

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫名稱

白花蛇舌草之超臨界二氧化碳萃取萃取研究

計畫類別：個別型計畫

整合型計畫

計畫編號：CNPH-93-11

執行期間：93 年 1 月 1 日至 93 年 12 月 31 日

計畫主持人：魏明治

共同主持人：

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 94 年 2 月 24 日

一、前言

中草藥在現代科學研究下，已被證實具有明確的特殊療效^(1,2)，因其藥材大多數取自植物的各部份，如根莖、葉、花、果實…等，其藥性通常較為溫和、副作用亦較小。同時，由於著回歸自然植物的醫藥養生保健法，中草藥日益受到重視，且逐漸蔚為風潮。

由於因現代科學的進步，一些新技術、新方法、新指標成份、新劑型等的開發應用，使現代中藥已逐步趨向重視活性成分、強調藥理作用的精緻、量小、方便之方向發展。然而目前中草藥在國際上尚被定位為健康食品，為達成中草藥與國際接軌的目標，中草藥的研究尚待全面性的突破與提昇。以歐美暢銷之中草藥補品年銷售額第一名的銀杏研究為例，銀杏葉中所含之成份不下百種，而這些成份中有的具有藥效，有些卻會引發問題。因此，理想的試劑是要保留有藥效的成份，去除引發問題之成份。以 Egb761 的銀杏製劑為例，是經過近三千次不同的製造方式，發現第 761 次萃取的成份最純、效果最佳，因此而命名。此銀杏製劑中不含有害的銀杏酸，而維持有 24 % 的銀杏黃酮醇及 6 % 銀杏內酯⁽³⁻⁵⁾。此製劑經由臨床實驗，發現對於老人痴呆症、性無能等等多項症狀具有療效。整個研究程序包括原料標準之制定、萃取、成份分離、藥理實驗、臨床實驗、製劑的製備加工，以及製劑的成份標準制定等。歐美國家的研究者由銀杏葉原料，成功地研製為成份明確、藥效顯著的製劑，其成功案例的研究方法，應可作為吾人研究中草藥的借鏡。

在整個中草藥製程研發中，如何有效地抽取藥材中所含之成分亦可說是一大關鍵。以日本學者於半夏厚朴湯抽取實驗為例。實驗顯示於實際煎劑中之油性成分含量只有 3.5 %，而殘渣中仍存有油性成分 49.8 %，其餘 46.7% 是在煎熬過程中揮發掉⁽⁶⁾。由此可知萃取步驟於中草藥製程研發的重要性，因此，探討萃取條件對於中草藥各成份萃取量之影響，亦是本研究所要達成的目標之一。中草藥的萃取方法常用者有溶劑萃取、溶劑萃取加超音波振盪、微波萃取與超臨界流體萃取等。

超臨界流體萃取，是基於超臨界流體兼具有氣體的高擴散性與液體的高滲透性之優良特性，所發展出的萃取分離技術。操作時參數(溫度、壓力)易於控制，溶劑亦可循環使用。尤其是當以二氣化碳為萃取溶劑時，因二氣化碳具有相對較低之臨界溫度(304.2 K)與中等的臨界壓力(1070.7 psi)，可於低溫下進行萃取，特別適合于分離熱敏感之物質。

二氣化碳的臨界現象是 Thomas Andrew 於 1869 年所發現，十年後 Hanny 與 Hogarth⁽⁷⁾ 進一步的觀察到超臨界流體具有溶劑之性質，此後，超臨界二氣化碳應用到萃取的領域才漸漸為世人所矚目，目前尤其是應用至食品⁽⁷⁾、天然物與中草藥加工⁽⁸⁻¹³⁾時，因二氣化碳具有無毒、不燃性、便宜、萃取速率迅速、容易自萃取物中分離、可低溫操作等優點，故深受重視。對於植物產品而言，超臨界二氣化碳主要是應用於幾類非極性化合物 (non-polar compounds) 的萃取，諸如精油、其他的芳香化合物 (other flavour and fragrance compounds)、醫藥的化合物 (medicinal compounds)、脂質 (lipids)、葉紅素 (carotenes) 與生物鹼 (alkaloids) 等；若對於極性化合物的萃取，則可加入極性溶劑，例如乙醇等，以增加萃取效率。

依據衛生署歷年的統計資料顯示⁽¹⁴⁾，台灣地區歷年來 (70-92 年) 十大死亡原因中，慢性肝病與肝硬化位居第六位；同時，在癌症死亡原因中，肝癌更是常年來 (80-92 年) 高居男性癌症中的首位。因此，肝病可以說是台灣地區最常見之本土化疾病，也可以說是我國之國病。故肝病醫療方法的研發，一直是我國醫藥界所共同致力之目標。

白花蛇舌草是台灣民間常用的生藥之一，常用於肝臟疾病⁽¹⁵⁾ 的治療。Lin 等⁽¹⁶⁾之研究指出，在台灣市售的白花蛇舌草中，常使用的有 *Hedyotis diffusa* Willd、*Hedyotis corymbosa* L.、*Hedyotis tenelliflora* Blume 及 *Mollugo pentaphylla* L. 等四種基源。根據文獻記載，

triterpene 類的 oleanolic acid (OA) 及 ursolic acid(UA)為白花蛇舌草的重要成份，已被證實有保肝^(17,18)、抗發炎⁽¹⁷⁾、抗腫瘤^(17, 19)、抗血內脂質過多症⁽¹⁷⁾、抗免疫缺乏症(Anti-HVI)⁽²⁰⁾、抗自由基⁽²¹⁾等作用。由以上研究結果得知，冬凌草不僅具有保肝作用，亦為一擁有抗腫瘤與治療肝癌效果的中草藥。本研究以各種溶劑及超臨界二氣化碳萃取白花蛇舌草中具有生物活性的成份，如 oleanolic acid 及 ursolic acid，探討各種萃取條件對於成份萃取量的影響。

二、研究內容

1. 水份測定

本研究之白花蛇舌草係購自高雄市的金漢行有限公司。首先將中草藥全草研磨至 35-70 mesh 的大小後，稱取 5 g 置於烘箱中乾燥至恆重，以測定水份含量。白花蛇舌草之水份含量為 9.2 %。後續所有萃取量的計算均以乾基(dry basis)為基準。

2. 超臨界二氣化碳萃取 (SFE)

超臨界二氣化碳萃取所採用的實驗設備為半流動式萃取裝置，如圖 1 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。取 10 g 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氣化碳與共溶劑，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。

3. 分析方法

本研究以 HPLC 分析萃取液中各成份的濃度。HPLC 係 JASCO 公司產製的，偵測器為 UV/Vis 多波長(190-650 nm)光電二極體(photodiode)偵測器。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。烘箱溫度控制在 45°C，流動相流速為 1 mL/min。分析 ursolic acid 與 oleanolic acid 的流動相為 H₂O(0.1% H₃PO₄)-CH₃OH (18:82, v/v)，偵測器之波長為 205 nm。

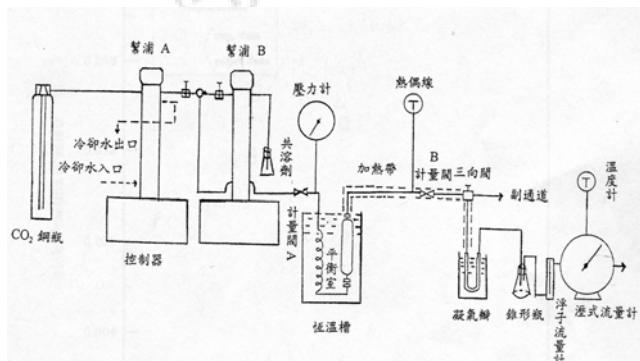


Fig. 1. A schematic diagram of the extraction apparatus of supercritical carbon dioxide.

三、結果與討論

1. HPLC 分析方法的精確性評估

量取一定量之成份，分別於同一日中分析六次(intraday)，以及連續六日中，每日分析

一次(interday)等兩種方式，以測試 HPLC 分析 oridonin 等三成份的精確性。表 1 顯示,intraday 及 interday 兩者之變異係數均小於 5%，可表示此分析方法的精確性與再現性均值得信賴。

Table 1 Intra- and inter-day precision for determination of OA and UA

Standard (mg/mL)	concentration	R.S.D.	
		Intraday (n=6)	Interday(n=6)
OA	0.6	2.59	4.12
UA	0.8	4.92	4.95

2. 超臨界二氣化碳萃取

(1) 未加共溶劑的超臨界二氣化碳萃取

於超臨界二氣化碳之壓力 1500-3000 psig 與溫度 40-60°C 下，萃取 4 小時，無法收集到上述二成份的萃取物，由此可知 oleanolic acid 等極性成份無法溶於非極性的 CO₂ 中，這結論與正己烷之萃取結果相同。

(2) 加共溶劑的超臨界二氣化碳萃取

Luque de Castro 與 Tena⁽²²⁾ 於 強極性或離子性化合物之超臨界流體萃取研究中指出，欲增加此等化合物之萃取產率，可藉由增加溶劑的極性與降低萃取物之極性兩方面達成。增加溶劑的極性方面，可採行的方式包括改變超臨界流體之溫度與壓力、使用強極性的溶劑，以及加入極性共溶劑(cosolvent or entrainer)等。而欲降低萃取物極性，可藉由形成離子對化合物、有機金屬化合物，以及形成複合物等達成。以超臨界二氣化碳而言，雖然改變其溫度與壓力，可提昇其萃取的能力，但超臨界二氣化碳即使於一般高壓的情況下，極性亦然很低，對於極性化合物的萃取效果仍然不佳，其萃取性質大約與正己烷相似，只能萃取較低極性的化合物。Lin 等⁽²³⁾ 於研究中提到，加入極性共溶劑可增加超臨界二氣化碳的極化度(polarizability)，進而大幅提高其對於強極性溶質的萃取能力。Lucien 與 Foster⁽²⁴⁾ 進一步的指出，添加愈多量之共溶劑，亦相對地可大幅提高溶質對於超臨界流體的溶解度。而共溶劑之添加量，一般均維持於 10% 內⁽²²⁾。

為了顧及藥物安全，本研究選擇藥用乙醇作為共溶劑，以修飾超臨界二氣化碳之極性，於 40°C 與 2000 psig 下進行萃取，結果如圖 2 所示。圖中顯示當乙醇濃度高於 5 % 以上，開始有一較明顯之 oleanolic acid 及 ursolic acid 的萃取量，且萃取量隨乙醇濃度的增加而增加，此一結論與 Lucien 與 Foster⁽²⁴⁾ 之結果互相契合。實驗結果亦可發現 ursolic acid 的萃取量遠大於 oleanolic acid，這意謂 ursolic acid 於白花蛇舌草中之含量遠高於 oleanolic acid，亦可能是因為乙醇對於 ursolic acid 之親和力較優於 oleanolic acid 所致。

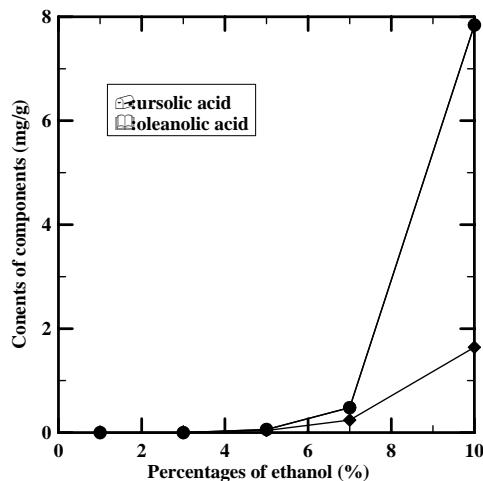


Fig. 2. Effect of the amount of co-solvent added on the content of two constituents extracted from Peh-Hua-Juwa-Chi-Cao as function of percentage of ethanol (SFE at 40 and 2000 psig).

溶質在超臨界二氣化碳中的溶解度，是決定於溶質本身之蒸氣壓，以及超臨界二氣化碳的密度。當溫度增加時，溶質本身之蒸氣壓會隨之增加，而超臨界二氣化碳的密度卻會隨之下降。由於溶質之蒸氣壓與溶劑密度對於溶解度大小有互相競爭的影響，故物質的溶解度在不同之溫度與壓力下，會有交錯現象(crossover phenomena)的發生(圖3)⁽²⁵⁾，即於P₁-P₂之範圍內，高溫(T₂)之物質的溶解度反較低溫(T₁)者差。許多關於超臨界流體萃取天然物之文獻中均提到此種現象，例如大豆⁽²⁶⁾、薄荷⁽²⁷⁾、向日葵子⁽²⁸⁾、薑⁽²⁹⁾等之萃取。本研究於壓力為1500-3000 psig 與溫度40-50°C下，以乙醇作為共溶劑萃取，於圖4 與5 中可發現，oleanolic acid與ursolic acid的萃取量均隨萃取溫度的增加而增加。此一結果應是當溫度增加時，溶質本身蒸氣壓上升的效應大於超臨界二氣化碳密度下降之趨勢所致，故無交錯現象的發生。再者，於圖4 與5 中亦顯示，oleanolic acid與ursolic acid之萃取量均隨壓力的升高而增加。此一現象主要是肇因於，當壓力上升時，超臨界二氣化碳的密度增加所致，因此造成溶質溶解度的增加。此一趨勢符合Hildebrand方程式的結果[30]。

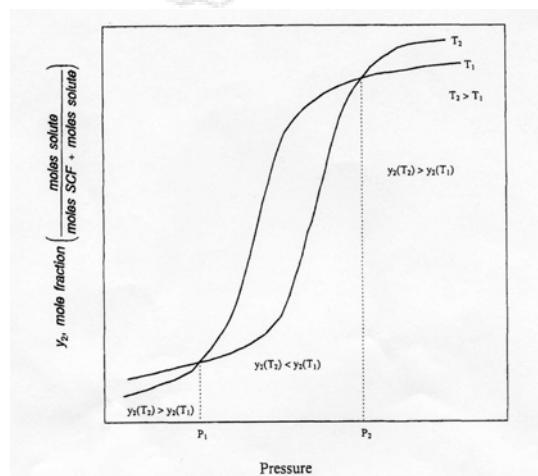


Fig. 3. Effect of temperature and pressure on solubility of solute in supercritical carbon dioxide⁽²³⁾.

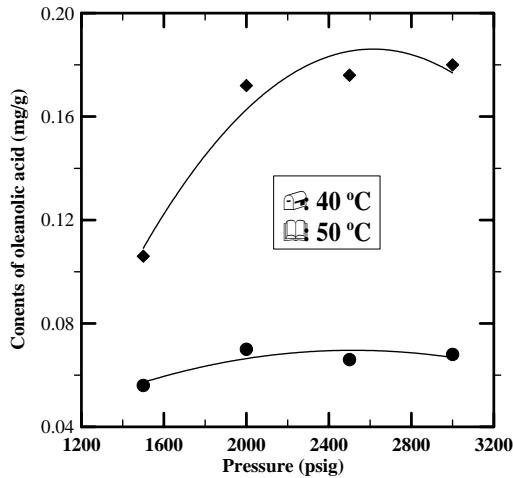


Fig. 4. Effect of temperature and pressure on the content of oleanolic acid extracted from Peh-Hua-Juwa-Chi-Cao by SFE with 5% ethanol as a modifier.

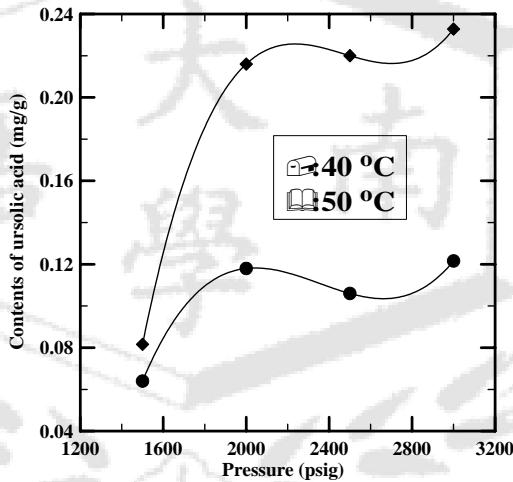


Fig. 5. Effect of temperature and pressure on the content of ursolic acid extracted from Peh-Hua-Juwa-Chi-Cao by SFE with 5% ethanol as a modifier.

四、結論

本研究於溶劑萃取白花蛇舌草研究中發現，在 40°C、2000 psig 下，有加 10 % 乙醇作為共溶劑的超臨界二氣化碳對於 ursolic acid 與 oleanolic acid 的萃取結果，即可與溶劑萃取於最適條件下之萃取量相較。故對於白花蛇舌草中 ursolic acid 與 oleanolic acid 的萃取，超臨界二氣化碳萃取法是一深具發展潛力之技術。

誌謝

本研究感謝學校計畫(CNPH93-11)經費的支持，特此誌謝。

參考文獻

1. Tzeng, B. k., "Chinese Medicine in the United States and It Perspective", Bioindutry, 7(1), 1-5, 1996.
2. Liu, J., "Pharmacology of Oleanolic Acid and Ursolic Acid", Journal of EthnoPharmacology, 57-68, 1995.
3. Ayroles, G., Rossard, R. M. and Cadiou, M., "Method for Obtaining an Rxtract or Ginkgo Biloba Leaves", U.S. patent, 4981688, 1991.
4. Bomebardelli, E., Mustich, G. and Bertani, M., "Extracts of Ginkgo Biloba and Their Methods of Preparation", U.S. patent, 5700468. 1997.
5. O'Reilly, J., "Extract from the Leaves of Ginkgo Biolba", U.S. patent, 5885582, 1999.
6. 野口衛，漢方製劑分析的技法，五十一年度厚生科學研究報告，大阪生藥學會，1976
7. Perrut, M., Clavier, J. Y., Poletto, M. and Reverchon, E., "Mathematical Modeling of Sunflower Seed Extraction by Supercritical CO₂", Ind. Eng. Chem. Res., 36, 430-135, 1997.
8. Lemberkovics, E., Kery, A., Marczal, G., Simandi, B. and Szoke, E., "Phytochemical Evaluation of Essential Oils, Medicinal Plants and Their Preparations", Acta Pharamaceutica Hungarica, 68(3), 141-149, 1998.
9. Senorans, F. J., Ibanez, E., Cavero, S., Tabera, J. and Reglero, G., "Liquid Chromatographic-mass Spectrometric Analysis of Supercritical-fluid Extracts of Rosemary", J. of chromatography, 870(1-2), 491-499, 2000.
10. Scalia, S. Giuffreda, L. and Pallado, P., "Analytical and Preparative Supercritical Fluid Extraction of Chamomile Flowers and Its Comparison with Conventional Methods", J. of Pharamaceutical and Biomedical Analysis, 21(3), 549-558, 1999.
11. Aleksovski, S., Sovova, H., Poposka, FA., Kulevanova, S. and Ristic, M., "Composition of Essential Oils Obtained from *Mentha Piperita* L. Using Supercritical Carbon Dioxide Extraction and Hydro-distillation", Acta Pharamaceutica, 49(1), 51-57, 1999.
12. Varga, E., Hajdu, Z., Veres, K., Mathe, I., Nemeth, E., Pluhar, Z. and Es, BJ., "Investigation of Production Biological and Chemical Variation of *Hyssopus Officinalis* L. ", Acta Pharamaceutica, 68(3), 183-188, 1998.
13. Scheffer, J. C., "Various Methods for the Isolation of Essential", Phytotherapy Research, 10, s6-s7, 1996.
14. 衛生署(<http://www.doh.gov.tw/>) 衛生資料統計。
15. Chiu, H. F., Lin, C. C., Yang, C. C. and Yang, F., "The Pharmacological and Pathological Studies on Several Hepatic Protecttive Crude Drugs from Taiwan(I)", American Journal of Chinese Medicine, 16(3-4), 127-137, 1988.
16. Lin, C. C. and Yang, J. J., "Antioxidant and free radical scavenging activity on some components of *Hedyotis* speciesl", Bioochem. Pharmacol., 1999-sumitted for publication.
17. Liu, J., "Pharmacology of Oleanolic Acid and Ursolic Acid", Journal of EthnoPharmacology, 57-68, 1995.
18. Jeong, H. G., "Inhibition of Cytochrome P450 2E1 Expression by Oleanolic Acid : Hepatoprotective Effects Against Carbon Tetrachloride-induced Hepatic Injury", Toxicology Letters, 105,215-222, 1999.
19. Oguro, T., Liu, J., Klaassen, C. D. and Yoshida, T., "Inhibitory Effect of Oleanolic Acid on 12-o-Tetradecanoylphorbol-13-acetate-Induced Gene Expression in Mouse Skin", Toxicological Sciences, 45,88-93, 1998 .
20. Kashiwada, Y., Wang H. K., Nagao T., Kitanaka S., Yasuda I., Fujioka T. and Yamagishi T., Cosentino L. M., Okabe H., Keshiro Y. I., Hu C. Q., Yeh E., Lee K. H., "Anti-AIDS Agents 30.Anti-HIV Activity of Oleanolic Acid, Pomolic Acid, and Structurally Related

- Triterpenoids”, J. Nat. Prod., 61,1090-1095, 1988.
- 21. Balanehru, S. and Nagarajan, B., “Protective Effects of Oleanolic Acid and Ursolic Acid Against Lipid Peroxidation”, Biochemistry International, 24(5), 981-990, 1991.
 - 22. Luquede Castro, M. D., and Tena, M. T., “Strategies for Supercritical Fluid Extraction of Polar and Ionic Compounds”, Trends in Analytical Chemistry, 15, 32-37, 1996.
 - 23. Lin, M. C., Tsai, M. J. and Wen, K. C., “Supercritical Fluid Extraction of Flavonoids from Scutellaria Radix”, Journal of Chromatography A, 830, 387-395, 1999.
 - 24. Lucien, F. P. and Foster, N. R., “Solubilities of Solid Mixtures in Supercritical Carbon Dioxide: a Review”, Journal of Supercritical Fluids, 17, 111-134, 2000.
 - 25. Castaneda-Acosta, J., Cain, A. W., Fischer, N. H. and Knopf F. C., “Extraction of Bioactive Sesquiterpene Lactones from Magnolia Grandiflora Using Supercritical Carbon Dioxide and Near-critical Propane”, J. Agric. Food Chem., 43, 63-68, 1995.
 - 26. Friedrich, J. P., List, G. R. and Heakin, A. J., “Petroleum-free Extraction of Oil from Soybeans with Supercritical Carbon Dioxide”, JAOCS, 59, 7, 288-292, 1982.
 - 27. Goto, M., Sato, M. and Hirose, T., “Extraction of Peppermint Oil by Supercritical Carbon Dioxide”, J. Chem. Eng. Japan, 26, 4, 401-407, 1993.
 - 28. Cocero, M. J. and Calvo, L., “Supercritical Fluid Extraction of Sunflower Seed Oil with Carbon Dioxide-ethanol Mixtures”, JAOCS, 73, 11, 1573-1578, 1996.
 - 29. Roy, B. C., Goto, M. and Hirose, T., “Extraction of Ginger Oil with Supercritical Carbon Dioxide: Experiments and Modeling”, Ind. Eng. Chem. Res., 35, 607-612, 1996.
 - 30. Giddings, J. C., Myers, M. N., McClaren, L. and Keller, R. A., Science, 162, 67 (1968).

