-132) 有干擾素激發作用^(5,6)，及抗癌效果^(7,8)。另有許多合成的有機銻化合物亦顯示抗癌作用⁽⁹⁻¹⁵⁾。

對於靈芝^(16,17) 及人參⁽¹⁶⁻¹⁹⁾ 中之銻含量，在淺井之後有許多人追試過，但所得之含量均在 0.1 ppm 以下。這些最近之銻定量的結果與淺井之結果⁽¹⁾ 相差極大，因此本研究室首先比較研討已發表之銻定量法，經改良後，定出最佳定量法（回收率 97%）。並以本改良法進行定量 6 種靈芝之銻含量，其值為 6.2~22.0 ppm⁽²⁰⁾。淺井之定量結果偏高⁽¹⁾，可能是由灰化等之前處理不適當及未除去有干擾物質所引起，但淺井未註明其所採用之定量法，致使後人無法追試它的可靠性及找出其錯誤之所在。

至今雖然天然有機銻未被分離出，但一般推想，它較容易被人體吸收而更有療效。因此在日本有許多添加二氧化銻來培育香菇⁽²¹⁻²³⁾、綠藻⁽²⁴⁾、靈芝⁽²⁵⁾等，經植物吸

收後，變成含高量天然有機銻之高經濟價值的健康食品，並取得專利。

本研究之目的為設法分離靈芝中之有機銻，並決定該化學結構式，但一般野生及人工栽培靈芝，其銻含量過少，大約在 10ppm 以下，難於分離出。因此以人工栽培法在大空包（耐熱塑膠袋）培養基中，添加二氧化銻來栽培靈芝，使它被取進後轉變成有機銻而大幅提高該含量，以便分離出有機銻。

對於靈芝中之有機銻的抽取，先以水、95% 乙醇、10% 乙醇、氫氧化鈉液等分別還流抽取，尋找最適當的抽取方法，然後採用管柱層析法由抽取物分離有機銻。

實驗部分

一、試藥：

二氧化銻、99.999999%，	E. Merck。
二氧化銻、99.999%，	OTAM miner AG。
鹽酸、37%，	GR, E. Merck。
四氯化碳，	E. Merck。
苯夫倫 (phenylfluorone)，	E. Merck。
甲醇，	E. Merck。
聚乙烯醇 (Polyvinyl alcohol)，聚合度 1600~1700，	和光試藥一級。
硫酸、氫氧化鈉，	富士一級試藥。
95% 乙醇，	台灣菸酒公賣局。

二、試液：

1. 0.04% 苯夫倫試液 (PF 試液)：取苯夫倫 0.04 克置於 100 毫升量瓶中，加入甲醇 75 毫升，再加鹽酸 0.4 毫升，攪拌使之溶解後再加甲醇，使全量達至 100 毫升。放置冰箱，可使用一週。
2. 0.25% 聚乙烯醇溶液：取聚乙烯醇 2.5 克，溶於溫蒸餾水 1 升中，用定性濾紙過濾。
3. 100 ppm 銻標準液：取二氧化銻 (E. Merck) 144.1 毫克，加 500 毫升約 70°C 蒸餾水，時加以攪拌使之溶解，待冷卻後加蒸餾水稀釋至 1000 毫升。
4. 400ppm 銻液：取二氧化銻 (OTAM) 576.4 毫克，加 800 毫升蒸餾水加熱回流溶解，待冷卻後加蒸餾水稀釋至 1000 毫升。200ppm 及 100ppm 銻液即以適當的稀釋 400ppm 銻液使用。
5. Ninhydrin 試液：0.2 公克 ninhydrin 溶於 100 毫升乙醇。
6. Anisaldehyde- 硫酸試液：0.5 毫升 anisaldehyde 加入 50 毫升乙酸後再加 1 毫升之硫酸，使用時新配製。

三、儀器：

1. 紫外光——可見分光光譜儀 (Beckman model 25)
2. 酸鹼度測定儀 (Suntex SP-32, ± 0.01 pH, 台灣製)
3. 粉碎機 (400ml, 台灣製)
4. 高壓滅菌釜 (Model SD-30N, 日本 Tonmy Seiko Co.)
5. 恆溫箱 (美國 Precision, Scientific Co.)

四、赤芝有機銻之抽取法研討：

第一次抽取：取乾燥之野生赤芝傘部（含有 7.76 ppm 銻）約 80 公克，先切成細片後，用粉碎機粉碎，稱重 10 公克棉狀粉碎物加 200 毫升蒸餾水煮沸回流 3 小時後，溫時過濾取抽出液，分兩次放入 200 毫升的梨形燒瓶，用減壓濃縮機將溶劑抽出，待剩餘 10 毫升後放入已預先放置約 1 公克脫脂棉花的 50 毫升磁坩堝內，再取約 10 毫升的蒸餾水將遺留在瓶壁內的殘餘物沖出置入原先的坩堝內後，放在 90~95 °C 的熱風烘箱內乾燥約 4 小時後取出，將該坩堝放入預先昇溫至 600 °C 之電爐，保持 600 °C 灰化 1 小時，再依照本研究室⁽²⁰⁾之銻定量改良法定量該銻含量。

第二次及第三次抽取：以第一次抽取後之赤芝反覆上述操作。

上述方法中加 200 毫升蒸餾水之部分，改用各別以 95% 乙醇，10% 乙醇或 0.01 N 氫氧化鈉溶液抽取，並比較抽取效果。

五、加銻栽培赤芝子實驗：

1. 純種之分離培養

(a) 馬鈴薯培養基 (PDA) 之製備

馬鈴薯	200 公克
葡萄糖	20 公克
瓊脂 (洋菜)	20 公克
水	1000ml

先將馬鈴薯去皮，稱取 200 公克，切成薄片，加水 1000 毫升，煮沸約 15 分鐘，用 6 層紗布過濾取汁，再加入瓊脂，繼續加熱攪拌待全部溶化後，再用紗布過濾一次，加葡萄糖用熱水補足到 1000 毫升，趁熱分裝於培養皿，然後用高壓滅菌釜滅菌（壓力 1.2 kg/cm²，120 °C）30 分鐘。

(b) 組織分離

以解剖刀劃開赤芝 (*ganoderma lucidum*) 嫩組織表面，以接種針挑取內部組織一小塊接於培養皿培養基上，接種好之培養皿置於 28 °C 之恆溫箱中培養約 10 天，待純白色毛狀菌絲佈滿培養基表面後置於約 6 °C 冰箱內，以保存當作菌種。

2. 原種之製作 (接種栽培用)

(a)培養基之製備

木屑	700g	石膏粉	20g
米糠	250g	水	約 1700 ~ 1800 毫升
尿素	10g	pH	5 ~ 6
蔗糖	20g		

先將乾燥潤葉樹木屑、米糠、石膏粉 ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 等混合滲和，充分拌勻，加入尿素和糖水，然後逐加入水，邊加邊拌和均勻，最好含水量為用手抓一把調好的培養基，握緊若指縫中滲出水而不下滴為適度（讓培養基充分吸水一段時間後握緊）。所加水量與木屑之乾燥度有關。拌好之培養基用 pH 試紙測定其酸度，調節 pH 值在 5 ~ 6 之間。

(b)裝瓶及滅菌

把拌好的培養基裝入 750 公克容量的白色透明廣口磨菇瓶內，邊裝邊樁，使培養基料均勻充實。再用木棍沿瓶四周適度壓實，裝到瓶的三分之二處，壓平上表面，再用尖木棒（直徑約 1.5 公分）在培養基料中央扎一洞深及填料的三分之二深處。然後拭乾瓶口，塞上未脫脂棉塞後再在瓶口上包一層牛皮紙用繩紮緊，置入高壓滅菌釜中，在 1.5 kg/cm^2 的壓力下加熱 60 分鐘。

(c)接種

滅菌後，待瓶內溫度下降至 30°C 以下，便可將瓶子移入接種箱內，用接種鏟從培養皿挖取 2 塊菌絲塊放入扎洞口處，然後迅速塞上棉塞。把瓶子移入恆溫箱內，在 $26 \sim 28^\circ\text{C}$ 溫度下培養，經約 25 天，菌絲便可貫穿整個培養瓶，可作原種使用。

3. 太空包加銻栽培

(a)與原種之製作不相同部分如下：

- ①用含有 100, 200, 400ppm 銻之水溶液代替原種培養基製備時之水。該培養基中之銻含量分別為 63, 126 及 252ppm。
- ②用圓直徑約 10 公分高 37 公分之耐熱 pp 塑膠袋（太空包）代替磨菇瓶，裝培養基約 500 公克到約 18 公分高度。
- ③接種時用大鑷子從原種瓶中挖取如蠶豆大小之原種 3 塊放入洞口。

(b)培養與管理：

培養室避免陽光直接照射，溫度最好保持 $26 \sim 28^\circ\text{C}$ ，相對濕度 $80 \sim 95\%$ ，每天開窗換氣一次。太空包中菌絲已佈滿全部培養基需約 1 個多月，此時拔去棉塞，子實體長出包口後，每日噴水一次，經約 1 個多月即可收穫。栽培時期在 4 ~ 10 月最為適宜。

(c)生長赤芝之銻含量，依本研究室之銻定量改良法⁽²⁰⁾定量之。

六、赤芝中之有機銻之萃取及分離

取由含有 126 ppm 銻太空包栽培之粉碎乾燥赤芝 100.0 公克 (含有 82.3 ppm 銻)，加 2 公升 95% 乙醇，煮沸回流 3 小時後溫時過濾萃取液，再反覆相同萃取一次，合併二次之抽取液用減壓濃縮機蒸乾得 8.52 公克暗棕色黏稠物質。反覆上次步驟 9 次處理，共計由赤芝 1 公斤所得之乙醇萃取物為 85.2 公克 (8.52%)。該萃取物加 400 毫升蒸餾水，加熱回流 20 分鐘，放冷至室溫後過濾，該濾液加 100 毫升正丁醇放入分液漏斗震搖，靜置，分離水層，用減壓濃縮機抽乾得 21.5 公克 (2.15%) 棕色黏稠物質(A)，經定量含有 2586.4 ppm 銻。取(A) 21.5 公克溶於約 60 °C 之 100 毫升甲醇，放冷，過濾以裝有 600 公克矽藻土管柱做層析分離 (沖提液為乙酸乙酯: 甲醇 = 2:1)，用矽藻土薄層層析法 (TLC) 追跡含有機銻部分，並收集該部分濃縮液，再以裝有 300 公克矽藻土管柱作進一步純化得 1.2g 棕色黏稠性物質(B)，經定量含有銻 21739.8 ppm。取(B)部分作溶解度測試，得知只溶於水、甲醇、乙醇、丙醇等極性大的溶劑，故嘗試以水及其他不與水混合的有機溶劑，作分配分離，但(B)部分中沒有東西溶在有機層，故利用溶解度分離並不成功。

亦取(B)部分作 TLC 法分離時在吸附劑只有矽藻土較適用，當展開液為甲醇時， R_f 值為 1.0，當展開液的極性比甲醇小時，則銻的斑點便拖一尾巴由原高至某一位置，展開液的極性較大時，銻的斑點所拉距離較長，當極性較小時，銻所拉的距離會變短，所以一直沒有辦法把銻的部分分離為完整的一點。由於較常用的分離方法皆不能把銻有效地分離成一點，所以分離部分暫時到此停止。

以 TLC 追跡含有機銻部分方法是使用鋁或玻璃底的矽藻土 TLC 片展開後噴霧 PF 試液，PF 試液遇銻便會呈現粉紅色，若顏色不太明顯，可把 TLC 片放入 600 °C 的烤箱中約 5 秒，PF 與銻所形成的顏色便較明顯。

七、取上述(B)的部分，作化學及光譜分析：

1. 取(B) 0.1 公克加 20 毫升蒸餾水溶解 (C 液)，測其酸鹼性，結果為酸性。
2. C 液用 ninhydrin 試液，測定是否含胺基酸，結果有呈色反應，表示有胺基酸存在。
3. 由於(B)放置在空氣中，會吸收水份，故用 anisaldehyde-sul-furic acid 試液測試是否含糖類，結果該顏色與各糖類之標準顏色有異，故可能不含糖類。
4. $UV \lambda_{\text{max}}$ (methanol) : 283nm
5. IR(KBr) cm^{-1} : 3400(NH), 1640(C = O), 1400(Ge-O-C)
6. $^1\text{H-NMR}(\text{D}_2\text{O}) \delta$: 1.42(d, 3H), 3.2(s, 1H), 3.3(s, 3H), 3.9(s, 0.5H, 不純物?), 4.25(q, 1H).
7. MS : 因分離物並不很純，所以只看出分子量約 300，而其他吸收峰並沒有太大幫助。

8. 銻之定量：取 C 液 1 毫升依本研究室之銻定量改良法⁽²⁰⁾ 定量之。

結果及討論

加銻栽培赤芝時使用二氧化銻是因市售銻化合物中該品最便宜，1 公斤約新台幣 3 萬元。即 Ge - 132 之價格的七分之一。

以水，95% 乙醇，10% 乙醇，0.01N 氫氧化鈉溶液萃取赤芝中之有機銻結果如表一。

表一 赤芝中之有機銻抽取率 (%) 比較表

萃取次數 \ 抽取液	水	95% 乙醇	10% 乙醇	0.01N 氫氧化鈉
1	49.8	45.1	37.5	59.0
2	34.9	32.7	29.6	31.3
3	9.4	12.8	18.5	2.2
抽取率總計	94.1	90.6	85.0	96.2

雖然用 0.01N 氫氧化鈉溶液萃取時其效果最好，但加熱萃取及濃縮過程中，可能有機銻與氫氧化鈉會起反應。次好係用水萃取，但其他水溶性物質如多糖類等亦同時被萃取，增加以後分離工作之困難，又需蒸乾多量之水。因此認為用 95% 乙醇萃取較為適當。

在各 10 包太空包中（培養基中之銻含量分別為 63, 126, 252 ppm）所生長的乾燥赤芝平均重量（公克）及其中之銻含量（ppm）如表二。

表二 加銻栽培之赤芝的重量 (g) 與銻含量 (ppm) 比較表

太空包中之銻含量 (X)	赤芝重量 (銻含量 Y)	Y / X
0.6	29.1 (2.1)	3.5
63	28.3 (45.2)	0.72
126	26.8 (82.3)	0.65
252	18.5 (116.8)	0.46

由表二得知，當太空包中之銻濃度到 252 ppm 時赤芝之產量有明顯的減少，且赤芝中之銻含量 (Y) 與太空包中之銻含量 (X) 之比亦減少。因此採用 126 ppm 銻濃度栽培時較為適當。太空包中之銻含量 0.6 ppm 者係未另添加二氧化銻者。

6 種靈芝栽培用木屑之銻含量經本人定量結果，發現均未超過 1 ppm。因此淺井發表的靈芝中之銻含量有 800~2000 ppm 是不可能的。添加於太空包中之二氧化銻不溶於乙醇，且用矽藻土 TLC 片以甲醇展開時之 R_f 值為 0.0，赤芝之有機銻為 1.0，相差頗大，可區別之。

對於經管柱層析法所得之含有 21,739.8 ppm 銻之黏稠性物質 (B) 的純化，因此部分只溶於水、甲醇、乙醇、丙酮等極性較大的溶劑，其他極性較小的溶劑則完全不溶而呈兩相狀態，所以不能利用溶解度的不同及分配分離的方法來純化。又該部分用各種吸附劑之 TLC 展開時含銻部分之 R_f 值調整到 0.9 到 0.2 之間時，產生嚴重之拉尾巴情形。使用製備 TLC 法亦不能進一步純化。再從所得的光譜分析，因分離物 (B) 本身就不太純，故沒有多大的幫助。但 (B) 之紅外線光譜與現本研究室合成之 2- 胺基丙酸-銻錯合物之紅外線光譜很類似又許多合成之有機銻化合物以聚合體狀態存在，因此靈芝中之胺基酸與銻亦可能以胺基酸-銻錯合物聚合體狀態存在。

謝 誌

本研究承行政院國家科學委員會之經費補助 (NSC 76-0208-M003-14) 及生物研究所簡秋源教授之支援得以完成，謹此誌謝。

參考文獻

1. 淺井一彥 (1977)。銻與我 (第四版)，P. 100 ~ 105，玄同社，東京。
2. 丹羽芳男 (民國 75 年)。銻可治現代病 (中文版)，P. 117 ~ 126，青春出版社，台北市。
3. 串田眞一郎 (1984)。銻對癌有效，P. 110 ~ 140 Health 研究所，大阪。
4. 太田富藏 (1984)。癌體質可由銻改善，P. 51 ~ 81，Ais 出版社，東京。
5. Mizuohima, Y. et al., (1980). Restoration of Impaired Immunoresponses by Ge-132 in mice. *Int. Archs Allergy appl. Immun.* 53, 338.
6. Aso, H. et al., (1984). Induction of Interferon and Activation of Nk Cell and macrophagy in mice by Oral Administration of Ge-132, *microbiol. Immunol.* 29, 65.
7. Sato, H. Tawaguchu, T. (1979). Antitumor activity of Ge-132, *Cancer Chemother.*, 6, 79.
8. Kumano, N. et al., (1978). Effect of Ge-132, on the methyl cholanthrene-induced

- tumorigenesis in mice, *Sci. Rev. Inst. Tohoku Univ.* 3/4 : 89.
9. 淺井 germanium 研究所 (1984) 。有機銻化合物，日本特許公開，昭 59-95293 。
 10. 淺井 germanium 研究所 (1985) 。抗腫瘍劑，日本特許公開，昭 60-64980 。
 11. 三和化學研究所 (1985) 。含有有機銻化合物之藥物組成物，日本特許公開，60-190714 。
 12. 德山曹達株式會社 (1985) 。有機銻化合物，日本特許公開，昭 60-100588 。
 13. 三井製藥工業株式會社 (1985) 。germanium-porphyrin 衍生物抗癌劑，日本特許公開，昭 60-64980 。
 14. Sato, R. et al., (1978). 3-Trihydroxygermyl propionic acid, U.S. Patent 4,066,678.
 15. Ishikawa, A. et al. (1981). germanium-contain organic polymer, U.S. Patent 4,271,084.
 16. Burns, D.T. and Dadger, D. (1980). Improvement of the Spectrophotometric Determination of germanium with phenylfluorone, *Analyst*, 105, 79-79.
 17. 中野正博等 (1984) 。生藥中銻之改良吸光光度定量法，*分析化學*，33，188~191。
 18. 室田智子，渡邊複三 (1984) 。野菜、生菜及生藥抽出液中之銻含量 (第一報) ，*神戸女子大學紀要*，17(2)，25~31 。
 19. Mino Y., et al., (1980). Determination of germanium in medical plant by Atomic Absorption Spectrometry, *Chem. Pharm. Bull.*, 28(9), 2687-2691.
 20. 姜宏哲，萬明華 (1986) 。中藥之銻定量法改良法研究，*台灣藥學新法*，38，189 - 197 。
 21. 飯塚千代吉 (1976) 。有藥効之食用茸之人工栽培法，日本特許公開，昭 51-114245。
 22. 札幌啤酒株式會社 (1978) 。含銻微生物體之製法，日本特許公開，昭 53-127882 。
 23. 札幌啤酒株式會社 (1979) 。特殊微生物體之製法，日本特許公開，54-2393 。
 24. 竹下茂雄，綠藻之培養法 (1977) 。日本特許公開，52-128287 。
 25. 亘重信，株式會社 Germax (1986) 。擔子菌 (靈芝之菌絲塊) ，日本特許公開，昭 61-9280 。

ORGANOGERMANIUM IN FRUIT BODY OF *GANODERMA LUCIDUM**Hung-Cheh Chiang***Abstract**

Cultivation of *Ganoderma lucidum* in 4 kinds of PP bags each of which contained 0.6, 63, 126 and 252 ppm germanium. The grown up *G. lucidum* fruit body contained 2.1, 45.2, 82.3 and 116.8 ppm germanium. The fruit body which contained 82.3 ppm germanium was extracted with 95% ethanol and separated with kieselguhr column chromatography twice and the part containing 21,739.9 ppm germanium was obtained.