

以超音波輔助萃取日本筋骨草之護肝活性成分

陳國洲、柯文慶、謝昌衛

E-mail: 344717@mail.dyu.edu.tw

摘要

日本筋骨草 (Ajuga) 為唇形科植物，其主要活性成分為黃酮類及蛻皮甙酮，兩者皆具有多項生理活性，包括抗氧化活性、改善心血管疾病以及護肝功能等效用。近年來超音波輔助萃取技術廣泛應用於中草藥活性成分萃取，具有萃取率高、萃取時間短以及成本低等優點。因此本研究以超音波萃取技術搭配 L9 直交實驗設計，進行日本筋骨草活性成分的萃取，並探討其最適化萃取條件。實驗結果顯示，時間 50 min、溫度 60 °C、固液 (乾燥筋骨草 / 70% 乙醇) 比 1:20 時，為黃酮類與蛻皮甙酮最佳萃取條件，黃酮類含量可達 7.87 mg/g，蛻皮甙酮含量可達 0.73 mg/g；所得萃取液 (濃度 5 mg/mL) 之 DPPH 清除力可達 84.8%，超氧陰離子清除力為 60.8%，還原力則隨著萃取液濃度增加而有上升趨勢。化學性肝損傷實驗部分，相較於 CCl₄ 誘導肝損傷組，日本筋骨草萃取液對 GPT 與 GOT 指數皆顯著下降現象，下降幅度分別為 40.6% 以及 46.2%，顯示日本筋骨草萃取液對於化學性肝損傷具有抑制效果。綜合結果顯示超音波輔助萃取技術能將日本筋骨草活性成分大量萃取出，萃出液並具有顯著護肝活性，未來能提供活性成分於食品、化妝品和藥物等領域的應用。

關鍵詞：日本筋骨草、黃酮類化合物、蛻皮甙酮、超音波輔助萃取、護肝活性

目錄

目錄 中文摘要.....	iii 英文摘要.....
.....iv 誌謝.....
.....v 目錄.....vi 圖目錄.....
.....xi 表目錄.....
.....xiii 1. 前言.....1 2. 文獻回顧.....
.....2 2.1 筋骨草屬 (Ajuga) 植物簡介.....
.....2 2.2 台灣產筋骨草屬植物形態及分佈簡介.....3 2.2.1 匍匐筋骨草.....
.....3 2.2.2 日本筋骨草.....
.....3 2.2.3 矮筋骨草.....3 2.2.4 台灣筋骨草.....
.....4 2.2.5 網果筋骨草.....4 2.3 筋
骨草屬植物研究概況.....4 2.3.1 筋骨草屬植物生理及藥理作用簡介.....
.....4 2.3.2 不同種筋骨草屬植物的生理作用簡介.....5 2.3.2.1 降血
糖.....5 2.3.2.2 保肝功能.....
.....5 2.3.2.3 降血脂及減少血中膽固醇.....6 2.3.2.4 抑制腫瘤.....
.....6 2.3.2.5 治療燒燙傷.....7 2.3.4 蛻皮甙酮.....
.....6 2.3.3 筋骨草屬植物相關成分研究進展.....9 2.3.5 黃酮類化合物.....
.....9 2.4 中草藥活性成分不同萃取方法介紹.....14 2.4.1 超音波輔助萃取.....
.....14 2.4.1.1 熱學原理.....
.....14 2.4.1.2 機械作用.....15 2.4.1.3 空穴作用.....
.....15 2.5 直交表.....16 2.5.2 因素分析.....
.....17 2.6 肝臟介紹.....19
.....19 2.6.1 肝臟.....19 2.6.2 化學性肝損傷.....
.....19 2.6.3 血液生化指標.....22 2.7
抗氧化活性評估.....22 2.7.1 自由基之定義.....
.....22 2.7.2 超氧歧化?.....23 2.7.3 自
由基清除能力.....23 2.7.4 還原力.....
.....24 3. 材料與方法.....25 3.1 實驗流
程.....25 3.2 實驗材料與試藥.....
.....25 3.3 實驗儀器.....26 3.4 實驗動物

.....	26 3.5 實驗方法.....
.....	29 3.5.1 樣品前處理.....	29 3.5.2 不同萃取
實驗建立.....	29 3.5.2.1 熱水萃取.....
.....	29 3.5.2.2 乙醇萃取.....	29 3.5.2.3 超臨界流體
萃取.....	30 3.5.2.4 超音波萃取.....
.....	30 3.6 最適化萃取條件之探討.....	32 3.6.1 直觀分析.....
.....	32 3.6.2 回應值計算.....
.....	32 3.6.3 級差值 (R 值) 計算.....	33 3.6.4 變異數分析.....
.....	33 3.7 活性成分含量分析.....
.....	36 3.7.1 總黃酮含量分析.....	36 3.7.2 總黃酮標準曲線建立...
.....	36 3.7.3 蛻皮甾酮含量分析.....
.....	36 3.7.4 蛻皮甾酮標準曲線建立.....	37 3.7.5 活性成分產量計算方式...
.....	37 3.8 抗氧化試驗.....
.....	37 3.8.1 DPPH 自由基清除活性評估.....	37 3.8.2 還原力.....
.....	38 3.8.3 清除超氧陰離子.....
38 3.9 肝功能生化指標測定及肝組織切片觀察.....	39 3.10 肝損傷誘導模式.....
.....	39 3.10.1 化學性肝損傷評估.....
40 4. 結果與討論.....	42 4.1 不同萃取方法之影響.....
.....	42 4.2 超音波萃取預實驗.....
42 4.2.1 超音波萃取時間對活性成分產量之影響.....	43 4.2.2 超音波萃取溫度對活性成分產量之
影響.....	43 4.2.3 超音波萃取乙醇濃度對活性成分產量之影響.....	44
4.2.4 超音波萃取固液比對活性成分產量之影響.....	50 4.2.5 超音波萃取頻率對活性成分產量之影
響.....	50 4.3 以直交實驗設計法探討最適黃酮類化合物及蛻皮甾酮萃取條件.....	53
4.3.1 萃取時間對活性成分萃取之影響.....	58 4.3.2 萃取溫度對活性成分萃取之影響.....
.....	58 4.3.3 固液比對活性成分萃取之影響.....	59 4.3.4
萃取的最適條件.....	62 4.4 樣品萃取液抗氧化活性.....
.....	65 4.4.1 樣品萃取液之 DPPH 清除率.....	65 4.4.2 樣
品萃取液之還原力.....	66 4.4.3 樣品萃取液之清除超氧陰離子.....
.....	67 4.5 樣品萃取液護肝活性.....	71 4.5.1 化學
性肝損傷結果.....	71 4.5.2 肝組織切片觀察.....
.....	72 5. 結論.....	76 參考文獻...
.....	77 圖目錄 圖1.筋骨草屬植物中活性成分結構.....
.....	8 圖2.蛻皮甾酮.....	11 圖3.
黃酮類基本結構.....	12 圖4.苯丙胺酸合成類黃酮化合物路徑.....
.....	13 圖5.四氯化碳誘導肝臟傷害機制.....	21 圖6.
實驗架構.....	27 圖7.日本筋骨草.....
.....	28 圖8.超音波萃取時間對總黃酮和蛻皮甾酮產量之影響.....	47 圖9.
超音波萃取溫度對總黃酮和蛻皮甾酮產量之影響.....	48 圖10.超音波萃取乙醇濃度對總黃酮和蛻皮甾
酮產量之影響.....	49 圖11.超音波萃取固液比對總黃酮和蛻皮甾酮產量之影響.....	51
圖12.超音波萃取頻率對總黃酮和蛻皮甾酮產量之影響.....	52 圖13.HPLC蛻皮甾酮層析圖.....
.....	56 圖14.HPLC日本筋骨草層析圖.....
57 圖15.正交實驗設計中 3個因子對活性成分萃取的影響.....	61 圖16.第6組萃取液 (50 min、60
、1:20) 對 DPPH 清除力之影響.....	68 圖17.第6組萃取液 (50 min、60 、1:20) 對清除超氧陰離子之影響.....
69 圖18.第6組萃取液 (50 min、60 、1:20) 對還原力之影響.....	70 圖19.日本筋骨草萃取液對四氯化碳誘導
小鼠 GPT 值上升的抑制作用.....	73 圖20.日本筋骨草萃取液對四氯化碳誘導小鼠 GOT 值上升的抑制作用.....
74 圖21.四氯化碳誘導肝損傷組織切片觀察.....	75 表目錄 表1.L9 (34) 直交表實驗配置...
.....	18 表2.不同萃取方法條件.....
.....	31 表3.直交實驗設計中各因子與水準之定義.....	34 表4.變異數分析公式與分析表...
.....	35 表5.化學性肝損傷動物分組.....
.....	41 表6.不同萃取方法總黃酮含量比較.....	45 表7.超音波萃取預實驗條件.....
.....	46 表8.L9 (34) 直交表實驗設計黃酮類化合物萃取實驗結果.....
.....	54 表9.L9 (34) 直交表實驗設計蛻皮甾酮萃取實驗結果.....	55 表10.直交實驗設計法-級差分析結
果.....	60 表11.直交實驗設計中黃酮類化合物萃取實驗之變異數分析.....

參考文獻

- 1.王初、周曉芳和陳偉英。2003。白毛夏枯草鮮汁治療燙傷的實驗研究。中國現代應用藥學雜誌 20 (4):311-312。
- 2.王嘉麒。2008。枸杞中類黃酮素、多醣體與類胡蘿蔔素的製備及抗氧化活性評估。輔仁大學食品科學系碩士論文。
- 3.利文耀。2007。發酵蔬果飲品之製備及其機能性評估。大葉大學生物產業科技學系碩士論文。
- 4.吳立軍。2006。中藥化學。科技圖書館。台北。
- 5.吳旭、王武軍、張軍花、熊俊和侯量。2006。植物藥有效成分 -蛻皮激素抑制血管內皮細胞的凋亡。中國臨床康復 10 (19) 72-73。
- 6.吳德峰。1997。淺析筋骨草的藥用價值。福建畜牧獸醫 (I) 32-330。
- 7.李亦品。2006。以酒精與四氯化碳誘導肝損傷動物模式評估護肝功能之研究。臺北醫學大學保健營養學系碩士論文。
- 8.林宏穗。2004。設計一種新型的直交粒子群最佳化演算法。逢甲大學碩士論文。
- 9.林進和唐仕榮。2005。論天然黃酮類化合物及其抗氧化作用。徐州工程學院學報 20:187-190。
- 10.林勵民。2007。巴西胡椒木之抗氧化成分研究。嘉義大學生命科學院碩士論文。
- 11.武繼彪、隋在雲和張玲。2001。 -蛻皮甾酮延緩衰老的初步實驗研究。天然產物研究與開發 13 (5):28-29。
- 12.邱年永和張光雄。2001。原色台灣藥用植物圖鑑 (6)。第 181 及 184 頁。南天書局有限公司。台北。台灣。
- 13.邱明華和邢其毅。1998。具有生理活性的天然有機化合物，化學進展 10 (3):265-272。
- 14.施益民、呂峰洲。1989。自由基與各種疾病當代醫學，16 (5):399-407。
- 15.徐世清、戈志強、戴漩穎、喬洪根、司馬楊虎和鄭必平。2005。20-羥基蛻皮酮的藥理作用和醫學應用研究進展。科技通報 21 (1):56-62。
- 16.祝國強、劉慶歐、杭國明、周第云、張學良、丁勇、楊潔、郭東星、羅明奎、騰海英、王培承。2009。醫藥數理統計方法。高等教育出版社。北京，中國。
- 17.馬志平和黃榕。2002。筋骨草有效部位黃酮類粗品的保肝試驗。海峽藥學 14 (5):40-41。
- 18.高述崙。1992。田口式品質工程概論。中華民國品質學會。台北，台灣。
- 19.張証維。2009。荔枝果實多酚萃取物具保護肝臟功能。嘉義大學生物醫藥科學研究所碩士論文。
- 20.張曉東、潘國鳳和呂圭源。超聲提取在中藥化學成分提取中的應用研究進展。2004。時珍國醫藥 15(12):861-862。
- 21.陳炳輝。2008。枸杞中類黃酮素、多醣體與類胡蘿蔔素的製備及抗氧化活性評估。輔仁大學食品科學系碩士論文。
- 22.陳莉莉、吳紅權、李穎和師琴。2002。漏蘆中蛻皮甾酮提取方法研究。中藥材。 (25) 3:195-197。
- 23.陳惠英、顏國欽。1998。自由基、抗氧化防禦與人體健康，中華民國營養學會會誌，23 (1): 105-121。
- 24.陳耀茂。2001。實驗設計與解析法。高立圖書。台北，台灣。
- 25.陳耀茂譯。安部季夫著。2002。直交表實驗計劃法。五南圖書。台北，台灣。
- 26.曾茂貴、賈伽和吳符火。2003。筋骨草對小鼠 S180 肉瘤的抑瘤試驗。福建中醫學院學報 13 (2):30-31。
- 27.項昭保。霍丹群和任紹光。2002。超音波在中藥化學成分提取中的應用。自然雜誌 23(5):289-291。
- 28.黃麗蓉。2009。葡萄籽中前花青素的分離純化與分析檢測探討。朝陽科技大學應用化學系碩士論文。
- 29.楊遠波、劉和義、彭鏡毅、施炳霖和呂勝由編著。1999。臺灣維管束植物簡誌第四卷，行政院農業委員會，台北，臺灣。
- 30.褚小蘭和王漢章。1997。筋骨草的本草考証。中藥材 20 (11): 586-587。
- 31.劉斌、石任兵、葛小俠、周瑩和周靜。2001。筋骨草屬植物化學成分與藥理活性。國外醫藥(植物藥分冊) 16 (3) 96-101。
- 32.劉斌、石任兵、葛小俠、周瑩和周靜。2001。筋骨草屬植物化學成分與藥理活性。國外醫藥 (植物藥分冊) 16 (3):96- 101。
- 33.蔡昊都和陳皓君，2006。蔬果中類黃酮之抗氧化作用與生物活性。化學 64 (3):315-353。
- 34.蕭久富。2007。不同萃取方法對台灣筋骨草及匍匐筋骨草活性成分之分析比較研究。大葉大學生物產業科技學系碩士論文。
- 35.賴建福。2010。四種台灣產筋骨草活性成分含量及其抗氧化能力之分析比較。
- 36.龍春、高志強、陳鳳鳴和王林。2006。黃酮類化合物的結構-抗氧化活性關係研究進展。重慶文理學院學(自然科學) 5 (2):13-17。
- 37.謝宗欣。1998。台灣筋骨草屬植物介紹。自然保育季刊 21:21-27。
- 38.鍾錠全。1997。青草世界-彩色圖鑑。第 273 頁。協聯印書館有限公司。台北。台灣。
- 39.譙斌宗、楊元和高玲。2002。微波萃取在衛生檢驗中的應用。中國衛生檢驗雜誌 12 (5):632-634。
- 40.嚴偉、李淑芬和田松江。2002。超聲波協助提取技術。化工進展 21 (9):649-651。
- 41.蘇朝墩。1999。產品穩健設計-田口品質工程方法的介紹和應用。中華民國品質學會。台北，台灣。
42. Baron, V., and Muriel, P., 1999. Role of glutathione, lipid peroxidation and antioxidants on acute bile-duct obstruction in the rat. *Bba-Gen Subjects*, 1472(1-2):173-180.
43. Bogs, J., Downey, O., Harvey, S., Ashton, R., Tanner, J., and Robinson, P., 2005. Proanthocyanidin synthesis and expression of genes encoding leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase in developing grape berries and grapevine leaves. *Plant Physiol*, 139:652-663.
44. Camnel, V., 2001. Recent extraction techniques for solid matrices supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. *Analyst*, 126:1182-1193.
45. Chen, Q., Xia, Y., and Qiu, Z., 2006. Effect of ecdysterone on glucose metabolism in vitro. *Life Sci*, 78(10):1108-1113.
46. Chenni, A., Ait Yahia, D., Boukourt, F. O., Prost, J., Lacaille-Dubois, M. A., and Bouchenak, M., 2007. Effect of aqueous extract of *Ajuga iva* supplementation on plasma lipid profile and tissue antioxidant status in rats fed a high-cholesterol diet. *J Ethnopharmacol*, 109(2):207-213.
47. Chiu, K., Cheng, Y., Chen, J., Chang, C., and Yang, P., 2002. Supercritical fluids extraction of Ginkgo ginkgolides and flavonoids. *J Supercrit Fluid*, 24(1):77-87.
48. Finaud, J., Lac, G., and Filaire, E., 2006. Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Med*, 36:327-358.
49. Forst, P., and Dean, P., 1997. Extraction of Hexaconazole from Weathered Soils: a comparison between Soxhlet extraction, microwave-assisted extraction, supercritical fluid extraction and accelerated solvent extraction. *Analyst*, 122:895-898.
50. Fridovich, I., 1975. Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem*, 44:147-159.
51. Fridovich, I., 1986. Biological effects of the superoxide radical. *Arch Biochem Biophys*, 247:1-11.
52. Halliwell, B., and Gutteridge, C., 1985. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press. London. U.K.
53. Harman, D., 2003. The free radical theory of aging. *Antioxid Redox Sign*, 5(5):557-561.
54. Hartonen, K., Parshintsev, J., Sandberg, K., Bergelin, E., Nisula, L., and Riekkola, M., 2007. Isolation of flavonoids from aspen knotwood by pressurized hot water extraction and comparison with other extraction techniques. *J Talanta*, 74(1):32-38.
55. Hilaly El, J., and Lyoussi, B., 2002. Hypoglycaemic effect of the lyophilized aqueous extract of *Ajuga iva* in normal and streptozotocin diabetic rats. *J Ethnopharmacol*, 80(2):109-113.
56. Hilaly El, J., Lyoussi, B., Wibo, M., and Morel, N., 2004. Vasorelaxant effect of the aqueous extract of *Ajuga iva* in rat aorta. *J Ethnopharmacol*, 93(1):69-74.

58.Hsieh, L. L., 2007. Studies on the antioxidant capacity of water extract from papaya (*Carica papaya*) fruit. Department of Food and Nutrition, Providence University, Master Thesis. 59.Huang, W., Xue, A., Niu, A., Jia, Z., and Wang, J., 2009. Optimised ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Folium eucommiae* and evaluation of antioxidant activity in multi-test systems in vitro. *Food Chem*, 114(3):1147-1154. 60.Husain, S. R., Cillard, J., and Cillard, P., 1987. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry*, 26:2489-2491. 61.Joshi, S., Kuszynski, A., Bagchi, M., Bagchi, D., 2000. Chemopreventive effects of grape seed proanthocyanidin extract on Chang liver cells. *Toxicology*, 155:83-90. 62.Kariba, R. M., 2001. Antifungal activity of *Ajuga remota*. *Fitoterapia*, 72:77-178. 63.Kim, S.J., Han, D., Moon, K.D. and Rhee, J.S. 1995. Measurement of superoxide dismutase-like activity of natural antioxidants. *Biosci Biotech Bioch*, 59:822-826. 64.Konoshima, T., Takasaki, M., Tokuda, H., and Nishino, H., 2000. Cancer chemopreventive activity of an iridoid glycoside, 8-acetylharpagide, from *Ajuga decumbens*. *Cancer Lett*, 157:87-92. 65.Li, Y., 2008. The discussion of detection method about free mineral acid in white vinegar. *Fujian Analysis and Testing*. 17(1):78-79. 66.Lieber, CS., and DeCarli, LM., 1994. Animal models of chronic ethanol toxicity. *Methods Enzymol*, 233:585-594. 67.McCord, M., and Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocytes. *Biol Chem*, 244:6049-6055. 68.McCord, M., and Fridovich, I., 1970. Utility of superoxide dismutase in studying radical reactions. *Biol Chem*, 25:1374-1377. 69.McKim, E., Konno, A., Gabele, E., Uesugi, T., Froh, M., Sies, H., Thurman, G., and Arteel, E., 2002. Cocoa extract protects against early alcohol-induced liver injury in the rat. *Arch Biochem Biophys*, 406:40-46. 70.Moran, J. F., Klucas, R. V., Grayer, R. J., Abain, J., and Becana, M., 1997. Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: prooxidant and antioxidant properties. *Free Radical Bio Med*, 22:861-870. 71.Oyaizu, M., 1986. Studies on products of browning reaction: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44(6):307-315. 72.Park, H., 1996. Robust design and analysis for quality engineering. Kluwer Academic, South, Korea. 73.Phadke, D., 1989. Quality Engineering Using Robust Design. Englewood Cliffs, NJ:Prentice-Hall. 74.Robak, J., and Gryglewski, I. R., 1988. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem Pharmacol*, 37:837-841. 75.Sarni-Manchado, P., Le Roux, E., Le Guerneve, C., Lozano, Y., and Cheynier, V., 2000. Phenolic composition of litchi fruit pericarp. *J Agric Food Chem*, 48(12):5995-6002. 76.Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., and Nakamura, T., 1992. Antioxidative properties of xanthone on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J Agric Food Chem*, 40:945-948. 77.Singh, S., Shackleton, G., Ah-Sing, E., Chakraborty, J., and Bailey, ME., 1992. Antioxidant defenses in the bile duct-ligated rat. *Gastroenterology*, 103 (5):1625-1629. 78.Sun, B., Belchior, P., Ricardo-da-Silva, M., and Spranger, I., 1999. Isolation and purification of dimeric and trimeric procyanidins from grape seeds. *J Chromatogr A*, 841(1):115-121. 79.Terahara, N., Callebaut, A., Ohba, R., Nagata, T., Ohnishi-Kameyama, M., and Suzuki, M., 2001. Acylated anthocyanidin 3-sophoroside-5-glucosides from *Ajuga reptans* flowers and the corresponding cell cultures. *Phytochemistry* 58(3):493-500. 80.Tseng, SH., Chien, TY., Tzeng, CF., Lin, YH., Wu, C., and Wang, C., 2007. Prevention of hepatic oxidative injury by Xiao-Chen-Chi-Tang in mice. *J Ethnopharmacol*, 111(2):232-239. 81.van Acker SA, van den Berg DJ, Tromp MN, Griffioen DH, van Bennekom WP, van der Vijgh WJ, and Bast A., 1995. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biol Med*, 20(3):331-342. 82.Vandenburg, J., and Clifford, A., 1999. Comparison of pressurized fluid extraction and microwave assisted extraction with atmospheric pressure methods for extraction of additives from polypropylene. *Analyst*, 124:397-400. 83.Weber, W., Boll, M., and Stampfl, A., 2003. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol*, 33:105-136. 84.Xiao, W., Han, L., and Shi, B., 2008. Microwave-assisted extraction of flavonoids from *Radix Astragali*. *Sep Purif Technol*, 62(3):614-618. 85.Yokozawa, T., Chen, CP., Dong, E., Tanaka, T., Nonaka, G-I., and Nishioko, I., 1998. Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Biochem Pharmacol*, 56(2):213-222. 86.Zhang, P., Bagby, G., Xie, M., Stoltz, D., Summer, W., and Nelson, S., 1998. Acute ethanol intoxication inhibits neutrophil beta2- integrin expression in rats during endotoxemia. *Alcohol Clin Exp Res*, 22 (1):135-41. 87.Zhishen, J., Mengcheng, T., and Jianming, W., 1999. The determination of flavonoids contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem*, 64: 555-559.