

# Comparison of Microwave-assisted and Ultrasonic-assisted Extraction of Huperzine A from *Huperzia Ser*

王承中、楊博文

E-mail: 345479@mail.dyu.edu.tw

## ABSTRACT

Base on those research in this following year, Huperzine A what we can find out in *Huperzia serrata* is kind of potent Acetylcholinesterase blocker; Acetylcholinesterase is the enzyme which decompose the Acetylcholine, and Acetylcholine is the Neurotransmitter of nerve function and memory working. That's why Huperzine A can help treatment the memory loss, especially the Alzheimer's disease and early symptoms of dementia. The purpose of this research is use microwave to assist the extraction method, extraction the Huperzine A inside of *Huperzia serrata*, and used the HPLC for the qualitative analysis; Also to investigate the best condition of microwave assist and ultrasound assist extraction method though the Orthogonal experimental design (Orthogonal Array) to assist the extraction the Huperzine A inside of *Huperzia serrata*. In this research, we also looking for compare Antioxidant capacity inside of the active ingredients in the best extraction condition, it can be the helping data to prove in the product development. In the resource show to us the best condition of microwave assist extraction method is ethanol concentration 75%, solid-liquid ratio is 1:30, temperature in 70 ,working time is 5 min, and get the Huperzine A is 0.0062 mg/mL; and the the best condition of ultrasound assist extraction method is ethanol concentration 75%, solid-liquid ratio is 1:30, temperature in 60 ,working time is 90 min, and get the Huperzine A is 0.007 mg/mL. The analysis of active ingredients has also get some content.

Keywords : *Huperzia serrata*、Huperzine A、microwave assist extraction、ultrasound assist extraction

## Table of Contents

封面內頁 簽名頁 中文摘要 iii 英文摘要 iv 誌謝 v 目錄 vi 圖目錄 ix 表目錄 xi 1. 前言 1 2. 文獻回顧 3 2.1 千層塔簡介 3 2.2 石杉鹼甲簡介 5 2.3 阿茲海默氏症簡介 6 2.4 中藥植物與天然物其化學成分不同萃取法簡介 7 2.4.1 冷浸攪拌萃取 8 2.4.2 熱迴流萃取 8 2.4.3 超音波輔助萃取 8 2.4.4 微波輔助萃取 10 2.5 類黃酮化合物 13 2.6 多醣化合物 13 2.7 多酚類化合物 14 2.8 三?類化合物 14 2.9 抗氧化能力 14 2.10 直交實驗計劃法 15 3. 材料與方法 18 3.1 試驗材料 18 3.2 試驗方法 21 3.2.1 樣品製備 21 3.2.2 水份含量測試 21 3.2.3 不同萃取方法之建立 21 3.2.4 成份分析 27 3.2.5 抗氧化能力分析 32 3.2.6 統計分析 32 4. 結果與討論 34 4.1 微波輔助萃取單一因子探討 34 4.1.1 不同萃取溶劑對石杉鹼甲產量之影響 34 4.1.2 不同萃取溫度對石杉鹼甲產量之影響 37 4.1.3 不同萃取時間對石杉鹼甲產量之影響 39 4.1.4 不同萃取固液比對石杉鹼甲產量之影響 41 4.2 微波輔助萃取直交表試驗 43 4.3 超音波輔助萃取單一因子探討 51 4.3.1 不同萃取溫度對石杉鹼甲產量之影響 51 4.3.2 不同萃取時間對石杉鹼甲產量之影響 53 4.3.3 不同萃取固液比對石杉鹼甲產量之影響 55 4.4 超音波輔助萃取直交表試驗 57 4.5 品種間石杉鹼甲產率比較 63 4.6 活性成份分析 64 4.6.1 總黃酮產率比較 64 4.6.2 總多酚產率比較 67 4.6.3 總多醣產率比較 70 4.6.4 總三?產率比較 73 4.6.5 萃取液中固形物含量測定 76 4.6.6 DPPH 自由基清除能力 78 4.6.6 超氧陰離子 (SOD) 清除能力 83 5. 結論 86 參考文獻 88 附錄 95 圖目錄 圖1 蛇足石杉 4 圖2 蛇足石杉 4 圖3 石杉鹼甲結構式 5 圖4 正常人體大腦與阿茲海默症患者大腦比較 7 圖5 大葉千層塔 18 圖6 小葉千層塔 18 圖7 試驗設計 20 圖8 微波輔助萃取直交表條件配置 24 圖9 超音波輔助萃取直交表條件配置 27 圖10 微波輔助萃取-不同乙醇濃度對石杉鹼甲產率比較 36 圖11 微波輔助萃取-不同萃取溫度對石杉鹼甲產率比較 38 圖12 微波輔助萃取-不同萃取時間對石杉鹼甲產率比較 40 圖13 微波輔助萃取-不同萃取固液比對石杉鹼甲產率比較 42 圖14 *Huperzine A*標準品之HPLC圖譜 45 圖15 千層塔萃取液之HPLC圖譜 46 圖16 微波輔助萃取千層塔-L9(33)各組石杉鹼甲產率比較 48 圖17 微波輔助萃取石杉鹼甲L9(33)各項萃取因子之訊號與雜訊 (S/N) 比值 49 圖18 微波輔助萃取最佳條件進行連續3次萃取石杉鹼甲 50 圖19 超音波輔助萃取-不同萃取溫度對石杉鹼甲產率比較 52 圖20 超音波輔助萃取-不同萃取時間對石杉鹼甲產率比較 54 圖21 超音波輔助萃取-不同萃取固液比對石杉鹼甲產率比較 56 圖22 超音波輔助萃取千層塔-L9(33)各組石杉鹼甲產率比較 60 圖23 超音波輔助萃取石杉鹼甲L9(33)各項萃取因子之訊號與雜訊 (S/N) 比值 61 圖24 超音波萃取最佳條件進行連續3次萃取石杉鹼甲 62 圖25 品種間石杉鹼甲產率比較 63 圖26 微波輔助萃取及超音波輔助萃取大葉千層塔中總黃酮產率比較 65 圖27 微波輔助萃取大葉千層塔及小葉千層塔總黃酮產率比較 66 圖28 微波萃取及超音波萃取大葉千層塔中總多酚產率比較 68 圖29 微波輔助萃取大葉千層塔及小葉千層塔總多酚產率比較 69 圖30 微波輔助萃取及超音波輔助萃取大葉千層塔中總多醣產率比較 71 圖31 微波輔助萃取大葉千層塔及小葉千層塔總多醣產率比較 72 圖32 微波輔助萃取及超音波輔助萃取大葉千層塔中總三?產率比較 74 圖33 微波輔助萃取大葉千層塔及小葉千層塔總三?產率比較 75 表目錄 表1 微波輔助萃取千層塔直交表各因子及參數範圍 44 表2 微波輔助萃取千層塔-L9(33)直交實驗設計表 47 表3 超音波輔助萃取千層塔直交表各因子及參數範圍 58 表4 超音波輔助萃取千層塔-L9(33)直交實驗設計表 59 表5 微波輔助萃取及超音波輔助萃取大葉千

層塔中固形物含量比較 76 表6微波輔助萃取大葉千層塔及小葉千層塔固形物含量比較 77 表7微波輔助萃取大葉千層塔萃取液DPPH自由基清除能力 79 表8超音波輔助萃取大葉千層塔萃取液DPPH自由基清除能力 80 表9大葉千層塔萃取液DPPH自由基清除能力 81 表10小葉千層塔萃取液DPPH自由基清除能力 82 表11微波輔助萃取大葉千層塔萃取液及超音波輔助萃大葉千層塔萃取液SOD清除能力 84 表12大葉千層塔萃取液及小葉千層塔萃取液SOD清除能力 85

## REFERENCES

- 1.王銳。2007。不同植株千層塔中石杉鹼甲含量研究。河南中醫醫學院學報22:133-134。
- 2.王艷和張鐵軍。2005。微波萃取技術在中藥有效成分提取中的應用。中草藥(36)3:470-473。
- 3.甘尉棠。2004。現代化工分離技術講座。精細石油化工4:63-65。
- 4.白雪蓮和章華偉。2005。微波萃取技術及在食品化學中的應用。食品工業科技11(26):182-185。
- 5.朱國輝、邱泰球和黃卓烈。2001。超聲波在萃取中的應用。聲學技術20(4):188-190。
- 6.吳立軍。2006。中藥化學。第1-33頁。科技圖書館。台北。台灣。
- 7.李岡榮。2005。實用台灣草藥百科。第108頁。漢宇國際文化有限公司。臺北。台灣。
- 8.李明、彭艷麗和田永云。2006。指紋圖譜技術在中藥鑑定中的應用。衛生職業教育24(7):105-107。
- 9.李齊激。2007。貴州不同產地千層塔中石杉鹼甲的含量研究。貴陽中醫學院民族醫藥研究89:6-7。
- 10.李靈霞和師伯省。2006。指紋圖譜技術的應用概況。健康大視野-醫學分冊(8):42-43。
- 11.沈明來。2005。試驗設計學第三版。第349-363頁。九州圖書文物有限公司。台北。台灣。
- 12.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。
- 13.邱年永和張光雄。2001。原色台灣藥用植物圖鑑。第181及184頁。南天書局有限公司。台北。台灣。
- 14.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。
- 15.金繼曙和都述虎。1994。筋骨草中黃酮類成份的研究。安徽醫學15(2):51-52。
- 16.查聖華。2004。從千層塔中微波協助提取石杉鹼甲和石杉鹼乙。中國生物工程雜誌24:11-13。
- 17.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。
- 18.袁珂和俞莉。2006。超聲提取與微波萃取冬凌草甲素的工藝比較。中國中藥雜誌(31)9:778-779。
- 19.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。
- 20.張英、俞卓裕和吳曉琴。2004。中草藥和天然植物有效成分提取新技術-微波協助萃取。中國中藥雜誌29(2):104-108。
- 21.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。時珍國醫國藥15(12):861-862。
- 22.張馨。2008。千層塔中石杉鹼甲的提取工藝優化。瀋陽藥科大學學院10:11-13。
- 23.許朝凱。2007。國內外保健食品管理制度概況。食品生技11:22-27。
- 24.都拉梯和于化東。2005。正交試驗設計表的使用分析。蘇州大學學報17(5):334-335
- 25.單文軍、郭芳齡、王科軍和徐建平。2006。微波技術在天然產物生物活性成份提取中的應用研究。江西化工所(4):46-49。
- 26.項昭保、霍丹群和任紹光。2002。超音波在中草藥化學成分提取中的應用。自然雜誌23(5):289-291。
- 27.馮年平、范廣平、吳春蘭和韓朝陽。2002。微波萃取技術在中藥提取中的應用。世界科學技術-中藥現代化(4)2:49-52。
- 28.楊明。2000。HPLC法測定時杉科植物中石杉鹼甲的含量。軍事醫學科學毒物藥物研究所24:3-5。
- 29.蔡寶昌和劉訓紅。2005。常用中藥材HPLC指紋圖譜測定技術。第1-33頁。化學工業出版社。北京。中國。
- 30.鄧湘慶和龔盛昭。2006。微波輔助萃取中藥有效成分的研究進展。廣東化工33(164):89-92。
- 31.黎海彬、王崑、白先放、郭?江、李琳。2006。微波輻射對羅漢果提取物中活性成分的影響。精細化工3(23):12-14。
- 32.謝明勇和陳奕。2006。微波輔助萃取技術研究進展。食品與生物技術學報25(1):105-114。
- 33.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。
- 34.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。
- 35.蘇小建、徐慶一、梁榮感、唐祖年、陳玉先。2005。羅漢果甜?的毒性作用研究。食品科學3(26):221-224。
- 36.Akhondzadeh S, Abbasi SH. 2006. Herbal medicine in the treatment of Alzheimer ' s disease. Am J Alzheimers Dis Other Demen 21:113 – 8.
37. Bernard F. Gibbs , Intezar Alli. 1998. Characterization of purified -amylase inhibitor from white kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). Food Research International. 3(31):217~225.
38. Chen, Y., Xie, M. Y. and Gong, X. F. 2007. Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum*. Journal of Food Engineering 81:162-170
39. Fishman, M. L., Chau, H. K., Hoagland, P. D. and Hotchkiss, A. T. 2006. Microwave-assisted extraction of lime pectin. Food Hydrocolloids 20:1170-1177.
40. Fulzele, D. P. and Satdive, R. K. 2005. Comparison of techniques for the extraction of the anti-cancer drug camptothecin from *Nothapodytes foetida*. Journal of Chromatography A 1063:9-13.
41. Ganzler, K., Salgo, A. and Valko, K. 1986. Microwave extraction: A novel sample preparation method for chromatography. Journal of Chromatography 371:299-306.
42. Ganzler, K., Salgo, A. and Valko, K. 1986. Microwave extraction: A novel sample preparation method for chromatography. Journal of Chromatography 371:299-306.
43. Guo, Z., Jin, Q., Fan, G., Duan, Y., Qin, C. and Wen, M. 2001. Microwave-assisted extraction of effective constituents from a Chinese herbal medicine *Radix puerariae*. Analytica Chimica Acta 436:41-47.
44. Guo, Z., Jin, Q., Fan, G., Duan, Y., Qin, C. and Wen, M. 2001. Microwave-assisted extraction of effective constituents from a Chinese herbal medicine *Radix puerariae*. Analytica Chimica Acta 436:41-47.
45. Hilaly El, J. and Lyoussi, B. 2002. Hypoglycaemic effect of the lyophilised aqueous extract of *Ajuga iva* in normal and streptozotocin diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology 80(2):109 – 113.
46. Jian Pan, Risheng Jin , Xueqiao Hu. 2006. A New Flavone Glycoside from *Huperzia serrata*. Journal of Chromatography B, 836 :108 – 110.
47. Jian Pan, Risheng Jin , Xueqiao Hu. 2006. Application of I-Amino acid in determination of *Huperzine A* by high performance liquid chromatography. Journal of Chromatography B, 836:108 – 110.
48. Junji Akaki, Yasunori Matsui, Hiroaki Kojima, Satomi Nakajima, Kaeko Kamei, Makoto Tamesada. 2009. Structural analysis of monocyte activation constituents in cultured mycelia of *Cordyceps sinensis*. Fitoterapia. 80:182~187.
49. Kariba , R. M . 2001. Antifungal activity of *Ajuga remota*. Fitoterapia 72:77-178.
50. Konoshima, T., Takasaki, M., Tokuda, H. and Nishino H. 2000. Cancer chemopreventive activity of an iridoid glycoside, 8-acetylharpagide, from *Ajuga decumbens*. Cancer Letters 157(1):87-92.
51. Labbozzetta, S., Valvo, L., Bertocchi, P. and Manna, L. 2005. Focused microwave-assisted extraction and LC determination of the active ingredient in naproxen-based suppositories. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 39:463-468.

52. LI Dian-peng, ZHANG Hou-rui. 2000. Studies and uses of Chinese medicine Luohanguo – a special local product of Guangxi. *Guihaia*. 20(3):270-276

53. Naczki, M. and Shahidi, F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food (Review). *Journal of Chromatography A* 1054:95-111

54. Naczki, M. and Shahidi, F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food (Review). *Journal of Chromatography A* 1054:95-111

55. Pan, X., Liu, H., Jia, G., and Shu, Y. Y., 2000. Microwave-assisted extraction of glycyrrhizic acid from licorice root. *Biochemical Engineering Journal* 5:173-177

56. Shu, Y. Y., Ko, Y. M. and Chang, Y. S. 2003. Microwave-assisted extraction of ginsenosides from ginseng root. *Microchemical Journal* 74:131-139

57. 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* 58:493-500

58. 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* 58:493-500

59. V. Rajendran, K. R. C. Prakash, Haresh S. Ved, Ashima Saxena, Bhupendra P. Doctor and Alan P. Kozikowskia. 2000. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 10:2467 ± 2469

60. V. Rajendran, K. R. C. Prakash, Haresh S. Ved, Ashima Saxena, Bhupendra P. Doctor and Alan P. Kozikowskia. 2000. Synthesis, Chiral Chromatographic Separation, and Biological Activities of the Enantiomers of 10,10-Dimethylhuperzine A. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 10 : 2467 ± 2469

61. Wang H.X., NG T.B., Liu W.K., OOI V.E.C., Chang S.T. 1996. Polysaccha-

62. Wang R, Tang XC. 2005. Neuroprotective effects of huperzine A. A natural cholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Neurosignals* 14:71 – 82

63. Wang Zhaojing, Luo Dianhui, Liang Zhongyan 2004. Structure of polysaccharides from the fruiting body of *Hericium erinaceus* Pers. *Carbohydrate Polymers* 57:241-247

64. Yang Q.Y., Yong S.C. and Yang X.T. 1987. The physico-chemical characteristics of the polysaccharide-peptide (PSP) of *Coriolus versicolor* (Yun-zhi). In Report on the Polysaccharide-Peptide (PSP) of *Coriolus versicolor*, pp, 1-6, Landford Press, China

65. Zhang HY, Tang XC. 2006. Neuroprotective effects of huperzine A: new therapeutic targets for neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol Sci* 27:619 – 25

66. Ziz-ur Rehman, A.M. salariya, S.I. Zafar. 2001. Effect of processing on available carbohydrate content and starch digestibility of kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*. 73:351~355.