

嘉南藥理大學114年度

研究計畫成果報告

■校內專題研究整合型計畫

總計畫名稱：合成衍生物與天然植萃之新型抗菌劑開發策略

子計畫名稱：CN11410魚腥草全草萃取技術之評估

□個人型產學合作研究計畫

計畫名稱：

執行期間：114年06月09日至114年12月31日

總計畫主持人：施美份教授

本（子）計畫主持人：楊舜心 助理教授

中華民國115年02月20日

摘要

本研究旨在以現代天然物化學及新藥開發之觀點，系統性探討台灣產魚腥草 (*Houttuynia cordata* Thunb.) 之最佳活性富集工藝。實驗採用液-液分配萃取法 (Liquid-Liquid Partition)，將魚腥草甲醇粗萃取物依溶劑極性遞增之順序，分別以正己烷 (*n*-Hexane)、乙酸乙酯 (Ethyl Acetate, EtOAc)、正丁醇 (*n*-Butanol, BuOH) 及水進行分劃，並利用改良式 Folin-Ciocalteu 法與氯化鋁 (AlCl_3) 比色法，針對各區分層 (Fractions) 進行總多酚 (Total Phenolic Content, TPC) 與總黃酮 (Total Flavonoid Content, TFC) 之定量分析。

研究結果顯示，魚腥草之多酚類成分主要分佈於中高極性溶劑層，其中正丁醇層 ($19.9 \mu\text{g GAE}/100 \mu\text{g extract}$) 與乙酸乙酯層 ($18.97 \mu\text{g GAE}/500 \mu\text{g extract}$) 之多酚富集效果最為顯著，約為甲醇粗萃取物之 3.5 倍。在黃酮類化合物方面，乙酸乙酯層表現出最高的含量 ($33.33 \mu\text{g RE}/100 \mu\text{g extract}$)，其次為正丁醇層 ($28.25 \mu\text{g RE}/100 \mu\text{g extract}$)，證實此二溶劑層為開發抗氧化及抗發炎植物藥之關鍵活性分層。

綜合化學計量學分析與藥理活性文獻，本研究確認乙酸乙酯層為魚腥草最具開發潛力之「先導分劃」 (Lead Fraction)，其不僅去除了低極性雜質 (如脂質、葉綠素) 與無活性之高極性物質 (如多醣、鹽類)，更高度富集了槲皮苷 (Quercitrin) 等指標性黃酮成分。本報告提出之製程參數與分析觀點，可為魚腥草相關健康食品或植物新藥之品質管制與製程優化提供堅實之科學依據。



一、前言

魚腥草 (*Houttuynia cordata* Thunb.) 為三白草科 (Saururaceae) 蕺菜屬植物，為東亞地區極具代表性之藥食同源植物。在傳統中醫藥體系中，魚腥草性寒、味辛，歸肺經，具有清熱解毒、消癰排膿、利尿通淋之功效，長期以來被視為治療肺部感染 (如肺癰)、呼吸道發炎及泌尿系統感染之特效藥。

隨著現代分離技術與藥理學的進展，魚腥草之臨床應用價值已獲得科學驗證。研究指出，魚腥草及其萃取物具備顯著的抗病毒 (包括流感病毒、冠狀病毒)、抗菌、抗發炎、抗氧化及免疫調節活性[1]。

然而，如同許多傳統草藥，魚腥草在邁向國際化植物新藥 (Botanical drug) 或高階保健食品的過程中，面臨著「成分複雜」與「品質均一化」之挑戰。粗萃取物 (Crude Extract) 中往往含有大量無藥理活性或會干擾吸收的初級代謝產物 (如澱粉、纖維素、葉綠素、無機鹽等)。若無法透過科學化之製程將活性成分有效富集 (Enrichment)，將難以建立明確的劑量-反應關係 (Dose-Response Relationship)，亦無法滿足現代藥典對於指標成分 (Marker Compounds) 含量之嚴格規範。

在天然物化學研究中，為了從成千上萬種化合物中篩選出活性物質，最經典且有效的策略即為「極性導向之分劃」 (Polarity-guided Fractionation)。液-液分配萃取利用不同溶劑間之互不相溶性 (Immiscibility) 及物質在兩相間之分配係數差異，將複雜混合物依極性進行初步純化。為了評估各萃取層之富集效率，本研究選用兩種高通量之光譜分析法：Folin-Ciocalteu 法以及氯化鋁 (AlCl₃) 比色法，測定魚腥草不同極性分層中的總酚含量以及總黃酮含量。

二、研究目的

基於對魚腥草藥用潛力之重視及天然物研發之嚴謹要求，本研究旨在建立一套科學化且具再現性的萃取技術，首先著重於建立標準化之極性區分流程，驗證利用正己烷、乙酸乙酯、正丁醇對魚腥草甲醇粗萃取物進行分劃之可行性，並詳細評估各層之產率與操作特性，以期為後續之放大製程 (Scale-up process) 提供關鍵參數。同時，本研究將深入解析活性成分之極性分佈規律，透過定量分析各萃取層中總酚與總黃酮之含量，釐清魚腥草中抗氧化成分之主要分佈區間，並特別針對文獻指出之乙酸乙酯層，確認其是否為黃酮類化合物之主要富

集區，以驗證其作為活性指標部位之適切性。

進一步而言，本研究將評估萃取溶劑之選擇性與富集倍率，計算各溶劑層相對於粗萃取物之活性成分富集倍數，藉此篩選出最具開發價值之極性分層。在分析方法學上，亦將探討分析方法之適用性與干擾因素，特別是針對低極性溶劑層（如正己烷層）在比色測定中可能因葉綠素干擾而出現之偽陽性數據，進行批判性分析並提出修正建議，確保數據解讀之科學性。最終，提供產品開發策略建議，綜合實驗結果，針對未來開發抗發炎、抗病毒之魚腥草植物新藥或保健食品，提出具體的原料前處理與提取工藝建議，以促進魚腥草相關產品之科學化與國際化發展。

三、 實驗器材與方法

3.1. 實驗樣品 (Plant Materials)

來源：本研究採用之魚腥草原料購自農記山農場加工廠。

3.2. 實驗試劑與藥品 (Chemicals and Reagents)

所有使用之化學試劑均為分析級 (Analytical Grade) 以上，以確保微量分析之準確度與再現性。

萃取溶劑：

- 甲醇 (Methyl Alcohol)：購自友和化工原料有限公司，作為初始全成分萃取溶劑。
- 正己烷 (Hexane)、乙酸乙酯 (EtOAc)、正丁醇 (Butanol)：購自友和化工原料有限公司公司，用於液-液分配。
- 去離子水：由實驗室逆滲透過濾系統製備，作為水相溶劑及試劑配製基礎。

分析試劑：

- 無水碳酸鈉 (Sodium carbonate, Na_2CO_3)：ACS 一級標準品 (純度 99.95-100.05%，Merck)。用於在 Folin-Ciocalteu 反應中營造鹼性環境 (pH ~10)，促進酚羥基之解離與氧化。
- 福林-酚試劑 (Folin & Ciocalteu's phenol reagent)：購自 Merck。此試劑對光敏感，需避光保存。
- 三氯化鋁 (Aluminum chloride hexahydrate, $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)：純度 99%，購自 Merck。為黃酮定量之螯合劑。
- 醋酸鉀 (Potassium acetate, CH_3COOK)：純度 >99%，購自 Merck。用於 AlCl_3 反應體系中維持適當酸鹼值，穩定化合物結構。



標準品 (Standards) :

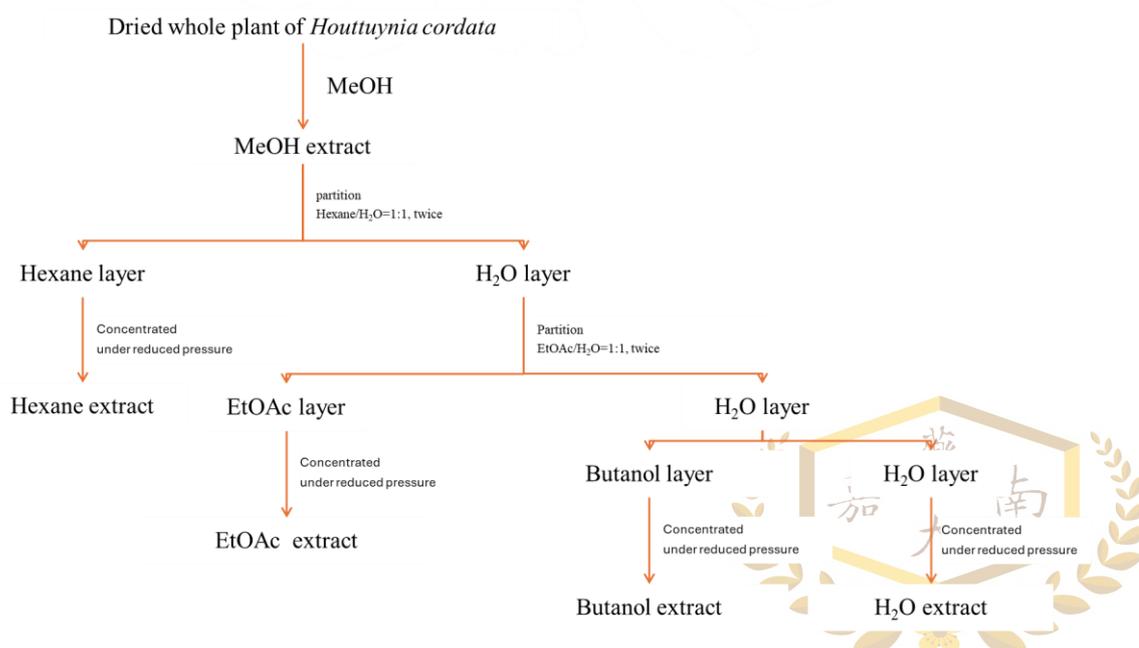
- 芸香苷 (Rutin) (Sigma-Aldrich) : 用於總黃酮含量檢量線之製作。
- 沒食子酸 (Gallic acid) (Sigma-Aldrich) : 用於總酚含量檢量線之製作

3.3. 實驗儀器

所有分光光度測量均使用全波長多功能微盤分析儀 (BioTek Instruments, Inc., 型號 Synergy HT) 進行。使用減壓濃縮機 (EYELA 東京理化器械株式會社, 型號 N-1300) 濃縮萃取物。

3.4. 魚腥草成分萃取與極性區分流程

取 3 台斤 (1800 公克) 乾燥新鮮魚腥草浸漬於 100% 甲醇當中，於室溫靜置五天後將萃取物溶液濾出，使用減壓濃縮機 (EYELA 東京理化器械株式會社, 型號 N 1300) 濃縮萃取物溶液，直至甲醇溶劑完全去除，得魚腥草-甲醇萃取物，留取部分作為樣品，再將該萃取物溶解於去離子水與正己烷 Hexane 比例 1:1 混合溶劑進行液-液萃取 (Liquid-Liquid Extraction)，收集正己烷 Hexane 層之溶液，將剩餘水層加入等體積乙酸乙酯 EtOAc 進行液-液萃取，收集乙酸乙酯 EtOAc 層之溶液，將剩餘水層中再加入等體積正丁醇 Butanol 進行液-液萃取，最後分別收集正丁醇 Butanol 層之溶液及剩餘水層中之溶液，個別溶液皆進行減壓濃縮至溶劑完全去除，最終得本次研究樣品包括：魚腥草-甲醇萃取物 (HCM)、魚腥草-正己烷萃取物 (HCMH)、魚腥草-乙酸乙酯萃取物 (HCME)、魚腥草-正丁醇萃取物 (HCMB) 和魚腥草-水層萃取物 (HCMW)。



3.5. 總酚類化合物含量分析

採用 Folin & Ciocalteu 試劑測定法，該方法參考 (Pereira et al.)(2018) [2] 報告的方法並進行修改。以沒食子酸 Gallic acid 標準品繪製檢量線。將 Gallic acid 溶於

40% 乙醇中配置成 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的初始溶液，接著將溶液稀釋成 0.5、1、5、10、50、75、100、125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。分別取 100 μL 稀釋後的標準溶液，加入 100 μL 的去離子水與 Folin & Ciocalteu 試劑 1:1 稀釋溶液、加入 800 μL 的 5% 碳酸鈉去離子水溶液於微量離心管中，經 Vortex (震盪) 與離心處理，吸取 200 μL 上清液

移至 96 孔盤後室溫避光 20 分鐘，使用全波長多功能微盤分析儀，在 760 nm 測定反應混合物的吸光值。空白對照組中，以等量的 40% 乙醇代替樣本。以上述相同方法，將各樣品與 Folin & Ciocalteu 試劑反應，以測定總酚類化合物的含量。

3.6. 黃酮類化合物含量分析

採用氯化鋁比色法，該方法參考 (Farasat et al.)(2014)[3]報告的方法並進行修改。以芸香苷 Rutin 標準品繪製檢量線。將 rutin 溶於 100% 甲醇中配置成 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的初始溶液，接著將溶液稀釋成 10、50、100、150、200、250、300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。分別取 80 μL 稀釋後的標準溶液，加入 80 μL 10% 三氯化鋁、80 μL 1M 醋酸鉀、720 μL 去離子水於微量離心管中。經 Vortex (震盪) 與離心處理，吸取 200 μL 上清液移至 96 孔盤，室溫靜置 30 分鐘後使用全波長多功能微盤分析儀，在 415 nm 測定反應混合物的吸光值。空白對照組中，以等量的 100% 甲醇代替樣品。以上述相同方法，將各樣品與三氯化鋁反應，以測定黃酮類化合物的含量。

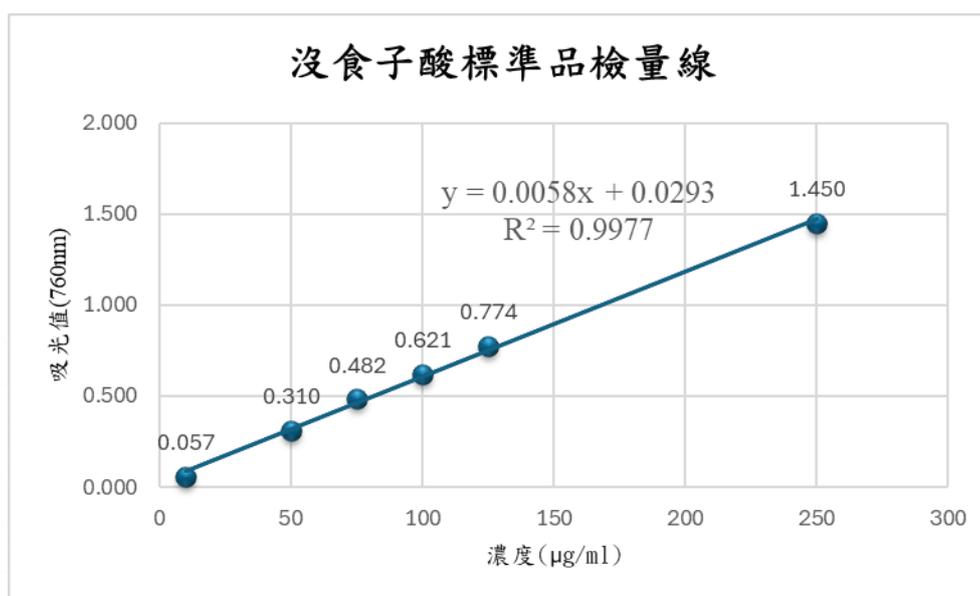
四、 結果與討論

4.1. 檢量線之建立與方法確效

在本實驗中，總酚 (TPC) 與總黃酮 (TFC) 之檢量線均展現了極佳的線性關係。Gallic acid 與 Rutin 之標準曲線 R^2 值均接近 1.0 (圖一及圖二)，顯示在設定的濃度範圍內 (TPC: 0.5-125 $\mu\text{g}/\text{mL}$; TFC: 10-300 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，該分析方法具有良好的線性度與可靠性。這為後續樣品定量數據的準確性奠定基礎。

4.2. 酚類化合物含量分析

將各萃取層樣品配製成相同濃度 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，測定其總酚含量，結果如表 1 所示。實驗數據顯示，甲醇粗萃取物之總酚含量僅約 5.55%，這意味著粗萃取物中有將近 95% 為非酚類物質 (如多醣、蛋白質、脂質等)。經過液-液分配後，正丁醇層與乙酸乙酯層之總酚濃度分別躍升至 19.90% 與 18.97%，富集倍率高達 3.5 倍以上。這證實了利用中高極性溶劑進行分劃，能有效剔除大量無效雜質，是提升魚腥草萃取物品質的關鍵步驟。



圖一、沒食子酸 Gallic acid 標準品檢量線

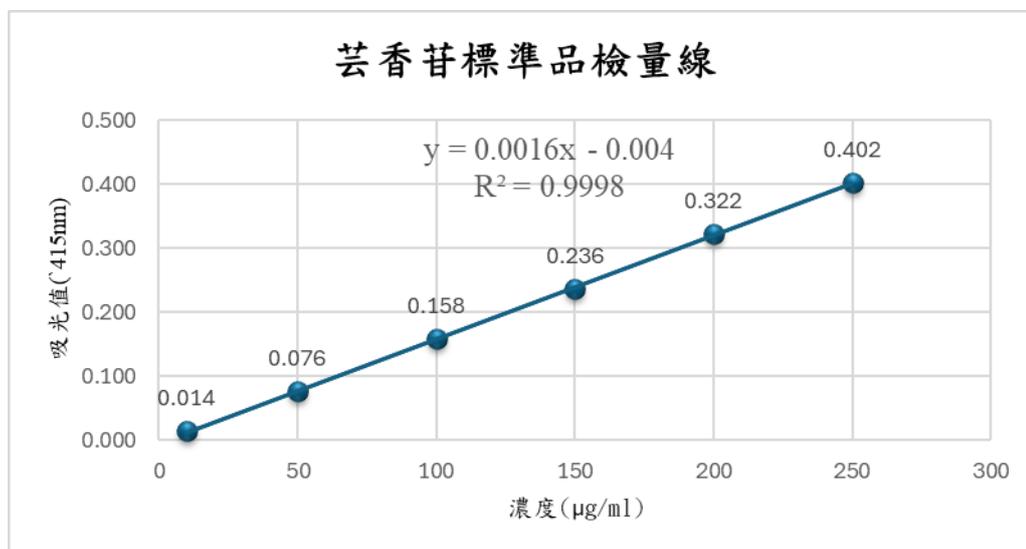
表一、各樣品中測得之酚類化合物含量

| 樣品 | TPC ($\mu\text{g GAE} / 100 \mu\text{g sample}$) | 富集倍率 (Fold Enrichment) |
|------|--|------------------------|
| HCM | 5.55 | 1.00 (基準) |
| HCMH | 0.36 | 0.06 |
| HCME | 18.97 | 3.42 |
| HCMB | 19.90 | 3.58 |
| HCMW | 3.39 | 0.61 |

4.3. 黃酮類化合物含量分析



同樣以 100 $\mu\text{g/mL}$ 濃度測定各層之總黃酮含量，結果如表 2 所示。與 TPC 結果略有不同，TFC 數值顯示乙酸乙酯層擁有最高的黃酮含量 (33.33%)，顯著高於正丁醇層。



圖二、芸香苷 (rutin) 標準品檢量線

表二、各樣品中測得之黃酮類化合物含量

| 樣品 | TFC ($\mu\text{g RE} / 100 \mu\text{g sample}$) | 富集倍率 (Fold Enrichment) |
|------|---|------------------------|
| HCM | 8.80 | 1.00 (基準) |
| HCMH | 17.17 | 1.95 |
| HCME | 33.33 | 3.79 |
| HCMB | 28.25 | 3.21 |
| HCMW | 2.42 | 0.27 |

4.4. 討論

由此研究可知，乙酸乙酯 (EtOAc) 與正丁醇 (BuOH) 是富集魚腥草多酚與黃酮類化合物之最佳溶劑系統。相較於甲醇粗萃取物，乙酸乙酯層之黃酮含量提升了約 3.8 倍，達到 33.3% 之高含量。此研究成果對後續將此傳統草藥進行成分分離以及健康食品開發奠定了堅實的化學基礎。



參考文獻

[1] Z. Wu, X. Deng, Q. Hu, X. Xiao, J. Jiang, X. Ma, M. Wu, *Houttuynia cordata* Thunb: An Ethnopharmacological Review, *Front Pharmacol* 12 (2021) 714694. <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2021.714694>

[2] G.A. Pereira, H.S. Arruda, G.M. Pastore, Modification and validation of Folin-Ciocalteu assay for faster and safer analysis of total phenolic content in food samples, *Braz J Food Res* 9 (2018) 125–140.

[3] M. Farasat, R.A. Khavari-Nejad, S.M. Nabavi, F. Namjooyan, Antioxidant activity, total phenolics and flavonoid contents of some edible green seaweeds from Northern coasts of the Persian gulf, *Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR* 13(1) (2014) 163-70.

