

行政院農業委員會林務局委託研究計畫系列 96-06-5-01

台灣產筋骨草活性成分之分析比較

Comparison of techniques for the extraction of active  
components from *Ajuga taiwainensis*.



委託機關：行政院農業委員會林務局屏東林區管理處

執行機關：大葉大學

計畫主持人：楊博文

協同計畫主持人：何偉真

中華民國 96 年 12 月 14 日

# 目 錄

	頁次
壹、摘要.....	1
中文摘要.....	1
英文摘(Abstract).....	3
貳、計畫緣起及目標.....	6
一、計畫緣起.....	6
二、計畫目標.....	6
(一)不同萃取方法對四種台灣產筋骨草相關活性成分之分析比較.....	6
(二)建立筋骨草屬植物所含蛻皮甾酮及總黃酮之分析方法，並探討台灣筋骨草及日本筋骨草其萃取蛻皮甾酮及總黃酮的最佳方法。進一步分析比較四種不同台灣產筋骨草，矮筋骨草，日本筋骨草，台灣筋骨草及匍匐筋骨草之抗氧化能力，蛻皮甾酮和總黃酮含量.....	7
(三)最後建立四種筋骨草之 FTIR 指紋圖譜以及 HPLC-UV 指紋圖譜.....	7
參、材料與試驗方法.....	7
一、材料-台灣產筋骨草屬植物型態及分佈簡介.....	7

(一)矮筋骨草.....	7
(二)日本筋骨草.....	10
(三)台灣筋骨草.....	12
(四)匍匐筋骨草.....	14
二、樣品前處理.....	17
三、蛻皮甾酮分析方法.....	17
(一)高效液相層析法指紋圖譜(HPLC)分析條件....	17
(二)蛻皮甾酮標準曲線建立.....	18
四、總黃酮分析步驟.....	19
(一)、分光比色分析方法.....	19
(二)、總黃酮標準曲線建立.....	20
五、標準萃取分析方法.....	21
六、超音波萃取方式最適條件探討.....	21
七、超音波輔助萃取之水及不同乙醇濃度探討.....	22
八、比較 4 種台灣產筋骨草超音波輔助萃取和微波輔 助萃取-甲醇及 95%乙醇之蛻皮甾酮產量.....	22
九、清除 DPPH 自由基能力測定分析.....	23
十、FTIR 傅利葉轉換紅外線光譜儀以及 HPLC-UV 指紋 圖譜建立.....	24
肆、結果與討論.....	26
一、標準萃取分析方法及總黃酮含量析.....	26
二、超音波萃取方式最適條件探討.....	27
三、超音波輔助萃取之水及不同乙醇濃度探討.....	31

四、比較 4 種台灣產筋骨草超音波輔助萃取和微波	
輔助萃取-甲醇及 95%乙醇之蛻皮甾酮產量.....	34
(一)、超音波輔助萃取分析步驟 .....	34
(二)、超音波輔助萃取總黃酮之產量 .....	35
(三)、微波輔助萃取分析步驟.....	37
五、清除 DPPH 自由基能力測定分析.....	40
六、FTIR 傅利葉轉換紅外線光譜儀以及 HPLC-UV	
指紋圖譜建立.....	44
(一)、分析方法.....	44
(二)、FTIR 指紋圖譜建立.....	44
(三)、以 KBr 方式進行樣品分析.....	44
(四)、HPLC-UV 指紋圖譜建立.....	46
伍、結論與建議.....	50
陸、參考文獻.....	51

## 壹摘要

### 中文摘要

在本研究中，分析四種台灣產匍匐筋骨草 (*Ajuga decumbens* Thunb. ex Murray)，台灣筋骨草 (*Ajuga taiwanensis* Nakai ex Murata)，矮筋骨草 (*Ajuga pygmaea* A. Gray) 及日本筋骨草 (*Ajuga nipponensis* Makino) 葉中蛻皮甾酮 (ecdysterone)

與總黃酮(total flavonoids)的含量多寡，結果顯示四種台灣產筋骨草的蛇皮甾酮，含量在 0.4~79.8 mg/100 g 之間，差異相當大。日本筋骨草  $79.8 \pm 0.02$  mg/100 g 含量最高，其他依次為匍匐筋骨草  $68.4 \pm 0.02$  mg/100 g，台灣筋骨草  $56.20 \pm 0.04$  mg/100 g 及矮筋骨草  $0.40 \pm 0$  mg/100 g。

四種台灣產筋骨草以甲醇為溶劑，功率 600 W 超音波輔助萃取總黃酮 50 分鐘，匍匐筋骨草總黃酮含量最高  $26.46 \pm 0.02$  mg/g 其他依次為台灣筋骨草  $22.85 \pm 0$  mg/g，矮筋骨草  $17.25 \pm 0$  mg/g 及日本筋骨草  $15.21 \pm 0.05$  mg/g。

在探討萃取筋骨草葉中的蛇皮甾酮及總黃酮技術上，以不同溶劑比較超音波輔助萃取及微波輔助萃取的萃取效率，結果以甲醇為溶劑，功率 600 W，超音波輔助萃取 50 分鐘效率最佳。

比較四種台灣產筋骨草的抗氧化能力，方法是以比較清除 DPPH 自由基的能力來測試。結果顯示以日本筋骨草的抗氧化能力效果最佳，抗氧化自由基清除率達 94.2%，其他依次為台灣筋骨草 93.7%，匍匐筋骨草 26.9%，和矮筋骨草 33.4%。

本研究亦成功的建立 FTIR 及 HPLC-UV 指紋圖譜，可

供日後分辨四種不同臺灣產筋骨草之用。

關鍵字：匍匐筋骨草，台灣筋骨草，矮筋骨草，日本筋骨草  
唇型花科，蛻皮甾酮，總黃酮，超音波輔助萃取，超音波輔助萃取，FTIR 指紋圖譜，HPLC-UV 指紋圖譜。

## 英文摘要(Abstract)

*Ajuga decumbens* Thunb. ex Murray , *Ajuga pygmaea* A. Gray , *Ajuga taiwanensis* Nakai ex Murata and *Ajuga nipponensis* Makino belong to genus *Ajuga*(Labiatae). These species of *Ajuga* have been used for the treatment of wounds, abdominal pain, fever, sore throat, lung disease and hepatitis in Taiwanese folk medicines.

In this study, the contents of ecdysterone and total flavonoids of leaves from *A. decumbens* Thunb. ex Murray , *A. pygmaea* A. Gray , *A. taiwanensis* Nakai ex Murata and *A. nipponensis* Makino were analyzed. The results indicated that the leaves from *A. nipponensis* contained the largest amount of ecdysterone  $79.8 \pm 0.02$  mg/100g and the leaves from *A. decumbens* contained the largest amount of total flavonoids  $26.5 \pm 0.23$  QE-mg/g. The best extraction conditions were using methanol as solvent in ultrasonic-assisted extraction for 50 min with a power of 600 W.

The antioxidant activities (scavenging effect on 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical ) and total flavonoids

contents of four kinds of Taiwan *Ajuga* extracts were evaluated in this study. The antioxidant activities were *A. nipponensis* 94.2% (the highest value), *A. taiwanensis* 93.7%, *A. decumbens* 26.9% and *A. pygmaea* 33.4%.

The contents of ecdysterone from *A. taiwanensis*, *A. decumbens*, *A. pygmaea* and *A. nipponensis* were analyzed by using high performance liquid chromatography. The contents of ecdysterone were between 0.4~79.8 mg/100g in *Ajuga*s. The ecdysterone of the *A. nipponensis* had the highest content of  $79.8 \pm 0.02$  mg/100g.

The total flavonoids contain of *A. nipponensis* , *A. decumbens*, *A. taiwanensis* and *A. pygmaea* were  $15.2 \pm 0.05$ ,  $26.5 \pm 0.02$ ,  $22.9 \pm 0$  and  $17.1 \pm 0$  QE-mg/g, respectively. The *A. decumbens* had the highest total flavonoids content of  $26.5 \pm 0.02$  QE-mg/g.

Keywords :

*Ajuga decumbens* , *A. pygmaea* , *A. taiwanensis* , *A. nipponensis*

Labiatae, ecdysterone, total flavonoids,

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl ( DPPH ) ,

butylated hydroxyanisole (BHA),

ultrasonic-assisted extraction(UAE),

microwave-assisted extraction(MAE),

FTIR finger print chromatogram,

HPLC-UV finger print chromatogram.

## 貳、計畫緣起及目標

### 一、計畫緣起

筋骨草屬植物，自八十年代以來，因其抗腫瘤、減少心血管  
疾病(Chenni,et al.,2007)與降血糖(Hilaly, et al.,2000)

的一定療效而被重視。(王初等，2003)

中國大陸在筋骨草保肝功效的初步實驗中，發現筋骨草  
中的粗黃酮萃取出，可治療 CCl<sub>4</sub> 誘導之大白鼠肝損。(Chen,et  
al.,2006)亦可應用於治療高血壓、降血脂(Hilaly, et al.,2004)、  
減緩氣喘症狀及抗痢疾等。(吳德峰，1997; 劉斌等，2001)

現今台灣產筋骨草於民間有零星栽培，在南投曾有以筋  
骨草作為原料之化妝保養品，在治療糖尿病及肝病(馬志平  
等，2002)方面亦有應用。

### 二、計畫目標

(一)不同萃取方法對四種台灣產筋骨草相關活性成分之  
分析比較。

(二)建立筋骨草屬植物所含蛻皮甾酮及總黃酮之分析方法，並探討台灣筋骨草及日本筋骨草其萃取蛻皮甾酮及總黃酮的最佳方法。進一步分析比較四種不同台灣產筋骨草，矮筋骨草，日本筋骨草，台灣筋骨草及匍匐筋骨草之抗氧化能力，蛻皮甾酮和總黃酮含量。

(三)最後建立四種筋骨草之 FTIR 指紋圖譜以及 HPLC-UV 指紋圖譜。

### 參、材料與試驗方法：

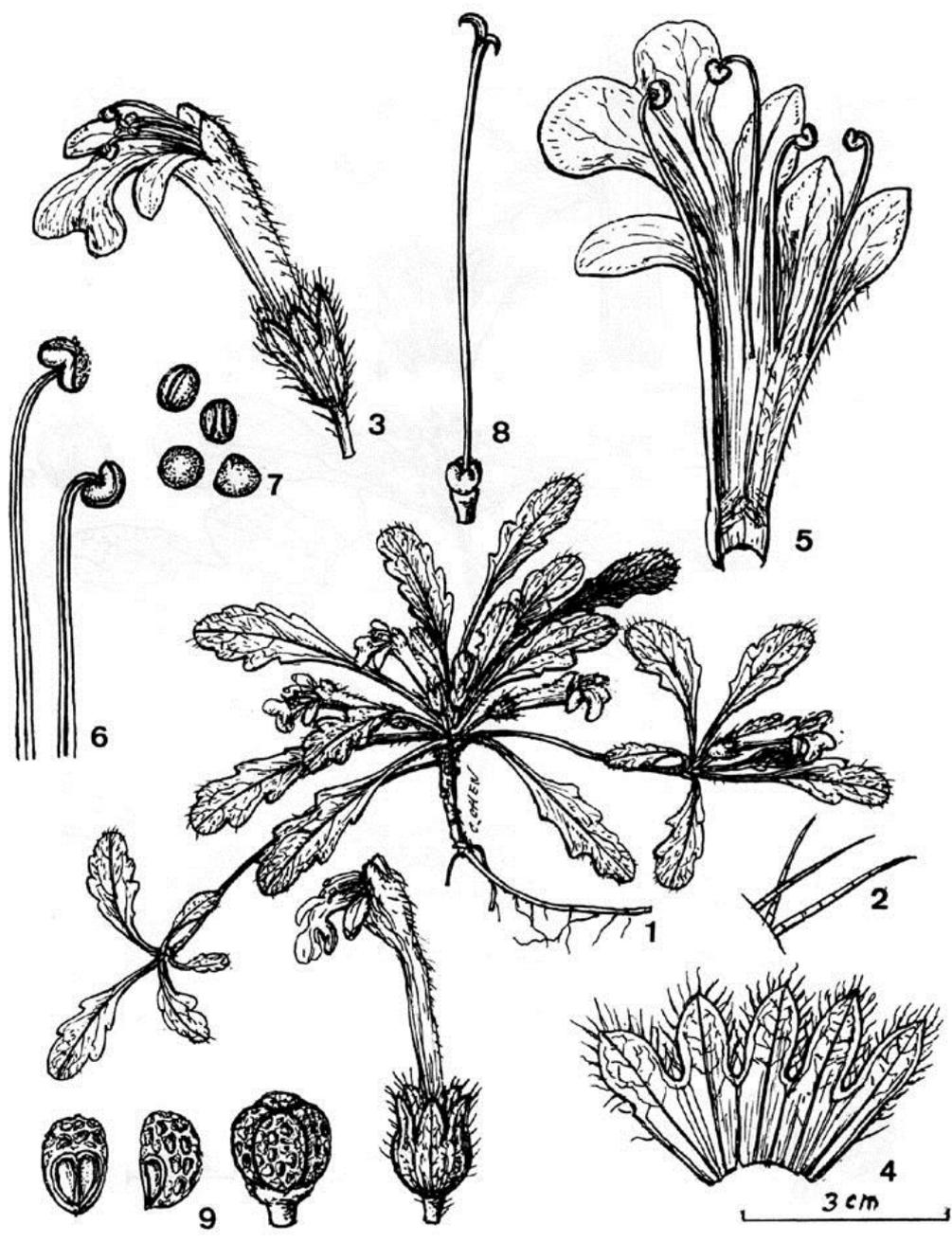
#### 一、材料

台灣產筋骨草屬植物型態及分佈簡介(謝，1990；楊等，1999)

#### (一)、矮筋骨草 *Ajuga pygmaea* A. Gray

植株具走莖，僅具基生葉；葉倒披針型至長橢圓狀倒披針型，長 2-4 公分，寬 0.5-1 公分，疏被長柔毛，波狀鋸齒緣；葉柄 1.5-3 公分。花冠藍紫色，內面近基

部具毛環。分布於台灣北部沿海地區，尚分布於日本、琉球。(謝，1998；楊等，1999)



1. habit; 2. multicellular hairs; 3. flower; 4. calyx; 5. open flower; 6. stamens; 7. pollen grains; 8. pistil; 9. nutlets.

圖一、矮筋骨草 *Ajuga pygmaea* A. Gray

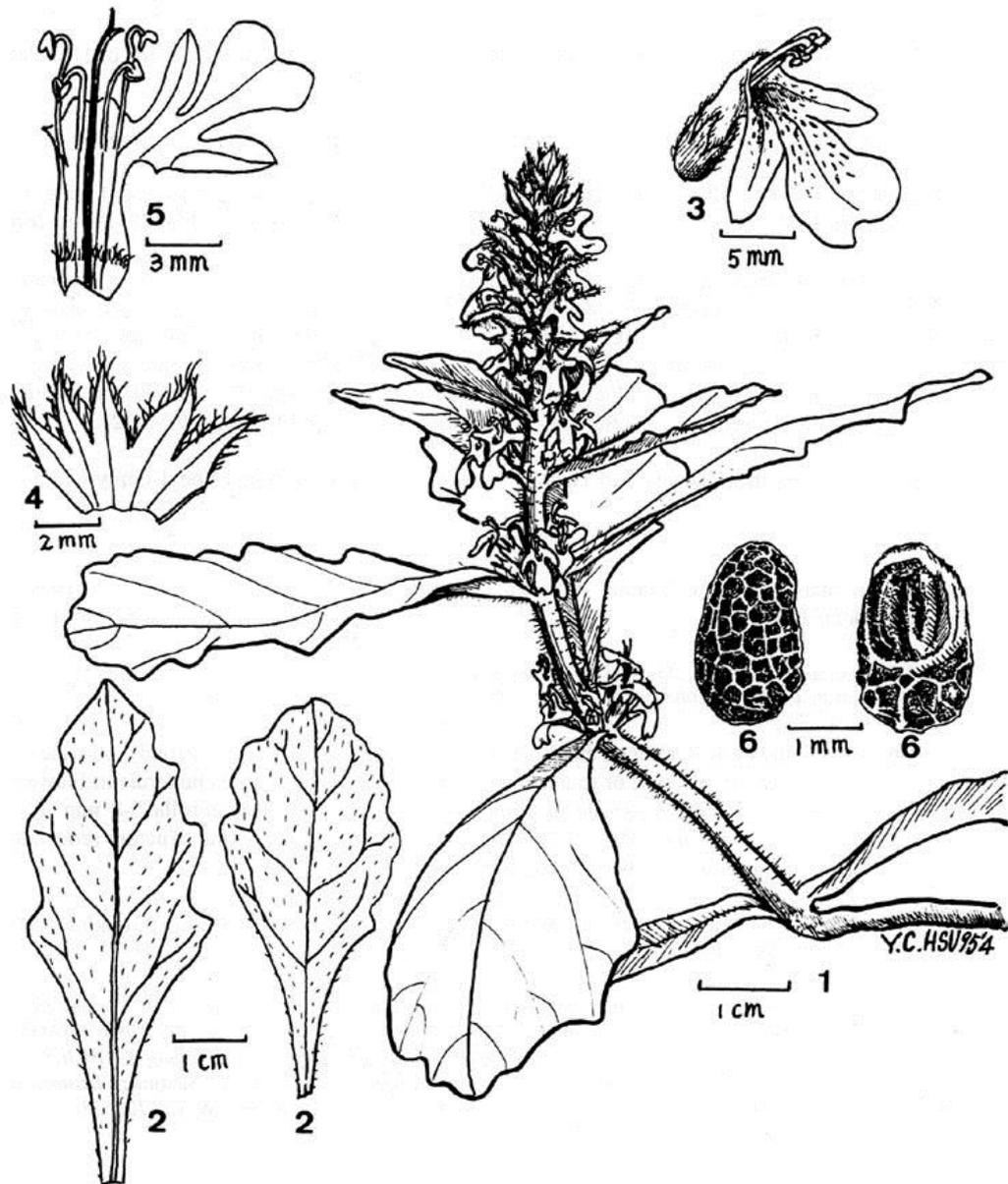
(楊等, 1999)



圖二.矮筋骨草 *Ajuga pygmaea* A. Gray

(二)、日本筋骨草 *Ajuga nipponensis* Makino

莖直立或斜上，無基生葉；葉橢圓形至橢圓狀狹卵型，長3-7公分，寬1-2.5公分，粗鋸齒狀牙齒緣，被長柔毛。花冠白色，內面近基部具毛環。在台灣分布於苗栗、新竹等北部西岸沿海沙地，尚分布於日本、韓國、中國大陸中部。(謝，1998；楊等，1999)



1. habit; 2. leaf; 3. flower; 4. calyx; 5. open flower; 6. nutlets.

圖三、日本筋骨草 *Ajuga nipponensis* Makino

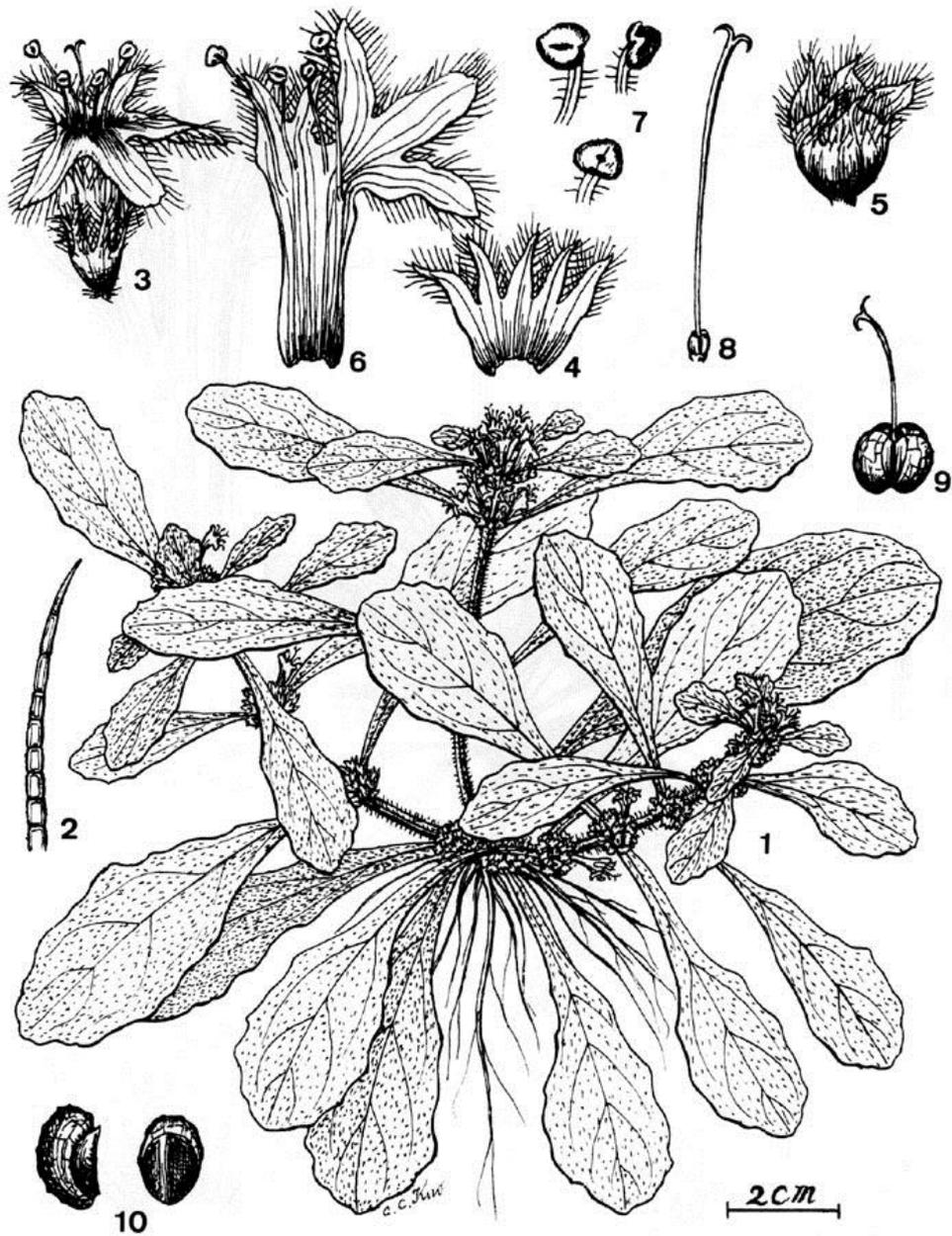
(楊等，1999)



圖四.日本筋骨草 *Ajuga nipponensis* Makino

(三)、台灣筋骨草 *Ajuga taiwanensis* Nakai ex Murata

莖直立或斜上，具基生葉及莖生葉；葉倒卵型至倒披針型，長 6-15 公分，寬 1-4 公分，波狀緣，被短毛；葉柄長 1-4 公分。花冠淡藍紫色至淡紅紫色。本種在台灣分布於全省中低海拔，尚分布於琉球、菲律賓賓及廣東。(謝，1998；楊等，1999)



1. habit; 2. multicellular hair; 3. flower; 4, 5. calyx; 6. open flower corolla; 7. stamens; 8. pistil; 9. fruit with persistent style; 10. nutlets.

圖五、台灣筋骨草 *Ajuga taiwanensis* Nakai ex Murata

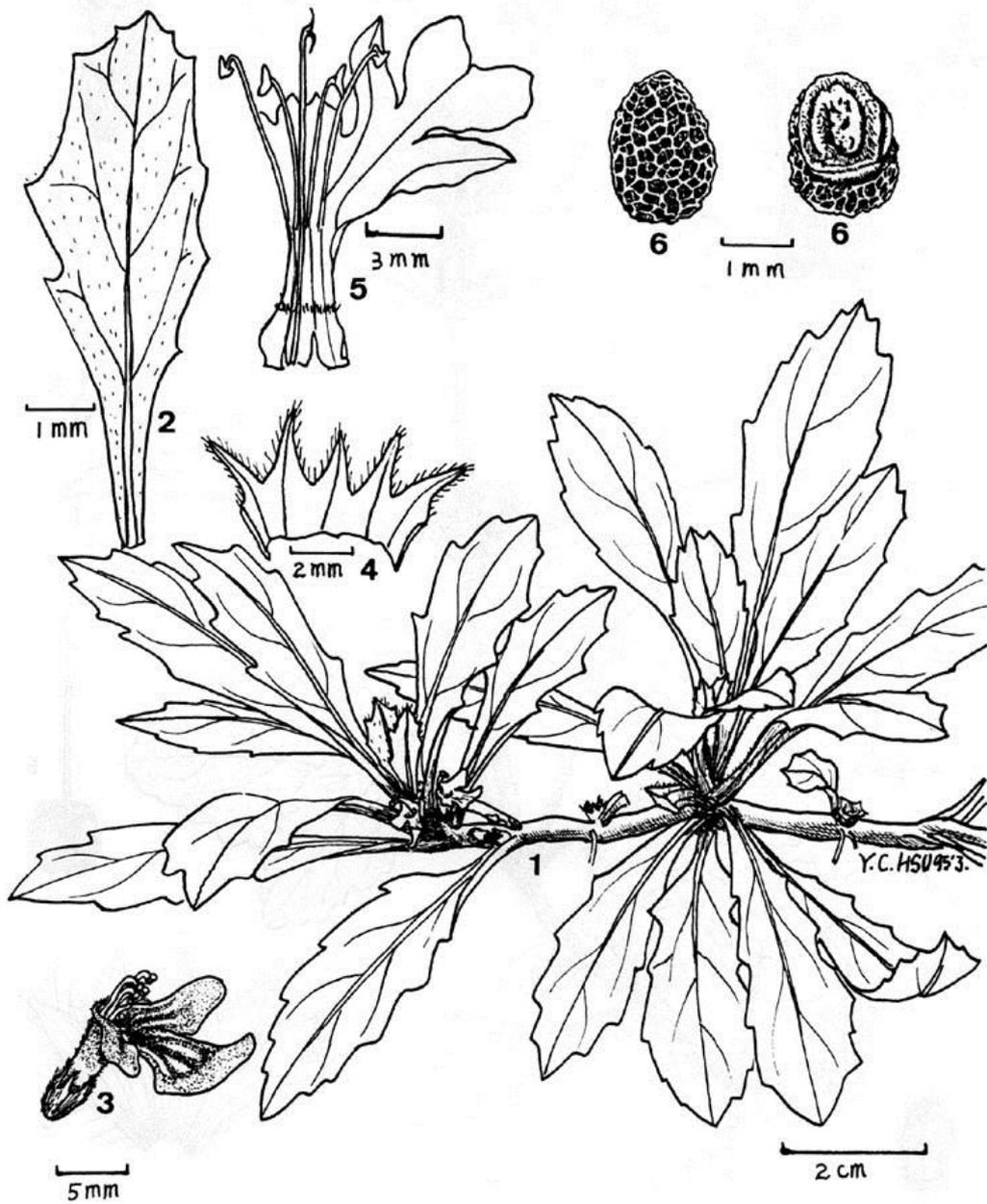
(楊等，1999)



圖六.台灣筋骨草 *Ajuga taiwanensis* Nakai ex Murata

(四)、匍匐筋骨草 *Ajuga decumbens* Thunb. ex Murray

莖匍匐，基生葉較莖生葉大，倒披針型至匙型，長 3-9 公分，寬 1-2.5 公分，粗鋸齒緣至波狀緣兩面疏被毛。花冠淡藍色至淡紅紫色，內面近基部具毛環。此種在台灣為一歸化種，僅分布於奮起湖鐵道附近，可能與山葵一起引進至台灣本省，由於氣候適合而歸化於此。本種尚分布於日本、韓國、中國中部。  
(謝，1998；楊等，1999)



1. habit; 2. leaf; 3. flower; 4. calyx; 5. open flower; 6. nutlets.

圖七、匍匐筋骨草 *Ajuga decumbens* Thunb. ex Murray

(楊等, 1999)



圖八.匍匐筋骨草 *Ajuga decumbens* Thunb. ex Murray

## 二、樣品前處理

將新鮮之四種筋骨草分別以去離子水反覆洗淨後，以自然乾燥方式陰乾約 5~ 7 天，分別以不透氣塑膠袋封閉保存，此為未經粉碎之母樣品，備用。自母樣品中取適量乾燥筋骨草，以均質機粉碎後，過篩(60 mesh)保存於密閉容器並置於乾燥器中。

## 三、蛻皮甾酮( Ecdysterone ; 20-Hydroxyecdysone ;

$\beta$ -ecdysone) 分析方法

### (一)、高效液相層析儀(HPLC)分析條件:

Autosampler L-7200 , HITACHI 。

UV Detector L-7400 , HITACHI 。

PUMP L-7100 , HITACHI 。

Column : RP-18 column ( 250 mm  $\times$  4.6 mm , 5  $\mu$  m )

Mobile phase : methanol/water = 40 : 60 (v/v)

Detector : UV 248 nm

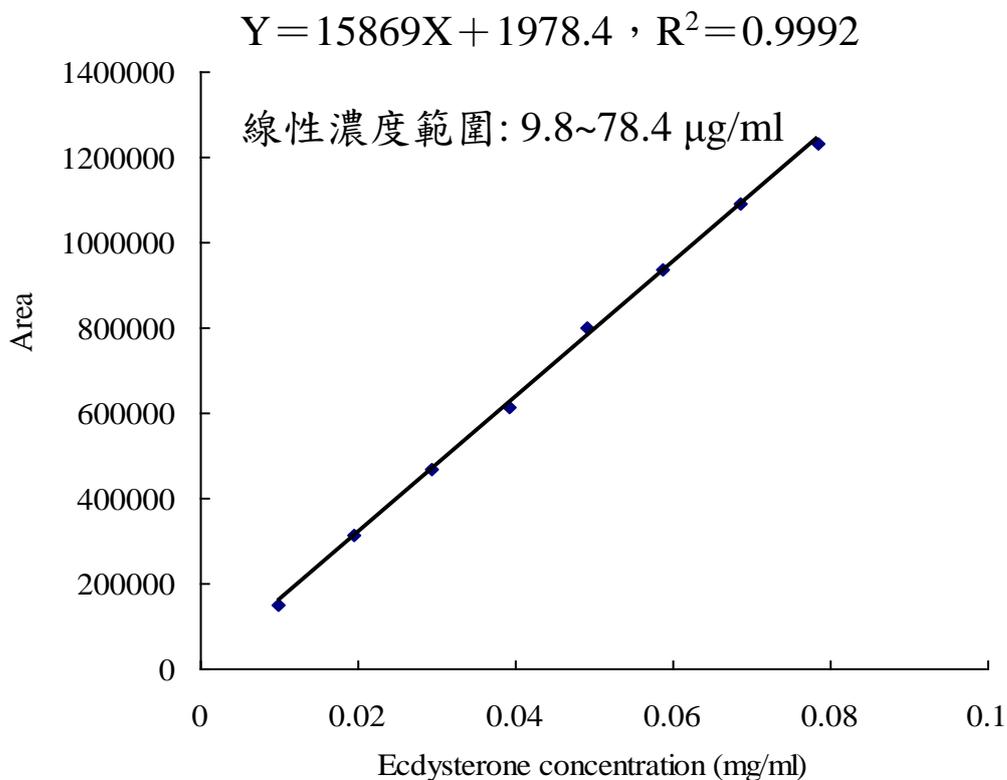
Flow rate : 1.0 ml/min

Injection volume : 20  $\mu$  l

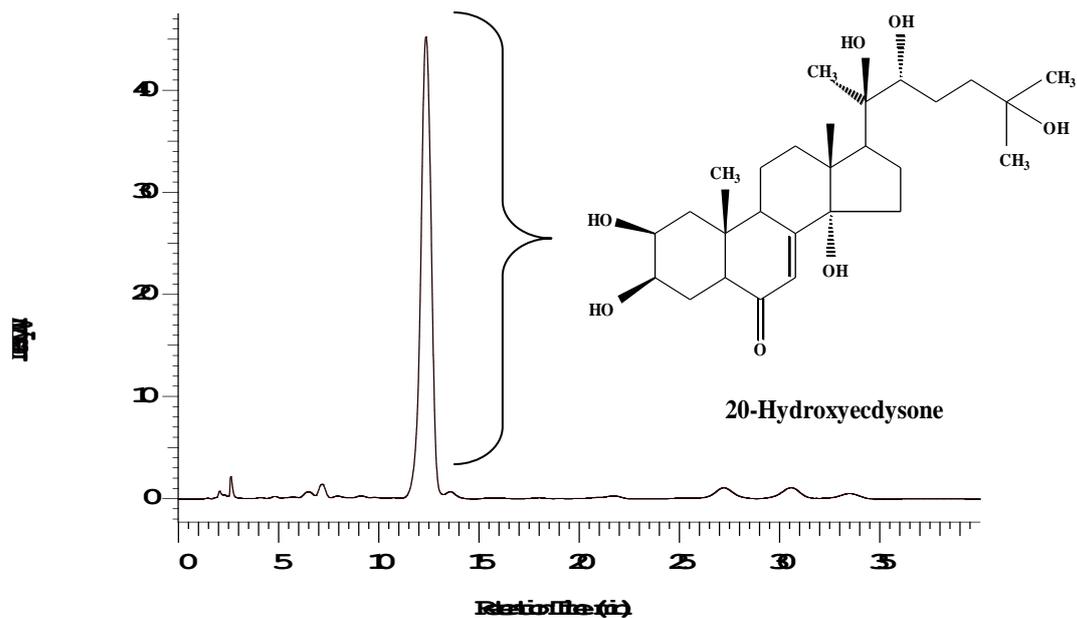
Column temperature : 40°C

(二)、蛻皮甾酮標準曲線建立：

精秤 9.8 mg 蛻皮甾酮(ecdysterone)標準品，以分析級甲醇定容至 100 ml，此為濃度 0.098 mg/ml 蛻皮甾酮標準品母液。自母液中分別精密吸取 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 至 10 ml 定量瓶中，加分析級甲醇稀釋至刻度，即可得到不同濃度的蛻皮甾酮標準品(0.0098~0.098 mg/ml)。以前述 HPLC 分析條件進行分析，以面積 (Y) 對相應濃度 (X) 做標準曲線。(蕭久富，2007)



圖九.蛻皮甾酮標準曲線



**Retention Time = 12.35 min**

圖十.蛻皮甾酮標準曲線及 HPLC 層析圖

The standard curve and HPLC chromatogram of ecdysterone

#### 四、總黃酮 (total flavonoids) 分析步驟

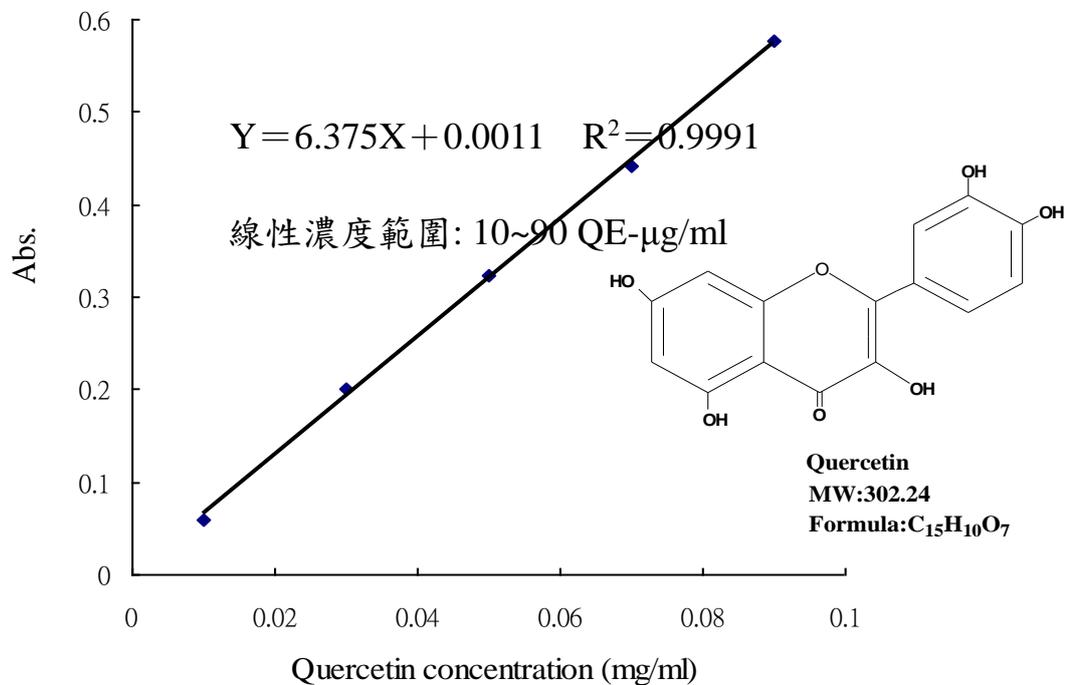
##### (一)、分光比色分析方法：

採  $\text{AlCl}_3$  呈色法原理，分析流程則參考 (Dewanto, et al., 2002) 之總黃酮分析步驟：取稀釋 10 倍後之萃取樣品 0.5 ml 加入 1.5 ml 95% 乙醇，再加入 0.1 ml (10%)  $\text{AlCl}_3$ 、0.1 ml (1M)  $\text{CH}_3\text{COOK}$  與 2.8 ml 去離子水，室溫下靜置 40 分鐘，測其 415 nm 吸光值。利用槲皮素(querctin)製作之標準曲線計算樣品中之

總黃酮含量，並以槲皮素當量(querctetin equivalents, QE)表示樣品之總黃酮含量。

(二)、總黃酮標準曲線建立：

不同濃度之槲皮素代替樣品以上述方式作標準曲線。不同濃度槲皮素標準品配置方式如下：精秤 10.0 mg 槲皮素，以分析級甲醇定量至 10 ml，即得槲皮素母液( 1.0 mg/ml )，再自母液分別精密吸取 0.1、0.3、0.5、0.7、0.9 ml 至 10ml 定量瓶中，加甲醇稀釋至刻度，即得不同濃度槲皮素( 0.01~0.09 mg/ml )。以吸光值 (Y) 對相應濃度 (X) 做標準曲線。



圖十一.總類黃酮標準曲線

The standard curve of total flavonoids.

## 五、標準萃取分析方法

此萃取分析法為參考(張等, 2002)及(陳等, 2002)在研究萃取分析蛻皮甾酮所使用之方式(以超音波為萃取方式)。在本研究中略加修飾, 用來分析兩種筋骨草其不同部位間(花、莖、葉)之蛻皮甾酮及總黃酮含量, 步驟如下: 精秤 60 mesh 樣品 2.00 g 加入甲醇 40 ml(置於三角錐形瓶), 超音波震盪 30 分鐘, 靜置冷卻(室溫), 過濾。殘渣再置入 40 ml 甲醇, 超音波震盪 10 分鐘, 過濾去除殘渣, 合併兩次濾液以甲醇定量至 100 ml, 過 0.45  $\mu$ m 濾膜, 置於 4 °C 下冷藏備用, 待 HPLC 成分分析。

## 六、超音波最佳萃取方式之條件探討

超音波輔助萃取-超音震盪時間之探討:

精秤 60 mesh 樣品 2.00 g, 加入溶劑 40ml(甲醇及 95% 乙醇), 置於 100 ml 定量瓶中密封, 溫度設定 50°C, 分為 6 組, 分別震動 5、10、30、50、70、80 分鐘, 靜置冷卻(室溫), 直接以相對應溶劑定量至刻度, 過 0.45  $\mu$ m 濾膜, 樣品儲存於 4 °C 下備用, 待 HPLC (HITACHI 高效液相層析儀, RP-18 column, 移動相 methanol/water = 40 : 60 v/v )成分分析。

## 七、超音波輔助萃取之水及不同乙醇濃度探討

精秤 60 mesh 樣品 2.00 g，加入溶劑 40 ml(水及不同濃度乙醇)，置於 100 ml 定量瓶中密封)，溫度設定 50 °C，超音波固定功率 600 W 之下，震盪時間 50 分鐘，靜置冷卻(室溫)，直接以相對應溶劑定量至刻度，過 0.45  $\mu$ m 濾膜，樣品儲存於 4°C 下備用待 HPLC(HITACHI 高效液相層析儀，RP-18 column，移動相 methanol/water =40 : 60 v/v )成分分析。

## 八、比較四種台灣產筋骨草超音波輔助萃取和微波輔助萃取

### - 甲醇及 95% 乙醇之蛻皮甾酮產量

進一步探討筋骨草屬植物所含蛻皮甾酮及總黃酮之活性成分之比較，在此綜合以上述實驗得最佳萃取條件進而依據最適方法來分析比較超音波輔助萃取和微波輔助萃取四種台灣產筋骨草之蛻皮甾酮及總黃酮含量。

### (一)、超音波輔助萃取分析步驟：

精秤 60 mesh 樣品 2.00 g，加入溶劑 40 ml(甲醇及 95% 乙醇)，置於 100 ml 定量瓶中密封，溫度設定 50 °C 超音波震盪時間 50 分鐘，靜置冷卻(室溫)，直接以

相對應溶劑定量至刻度 100 ml，過 0.45  $\mu$  m 濾膜，樣品儲存於 4°C 下備用待 HPLC(HITACHI 高效液相層析儀，RP-18 column，移動相 methanol/water =40 : 60 v/v ) 成分分析。

(二)微波輔助萃取分析步驟：

微波萃取條件上，精秤 60 mesh 樣品 2.00 g，加入溶劑 40ml(甲醇及 95%乙醇)，置於圓形錐瓶中密封，溶劑分別為甲醇及 95%乙醇、溫度設定 65°C、功率 300W 下萃取時間為 3 分鐘,靜置冷卻(室溫),直接以相對應溶劑定量至刻度 100ml，過 0.45  $\mu$  m 濾膜，樣品儲存於 4°C 下備用待 HPLC(HITACHI 高效液相層析儀，RP-18 column，移動相 methanol/water =40 : 60 v/v ) 成分分析。

## 九、清除 DPPH 自由基能力測定分析

(一)、樣品之製備：

- 1.精秤 60 mesh 樣品 2.00 g 加入甲醇 40 ml(置於三角錐形瓶)超音波震盪 50 分鐘。
- 2.靜置冷卻(室溫)，過濾。

3.濾液以甲醇定量至 100 ml 。

4.成為 *Ajuga* 甲醇萃取液，備用。

(二)、試驗方法：

1.以 *Ajuga* 甲醇萃取液。

2.將濃度為 20 mg/ml *Ajuga* 甲醇萃取液，稀釋成  
4mg/ml、2 mg/ml、1mg/ml、0.8 mg/l、0.4 mg/ml、  
0.2 mg/ml、0.11 mg/ml。

3. 取 0.01 mg 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)  
溶於 25 ml Methanol 。

4.分別取 5ml 不同濃度之 *Ajuga* 植物萃取液，加入 1  
ml 新鮮配置之 1 mM DPPH 之 Methanol 溶液。

5.室溫下靜置靜置 30min。

6.以上步驟三個重複。

7.以分光光譜儀(spectrophotometer)波長 517nm 分析。

十、FTIR 傅利葉轉換紅外線光譜儀以及 HPLC-UV

指紋圖譜建立

(一)、FTIR 傅利葉轉換紅外線光譜儀分析方法:

1.精秤 60 mesh 樣品 2.00 g 加入甲醇 40 ml(置於三角  
錐形瓶)超音波震盪 50 分鐘。

2. 靜置冷卻(室溫)，過濾。
3. 濾液以甲醇定量至 100 ml 。
4. 待樣品分析。

(二)、以 KBr 方式進行樣品分析：

儀器設備：瑪瑙研鉢、打片器、樣品槽、傅利葉轉換紅外線光譜儀。

1. 將 KBr 刮入適量於研磨鉢中，將 KBr 粉末磨至越細越好。
2. 將 KBr 粉末置於打錠器中打錠。
3. 將 sample 萃取液均勻塗抹在 KBr，製成檢體。
4. 將打好的薄片置於紅外線光譜儀中偵測。

(三)、HPLC-UV 指紋圖譜分析方法：

1. 精秤 60 mesh 樣品 2.00 g 加入甲醇 40 ml(置於三角錐形瓶)超音波震盪 50 分鐘。
2. 靜置冷卻(室溫)，過濾。
3. 濾液以甲醇定量至 100 ml 。
4. 將樣品以 HPLC(HITACHI 高效液相層析儀，RP-18 column，移動相 methanol/water =40：60 v/v，波長 248 nm)分析，以建立指紋圖譜。

## 肆、結果與討論:

### 一、標準萃取分析方法及總黃酮含量分析

此標準萃取分析法為參考(張等, 2002)及(陳等, 2002)在研究萃取分析蛻皮甾酮所使用之方式(以超音波為萃取方式)。在本研究中略加修飾, 用來分析兩種筋骨草其不同部位間(花、莖、葉)之蛻皮甾酮及總黃酮含量, 步驟如下: 精秤 60 mesh 樣品 2.00 g 加入甲醇 40 ml(置於三角錐形瓶), 超音波震盪 30 分鐘, 靜置冷卻(室溫), 過濾。殘渣再置入 40 ml 甲醇, 超音波震盪 10 分鐘, 過濾去除殘渣, 合併兩次濾液以甲醇定量至 100 ml, 過 0.45  $\mu$ m 濾膜, 置於 4°C 下冷藏備用, 待 HPLC(HITACHI 高效液相層析儀, RP-18 column, 移動相 methanol/water =40 : 60 v/v )成分分析。

總黃酮含量分析則是取稀釋 10 倍後之萃取樣品 0.5 ml 加入 1.5 ml 95% 乙醇, 再加入 0.1 ml (10 %)  $\text{AlCl}_3$ 、0.1 ml (1M)  $\text{CH}_3\text{COOK}$  與 2.8 ml 去離子水, 室溫下靜置 40 分鐘, 測其 415 nm 吸光值。

表一.兩種筋骨草其花、莖、葉活性成分(蛻皮甾酮及總黃酮)

含量 \ 來源及 部位	<i>Ajuga taiwanensis</i>			<i>Ajuga nipponensis</i>		
	花	莖	葉	花	莖	葉
<b>Ecdysterone(m g/100g)</b>	58.3 ± 0.5	34.5 ± 1.3	56.2 ± 0.0	79.2 ± 0.4	39.0 ± 3.2	79.8 ± 0.0
<b>Total</b>						
<b>Flavonoids (QE-mg/g)</b>	17.9 ± 0.2	1.5 ± 0.2	22.9 ± 0.0	7.1 ± 0.2	4.5 ± 0	15.2 ± 0.1

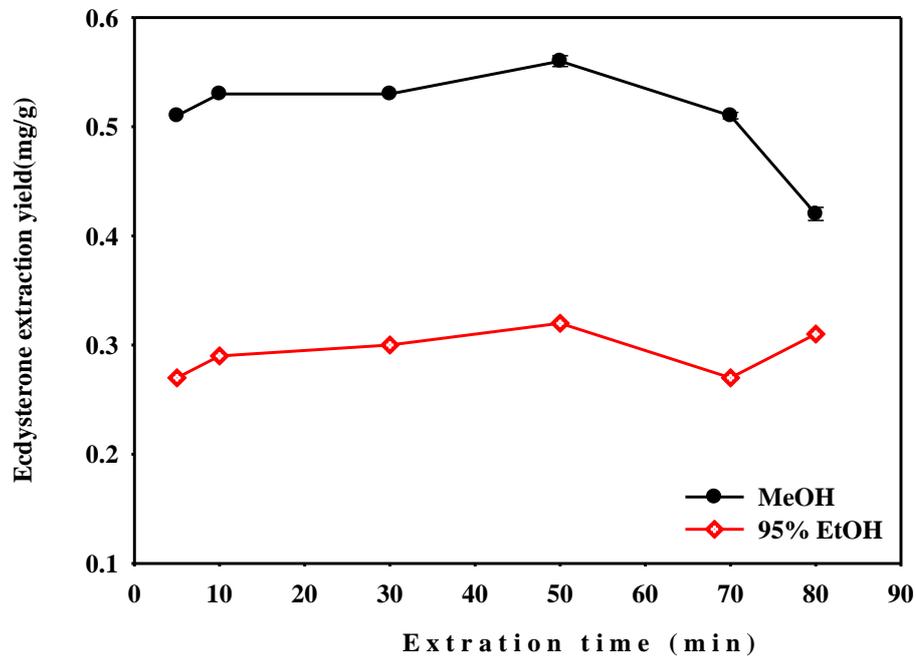
## 二、超音波最佳萃取方式之條件探討

### 1. 超音波輔助萃取-超音震盪時間之探討

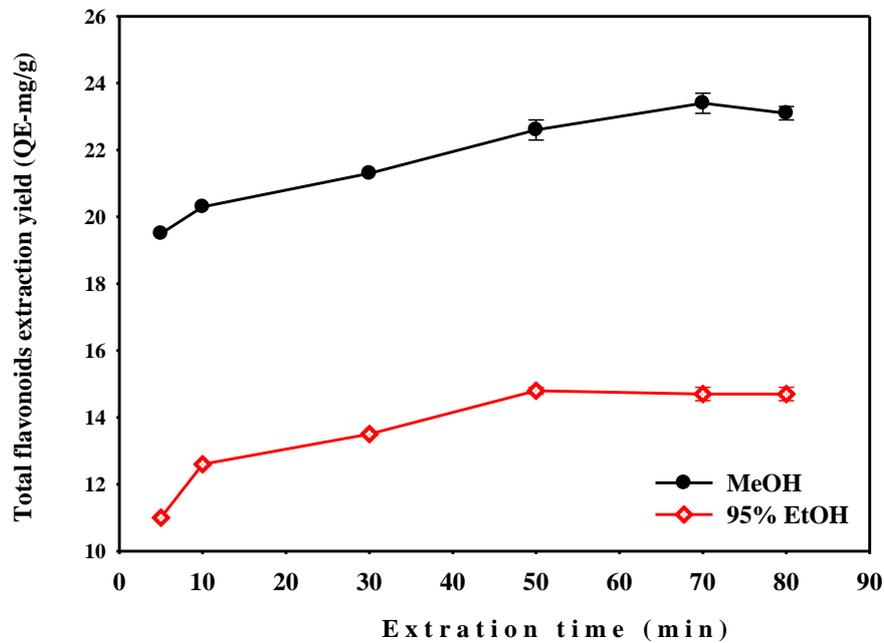
精秤 60 mesh 樣品 2.00 g，加入溶劑 40ml(甲醇及 95%乙醇)，置於 100 ml 定量瓶中密封，溫度設定 50 °C，分為 6 組，分別震動 5、10、30、50、70、80 分鐘，靜置冷卻(室溫)，直接以相對應溶劑定量至刻度，過 0.45 μm 濾膜，樣品儲存於 4°C 下備用，待

HPLC(HITACHI 高效液相層析儀，RP-18 column，移動相 methanol/water =40 : 60 v/v )成分分析。

A.



B.



圖十二. 超音波輔助萃取台灣筋骨草(葉)-時間對蛻皮甾酮及總黃酮產量之影響(A.蛻皮甾酮、B.總黃酮)

表二. 超音波輔助萃取台灣筋骨草(葉) 50~80 分鐘-甲醇及  
95%乙醇之蛻皮甾酮產量

Time (min) \	Ecdysterone extraction yield (mg/100g)	
	Solvent	
	MeOH	95%EtOH
50	56.2 ± 0.5	31.8 ± 0
70	51.0 ± 0.3	27.1 ± 0.1
80	42.1 ± 0.6	30.9 ± 0.1

表三. 超音波輔助萃取台灣筋骨草(葉) 50~80 分鐘-甲醇  
及 95%乙醇之總黃酮產量

Time (min) \	Total flavonoids extraction yield	
	(QE-mg/g)	
Solvent	MeOH	95%EtOH
50	22.6 ± 0.3	14.8 ± 0.1
70	23.4 ± 0.3	14.7 ± 0.2
80	23.1 ± 0.2	14.7 ± 0.2

由(圖十二)可看出在超音波輔助萃取在固定功率 600 W 之下，不同時間點上蛻皮甾酮及總黃酮產率趨勢。在蛻皮甾酮部分(圖十二、A)，不論以甲醇或 95% 乙醇萃取，約 50 分鐘後即可達到穩定之產量(表二)；實驗結果也顯示出，以甲醇萃取蛻皮甾酮效果較佳。

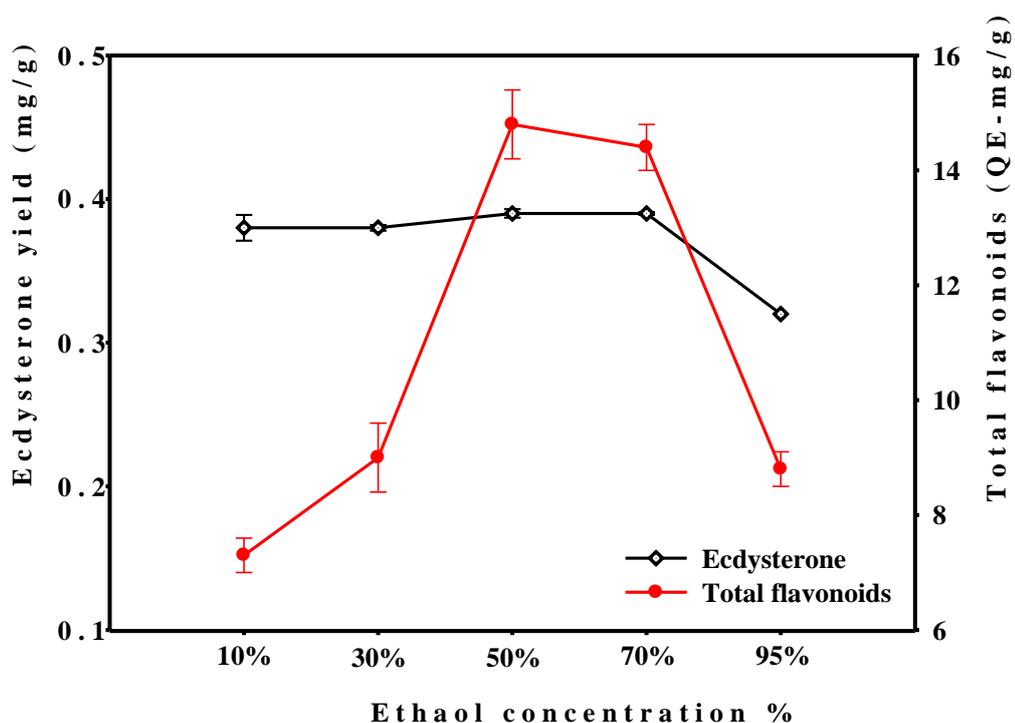
而在總黃酮產量上，隨著時間增加，甲醇或 95% 乙醇，總黃酮產量約 50~70 分鐘達至高峰(圖十二、B)，而萃取效果上，仍是以甲醇略佔優勢(表三)。

綜合以上，在探討超音波功率 600 W 之下震盪萃取時間上，蛻皮甾酮或總黃酮約 50 分鐘左右即有穩定之產量，又因考量到未來可開發筋骨草為保健食品或中成藥所以在，故再以甲醇及乙醇做探討，在固定功率 600 W 之下萃取時間最佳之 50 分鐘作為震盪萃取時間。

### 三、超音波輔助萃取之水及不同乙醇濃度探討

精秤 60 mesh 樣品 2.00 g，加入溶劑 40 ml(水及不同濃度乙醇)，置於 100 ml 定量瓶中密封)，溫度設定 50°C，超音波固定功率 600 W 之下，震盪時間 50 分鐘，靜置冷卻(室溫)，直接以相對應溶劑定量至刻度，過 0.45  $\mu$  m 濾膜，樣品儲存於 4°C 下備用，待 HPLC(HITACHI 高效液相層析儀，RP-18

column，移動相 methanol/water =40 : 60 v/v )成分分析。



圖十三. 超音波輔助萃取台灣筋骨草(葉)-不同乙醇濃度對蛻皮甾酮及總黃酮產量之影響

表四. 超音波輔助萃取台灣筋骨草(葉)-水及不同乙醇濃度蛻

皮甾酮與總黃酮之產量

solvent\content	Ecdysterone (mg/100g)	Total flavonoids (QE-mg/g)
10% EtOH	37.6 ± 0.9	7.3 ± 0.3
30% EtOH	38.0 ± 0.2	9.0 ± 0.6
50% EtOH	38.5 ± 0.3	14.8 ± 0.6
70% EtOH	38.5 ± 0.1	14.4 ± 0.4
Water	38.8 ± 0.6	8.8 ± 0.3

於探討超音波萃取時間中，95%乙醇在萃取蛻皮甾酮不及甲醇，本實驗中嘗試以不同乙醇濃度及水來探討可否達至如甲醇所萃取之效果，以便在未來可開發為保健食品。(圖十三)為不同乙醇濃度萃取蛻皮甾酮及總黃酮之差異性。

實驗結果顯示，低於 70% 乙醇的濃度下萃取效果良好，隨著乙醇濃度增加而增加之趨勢，以 50~70% 乙醇萃取產量最高，而以水做為萃取溶劑方面產量也達 31.6 ± 0.6 mg/100g(表四)；另一方面，可看出蛻皮甾酮受乙醇濃度影響很大，低於 70% 乙醇濃度時，隨著乙醇濃度增加而產量增

加，但超過 70% 乙醇，蛻皮甾酮產率明顯下降。

在總黃酮萃取上，顯示出黃酮類物質也深受乙醇濃度影響，就趨勢上來看(圖十三)，隨著乙醇濃度增加總黃酮產量越高，約 70%~95% 乙醇下萃取效果較好，但水萃黃酮產量不佳(表四)，這方面與類黃酮物質化學結構有關。

#### 四、比較四種台灣產筋骨草超音波輔助萃取和微波輔助萃取 - 甲醇及 95% 乙醇之蛻皮甾酮產量

進一步探討筋骨草屬植物所含蛻皮甾酮及總黃酮之活性成分之比較，在此綜合以上述實驗得最佳萃取條件進而依據最適方法來分析比較超音波輔助萃取和微波輔助萃取四種台灣產筋骨草之蛻皮甾酮及總黃酮含量。

##### (一)、超音波輔助萃取分析步驟：

精秤 60 mesh 樣品 2.00 g，加入溶劑 40ml(甲醇及 95% 乙醇)，置於 100 ml 定量瓶中密封，溫度設定 50°C 超音波震盪時間 50 分鐘，靜置冷卻(室溫)，直接以相對應溶劑定量至刻度 100ml，過 0.45  $\mu$ m 濾膜，樣品儲存於 4 °C 下備用待 HPLC(HITACHI 高效液相層析儀，RP-18 column，移動相 methanol/water =40 : 60 v/v )成分分析。

表五. 超音波輔助萃取 4 種筋骨草-甲醇及 95% 乙醇之蛻皮甾酮產量

超音波輔助萃取	Ecdysterone extraction yield (mg/100g)	
	MeOH	95%EtOH
矮筋骨草	0.4 ± 0.00	-ND-
日本筋骨草	79.8 ± 0.02	33.7 ± 0.01
台灣筋骨草	56.2 ± 0.04	31.8 ± 0.04
匍匐筋骨草	68.4 ± 0.02	39.4 ± 0.01

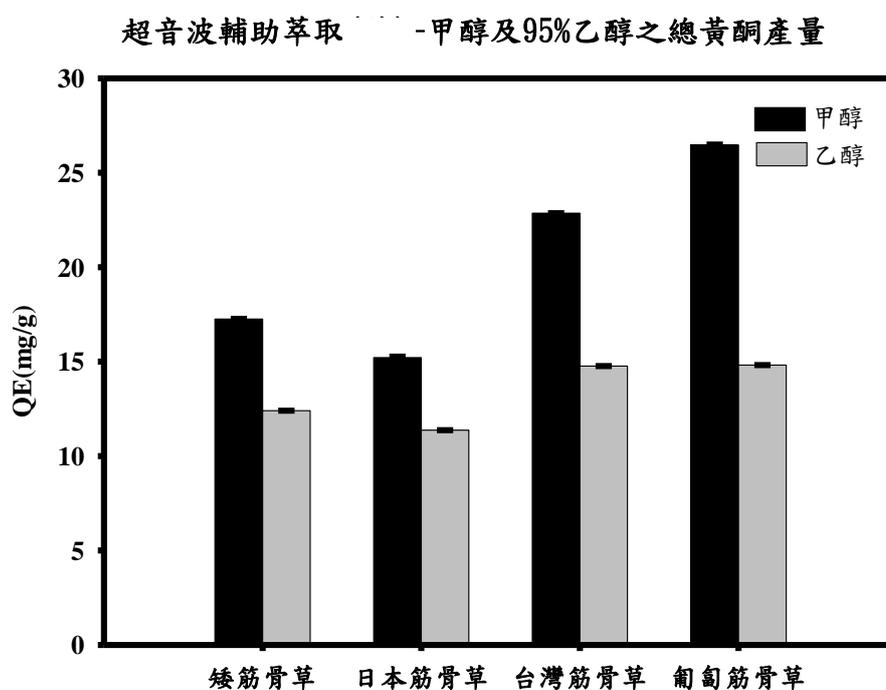
ND= not detectable

(二)、超音波輔助萃取總黃酮之產量：

總黃酮含量分析為取稀釋 10 倍後之萃取樣品 0.5 ml 加入 1.5 ml 95% 乙醇，再加入 0.1 ml (10 % )AlCl<sub>3</sub>、0.1 ml (1M) CH<sub>3</sub>COOK 與 2.8 ml 去離子水，室溫下靜置 40 分鐘，測其 415 nm 吸光值。

表六. 超音波輔助萃取 4 種筋骨草-甲醇及 95% 乙醇之總黃酮產量

超音波輔助萃取 總黃酮之產量	Total flavonoids extraction yield (QE-mg/g)	
	MeOH	95%EtOH
矮筋骨草	17.3 ± 0	12.4 ± 0
日本筋骨草	15.2 ± 0	11.4 ± 0
台灣筋骨草	22.9 ± 0.01	14.8 ± 0
葡萄筋骨草	26.5 ± 0.02	14.8 ± 0



圖十四. 超音波輔助萃取-甲醇及 95% 乙醇之總黃酮產量

(三)、微波輔助萃取分析步驟：

微波萃取條件上，精秤 60 mesh 樣品 2.00 g，加入溶劑 40ml(甲醇及 95%乙醇)，置於圓形錐瓶中密封，溶劑分別為甲醇及 95%乙醇、溫度設定 65°C、功率 300 W 下萃取時間為 3 分鐘,靜置冷卻(室溫)，直接以相對應溶劑定量至刻度 100 ml，過 0.45  $\mu$ m 濾膜，樣品儲存於 4 °C 下備用待 HPLC(HITACHI 高效液相層析儀，RP-18 column，移動相 methanol/water =40 : 60 v/v )成分分析。總黃酮含量測定則同超音波萃取之。

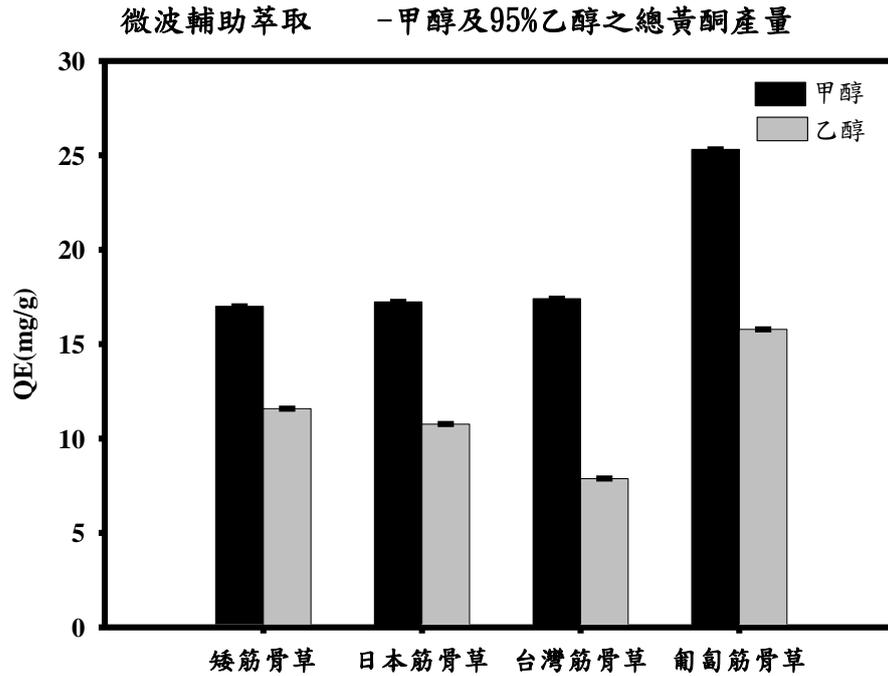
表七. 微波輔助萃取 4 種筋骨草-甲醇及 95%乙醇之蛻皮甾酮產量

微波輔助萃取	Ecdysterone extraction yield (mg/100g)	
	MeOH	95%EtOH
矮筋骨草	0.23 $\pm$ 0	-ND-
日本筋骨草	43.2 $\pm$ 0	35.5 $\pm$ 0
台灣筋骨草	53.0 $\pm$ 0.1	20.1 $\pm$ 0
匍匐筋骨草	56.1 $\pm$ 0	28.4 $\pm$ 0

ND= not detectable

表八. 微波輔助萃取4種筋骨草-甲醇及95%乙醇之總黃酮產量

微波輔助萃取總黃酮 之產量	Total flavonoids extraction yield (QE-mg/g)	
	MeOH	95%EtOH
矮筋骨草	17.0	11.6
日本筋骨草	17.2	10.8
台灣筋骨草	17.4	7.9
匍匐筋骨草	25.3	15.8



圖十五.微波輔助萃取-甲醇及 95%乙醇之總黃酮產量

在超音波輔助萃取蛻皮甾酮，實驗結果顯示出，四種台灣產筋骨草中超音波輔助萃取比較，以日本筋骨草的 79.8 mg/100g 蛻皮甾酮含量最高(表五)，甲醇萃取蛻皮甾酮效果較佳。

在微波輔助萃取蛻皮甾酮，實驗結果顯示出，四種筋骨草中微波輔助萃取比較，結果日本筋骨草得到 43.2 mg/100g，反而匍匐筋骨草甲醇萃取的 56.1 mg/100g 蛻皮甾酮含量最高(表七)，微波輔助萃取依然是甲醇萃取蛻皮甾酮效果較佳。

在總黃酮產量，實驗結果顯示出，四種筋骨草中超音波

萃取以匍匐筋骨草甲醇萃取之總黃酮 26.5 mg/g 產量含量最高(表六)，甲醇萃取總黃酮效果比乙醇好(圖十四、圖十五)。實驗結果顯示出四種筋骨草中微波萃取以甲醇萃匍匐筋骨草 25.3 mg/g 所得總黃酮產量含量最高(表八)。

超音波輔助萃取及微波輔助萃取蛻皮甾酮方面比較，超音波的產率比微波萃取效果佳。而在超音波輔助萃取及微波輔助萃取總黃酮產量上兩者相當，但比較下微波輔助萃取因所耗時間只有 3 分鐘，而超音波輔助萃取卻用了 50 分鐘，因此在萃總黃酮效率上微波輔助萃取佔有優勢。

## 五、清除 DPPH 自由基能力測定分析

原理：DPPH 自由基為一相當安定的自由基，其甲醇溶液在 517nm 有強吸光值，當自由基被抗氧化物還原或與另一個自由基結合時吸光值會降低或消失，吸光值愈低，表示抗氧化物的供氫能力愈強。(Blosi, 1958)(Thamas, 1995)



### (一)、樣品之製備：

- 1.精秤 60 mesh 樣品 2.00 g 加入甲醇 40 ml (置於三角錐形瓶)超音波震盪 50 分鐘。

- 2.靜置冷卻(室溫)，過濾。
- 3.濾液以甲醇定量至 100 ml 。
- 4.成為 *Ajuga* 甲醇萃取液，備用。

## (二)、試驗方法

- 1.以 *Ajuga* 甲醇萃取液。
- 2.將濃度為 20 mg/ml *Ajuga* 甲醇萃取液，稀釋成 4mg/ml、2 mg/ml、1mg/ml、0.8 mg/l、0.4 mg/ml、0.2mg/ml、0.11mg/ml
3. 0.01 mg 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) 溶於 25ml Methanol 。
- 4.分別取 5ml 不同濃度之 *Ajuga* 植物萃取液，加入 1ml 新鮮配置之 1 mM DPPH 之 Methanol 溶液。
- 5.室溫下靜置靜置 30min 。
- 6.以上步驟三個重複。
- 7.以分光光譜儀(spectrophotometer)波長 517 nm 分析。

## (三)、BHA 人工合成抗氧化劑

丁羥甲醚 butylated hydroxyanisole (BHA),為一人工合成抗氧化劑構造式中一個苯環接上一個-OH 基,提供一個共振環境,(自然界的多酚,類黃酮也有一樣的構造)

不同在於甲基(或其他取代基)取代的位置不同，這會影響他們的抗氧化能力，對不同的東西，抗氧化力的強弱也不太一樣，合成的抗氧化力比自然存在(如 Vit. E)的強，因此在此取為對照組。(高等，1998)

(四)、實驗結果:

表九.筋骨草清除自由基能力

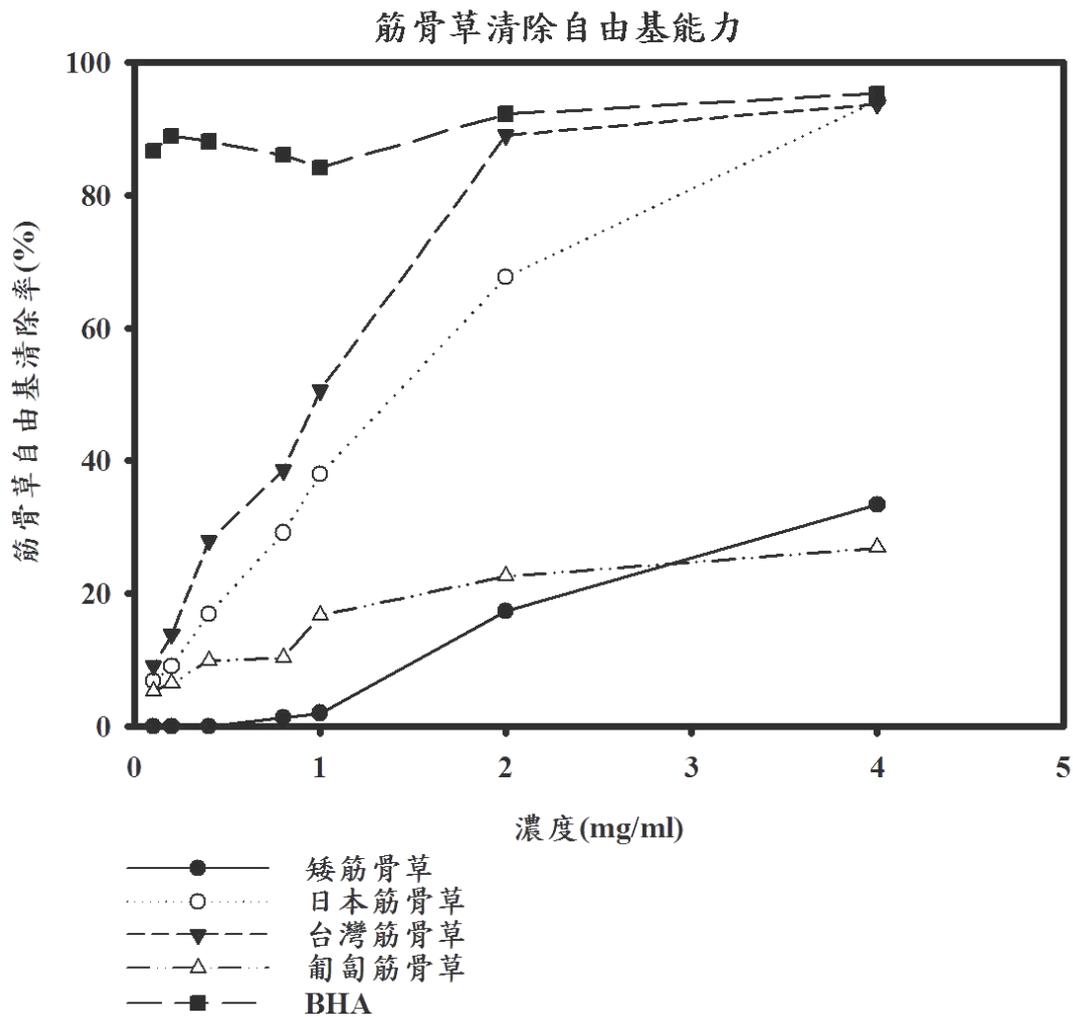
矮筋骨草 日本筋骨草 台灣筋骨草 匍匐筋骨草

---

33.4%	94.2%	93.7%	26.9%
-------	-------	-------	-------

---

$\{1 - (\text{樣品吸光值} / \text{未知樣品之控制組之吸光值})\} * 100 = \text{自由基清除百分率}$



圖十六.筋骨草清除自由基能力

抗氧化物還原時吸光值會降低，吸光值愈低，表示抗氧化物的供氫能力愈強。在不同種台灣產的筋骨草抗氧化能力的比較分析下，日本筋骨草的抗氧化能力效果最佳，抗氧化清除率達 94.2% (表九)，其次為台灣筋骨草 93.7%，相較之下匍匐筋骨草 26.9% 和矮筋骨草 33.4% 的抗氧化能力都較不及其它 2 種筋骨草之抗氧化效果(圖十六)。

## 六、FTIR 傅利葉轉換紅外線光譜儀以及 HPLC-UV

### 指紋圖譜建立

#### (一)、分析方法:

1. 精秤 60 mesh 樣品 2.00 g 加入甲醇 40 ml (置於三角錐形瓶)超音波震盪 50 分鐘。
2. 靜置冷卻(室溫)，過濾。
3. 濾液以甲醇定量至 100 ml 。
4. 待樣品分析。

#### (二)、FTIR 指紋圖譜建立:

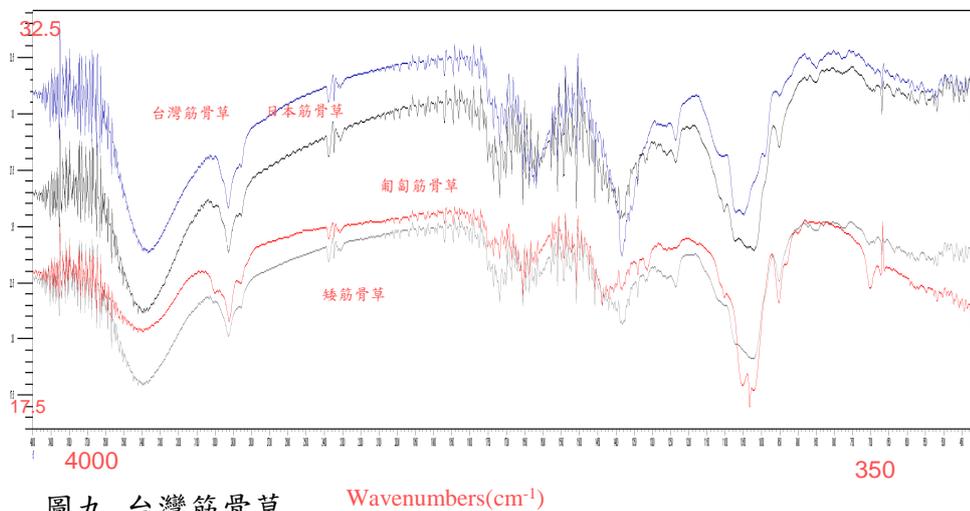
IR 原理:主要是分子中的官能基產生分子間的振動、轉動，之間吸收了適當的紅外光能量而得到的光譜藉紅外光光譜所顯現的 peak 來判斷化合物結構上的官能基。而 FTIR 系統是利用干涉儀產生干涉圖譜經傅利葉轉換成 IR 的光譜。(使用 PE-2000 FTIR，波長在  $4000-400/\text{cm}^{-1}$  得到 IR 光譜)

#### (三)、以 KBr 方式進行樣品分析:

儀器設備：瑪瑙研鉢、打片器、樣品槽、紅外線光譜儀。

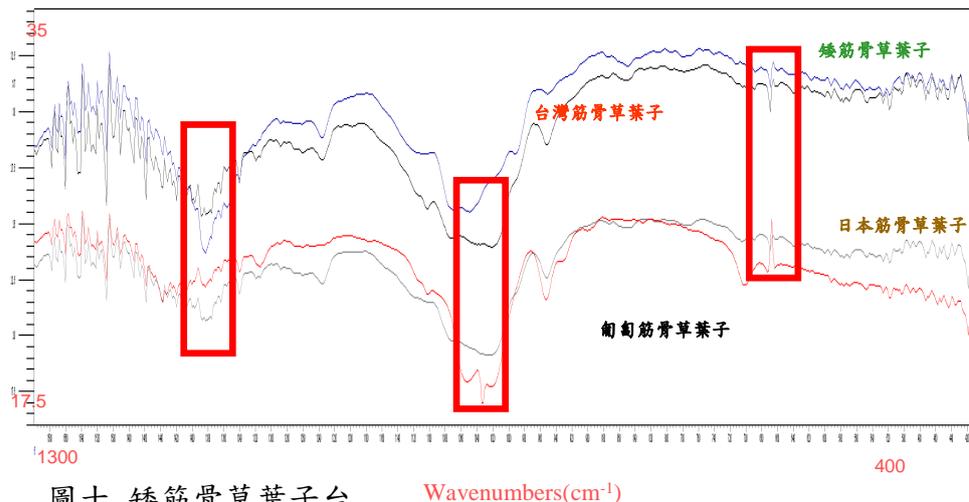
1. 將 KBr 刮入適量於研磨鉢中，將 KBr 粉末磨至越細越好。

- 2.將 KBr 粉末置於打錠器中打錠。
- 3.將 sample 萃取液均勻塗抹在 KBr，製成檢體。
- 4.將打好的薄片置於 FTIR(Shimadzu-8400)傅利葉轉換紅外線光譜儀中偵測。



圖九. 台灣筋骨草  
 葉子日本筋骨草葉  
 子匍匐筋骨草葉子  
 矮筋骨草葉子比較  
 圖350-4000( $\text{cm}^{-1}$ )

圖十七. 四種台灣產筋骨草 FTIR 圖譜



圖十. 矮筋骨草葉子  
台灣筋骨草葉子  
日本筋骨草葉子  
匍匐筋骨草葉子  
指紋圖譜比較圖  
400-1300( $\text{cm}^{-1}$ )

#### 圖十八. 四種台灣產筋骨草 FTIR 指紋圖譜

四種台灣產筋骨草 FTIR 指紋圖譜，在特定波數(紅色標示處)有顯著不同吸收圖譜，可供指紋辨識。

FTIR(Shimadzu-8400)分析儀器參數條件：

Number of Scans: 20

Resolution: 4.0

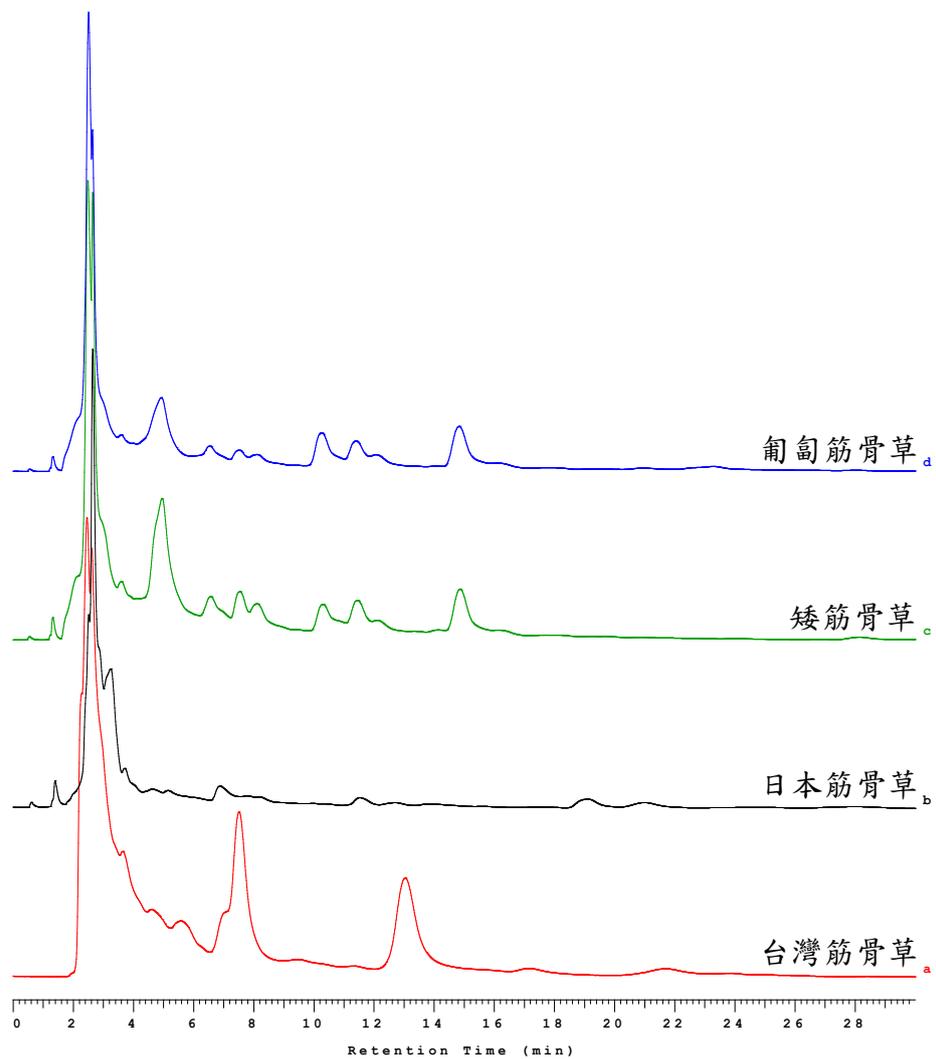
Range ( $\text{cm}^{-1}$ ): 400 ~ 4000  $\text{cm}^{-1}$

(四)、HPLC-UV 指紋圖譜建立:

分析方法:

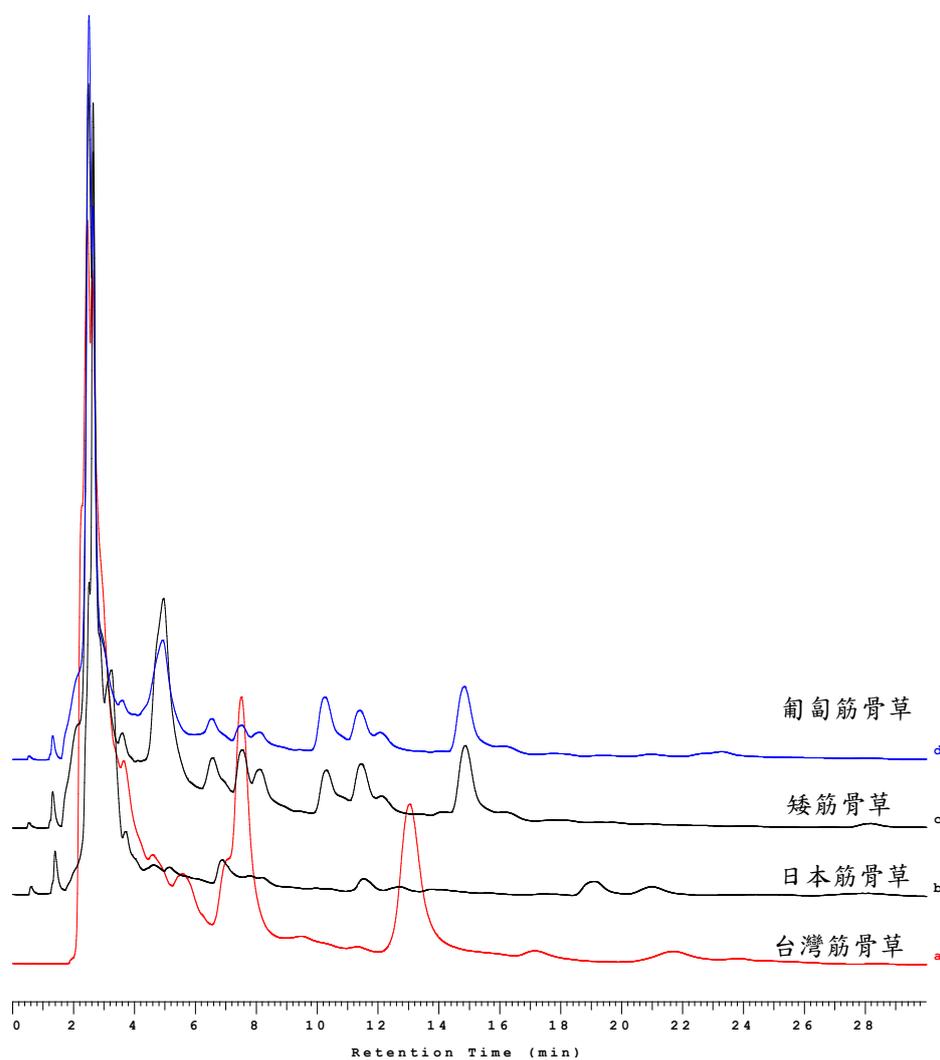
1. 精秤 60 mesh 樣品 2.00 g 加入甲醇 40 ml(置於三角錐形瓶)超音波震盪 30 分鐘。

2. 靜置冷卻(室溫)，過濾。
3. 濾液以甲醇定量至 100 ml 。
4. 過 0.45  $\mu$  m 濾膜待 HPLC(HITACHI 高效液相層析儀，RP-18 column，移動相 methanol/water =40 : 60 v/v，波長 248 nm)分析以建立指紋圖譜。



圖十九. 四種台灣筋骨草之 HPLC-UV 248 nm 波長指紋圖譜

四種台灣筋骨草 HPLC-UV 248 nm 波長指紋圖譜之比較，除匍匐筋骨草及矮筋骨草指紋圖譜較接近之外，日本筋骨草及台灣筋骨草則明顯有不同之指紋圖譜。



圖二十. 四種台灣筋骨草之 HPLC-UV 248 nm 波長指紋圖譜

(圖譜重疊比較)

Column : RP-18 column( 250 mm × 4.6 mm , 5  $\mu$  m )

Detector : UV 248nm

Flow rate : 1.0 ml/min

注入量 : 20  $\mu$ l , 柱溫: 40°C

## 伍、結論與建議:

實驗結果顯示出，四種台灣產筋骨草萃取超音波輔助萃取比較中，以日本筋骨草甲醇萃取蛻皮甾酮含量最高達 79.8mg/100g。然而微波輔助萃取蛻皮甾酮方面，日本筋骨草甲醇萃取蛻皮甾酮含量較低，只有 43.2 mg/100g。

在總黃酮量實驗結果顯示出，四種台灣產筋骨草中超音波輔助萃取 50 分鐘的比較研究，結果以匍匐筋骨草甲醇萃取之總黃酮  $26.5 \pm 0$  mg/g 含量最高。而微波輔助甲醇萃取 3 分鐘，總黃酮含量匍匐筋骨草得到  $25.3 \pm 0$  mg/g，兩者相當，顯示微波輔助萃取 3 分鐘比超音波輔助萃取 50 分鐘，在總黃酮方面有相當優勢。不同種筋骨草抗氧化能力的比較分析下，日本筋骨草的抗氧化能力效果最佳，抗氧化自由基 DPPH 清除率達 94.2%。根據以往文獻顯示此些生理活性，有利於未來醫藥產業之應用，具有開發利用之價值。在此研究中也建立了四種筋骨草之 FTIR 指紋圖譜以及 HPLC-UV 指紋圖譜，以供日後辨識四種不同臺灣產筋骨草之品種。

建議:

筋骨草屬植物的全草入藥，文獻研究指出其功效具有止咳化痰、清熱涼血、解毒消腫止痢(王初等，2003)的功效，民間民俗療法亦用於治療肝病，上呼吸道感染引起的急慢性咽喉炎、支氣管炎、扁桃體炎、肺炎、痢疾、吐血、咳血以及跌打損傷等(吳德峰，1997；劉斌等，2001)。根據此實驗結果，筋骨草確實含有效能之活性成分，為求確切功效，建議進一步以本研究最佳之萃取方法，提供不同之部分萃取液(Fractions) 提供細胞及動物試驗，以確定台灣筋骨草中具生理功能性之萃取液部份，並進一步研究其中之有效成分，以供日後發展其機能性台灣筋骨草之保健食品。

#### 陸、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. 吳德峰。1997。淺析筋骨草的藥用價值。福建畜牧獸醫(1)32-33。
3. 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。
4. 陳莉莉、吳紅權、李穎和帥琴。2002。漏蘆中蛻皮甾酮提取方法研究。中藥材(25)3。
  5. 張英、韋異及粟暉。2002。超聲提取-反相高效液相色譜法測定牛膝中蛻皮甾酮。光譜實驗室 19(5):668-671。
  6. 高馥君、李敏雄。1998。食品保存與抗氧化劑。食品工業，30(12):17-24。
  7. 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。
  8. 薛聰賢。2003。台灣原生景觀植物圖鑑。第 149 頁。台灣普綠有限公司出版部。彰化。台灣。
  9. 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。
  10. 謝宗欣。1998。台灣筋骨草屬植物介紹。自然保育季刊 21:21-27。

11. 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。
12. Blois, M.S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 26:1199-1200.
13. Chenni, A., Ait Yahia, D., Boukortt, F.O., Prost, J., Lacaille-Dubois, M.A., 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. *Journal of Ethnopharmacology* 109 (2) :207-213.
14. Chen, Q., Xia, Y. P. and Qiu, Z.Y. 2006. Effect of ecdysterone on glucose metabolism in vitro. *Life Sciences* 78: 1108-1113.
15. Dewanto, V., Wu, X. Z., Adom, K. K. and Liu, R. H (2002). Thermal Processing enhances the nutritional value of Tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.*, 50(10):3010-3014.
16. El Hilaly, J. and Lyoussi, B. 2002. Hypoglycaemic effect of the lyophilised aqueous extract of *Ajuga iva* in

normal and streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 80:109–113.

17. El Hilaly, J., Lyoussi, B., Wibo M., Morel, N. 2004. Vasorelaxant effect of the aqueous extract of *Ajuga iva* in rat aorta. *Journal of Ethnopharmacology* 93:69–74.

18. Thamas, J. (1995). The role of free radicals and antioxidants: How do we know that are working. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 35(1):21-39.