嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫名稱

半枝蓮中保肝活性成份的分離研究

計畫類別：□個別型計畫　　□整合型計畫

計畫編號：CNPH9507

執行期間：95 年 1 月 1 日至 95 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：嘉南藥理科技大學藥學系

中華民國　96　年　2　月 27　日

1. 前言

半枝蓮是唇形科黃芩屬植物狹葉韓信草（*Scutellria barbata Don*）之乾燥全草，近年來臨床研究顯示〔1〕，半枝蓮之水抽取物對於大白鼠受 D-半乳糖胺 (D-galactosamine)、對位乙醯胺酚 (acetaminophen)及四氯化碳等三種不同化合物之肝毒化物，所誘發之肝細胞損傷具有顯著的抑制作用。詹等人〔2〕之研究發現，半枝蓮之抽取物對於小白鼠腹水癌也有抑制作用。另外 Chou〔3〕以及後續多位學者〔4, 5〕之研究發現，半枝蓮所含成份中具有保肝作用之主要成份為 baicalein、baicalin 及 wogonin 等。

半枝蓮單一成份的保肝與抗腫瘤藥理學研究方面，Kimuya 等人〔6〕曾於小白鼠投與過氧化脂質(lipid peroxidation)類之物使形成高脂血症後，分別經口投與 baicalein、baicalin 及 wogonin 等，發現此三種成份均具有抗氧化能力，而可預防肝細胞的障害；Abe 等人〔7〕發現，baicalein 與 baicalin 具有促進大白鼠膽汁分泌的作用；Lin 與 Shieh〔8〕使用 D-半乳糖胺、對位乙醯胺酚及四氯化碳等三種不同化合物之肝毒化物，誘發大白鼠產生肝細胞障礙，以分別評估 baicalein、baicalin 及 wogonin 等三種成份各別之抗炎症與保肝作用，結果發現此三種成份均具有抗炎症與保肝之作用，其中以 baicalin 之抗炎作用最佳，而 wogonin 有較好的保肝效用。抗腫瘤方面，陳與呂〔9〕分別以 baicalein、baicalin 及 wogonin 等成份，進行人類肝癌 Hep G2 (hepatoblastoma G2)細胞株之抗腫瘤作用評估，結果顯示此三種成份皆具有抗腫瘤的活性，其中以 baicalein 的效果最佳；同樣地，王與黃〔10〕發現 baicalein 能有效抑制接種性腫瘤的生長(人類肝癌 Hep G2 細胞株)；高與呂〔11〕之研究結果顯示，baicalein 尚可抑制 T 淋巴腫瘤細胞株的生長。此外，半枝蓮之芹菜素（apigenin）與木犀草素（luteolin）對人類前列腺癌有毒殺與抑制作用〔12〕，而半枝蓮中的 naringenin 亦被證實具有抑制胸腔癌細胞增生之作用〔13〕。由以上的研究結果得知，半枝蓮不僅具有保肝作用，亦為一擁有抗腫瘤與治療肝癌效果的中草藥。

本研究以乙醇加熱迴流抽取半枝蓮中具有抗腫瘤等活性成份，其抽取物以各種溶劑分配萃取，並利用 HPLC 分析各分層中之各成份分怖情形。各分層中之各成份分離有待矽膠管柱層析、薄層層析等方法作進一步的分離。研究結果不僅可提供後續的抗腫瘤藥理學研究外，對於中草藥分離技術的提昇亦有助益。

2、研究方法

2.1 水份測定

將半枝蓮全草研磨成一定顆粒大小的粉末後，稱取一定重量置於 105℃烘箱中乾燥至恆重，以測定半枝蓮之水份含量，測定結果得其水份含量為 12.1 %。本研究後續所有抽取量的計算均以乾基(dry basis)為基準。

2.2 HPLC分析條件

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 $5C_{18}$ 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℃，流動相為 0.1% H_3PO_4 水溶液(A)與 CH_3CN (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) ，流速為 1 mL/min；8-25 min 之 A/B 為 78/22 至 77/23 (v/v) ，流速為 1 mL/min ；25-32 min 之 A/B 為 77/23 (v/v) ，流速為 1.5 mL/min ；32-40min 之 A/B 為 77/23 (v/v) ，流速為 1 mL/min ；40-60 min 之 A/B 為 77/23 變至 30/70 (v/v) ，流速為 1 mL/min 。

2.3 檢量線的製備

將baicalein、baicalin、naringenin、luteolin、apigeninn及wogonin等六種半枝蓮活性成份之標準品溶於乙醇中，混合配製成所需之濃度，取25μL注入HPLC分離管進行分析，分別計算六種標準品吸收峰面積與濃度的比值，而得六條檢量線。

2.4半枝蓮HPLC指紋圖譜的建立

量取一定重量研磨後的半枝蓮，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，建立半枝蓮生藥之 HPLC 指紋圖譜。

2.5 半枝蓮指標成份的定量

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。

2.6 回收率測定

精秤一定重量研磨後的半枝蓮，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： $\mathrm{Recovery}(\%) = \frac{A-B}{C} \times 100\%$

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。

2.7 成份的分離

乙醇水溶液的抽取濾液經減壓濃縮後所得抽出物，再分別以正己烷、氯仿、乙酸乙酯及水等分別進行多次分配萃取，並配合 HPLC 分析，以確定指標成份於各種溶劑分配萃取分層之分佈情形。

3、結果與討論

3.1 HPLC 分析方法之定性分析

半枝蓮中 baicalin 等六種標準品於某一濃度下之 HPLC 層析圖譜如圖 1(a)所示，顯示於 60 分鐘內各成份均可達到良好的分離。此外，比較圖 1(a)、1(b)與 1(c)發現，在不同的 UV 偵測波長下，相同濃度的六種標準品具有不同之吸收波蜂強度；雖然並非每一成份之最強吸收波蜂均在 280 *nm* 波長，然而以六種標準品之波蜂強度為整體考量時， 280 *nm* 為較佳的吸收波長。由於本研究須同時分析六種標準品，所以必需對於各個標準品的 UV 吸收波長作整體考量，以達到每一成份在某吸收波長下均有一定的波蜂強度，故後續所有的分析均以吸收波長 280 *nm* 作為基準。

3.2 HPLC 分析方法之定量分析

表一為 baicalin 等六種標準品的檢量線資料，顯示線性化係數(R)平方介於 0.995-0.999 之間，此意謂著這六條檢量線均具有一定水平之線性關係。為了檢驗此六條檢量線的精確性，本研究分別選用高、中、低三種濃度以查核檢量線之確效；表二顯示，intraday 及 interday 兩者之變異係數均小於 5%，表示此分析方法之精確性與再現性均值得信賴。

3.3 半枝蓮 HPLC 指紋圖譜的建立

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 2 顯示，於 HPLC 分析半枝蓮的前 10 分鐘，雖然有波蜂糾結之情形，但在六種標準品波蜂出現處的 15-58 分鐘間並無發生波蜂重

疊的現象；經與標準成份的滯留時間及 UV 圖譜比對，可確定為本研究所要的六種目標活性成份無誤，由此可建立半枝蓮之 HPLC 指紋圖譜。

3.4 半枝蓮指標成份的定量

表三為於溫度 50℃、抽取時間 1 小時下，不同濃度乙醇水溶液之成份抽取量。表中發現於 50 至 80%乙醇水溶液中，各成份可達其最高抽取量。這些結果表示黃酮類骨架上所連接的不同基團，對於純水與乙醇有不同的親和力。baicalein 等各成份之化學結構式如圖 3 所示，顯示各成份均為黃酮類的成份。此外，表中亦發現於這六種成份中以 apigenin 的抽取量最多，而 wogonin 的抽取量最少。

3.5回收率測定結果

量取5g研磨後的半枝蓮，以60%的乙醇水溶液30mL於333K下抽取1小時，過濾後之藥渣再以相同條件抽取一次，經過濾後合併前後兩次抽取之濾液。濾液經減壓濃縮後，以HPLC定量抽取液中各成份之含量，如表四所示。由此結果發現baicalein等各成份之回收率介於91-95 %，其相對標準偏差(R.S.D.)為3.9 %至5.1 %。

3.6 成份分離結果

3.6.1 正己烷萃取分層

抽出物之正己烷分配萃取分層經 HPLC 分析，結果如圖 4 所示。圖中顯示，於滯留時間的前 50 分鐘內幾乎沒有任何 UV 吸收波蜂，所有的吸收波蜂均集中於 50-70 分鐘間，且各吸收波蜂間有相互重疊的現象，以致較難判斷是否有某一成份的存在，而造成定量上的困難。因為於本研究的 HPLC 分析條件下，baicalin、lutolin、naringenin 及 aprigenin 等成份的 UV 吸收波蜂之滯留時間分別為 17.2 min、21.4 min、34.8 min 及 37.7 min，而此分層的前 50 分鐘內幾乎沒有無任何吸收波蜂，由此，可確定無 baicalin 等四成份的存在；雖然於滯留時間 50-60 分鐘間有吸收波蜂，而 baicalein 及 wogonin 等的吸收波蜂滯留時間亦分佈於此段時間內，但本研究曾以正己烷為溶劑於溫度 50℃下進行抽取，而非極性的正己烷不能溶解極性的黃酮類成份。據此推測於滯留時間 50-60 分鐘間之吸收波蜂，應非 baicalein 及 wogonin，而是屬於非極性的脂類。

3.6.2 氯仿萃取分層

抽出物之正己烷分配萃取的下層液，繼續以氯仿進行分配萃取，其 HPLC 層析圖如圖

5 所示。與標準品的滯留時間及吸收波蜂比較，可明顯發現此分層中有 baicalein 等六成份之存在，表示氯仿對於黃酮類成份具有極佳的親和力。至於各成份的單離，可用矽膠管柱層析、薄層層析等方法分離。

3.6.3 乙酸乙酯萃取分層

抽出物經氯仿分配萃取後的下層液，續以乙酸乙酯分配萃取，其萃取分層液並以 HPLC 分析，結果如圖 6 所示。與標準品之 HPLC 層析圖譜(圖 1) 的 滯留時間及吸收波蜂比較，發現乙酸乙酯分層中亦有 baicalin、lutolin、baicalein 及 wogonin 等四種成份之存在。這顯示抽出物中的六種目標成份於氯仿分配萃取時，尚有殘留之成份，亦表示乙酸乙酯與此四種成份具有良好的相溶性。

3.6.4 水萃取分層

抽出物經各溶劑分配萃取後的下層液(水萃取分層)，藉由 HPLC 分析。觀察比較水萃取分層(圖 7)與標準品(圖 1)之 HPLC 層析圖的 UV 吸收波蜂，並未查核到 baicalin、lutolin、naringenin 及 aprigenin 的吸收波蜂，但顯示還有少量的 Baicalein 及 Wogonin 殘餘在此萃取分層中。

4、結論

本研究於實質上建立了半枝蓮生藥之 HPLC 指紋圖譜，可作為半枝蓮定性與定量的標準層析圖，藉由各成份的定性與定量分析，以幫助生藥及製劑的品質控管。成份分離方面，選用正己烷、氯仿、乙酸乙酯及水對於抽出物進行多次分配萃取，顯示六種目標成份均分怖於氯仿層，亦有 Baicalin、Lutolin、Baicalein 及 Wogonin 等四成份較少量分配於乙酸乙酯層；於最後水層已幾乎無目標成份殘餘。表示氯仿對於本研究的六種目標成份具有極佳的選擇性，可用管柱層析、薄層層析等方法分離。

5、參考文獻

1. Lin, S. C., Lin, C. C., Lin, Y. H. and Chen, C. H., “Protective and Therapeutic Effects of Ban-Zhi-lian on Hepatotoxin-induced Liver Injuries”, Am. J. Chin. Med., 22, 29-42(1994).
2. 詹鎮遠，指導教授林進丁，郝道猛，朱康初及莊榮豐，百花蛇舌草與半枝蓮抗實驗性腹水癌及肉瘤 180 效應之研究，中國醫藥學院，中國藥學研究所碩士論文，73 學年度。
3. Chou, C. J., “A New Favone from Scutellaria Rivularis”, J. Taiwan Parm. Assoc., 30, 36-43(1978).
4. Miyaichi, Y. and Tomimori, T., “Studies on the Constituents of Scutellaria Species XVI, On the Phenol Glycosides of the Root of Scutellaria Baicalensis Georgi”, Natural Med., 48, 215-218(1994).
5. Tomimori, T., Imoto, Y. and Miyaichi, Y., “Studies on the Constituents of Scutellaria Species XII, On the Flavonoid Constituents of Root of Scutellaria Rivularis Wall”, Chem. Pharm. Bull., 38(12), 3488-3490(1990).
6. 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).
7. Abe, K., Inoue, O. and Yumioka, E., “Binary Excretion of Metabolites of Baicalin and Baicalein in Rats”, Chem. Pharm. Bull., 38(1), 208-211(1990).
8. Lin, C. C. and Shieh, D. E., “In Vivo Hepatoprtective Effect of Baicalin, Baicalein and Wogonin from Scutellaria Rivalaris”, The Bull. Of Society of Pharmacognosy, R.O.C., NO. IV, pp. 69-70(1996).
9. 陳俊憲，指導教授呂鋒洲，第一篇: Baicalein 引發人類肝癌細胞計畫性死亡作用機轉的研究第二篇:Shikonin 引發人類肝癌細胞計畫性死亡作用機轉的研究，臺灣大學，生物化學研究所博士論文，89 學年度。
10. 王惠蓉，指導教授黃慧貞，植物成份對人類肝癌細胞 Hep G2 cells 及血管平滑肌細胞之作用及其機轉之研究，臺灣大學，藥理學研究所碩士論文，82 學年度。
11. 高榮駿，指導教授呂鋒洲，(1)腐植酸對內皮細胞的作用；(2) Baicalein 抗癌機轉探討，臺灣大學，生物化學研究所博士論文，89 學年度。
12. Kobayashi, T., Nakata, T. and Kuzumaki, T., “Effect of Favonoids on Cell Cycle Progression in Prostate Cancer Cells”, Cancer Lett., Feb 8, 176 (1), 17-23(2002).
13. Bear, Wol. And Teel, R. W., Anticancer Res., 20, 3609 (2000).

6、圖表

表一　半枝蓮中六種指標成份的HPLC檢量線資料

Compound	R. t. (min)	Calibration curve	R^2
baicalin	17.2	Y=0.0001496x+3.17863; Calibration range (ug/mL): 6-180 Data points:14	0.995
lutolin	21.4	Y=0.000242x-1.52173 Calibration range (ug/mL): 6-200 Data points:14	0.997
naringenin	34.8	Y=0.00016947x+5.8472 Calibration range (ug/mL): 6-200 Data points:14	0.997
aprigenin	37.7	Y=0.00015716x+3.10006 Calibration range (ug/mL): 5-400 Data points:10	0.998
baicalein	50.1	Y=0.00008448x+4.39065 Calibration range (ug/mL):6-200 Data points:10	0.998
wogonin	56.2	Y=0.000021695x+0.4529 Calibration range (ug/mL): 4-20 Data points:10	0.997

表二　半枝蓮中六種指標成份於同日間(Intrayad)與異日間(interday)之確效

Standard	concentration (ug/mL)	R.S.D. Intraday (n=6)	Interday(n=6)
wogonin	18	3.31	3.73
	10	3.40	3.64
	6	4.52	4.89
baicalein	150	2.72	2.94
	20	2.56	3.03
	9	3.97	4.48
baicalin	150	2.01	3.09
	20	2.49	3.02
	9	2.75	3.82
naringenin	150	2.18	2.63
	20	2.29	2.77
	9	2.53	2.98
luteolin	150	2.06	3.53
	20	2.27	3.26
	9	2.88	3.59
apigenin	300	2.87	3.05
	30	2.01	2.74
	9	2.97	3.51

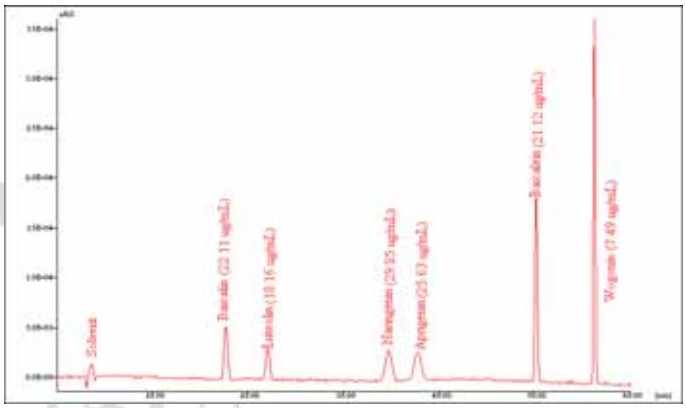
表三　溫度50℃、抽取時間1小時下，不同濃度乙醇水溶液之成份抽取量 (n = 3)

Concentration of ethanol (vol(%))	Component	Amount (mg/g)
0	apigenin	0.36191±0.0011
	baicalein	0±0.0
	baicalin	0.00993±0.000049
	luteolin	0.09221±0.00037
	naringenin	0±0.0
	wogonin	0.00494±0.000025
30	apigenin	0.81566±0.0024
	baicalein	0.01826±0.000071
	baicalin	0.07052±0.000346
	luteolin	0.18005±0.00067
	naringenin	0.04710±0.00023
	wogonin	0.01382±0.000047
50	apigenin	1.34198±0.0039
	baicalein	0.02156±0.000123
	baicalin	0.09774±0.00037
	luteolin	0.26788±0.00083
	naringenin	0.04887±0.00013
	wogonin	0.01869±0.000095
60	apigenin	1.52084±0.0041
	baicalein	0.02448±0.0 00093
	baicalin	0.10741±0.00031
	luteolin	0.31516±0.00132
	naringenin	0.0576±0.000213
	wogonin	0.01927±0.000066
80	apigenin	1.53533±0.0039
	baicalein	0.02510±0.0000115
	baicalin	0.09365±0.0000459
	luteolin	0.32306±0.00129
	naringenin	0.05405±0.0000276
	wogonin	0.0179±0.00000823
99.5	apigenin	0.43597±0.0019
	baicalein	0±0.0
	baicalin	0±0.0
	luteolin	0.0662±0.000357
	naringenin	0±0.0
	wogonin	0.00932±0.0000182

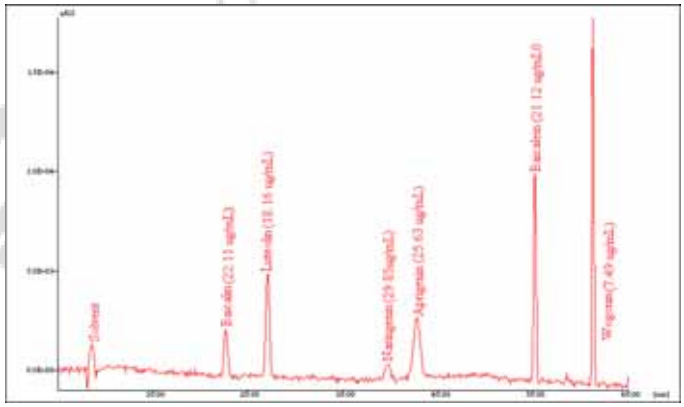
表四半枝蓮各成份的回收率

Component	Amount added (mg)	Recovery. (n = 3) mean	R.S.D.
apigenin	2.0	95	3.9
baicalein	0.2	93	4.5
baicalin	0.2	92	4.7
luteolin	0.4	94	4.2
naringenin	0.2	91	5.0
wogonin	0.1	91	5.1

(a) 280 *n*m



(b) 260 *n*m



(c) 300 *n*m

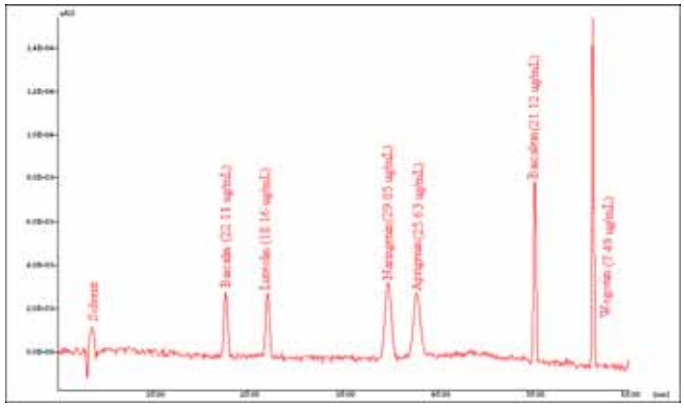


Fig. 1 半枝蓮中六種指標成份於某一濃度下之 HPLC 層析圖譜

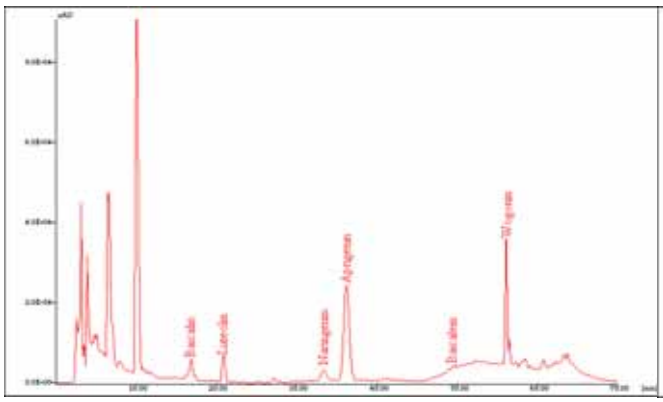


Fig. 2 半枝蓮生藥 HPLC 指紋圖譜 (280 *n*m)

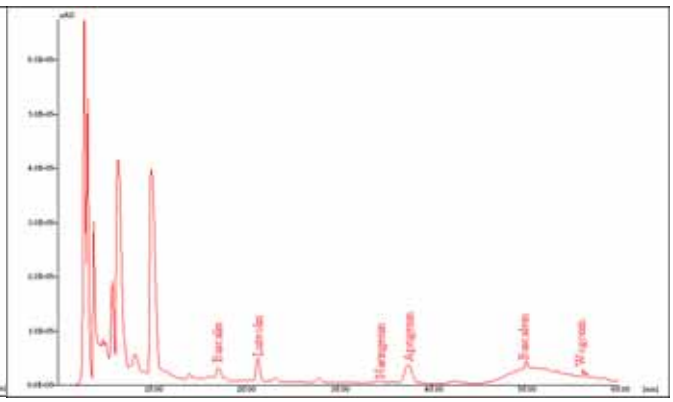


Fig. 5 氯仿分配萃取分層之 HPLC 層析圖譜 (280 *n*m)

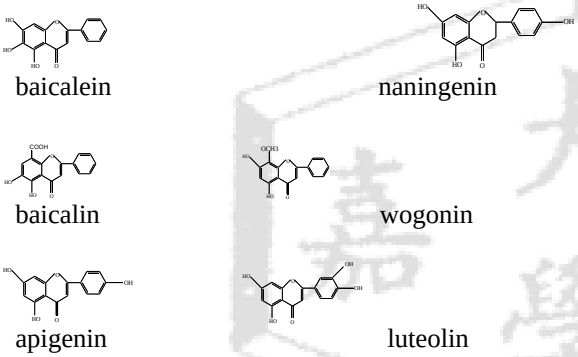


圖 3　baicalein 等各成分之分子結構式

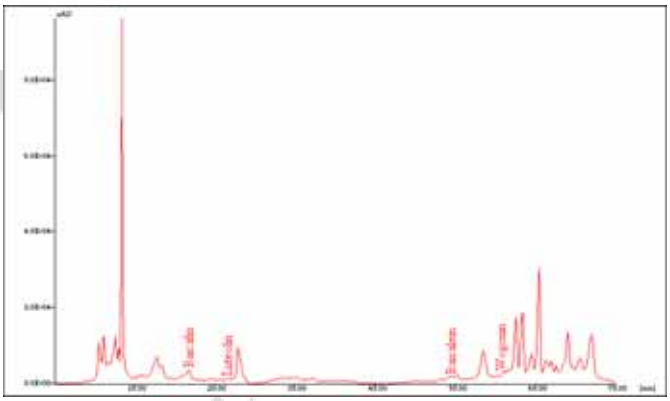


Fig. 6 乙酸乙酯分配萃取分層之 HPLC 層析圖譜 (280 *n*m)

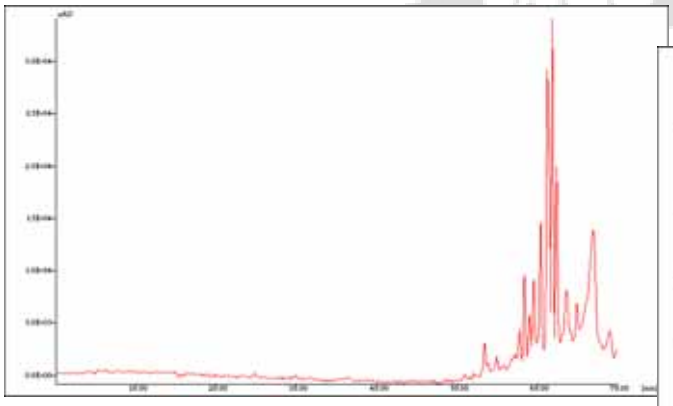


Fig. 4 正己烷分配萃取分層之 HPLC 層析圖譜 (280 *n*m)

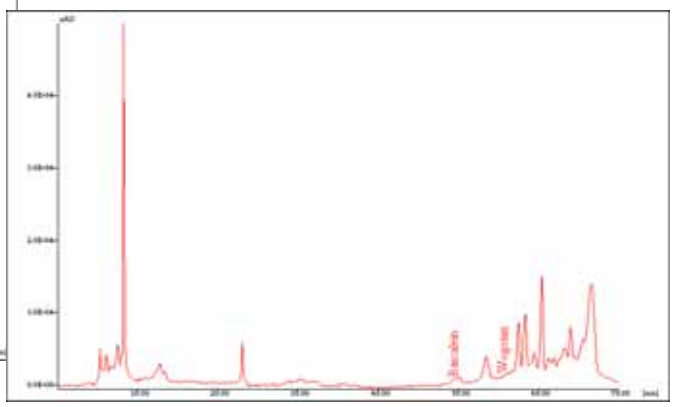


Fig. 7 水分配萃取分層之 HPLC 層析圖譜 (280 *n*m)