

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萃取與分離研究

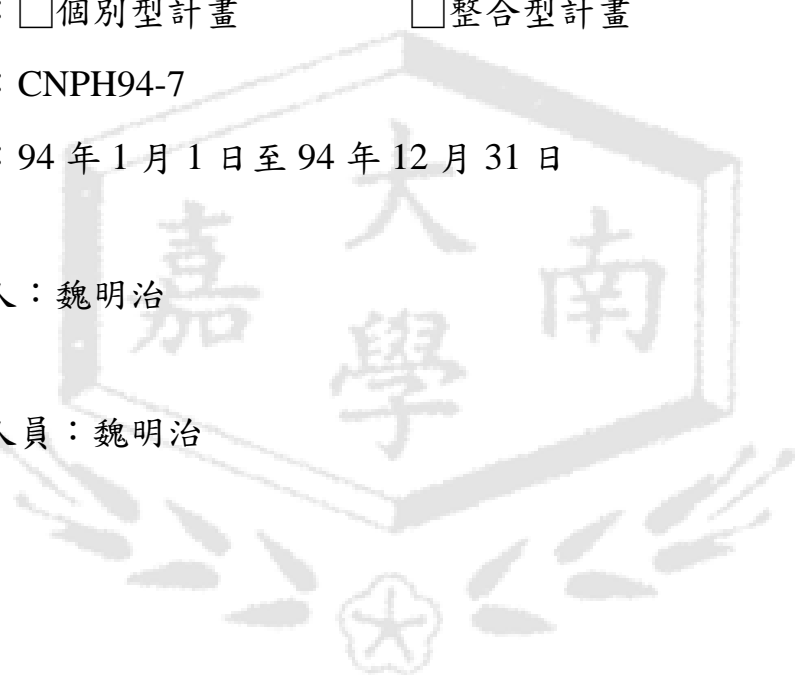
計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CNPH94-7

執行期間：94年1月1日至94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 95 年 2 月 24 日

一、前言

行政院衛生署的統計數據顯示[1]，在台灣地區，慢性肝病、肝硬化等疾病向來高居十大死亡原因之列；而惡性腫瘤自 71 年起，已經連續 20 年蟬聯國人主要死亡原因的榜首，其中肝腫瘤更是常年來（80-93 年）高居男性癌症主要死亡中的首位。此外，衛生署的統計資料亦顯示，癌症死亡人口有逐年增加的趨勢，且此種趨勢預估仍將持續，同時部份癌症更有年輕化傾向；全民健保每年支付癌症治療費即高達新台幣 100 億元，平均每位癌症病人每年約需花費 14 萬元的健保資源。Safary 與 Beck [2]於 1980-1999 年間的統計資料指出，亞洲地區國家之 B 型肝炎帶原者約佔全世界的 75%，而慢性 B 型肝炎患者中有 75-90% 的機率會轉變為肝癌，同時肝癌亦屬於世界十大癌症之一。因此，治療肝相關疾病的藥物研發，對於全民健康的保護，乃是一項相當重要之課題。

肝臟是人體內最大的腺體機器官，成年人之肝臟質量約為 1400-1600 公克，為體內進行代謝的主要場所。當肝臟受到損傷時，會產生發炎反應，輕微的可藉由免疫系統修復或肝細胞再生而恢復，但若傷害持續，而重複發炎，則會進一步惡化，造成肝纖維化(hepatic fibrosis) 及肝硬化(liver cirrhosis)。造成肝臟損傷的原因很多，大致上分為化學性傷害及病毒性傷害兩種，前者如酒精、藥物濫用或中毒；後者如 B、C 型肝炎病毒等。據研究顯示，於肝纖維化的過程中，肝臟內的各種細胞激素(cytokine)扮演著很重要之角色[3, 4]。肝臟細胞的損傷並非完全由毒物所引起，受損的細胞亦會吸引發炎細胞之聚集，進而活化內皮細胞及肝臟星狀細胞等，並持續地引起周圍的肝臟細胞受損，甚至死亡。Svegliati-Baroni 等人[5]於肝纖維化的動物體內實驗模式中，觀察到活性氧化物的生成；故證實活性氧化物之形成，是肝臟損傷造成肝纖維化的原因之一。活性氧化物所造成之氧化壓力或脂質過氧化，會活化星狀細胞及調節膠原蛋白基因的表現。由氧化壓力刺激產生的 paracrine，或由 Fe^{2+} /ascorbate 產生的自由基，均會刺激肝臟星狀細胞的活化增生與膠原蛋白之形成；當肝臟持續受損及增生，於遺傳學上的變異機率可能會升高，伴隨著肝纖維化及肝硬化，進一步的可能演變成肝癌(hepatocellular carcinoma) [6]。根據流行病學統計資料顯示，肝癌是一種相當惡性的癌症，於肝癌發生的高危險區，如東南亞、中國大陸沿海區域及撒哈拉沙漠以南之非洲國家等，肝癌每年的患病者約高達一百二十萬人，居世界癌症發生率的第八位，分別為男性的第六位及女性第十一位，年死亡人數至少達一百萬人[7]。肝癌發生的可能危險因子，包括 B、C 肝型炎病毒造成之慢性感染及肝硬化、酒精性慢性肝病、肝毒性物質之暴露、肝硬化、家族有肝癌病人、有肝病既往史、紅血球 Rh 系統 C 抗原陽性、營養不良、長期酗酒、先天性新陳代謝之缺陷，以及服用過量藥物，如類固醇、荷爾蒙、動

情素等。

肝癌的治療目前常採用化學療法、放射線療法、外科手術或合併療法等。前兩種方法是以細胞壞死(necrosis)的途徑來殺死癌細胞，而在殺死腫瘤細胞的同時，其他正常細胞亦受到大量傷害，造成病患在治療過程中身體受到極大的不適。而外科手術處理則採手術切除或肝臟移植。各種療法雖可以單獨進行或合併使用，但對於大多數的肝癌病患，因為肝細胞壞死之處太多，且普遍性肝功能均不佳，故治癒率有限[8]。因此，如何研發更有效率之抗肝癌藥物，乃屬當務之急。癌症化學防禦的觀念是目前治療或研究癌症的重點之一，其主要是藉由天然物中的活性成份以預防、減緩或終止癌之形成過程[9, 10]。具有癌症化學防禦能力的物質，可經由阻斷 DNA 的途徑，抑制癌症之發展，也可以誘發尚未成癌的細胞進行分化或凋亡。為達到抗癌的預期效益，這些化學防禦物質通常需要長期的使用，故基於藥物安全性(無毒、無副作用)之考量，期能由天然植物中萃取、分離出有效的抗癌藥物，與目前臨床上的抗癌療法結合，以減輕對病患的副作用，而又可以達到抗癌目的。近年來，藉由天然物中所分離出有效的抗癌藥物，以進行腫瘤細胞計畫性凋亡機制研究，已成為研究治療癌症藥物發展的方向之一[11]。例如研究者曾由不同的天然植物中分離出各種有效成份，如 baicalein [12-15]，bergenin [16, 17]，chebulagic acid [18]，corilagin [19, 20]，gallic acid [21, 22]，geraniin [23, 24]與 tercatin [18]等處理人類的肝癌細胞株，觀察這些成份對肝癌細胞株的毒性與生長抑制情形。

黃芩為唇形科植物黃芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的根，別名黃金茶、山茶根、爛心草、黃芩茶、土金茶根，是一種相當古老的中藥，已使用了上千年，安全無害，早記載在神農本草經中，並列為中品。主要生長於向陽草地山坡及休荒地上。主產于河北、山西、內蒙古、河南及陝西等地。以山西產量最多，河北承德產的品質最好。黃芩是多年生草本，苗長尺餘，莖幹粗如箸，葉從地向四面叢生，類紫草，高一尺許，亦有獨莖者，葉細長，青色，兩面相對，六月開紫花，根黃如知母粗細，長四五寸，春、秋季採挖。黃芩根細深長，根條易斷，採收時需要深挖，不能刨斷根。去掉殘莖及鬚根，曬半幹剝去外皮，捆成小把，再曬乾或烘乾；在晾曬過程中，避免暴曬過度發紅，同時防止水濕雨淋，黃芩見水變綠，最後發黑影響品質。黃芩成品呈圓錐形，扭曲不直，外形似腐木，長 8-25cm，直徑 1-3cm，表面棕黃色或深黃色，上部有明顯網紋，下部有細紋，表面有稀疏根痕。新根堅實而質硬，稱為條芩，斷面黃色，中間紅棕色，外層有層狀圓環，遇水受潮變為黃綠色。老根中間呈暗棕色或棕黑色，枯朽狀或已成空洞稱為枯碎芩，氣微，味苦。選用藥材時以條長 10 釐米以上，中部直徑 1 釐米以上，去淨粗皮，無雜質，蟲蛀與黴變者為佳；條長 4 釐米以上，中部直徑 1 釐米以下，但不小於 0.4 釐米，去淨粗皮，無雜質、蟲蛀與黴變者

次之。

黃芩為傳統上常用之中藥材，應用歷史悠久，據記載，於臨床應用已有 2000 多年的歷史。黃芩味苦，性寒，歸肺、心、肝、膽、大腸經，清熱瀉火，燥濕解毒，止血、安胎，主治肺熱咳嗽、暑溫胸悶嘔惡、肝火頭痛、目赤、濕熱黃疸、瀉痢、血熱吐衄、胎動不安、癰腫瘡毒。此外，近代的臨床研究[25]顯示，黃芩之甲醇萃取物於大白鼠受慢性膽管結紮模式 (bile duct ligation)，以及四氯化碳等不同作用機轉之肝毒化物，所誘發之肝纖維化與脂質過氧化 (lipid peroxidation) 具有顯著的抑制作用。Shimizu 等人[26, 27]亦證實，黃芩可抑制小白鼠的肝纖維化及肝癌成長。依據 Sagara 等人[28]及 Xie 等人[29]的研究顯示，黃芩中含有 Baicalein、baicalin 及 wogonin 等三種重要的保肝與抗腫瘤成份。其藥理學之研究分述如下：

1. 保肝作用

Kimuya 等人[30]曾以不同的肝損傷模式，使小白鼠形成脂質過氧化 (lipid peroxidation)，再分別經口投與 baicalein、baicalin 及 wogonin，發現此三成份均具有抗氧化能力，可預防肝細胞障害作用。蔡等人[31]亦發現，baicalein 對於 tert-butyl hydroperoxide 所誘發大白鼠肝細胞氧化損傷具有保護作用。Abe 等人[32]則發現，baicalein 與 baicalin 有促進大白鼠膽汁分泌作用。Lin 與 Shieh[33, 34]使用 D-半乳糖胺 (D-galactosamine)、對位乙醯胺酚 (Acetaminophen) 及四氯化碳等三種不同作用機轉之肝毒化物，以誘發大白鼠產生肝細胞障礙，再分別以 baicalein、baicalin 及 wogonin 等三成份處理，結果發現此三成份均具有抗發炎與保肝的作用，其中以 baicalin 呈現最佳的抗炎作用，而 wogonin 之保肝效用較好。Huang 等人[35]亦發現，wogonin 具有抗 B 型肝炎病毒之能力。

2. 防癌與抗癌

以 baicalein、baicalin 與 wogonin 等成份 (尤其是 baicalein) 進行抗癌機制探討之文獻甚多，包括人類各種的細胞株，如肝癌[14, 15, 36-41]、膀胱癌[42]、乳癌[43-45]、胃癌[46]、前列腺癌[47-49]、胰臟癌[50, 51]與腸癌[43]等。結果顯示，這些成份對於癌細胞均具有成長抑制或凋亡的作用。

3. 心血管疾病之作用

Takizawa 等人[52]研究顯示，baicalein 可以降低由於血管收縮素所引起的急性高壓現象。也有研究者[53-56]指出，baicalein 可抑制因花生四烯酸、phenylephrine 與血小板因子引起的細胞增生及移動，防止粥狀動脈硬化斑塊形成。Kimura 等人[57]發現，baicalein 能

明顯抑制鈣離子的增加，而降低 peptide 誘導之 plasminogen activator inhibitor (PAI-1) 生成，故推測 baicalein 可用於動脈硬化症或糖尿病之防治。

4. 抗過敏作用

Baicalein 與 baicalin 對於主動性過敏反應、被動性過敏反應、實驗性氣喘與過敏性皮膚炎均有抑制作用[58- 61]，其作用機制大致包括抑制毛細血管透過性作用[62- 64]、影響前列腺素之生成[65, 66]、抗乙醯膽素作用[67-70]、阻斷 type IV 過敏反應[71]、抑制白三烯素 B4 與 C4 之釋放，降低過敏反應[72]與調節嗜鹼細胞之生長及分化[73, 74]等。

5. 抗發炎作用

Baicalein、baicalin 及 wogonin 等對於大白鼠因 carrageenin 引起的腳爪浮腫，有抑制作用，其中尤其以 baicalin 的作用最為顯著[75]。baicalein 與 wogonin 可抑制 lipopolysaccharide 誘導巨嗜細胞產生一氧化氮，並減少誘導型一氧化氮合成之蛋白表現量，其中以 wogonin 的效果較強[76]。Butenko 等人[77]發現，baicalein 可抑制白三烯素之合成，具有抗發炎的特性。也有研究指出，baicalin 可與化學激素結合，而產生抗發炎活性[78]。

此外，Baicalein 及 baicalin 亦被證實具有抗病毒之效用，如 B 型肝炎病毒[35]、人類免疫不全病毒[79- 88]及流行性感冒病毒[89- 92]等，以及抗菌活性[93-99]。以上的研究結果得知，黃芩不僅具有保肝作用，亦為一擁有抗腫瘤功效的中藥草。黃芩之功效廣泛，於臨床應用上並可與其他生藥搭配為複方使用。根據大陸中成藥產品目錄第一部的統計資料，66 種蜜丸中有 45 種含黃芩，64 種片劑中有 46 種應用黃芩，36 種湯劑也有 25 種用黃芩；換言之，於中成藥方劑中約有 70% 含有黃芩。常見的中藥複方中含有黃芩者如三黃瀉心湯、三黃石膏湯、半夏瀉心湯、生薑瀉心湯、甘草瀉心湯、大柴胡湯、小柴胡湯、柴胡清肝湯、柴胡桂薑湯、柴胡桂枝湯、柴葛解肌湯、洗肝明目湯、消痔丸、乾薑黃蓮黃芩人參湯、涼血地黃湯、清上防風湯、清心蓮子湯、清肺湯、清氣化痰湯、清涼湯、清濕化痰湯、膈涼散、黃蓮上清丸、黃蓮阿膠湯、黃蓮解毒湯、黃芩湯、普濟消毒散、散腫潰堅湯、溫清散、當歸龍薈丸、當歸六黃湯、葛根黃蓮黃芩湯、頓嗽湯、潤腸湯、龍膽瀉肝湯、鼻良湯、蓮子清心湯、導滯湯、乙字湯、人參瀉肺湯、小續命湯、甘露散、辛夷清肺湯、防風通聖散等多味中藥複方。由此可知，目前黃芩的應用和開發越來越受到國內外醫學界的關注，需求量也隨之急劇增加。

基於過去之研究基礎，以及對於百花蛇舌草、半枝蓮及冬凌草等生藥中的保肝與抗肝癌活性成份之萃取研究，已稍具基礎。為深入瞭解保肝與抗腫瘤活性成份之生藥材的化學

組成與抗癌活性，下年度擬以黃芩為研究對象，以三年為期，利用不同的溶劑、不同的萃取方法，以萃取黃芩之活性成份，以及執行成份分離及純化的工作，並探討各種條件萃取所得之萃取液及各成份之抗肝癌活性。

二、研究內容

本研究計畫分別以溶劑以及超臨界二氧化碳萃取黃芩中之活性成份，如 baicalein 等，探討萃取條件對成份萃取量之影響。實驗內容分述如下：

一、溶劑萃取

1. 首先將中草藥研磨至一定大小，並測定水份含量，以利於後續萃取量的計算(以乾基為基準)。
2. 以 intraday 及 interday 兩變異係數，評估 HPLC 分析 baicalein 等成份的精確性與再現性。
3. 以水及不同濃度之乙醇水溶液當萃取劑，並逐一探討不同的萃取條件，如樣品顆粒、溫度、與萃取時間等諸變因，對於黃芩中之活性成份，如 baicalein 等成份萃取量的影響，以期獲得最適之萃取條件。各種萃取條件之萃取液經由高效率液相層析儀定量分析，以作為最佳萃取條件之指標。並測試各成份萃取的回收率，以評定萃取方法及條件的良窳。同時，為評估各成份萃取量的再現性，原則上以每一萃取條件萃取三次，視相對平均誤差而定，必要時並作更多次萃取。
4. 以各種不同的有機溶劑，例如 n-hexane 等作為萃取劑進行萃取，亦尋求最佳之萃取條件。

二、超臨界二氧化碳萃取

1. 超臨界二氧化碳萃取裝置，如圖一所示，係以 ISCO 公司產製的超臨界流體萃取裝置為主，加以改良而成，可允許測量壓力至 40Mpa 之數據。欲萃取之樣品是裝填於樣品匣(cartridge)中，俟達到設定之溫度、壓力及平衡後，即可進行萃取；而萃取物係被收集於凝氣瓣的 U 型管內。
2. 稱取一定重量研磨後之中草藥置於樣品匣(cartridge)中，並以雙幫浦系統分別輸入二氧化碳與共溶劑，俟達到設定之溫度、壓力及平衡後，即進行萃取，並在萃取槽末端出口，以溶劑加冰浴法收集萃出物，萃取結束後，再以 HPLC 分析萃出物中各成份的濃度。

並逐一探討不同的萃取條件，如樣品顆粒、溫度、壓力、二氧化碳流速、萃取時間及共溶劑用量等變因，對於黃芩中之活性成份萃取量的影響，以期獲得最佳之萃取條件。

3. 測試各成份萃取的回收率，以及各成份萃取量的再現性。

三、結果與討論

3.1 HPLC 分析條件

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)，波長為 200nm。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。沖提方式為：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 為 78/22 至 77/23 (v/v)；25-60 min 之 A/B 為 77/23 至 57/43 (v/v)；60-70 min 之 A/B 為 77/43 至 78/22 (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。流速的變化為：0 至 25 分鐘時流速從 1mL/min 變為 1.5mL/min；25 至 32 分鐘時流速從 1.5mL/min 變為 1mL/min；32 至 55 分鐘時維持流速 1mL/min；55 至 60 分鐘時流速從 1mL/min 變為 0.5mL/min；60 至 70 分鐘時流速從 0.5mL/min 變為 1mL/min。

3.2 標準品的 HPLC 層析圖

黃芩中 baicalin 等六種標準品於某一濃度下(Baicalin:12.5ug/mL, Apigenin:40 ug/mL, Baicalein:12.5 ug/mL, Wogonin:1.25 ug/mL, Chrysin:13.18ug/mL, Acacetin:75 ug/mL)之 HPLC 層析圖譜如圖二所示，顯示在 65 分鐘內，於 3.1 節中的 HPLC 分析條件下，各成份均可達到良好的分離。由黃芩中相關活性成份的結構式(圖三)，發現各成份中均含有 C=O、C-OH 等極性鍵，故應均為極性化合物；而由圖二可知，這六成份的極性順序為 Baicalin > Apigenin > Baicalein > Wogonin > Chrysin > Acacetin。

3.3 黃芩 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。圖四顯示，於 HPLC 分析黃芩的前 10 分鐘，雖然有波峰糾結之情形，但在六種標準品波峰出現處的 15-65 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，由此可建立黃芩之 HPLC 指紋圖譜。

3.4 黃芩中六種標準品檢量線資料

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。

3.5 乙醇濃度對黃芩成分萃取量的影響

於 333K 下萃取 1 小時，觀察不同體積百分比的乙醇水溶液對於成份萃取量的影響。圖五顯示，極性最高的 baicalin 於 20-60% 乙醇水溶液中，具有較佳的抽取效果；極性其次的 baicalein 於 40-70% 乙醇水溶液中，有較好的抽取效果；而極性較小的 wogonin 與 chrysin 需於相對較高濃度的乙醇水溶液中，才有較好的抽取效果。實驗結果符合極性相似者，可互相溶解之原理。

3.6 溫度對黃芩成分萃取量的影響

以純水與 60% 乙醇水溶液為溶劑，在溫度 303-353K 下萃取 1 小時，探討萃取溫度對萃取量的影響。圖六顯示，以 60% 乙醇水溶液為萃取劑時，baicalin 等成份在 313-343K 下，具有較高的萃取量。

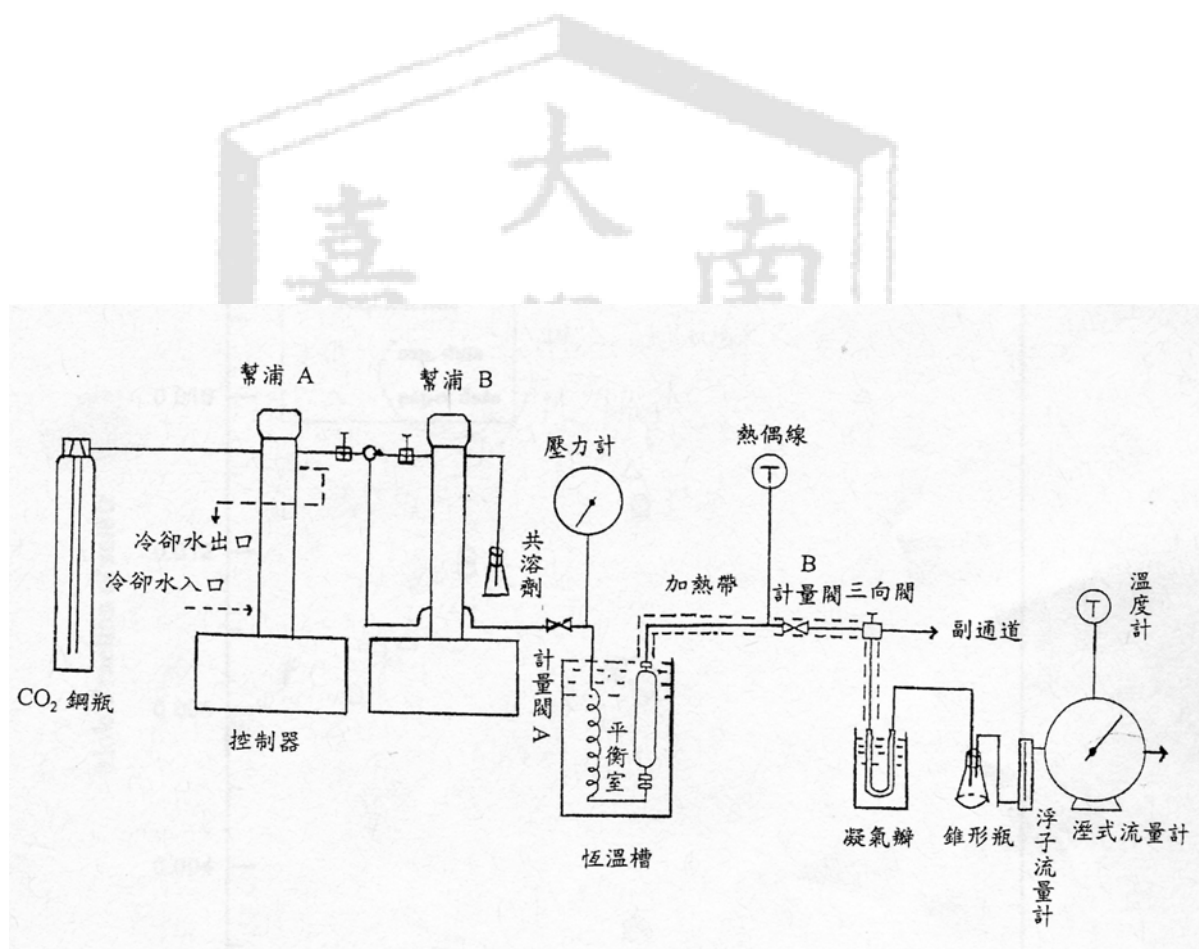
四、結論

以上是本研究計畫於冬凌草之萃取研究中，有關萃取條件對於成份萃取量影響的初步結果。本研究成果不僅於抗肝癌藥物之研發上極具參考價值，除了可提供後續之抗肝癌藥理學研究外，同時對於科學中藥製程中萃取技術的改進與提昇亦將有所貢獻。

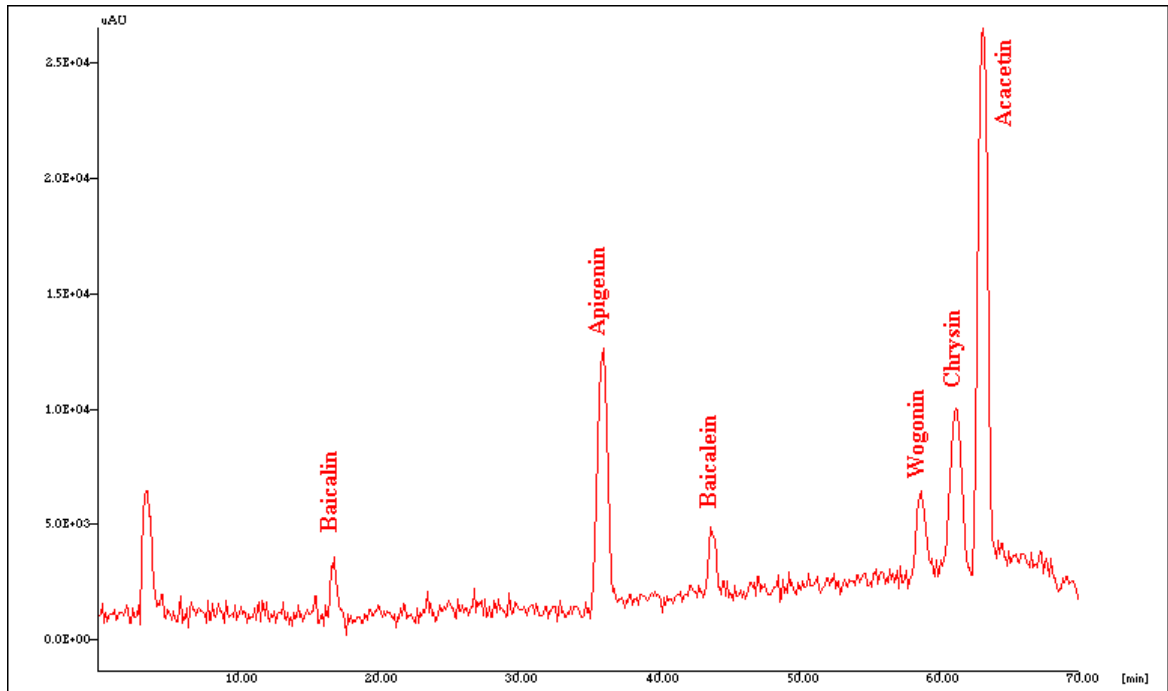
五、圖表

表一黃芩中六種標準品檢量線資料

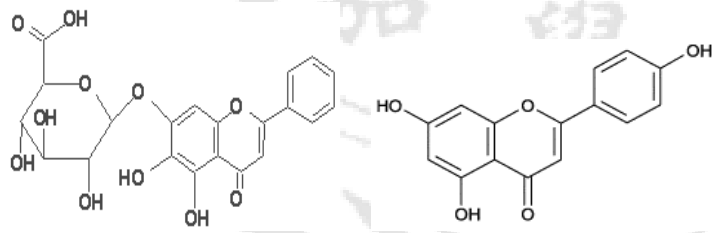
成分	濃度範圍(ug/mL)	檢量線方程式	R ²
baicalin	10-180 (6 points)	$Y = 7589.905607 * X - 24084.94409$	0.999
apigenin	60-320 (5 points)	$Y = 16533.74807 * X - 418451.4621$	0.996
baicalein	50-200 (5 points)	$Y = 15421.51486 * X - 669502.2626$	0.999
wogonin	6-18 (5 points)	$Y = 79924.85355 * X - 342938.6979$	0.996
chrysin	63.3-189.9 (5 points)	$Y = 21024.62497 * X - 787784.362$	0.999
acacetin	50-200 (5 points)	$Y = 10781.06993 * X - 23300.24462$	0.999



圖一 超臨界二氧化碳萃取裝置圖

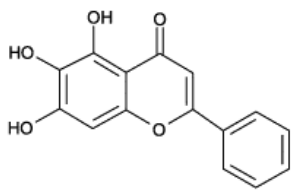


圖二 標準品的 HPLC 層析圖

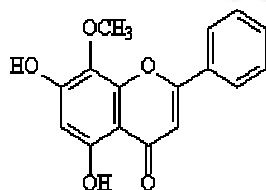


Baicalin

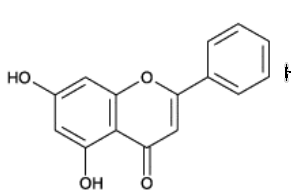
apigenin



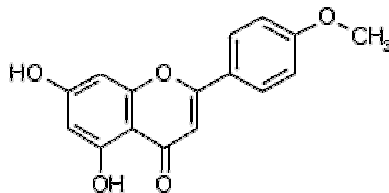
Baicalein



Wogonin

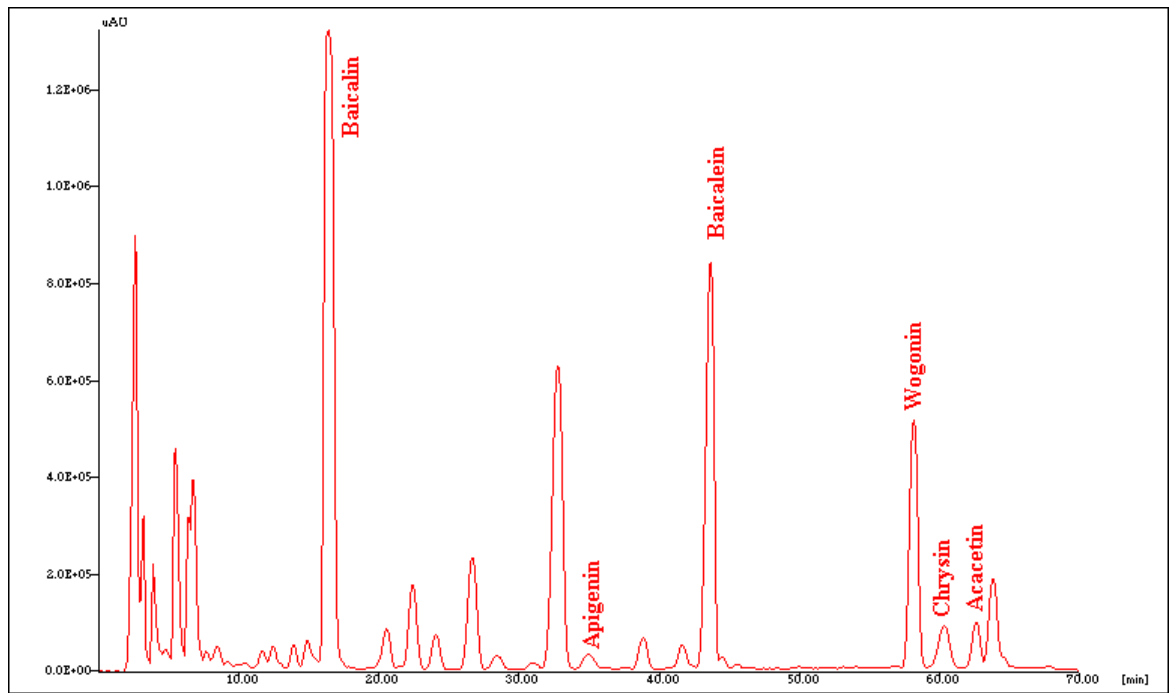


Chrysin

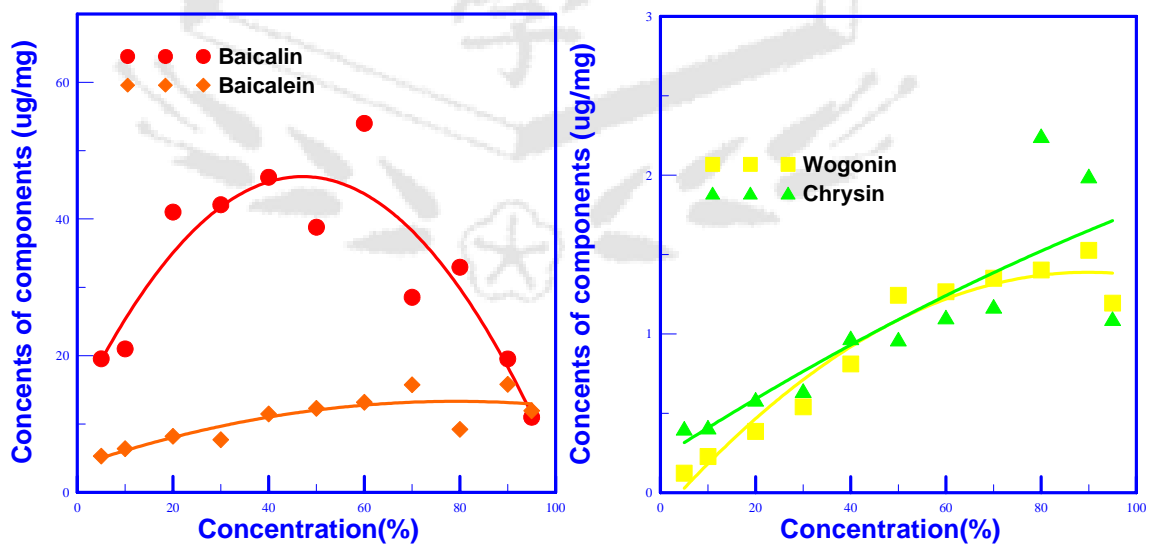


Acacetin

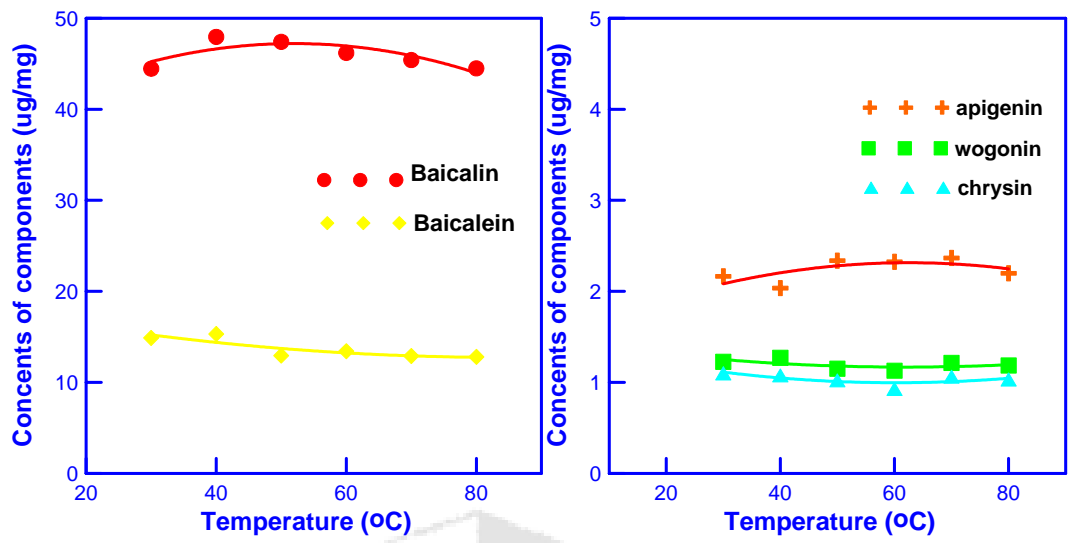
圖三 黃芩相關活性成份的結構式



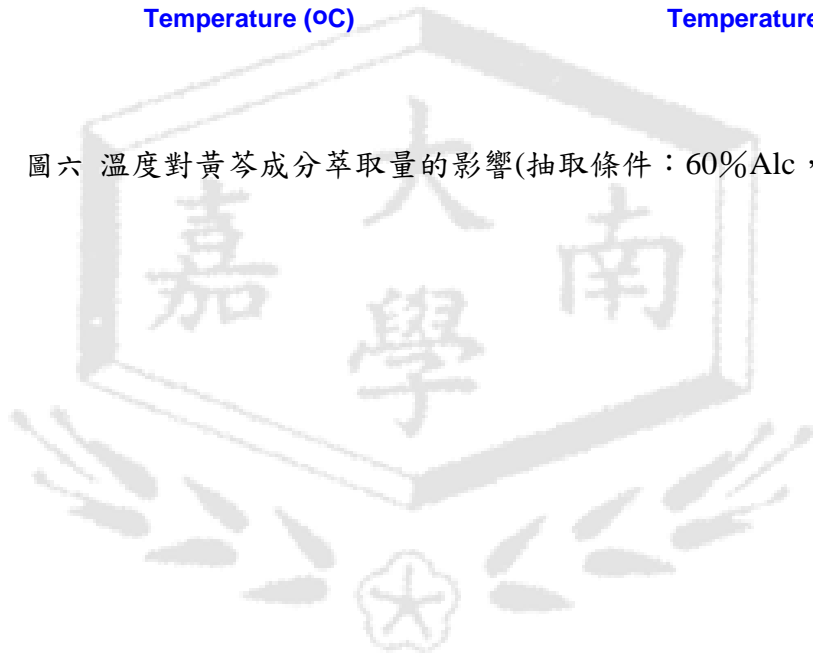
圖四 黃芩的 HPLC 指紋圖譜(抽取條件：50°C，60%Alc，60min)



圖五 乙醇濃度對黃芩成分萃取量的影響(抽取條件：60°C，60min)



圖六 溫度對黃芩成分萃取量的影響(抽取條件：60%Alc，60min)



參考文獻

1. 衛生署(<http://www.doh.gov.tw/>) 衛生資料統計。
2. Safary, A., and Beck J., Vaccination against hepatitis B: current challenges for Asian countries and future directions, *Journal of gastroenterology and hepatology*, 15, 396- 401 (2000).
3. Friedman, S. L., The cellular basis of hepatic fibrosis, *New England journal of medicine*, 328, 1828-1835 (1993).
4. Rambaldi, A., and Glud C., Colchicine for alcoholic and non-alcoholic liver fibrosis or cirrhosis, *Liver*, 21, 777-784 (2001).
5. Svegliati-Baroni, G., Di, Sario, A., Casini, A., Ferretti, G., D'Ambrosio, L., Ridolfi, F., Bolognini, L., Salzano, R., Orlandi, F., and Benedetti, A., The Na⁺/H⁺ exchanger modulates the fibrogenic effect of oxidative stress in rat hepatic stellate cell, *Journal of hepatology*, 30, 868-875 (1999).
6. Shimizu, I. Sho-saiko-to, Japanese herbal medicine for protection against hepatic fibrosis and carcinoma, *Journal of gastroenterology and hepatology*, 15(suppl), D84-90 (2000).
7. Bosch, F. X., Global epidemiology of hepatocellular carcinoma, In Okuda, k., and Tarbor, E., editors, *Liver cancer*, New York, Churchill livingstone, 13- 28 (1997).
8. Akriviadis, E. A., Llovet, J. M., Efremidis, S. C., Shouval, D., Canelo, R. Ringe, B., and Meyers, W. C., Hepatocellular carcinoma, *The British Journal of surgery*, 85, 1319-1331 (1998).
9. Ashendel, C. L., Diet signal transduction and carcinogenesis, *Journal of nutrition*, 125, 686-91s (1995).
10. Austoker, J., Diet and cancer, *British medical journal*, 308, 1610-4 (1994).
11. Maximilian, L., Marcha, L., Edwin, H., Apoptosis and necrosis: basic types and mechanisms of cell death, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 117, 1208-1214 (1993).
12. Gerschenson, L. E., Apoptosis: a different type of cell death, *FASEB*, 6, 2450-2455 (1992).
13. So, F. V., Guthrie, N., Chambers, A. F., 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 Lett*, 112, 127-133 (1997).
14. Morimoto, S., Tateishi, N., Matsuda, T., Tanaka, H., Taura, F., Furuya, N., Matsuyama, N., Shoyama, Y., Novel Hydrogen peroxide metabolism in suspension cells of *Scutellaria baicalensis* Georgi, *J Biol Chem*, 273, 12606-12611 (1998).
15. Ching, H. C., Lynn, L. H., and Fung, J. L., Baicalein, a novel apoptotic agent for hepatoma cell lines, a potential medicine for hepatoma, *Nutrition and cancer*, 38 (2), 287-295 (2000).

16. Wayne, Y. T., Chang, W. H. and Fung, J. L., Enhancing effect of patented whey protein isolate on cytotoxicity of an anticancer drug, *Nutrition and cancer* , 38 (2), 287-295 (2000).
17. Geol,R.K,Maiti,R.N., Manickam, M.,Ray,A.B., Antiulcer activity of naturally occurring Pyrano-coumarin and isocoumarins and their effect on prostanoid synthesis using human colonic mucosa, *Indian J.Exp.Biol*, 35,1080-1083 (1997).
18. Piacente, S., Pizza, C., Detommasi, N., Mahmood, N., Constituents of *Ardisia Japonica* and their in vitro anti-HIV activity, *J.Nat. Prod.*59,565-569 (1996).
19. Hamada, S., Kataoka, T., Woo, J. T., Yamada, T., Nishimura, T., Otake, N.,Nagai, K., Immunosuppressive effects of gallic acid and chebulagic acid on CTL-mediated cytotoxicity, *Biol Pharm. Bull.*,20,1017-1079 (1997).
20. Burapadaja, S., Bunchoo, A., Antimicrobial activity of tannins from *Terminalia citrina*[letter], *Planta Med.*,61,365-366.
21. Cheng,J.T., Lin,T.C., Hus, EL., Antihypertensive effect of corilagin in the rat Can., *J.Physiol Pharmacol*, 73, 1425-1429 (1995).
22. Lin, H. C., Ding, H. Y., Wu, Y. C., Two novel compounds from *Paeonia suffruticosa*, *J. Nat. Prod.*, 61, 343-346 (1998).
23. Shahrzad, S., Bitsch, I., Determination of gallic acid and its metabolites in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography, *J.Chromatogr.B Biomed, Sci.Appl.*, 705,87-95 (1998).
24. Miguel, O.G, Calixto, J.B.,Santos, A.R., Messana, I., Ferrari, F., Cechinel, F.V., Pizzolatti, M.G, Yunes, R.A. Chemical and preliminary analgesic evaluation of geraniin and furosin isolated from *Phyllanthussellowianus*, *Planta Med.*, 62,146-149 (1996).
25. 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 caroliniensis* in mice, *J. Pharm. Pharmacol.*, 48,1231-1236 (1996).
26. 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).
27. Shimizu, I., Ma, Y. R., Mizobuchi, Y., Liu, F., Miura, T., Nakai, Y., Yasuda, M., Shiba, M., Horie, T., Amagaya, S., Kawada, N., Hori, H., and Ito, S., Effects of Sho-saiko-to, a Japanese herbal medicine, on hepatic fibrosis in rats, *Hepatology*, 29, 149-160 (1999).
28. Sagara, K. Ito, Y., Oshima, T., Misaki, T., and Murayama, H., Simulataneous determination of baicalein, wogonin, oroxyyin-A and their glucuronides in *Scutellariae radix* by ion-pair high-performance liquid chromatography, *J. chromatography*, 328, 289 -297 (1985).

29. Xie, L. H., Wang, X., Basnet, P., Matsunaga, N., and Yamagi, S., Evaluation of variation acetoside and three major flavonoids in wild and cultivated *Scutellaria baicalensis* roots by micellar electrokinetic chromatography, *Chem. Pharm. Bull.*, 50, 896-899 (2002).
30. 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).
31. 蔡玉英，指導教授朱嘉一及曾翠華，part I：Baicalein 抗氧化及抗癌作用之研究(一) Baicalein 對 tert-Butyl Hydroperoxide 誘發大白鼠肝細胞氧化損傷之保護作用機制探討 (二) Baicalein 抗 TPA 促癌作用及機制研究 Part II：Esculetin 誘發人類白血癌細胞 (HL-60) 凋亡及其機制之探討，中山醫學院，生物化學研究所碩士論文，86 學年度。
32. Abe, K., Inoue, O. and Yumioka, E., Biliary excretion of metabolites of baicalin and baicalein in rats, *Chem. Pharm. Bull.*, 38(1), 208-211 (1990).
33. Lin, C. C. and Shieh, D. E., The anti-inflammatory activity of *Scutellaria rivalaris* extractions and its active components, baicalin, baicalein and wogonin, *The 10th Symposium on Natural Products*, Kaohsiung, Taiwan, R.O.C., P94-95 (1995).
34. Lin, C. C. and Shieh, D. E., In Vivo hepatoprotective effect of baicalin, baicalein and wogonin from *Scutellaria rivalaris*, *The Bull. Of Society of Pharmacognosy*, R.O.C., NO. IV, P 69-70 (1996).
35. Huang, R. L., Chen, C. C., Huang, H. L., Chang, C. G., Chen, C. F., Chang, C. M., and Hsieh, M. T., Anti-Hepatitis B virus effects of wogonin isolated from *Scutellaria baicalensis*, *Planta Medica.*, 66, 694- 698 (2000).
36. Yano, H., Mizoguchi, A., and Kojiro, M., The herbal medicine Sho-saiko-to inhibits proliferation of cancer cell lines by inducing apoptosis and arrest at the G0/G1 phase, *Cancer research*, 54, 448-54 (1994).
37. 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).
38. Matsuzaki, Y., Kurokawa, N., Terai, S., Matsumura, Y., Kobayashi, N., and Okita, K., Cell death induced by baicalein in human hepatocellular carcinoma cell lines, *Japanese journal of cancer research*, 87, 170-7 (1996).
39. Park, H. J., Lee, Y. W., Park, H. H., Lee, Y. S., and Yu, J. H., Induction of quinone reductase by a methanol extract of *scutellaria baicalensis* and its flavonoids in murine Hepa 1c1c7 cell, *European journal of cancer prevention*, 7, 465-71 (1998).
40. Shimizu, I., Ma, Y. R., and Ito, S., Effects of Sho-saiko-to, a Japanese herbal medicine, on hepatic fibrosis in rats, *Hepatology*, 29, 149-60 (1999).
41. 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).

42. Ikemoto, S., Sugimura, K. Yoshida, N., Yasumoto, R., Wada, S., Yamamoto, K., and Kishimoto, T., Antitumor effects of Scutellariase radix and its components baicalein, baicalin and wogonin on bladder cancer cell lines, *Urology*, 55, 951-5 (2000).
43. 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).
44. So, F. V., Guthrie, N., Chambers, A. F., Moussa, M., and Carroll K. K., Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices, *Nutrition and cancer*, 26, 167-81 (1996).
45. 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 letter*, 112,127-33 (1997).
46. 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).
47. Chan, FL., Choi, HI., Chen ZY., Chan, PS.,and Huang, Y., Induction of apoptosis in prostate cancer cell lines by a flavonoid,baicalin, *Cancer Letters.*, 160, 219-28 (2000).
48. Tim, J. R., Li, L., and Hagmann, W., Expression, subcellular location and putative function of platelet-type 12-lipoxygenase in human prostate cancer cell lines of different metastatic potential, *International journal of cancer*, 87, 37-43 (2000).
49. 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).
50. Ding, X. Z., Kuszynski, C. A., E1-Metwally, T. H. and Adrian, T. E., Lipoxygenase inhibition induced apoptosis, morphological changes, and carbonic anhydrase expression in human pancreatic cancer cells, *Biochemical and biophysical research communications*, 266, 392-9 (1999).
51. Motoo, Y., and Sawabu, N., Antitumor effects of saikosaponins, baicalin and baicalein on human hepatoma cell lines, *Cancer letters*, 86, 91-5 (1994).
52. Takizawa, H., Dellipizzi, A. M. and Nasjletti, A., Prostaglandin contributes to the vasodpressor effect of baicalein in hypertensive rats, *Hypertension*, 31, 886-71 (1998).
53. Nishio, E., and Wastanabe, Y., Role of the lipoxygenase pathway in phenylephrine-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration, *European journal of*

- pharmacology*, 336, 267- 273 (1997).
54. Lin, L., Balazy, M., Pagano, P. J., and Nasjletti, A., Expression of prostaglandin H₂-mediated mechanism of vascular concentration in hypertensive rats, *Circulation research*, 74, 197-205 (1994).
 55. Nishio, E., and Watanabe, Y., Role of the lipoxygenase pathway in phenylephrine-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration, *European journal of pharmacology*, 33, 267-73 (1997).
 56. Natarajan, R., Gonzales, N., Lanting, L., and Nadler, J., Role of the lipoxygenase pathway in angiotensin induced vascular smooth muscle cell hypertrophy, *Hypertension*, 23, 132-7 (1994).
 57. Kimura, Y., Yokoi, K., Matsushita, N., and Okuda, H., Effects of flavonoids isolated from scutellariae radix on the production of tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 induced by thrombin and thrombin receptor agonist peptide in cultured human umbilical vein endothelial cell, *Journal of pharmacy and pharmacology*, 49, 816-22 (1997).
 58. Koda, A., Nagai, H., Wada, H., Pharmacological actions of baicalin and baicalein on active anaphylaxis, *Nippon Yakurigaku Zasshi- Folia pharmacologica japonica*, 66, 194- 213 (1970a).
 59. Koda, A., Nagai, H., Yoshida, Y., and Lauw, H. K., Pharmacological actions of baicalin and baicalein. 3. Action on experimental asthma, *Nippon Yakurigaku Zasshi- Folia pharmacologica japonica*, 66, 471- 486 (1970b).
 60. Nagai, H., Osuga, K., and Koda, A., Inhibition of hypersensitivity reactions by soluble derivatives of baicalein, *Japanese journal of pharmacology*, 25, 763- 772 (1975).
 61. Gabor, M., Anti-inflammatory and anti-allergic properties of flavonoids, *Progress in clinical and biological research*, 213, 471- 480 (1986).
 62. Sakamoto, K., Nagai, H., and Koda A., Role of hyaluronidase in immediate hypersensitivity reaction, *Immunopharmacology*, 2, 139-146 (1980).
 63. Liaw, J., Gau, Y. Y. and Chao, Y. C., Effect of baicalin on tracheal permeability in ovalbumin(OA)-sensitized guinea pigs, *Pharmaceutical research*, 16, 1653-7 (1999).
 64. Sekiya, K., Kadota, S., Katayama, K., Koizumi, T., and Namba, T., Study on baths with crude drug, *Biological and pharmaceutical bulletin*, 20, 983-7 (1997).
 65. Miyamoto, K., Katsuragi, T., Abdu, P., and Furkawa, T., Effects of baicalein on prostanoid generation from the lung and contractile responses of the trachea in guinea pig, *American journal of Chinese medicine*, 25, 37-50 (1997).
 66. Nakahata, N., Kutsuwa, M., Kyo, R., Kubo, M., Hayashi, K., and Ohizumi, Y., Analysis of

- inhibitory effects of scutellariae radix and baicalein on prostaglandin E2 production in rat C6 glioma cells, *American journal of Chinese medicine*, 67, 132-5 (2001).
67. Chen ZY, Su YL, Lau CW., Law WI., and Huang Y., Endothelium-dependent contraction and direct relaxation induced by baicalein in rat mesenteric artery. *European Journal of Pharmacology*, 374:41-7 (1999).
 68. Tsang, S. Y., Chen, Z. Y. Yao, X. Q. and Huang, Y., Potentiating on contractions by purified baicalin and baicalein in the rat mesenteric artery, *Journal of cardiovascular pharmacology*, 36, 163-9 (2000).
 69. Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M. M., and Schaffner, W., Rapid detection of octamer binding proteins with mini-extracts, prepared from a small number of cells, *Nucleic acids research*, 17, 6419 (1989).
 70. Stanke-Labesque, F., Devillier, P., and Bessard, G., Angiotensin induced contractions in human internal mammary artery, *Cardiovascular research*, 47, 376-83 (2000).
 71. Taniguchi, C., Homma, M., and Hayashi, T., Pharmacological effects of urinary products obtained after treatment with saiboku-to, a herbal medicine for bronchial asthma, on type allergic reaction, *Planta. Medica*, 66, 607-11 (2000).
 72. Homma, M., Minami, M., Taniguchi C., Oka, K., Morita, S., Niitsuma, T., and Hayashi, T., Inhibitory effects of lignans and flavonoids in saiboku-to, A herbal medicine for bronchial asthma, on the release of leukotrienes from human polymorphonuclear leukocytes, *Planta. Medica.*, 66, 88-91 (2000).
 73. Tanno, Y., Kakuta, Y., and Takishima, T., Effects of qing-fei-tang and baicalein, its main component flavonoid, on lucigenin-dependent chemiluminescence and leukotriene B4 synthesis of human alveolar macrophages, *American journal of Chinese medicine*, 16, 145-54 (1988).
 74. Tanno, Y., Kakuta, Y., and Takishima, T., Modulation of human basophil growth in vitro by xiao-qing-long-tang, chai-pu-tang, qing-fei-tang, baicalein and ketotifen, *American journal of Chinese medicine*, 17, 45-50 (1989).
 75. Lin, C. C., and Shieh, D. E., The anti-inflammatory activity of scutellaria rivularis extracts and its active components, baicalin, baicalein and wogonin, *American journal of Chinese medicine*, 24, 31-6 (1996).
 76. Wakabayashi, I., Inhibitory effects of baicalein and wogonin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in macrophages, *Pharmacology and toxicology*, 84, 288-91 (1999).
 77. Butenko, I. G., Gladchenko, S. V., and Galushko, S.V., Anti-inflammatory properties and inhibition of leukotriene C4 biosynthesis in vitro by Flavonoid baicalein from Scutellaria baicalensis georgy roots, *Agents&Actions*, 39, C49-51(1993).

78. Li, B. Q., Fu, T., Dongyan, Y., Mikovits, J. A., Ruscetti, F. W., and Wang, J. M., Flavonid baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry, *Biochemical and biophysical research communications*, 276, 534-8 (2000).
79. Buimovini-Klein, E., Mohan, V., Lange, M., Fenamore, E., Innada, Y., and Cooper, L. Z., Inhibition of HIV replication in lymphocyte cultures of virus-positive subjects in the presence of Sho-Saiko-To, an oriental plant extract, *Antiviral research*, 14, 279- 286 (1990).
80. Critchfield, J. W., Butera, S. T., and Folks, T. M., Inhibition of HIV activation in latently infected cells by flavonoid compounds, *AIDS research and human retroviruses*, 12, 39- 46 (1996).
81. Hu, C. Q., Chen, K., Shi, Q., Kilkuskie, R. E., Cheng, Y. C., and Lee, K. H., Anti-AIDS agents, 10. Acacetin-7-O-beta-D-galactopyranoside, an anti-HIV principle from *Chrysanthemum morifolium* and a structure-activity correlation with some related flavonoids, *Journal of natural products*, 57, 42- 51 (1994).
82. Kitamura, K., Honda, M., Yoshizaki, H., Yamamoto, S., Nakane, H., Fukushima, M., Ono, K., and Tokunaga, T., Baicalin, an inhibitor of HIV-1 production in vitro, *Antiviral research*, 37, 131- 140 (1998).
83. Lam, T. L., Lam, M. L., Au, T. K., Ip, D. T., Ng, T. B., Fong, W. P., and Wan, D. C., A comparison of human immunodeficiency virus type-1 protease inhibition activities by the aqueous activities by the aqueous and methanol extracts of Chinese medicinal herbs, *Life sciences*, 67, 2889-28896 (2000).
84. Li, B. Q., Fu, T., Dongyan, Y., Mikovits J. A., Ruscetti, F. W., and Wang, J. M., Flavonoid baiclin inhibits HIV-1 infection at the level of viral enty, *Biochemical and biophysical research communications*, 276, 534- 538 (2000).
85. Li, B. Q., Fu, T., Yan, Y. D., Baylor, N. W., Ruscetti, F. W., and Kung, H. F. L., Inhibition of HIV infection by baicalin- a flavonid compound purified from Chinese herbal medicine, *Cellular and molecular biology research*, 39, 119- 124 (1993).
86. Piras, G., Makino, M., and Baba, M., Sho-saiko-to, a traditional Kampo medicine, enhances the anti-HIV-1 activity of lamivudine (3TC) in vitro, *Microbiology and immunology*, 41, 835- 839 (1997).
87. Wang, H. K., Xia, Y., Yang, z. y., Natschke, S. L., and Lee, K. H., Recent advances in the discovery and development of flavonoids and their analogues as antitumor and anti-HIV agents, *Advances in experimental medicine and biology*, 439, 191- 225 (1998).
88. Wu, J. A., Attele, A. S., Zhang, L., and Yuan, C. S., Anti-HIV activity of medicinal herbs: usage and potential development, *American journal of Chinese medicine*, 29, 69-81

(2001).

89. Nagai, T., Moriguchi, R., Suzuki, Y., Tomimori, T., and Yamada, H., Mode of action of the anti-influenza virus activity of plant flavonoid, 5, 7, 4-trihydroxy-8-methoxyflavone, from the roots of *Scutellaria baicalensis*, *Antiviral research*, 26, 11- 25 (1995a).
90. Nagai, T., Suzuki, Y., Tomimori, T., and Yamada, H., Antiviral activity of plant flavonoid, 5, 7, 4-trihydroxy-8-methoxyflavone, from the roots of *Scutellaria baicalensis* against influenza A (H3N2) and B viruses, *Biological and pharmaceutical bulletin*, 18, 295- 299 (1995b).
91. Nagai, T., Miyaichi, Y., Tomimori, T., Suzuki, Y., T., and Yamada, H., In vivo anti-influenza virus of plant flavonoids possessing inhibitory activity for influenza virus sialidase, *Antiviral research*, 19, 207- 217 (1992).
92. Nagai, T., Miyaichi, Y., Tomimori, T., Suzuki, Y., T., and Yamada, H., Inhibition of influenza virus sialidase and anti-influenza virus activity by plant flavonoids, *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 38, 1329- 1332 (1990).
93. Kubo, M., Kimura, Y., Odani, T., Tani, T., and Namba, K., Studies on *Scutellaria radix*. The antibacterial substance, *Planta medica*, 43, 194- 201 (1981).
94. Ng, T. B., Ling, J. M., Wang, Z. T., Cai, J. N., and Xu, G. J., Examination of coumarins, flavonoids and polysaccharopeptide for antibacterial activity, *General pharmacology*, 27, 1237- 1240 (1996).
95. Tsao, T. F., Newman, M. G., Kwok, Y. Y., and Horikoshi, A. K., Effect of Chinese and western antimicrobial agents on selected oral bacteria, *Journal of dental research*, 61, 1103- 1106 (1982).
96. Kim, H., Kim, Y. S., Kim, S. Y., and Suk, K., The plant flavonoid wogonin suppresses death of activated C6 rat glial cells by inhibiting nitric oxide production, *Neuroscience letters*, 309, 67- 71 (2001).
97. Blaszczyk, T., Krzyanowa, J. and Lamer-Zarawska, E., Screening for antimycotic properties of 56 traditional Chinese drugs, *Phytotherapy research*, 14, 210- 202 (2000).
98. Yabu, Y., Nose, M., Koide, T., Ohta, N., and Ogihara, Y., Antirypanosomal effects of tradition Chinese herbal medicines on bloodstream forms of trypanosome brucei rhodesiense in vitro, *Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, 29, 599- 604 (1998).
99. Rhee, J. K., Woo, K. J., Baek, B. K., and Ahn, B. J., Screening of the wormicidal Chinese raw drugs on *clonorchis sinensis*, *American journal of Chinese medicine*, 9, 277- 284 (1981).