

# 嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫名稱  
冬凌草之萃取研究

計畫類別：個別型計畫                      整合型計畫

計畫編號：CNPB-92-8

執行期間：92年1月1日至92年12月31日

計畫主持人：魏明治

共同主持人：韓建華

計畫參與人員：魏明治 韓建華

執行單位：嘉南藥理科技大學藥學系

中華民國 93 年 2 月 24 日

## 一、前言

由於環境的污染、農藥與藥物的濫用，以及化學物品的添加等等因素，已對於人類之肝臟造成極大的負擔。依據行政院衛生署的統計資料顯示[1]，歷年來(70-89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(80-89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。

在醫療體系中，目前是以西醫藥為主，中醫藥為輔。以癌症的治療而言，西醫常採用化學療法、放射線療法、外科手術或合併療法等。若採用前兩種方法，因會涉及腫瘤以外的部份，包括各種正常之組織與細胞，因此，如何於進行殺死腫瘤細胞的同時，而又要顧及其他正常之細胞不受傷害，或增加細胞對放射線或化學藥品的忍受性，是臨床上使用此兩種方法時首要考慮的因素之一。由張代釗等多位大陸學者[2-7]於中醫藥防治放射線與化學療法之毒副反應的研究，發現在中醫藥防治放化療毒副反應與增加療效方面已有較大的進展，已使21000例癌症患者順利地完成了放化療各個療程的治療，其中中西醫結合組較單純放化療組之完成率提高20%左右，而且副反應輕，一些常見腫瘤的生存率也明顯提高。這些實驗中證實有許多之生藥與中藥方劑，確實具有防治放化療毒副反應與增加療效的功能。例如用環磷胺進行腫瘤化學療法的同時，發現冬凌草能抑制DNA、RNA的合成，對腫瘤細胞有殺傷作用；而沙參、砂仁、豬苓、雞血藤、莢述對環磷胺引起的骨髓嗜多染紅細胞(PCE)微核率(MNR)的聚增及外周血白細胞值和血紅蛋白值的降低均有明顯的抑制或緩解功效。另外，於張代釗等多位學者[2-7]實驗中也証實，人參多糖、四君子湯、四生湯對放射小鼠有增強免疫功能和緩解毒副反應的作用；人參多糖、人參蜂王漿、當歸多糖、冬蟲夏草、紅花、丹參等能保護造血細胞；花粉、刺玫瑰、丹參、人參三醇有清除自由基和防止輻射損傷的作用。此外，於Hosokawa等多位學者[8-13]的研究中，可知小柴胡湯、人參、十全大補湯與補中益氣湯等，確實具有明顯的輻射保護功能。

冬凌草是盛產于河南淇縣和市郊區西部沿淇河兩岸的山區地帶，以及黃河流域以南地區，以冬季莖近地面處結冰而得名，又名冰凌草，別名叫破血草或六月令，為唇形科香茶菜屬植物碎米亞 *Rabdosia rubsecens* (Hemsl.) Hara 的全草。冬凌草具有清熱消腫、養陰、活血、祛瘀止痛之功效，民間長期應用于治療急慢性

咽炎、支氣管炎、扁桃腺炎等炎症與蛇虫咬傷、慢性肝炎、腫瘤等。此外，依據劉桂亭等學者[14-19]的臨床研究顯示，冬凌草的乙醇抽取劑與抗腫瘤藥物乙亞胺、丙亞胺合用，可加強乙亞胺與丙亞胺對小白鼠肉瘤 37 的抗腫瘤作用，而毒性未見增加；同時，發現冬凌草的乙醇抽取劑對於移植性動物腫瘤艾氏腹水癌、食道癌 109 株、乳腺癌與肉瘤 S108 均有明顯抗腫瘤作用，而對於小白鼠子宮頸癌 U14 與大白鼠癌肉瘤 Hele 細胞亦有一定作用。王瑞林等[20]於冬凌草與化療合用治療食管癌增效作用的探討中，發現有明顯增效作用。王瑞林[21, 22]也使用冬凌草的乙醇抽取製劑，進行治療原發性肝癌 31 例臨床觀察，有 80 % 病人的肝痛與食慾不振等症狀獲得明顯改善；又高欣等人[23]於冬凌草臨床抗癌療效進行觀察，在 12 肝腫瘤病人中，具有顯效與穩定者佔 5 例。另外，也有研究[16, 24]顯示，冬凌草的醇提取物對金黃色葡萄球菌、甲型溶血性鏈球菌有明顯的抗菌作用。又有研究者[25]用冬凌草的醇製劑治療食管癌、賁門癌之案例，其有效的治療率分別為 34.8 % 與 40 %。

此外，在單一成份藥理學之研究方面，據葛銘 [26, 27]之研究顯示，冬凌草中含有的 oridonin (rubescensin A)、ponicidin (rubescensin B)對人肝癌 BEL-7402 細胞株、長期培養的人食管癌 109 細胞與短期培養的離體食管癌細胞組織均有一定的殺傷作用；較高濃度之 oridonin、ponicidin 並且可阻止細胞進入 S 期或殺傷 S 期之細胞。又有研究[28, 29]顯示，oridonin 腹腔注射，對於艾氏腹水癌、肝癌與肉瘤 S108 腹水型均有顯著抗腫瘤作用，部分動物可長期存活。而在張覃沐等[30-32]之研究中，發現 ponicidin 腹腔注射，對艾氏腹水癌、肝癌與肉瘤 S108 與 L1 腹水型亦有顯著抗腫瘤作用。另外，在馮長偉與潘祥林[33]於冬凌草甲素對人白血病 HL-60 細胞抑制作用的研究中，顯示 oridonin 具有明顯顯著抑制 HL-60 細胞的生長的功能，可誘導細胞凋亡，為 oridonin 治療白血病提供了依據；同時，馮與潘亦發現 oridonin 對人紅白血病細胞 K562 細胞生長有抑制作用[34]。於張予與會徐霞[35]之研究中，證實 oridonin 亦具有抗氧化作用，可抑制脂質過氧化物引起的肝線粒體腫脹。又在林晨等人[36-38]之研究中得知，oridonin 與 ponicidin 均有防治放射性治療的副作用。此外，潘爐台等人[39-43]於貴州省施秉所產之冬凌草進行化學成分研究時，同時亦發現有抗癌成份—ursolic acid 的存在。Balanehru 與 Nagarajan 以 Ascorbic acid、四氯化碳與 ADP/Iron 誘發老鼠肝微粒中脂質過氧化，結果發現 ursolic acid 保護脂質過氧化物率為 60% [44]。在陳怡靜

等人[45, 46]之研究中得知，ursolic acid 對於人類肝癌細胞株 HepG2 與 HepG3 具有毒殺作用。

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，以及其他的加工步驟，以製得方便攜帶與服用之劑型。但據 1976 年，野口衛[47]於半夏厚卜湯抽取實驗顯示，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。

## 二、研究內容

本研究計畫以溶劑及超臨界二氧化碳流體，萃取中草藥冬凌草中之抗肝癌成分 oleanolic acid 與 ursolic acid。

溶劑萃取方面，以純水及不同重量百分比的乙醇水溶液作為萃取溶劑。於溶劑萃取程序中，以加熱回流方式，使冬凌草之成份更快速溶於溶劑中，以達到萃取之目的。實驗中並逐一探討不同的萃取條件，如樣品顆粒、溫度、與萃取時間等諸變因，對於冬凌草中之 oleanolic acid 及 ursolic acid 成份萃取量之影響。其中 oleanolic acid 及 ursolic acid 以高效液相層析儀(HPLC)分析其濃度。兩成份之結構式如圖一、二所示。

超臨界二氧化碳流體萃取部份，主要分成純二氧化碳萃取與共溶劑乙醇萃取兩部份。

二氧化碳之臨界溫度與臨界壓力分別為 $30.92^{\circ}\text{C}$ 與 $73.0\text{atm}$ 。二氧化碳的超臨界流體，具有相對較低之臨界溫度與中等的臨界壓力。亦因二氧化碳具有無毒性、無污染、安全，以及經濟等多項優點，常廣用於食品、天然物、藥物之萃取。因此本研究亦在二氧化碳超臨界狀態下，從事白花蛇舌草之萃取研究。超臨界二氧化碳萃取所採用實驗設備為半流動式相平衡測量裝置，如圖二所示。將欲萃取之樣品裝填於平衡室中，俟達到動態平衡後，即可進行萃取。本研究中曾逐一探討各種萃取條件，如溫度、壓力及共溶劑乙醇的添加量等變因，對於成份萃取量之影響。

## 三、結果與討論

溶劑萃取方面；於探討不同重量百分比乙醇水溶液對成份萃取量的影響（圖三與圖四），發現純水及 30% 以下乙醇水溶液對於 oleanolic acid 及 ursolic acid 兩

成份均無萃取效果；而 60%、90% 及 99.5% 乙醇水溶液均有顯著的萃取效果。對於 ursolic acid 而言，乙醇濃度愈高，其萃取效果較佳。這表示乙醇是一極佳之溶劑，亦顯示 ursolic acid 與乙醇有較佳之親和力。此外，就 oleanolic acid 而論，以 60% 乙醇水溶液為萃取溶劑時，其萃取效果較佳。同時於圖中亦可明顯看出，oleanolic acid 的萃取量遠低於 ursolic acid 之萃取量；這可能是冬凌草中原本含量之故。

超臨界二氧化碳流體萃取部份；當以純二氧化碳流體為萃取溶劑時，在 40 °C 下，壓力分別為 1500、2000 及 2500psig 萃取 3 小時，於萃取槽出口處均收集不到任何物質。由此可知冬凌草之 oleanolic acid 及 ursolic acid 成份無法溶於非極性的 CO<sub>2</sub> 溶劑中。

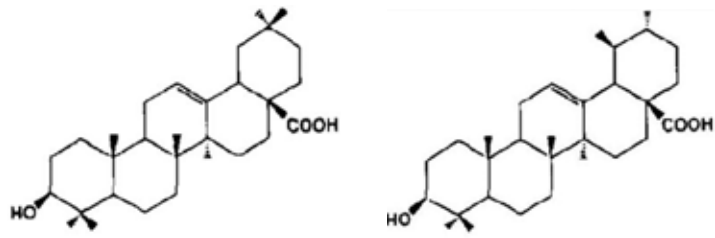
當實驗中加入共溶劑乙醇時，顯示當乙醇濃度高於 5 % 以上，開始有一較明顯之 oleanolic acid 及 ursolic acid 的萃取量（圖五與六）。實驗結果亦明顯顯示 ursolic acid 的萃取量遠大於 oleanolic acid，此一趨勢與溶劑萃取完全吻合。這意謂 ursolic acid 於冬凌草中之量遠高於 oleanolic acid，亦可能是因為乙醇對於 ursolic acid 之親和力較優於 oleanolic acid 所致。再者，於實驗中（圖五與六）亦顯示，oleanolic acid 與 ursolic acid 的萃取量均隨萃取溫度與壓力的增加而增加。

本研究以溶劑萃取與超臨界流體萃取法，分別探討冬凌草中 oleanolic acid 與 ursolic acid 之萃取。在溶劑萃取方面，各種萃取條件，如冬凌草粒徑、萃取溫度、萃取時間及乙醇濃度等，對於 oleanolic acid 與 ursolic acid 萃取量之影響亦曾加以探討。另外，超臨界二氧化碳流體萃取方面，發現冬凌草之成份無法溶於非極性的純 CO<sub>2</sub> 溶劑中；當有共溶劑乙醇存在時，顯示在本實驗之操作壓力與溫度範圍內，oleanolic acid 與 ursolic acid 的萃取量均隨溫度與壓力的提升而增加。

#### 四、結論

以上是本研究計畫於冬凌草之萃取研究中，有關萃取條件對於成份萃取量影響的初步結果。本研究成果不僅於抗肝癌藥物之研發上極具參考價值，除了可提供後續之抗肝癌藥理學研究外，同時對於科學中藥製程中萃取技術的改進與提昇亦將有所貢獻。

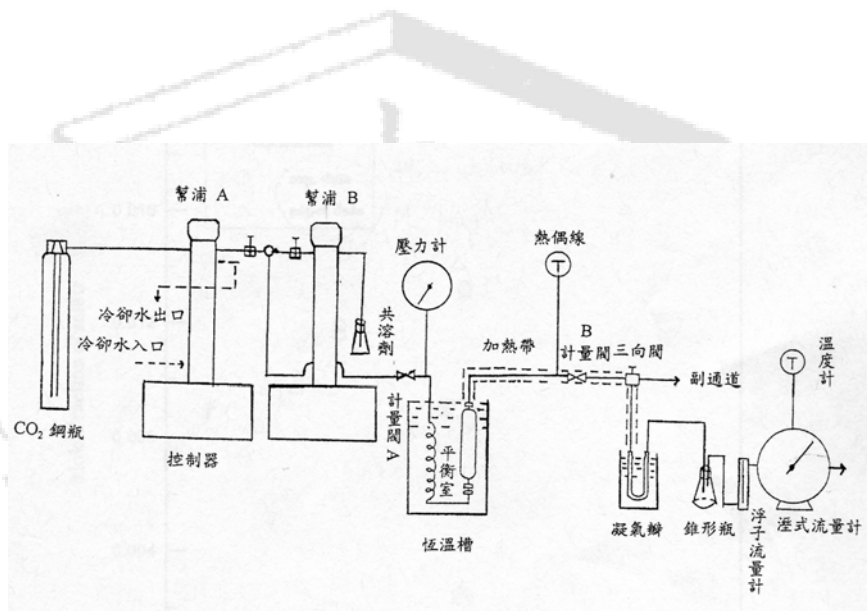
五、圖表



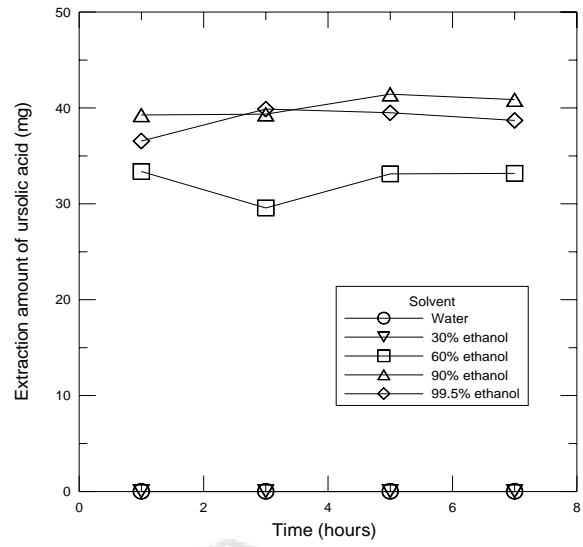
Oleanolic acid

Ursolic acid

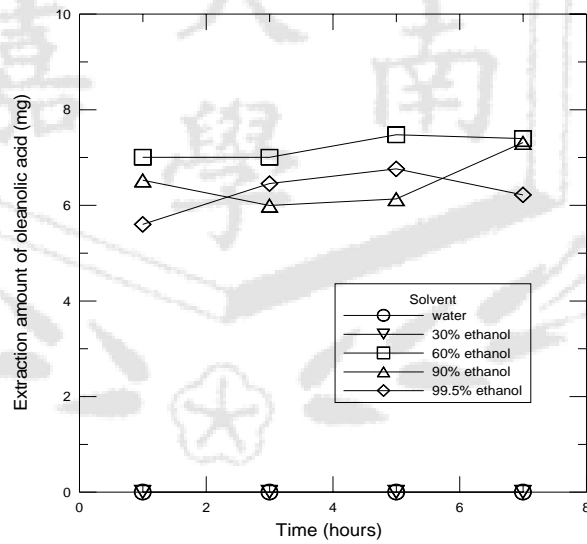
圖一 oleanolic acid 與 ursolic acid 之結構圖



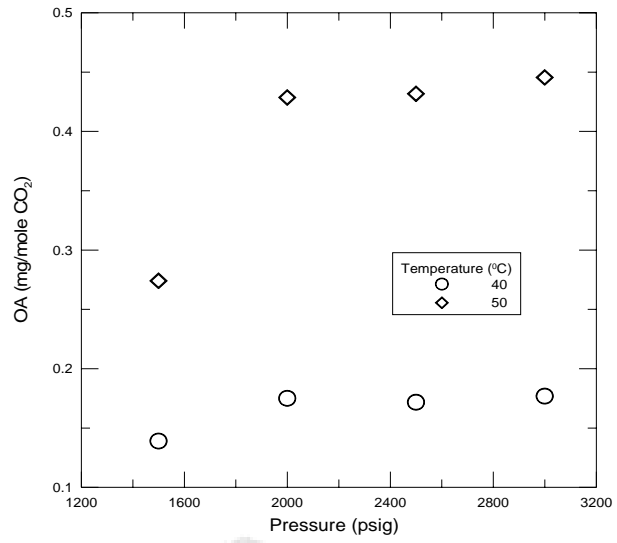
圖二 超臨界二氧化碳萃取裝置圖



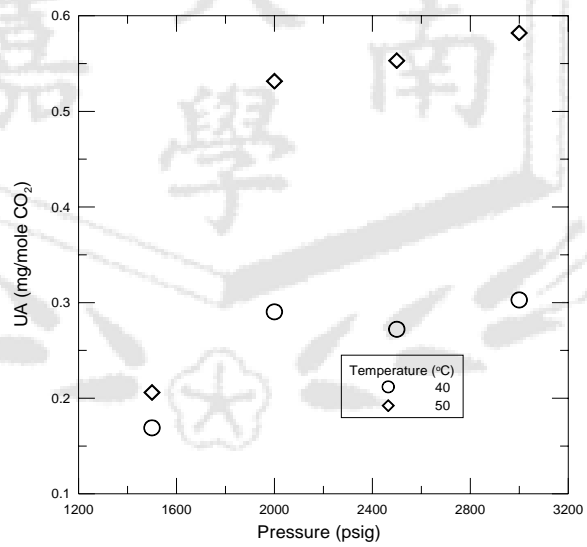
圖三 不同重量百分比乙醇水溶液對 ursolic acid 萃取量的影響(40°C)



圖四 不同重量百分比乙醇水溶液對 oleanolic acid 萃取量的影響(40°C)



圖五 溫度及壓力對 oleanolic acid 萃取量的影響(5 % 乙醇)



圖六 溫度及壓力對 ursolic acid 萃取量的影響(5 % 乙醇)



## 參考文獻

1. 衛生署(<http://www.doh.gov.tw/>) 衛生資料統計。
2. 張代釗、余桂清、段鳳舞.中西醫結合治療癌症有效病例選，北京醫科大學中國協和醫科大學聯合出版社，1994.9。
3. 郁仁存.腫瘤研究，上海科學技術出版社，1991.12。
4. 張宗岐.臨床腫瘤綜合治療大全，奧林匹克出版社，1995.3。
5. 孫燕、余桂清.中西醫結合防治腫瘤，北京醫科大學中國協和醫科大學聯合出版社，1995.10。
6. 李佩文.老年惡性腫瘤防治對策.華齡出版社，1997.6。
7. 潘敏求.中華腫瘤治療大成.石家莊，河北科學技術出版社，1996.1。
8. Tzeng B. k., Chinese medicine in the United States and it perspective, *Bioindustry*, 7(1), 1-5 (1996).
9. Hosokawa, Y., Radioprotective effects of Chinese medicinal prescriptions in mice, *J. Med. Pharma. Soci.*, WAKAN-YAKU,3 164-169 (1086).
10. Takeda, A., Yonezawa, M. and Katoh, N., Restoration of radiation injury by ginseng, I. Responses of x-irradiated mice to ginseng extract, *J. Radiat. Res.*, 22, 323-333 (1981).
11. Yonezawa, A., Katoh, N. and Takeda, A., Restoration of radiation injury by ginseng, II. Some properties of the radioprotective substances, *J. Radiat. Res.*, 22, 336-343 (1981).
12. Takeda, A , Katoh, N. and Yonezawa, A., Restoration of radiation injury by ginseng, III. Radioprotective effects of the thermostable fraction of ginseng extract on mice, rats and guinea pigs, *J. Radiat. Res.*, 23, 150-167 (1982).
13. Yonezawa, A., Katoh, N. and Takeda, A., Restoration of radiation injury by ginseng, IV. Stimulation of recoveries in CFUs and megakaryocyte count related to the prevention of occult blood appearance in x-irradiated mice, *J. Radiat. Res.*, 26, 436-442 (1985).
14. 劉桂亭，河南醫學院學報，5，18 (1976)。
15. 張覃沐，河南醫學院學報，5，13 (1976)。
16. 河南省醫學科學研究所藥理藥化組，河南醫學院學報，2，9 (1975)。
17. 河南醫科學所，腫瘤防治研究所，2，82 (1974)。
18. 呂祥勳，中藥藥理，咸陽，陝西中醫學院，302 (1987)。
19. 武漢醫學院病理教研所，武漢醫學學報，2，116 (1978)。
20. 王瑞林，張覃沐與陳紹堂，中華腫瘤雜誌，8 (4)，(1986)。
21. 河南醫學院第一腫瘤科，河南醫學院學報，5，22 (1976)。
22. 王瑞林，癌症，3 (1)，50 (1984)。
23. 高欣，中華腫瘤雜誌，(2)，97 (1983)。
24. 范振廷，河南醫學情報，(6)，4 (1994)。
25. 河南省冬凌草研究協作組，河南醫學院學報，(5)，21 (1976)。
26. 葛銘，藥學通報，16(5)，262 (1981)。
27. 葛銘，河南醫學情報，(1)，3 (1984)。
28. 河南省醫學科學研究所藥理藥化組，中草藥通訊，(11)，30 (1977)。
29. 河南省醫學科學研究所藥理藥化組，科學通報，23(1)，53 (1978)。
30. 張覃沐，河南醫學院學報，(1)，10 (1979)。
31. 張覃沐，科學通報，25(22)，1051 (1980)。
32. 李敏民，中醫藥學研究參考資料，(1)，10 (1988)。
33. 馮長偉與潘祥林，浙江中醫學院學報，24(3)，47 (2000)。
34. 馮長偉與潘祥林，山東中醫藥大學學報，24(3)，225 (2000)。

35. 張予與徐霞，中國藥理學通報, 15(1), 46 (1999)。
36. 林晨，河南醫學院學報, 16(4), 75 (1981)。
37. 韓正濤，腫瘤研究, (2), 4 (1983)。
38. 張覃沐，河南醫科大學學院學報, 25(1), 13 (1990)。
39. 袁珂與董留民，中藥材, 21(10), 519 (1998)。
40. 冀春茹與袁珂，中醫藥學報, 25(6), 43 (1997)。
41. 袁珂與董留民，中國實驗方劑學雜誌, 4(6), 1 (1998)。
42. 潘爐台、姚娉與陳德媛，中國中藥雜誌, 19(2), 102 (1994)。
43. 趙清活與孫漢董，中草藥, 15(2), 1 (1984)。
44. Balanehru S.; Nagarajan B., Protective effect of oleanolic acid and ursolic acid against lipid peroxidation, Biochem Int (AUSTRALIA), 1991 Jul., 24(5), 981.
45. 陳怡靜，指導教授徐雪瑩，oleanolic acid 與 ursolic acid 誘發肝癌細胞使死亡的研究，慈濟醫學院，醫學研究所碩士論文，88 學年度。
46. 曾淑芬，指導教授林俊清，百花蛇舌草抗腫瘤活性成分之評估，高雄醫學院，天然藥物研究所碩士論文，88 學年度。
47. 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)。

