

## 大花咸豐草超臨界流體萃取物抗氧化、抗發炎能力研究

陳薪曉<sup>1</sup> 林昀蓉<sup>2</sup> 王蓉敏<sup>2</sup> 周培萱<sup>2</sup> 陳美慧<sup>2</sup> 黃敏鳳<sup>2</sup> 洪彰岑<sup>3</sup> 林榮宗<sup>4</sup> 林文傑<sup>5,\*</sup>

<sup>1</sup>台北醫學大學-署立雙和醫院 放射診斷科

<sup>2</sup>元培科技大學 護理系

<sup>3</sup>福建中醫藥大學 中西醫結合系

<sup>4</sup>臺北市立聯合醫院仁愛院區 放射診斷科

<sup>5</sup>元培科技大學 視光系

### 摘要

大花咸豐草為菊科多年生植物，在傳統醫學上具有解熱、消炎與鎮痛的效果，所以用來治療氣管炎、肺炎、咽喉炎、痢疾等各種疾病。本研究將探討超臨界二氧化碳萃取大花咸豐草萃取物(BP)對於抗氧化、抗發炎之成效。實驗以總多酚、總類黃酮測定、DPPH 自由基清除率、TEAC 當量測定、鐵離子螯合和還原力測定等化學方法測試細胞外抗氧化能力，並以過氧化氫( $H_2O_2$ )毒殺作用的保護能力測試細胞內抗氧化效果。另外以一氧化氮分析( NO assay ) 和硝基藍四氮還原試劑( NBT assay ) 評估萃取物抗發炎能力。實驗結果顯示 BP 的總多酚當量為  $79 \pm 0.25$ GAE (mg)/100g，總類黃酮當量為  $24.1 \pm 0.36$  RE(mg)/100g，DPPH 50%自由基清除濃度( $IC_{50}$ )為  $25\mu g/mL$ ，該濃度的 TEAC 當量為  $74 \pm 2.88\mu M$ 。當 BP 濃度在  $350\mu g/mL$  時，對於  $H_2O_2$  的傷害有最大保護能力，約有 70%的存活率，NO 生成當量約  $38\mu M$ ，硝基藍四氮(NBT)還原測試，發現可抑制 25%細胞產生發炎反應。以超臨界流體二氧化碳萃取大花咸豐草效率高產量多且能保持其抗氧化、抗發炎特性。

**關鍵詞：**超臨界二氧化碳萃取，大花咸豐草，抗氧化，抗發炎

### 一、前言

大花咸豐草為外來草種，分布於全台低海拔地區，除黃色筒狀花之外，周圍具較大之白色舌狀花，長約 10-15mm，嫩莖葉或幼苗可炒食，是常見的野菜，清涼退火，也是青草茶重要的藥材之一。大花咸豐草在傳統中藥常用於慢性病的治療包括糖尿病[1]、抗發炎[2]和肝炎的治療[3]。大花咸豐草甲醇萃取液對於鹽類引起老鼠血壓增高有抑制作用[4]；Alvarez 曾經將它用於治療胃潰瘍[5]；Rabe

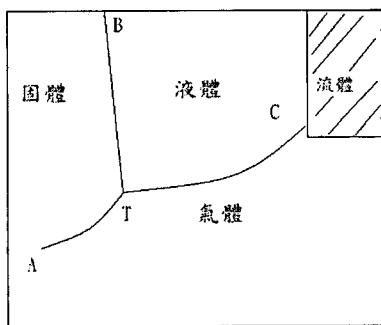
的研究中亦指出大花咸豐草提煉出的生物有效成分具有抗生素、治瘧和抑制前列腺素合成的作用[6]；Chiang 等亦證實大花咸豐草的萃取物有顯著 DPPH 自由基清除作用[7]；Change 曾經報告大花咸豐草的熱水萃取物能有效抑制 L1210、P3MR1、Raji、K562 等四種白血病細胞的生長，它的  $IC_{50}$  值在  $200\mu g/mL$  以下[8]；Chiang 指出從大花咸豐草萃取的咖啡因乙酯能阻斷 NF- $\kappa B$  活化 RAW264.7 巨噬細胞，而抑制 LPS 誘發的細胞素 iNOS 和 COX-2 的表現[9]；Yang 亦發現大花咸豐草的酒精萃取物能有效保護細胞培養中人類紅血球細胞對抗氧化的傷害[10]；Chiang 亦證實大花咸豐草甲醇萃取物能調節 T 細胞的分化防止非肥胖型糖尿病老鼠產生

100 年 4 月 29 日受理 100 年 5 月 24 日接受刊登

\*通訊作者：林文傑講師 新竹市香山區元培街 306 號  
元培科技大學視光系 電話：03-5381183 轉 8346  
E-mail: wjlin@mail.ypu.edu.tw

非肥胖型糖尿病[11]。以上結果可知大花咸豐草的萃取物對於各種疾病確實有其實用價值，但是所有參考文獻所使用的方法不外乎甲醇、乙醇和熱水萃取，不但耗時間也造成資源的浪費。

圖一為純流體的壓力-溫度關係，AT線表示氣-固平衡的昇華曲線，BT線表示液-固平衡的熔融曲線，CT線表示氣-液平衡的蒸氣壓曲線，點T是氣-液-固三相共存的三相點。當溫度及壓力超過其臨界溫度及臨界壓力時，即所謂的超臨界流體狀態。在未達臨界點前，常存在明顯氣、液兩相之間的界面，但到達臨界點時，此界面即消失不見。有些物質在到達超臨界流體相時，顏色也會由無色變成其他顏色，若再經減壓或降溫，又會回復氣、液兩相，因此其具有類似氣體的擴散係數和液體的溶解力，且表面張力為零，能迅速滲透進固體物質之中，提取其精華。二氣化碳臨界溫度接近室溫，約攝氏 $31.2^{\circ}\text{C}$ ，臨界壓力約 $72.8\text{ atm}$ ，不具毒性，不會自燃，來源廣價格低廉，且臨界密度為 $0.448\text{g/cm}^3$ [12]，比起一般常用溶劑例如甲醇( $0.272\text{g/cm}^3$ )、乙醇( $0.276\text{g/cm}^3$ )和水( $0.344\text{g/cm}^3$ )的密度要高，由於超臨界流體的溶解能力會隨著流體密度升高而增加因此二氣化碳確實適合用來作為超臨界溶劑使用。實驗以超臨界流體萃取法做大花咸豐草的萃取，並將萃取物進一步做抗氧化與抗發炎的研究，以達成綠色化學的目的。



圖一、純流體的壓力-溫度關係

## 二、材料與方法

### 樣品前處理

實驗使用的大花咸豐草採集自新竹港南風景區，全株清水清洗，以 $50^{\circ}\text{C}$ 乾燥四小時，全株磨粉，過 $0.42\text{mm}$ 篩網後放置在濕度 $40\%$ 的乾燥箱備用。

### 實驗試劑

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium (Biological, USA), RPMI: Roswell Park Memorial Institute (Biological, USA), PBS: Phosphate buffered saline (Biological, USA), Trypan blue (Biochrom ,AG), Trypsin-EDTA, DMSO: Dimethyl sulfoxide (Sigma,USA), MTT: (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (Sigma,USA), NBT: Nitroblue tetrazolium (Sigma,USA), PMA: Phorbol 12-myristate 13-acetate (Sigma,USA), Ascorbic acid (Sigma,USA), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma,USA), Penicillin-Streptomycin (Gibco, USA), Sodium bicarbonate (Sigma,USA), LPS (Sigma,USA)

### 實驗細胞

clone-9 細胞為正常的老鼠肝細胞，因其為正常細胞，無法進行長期繼代培養，需注意其生長週期，通常取三十代以內的細胞進行實驗。RAW 264.7 細胞是老鼠巨噬細胞，是一種位於組織內的白血球，它們的主要功能是對細胞殘片及病原體進行吞噬作用（即吞噬以及消化），並且活化其他免疫細胞，令其對外來物作出免疫反應。THP-1 細胞是人類單核球細胞，它在人體內的功能和巨噬細胞相同，單核球細胞在人體內約存活數天即會被淘汰換新。

### 萃取方法

使用超臨界二氣化碳流體萃取法，取乾燥粉末 $5\text{g}$ 加入 $50\text{mL}$ 萃取槽內，萃取壓力設定 $120\text{atm}$ ，萃取溫度 $32^{\circ}\text{C}$ 。靜態萃取 30 分鐘後蒐集萃取物並且過濾。使用減壓濃縮將過濾的粗萃物乾燥，收取其結晶物，放置在 $4^{\circ}\text{C}$ 冰箱備用。



### 總多酚測定

使用 gallic acid 做為標準品，取 75 $\mu$ L 標準品和濃度分別為 25 $\mu$ g/mL、50 $\mu$ g/mL、100 $\mu$ g/mL、150 $\mu$ g/mL 和 200 $\mu$ g/mL 的萃取物，再分別加入 960 $\mu$ L 的 Folin，等待 7 分鐘後再分別加入 120 $\mu$ L 的 20% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>，再等待七分鐘，以分光光度計測其 680 nm 吸光值，並以不同濃度標準品比對檢量線，推算其當量濃度，即 GAE ( Gallic acid equivalent)。

### 總黃酮測定

使用 Rutin 做為標準品，取 100 $\mu$ L 標準品和濃度分別為 1 $\mu$ g/mL、1.25 $\mu$ g/mL、1.5 $\mu$ g/mL、1.75 $\mu$ g/mL 和 2 $\mu$ g/mL 的萃取物。再分別加入 960 $\mu$ L 的 5mM NaNO<sub>2</sub>，7 分鐘後每個樣品加入 240 $\mu$ L 的 0.1M AlCl<sub>3</sub>，14 分鐘時，每個樣品加入 800 $\mu$ L 的 2N NaOH，21 分鐘時，以分光光度計測其 510 nm 吸光值，並以不同濃度標準品比對檢量線，推算其當量濃度，即 RE ( Rutin equivalent)。

### DPPH(*a,a-diphenyl-β-pricrylhydrazyl*) 自由基清除測定

取 5mL 不同濃度之萃取液，並以 5mL 甲醇為對照組，加入 1mM 之 DPPH 甲醇溶液 1mL，混合均勻後靜置避光 30 分鐘，於 OD<sub>517</sub> 下進行分光測試。

計算清除率(%)=[1-(樣品 OD<sub>517</sub>/對照組 OD<sub>517</sub>)]×100%

### 亞鐵離子螯合測定

取 5mL 不同濃度之萃取液，並以 5mL 甲醇作為對照組，加入 2mM 的氯化亞鐵溶液 0.1mL 與 5mL 的 Ferrozine 溶液 0.2mL，反應 10 分鐘後，於 562nm 下測吸光值。吸光值越低表示萃取液螯合 Fe<sup>2+</sup> 能力越強，抗氧化效果越佳。

螯合能力(%)=[1-(樣品 OD<sub>562</sub>/對照組 OD<sub>562</sub>)] ×100%

### 還原力測定

取 0.15mL 不同濃度的萃取液，加入 0.2M 的磷酸鈉緩衝液 0.15mL 與含 1% 的 K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 溶液 0.15mL，混合均勻後於 50°C 水浴下反應 20 分鐘，急速冷卻，再加入 0.15mL 之 10%TCA 溶液、0.6mL 去離子水及含有 0.1% 之 FeCl<sub>3</sub> 溶液 0.6mL，混合均勻後靜置避光反應 14 分鐘，以分光光度計測其 700 nm 吸光值。

### ABTS 陽離子自由基清除測定

取 1.5mL 去離子水、44unit /mL peroxidase 水溶液 0.25mL，500 $\mu$ M 之 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液 0.25mL 及 1000 $\mu$ M 的 ABTS 溶液 0.25mL，混勻後避光反應一小時，使其生成穩定之藍綠色，ABTS<sup>+</sup>，再加入 0.25mL 萃取液，於以分光光度計測其 734 nm 吸光值。

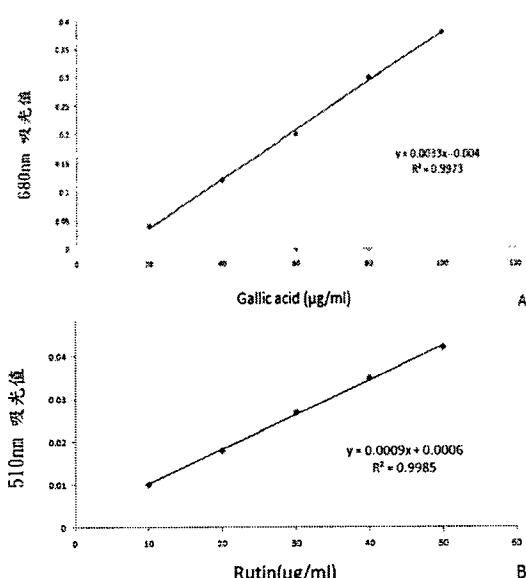
### 細胞內抗氧化實驗

胞內抗氧化實驗是利用萃取物保護正常細胞免於受到 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的傷害。實驗時將每毫升 5×10<sup>4</sup> 個 clone-9 細胞培養在 24 well 中，以 10% FBS 的 DMEM 培養基培養，待細胞貼盤後，將培養基移除，再換上 1% FBS 的 DMEM 培養基繼續培養 24 小時。之後再分別加入去離子水、PBS 和粗萃物，繼續培養 24 小時。加入 100 $\mu$ M 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，作用 1 小時後，以 MTT assay 測試其存活率。

### 一氧化氮(NO)生成量測試

實驗時使用 24 孔培養盤，每孔種 2×10<sup>5</sup> 個 RAW 264.7 細胞，以含 10%FBS 的新鮮 DMEM 培養基於 37°C 細胞培養箱中培養，等待 RAW 264.7 細胞完全貼附於培養皿上，再加入不同濃度的大花咸豐草萃取物，並且加入 100 $\mu$ g/mL 的 LPS 刺激誘發細胞產生一氧化氮(NO)。待培養 4 小時後抽取作用完的培養基，以 1200rpm 離心 5 分鐘，收集離心完的上清液測試 NO 表現量。測試 NO 表現量時，取 80 $\mu$ L 培養液放入 96 孔培養盤，再加入 100 $\mu$ L griess-reagent (配方: 50 $\mu$ L 1% sulfanilamide 加入 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 與 50 $\mu$ L 0.1% naphthylethylenediamine





圖二、(A)總多酚檢量線(B)總類黃酮檢量線

dihydrochloride)，混合後使用 ELISA reader 分析，波長設定在 540nm。另外必須製作 NO 檢量線以得知 NO 生成量。

#### NBT assay

使用 24 孔培養盤，每孔種  $2 \times 10^5$  個 THP-1 細胞，分別加入不同濃度的大花咸豐草萃取物 (10 μg/mL、50 μg/mL、150 μg/mL、250 μg/mL、350 μg/mL、400 μg/mL、450 μg/mL) 再和 1mL 的硝基藍四氮試劑 [ NBT reagent: 5mg NBT + 10 μL 之 100nM PMA( phorbol 12-myristate 13-acetate) 溶於 1mL 的 RPMI 1640+ 10% FBS 之中]，以 37°C，5% CO<sub>2</sub> 培養箱培養 4 小時後，移除硝基藍四氮試劑，加入二甲基亞楓 (DMSO) 將紫色結晶溶解。使用紫外光可見光分光度計測吸光值，波長選擇 540nm，吸光值越高則代表細胞分化越成熟，利用吸光值換算其分化百分比。

#### 細胞存活試驗(MTT assay)

MTT (3-(4,5-dimethylazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium Bromide )分析是利用 MTT reagent 中 tetrazolium 在活細胞中會被粒腺體的脫氫

酵素還原，產生紫色 MTT formazan，MTT formazan 以 DMSO 溶解後在 540 nm 有極高的吸收。當存活細胞越多，產生的 formazan 也越多，在 540 nm 的吸光值也越大，藉此可計算出細胞存活率。實驗步驟為配製濃度含 0.1 mg/mL 之 MTT 細胞培養液，將細胞培養 3 小時後移除，再加入 0.5 mL 之 DMSO 溶解，利用 ELISA reader 在波長 540 nm 下測量吸光值再以下式計算細胞存活率。

$$\text{MTT assay 細胞存活率} = (\text{實驗組細胞 OD}_{540} / \text{對照組細胞 OD}_{540}) \times 100\%$$

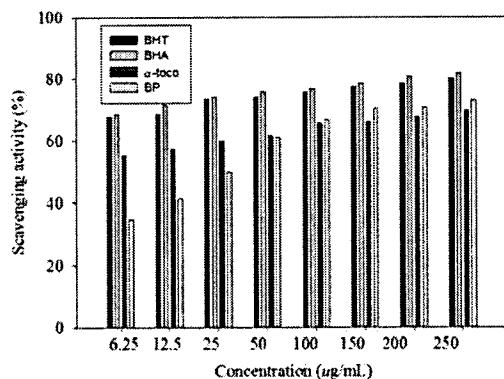
### 三、結果與討論

#### 總多酚當量和總類黃酮當量測定

總類黃酮當量為判定植物萃取物是否含有抗氧化物質的重要指標。使用 Gallic acid 和 Rutin 測定總多酚與總類黃酮的含量，圖二顯示總多酚與總類黃酮的檢量線。實驗結果，大花咸豐草萃取物(BP)的總多酚當量含量為  $79 \pm 0.25$  GAE(mg)/100g；總類黃酮當量為  $24.1 \pm 0.36$  RE(mg)/100g。

#### DPPH 自由基清除測試

DPPH 是一種人造穩定的自由基，DPPH 的清除率與抗氧化能力成正比，所以為物質抗氧化能力評估重要指標之一。實驗時以大花咸豐草萃取物和人工抗氧化劑 BHT、BHA 與 α-tocopherol 比



圖三、大花咸豐草萃取物(BP)與人造抗氧化劑的 DPPH 自由基清除



較它們清除 DPPH 自由基的能力。圖三顯示大花咸豐草萃取物與人造抗氧化劑 DPPH 自由基清除測試結果。由圖可發現隨著萃取物濃度的增加，DPPH 自由基清除率顯著增加( $p < 0.05$ )，萃取物濃度為  $25\mu\text{g/mL}$  自由基的清除率為 50% ( $\text{IC}_{50}=25\mu\text{g/mL}$ )。當萃取物濃度為  $150\mu\text{g/mL}$  時 DPPH 自由基清除率顯著高於  $\alpha$ -tocopherol，但是與 BHT 或 BAT 還是有明顯差距。

#### TEAC 當量測試

ABTS (2,2'Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline sulfonic acid) 和過氧化氫酶與  $\text{H}_2\text{O}_2$  反應會產生  $\text{ABTS}^+$ ，此為一相當穩定的藍色物質，於波長 734 nm 有吸收波峰。吸光值的高低代表抗氧化能力的強弱。

Trolox 是一種人造維他命 E，時常添加在食品中做為抗氧化劑，尤其最常添加在泡麵或乾燥食品內。利用 Trolox 做為 TEAC 當量試驗的標準品做出檢量線，並且換算求得 Trolox 的當量抗氧化能力 (Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC)，此測試方法為食品科學中測定物質抗氧化能力常用的標準做法之一。

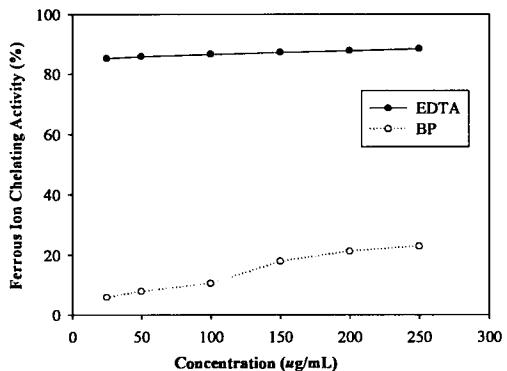
表一為大花咸豐草萃取物 TEAC 的試驗結果，大花咸豐草萃取物的濃度為 250、200、150、100、50 和  $25\mu\text{g/mL}$  時，TEAC 值分別為  $124 \pm 2.64$ 、 $113 \pm 4.94$ 、 $101 \pm 3.94$ 、 $92 \pm 3.77$ 、 $83 \pm 2.69$  和  $74 \pm 2.88$ 。由 TEAC 當量試驗結果，與 DPPH · 清除相符合，由此顯示在大花咸豐草中含有可清除自由基之抗氧化物質，能有效清除自由基以達到抗氧化目的。

表一、大花咸豐草的 TEAC

萃取物濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Trolox equivalent ( $\mu\text{M}$ )
25	$74 \pm 2.88$
50	$83 \pm 2.69$
100	$92 \pm 3.77$
150	$101 \pm 3.94$
200	$113 \pm 4.94$
250	$124 \pm 2.64$

#### 亞鐵離子螯合能力測試

測定亞鐵離子螯合能力所使用的標準品為 EDTA。EDTA 是一種很強的金屬螯合物質，它能提供 2 個氮原子和 4 個羧基氧原子與金屬配合，生成極穩定的產物，在一般人體內會存在一定量的亞鐵離子；它在促進人體氧化功能上扮演一個重要的角色。故在抗氧化模型試驗上；常藉由亞鐵離子螯合能力測試，來評估樣品的抗氧化效力。亞鐵離子螯合測定的結果顯示於圖四。由圖四可發現大花咸豐草的亞鐵離子螯合率大約在 22% 左右，其亞鐵離子螯合能力遠不及 EDTA。從實驗結果發現大花咸豐草雖然具有強的 DPPH · 清除率但是其螯合金屬離子的能力卻不強。

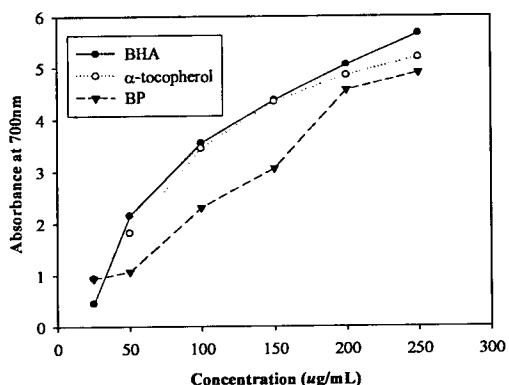


圖四、大花咸豐草萃取物(BP)的亞鐵離子螯合能力測定

#### 還原力測定

在還原力測定上，主要為測試樣品中是否具有供給電子之能力，能將  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  還原成  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ ，再利用形成之  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  與  $\text{FeCl}_3$  錯合形成  $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$  深藍色複合物，稱普魯士藍，它在 700 nm 具有強的吸收峰，吸光值愈高表示樣品中所含之還原物質愈多，還原力愈強。圖五是大花咸豐草萃取物還原力測試結果，由圖可知還原力隨萃取物濃度成正比例增加，從結果來看，大花咸豐草萃取物有提供電子的能力，但其能力不及 BHA 和  $\alpha$ -tocopherol。

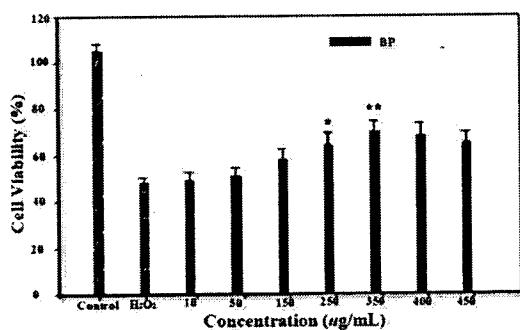




圖五、大花咸豐草萃取物(BP)的還原力測定

### 細胞內抗氧化試驗

$H_2O_2$ 具有很強的氧化性，化學性質不穩定。細胞內抗氧化測試主要探討大花咸豐草萃取物保護正常細胞免於受到  $H_2O_2$  傷害的能力。圖六是大花咸豐草萃取物對於  $H_2O_2$  之傷害的保護結果，由圖可發現在萃取物濃度在 250 $\mu g/mL$  以上時，對  $H_2O_2$  的傷害有顯著保護作用( $p < 0.05$ )，當濃度為 350 $\mu g/ml$  時對於 Clone 9 細胞有最大的保護效果，其存活率約可提升至 70%，約為  $H_2O_2$  傷害對照組的 1.4 倍。

圖六、大花咸豐草萃取物(BP)對於細胞防護  $H_2O_2$  傷害之能力 (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

### 一氧化氮分析

在免疫系統中巨噬細胞能吞噬細菌，如果巨噬細胞無法完全吃掉細菌，它會誘發產生一氧化氮(NO)而抑制細菌的代謝作用，使細菌無法生長，這是 NO 防禦功能的一個途徑。NO 另外一個防禦方式就是 NO 與超氧自由基在酸性水溶液中會作用形

成過氧化亞硝酸陰離子(ONOO<sup>-</sup>)，它會分解形成氫氧化自由基(·OH)與二氧化氮(NO<sub>2</sub>)，此二種物質對細菌而言都是具有毒性，可直接殺死細菌。NO 與超氧自由基的化學反應式如下：

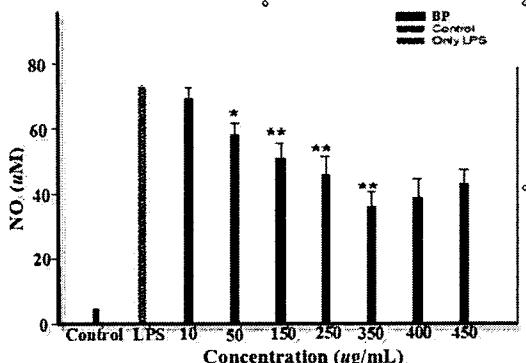


一氧化氮自由基( NO · )是一個半衰期約為 3 秒到 50 秒不穩定的自由基。因此，很快的被氧化成硝酸鹽 ( Nitrate; NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)及亞硝酸鹽 ( Nitrite; NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)。

一氧化氮由於分子小且未帶電性(uncharged)，所以能藉著 paracrine 或 autocrine 的方式快速的通過細胞膜進入細胞中。一氧化氮是體內 L-arginine 在 NADPH 提供還原力和 O<sub>2</sub> 的輔助下，經一氧化氮合成酶( nitric oxide synthase; NOS) 催化而生成。一氧化氮可在許多細胞產生，包括：巨噬細胞、血管內皮細胞、平滑肌細胞等[12][13]。少量的一氧化氮可以維持正常生理功能：過多則會導致一些慢性發炎疾病，目前已證實的有類風濕性關節炎、敗血性休克、中風、高血壓等疾病的發生[14]。脂多醣( Lipopolysaccharide; LPS)由含有一個親水性的多醣( polysaccharide) 及厭水性的 lipid A 以共價結合而成，為格蘭氏陰性菌細胞壁成份的混合物。脂多醣是一種強烈的先天性免疫反應刺激因子，當巨噬細胞受刺激後會開始吞噬外來物，增加毒殺細菌作用，但過度表現對宿主體內亦造成明顯的生理變化，包括發炎、水腫、以及敗血性休克[15]。

本實驗是利用 LPS 刺激 Raw 264.7 細胞，探討大花咸豐草萃取物對 NO · 產生的抑制作用，以評估其抗發炎之功效。由圖七可發現大花咸豐草萃取物對於 NO · 的產生抑制的效果，當其濃度為 50 $\mu g/mL$  時有顯著的抑制效果( $p < 0.05$ )，而濃度 350 $\mu g/mL$  的抑制效果最佳，NO · 的產生量約為 38 $\mu M$ ，隨著濃度增加對 NO · 的抑制並無統計上的意義。至於濃度大於 350 $\mu g/mL$  後其清除率降低的結果與保護細胞不受  $H_2O_2$  傷害的結果相符(如圖六)當濃度大於 350 $\mu g/mL$  細胞存活率反而下降的趨勢，而產生此種現象的原因可能需要進一步探討。

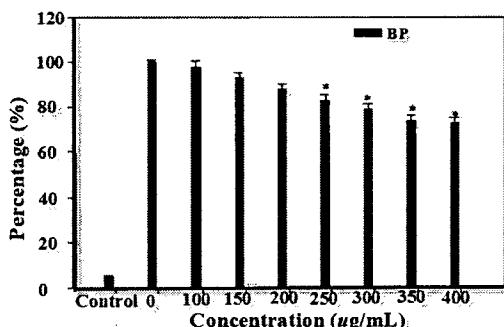




圖七、不同濃度大花咸豐草萃取物(BP)抑制 LPS 誘 Raw264.7 生成一氧化氮自由基的表現

#### NBT assay

硝基藍四氮( NBT) 還原測試常用來評估單核球( monocyte) 發炎感染時的指標。NBT的化學式為 $C_{40}H_{30}C_{12}N_{10}O_6$ ，分子量817.64。單核球( monocyte) 受感染或發炎時會吞噬微生物，導致細胞內的酵素活性大量增加，促使葡萄糖-6-磷酸( glucose-6-phosphate) 大量被細胞質中的超氧化陰離子( superoxide anion) 氧化，細胞內的NADPH會將NBT吞噬形成紫色結晶，透過紫色結晶多寡當作分化指標。圖八是大花咸豐草萃取物抑制THP-1細胞分化的結果。由圖中發現在沒有PMA刺激的情況下，THP-1分化並不明顯。當使用PMA刺激，但是不加大花咸豐草萃取物的THP-1，其分化比例為100%。從PMA刺激且加入BP的實驗組中發現，使用大花咸豐草萃取物濃度越高，抑制THP-1效果越佳，當濃度大於200μg/mL時有顯著的統計意義( $p < 0.05$ )，當濃度達400μg/mL其抑制分化的能力達到最高，其抑制分化的能力約有25%。



圖八、不同濃度大花咸豐草萃取物(BP)抑制 THP-1 細胞分化的表現(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

傳統萃取大花咸豐草是使用甲醇、乙醇和丙酮...等有機溶劑，不但費時而且要耗費大量的有機溶劑較不符合環保效益。本文中使用超臨界二氧化碳萃取大花咸豐草之有效成份有三個特點：

- (1) 不使用有機溶劑，但萃取物效果相同：超臨界二氧化碳萃取物以細胞內抗氧化、細胞外抗氧化有機溶劑萃取物具有同樣的作用能力，但是減少大量有機溶劑的消耗。
- (2) 效率高，產量多：超臨界二氧化碳萃取，以萃取時間 30 分鐘萃取大花咸豐草得到含量頗多的類黃酮，此為有機溶劑萃取無法相比的優勢。
- (3) 廢物利用增加效益：大花咸豐草為路邊隨處可見的野草，一年四季皆可採摘來源成本低。

#### 四、參考文獻

1. Lin, CC, Crude drugs used for the treatment of diabetes mellitus in Taiwan. *Am J Chin Med* 1992;20:269–279.
2. Zamora-Martinez, MC, de Pascual Pola, CN, Medicinal plants used in some rural populations of Oaxaca, Puebla and Veracruz. *J Ethnopharmacol* 1992;35:229–257.
3. Winkelman, M, Ethnobotanical treatments of diabetes in Baja California Norte. *Med Anthropol* 1989;11:255–268.
4. Dimo, T., Rakotonirina, S.V., Tan, P.V., Azay, J., Dongo, E., Cros, G., 2002. Leaf methanol extract of *Bidens pilosa* prevents and attenuates the hypertension induced by high-fructose diet in Wistar rats. *J Ethnopharmacol* 83, 183–191.
5. Alvarez, A, Pomar, F, Sevilla, MA, Montero, MJ, Gastric antisecretory and antiulcer activities of an ethanolic extract of *Bidens pilosa* L. var. radiata Schult. Bip. *J Ethnopharmacol* 1999;67, 333–340.



6. Rabe, T, van Staden, J, Antibacterial activity of South African plants used for medicinal purposes. *J Ethnopharmacol* 1997;56:81–87.
7. Chiang, YM, Chuang, DY, Wang, SY, Kuo, YH, Tsai, PW, Shyur, LF, Metabolite profiling and chemopreventive bioactivity of plant extracts from *Bidens pilosa*. *J Ethnopharmacol* 2004;95:409–419.
8. Chang, JS, Chiang, LC, Chen, CC, Liu, LT, Wang, KC, Lin, CC, Antileukemic activity of *Bidens pilosa* L. var. minor (Blume) Sherff and *Houttuynia cordata* Thunb. *Am J Chin Med* 2001;29: 303–312.
9. Chiang, YM, Lo, CP, Chen, YP, Wang, SY, Yang, NS, Kuo, YH, Shyur, LF, Ethyl caffeoate suppresses NF- $\kappa$ B activation and its downstream inflammatory mediators, iNOS, COX-2, and PGE2 in vitro or in mouse skin. *Brit J Pharmacol* 2005;146:352–363.
10. Yang, HL, Chen, SC, Chang, NW, Chang, JM, Lee, ML, Tsai, PC, Fu, HH, Kao, WW, Chiang, HC, Wang, HH, Hseu, YC, Protection from oxidative damage using *Bidens pilosa* extracts in normal human erythrocytes. *Food Chem Toxicol* 2006;44:1513–1521
11. Chiang, YM, Chang, CLT, Chang, SL, Yang, WC, Shyur, LF, Cytopiloyne, a novel polyacetylenic glucoside from *Bidens pilosa*, functions as a T helper cell modulator. *J Ethnopharmacol* 2007;110: 532–538
12. Ulmer M, Rautmann A and Gross WL. Immunodiagnostic aspects of autoantibodies against myeloperoxidase. *Clin Nephrol* 1992; 37; 161-168.
13. Stuehr, D J and Marletta MA. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc Nat Acad* 1985; 82; 7738-42.
14. Patrick CI, Amera M, Ahmada HB, Sidney F, Yinglei L, Liliana F, Nachiket D, Todd K, Prachee K. and Timothy A. A database for annotation and comparison of published microarray gene lists. *Gene*; 2005; 360; 78-82
15. Schultz DR. and Harrington WJ Jr. Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. *Semin Arthritis Rheum* 2003;32:345-69



## A Study of the Antioxidant and Anti-Inflammatory Potential of Supercritical Carbon Dioxide Extract of *Bidens pilosa*

Shin-Liang Chen<sup>1</sup>, Yung-Rong Lin<sup>2</sup>, Rong-Min Wang<sup>2</sup>, Pei-Hsuan Chou<sup>2</sup>, Mei-Hui Chen<sup>2</sup>,  
Min-Feng Huang<sup>2</sup>, Chang-Tsen Hung<sup>3</sup>, Rong-Tzong Lin<sup>4</sup>, Wen-Jye Lin<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Department of Radiology, Taipei Medical University Shuang Ho Hospital, Taipei City, Taiwan, ROC

<sup>2</sup>Department of Nursing, Yuanpei University, Hsinchu City, Taiwan, ROC

<sup>3</sup>Graduate Institute of Integrated Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, China

<sup>4</sup>Department of Radiology, Taipei Hospital, RenAi Branch, Taipei City, Taiwan, ROC

<sup>5</sup>Department of Optometry, Yuanpei University, Hsinchu City, Taiwan, ROC

### Abstract

*Bidens pilosa* are Asteraceae perennial plant found widely throughout Taiwan. It is used as a folk medicine for the treatment of bronchitis, pneumonia, pharyngitis, dysentery, and the ingestion of poisons, on the basis of its antifebrile, antidotal, and analgesic effects. Supercritical Carbon Dioxide Extraction was used to obtain effective extracts from *Bidens pilosa* (BP). The total phenolic content, total flavonoid content 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity, Trolox equivalent anti-oxidizing capacity (TEAC) assay, ferrous ion chelating and reducing power were used to evaluate the overall antioxidative ability of the extracts. Nitric oxide and nitro blue tetrazolium (NBT) assays were used to evaluate the anti-inflammatory properties. The results revealed that BP has a total phenolic content of  $79 \pm 0.25$  gallic acid equivalents (GAEs) mg/100g, total flavonoid content of  $24.1 \pm 0.36$  rutin equivalents (RE) mg/100g, DPPH· radical scavenging activity of 50% ( $IC_{50}$ ) was 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , and an antioxidant activity of  $74 \pm 2.88$   $\mu\text{M}$  Trolox equivalents. BP at a concentration of 350  $\mu\text{g}/\text{mL}$  could prevent oxidative stress, induced by hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), and inhibit 25% of Phorbol esters (PMA) induced THP-1 monocyte differentiation.

**Keywords:** *Bidens pilosa*, Supercritical Carbon Dioxide Extraction, antioxidant, anti-inflammatory

