

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-93-10

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 21 日

一、前言

因為受到農藥與藥物的濫用、食品中化學物品不當的添加，以及環境污染等諸多因素的影響，已使得人類之肝臟造成極大的負擔。在衛生署的統計資料顯示⁽¹⁾，歷年來(70-92 年)台灣地區十大死亡原因中，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。故治療肝病藥物的研發，對於全民健康的保護，乃是一項相當重要之課題。

在傳統使用之中草藥中相傳具有保肝作用者，包括柴胡、茵陳、山豆根、山葡萄、薑黃、三白草、羊蹄甲、金線蓮、枸杞、山防風、山芋麻、欖人葉、地耳草、苦菜、酸藤、蝴蝶花、石上柏、土丁桂、龍葵、白花蛇舌草、半枝蓮……等等。其中半枝蓮常與白花蛇舌草配伍使用於治療肝臟疾病⁽²⁾。半枝蓮是唇形科黃芩屬植物狹葉韓信草 (*Scutellaria barbata* Don) 之乾燥全草，近代的臨床研究顯示^(3, 4)，半枝蓮之水萃取物於大白鼠受 D-半乳糖胺 (D-galactosamine)、對位乙醯胺酚 (Acetaminophen) 以及四氯化碳等三種不同作用機轉之肝毒化物，所誘發之肝細胞損傷具有顯著的抑制作用。同時，由詹等人⁽⁵⁾ 之研究中發現，半枝蓮之萃取物於小白鼠腹水癌也有抑制作用。另外，據 Chou⁽⁶⁾ 及後續多位學者⁽⁷⁻¹²⁾ 之研究發現，半枝蓮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，由 Kimuya 等人⁽¹³⁾ 與 Abe 等人⁽¹⁴⁾，以及其他多位學者⁽¹⁵⁻¹⁹⁾研究發現，Baicalein、Baicalin 及 Wogonin 具有保肝及抗腫瘤之作用。而芹菜素 (apigenin)、木犀草素 (luteolin) 對人類前列腺癌有毒殺與抑制作用⁽²⁰⁾。又有研究證實原兒茶酸 (protocatechuic acid) 對人類結腸癌細胞的生長有抑制作用⁽²¹⁾。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。

中草藥之抽取物 (湯劑) 因具有內服吸收快、療效迅速之優點，故在臨床應用上最為常見。由於現代科學的進步，一些新技術、新方法、新指標成份、新劑型等的開發應用，湯劑已漸為科學中藥製劑所取代。而科學中藥製劑，在台灣的中藥廠中，大都係將藥材加水 (有時亦加入少量酒)，並以水蒸氣加熱蒸煮 (萃取) 後，去渣起汁，濃縮後再藉由賦型劑吸收，以及其他加工步驟，以製得方便攜帶與服用之劑型。但據 1976 年，野口衛⁽²²⁾ 於半夏厚朴湯抽取實驗顯示，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 %，其餘有 46.7% 是在煎熬過程中揮發掉的；所以如何有效地抽取藥材中所含之成分，亦是中草藥製程研發的一大關鍵。

中草藥的萃取方法常用者有溶劑萃取⁽²³⁻²⁷⁾、溶劑萃取加超音波振盪⁽²⁸⁾、微波萃取⁽²⁹⁾ 與超臨界流體萃取^(23-26, 28, 30-31) 等。前三種方法是較常採用之傳統萃取技術，而超臨界流體萃取係歐美國家現在最盛行的綠色萃取法，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，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。目前尤其是應用至天然物與中草藥萃取加工時，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。

本研究以各種溶劑及超臨界二氣化碳萃取中草藥半枝蓮中的保肝與抗腫瘤成分 naringenin、luteolin、protocatechuic acid、wogonin、baicalein、baicalin 與 apigenin 等，探討各種萃取條件對於各成分萃取量的影響，研究結果於中草藥萃取技術的提昇應有所助益，並可作為保肝藥理學之研究基礎。

二、研究內容

1. 水份測定

將半枝蓮全草研磨至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，以測定水份含量。測定結果半枝蓮之水份含量為12.1%，故後續所有萃取量的計算均以扣除此值之乾基(dry basis)作為基準。

2. 超臨界二氧化碳萃取 (SFE)

超臨界二氧化碳萃取所採用的實驗設備為半流動式萃取裝置，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(Fig. 1)。首先秤取一定重量研磨後之半枝蓮置於樣品匣(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、壓力及動態平衡後，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

本研究中 Naringenin 等七種各成份之標準品是 Aldrich 公司生產的，藉由 HPLC 分析比對，用以決定萃取液中各成份的濃度。HPLC 係 JASCO 公司產製的，偵測器為 UV/Vis 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 protocatechuic acid 的流動相為 0.1% H₃PO₄，偵測器之波長為 270 nm。分析 naringenin、luteolin、baicalin、apigenin 的流動相為 0.1% H₃PO₄-CH₃CN (80:20, v/v)，偵測器之波長為 280 nm。分析 baicalein 的流動相為 0.1% H₃PO₄-CH₃CN (75:25, v/v)，偵測器之波長為 280 nm。分析 wogonin 的流動相為 0.1% H₃PO₄-CH₃CN (70:30, v/v)，偵測器之波長為 280 nm。

三、結果與討論

1. HPLC 分析方法的精確性評估

量取 0.5 mg/mL 之 Naringenin 等七成份的標準品，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)兩種方式，以鑑定 HPLC 分析各成份的精確性。結果顯示，wogonin、baicalein、baicalin、naringenin、luteolin、apigenin 及 protocatechuic acid 等七成份之 intraday 的相對標準偏差(RSD)分別為 3.41、2.92、3.71、2.18、3.06、2.87 及 3.64；而 wogonin、baicalein、baicalin、naringenin、luteolin、apigenin 及 protocatechuic acid 等七成份之 interday 的相對標準偏差(RSD)分別為 3.83、3.04、4.19、2.73、3.53、3.05 及 3.97。兩者之相對標準偏差(RSD)均約略於 4% 內，表示本分析方法的精確性及再現性均值得信賴。

2. 超臨界二氧化碳萃取

(1) 未加共溶劑的超臨界二氧化碳萃取

於超臨界二氧化碳之壓力 103-205 bar 與溫度 307-333K 下，萃取 4 小時，無法收集到上述諸成份的萃取物，由此可知 wogonin 等極性成份無法溶於非極性的 CO₂ 中。

(2) 加共溶劑的超臨界二氧化碳萃取

基於用藥安全之考量，選用乙醇作為共溶劑，於壓力 171 bar 與溫度 325K 下萃取，探討共溶劑用量對於成份萃取量的影響，結果如圖 2 所示。顯示當乙醇濃度高於 2.13 % 以上，開始有一較明顯的成份萃取量，且 wogonin 等三成份之萃取量均隨乙醇含量的提升而增加，此一結論與 Lucien 及 Foster 之結果互相契合，亦表示乙醇是一適合的共溶劑。

以 11.5% 乙醇為共溶劑，探討溫度及壓力對萃取量的影響。圖 3 中顯示，在壓力 171 bar 與溫度 307-333K 下，wogonin 等三成份之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，溶質本身蒸氣壓上昇的效應大於超臨界二氧化碳密度下降之趨勢所致。而在 339-342K 範圍時，成份萃取量反倒有下跌趨勢。這可能是溶質本身蒸氣壓與超臨界二氧化碳密度互相競爭的結果，致造成錯現象的發生。再者，於圖 4 中發現，在萃取溫度 325K 下，wogonin 等三成份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，超臨界二氧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。於圖 3 與圖 4 亦顯示，wogonin 等三成份均於壓力 171- 205bar 與溫度 328- 333K 下，具有較佳的萃取效果。此意謂著，在超臨界二氧化氮萃取法加乙醇為共溶劑下，wogonin 等三成份僅需使用中等之萃取壓力與溫度，即可達到滿意的萃取效果。

四、結論

本研究於超臨界二氧化氮萃取半枝蓮研究中發現，有加乙醇作為共溶劑的超臨界二氧化氮對於 wogonin 等三成份的萃取結果，有明顯增加的趨勢。

誌謝

本研究感謝學校計畫(CNPH93-10)經費的支持，特此誌謝。

參考文獻

1. 衛生署(<http://www.doh.gov.tw/>) 衛生資料統計。
2. Chiu, H. F., Lin, C. C., Yang, C. C. and Yang, F., "The Pharmacological and Pathological Studies on Several Hepatic Protective Crude Drugs from Taiwan(I)", American Journal of Chinese Medicine, 16(3-4), 127-137, 1988.
3. Chiu, F. H., Lin, C. C., Yen, M. H., Wu, P. S. and Yang, C. Y., "The Pharmacological and Pathological Studies on Several Hepatic Protective Crude Drugs from Taiwan (V): The Effects of Bombax Malabrica and Scutellaria Rivularis", Am. J. Chin. Med., 4, 257-264, 1992.
4. 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.
5. 謙鎮遠，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。
6. Chou, C. J., "A New Favone from Scutellaria Rivularis", J. Taiwan Parm. Assoc., 30, 36-43, 1978.
7. 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.
- 8. Chou, C. J. and Lin, S. Y., “Studies on the Constituents of Scutellaria Rivularis Roots(III)”, J. Taiwan Parm. Assoc., 37, 186-209, 1985.
 - 9. Tomimori, T., Miyaichi Y., Imoto, Y. and Kizu, H., “Studies on the Constituents of Scutellaria Species X, On the Flavonoid Constituents of Ban Zhi Lian the Whole Herb of Scutellaria Rivalaris Wall(I)”, Shoyakugaku Zasshi, 38, 249-252, 1984.
 - 10. Tomimori, T., Lin, H., Miyaichi, Y., Toyofuku, S. and Namba, T., “ Studies on the Constituents of Scutellaria Species VI, On the Flavonoid Constituents of the Root of Scutellaria Baicalensis Georgi (5), Quantitative analysis of Flavonoids in Scutellaria Roots by High-performance Liquid Chromatography”, Yakugaku Zasshi, 105, 148-155 , 1985.
 - 11. Tomimori, T., Miyaichi, Y., Imoto, Y. and Kizu, H., “Studies on the Constituents of Scutellaria Species VII, On the Flavonoid Constituents of Ban Zhi Lian, the Whole Herb of Scutellaria Rivalaris Wall(2) ”, Shoyakugaku Zasshi, 40, 432-433, 1986.
 - 12. 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.
 - 13. 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.
 - 14. 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.
 - 15. 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., pp. 94-95, 1995.
 - 16. 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, pp. 69-70, 1996.
 - 17. 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。
 - 18. 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。
 - 19. 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。
 - 20. 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.
 - 21. Hudson, E. A., Dinh, P. A., Kokubun, T., Simmonds, M. S. and Gescher, A., “Characterization of Potentially Chemopreventive Phenols in Extracts of Brown rice that Inhibit the Growth of Human Colon Cancer cells”, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev., Nov, 9(11), 1163-70, 2000.
 - 22. 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
 - 23. Baysal, T. and Starmans, D. A. J., “ Supercritical carbon dioxide extraction of carvone and limonene from caraway seed”, Journal of Supercritical Fluids, 14, 225-234, 1999.
 - 24. Yepez, B., Espinosa, M., Lopez, S. and Bolanos, G., “Producing antioxidant fractions from herbaceous matrices by supercritical fluid extraction”, Fluid Phase Equilibria, 194-197, 879- 884, 2002.
 - 25. Lucas, A., Martinez, E., Rincon, J., Balanco, M. A. and Gracia, I., “ Supercritical fluid extraction of tocopherol concentrates from olive tree leaves”, Journal of Supercritical

- Fluids, 22, 221- 228, 2002.
26. Chiu, K. L., Cheng, Y. C., Chen, J. H. Chang, C. J. and Yang, P. W., " Supercritical fluids extraction of Ginkgo ginkgolides and flavonids", Journal of Supercritical Fluids, 24, 77- 87, 2002.
 27. Chen, J. H., Xia, Z. H. and Tan, R. X., " High-performance liquid chromatographic analysis of bioactive triterpenes in Perilla frutescens", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 32, 1175- 1179, 2003.
 28. Lin, M. C., Tsai, M. J. and Wen, K. C., " Supercritical fluid extraction of flavonoids from Scutellariae Radix", Journal of Chromatography A, 830, 387- 395, 1999.
 29. Sha, Y. F., Huang, Tao M., Shen, S. and Duan, G. L., " Determination of volatile compounds in Magnolia Bark by microwave-assisted extraction couple to headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry", The Japan Society for Analytical Chemistry, 20, 857-859, 2004.
 30. Catchpole, O. J., Perry, N. B., da Silva, B. M. T., Grey, J. B. and Smallfied B. M., " Supercritical extraction of herbs I: Saw Palmetto, St John's Wort, Kava Root, and Echinacea, ", Journal of Supercritical Fluids, 22, 129- 138, 2002.
 31. Zancan, K. C., Marques, M. O.M., Petenate, A. J., Meireles, M. A. A., " Extraction of ginger (Zingiber officinale Roscoe) oleoresin with carbon dioxide and co-solvents: a study of the antioxidant action of the extracts ", Journal of Supercritical Fluids, 24, 57- 76, 2002.
 32. LuquedeCastro, M.D. and Ten a, M.T., "Strategies for Supercritical Fluid Extraction of Polar and Ionic Compounds", Trends in Analytical Chemistry, 15, 32-37, 1996.

圖

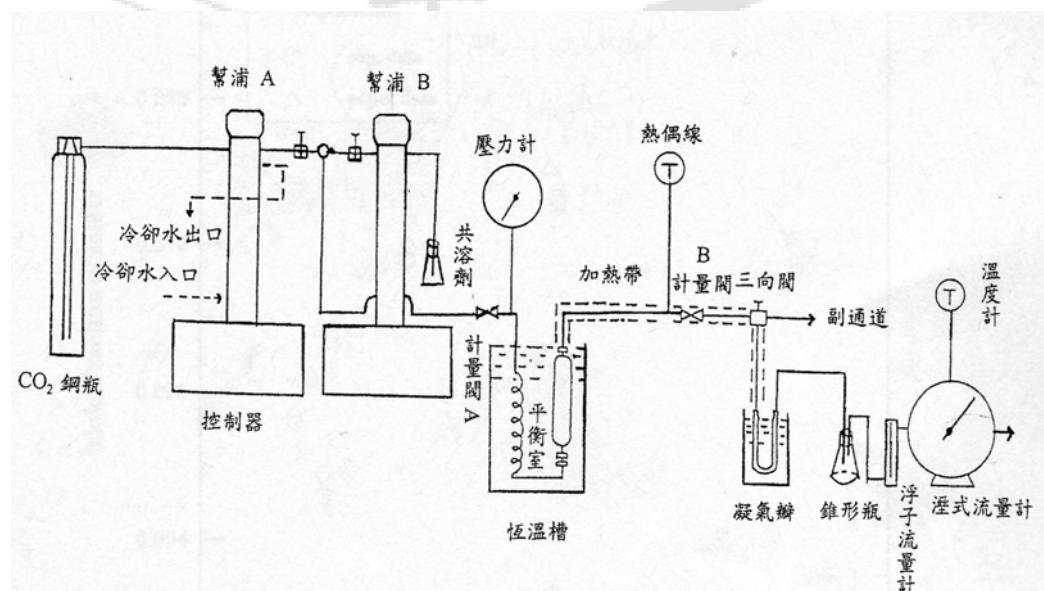


Fig. 1. A schematic diagram of the extraction apparatus of supercritical carbon dioxide.

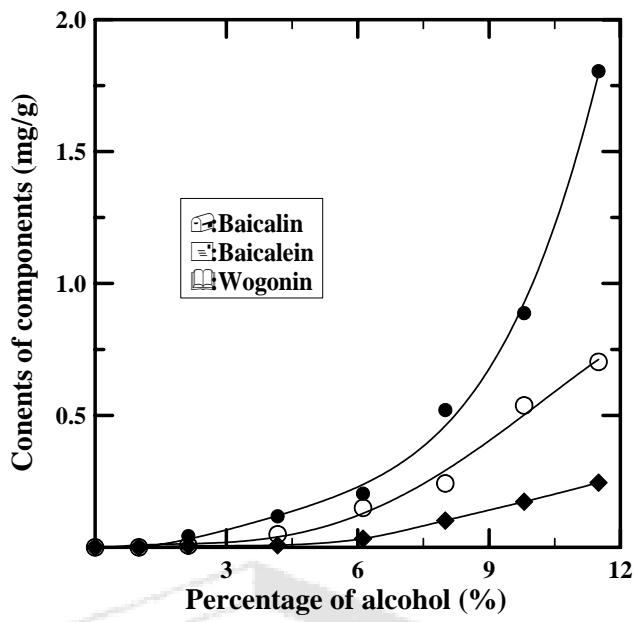


Fig. 2. Effect of the amount of co-solvent added on the extraction of three constituents from *Scutellaria Barbata* Don as function of percentage of alcohol (SCE at 171 bar and 328K).

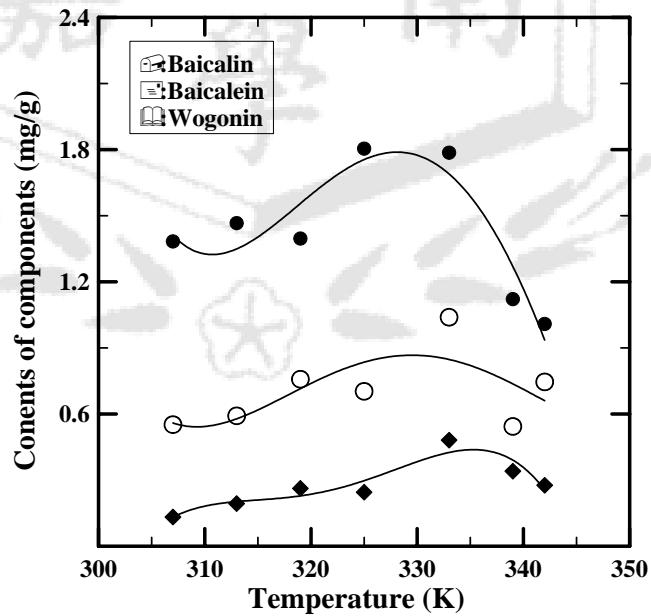


Fig. 3. Effect of temperature on the extraction of three constituents from *Scutellaria Barbata* Don (SCE at 171 bar and 11.5% alcohol).

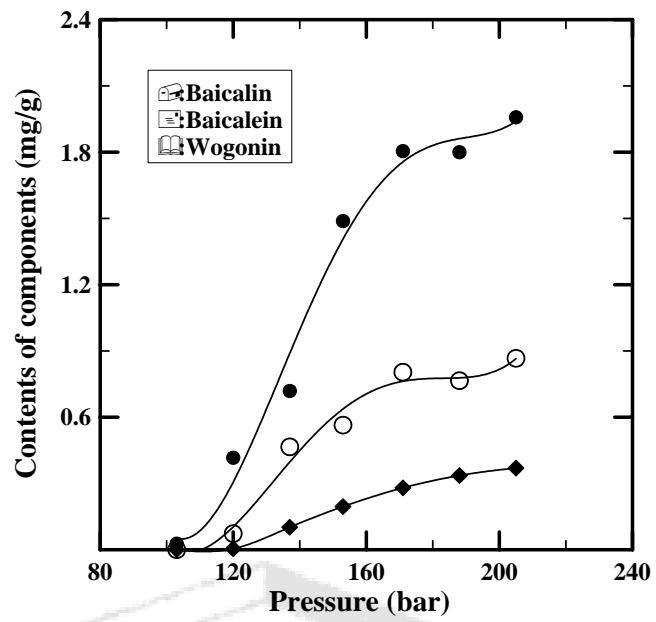


Fig. 4. Effect of pressure on the extraction of three constituents from *Scutellaria Barbata* Don (SCE at 328 K and 11.5% alcohol).