

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫名稱

黃芩中抗腫瘤成份之分離研究

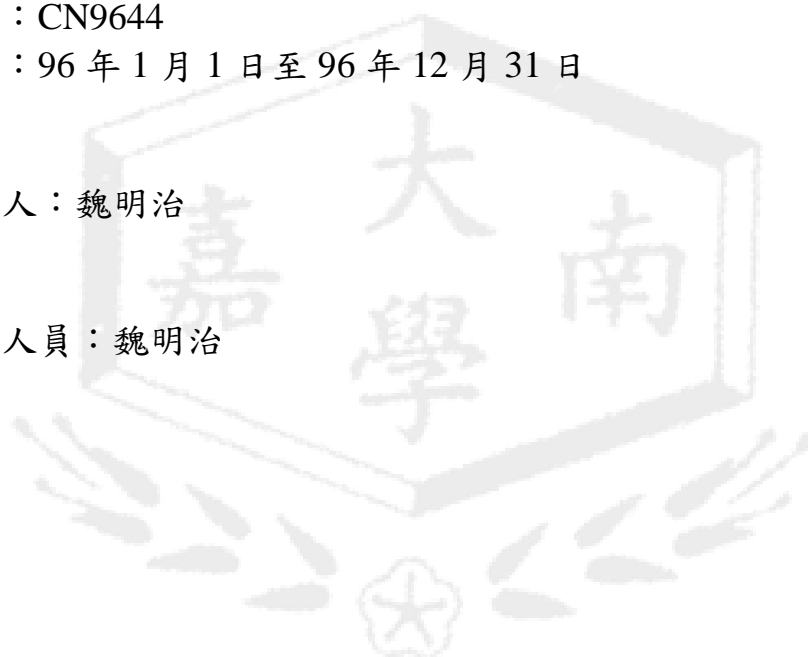
計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CN9644

執行期間：96年1月1日至96年12月31日

計畫主持人：魏明治

計畫參與人員：魏明治



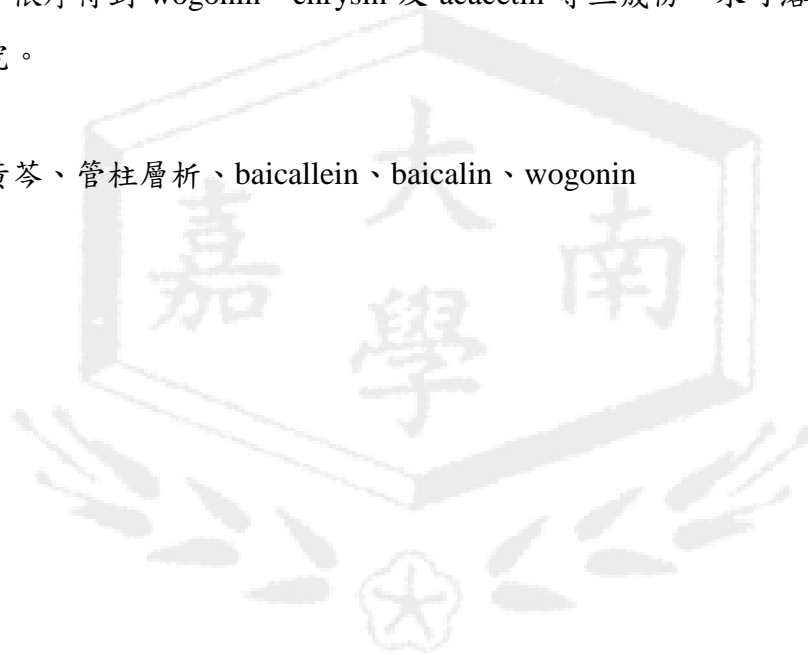
執行單位：嘉南藥理科技大學職安系

中華民國 97 年 3 月 25 日

摘要

黃芩為中華藥典中最重要且廣為使用的傳統中草藥之一，具有抗發炎、抗腫瘤、抗病毒、抗細菌、清熱燥濕、瀉火解毒、保護肝臟，以及降膽固醇及血壓等功用。黃芩中含有 baicalin、apigenin、baicalein、wogonin、chrysin 及 acacetin 等黃酮類的主要活性成份。本研究以 60% 乙醇及溫度 333 K 下連續熱迴流抽取黃芩，其抽取液經減壓濃縮至乾，再經氯仿及水連續分配萃取後，分為氯仿及水可溶層。氯仿可溶層以矽膠吸附，進行管柱層析分離，經 hexane- ethyl acetate (1:5) 洗脫沖提，得到兩個區分(fraction C1, C2)。藉由高效液相層析儀(HPLC)分析，經過與標準品之滯留時間及圖譜比對，確定 C2 區分(fraction C2)為 baicalin 成份；C1 區分(fraction C1)繼續以 LiChrospher RP-18 管柱層析進行分離，經 20% 甲醇沖提，依序得到 wogonin、chrysin 及 acacetin 等三成份。水可溶層之各成份有待進一步分離研究。

關鍵字：黃芩、管柱層析、baicallein、baicalin、wogonin



一、前言

黃芩為唇形科植物黃芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的根，近代的臨床研究[1]顯示，黃芩於大白鼠受不同作用機轉之肝毒化物所誘發的肝纖維化與脂質過氧化具有顯著的抑制作用。Shimizu 等人[2]亦證實，黃芩可抑制小白鼠的肝纖維化及肝癌成長。

在單一成份藥理學之研究方面，發現黃芩中的 acacetin、apigenin、baicalleins、baicalin、chrysin 及 wogonin 等成份分別具有某些特殊療效，如抗肝癌[3]、膀胱癌[4]、乳癌[5]、胃癌[6]、前列腺癌[7]、胰臟癌[8]與腸癌[9]等，以及保肝[10]、抗心血管疾病[11]、抗過敏[12]及抗發炎[13]作用等。由以上研究結果得知，黃芩不僅具有保肝作用，亦為一擁有抗腫瘤與治療肝癌效果的中草藥。

本研究以乙醇熱迴流抽取黃芩，其抽取物藉由各種條件的管柱層析分離出上述數種活性成份。研究結果不僅可提供後續的抗肝癌藥理學研究外，亦對於中草藥抽取及分離純化技術的提昇有所助益。

二、研究方法

2.1 藥材之基源鑑定

經港香蘭藥廠(Kaiser Pharmaceutical CO.)以顯微及外觀鑑定，確定為藥用黃芩。

2.2 水份測定

將黃芩的根研磨成一定顆粒大小的粉末後，稱取一定重量置於 105°C 烘箱中乾燥至恆重，以測定黃芩之水份含量，測定結果得其水份含量為 11.5 %。本研究後續所有抽取量的計算均以乾基(dry basis)為基準。

2.3 溶劑抽取

量取一定重量研磨後的黃芩，置於抽取瓶中，加入一定量的溶劑，於設定溫度下加熱迴流抽取。抽取液以高效液相層析儀(HPLC)測定 baicalleins 等成份之濃度。

2.4 分析方法

1. 紫外光/可見光分光光譜儀(UV/Visible spectrophotometer)：

UV/Visible spectrophotometer 為 Hitachi 公司產製的 U-3000 型，其量測波長範圍為 190-700 nm，光譜頻寬為 2.0nm，掃描速度為 400 nm/min。測量時以酒精為背景值，以測量各成份之吸收度(Abs)

2. 高效率液相層析儀 (HPLC) :

本研究中baicalein等各成份之標準品購自Aldrich公司，藉由與標準品的HPLC分析比對，以決定抽取液中各成份的濃度。HPLC係JASCO公司產製，幫浦為PU-986智慧型高壓幫浦；偵測器為UV/Vis光電二極體(photodiode)偵測器(MD-910)。分離管柱為Inertsil 5C₁₈ ODS-2的逆向管柱，管柱內徑4.6 mm、長度250 mm。分析中烘箱溫度控制在45°C，流動相為0.1% H₃PO₄水溶液(A)與CH₃CN (B) 的混合溶液，分析開始至第8分鐘(0-8 min)之A/B為78/22 (v/v)；8-25 min之 A/B由78/22變至77/23 (v/v)；25-60 min之A/B由77/23變至57/43 (v/v)；60~70 min之 A/B由57/43變至78/22 (v/v)。流速變化於0-25min由1mL/min升到1.5mL/min，於25-32min再下降至1mL/min，於32-55min保持1mL/min，於55-60min降到0.5mL/min，於60-70min升至1mL/min。偵測波長為280nm。

2.5 黃芩HPLC指紋圖譜的建立

量取一定重量研磨後的黃芩，置於抽取瓶中，加入一定體積的乙醇水溶液，於設定溫度下加熱迴流抽取。取適量抽取液以0.45 μm的Millipore 薄膜過濾後，以HPLC進行分析。比對標準品成份的滯留時間與紫外線(UV)吸收圖形，以確定所有已知指標成份的HPLC層析圖，建立黃芩生藥之HPLC指紋圖譜。

2.6 黃芩指標成份的定量

比對六種標準品與抽取液的UV吸收圖譜及滯留時間，確定各個指標成份後，再以檢量線分別計算各指標成份之含量。

2.7 回收率測定

精秤一定重量研磨後的黃芩，添加約兩倍量各成份之標準品，隨即進行成份抽取與HPLC分析。回收率之計算式如下：
$$\text{Recovery}(\%) = \frac{A - B}{C} \times 100\%$$

其中A為HPLC分析所偵測的成份總含量，B為未添加標準品時HPLC分析所偵測的成份含量，C為添加標準品的成份含量。

2.8 黃芩抽取物活性成分之分離

於溫度333 K下，以60%乙醇連續熱迴流抽取黃芩三次，其抽取液經減壓濃縮至乾，再經氯仿-水(1:1)連續分配萃取三次後，分為氯仿及水可溶層。各分層再藉由不同的吸附

劑、沖提液及沖提流速等條件，以進行各成份之分離。

2.9 氯仿可溶層矽膠管柱層析

取適量氯仿可溶層溶液吸附於矽膠（230~400 mesh）中，以濕式法充填入管柱中進行管柱色層分析（玻璃管柱 6×90 cm，silica gel 500g），再經正己烷：乙酸乙酯（5：1）為沖提劑，流速1mL/ min進行初步洗脫分離，每5mL收集成一瓶，共得到240瓶。每一瓶洗脫液並以UV₂₈₀光譜偵測，獲得兩個區分(fraction C1, C2)。第70-150瓶為C1區分(fraction C1)；第197-223瓶為C2區分(fraction C2)的範圍。

2.10 氯仿可溶層RP-18管柱層析

取適量的C1區分(fraction C1)樣品，使用LiChrospher RP-18作為吸附劑（玻璃管柱 3×60 cm，RP-18, 70g），以甲醇：水（1：5）作為沖提劑洗脫，流速0.5mL/ min，每1mL收集為一瓶，共收集到512瓶。經UV₂₈₀偵測，得到四個區分(fraction I-IV)。第7-115瓶為Fraction I；第122-227瓶為Fraction II；第247-346瓶為Fraction III；第380-480瓶為Fraction IV。

三、結果與討論

3.1 黃芩 HPLC 指紋圖譜的建立

圖 1(B)為 60 % 乙醇水溶液於 60°C 下抽取黃芩 1 小時所得之抽取液的 HPLC 層析圖譜。雖然於圖譜的前 10 分鐘有波峰糾結之情形，但在 baicalin 等六種黃酮類活性成份波峰出現處的 16-63 分鐘間並無發生波峰重疊的現象；經與標準成份的滯留時間及 UV 圖譜(圖 1(A)) 比對，可確定為 baicalin 等六種目標活性成份無誤，由此可建立黃芩之 HPLC 指紋圖譜。中草藥指紋圖譜可作為中草藥定性與定量的標準層析圖，藉由各成份的定性與定量分析，以達到生藥及製劑品質管制的要求。圖 1 亦可看出，baicalin 等六種成份的極性大小順序；雖然此等成份均為黃酮類，但由於結構上連接不同種類的取代基，以及其連接位置不同，以致於造成極性上的差異。baicalin 等各成份之化學結構式如圖 2 所示。

上述六種黃酮類成份中，baicalin 含有五個羥基(-OH)及一個羧酸基(-COOH)，因為此兩種基團均能形成氫鍵，可以增加物質的極性，故極性最強；其次，由於apigenin之A及C環分別連接兩個及一個羥基，極性居次；baicalein因為三個極性的羥基均集中於A環上，當形成氫鍵過程中會有立體障礙之發生，致極性較apigenin低。另外，wgonin、chrysin及acacetin

等三成份之結構非常相似，均僅含有兩個羥基。其中wogonin於A環上同時連接一個OCH₃基，在結構的對稱性上較差，形成較大的隅極距，致極性較chrysin及acacetin略強；chrysin之結構上沒有OCH₃基，極性居次；acacetin之C環因連接一個OCH₃基，結構的對稱性上較佳，形成較小的隅極距，致極性較chrysin略低。

3.2 黃芩提取物活性成分之分離

3.2.1 黃芩提取物的分配萃取

為簡化後續管柱層析之難度，首先將黃芩提取物依極性劃分為氯仿及水可溶層。HPLC層析圖譜(圖3)顯示，氯仿層含有極性較低的wogonin、chrysin、acacetin及baicalein等四成份；極性相對較高的baicalin、apigenin等二成份及少量的baicalein則被分配萃取至水層中。因為baicalein在水層中含量與氯仿層比較，顯得甚為微量，因此，本研究於水層之分離主要係以baicalin及apigenin為目標。

3.2.2 baicalein 的分離

氯仿可溶層矽膠管柱層析之分離狀況如圖4所示。其中第197-223瓶洗脫液(fraction C2)經HPLC(圖5)及UV(圖6)鑑定，可確定為baicalein。矽膠適用於適用於中性或酸性成分的層析，可利用欲分離成份與吸附劑之間產生氫鍵數目的差異，以進行分離。因氯仿可溶層中，baicalein與其他三種目標成份(wogonin、chrysin及acacetin)所含有的羥基(-OH)明顯不同，並且HPLC層析圖譜(圖1)中的極性差異亦相當明顯，故於正相的矽膠管柱層析中，即可分離獲得。

3.2.3 wogonin、chrysin 及 acacetin 的分離

氯仿可溶層中其他三種目標成份(C1區分，第70-150瓶)因極性非常接近，需繼續以逆相長碳鏈的LiChrospher RP-18管柱層析分離，經甲醇：水(1：5)作為沖提劑，以較慢的流速進行洗脫，其管柱分離狀況如圖7所示。其中Fraction I(第7-115瓶)、Fraction II(第122-227瓶)及Fraction III(第247-346瓶)藉由HPLC(圖8-10)及UV(圖11-13)分析，分別被鑑定為wogonin、chrysin及acacetin。RP-18含有18個長碳鏈，可依成份的親脂性能力進行精細分離。wogonin, acacetin與chrysin等三成份雖然於A環上均含有兩個極性的親水基(羥基)，但C環上分別連接不同的親脂性基團，故此等三成份均具有強烈的親脂性，於逆相RP-18管柱層析中可得到良好的吸附分離，而各成份被洗脫之順序正如其極性的大小順序。

四、結論

本研究建立了同時分析黃芩中 acacetin、apigenin、baicalleins、baicalin、chrysin 及 wogonin 等六種成份的 HPLC 分析方法，以及黃芩提取液的 HPLC 指紋圖譜。並且完成了黃芩提取液中氯仿層之分離方法。本研究計畫之研究成果，不僅於抗癌藥物研發上極具參考價值，除了可提供後續抗癌藥理學研究外，同時對於中藥製程中抽取及分離技術的改進與提昇亦有所貢獻。



五、参考文献

1. Cechinel, F.V., Santos, A. R., De Campos, R. O., Miguel, O.G, Yunes, R. A., Ferrari, F., Messana, I., Calixto: Chemical and Pharmacological studies of *Phyllanthus carolinensis* in mice, *J. Pharm. Pharmacol.*, 48,1231-1236 (1996).
2. Nan, J. X., Park, E. J., Kim, Y. C., Ko, G., and Sohn, D. H., *Scutellaria baicalensis* inhibits liver fibrosis induced by bile duct ligation or carbon tetrachloride in rats, *J. pharm. Pharmacol*, 54 (4), 555-563 (2002).
3. Chang, W.H., Chen C.H., Lu F. J., Different effects of baicalein, baicalin and wogonin on mitochondrial function, glutathione content and cell cycle progression in human hepatoma cell lines. *Planta Med.*, Feb, 68(2), 128-32(2002).
4. Ikemoto, S., Sugimura, K. Yoshida, N., Yasumoto, R., Wada, S., Yamamoto, K., and Kishimoto, T., Antitumor effects of *Scutellariae radix* and its components baicalein, baicalin and wogonin on bladder cancer cell lines, *Urology*, 55, 951-5 (2000).
5. So, F. V., Guthrie, N., Chambers, A. F., and Carroll K. K., Inhibition of proliferation of estrogen receptor-positive MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids in the presence and absence of excess estrogen, *Cancer latter*, 112,127-33 (1997).
6. Wong, B. C., Wang, W. P. Cho, C. H. and Lam, S. K., 12-Lipoxygenase inhibition induced apoptosis in human gastric cancer cells, *Carcinogenesis*, 22, 1349-54 (2001).
7. Chen, S., Ruan, Q., Bedner, E., Deptala, A., Wang, X., Hsieh, T.C., Traganos, F., Darzynkiewicz, Z., Effects of the flavonoid baicalin and its metabolite baicalein on androgen receptor expression, cell cycle progression and apoptosis of prostate cancer cell lines, *Cell Prolif*, Oct, 34(5), 293-304(2001).
8. Motoo, Y., and Sawabu, N., Antitumor effects of saikosaponins, baicalin and baicalein on human hepatoma cell lines, *Cancer letters*, 86, 91-5 (1994).
9. Kuntz, S., Wenzel, U., and Daniel, H., Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines, *European Journal of nutrition*, 38, 133-42 (1999).
10. Kimuya, Y., Kubo, M, Tani, T., Arichi, S. and Okuda, H., Studies on *Scutellaria Radix* IV, Effects on lipid peroxidation in rat liver, *Chem. Pharm. Bull.*, 29, 2610-2617 (1981).
11. Takizawa, H., Dellipizzi, A. M. and Nasjletti, A., Prostaglandin contributes to the vasoderpressor effect of baicalein in hypertensive rats, *Hypertension*, 31, 886-71 (1998).
12. Nakahata, N., Kutsuwa, M., Kyo, R., Kubo, M., Hayashi, K., and Ohizumi, Y., Analysis of inhibitory effects of *hscutellariae radix* and baicalein on prostaglandin E2 production in rat C6 glioma cells, *American journal of Chinese medicine*, 67, 132-5 (2001).

13. Wakabayashi, I., Inhibitory effects of baicalein and wogonin on lipopolysaccharide induced nitric oxide production in macrophages, *Pharmacology and toxicology*, 84, 288-91 (1999).



六、圖表

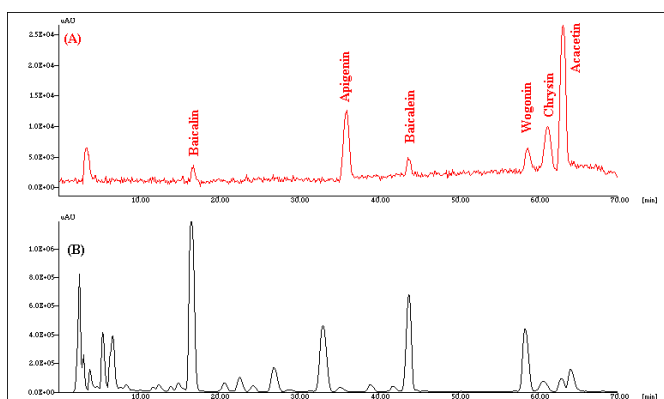


圖 1 黃芩的 HPLC 指紋圖譜 ((A)：標準品；(B)：60°C，60% ethanol solution 抽取 1h 之黃芩抽取液)

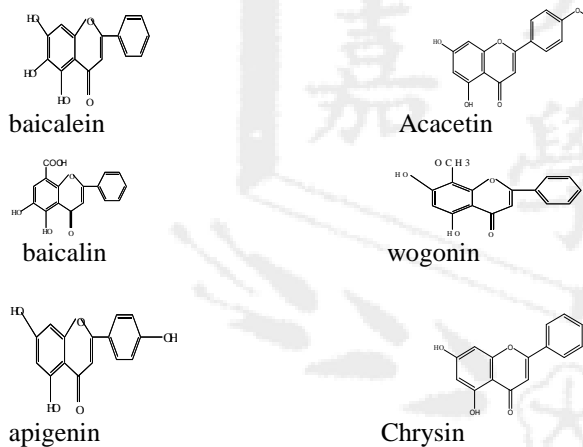


圖 2 baicalein 等各成分之分子結構式

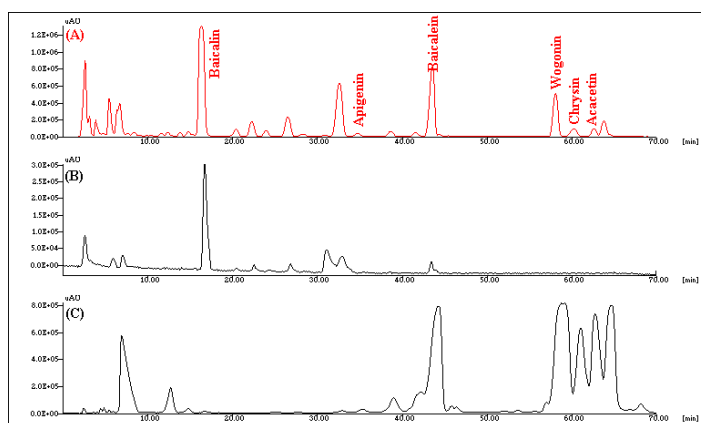


圖 3 黃芩乙醇抽取液及水可溶層與氯仿可溶層的 HPLC 層析圖：(A) 黃芩抽取乙醇水溶液，60°C，1h，60% ethanol；(B) 水可溶層；(C) 氯仿可溶層

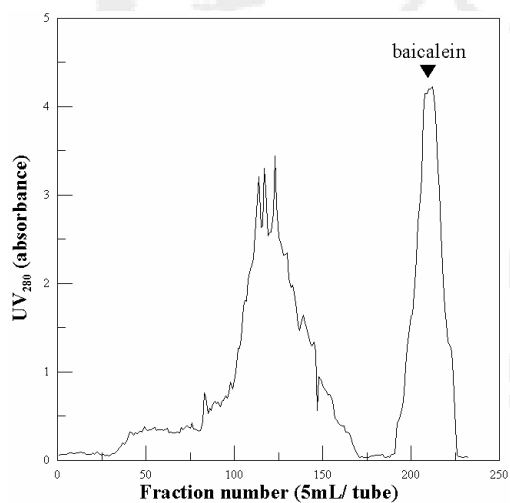


圖 4 黃芩氯仿可溶層矽膠管柱層析沖提圖：以沖提劑正己烷：乙酸乙酯沖提（5：1），流速 1mL/ min。第 197-223 瓶為 baicalein

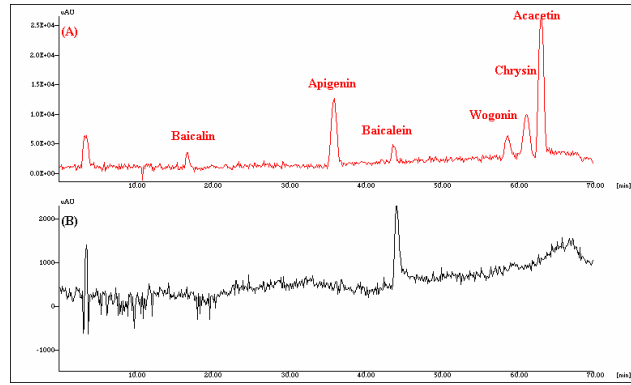


圖 5 baicalein 與標準品之 HPLC 層析對照圖：(A) 為標準品；(B) 為矽膠管柱層析分離獲得之 baicalein

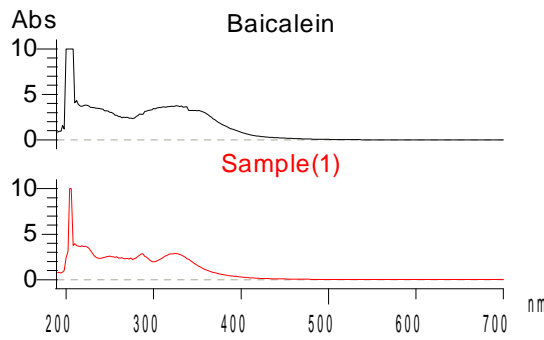


圖 6 baicalein 與標準品之 UV 對照圖：上為標準品；下為矽膠管柱層析分離獲得之 baicalein (sample 1)

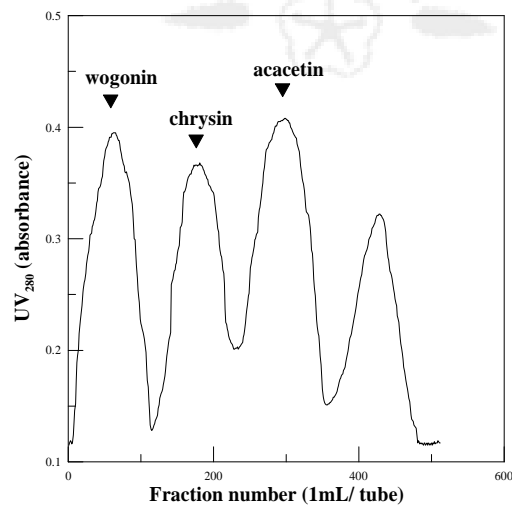


圖 7 氣仿可溶層 RP-18 管柱層析沖提圖：沖提劑為甲醇：水 (1:5)，流速 0.5mL/min。第 7-115 瓶為 wogonin；第 122-227 瓶為 chrysin；第 247-346 瓶為 acacetin

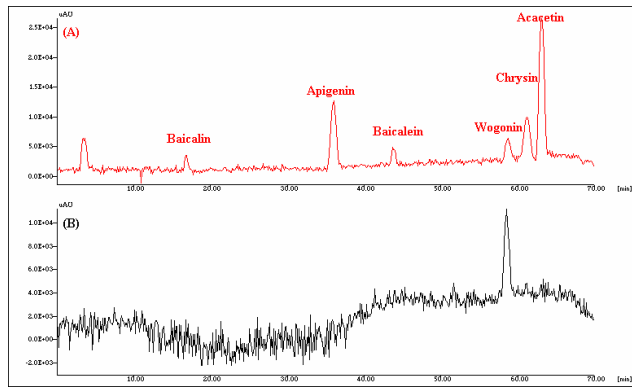


圖 8 wogonin 與標準品之 HPLC 層析對照圖：(A) 為標準品；(B) 為 RP-18 管柱層析分離獲得之 wogonin

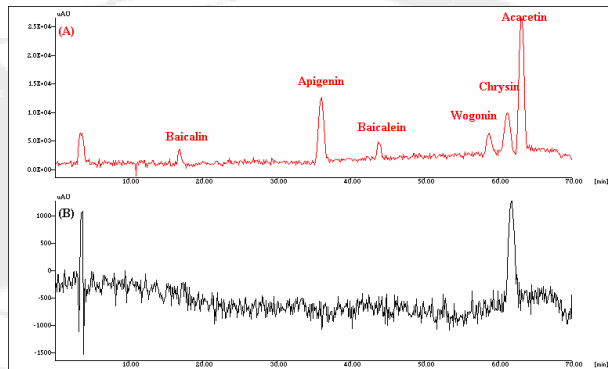


圖 9 chrysin 與標準品之 HPLC 層析對照圖：(A) 為標準品；(B) 為 RP-18 管柱層析分離獲得之 chrysin

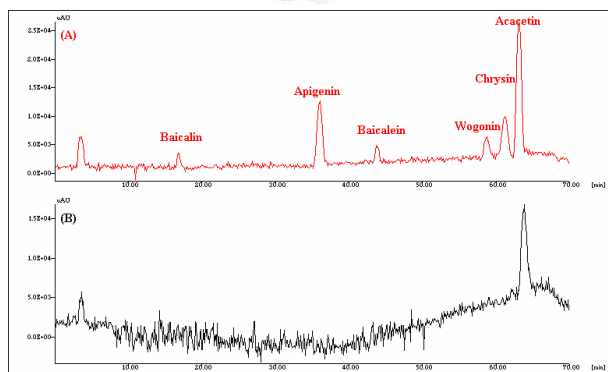


圖 10 acacetin 與標準品之 HPLC 層析對照圖：(A) 為標準品；(B) 為 RP-18 管柱層析分離獲得之 acacetin

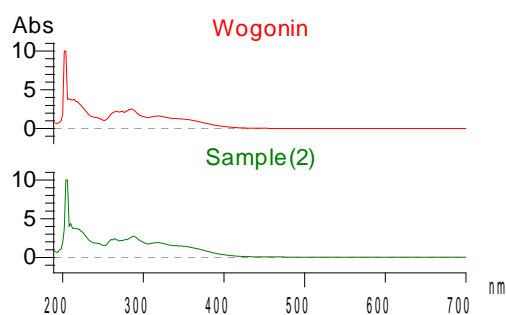


圖 11 wogonin 標準品與 RP-18 管柱層析分離獲得 wogonin 之 UV 對照圖：上為標準品；下為 RP-18 管柱層析分離獲得之 wogonin (sample 2)

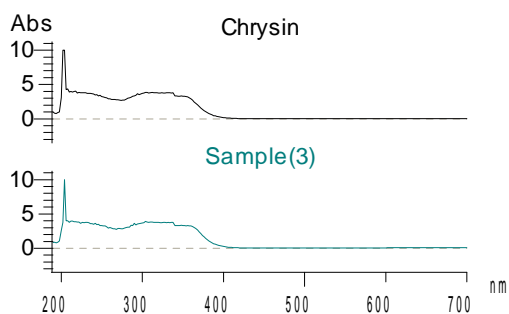


圖 12 chrysin 標準品與 RP-18 管柱層析分離獲得 chrysin 之 UV 對照圖：上為標準品；下為 RP-18 管柱層析分離獲得之 chrysin (sample 3)

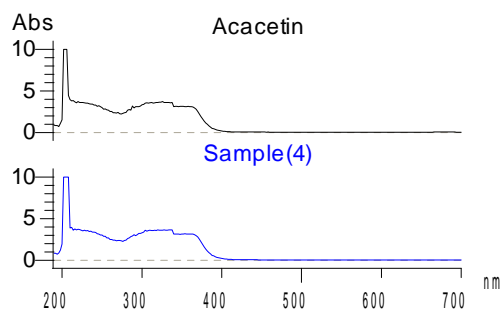


圖 13 acacetin標準品與RP-18管柱層析分離獲得acacetin 之UV對照圖：上為標準品；下為 RP-18管柱層析分離獲得之acacetin (sample 4)