

中國醫藥大學 藥學院
藥學系碩士班 碩士論文

蛇床子素之超臨界抽提及其奈米膠漿製備

**Extraction of Osthole by Supercritical Fluid
Method and Preparation of Its Nanoemulsion**

指導教授：余建志 教授

研究生：張釗愷

Chao-Kai Chang

中 華 民 國 100 年 7 月

中文摘要

本研究目的在於評估以超臨界流體(Super critical Fluid, SCF)抽提中藥材蛇床子果實中的蛇床子素(Osthole)，評估各種超臨界抽提變因，並予以最佳化。本研究以二氧化碳作為超臨界流體，評估五種超臨界流體變因分別是夾帶劑、抽提次數、壓力、靜態抽提時間與溫度。以高效率液相層析儀測定抽提效率，固定相為 RP-C18 管柱，移動相為甲醇:水=7:3，發光二列陣檢測器，最大吸光波長 323 nm。最佳化條件為：抽取 5 公克蛇床子藥材時加甲醇 5 mL 為夾帶劑，萃取管溫度為攝氏 100 °C，抽提壓力設為 0.5 Mpa，靜態抽提時間 120 分鐘，動態抽提時間 20 分鐘，反覆以超臨界流體抽提 5 次；蛇床子素奈米膠漿製備，以卡波姆 940 的膠體 0.25% 的濃度，含有蛇床子素 0.04%，可使奈米化的蛇床子素維持在奈米等級粒徑的時間較長且不易析出。

Abstract

This study's purpose is to estimate using supercritical fluid for extracting Osthole from *Cnidium monnieri*, compare all those extraction factors and to optimize extraction factors. Use carbon dioxide as a supercritical fluid and estimate five extraction factors as co-solvent, number of extraction, pressure, static extraction time and temperature. Used high performance liquid chromatography to detect extraction effect, static phase is RP-C18 column and mobile phase MeOH: water=7:3, photo diode array detector set by max absorption wavelength 323 nm. Optimize Result: 5 g herb adds 5 mL MeOH as co-solvent, extraction cube temperature 100°C, extraction pressure 0.5 MPa, extraction time 2 hrs, repeat for 5 times of extraction. Preparation of Osthole nanoemulsion is using 0.25% Carbomer 940 and contain 0.04% Osthole, this condition can maintain nanofabrication's Osthole in nano level's particle size for longer time and not easy to dissolve out.

論文目次

中文摘要	1
英文摘要	2
本文	3
圖目錄	8
表目錄	11
壹、前言	12
一、研究背景	12
二、研究目的	13
三、蛇床子及蛇床子素介紹	14
(一)、蛇床子	14
(二)、蛇床子素	15
(三)、蛇床子素的近期研究	16
四、超臨界流體抽提	17
(一)、超臨界流體	17
(二)、超臨界二氧化碳	18
(三)、夾帶劑	19
(四)、超臨界抽提的變因	19

(五)、超臨界設備簡介	19
五、蛇床子素奈米膠漿	22
(一)、聚維酮(Polyvinylpyrrolidone K-30 ; PVP)	22
(二)、果膠(Pectin)	23
(三)、甲基纖維素(Methyl Cellulose ; MC)	23
(四)、羧甲基纖維素鈉(Carboxymethyl Cellulose Sodium ; CMC)	24
(五)、結蘭膠(Gellan Gum)	25
(六)、卡波姆(Carbomer 940 ; Carbopol)	25
貳、研究方法	27
一、研究設計	27
二、研究材料	28
(一)、實驗材料	28
1、溶媒及試藥	28
2、標準品	29
(二)、藥材	29
(三)、儀器	29
1、超臨界抽提裝置	29
2、氣相層析儀	29
3、高效液相層析儀	30

4、雷射奈米粒徑及 Zeta電位量測儀	30
三、實驗方法	31
(一)、抽提力比較	31
1、檢品製備	31
2、分析條件	31
(二)、超臨界二氧化碳流體抽提	32
1、抽提步驟	32
(三)、超臨界抽提的變因	33
1、對照組條件	33
2、控制組條件	33
(四)、高效液相層析分析超臨界抽提效果	34
1、蛇床子素標準品製備	34
2、超臨界抽提之檢品製備	35
3、分析條件	35
4、蛇床子素檢量線	35
(五)、蛇床子素奈米膠漿的製備	35
1、蛇床子素酒精溶液	35
2、膠體水溶液	36
3、蛇床子素奈米膠漿製備	37

4、奈米膠漿的粒徑測定	37
叁、結果與討論	38
一、溶媒抽提效應的影響	38
二、蛇床子素檢量線	39
三、抽提次數的影響	40
四、夾帶劑的影響	42
五、壓力的影響	43
六、時間的影響	44
七、溫度的影響	45
八、蛇床子素奈米膠漿	46
(一)、空白對照組	46
(二)、聚維酮蛇床子素奈米膠漿	48
(三)、果膠蛇床子素奈米膠漿	51
(四)、甲基纖維素蛇床子素奈米膠漿	51
(五)、羧甲基纖維素鈉蛇床子素奈米膠漿	54
(六)、結蘭膠蛇床子素奈米膠漿	56
(七)、卡波姆940蛇床子素奈米膠漿	60
(八)、蛇床子素奈米膠漿的製備	63
肆、結論	65



圖目錄

圖一、蛇床子藥材	15
圖二、蛇床子素結構圖	16
圖三、二氧化碳超臨界流體相圖	17
圖四、超臨界流體儀器簡圖	20
圖五、超臨界流體儀器圖	21
圖六、聚維酮結構式	22
圖七、果膠結構式	23
圖八、甲基纖維素結構式	24
圖九、羧甲基纖維素鈉結構式	24
圖十、結蘭膠結構式	25
圖十一、卡波姆結構式	26
圖十二、溶媒對蛇床子素抽提效果之影響	38
圖十三、蛇床子素檢量線	39
圖十四、超臨界流體連續抽提次數的影響	40
圖十五、比較兩種夾帶劑對超臨界流體抽提的影響	42
圖十六、比較五種壓力對超臨界流體抽提的影響	43
圖十七、比較六種靜態抽提時間對超臨界流體抽提的影響	44
圖十八、比較七種溫度對超臨界流體抽提的影響	45

圖十九、空白組結晶析出的情形	46
圖二十、蛇床子素奈米膠漿粒徑測定結果	47
圖二十一、蛇床子素奈米膠漿粒徑測定結果	47
圖二十二、蛇床子素奈米膠漿粒徑測定結果	48
圖二十三、聚維酮蛇床子素奈米膠漿靜置析出情形	49
圖二十四、聚維酮蛇床子素奈米膠漿粒徑測定結果	49
圖二十五、聚維酮蛇床子素奈米膠漿粒徑測定結果	50
圖二十六、聚維酮蛇床子素奈米膠漿粒徑測定結果	50
圖二十七、蛇床子素於果膠表面析出情形	51
圖二十八、甲基纖維素蛇床子素奈米膠漿粒徑測定結果	52
圖二十九、甲基纖維素蛇床子素奈米膠漿粒徑測定結果	53
圖三十、甲基纖維素蛇床子素奈米膠漿粒徑測定結果	53
圖三十一、羧甲基纖維素鈉蛇床子素奈米膠漿粒徑測定	54
圖三十二、羧甲基纖維素鈉蛇床子素奈米膠漿粒徑測定	55
圖三十三、羧甲基纖維素鈉蛇床子素奈米膠漿粒徑測定	55
圖三十四、結蘭膠0.75%蛇床子素奈米膠漿粒徑測定結果	56
圖三十五、結蘭膠0.75%蛇床子素奈米膠漿粒徑測定結果	57
圖三十六、結蘭膠0.75%蛇床子素奈米膠漿粒徑測定結果	57
圖三十七、結蘭膠0.75%蛇床子素奈米膠漿靜置後析出的狀況	58

圖三十八、結蘭膠1.5%蛇床子素奈米膠漿粒徑測定結果	58
圖三十九、結蘭膠1.5%蛇床子素奈米膠漿粒徑測定結果	59
圖四十、結蘭膠1.5%蛇床子素奈米膠漿粒徑測定結果	59
圖四十一、卡波姆940蛇床子素奈米膠漿粒徑測定結果	60
圖四十二、卡波姆940蛇床子素奈米膠漿粒徑測定結果	61
圖四十三、卡波姆940蛇床子素奈米膠漿粒徑測定結果	61
圖四十四、卡波姆940蛇床子素奈米膠漿24小時後粒徑測定結果	62
圖四十五、卡波姆940蛇床子素奈米膠漿24小時後粒徑測定結果	62
圖四十六、卡波姆940蛇床子素奈米膠漿24小時後粒徑測定結果	63



表目錄

表一、蛇床子素超臨界抽提次數累進抽提率資料	41
表二、空白組以及各膠漿測得平均粒徑大小	64



壹、前言

一、研究背景

2005 年中醫藥研究新知學術研討會中，中草藥對陽痿作用之影響一文中，邱文慧教授已經證實蛇床子素對陰莖海綿體有舒張的作用，並且確立了作用的機轉，蛇床子素具有開發成壯陽藥物的潛力。目前蛇床子素價格昂貴，仍需利用傳統的管柱層析法來分離純化，此法耗時，溶媒消耗多等缺點，所以在大量生產上的產能無法突破，導致成本偏高，且無法支應未來相關的研究；毛細管電泳分離¹和使用界面活性劑²等非傳統的方式都曾被用來嘗試進行抽提，但要達到大量分離純化，仍然有改善空間；利用減壓蒸餾法分離蛇床子素已被證實為可行並已被實施，該法施行中最大的問題在於如何由藥材中快速抽出大量蛇床子素，較之於傳統的溶媒抽提法，超臨界抽提應可以扮演取代的角色，快速而大量的供應蛇床子素之粗萃物，供減壓蒸餾法後續量產滿足蛇床子素之兼具質量的產出。另一方面，因為蛇床子素對水的溶解度不佳，難以被生體所利用，所以也嘗試採用奈米化的方式，將蛇床子素變成奈米膠漿製劑，提高其溶解度。

二、研究目的

本研究採用超臨界流體(Supercritical Fluid)設備，使用二氧化碳流體，直接從蛇床子藥材中抽提其中的蛇床子素，並利用各種變因的調控和抽提效果的檢測，篩選出最佳的抽提條件；另外，製備蛇床子素奈米膠漿並偵測粒徑，比較各種膠漿的優缺點。



三、蛇床子及蛇床子素介紹

(一)、蛇床子

蛇床子為繖形科一年生草本植物蛇床子 *Cnidium monnieri* (L.) Cuss. 的成熟果實(圖一)。

蛇床子始載於神農本草經³，位列上品，記載如下「味苦，平。主治婦人陰中腫痛，男子陽痿濕癢，除痹氣，利關節，治癩癧，惡瘡。久服輕身。一名蛇粟，一名蛇米。生臨淄川澤。」，以現代的說法即具有壯陽補腎，祛風燥熱，消炎收斂的功效。

中醫藥委員會網站⁴中蛇床子藥材的介紹「蛇床子來源分布中國大陸大部分地區，含有當歸酸酯(Columbianadin)、蛇床明素(Edultin)、佛手柑內酯(Columbianetin)、異虎耳草素(Isopimpinellin)及蛇床子素(Osthole)等等成分」。

蛇床子的藥材性狀「蛇床子果實呈橢圓形，二分果合成，長約2毫米，寬1-1.5毫米，表面灰褐或灰黃色，具小果柄，頂端二枚向外彎曲宿存花柱。分果半圓形，脊部隆起，突出脊線五條。分果接觸面平坦，有二條棕色稍突起縱線，中間有心皮柄附著，果皮鬆脆。種子細小，灰棕色，有油性。氣香，味辛涼微麻舌感。」⁴



圖一、蛇床子藥材。

(二)、蛇床子素

1. 蛇床子素⁵

英文名:Osthole

化學名:7-Methoxy-8-(3-methyl-2-butenyl)-2H-1-benzopyran-2-one;

7-Methoxy-8-(3-methyl-2-butenyl) coumarin (圖二)

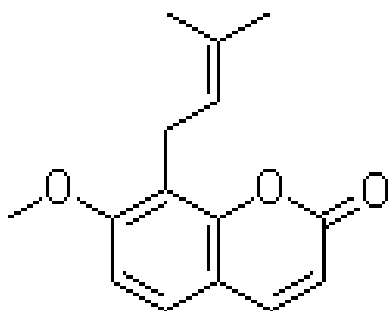
分子式: $C_{15}H_{16}O_3$

分子量:244.29

熔點:83°C~84°C

溶解度:溶於甲醇、乙醇、氯仿、丙酮、乙酸乙酯、和沸騰石油醚。

不溶於水。



圖二、蛇床子素結構圖。

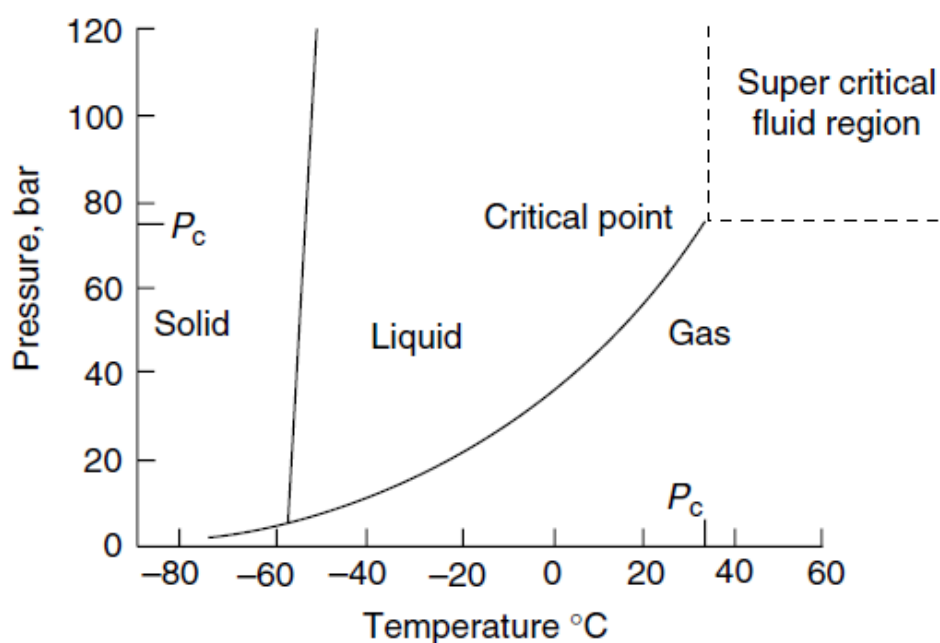
(三)、蛇床子素的近期研究

蛇床子素相關的研究，朝向許多方向，例如抗癌方面，在抗乳癌活性上，發現有抑制 HER-2 過度表現型乳癌細胞的脂肪酸合成路徑⁶，以及其衍生物展現出良好的抑制乳癌細胞株活性的能力⁷；而治療肝臟發炎方面，有抗肝細胞纖維化的活性⁸，另外發現對酒精誘導脂肪肝的小鼠有抑制作用⁹，而對肝臟 PPAR- α 媒介的脂肪合成作用有調節的現象¹⁰；另外一個較多研究的部分就是，抗骨質疏鬆的相關活性研究，比如有助於刺激成骨細胞的分化^{11.12.13}和骨頭合成這兩個方面；還有抗發炎的方面，主要是針對發炎介質的抑制作用^{14.15}和具有抗過敏活性¹⁶；其它方面還有抗腦部缺血^{17.18}、抗寄生蟲¹⁹以及抗黴菌²⁰的活性，都有被發現。

四、超臨界流體抽提

(一)、超臨界流體

物質有原本就存在氣、固及液態三種狀態，當物質所處的溫度和壓力發生變化，這三種狀態就會互相轉化。



! Carbon dioxide phase diagram.

圖三、二氧化碳超臨界流體相圖²¹。

以二氧化碳為例，從三相圖可以知道，固體隨著溫度上升，變成液體，再變成氣體；反之溫度下降，氣體會回復成液體或固體的狀態。

但是當圖中的溫度和壓力，達到臨界點(Critical point)時，也就是液態跟氣態中間的狀態，此時的壓力稱為臨界壓力，溫度稱為臨界溫

度，此點之後的區域稱為超臨界流體，而非液態或氣態。

超臨界流體區域中，該狀態下的物質呈現出的特殊的型態，密度會接近物質為液體時的密度，流體密度是可以調整的，調整的方式也是藉由溫度和壓力的變化來調整，在此同時，類似液體的流體卻又具有氣體的性質，也就是擴散性質；這個狀態下，液氣兩相間的界面也會消失，表面張力為零，反應速率最大，熱容量，熱傳導率等物性出現巨大變化。物質如要出現超臨界的狀態，則需要該物質不會在超臨界條件下分解而保持穩定。

(二)、超臨界二氧化碳

超臨界二氧化碳的臨界條件是攝氏 31.7°C 和壓力 71.8 大氣壓，作為一種新型溶劑，超臨界二氧化碳得到工業和學術研究上的廣泛應用，因為二氧化碳無毒，還有一旦脫離條件後就會回復成氣體，也沒有殘留上的問題，且相較其他常用流體，壓力跟溫度較易於達成。

但是超臨界二氧化碳流體對不同物質的溶解能力差別很大，這與物質的極性、沸點和相對分子量有非常密切的關係，對於親脂性、低沸點成分抽提較容易，相對來說，極性較高的物質則抽提困難或者是無法抽提，這類極性上造成的抽提問題可以藉由添加夾帶劑改善。

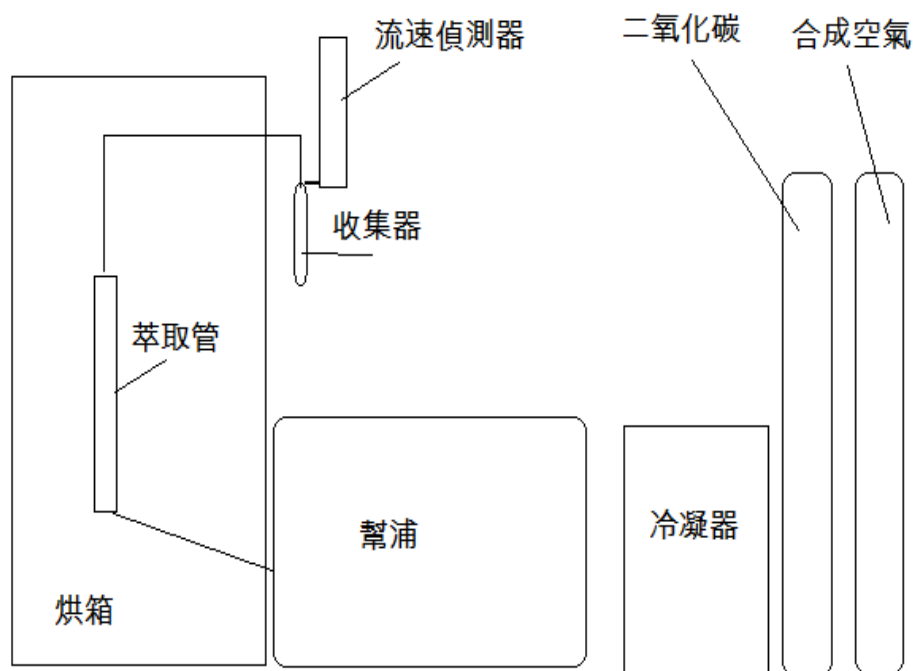
(三)、夾帶劑

極性較高的化合物，單純使用二氧化碳流體來抽提效果並不佳，添加一些極性較高或者是對目標化合物親和力較高的溶媒幫助抽提，可提高對目標化合物的抽提效果²²，如甲醇、乙醇等。

(四)、超臨界抽提的變因

影響抽提化合物效果的主因除了夾帶劑還有壓力以及溫度，影響原因是因為會改變流體的密度；另外，實驗時會有時間因素的影響，流體和藥材在萃取管內混合的時間稱為靜態混合時間，而抽提完成的抽提物從管路流出的時間稱為動態抽提時間，主要影響的因素是靜態抽提時間；其他還有重複抽提的次數，也會影響抽提的效果。

(五)、超臨界設備簡介



圖四、超臨界流體儀器簡圖。

儀器會用到二氧化碳跟合成空氣兩種壓縮氣體，整個超臨界抽提系統的壓力來自於合成空氣的壓力，換算比率是合成空氣：二氧化碳 = 1：1.2，所以可以藉由合成空氣壓力去調整系統壓力；而冷凝器的作用，是用於使更多二氧化碳氣體可以進入管路，因為管路溫度越低，氣體體積越小；幫浦的部分，主要功能是調整系統壓力，來調控實驗變因；而左邊烘箱的部分，則是控制抽提溫度的地方，因為萃取管就放置其中，氣體會從下方管路進入萃取管，待實驗結束再由上方管路進入收集管中；收集管有連接出口流速計，讓回復成氣體狀態的二氧化碳排出，收集管端的溫度必須高於烘箱溫度 100 °C 以上，因二氧化碳回復成氣體時會大

量吸熱膨脹，如果沒有提供更多熱能，可能會造成收集管爆裂或者是噴
飛造成危險。



圖五、超臨界流體儀器圖。

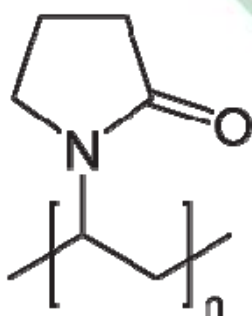
五、蛇床子素奈米膠漿

蛇床子素不溶於水中，因此藉由奈米化的方式，均勻分散到水溶液內，並添加增稠劑使其形成膠體狀態，維持蛇床子素一定程度的粒徑，形成奈米膠漿。

蛇床子素以酒精溶解之後，添加到大量且快速攪拌的水中，即可以呈現白色霧狀的乳化情形；如果此時水中含有適量的增稠劑，可以幫助防止蛇床子素於水溶液中快速凝絮析出。

以下介紹本實驗所使用的增稠劑^{23、24}：

(一)、聚維酮(Polyvinylpyrrolidone K-30；PVP)

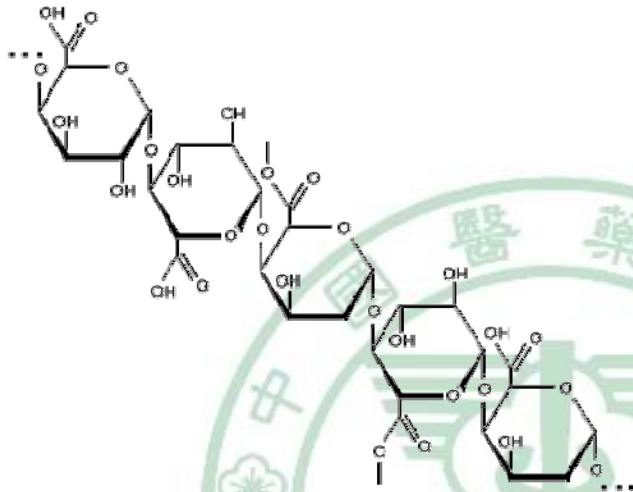


圖六、聚維酮結構式。

本品為白色至乳白色的粉末，無臭或者是稍有特殊臭味，具有吸濕性。在水、乙醇、異丙醇或氯仿中溶解，不溶於丙酮或乙醚。K-30 的平均相對分子量為 38000。

用途主要有黏合、增稠、助懸、分散等。

(二)、果膠(Pectin)

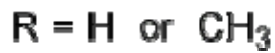
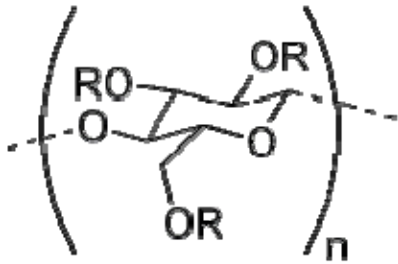


圖七、果膠結構式。

本品為白色帶黃色或淺灰色粉末。幾乎沒有臭味，口感黏滑。可溶於 20 倍水，形成乳白色黏稠狀膠體溶液，呈弱酸性。耐熱性強，且幾乎不溶解於乙醇以及其他有機溶劑；溶解時可以使用乙醇、甘油或者是砂糖糖漿潤濕。

主要用途為增稠劑、乳化穩定劑、凝膠劑以及微膠囊等。

(三)、甲基纖維素(Methyl Cellulose ; MC)

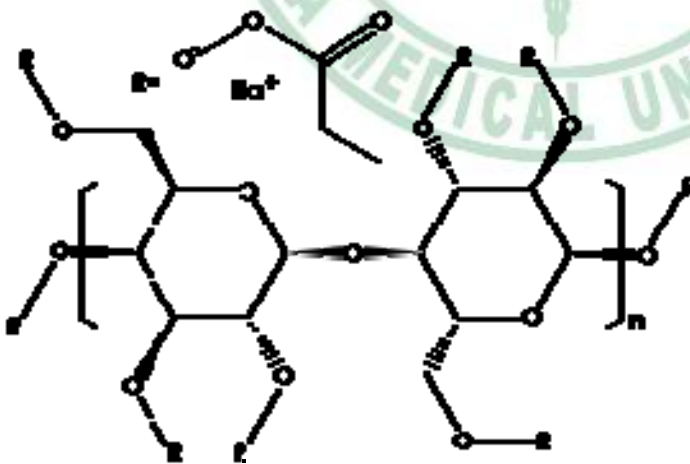


圖八、甲基纖維素結構式。

本品為白色或類白色纖維狀顆粒狀粉末，無臭無味。在水中會膨脹成澄清或稍為混濁的膠體溶液，在無水乙醇、氯仿及乙醚中不溶。

主要用途為黏合劑、凝膠劑和助懸劑等。

(四)、羧甲基纖維素鈉(Carboxymethyl Cellulose Sodium ; CMC)



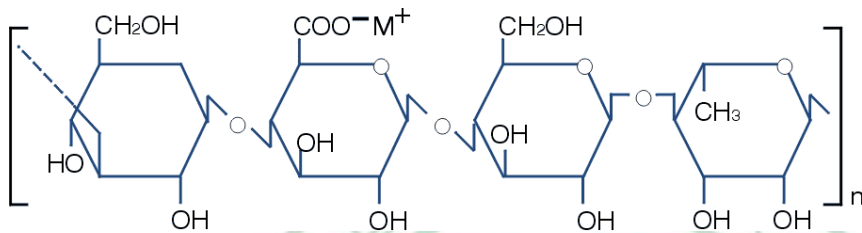
圖九、羧甲基纖維素鈉結構式。

植物纖維素羧甲基化之後，再轉化成鹽類。本品為白色到乳白色粉末或者顆粒，幾乎無臭無味，具有吸濕性，容易分散在水中形成澄清膠

狀液體；在乙醇、乙醚或者大多數有機溶劑中不溶。

主要用途有黏合、助懸、增稠、乳化以及緩釋等。

(五)、結蘭膠(Gellan Gum)

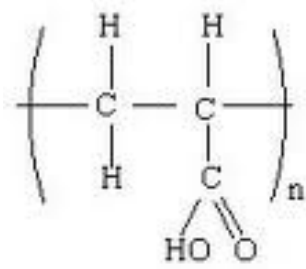


圖十、結蘭膠結構式。

結蘭膠是由一群現稱為 *Sphingonas paucimobilis* 所產生，為一商品化之微生物所生產之多醣。天然形式的結蘭膠於 500kDa 之四糖重複單位之直鏈聚合物上帶有 *O*-乙醯基及甘油基。結蘭膠會形成熱可逆的膠狀物，當濃度為 0.75% 時即可提供高強度的膠狀物。

主要用作食品級的膠凝劑、安定劑及助懸劑，用於乳製品、沙拉醬汁及果汁中。

(六)、卡波姆(Carbomer 940 ; Carbopol)



圖十一、卡波姆結構式。

本品為白色疏鬆粉末，940 的平均分子量約為 6 萬；有特徵性微臭，有吸濕性。0.1 g 均勻分散於 20 mL 水中，加入 10% NaOH 0.4 mL，即成凝膠狀。

作為乳化劑、軟膏基劑或黏合劑等。



貳、研究方法

一、研究設計

研究中，對於超臨界二氧化碳抽提藥材的各種分析變因²³，針對本研究中超臨界流體抽提蛇床子素的方面，來設定各種變因，進行抽提效果比較。

夾帶劑的部分，蛇床子素的測定中，使用氣相層析來進行測定²⁴，故選用甲醇、乙醇、氟甲烷、乙酸乙酯、氯仿、正己烷以及丙酮進行抽提能力比較，採冷浸靜置後，定量進行氣相層析的分析。

超臨界流體抽提的變因方面，以抽提次數、溫度、壓力、靜態抽提時間以及從氣相層析結果選出的夾帶劑，個別進行抽提效果比較；先以超臨界流體抽提之後，檢品經過過濾定量，以高效液相層析儀²⁵。

奈米膠漿部分，製備完成之後，以雷射奈米粒徑及 Zeta 電位量測儀，測量粒徑。

二、研究材料

(一)、實驗材料

1、溶媒及試藥

甲醇，Mallinkrodt，美國。

乙醇，公賣局，台灣。

正己烷，ALPS，新竹。

乙酸乙酯，J. T. Baker，美國。

氯仿，Mallinkrodt，美國。

氟甲烷，J. T. Baker，美國。

丙酮，Mallinkrodt，美國。

結蘭膠，sigma，德國。

果膠，sigma，德國。

卡波姆 940，第一化工，台灣台北。

甲基纖維素，和光純藥工業株式會社，日本。

羧甲基纖維素鈉，sigma，德國。

聚維酮 K-30，惠民製藥股份有限公司，台灣台北。



2、標準品

蛇床子素標準品，Wako 米山，日本。

(二)、藥材

蛇床子藥材，杏豪藥材貿易有限公司，高雄。

(三)、儀器

1、超臨界抽提裝置

合成空氣，高雄精上氣體。

二氧化碳，高雄精上氣體。

冷凝器，DENG YNG D-606，台灣。

超臨界抽提裝置，Spe-ed SFE Applied Separations (烘箱、幫浦、萃

取管、收集管、聚丙烯棉)，美國。

2、氣相層析儀



氣相層析儀(管柱烘箱 GC-2014AF、自動注射器 AOC-20i)，SHIMADUZ，日本。

玻璃管柱，填充物 10% PEG 20M chromosorb 80~100 mesh，日本。

3、高效液相層析儀

管柱，Merck 50734 Lichrospher RP-18 4 mm x 12.5 cm endcapped，德國。

超微濾系統，Milli-Q water purification system (Millipore)，美國。

高效液相層析儀(幫浦 LC-10ATvp、管柱烘箱 CTO-10ASvp、自動注射器 SIL-10ADvp、系統控制器 SCL-10Avp、偵測器 SPD-M10Avp)，SHIMADZU，日本。

4、雷射奈米粒徑及 Zeta 電位量測儀

雷射奈米粒徑及 Zeta 電位量測儀，Malvern，英國。

透明試管，PLASTIBRAND，德國。

攪拌石，Spinbar，美國。

三、實驗方法

(一)、抽提力比較

利用氣相層析比較夾帶劑的抽提效果；標準品配置是取標準品 1 mg，以甲醇溶解定量至 1 mL，用來確定蛇床子素的訊號出現時間；接著分別以 7 種溶媒(氟甲烷、甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯、正己烷及氯仿)，去進行抽提比較。

1、檢品製備

10 g 蛇床子藥材，放到 250 mL 三角瓶內，分別加入 7 種不同溶媒 50 mL，以鋁箔紙封口，靜置三日，倒出，減壓濃縮至乾，接著把濃縮物以甲醇洗至 50 mL 定量瓶內，定量到 50 mL，備用。

2、分析條件

氣相層析儀條件為氣體流速 40 mL/min、起始溫度 135 °C、每分鐘升溫 12 °C、最高溫度 215 °C 和維持時間 30 分鐘進行分析，其結果為

超臨界抽提選用夾帶劑依據。

(二)、超臨界二氧化碳流體抽提

1、抽提步驟

抽提步驟:先把冷凝器打開，待溫度冷凝到攝氏5~7度並檢查所有閥門是否關閉；稱取蛇床子藥材後，先以鋼棍把一小塊聚丙烯棉塞到不鏽鋼製萃取管底部，避免藥材會有碎屑通過管路，接著把蛇床子置入萃取管，用鋼棍把蛇床子藥材壓進鋼製的萃取管中，再以鋼棍壓一小塊玻璃棉進去，蓋住藥材上端，防止藥材碎屑從管路通過；再來倒入夾帶劑到萃取管中，把萃取管接到超臨界設備裡；之後打開二氧化碳鋼瓶和合成空氣鋼瓶，讓壓力控制器顯示出壓力上升，慢慢調整壓力到要用的壓力一半的位置；等待壓力調整到一半之後，把超臨界烘箱加熱設備打開(萃取管端溫度要高於烘箱，避免收集檢品時，因二氧化碳極速吸熱膨脹，導致收集管噴飛產生危險)，讓溫度開始上升到設定溫度；待溫度到達時，把壓力調整到需要壓力，打開閥門，讓二氧化碳流入萃取管，即可開始計算靜待抽提時間；等待靜態抽提時間結束時，接上收集管，並且蓋上壓克力板保護安全；靜態抽提時間結束之後打開上方收集槽閥門，

接著調整微調用出口閥門，觀察出口流速計，直到速度到達 5 mL/min 速度，開始計算動態抽提時間；動態抽提時間結束後，關閉二氧化碳入口管路，讓萃取管內剩餘二氧化碳持續流出，直到沒有二氧化碳流出為止；接著取下萃取管，從上端管路入口，以針筒將使用夾帶劑適量推入，以清洗管路，重複 1~2 次，再用針筒推入空氣，把清洗用夾帶劑排入收集管，之後收集管中檢品，過濾定量後待高效液相層析儀分析。

(三)、超臨界抽提的變因

以二氧化碳做為超臨界流體進行抽提，設定一組條件做為對照組，比較不同的變因對抽提效果影響。

1、對照組條件

烘箱溫度攝氏 55 °C、壓力 0.5 MPa(利用合成空氣壓力調整系統壓力)、靜態抽提時間 20 分鐘、動態抽提時間 20 分鐘、初出口速度為 5 mL/min 及夾帶劑為 5 mL 的甲醇。

2、控制組條件

抽提次數：同一管藥材，連續抽提 1、2、3、4、5 次直到第 6 次，分別收集各次收集的檢品。

抽提用夾帶劑：從氣相層析中選出抽提效果較好的夾帶劑。

壓力：控制合成空氣壓力為 0.1 MPa、0.2 MPa、0.3 MPa、0.4 MPa 或 0.5 MPa。(相等於 120 Bar、240 Bar、360 Bar、480 Bar 及 600 Bar。)

抽提時間(靜態抽提時間)：10、20、30、40、120 及 180 分鐘。(靜態抽提時間影響二氧化碳流體跟藥材混合時間。)

抽提溫度：烘箱溫度 40、50、60、70、80、90、100 °C。(因為萃尿管放置於烘箱內，調整烘箱溫度即可調整抽提溫度。)

(四)、高效液相層析分析超臨界抽提效果

1、蛇床子素標準品製備

取標準品 10 mg，以適量甲醇溶解，之後定量到 10 mL，再各別對半稀釋成 0.5 mg/mL、0.25 mg/mL、0.125 mg/mL 及 0.0625 mg/mL，當成分析用的標準品。

2、超臨界抽提之檢品製備

超臨界抽提之檢品溶液以濾紙過濾不溶物，使用 50 mL 定量瓶，加甲醇溶液定量到 50 mL，過濾到檢品瓶內，作為檢品，待高效液相層析儀分析。

3、分析條件

使用 RP-C18 管柱，photodiode array detector，移動相採用甲醇:水=7:3，吸光波長 323 nm，時間 40 分鐘，進行分析。

4、蛇床子素檢量線

五個濃度的標準品，進行高效液相層析儀分析，以線性迴歸畫出檢量線，計算相關係數和 f 值。

(五)、蛇床子素奈米膠漿的製備

1、蛇床子素酒精溶液



把蛇床子素 200 mg 加入定量瓶內，以酒精定量到 10 mL，搖晃均勻使其溶解，蛇床子素濃度為 0.2 g/mL，備用。

2、膠體水溶液

取水 9.8 mL，個別加入燒杯中，加入攪拌石，定速到 1100 rpm，使之穩定旋轉，之後個別加入聚維酮 0.1 g、甲基纖維素 0.3 g、羧甲基纖維素鈉 0.5 g、結蘭膠 0.075 g、結蘭膠 0.15 g，均勻攪拌使形成膠體水溶液。

卡波姆 940 的部分，取水 9.6 mL，加入燒杯中，加入攪拌石，定速到 1100 rpm，使之穩定旋轉，秤取 0.025 g，緩慢灑佈卡波姆 940 到水裡面，讓卡波姆 940 完全溶解於水中，之後加入 0.2 mL 10% NaOH 水溶液，此時會形成膠體水溶液。

果膠的部分，秤取完果膠 0.25 g 之後，先行加入燒杯中，接著以適量酒精潤濕，接著取水 9.8 mL，加入燒杯中，加入攪拌石，定速到 1100 rpm，使之穩定旋轉，形成膠體水溶液。

最後得到，聚維酮 1% 水溶液膠體、果膠 2.5% 水溶液膠體、甲基纖維素 3% 水溶液膠體、羧甲基纖維素鈉 5% 水溶液膠體、結蘭膠 0.75% 和 1.5%

水溶液膠體以及卡波姆 0.25%水溶液膠體。

3、蛇床子素奈米膠漿製備

6 種膠體，以攪拌石 1100 rpm 快速攪拌，使其穩定，接著取蛇床子素酒精溶液 0.2 mL，個別加入 6 種膠體中，定時 2 分鐘，讓蛇床子素均勻乳化在膠體水溶液中，形成蛇床子素奈米膠漿，待測定粒徑。

最後得到，聚維酮 1%水溶液膠漿、果膠 2.5%水溶液膠漿、甲基纖維素 3%水溶液膠漿、羧甲基纖維素鈉 5%水溶液膠漿、結蘭膠 0.75%和 1.5%水溶液膠漿以及卡波姆 0.25%水溶液膠漿，各含 0.04 g 蛇床子素。

空白對照組的部分，取水 9.8 mL，以攪拌石 1100 rpm 快速攪拌，使其穩定，加入蛇床子素酒精溶液 0.2 mL，定時 2 分鐘，立刻進行粒徑的測定。

4、奈米膠漿的粒徑測定

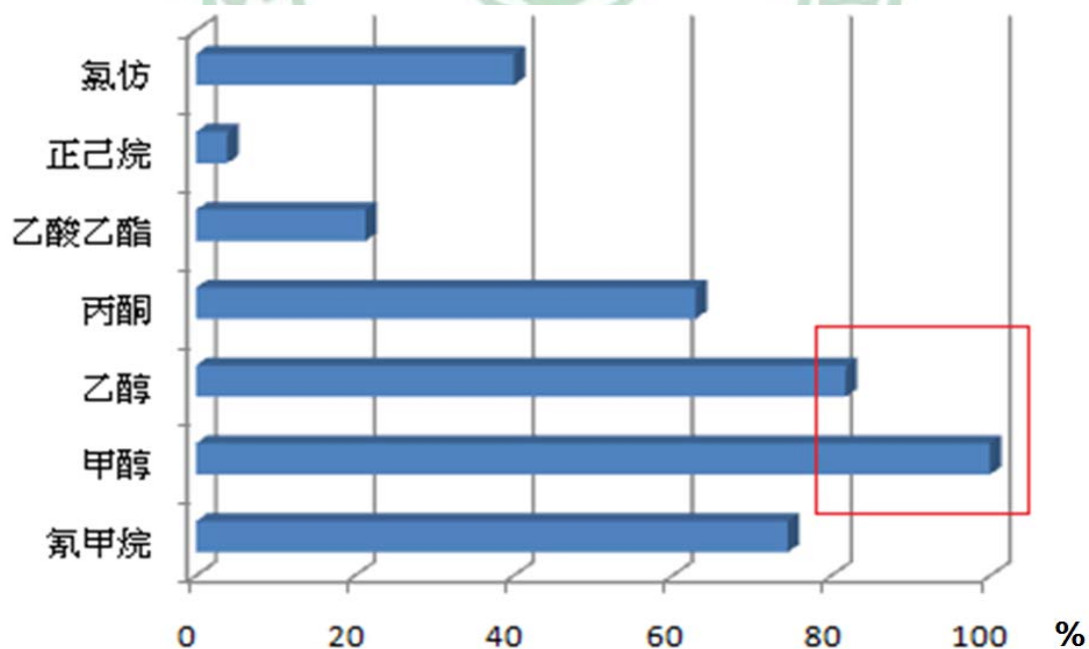
各取 6 種膠漿 1 mL，加入透明試管中，接著放入機器內測定。

機器設定為測粒徑，並且需選擇所使用的透明試管的種類。

叁、結果與討論

一、溶媒抽提效應的影響

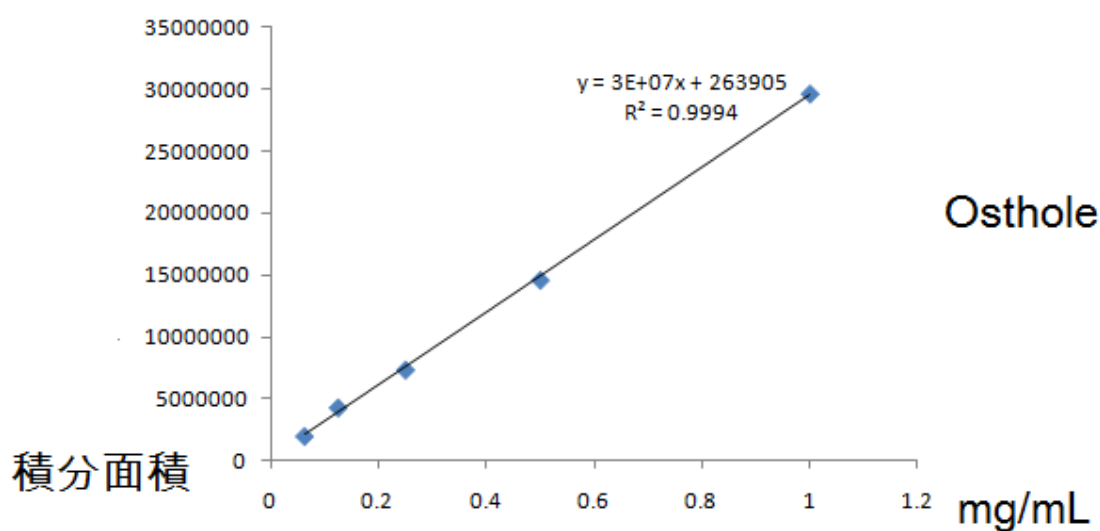
溶媒對蛇床子素的抽提力不同，利用氣相層析比較各種溶媒抽提蛇床子素的效果，結果如(圖十二)所示，抽提能力大小甲醇>乙醇>氯甲烷>丙酮>氯仿>乙酸乙酯>正己烷，此結果和余建志等²⁶的研究中，排序相符合，本實驗發現，甲醇顯現出了極佳的抽提效果，傳統常使用的乙醇，效果亦不錯，故選取此兩種效果較佳的溶媒當成超臨界二氧化碳抽提實驗時的夾帶劑。



圖十二、溶媒對蛇床子素抽提效果之影響。

二、蛇床子素檢量線

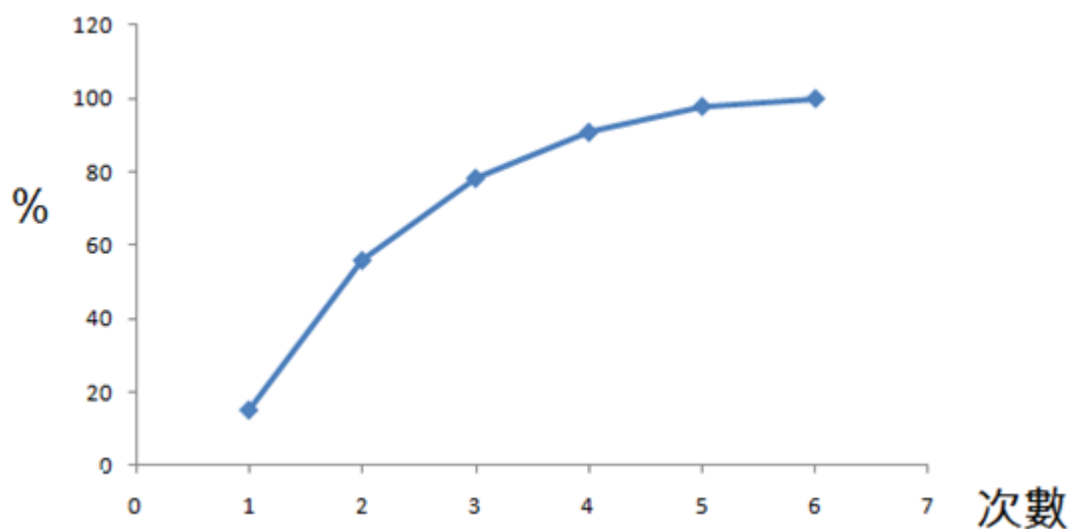
建立檢量線用的標準品濃度為 1 mg/mL，稀釋成 0.5、0.25、0.125、0.0625 mg/mL，將之進行高效液相層析儀的分析確效，重複 3 次，確定實驗穩定度。經過線性迴歸之後，相關係數是 0.9994，F 值 < 0.05，表示儀器的分析結果是可信的。



圖十三、蛇床子素檢量線。

三、抽提次數的影響

同一批藥材經過連續六次抽提，個別收集每一次的檢品，分析其抽提量進行累計抽提值的觀察。由(圖十四)、(表一)實驗結果可見到抽提量隨著抽提次數增加而減少，直到第六次時，圖中的曲線已經接近高原期，就算增加抽提次數，抽提量也僅有微量增加，故把總量作為 100%換算之後，(表一)中，抽提量隨著抽提次數增加而上升，到抽提五次時僅跟抽提六次相差 2.24%的抽提量，所以為了節省實驗成本，抽提五次是較佳的實驗結果。



圖十四、超臨界流體連續抽提次數的影響。

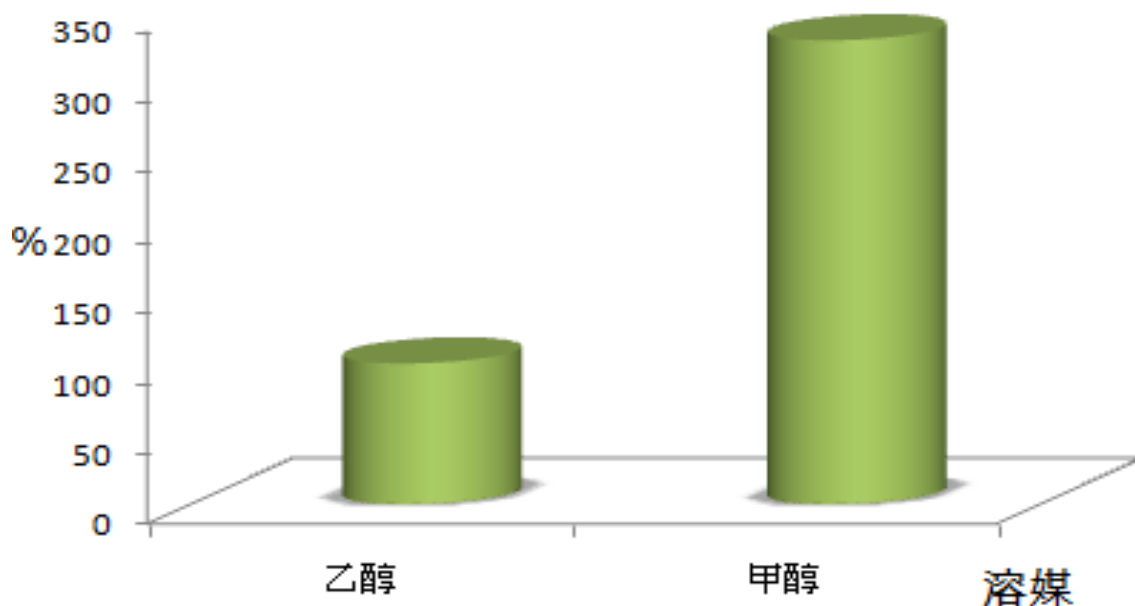
表一、蛇床子素超臨界抽提次數累進抽提率資料。

抽提次數	第一次	第二次	第三次	第四次	第五次	第六次
抽提率	15.10%	55.90%	78.24%	90.80%	97.86%	100%



四、夾帶劑的影響

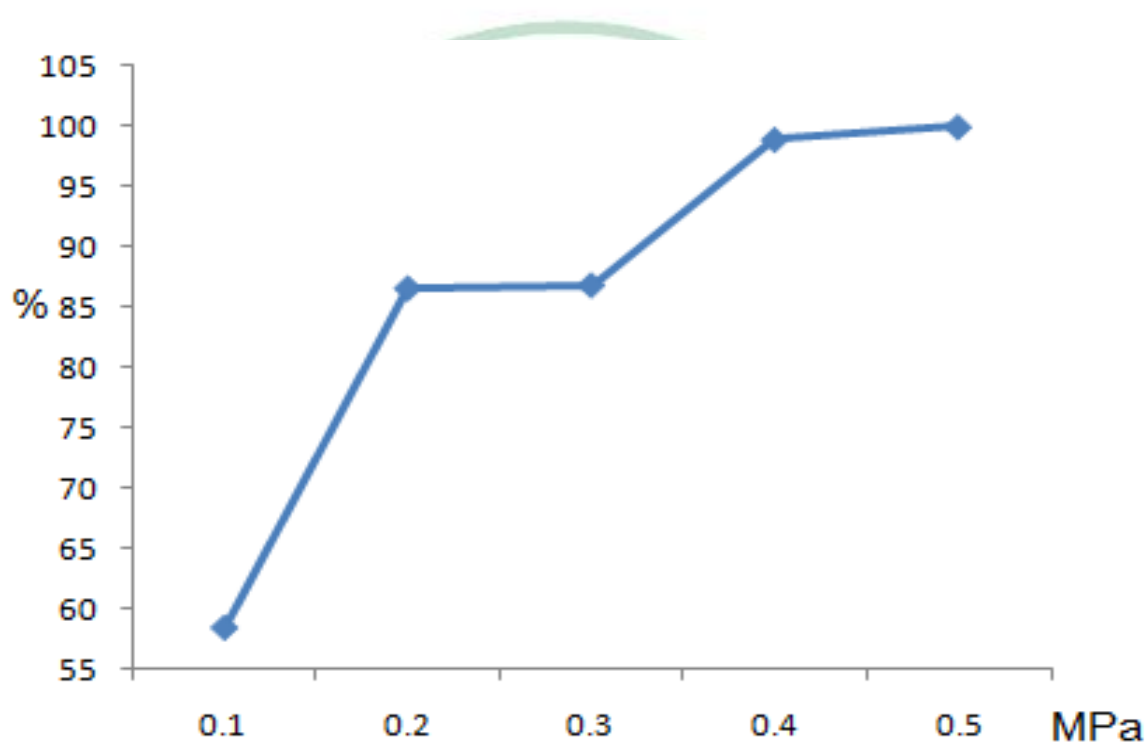
以氣相層析分析 7 種溶媒對蛇床子素的抽提力結果，觀察到甲醇最高，乙醇次之，於是選擇此兩種夾帶劑進行超臨界二氧化碳流體抽提效果比較。甲醇對於蛇床子素的抽提力大於乙醇，相差約 20%，同樣作為超臨界二氧化碳抽提的夾帶劑時，甲醇跟乙醇的差距有放大的情形，可能因為甲醇改變超臨界二氧化碳流體的性質較乙醇改變更多，其差距可以放大到 3.5 倍，故甲醇是夾帶劑較佳選擇。



圖十五、比較兩種夾帶劑對超臨界流體抽提的影響。

五、壓力的影響

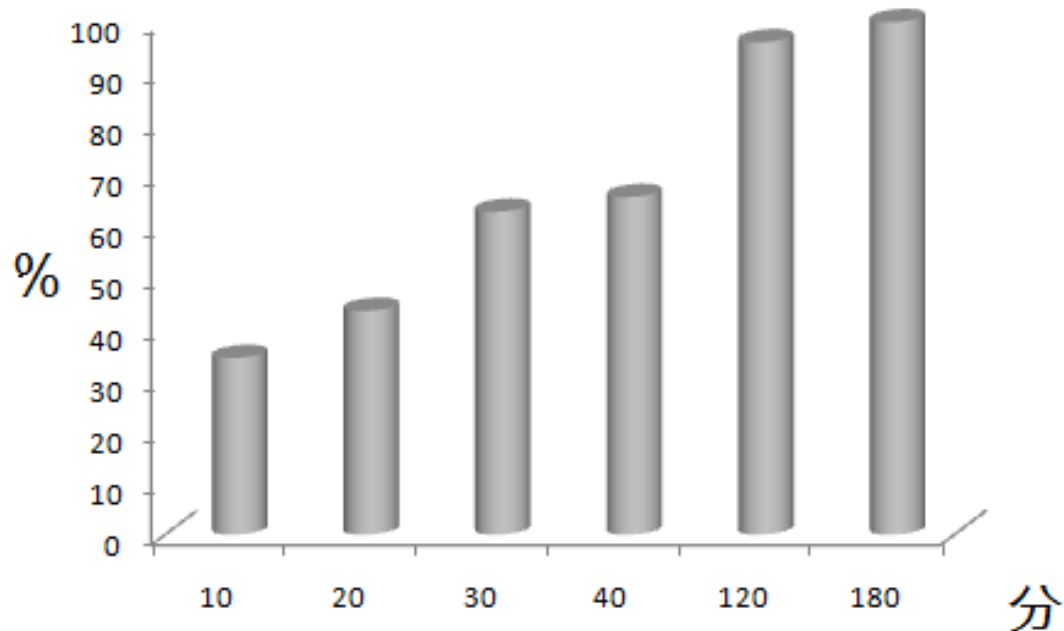
以五種不同壓力進行抽提效果比較。(圖十六)顯示，壓力越大，抽提量也相對提高，推測其原因是因為壓力越大，二氧化碳流體密度也隨之上升，讓抽提力也跟著上升，機器負荷最大為 680 Bar，故選擇 0.5 MPa(600 Bar)為最佳的抽提壓力。



圖十六、比較五種壓力對超臨界流體抽提的影響。(等於 120 Bar、240 Bar、360 Bar、480 Bar 及 600 Bar；1 Bar 約等於一大氣壓)

六、時間的影響

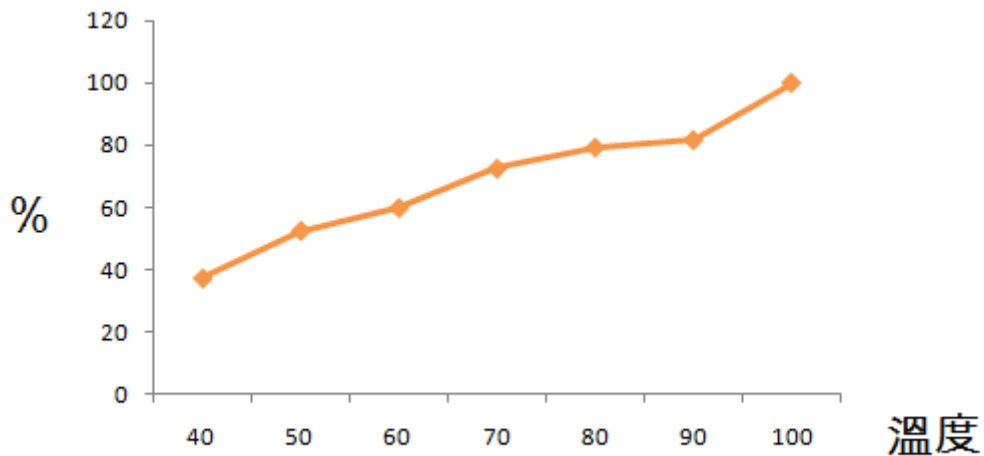
時間影響是靜態抽提的時間，代表二氧化碳流體跟藥材混合浸泡的時間，調整靜態抽提時間來觀察抽提效果。結果顯示出抽提量隨著時間增加，所以藥材浸泡在超臨界流體中越久，可以帶出更多的蛇床子素，考量到時間成本，120分鐘是作為靜態抽提時間的較佳選擇。



圖十七、比較六種靜態抽提時間對超臨界流體抽提的影響。

七、溫度的影響

抽提溫度分成 7 個溫度來比較，從 40 到 100 °C，比較不同溫度之間抽提效果的大小，結果顯示隨著溫度升高，抽提效率越佳，因為溫度設定極限，故抽提溫度設定為 100 °C。推測影響的原因是，超臨界二氧化碳流體隨著溫度上升密度增大，使抽提效果也改變。



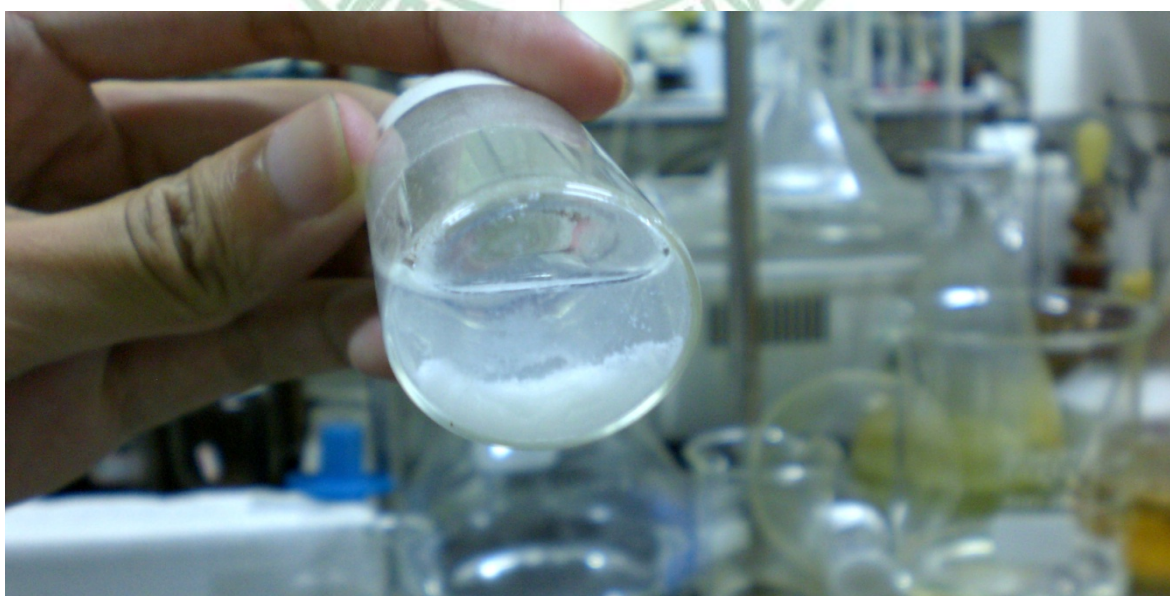
圖十八、比較七種溫度對超臨界流體抽提的影響。

八、蛇床子素奈米膠漿

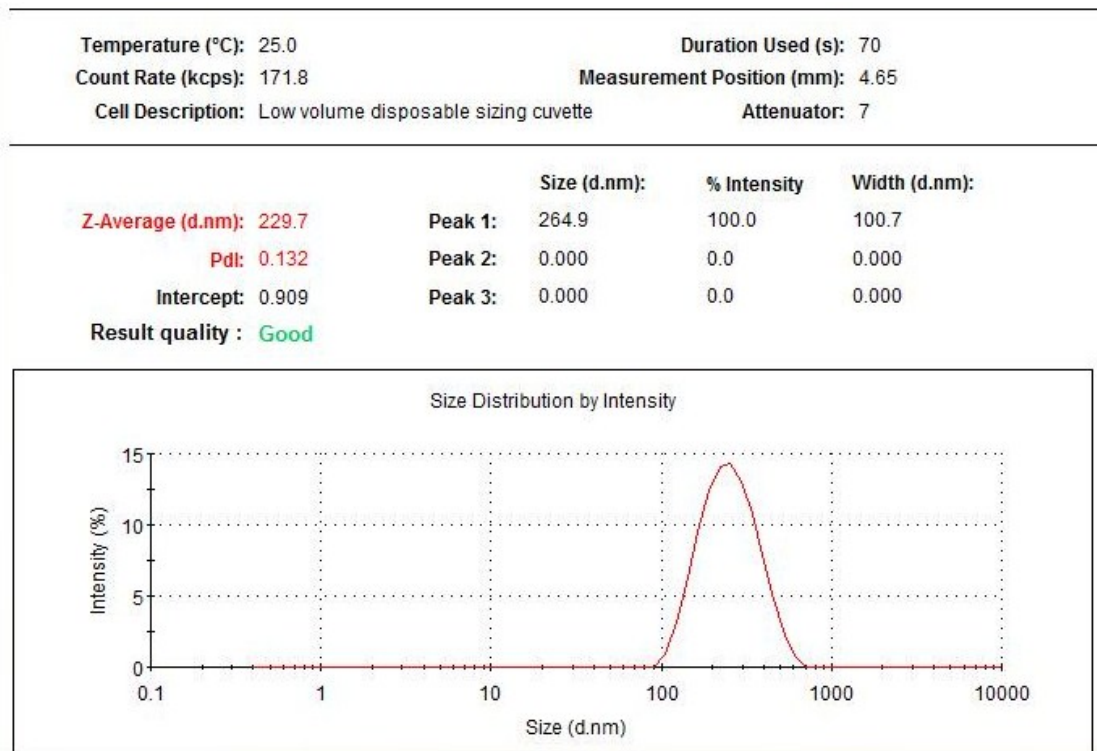
(一)、空白對照組

蛇床子素酒精溶液，滴入水中之後，析出的速度非常快，幾分鐘內即可看見結晶凝絮的情形，靜置一段時間之後，會發現結晶沉澱在底部的情形如圖十九。

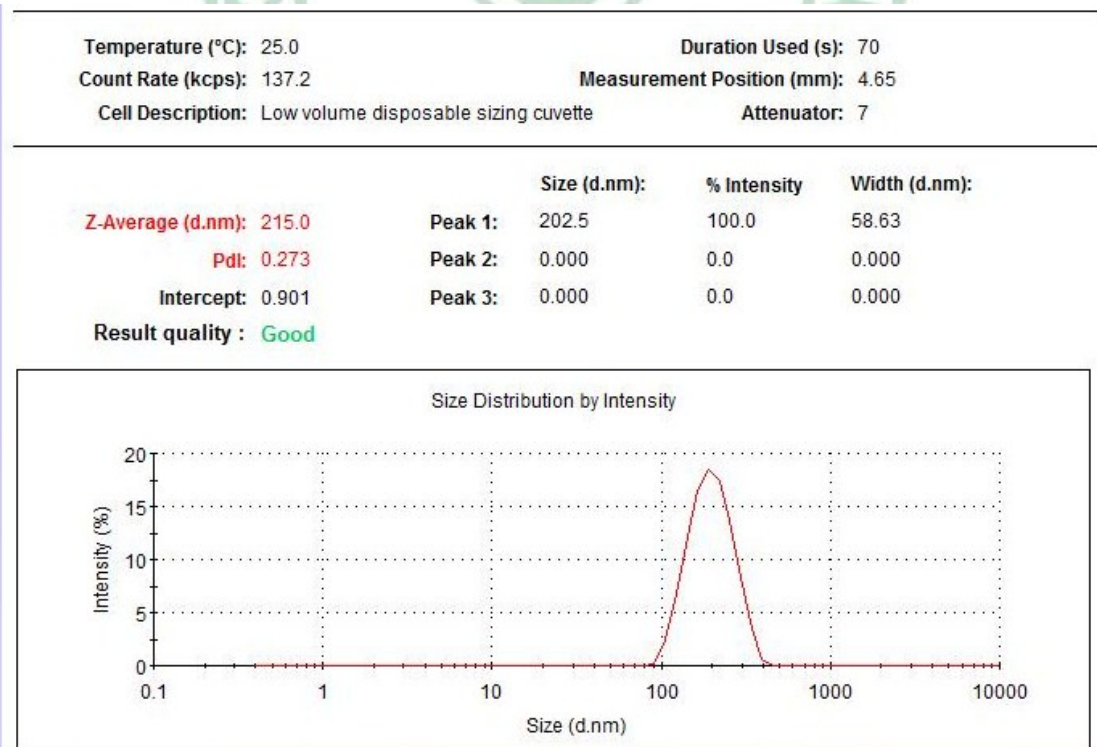
因此製備完成空白組時，便需要立刻進行粒徑的測定，測定結果如下圖二十到圖二十二，結果平均粒徑出現在 150~300 nm 之間，顯示出有呈現奈米等級的狀態，表示蛇床子素之奈米化是可行的，並且可以對照後續其他膠體的粒徑結果。



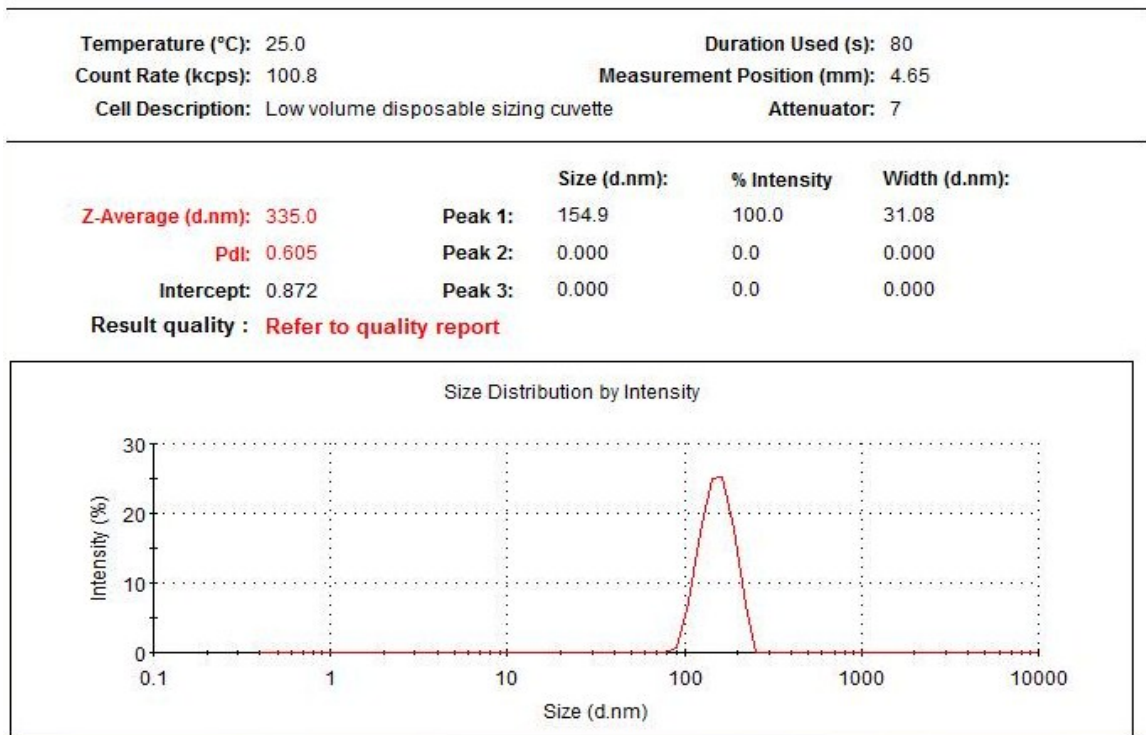
圖十九、空白組結晶析出的情形。



圖二十、蛇床子素奈米膠漿粒徑測定結果。



圖二十一、蛇床子素奈米膠漿粒徑測定結果。

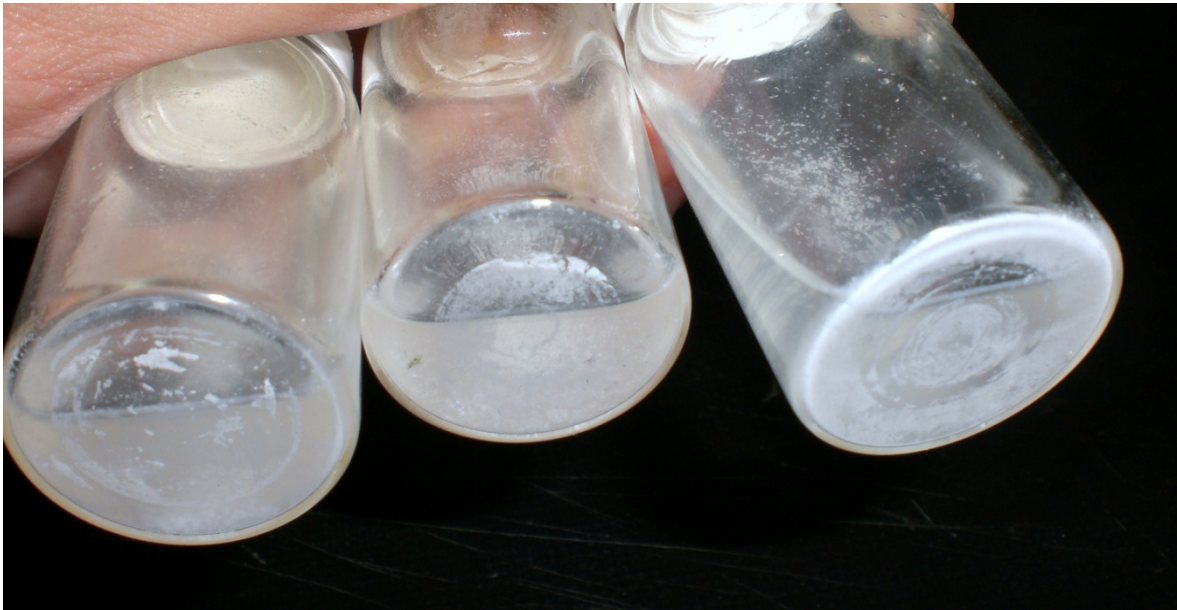


圖二十二、蛇床子素奈米膠漿粒徑測定結果。

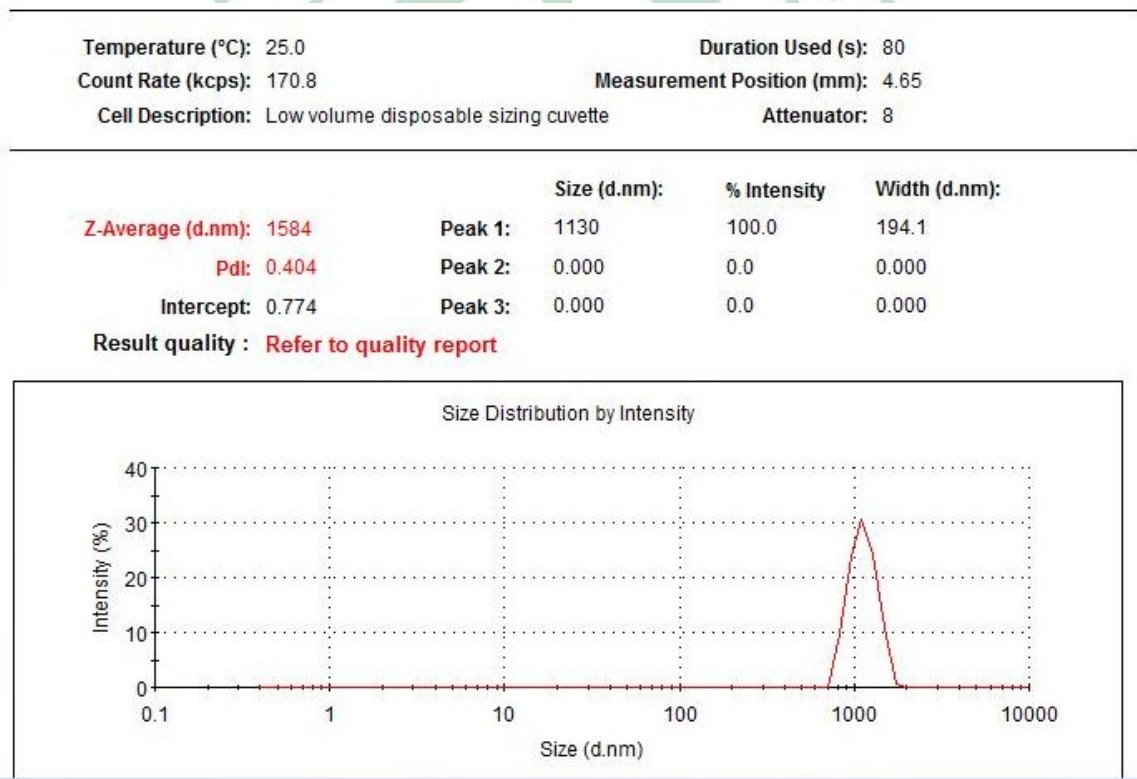
(二)、聚維酮蛇床子素奈米膠漿

剛開始可以很好得呈現出白色混濁的奈米膠漿狀態，粒徑大小可以偵測的到，可是很快底部有白色結晶沉澱，靜置一天之後，結晶大量沉澱於底部如圖二十三。

粒徑結果如圖二十四~圖二十六顯示，即使是新鮮製備，粒徑仍會測出 700~1000 左右的大小，並非理想的奈米化大小，而且結晶析出快速，狀態無法保持，故聚維酮無法作為此種奈米膠漿製備的適當增稠劑。



圖二十三、聚維酮蛇床子素奈米膠漿靜置析出情形。

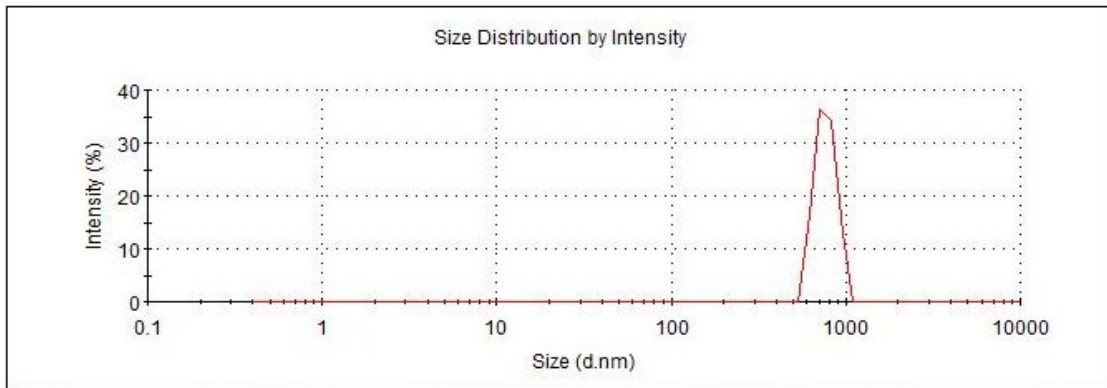


圖二十四、聚維酮蛇床子素奈米膠漿粒徑測定結果。

Temperature (°C): 25.0	Duration Used (s): 80
Count Rate (kcps): 155.9	Measurement Position (mm): 4.65
Cell Description: Low volume disposable sizing cuvette	Attenuator: 8

	Size (d.nm):	% Intensity	Width (d.nm):
Z-Average (d.nm): 2045	Peak 1: 766.8	100.0	103.1
Pdl: 0.884	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.845	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality : Refer to quality report

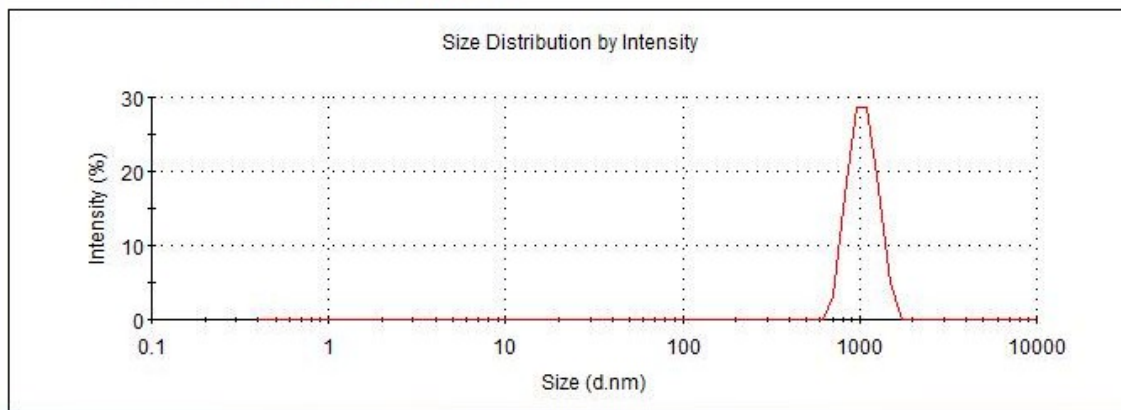


圖二十五、聚維酮蛇床子素奈米膠漿粒徑測定結果。

Temperature (°C): 25.0	Duration Used (s): 70
Count Rate (kcps): 166.6	Measurement Position (mm): 4.65
Cell Description: Low volume disposable sizing cuvette	Attenuator: 8

	Size (d.nm):	% Intensity	Width (d.nm):
Z-Average (d.nm): 1763	Peak 1: 1053	100.0	185.9
Pdl: 0.461	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.778	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality : Refer to quality report



圖二十六、聚維酮蛇床子素奈米膠漿粒徑測定結果。

(三)、果膠蛇床子素奈米膠漿

果膠膠體奈米膠體製備是失敗的，當果膠製備完成之後，滴入蛇床子素酒精溶液的同時，因為果膠不溶於酒精的特性，會立刻於果膠表面形成透明的膜，且蛇床子素立刻析出於膜上如圖二十七，所以此奈米化的方法無法使用果膠當增稠劑。

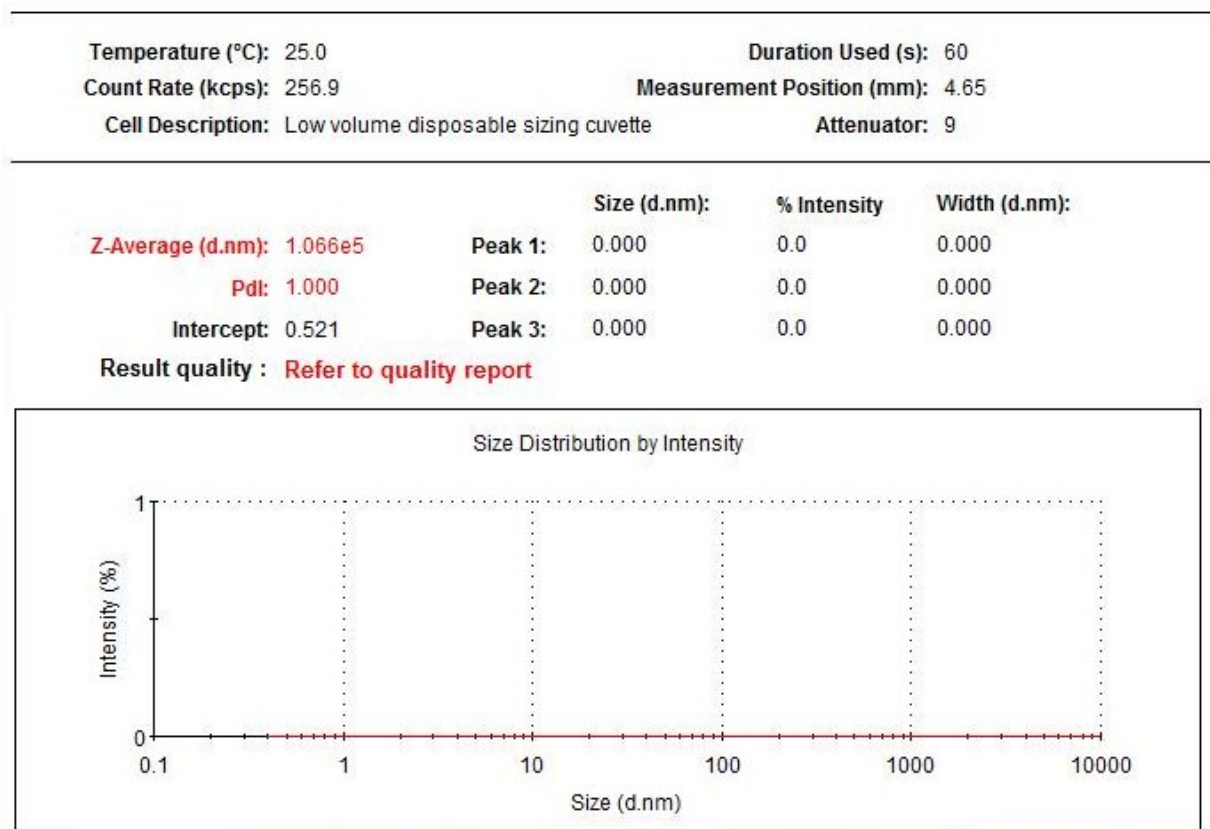


圖二十七、蛇床子素於果膠表面析出情形。

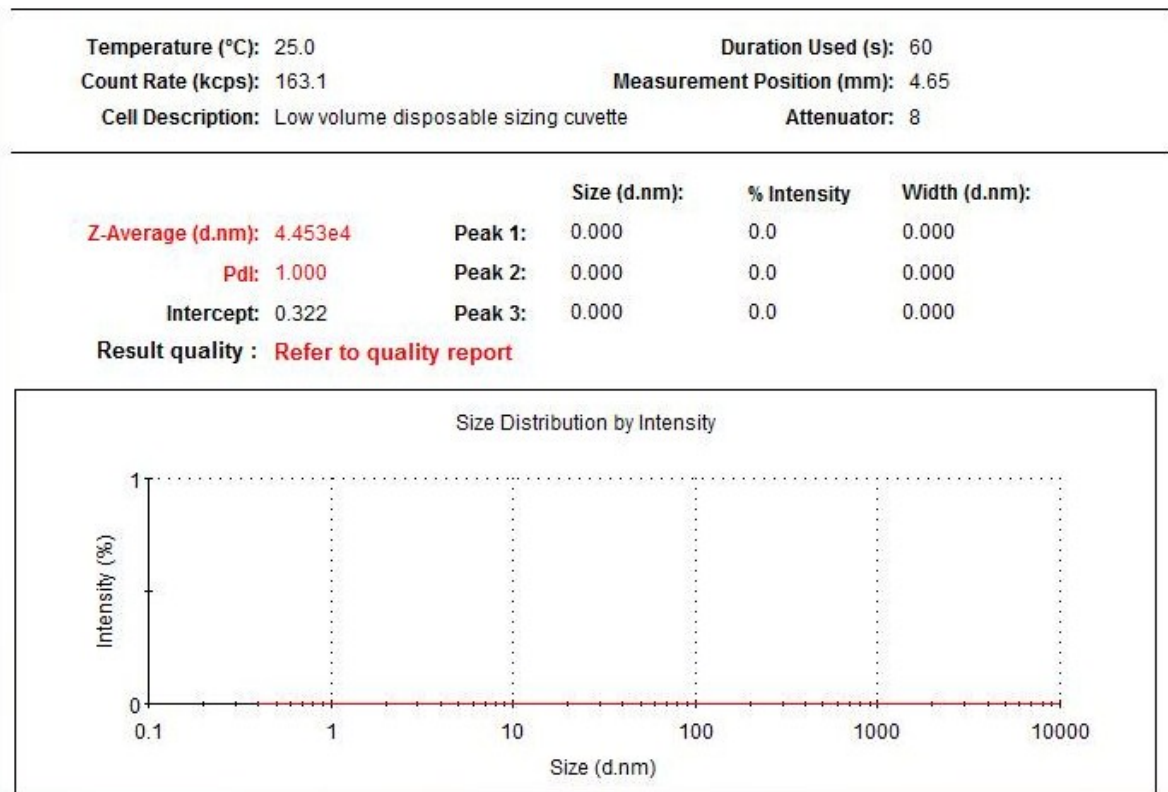
(四)、甲基纖維素蛇床子素奈米膠漿

甲基纖維素可以形成具稠度的膠體，且沒有觀察到蛇床子素有沉澱

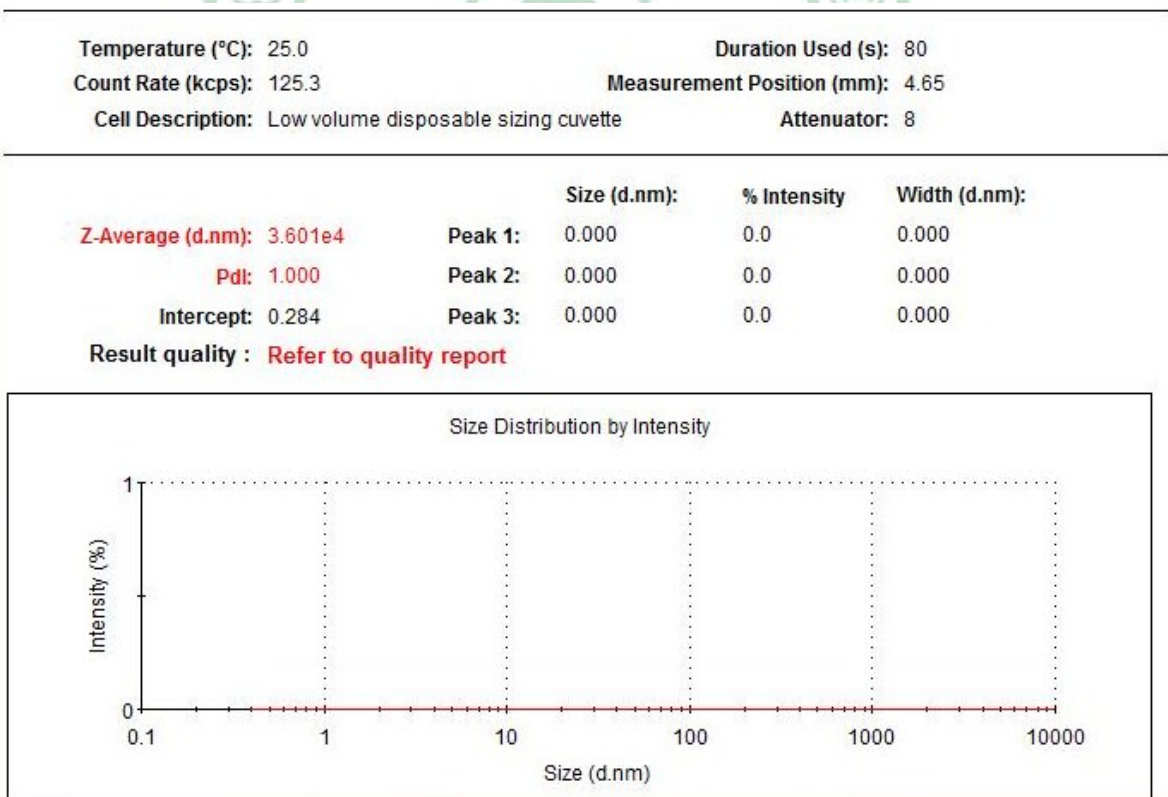
情形，但在測量粒徑的結果，如圖二十八~圖三十，卻顯現出不佳的奈米化狀況，平均粒徑的大小甚至超過儀器測量的上限值 1 萬 nm，所以不是適合使用的膠體。



圖二十八、甲基纖維素蛇床子素奈米膠漿粒徑測定結果。



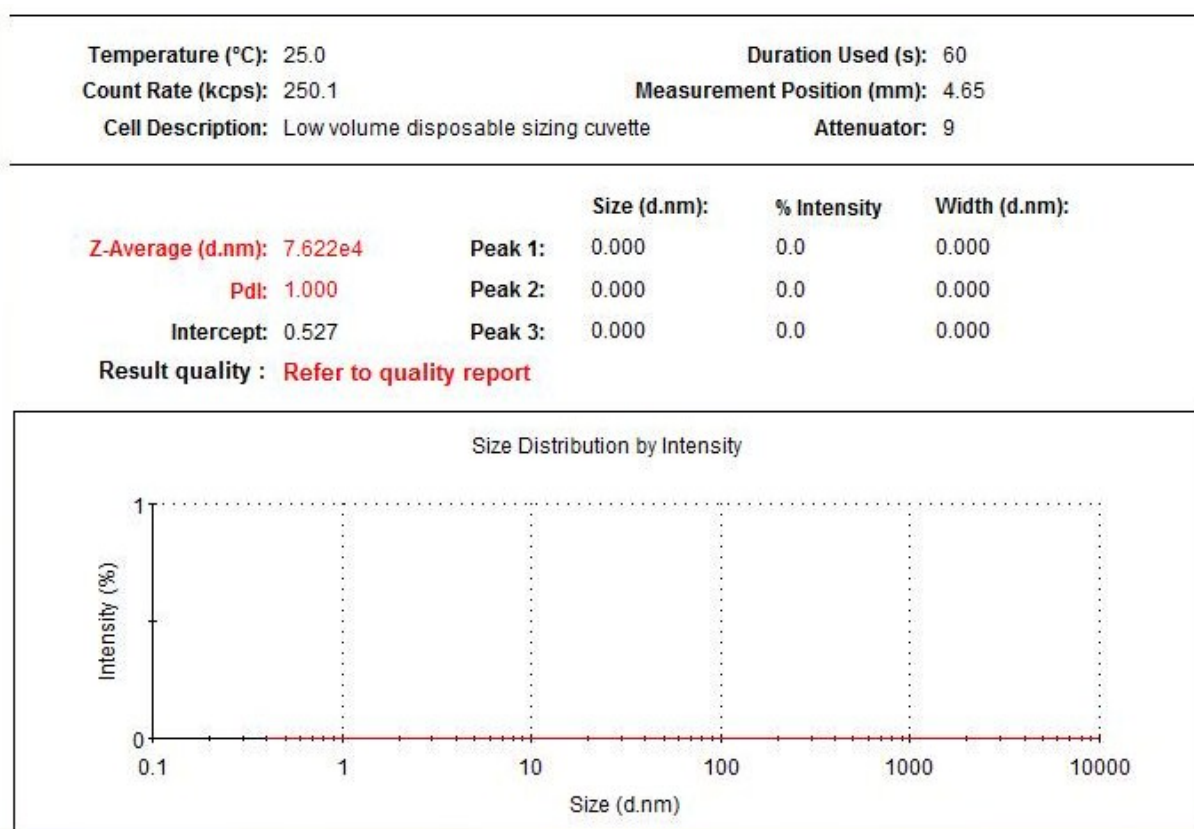
圖二十九、甲基纖維素蛇床子素奈米膠漿粒徑測定結果。



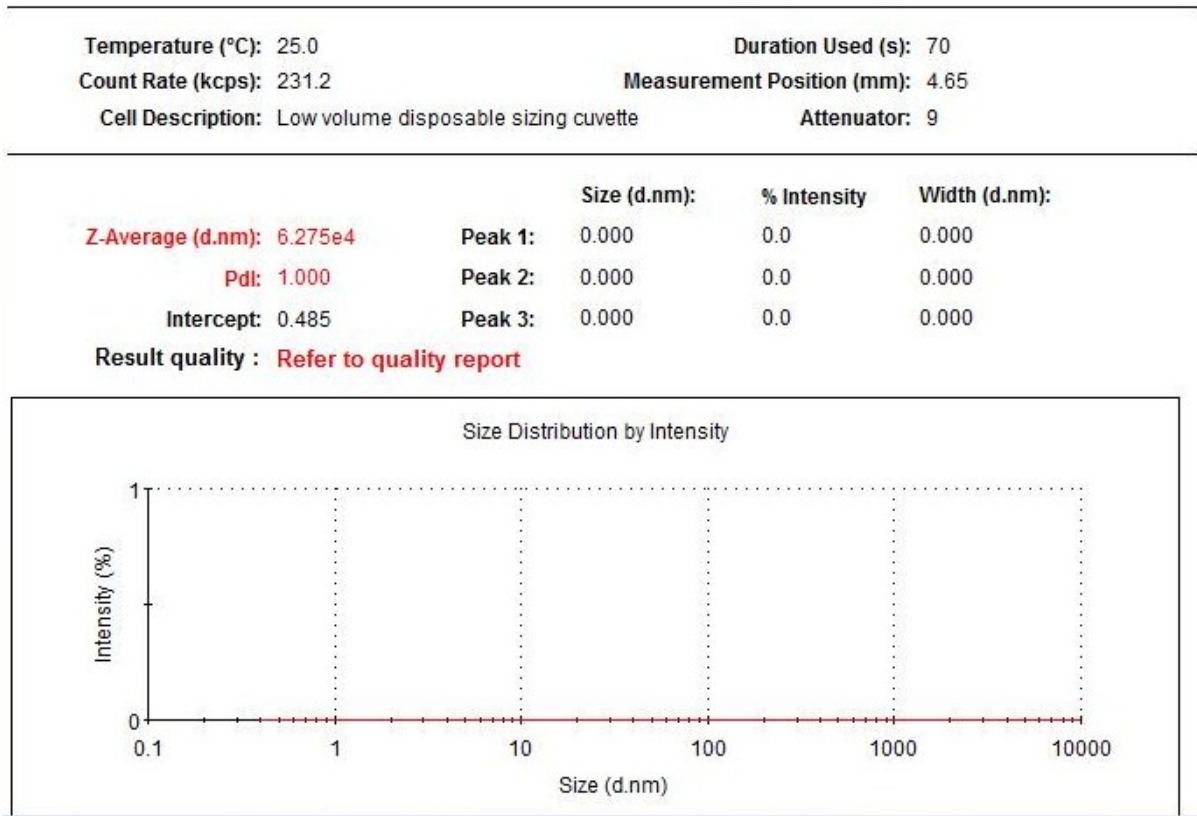
圖三十、甲基纖維素蛇床子素奈米膠漿粒徑測定結果。

(五)、羧甲基纖維素鈉蛇床子素奈米膠漿

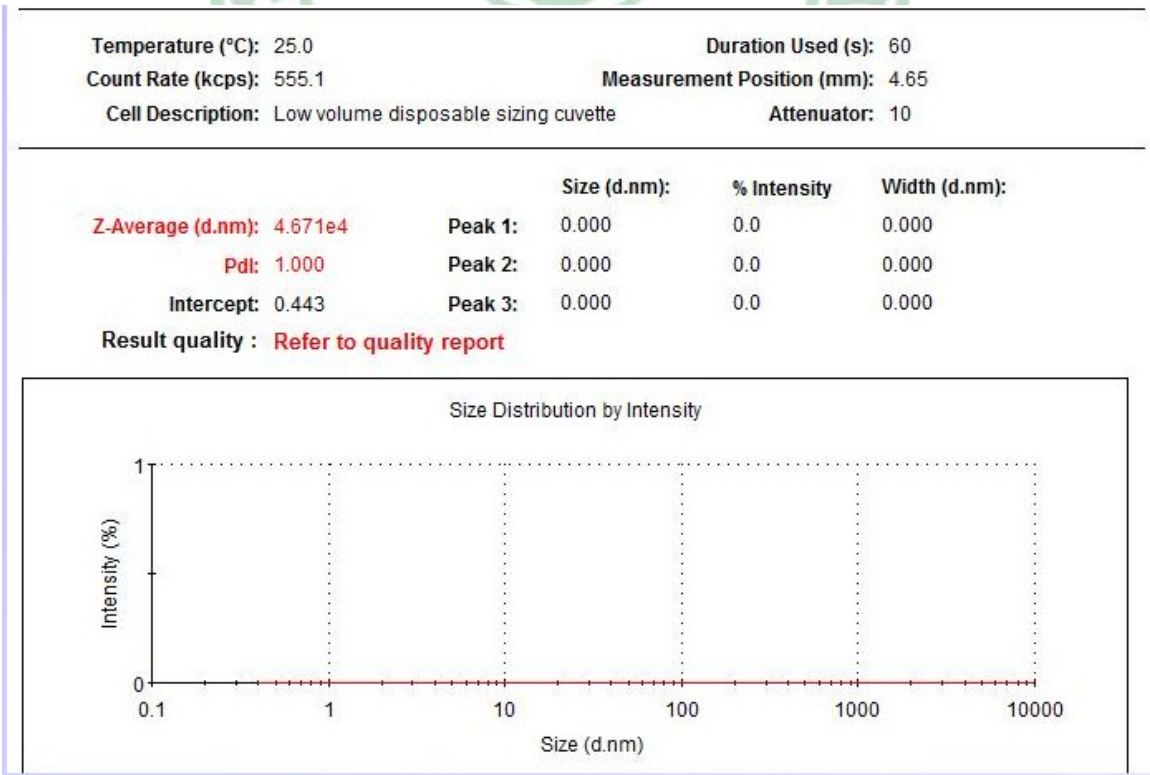
結果如圖三十一~圖三十三，同甲基纖維素蛇床子奈米膠漿，形成的膠漿狀態，粒子並沒有形成奈米等級的大小，並不適合使用。



圖三十一、羧甲基纖維素鈉蛇床子素奈米膠漿粒徑測定。



圖三十二、羧甲基纖維素鈉蛇床子素奈米膠漿粒徑測定。

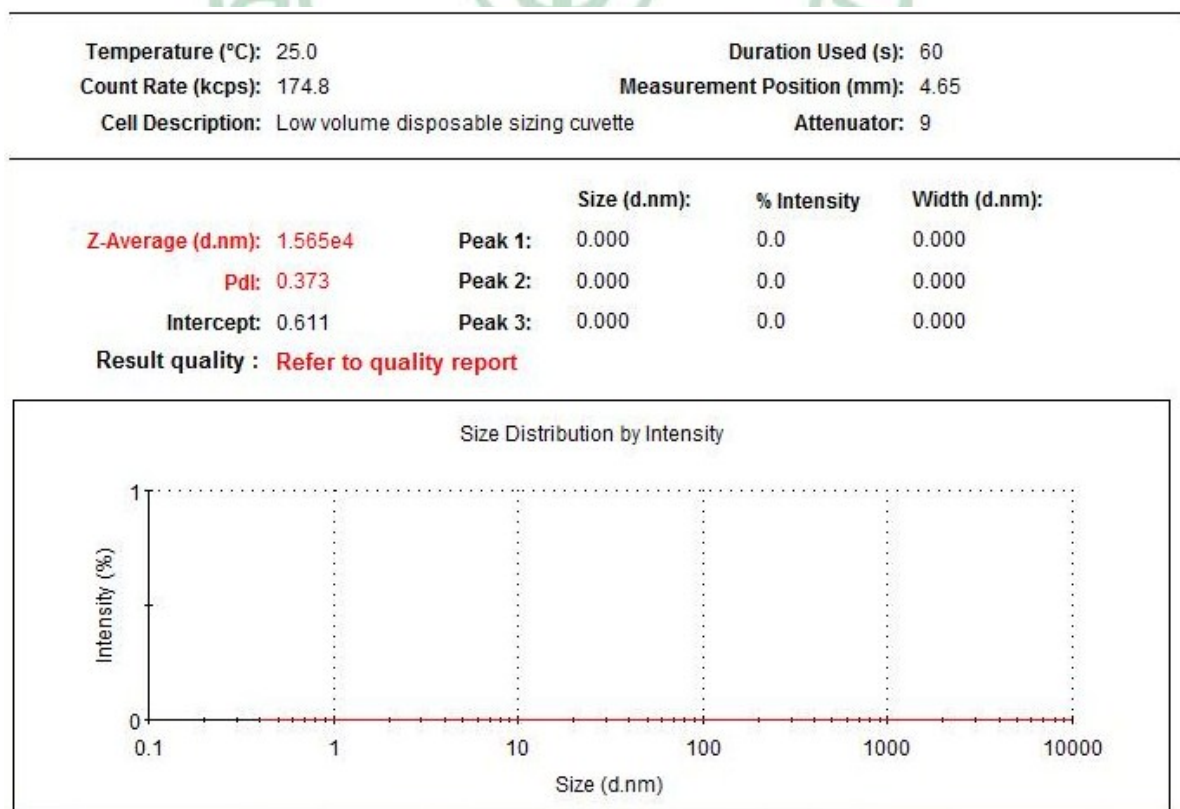


圖三十三、羧甲基纖維素鈉蛇床子素奈米膠漿粒徑測定。

(六)、結蘭膠蛇床子素奈米膠漿

0.75%濃度的結果如圖三十四~圖三十六，測出的粒徑大小過大，不是奈米等級，而且靜置之後有析出沉澱情形。

因為較低濃度結蘭膠會讓結晶有析出沉澱的狀況如圖三十七，所以調整過後用兩倍濃度再次進行實驗，1.5%濃度的結果如圖三十八~圖四十，如同0.75%濃度的結果，粒徑大小過大；從結果看，0.75%濃度無法很好的防止蛇床子素析出凝絮，且粒徑過大，而1.5%濃度雖無觀察到大量析出的狀況，但粒徑同樣過大，從兩種濃度的結果來看，結蘭膠也不是適合的增稠劑。



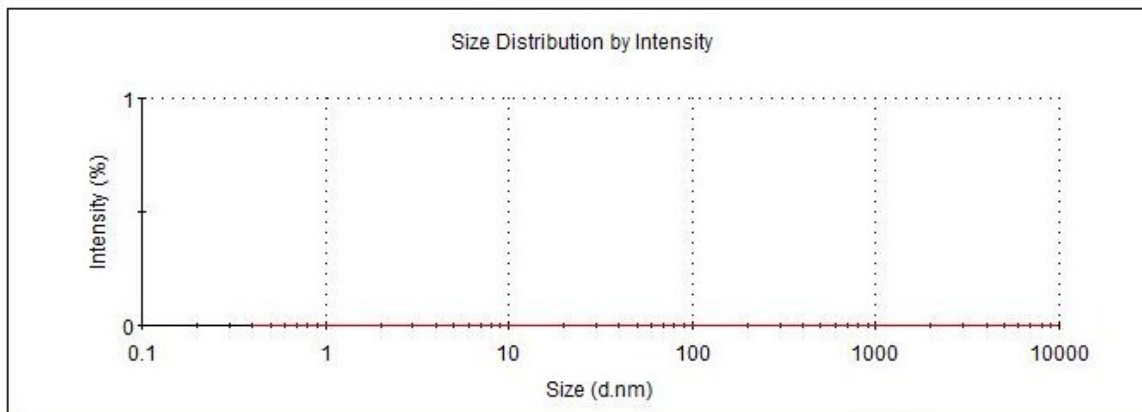
圖三十四、結蘭膠 0.75%蛇床子素奈米膠漿粒徑測定結果。

Temperature (°C): 25.0
Count Rate (kcps): 204.8
Cell Description: Low volume disposable sizing cuvette

Duration Used (s): 70
Measurement Position (mm): 4.65
Attenuator: 9

	Size (d.nm):	% Intensity	Width (d.nm):
Z-Average (d.nm): 1.862e4	Peak 1: 0.000	0.0	0.000
Pdl: 0.341	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.470	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality : Refer to quality report



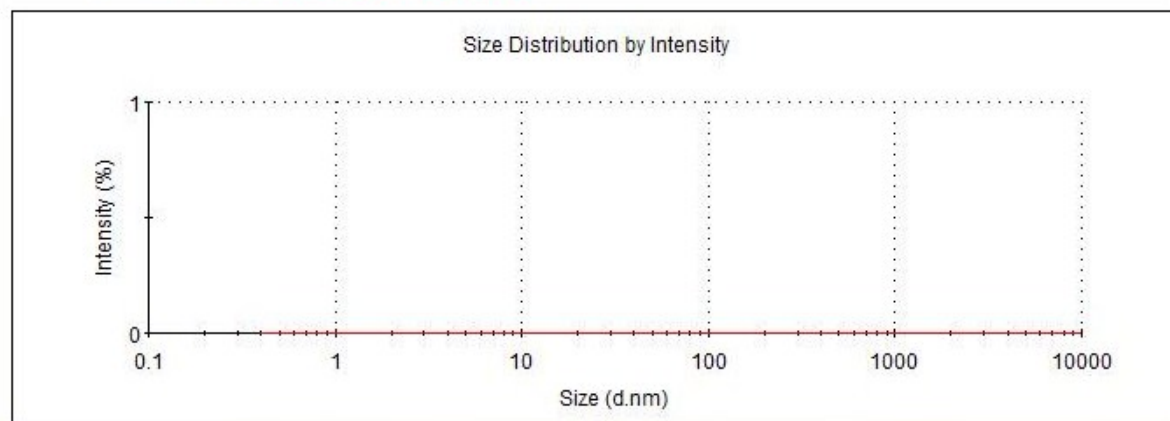
圖三十五、結蘭膠 0.75%蛇床子素奈米膠漿粒徑測定結果。

Temperature (°C): 25.0
Count Rate (kcps): 173.1
Cell Description: Low volume disposable sizing cuvette

Duration Used (s): 70
Measurement Position (mm): 4.65
Attenuator: 9

	Size (d.nm):	% Intensity	Width (d.nm):
Z-Average (d.nm): 1.367e4	Peak 1: 0.000	0.0	0.000
Pdl: 0.473	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.506	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

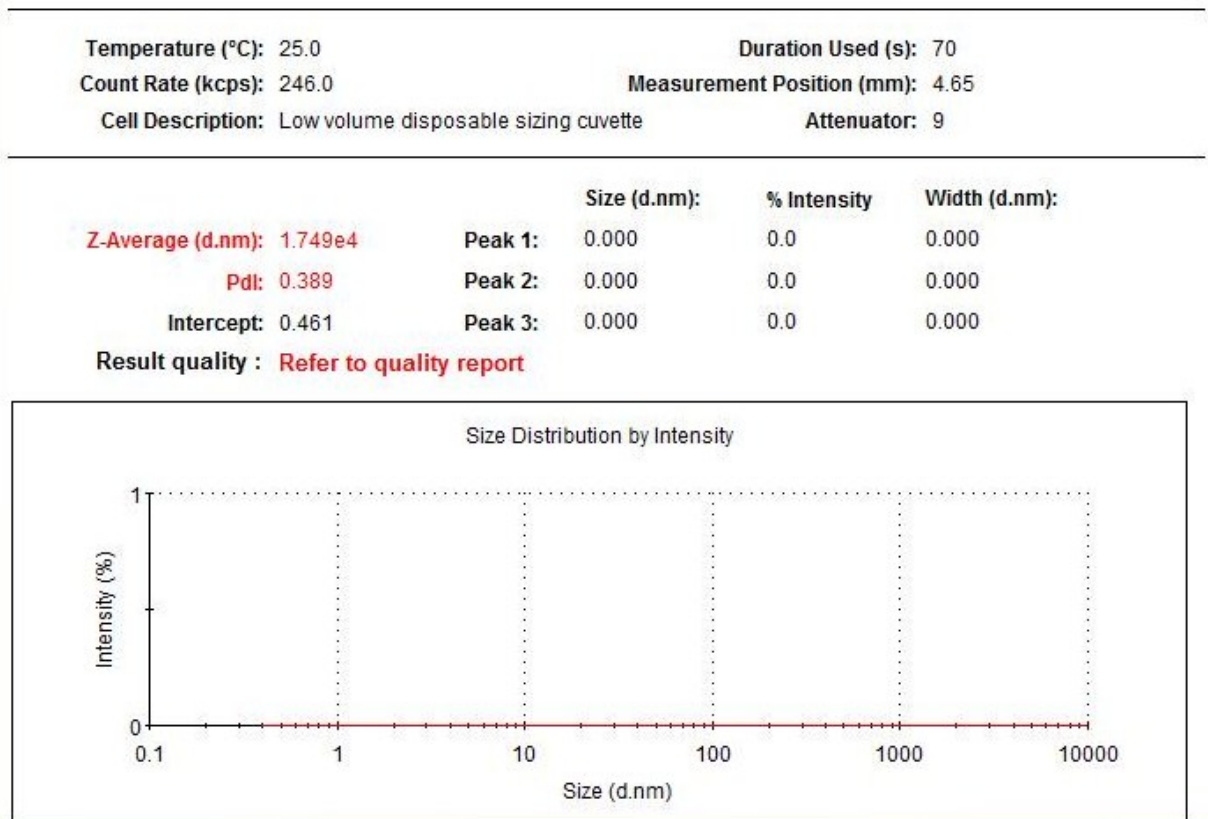
Result quality : Refer to quality report



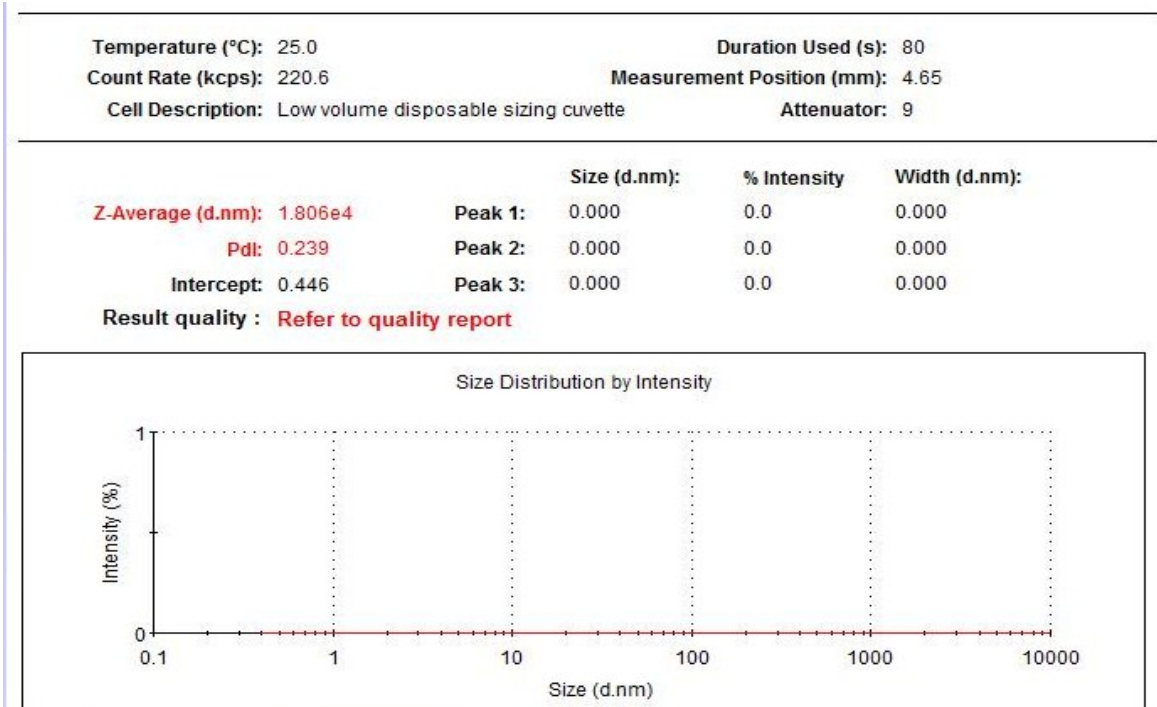
圖三十六、結蘭膠 0.75%蛇床子素奈米膠漿粒徑測定結果。



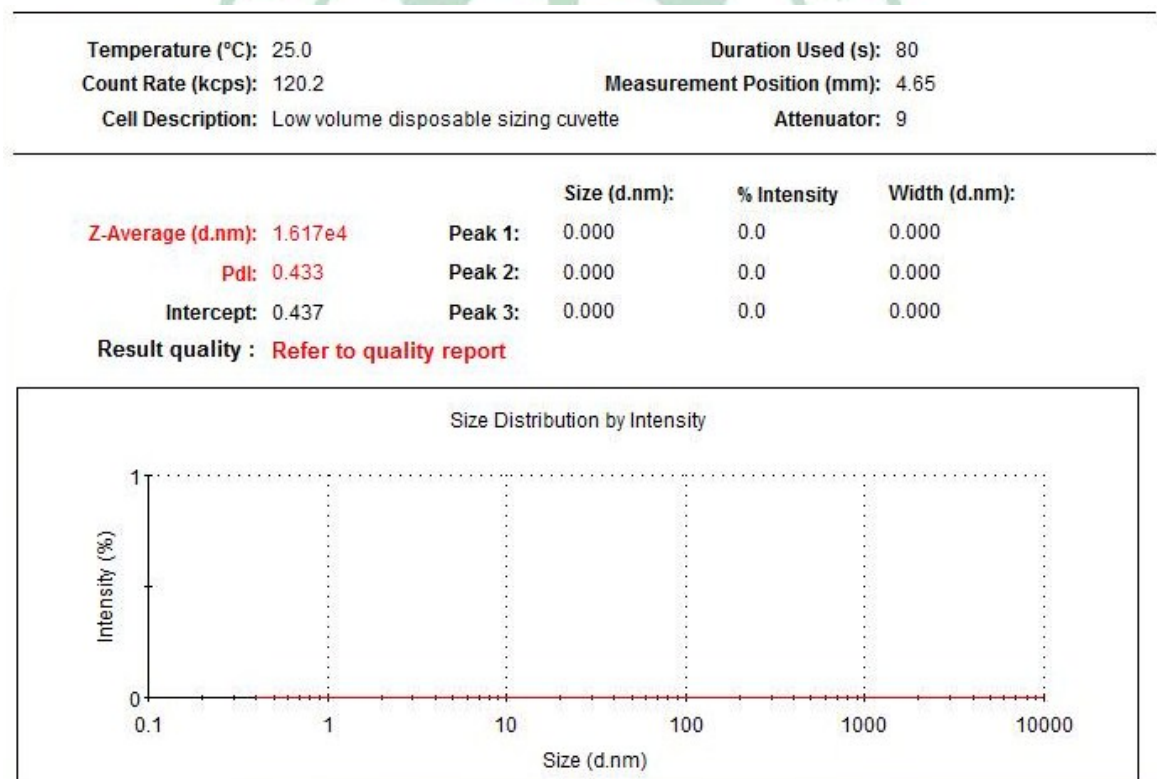
圖三十七、結蘭膠 0.75%蛇床子素奈米膠漿靜置後析出的狀況。



圖三十八、結蘭膠 1.5%蛇床子素奈米膠漿粒徑測定結果。



圖三十九、結蘭膠 1.5%蛇床子素奈米膠漿粒徑測定結果。

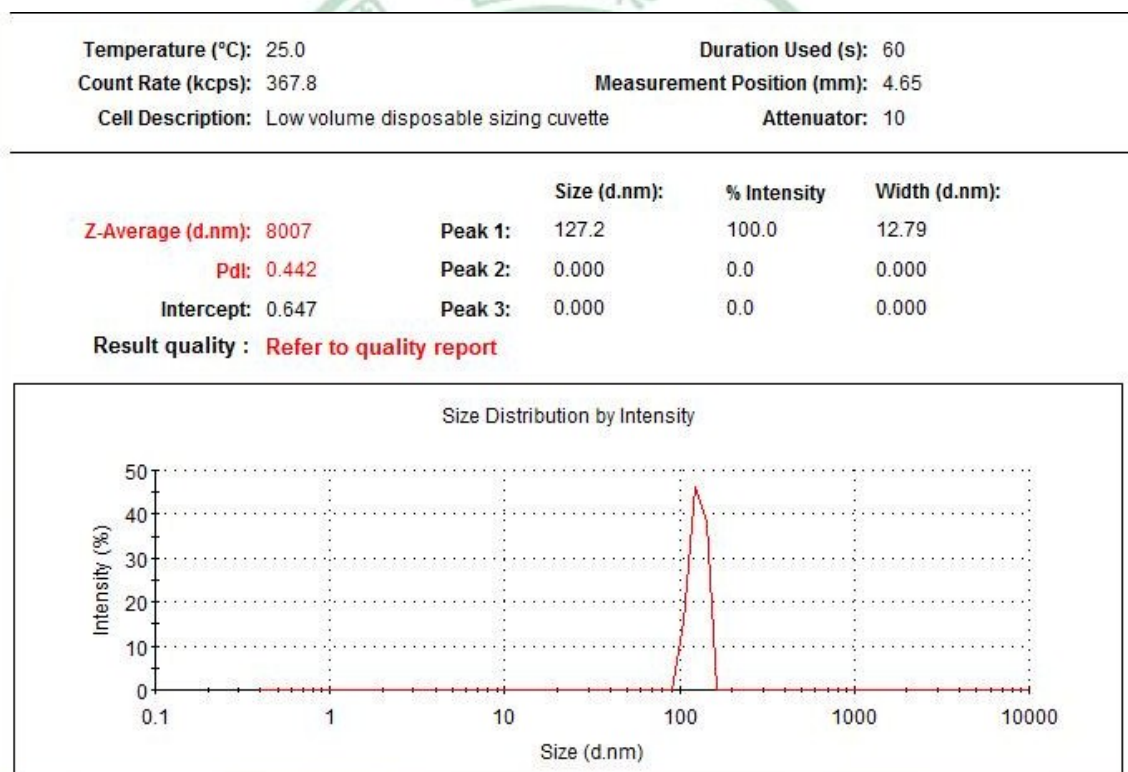


圖四十、結蘭膠 1.5%蛇床子素奈米膠漿粒徑測定結果。

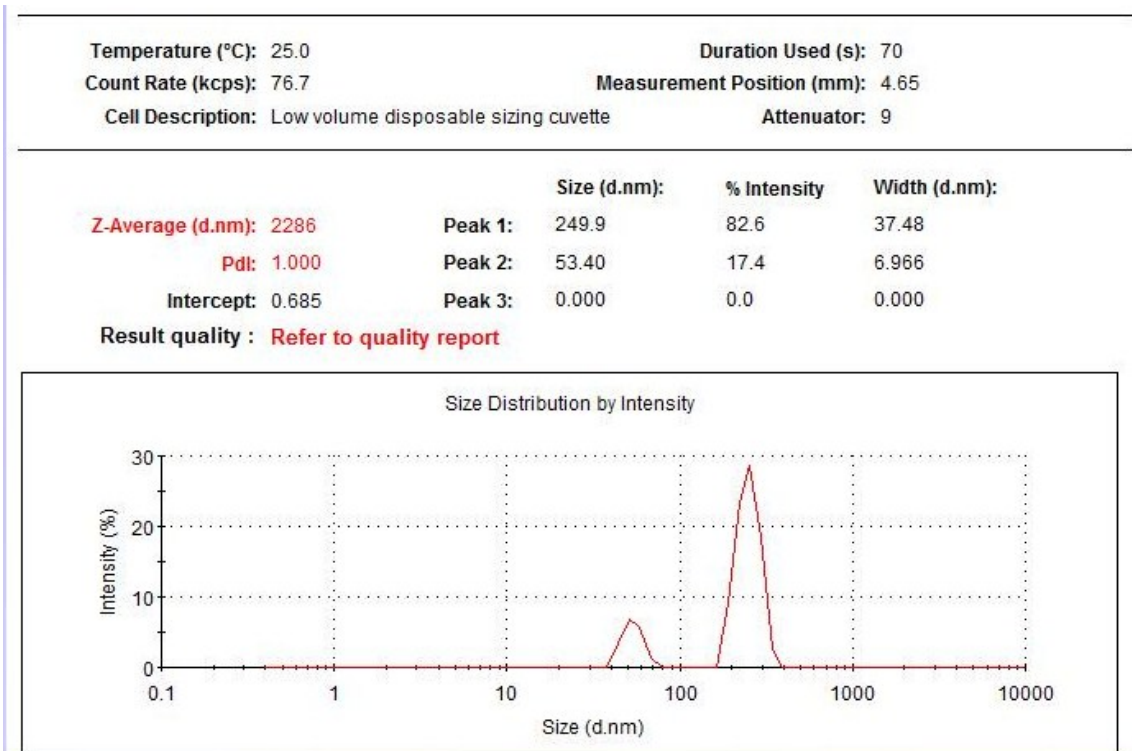
(七)、卡波姆 940 蛇床子素奈米膠漿

從新鮮製備完的結果觀察，如圖四十一~圖四十三，粒徑大小有達到適合的大小，且經過靜置 24 小時，也沒有發現析出或者是沉澱現象。

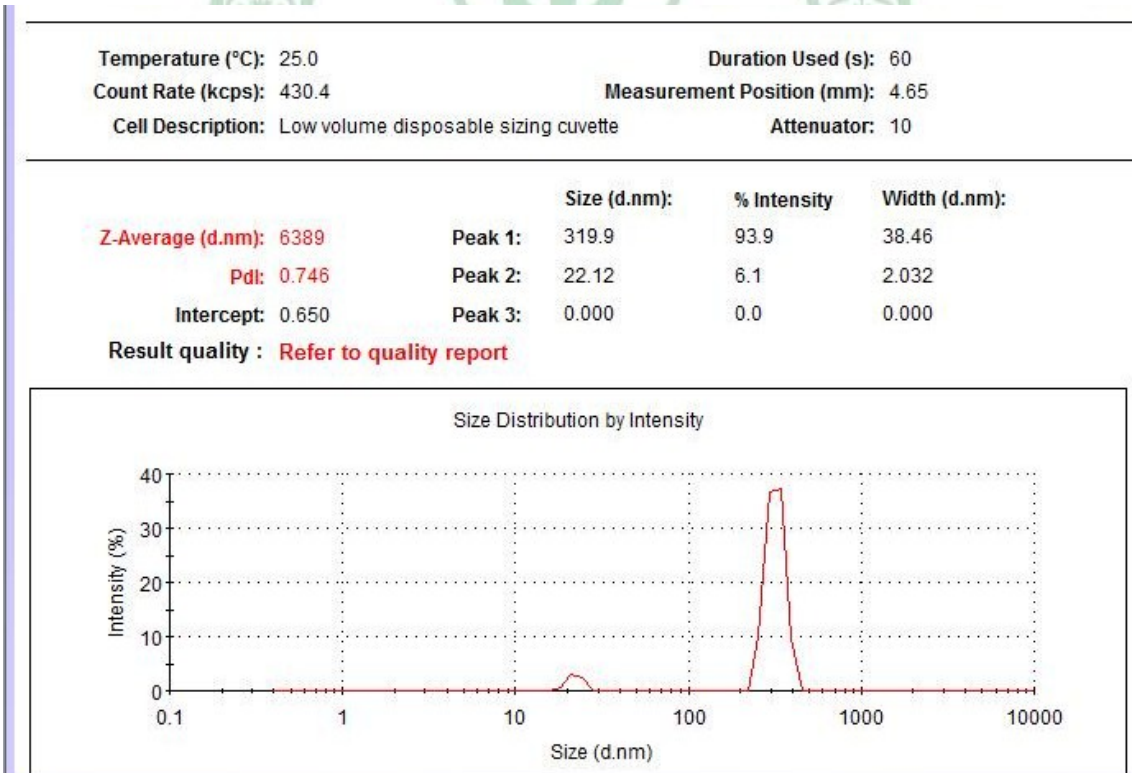
24 小時後的測定結果如圖四十四~圖四十六，結果顯示，粒徑有增大的現象，但是偵測到的平均粒徑大小仍然是保持在幾百奈米的等級，所以卡波姆 940 是一個不錯選擇。



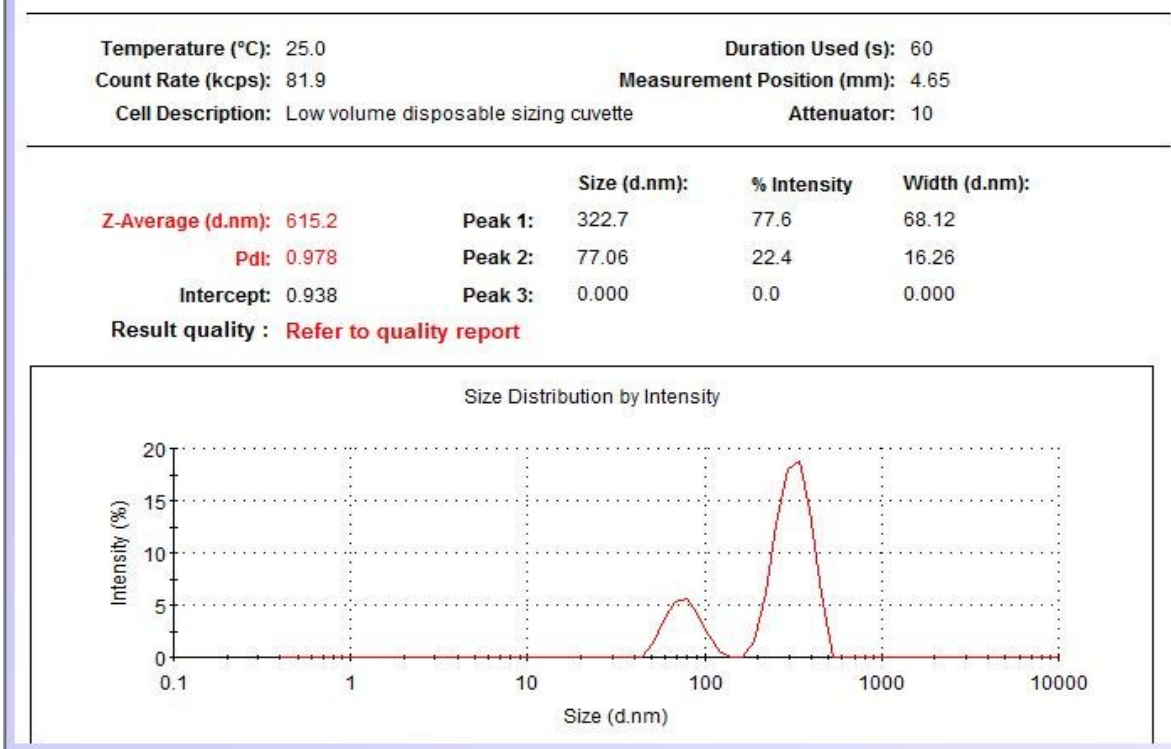
圖四十一、卡波姆 940 蛇床子素奈米膠漿粒徑測定結果。



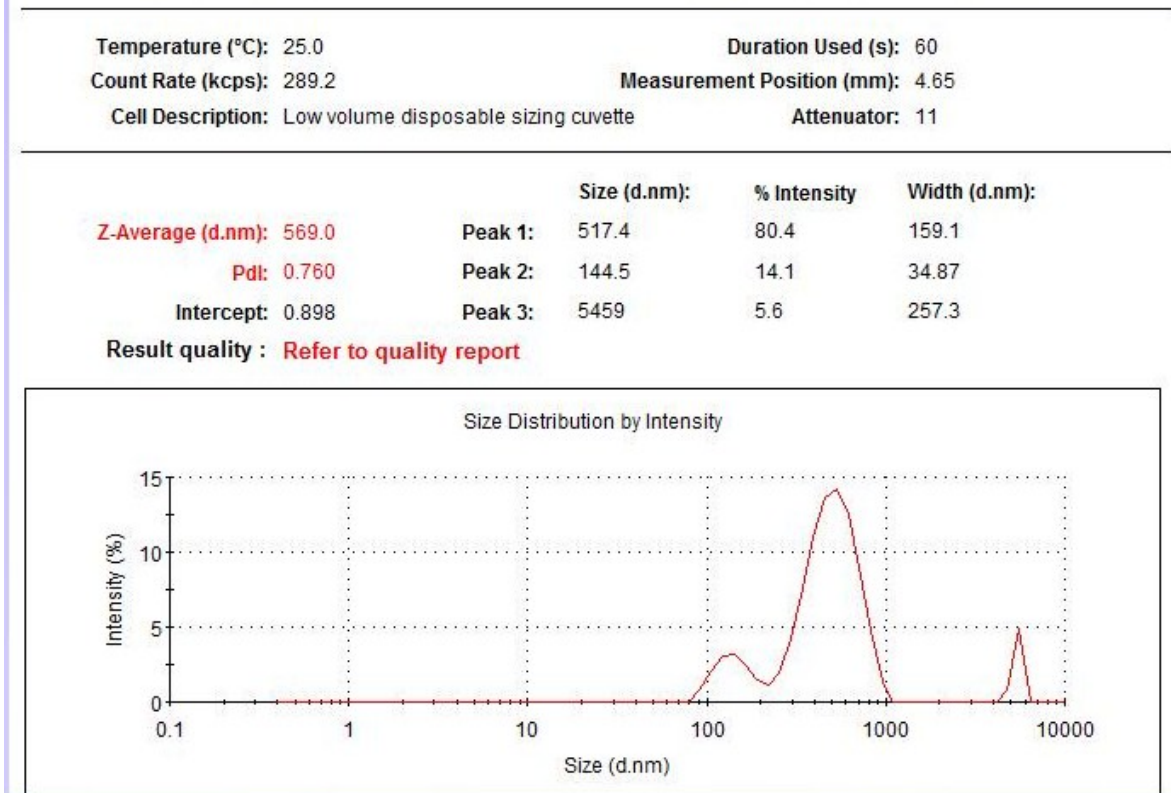
圖四十二、卡波姆 940 蛇床子素奈米膠漿粒徑測定結果。



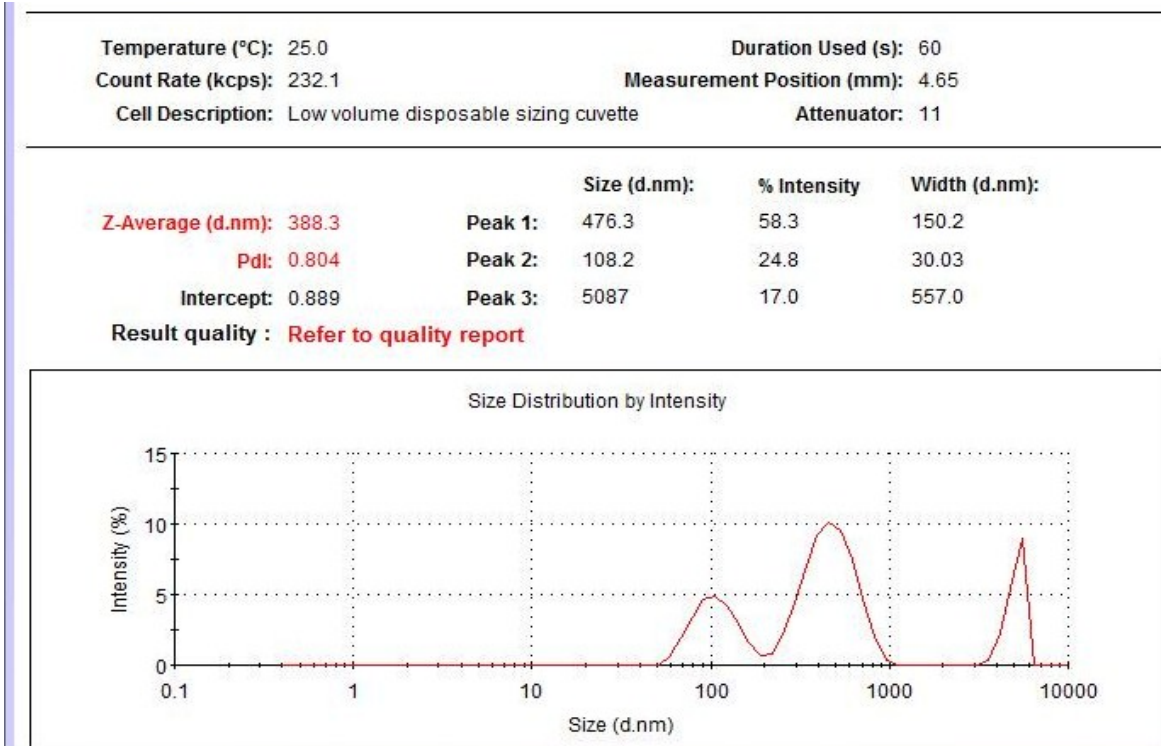
圖四十三、卡波姆 940 蛇床子素奈米膠漿粒徑測定結果。



圖四十四、卡波姆 940 蛇床子素奈米膠漿 24 小時後粒徑測定結果。



圖四十五、卡波姆 940 蛇床子素奈米膠漿 24 小時後粒徑測定結果。



圖四十六、卡波姆 940 蛇床子素奈米膠漿 24 小時後粒徑測定結果。

(八)、蛇床子素奈米膠漿的製備

實驗過程中，因為酒精使用的關係，已經先行去除很大部分跟酒精配伍禁忌的增稠劑，另外，增稠劑的濃度也容易影響結果，膠體太黏稠，會導致蛇床子素加入時無法攪動，不能均勻快速分散，而膠體如果過稀，蛇床子素加入的時候，液體表面很快出現細小的結晶析出，而且凝絮沉降的速度會很快。

不同於先行混合製造蛇床子素奈米油滴微粒的方法²⁹，是直接滴加蛇床子素進入膠體中，蛇床子素並沒有包覆在微粒中，所以進行實驗的增

稠劑，如聚維酮和低濃度結蘭膠，蛇床子素會出現析出沉澱的狀況。

扣除靜置會析出，以及不會析出但是粒徑大小過大的增稠劑，本實驗中所使用的增稠劑，根據上述各粒徑圖的結果及下方偵測結果的平均粒徑(表格二)，得知，卡波姆 940 是最適合於此種奈米化的方法的增稠劑。

表二、空白組以及各膠漿測得平均粒徑大小。

n=3 膠體種類	第一次	第二次	第三次
空白組	264 nm	202 nm	154 nm
聚維酮	1130 nm	766 nm	1053 nm
果膠	製備失敗	製備失敗	製備失敗
甲基纖維素	粒徑過大無法偵測	粒徑過大無法偵測	粒徑過大無法偵測
羧甲基纖維素鈉	粒徑過大無法偵測	粒徑過大無法偵測	粒徑過大無法偵測
結蘭膠 0.75%	粒徑過大無法偵測	粒徑過大無法偵測	粒徑過大無法偵測
結蘭膠 1.5%	粒徑過大無法偵測	粒徑過大無法偵測	粒徑過大無法偵測
卡波姆 940	127 nm	249 nm	319 nm
卡波姆 940 24 小時	322 nm , 77 nm	517 nm , 144 nm , 5459 nm	476 nm , 108 nm , 5087 nm

肆、結論

超臨界流體抽提的高穿透力，可以達到從植物體中較快速進行粗分離目標化合物的效果，直接對蛇床子藥材進行抽提，利用此方法來抽提蛇床子素，不用先行浸泡藥材做抽提且不需要耗費大量溶媒，所以是一個很好的選擇。

從實驗結果來觀看，選出單次實驗的最佳條件，5 g 的蛇床子藥材，以超臨界二氧化碳流體抽提 5 次，甲醇 5 mL 當成夾帶劑，0.5 MPa 的抽提壓力，靜態抽提時間 120 分鐘，動態抽提時間 20 分鐘，萃取管溫度攝氏 100 °C 為最佳條件。

奈米膠漿的製備，從空白組結果得知此奈米化方法可行，確實可以達到奈米等級的大小，但是卻無法維持，因此需要增稠劑的幫助，從 6 種不同增稠劑的結果來看，最佳的增稠劑為卡波姆 940，蛇床子素濃度為 0.04%，卡波姆濃度為 0.25%，可以提供合適的流動性方便粒子分散，也可以保持在適當的黏稠度，讓奈米狀態維持。

伍、參考文獻

- 1、D.X. Chen, J.J. Wang, Y.Y. Jiang, T.T. Zhou, G.R. Fan, Y.T. Wu:
Separation and determination of coumarins in *Fructus cnidii* extracts by
pressurized capillary electrochromatography using a packed column with a
monolithic outlet frit. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*
2009; 50: 695-702.
- 2、Z. Jun, L.S. Xiao, W.W. Si : Micelle-mediated extraction and cloud-point
preconcentration of osthole and imperatorin from *Cnidium monnieri* with
analysis by high performance liquid chromatography. *Journal of*
Chromatography A 2008; 1200: 93-99.
- 3、尚志鈞：神農本草經校注。學苑出版社 2008；61。
- 4、中醫藥委員會網站，中草藥用藥安全網。
- 5、Merck Index 13rd 2001;1234.
- 6、C. H. Lin、周俊宏、林英超、林佳霓、余建志、湯智昕、林慧怡、魏
宗德：Osthole suppresses fatty acid synthase expression in
HER2-overexpressing breast cancer cells through modulating Akt/mTOR

pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010 ; 58: 4786-4793.

7、L. You, R. An, X. Wang, Y. Li: Discovery of novel osthole derivatives as potential anti-breast cancer treatment. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2010; 20(24): 7426-7428.

8、E. Shin, C. Lee, S.H. Sung, Y.C. Kim, B.Y. Hwang, M.K. Lee: Antifibrotic activity of coumarins from *Cnidium monnieri* fruits in HSC-T6 hepatic stellate cells. *Journal of Nature Medicine*. 2010 Nov 17; DOI 10.1007/s11418-010-0485-7.

9、J. Zhang, J. Xue, H. Wang, Y. Zhang, M. Xie : Osthole improves alcohol-induced fatty liver in mice by reduction of hepatic oxidative stress. *Phytotherapy research*. 2010; Oct 27 Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/ptr.3315.

10、F. Sun, M.L. Xie, J. Xue, H.B. Wang : Osthol regulates hepatic PPAR α -mediated lipogenic gene expression in alcoholic fatty liver murine *Phytomedicine* 2010; 17: 669-673.

11、D.Z. Tang, W. Hou, Q. Zhou, M. Zhang, J. Holz, T.J. Sheu, T.F. Li, S.D. Cheng, Q. Shi, S.E. Harris, D. Chen, Y.J. Wang: Osthole stimulates osteoblast

differentiation and bone formation by activation of beta-catenin-BMP signaling. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2010; 25(6): 1234-45.

12、W.P. Zhang, D.M. Ma, Q. Zhao, T. Ishida: The Effect of the Major Components of Fructus Cnidii on Osteoblasts In Vitro *Journal of Acupuncture and Meridian Studies* 2010; 3(1): 32–37.

13、P.L. Kuo, Y.L. Hsu, C.H. Chang, J.K. Chang: Osthole-Mediated Cell Differentiation through Bone Morphogenetic Protein-2/p38 and Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Pathway in Human Osteoblast Cells *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2005; 314(3):1290-1299.

14、P.C. Liao, S.C. Chien, C.L. Gho, Eugene I.C. Wang, S.C. Lee, Y.H. Kuo, N. Jeyashoke, J. Chen, W.C. Dong, Louis K.P. Chao, K.F. Hua: Osthole regulates inflammatory mediator expression through modulating NF- κ B, mitogen-activated protein kinases, protein kinase C, and reactive oxygen species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010; 58(19): 10445-10451.

15、T. Nakamura, N. Kodama, Y. Arai, T. Kumamoto, Y. Higuchi, C. Chaicha, T. Ishikawa, K. Ueno, S. Yan: Inhibitory effect of oxycoumarins isolated from the Thai medicinal plant *Clausena guillauminii* on the inflammation mediators, iNOS, TNF- α , and COX-2 expression in mouse macrophage RAW 264.7 *Journal of Natural Medicine* 2009;63:21-27.

16、H. Matsuda, N. Tomohiro, Y. Ido, M. Kubo: Anti-allergic effects of *Cnidii Monnieri* fructus (dried fruits of *Cnidium monnieri*) and its major component, Osthol. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 2002; 25(6): 809-812.

17、H.J. Ji, J.F. Hu, Y.H. Wang, X.Y. Chen, R. Zhou, N.H. Chen: Osthole improves chronic cerebral hypoperfusion induced cognitive deficits and neuronal damage in hippocampus. *European Journal of Pharmacology* 2010; 636(1-3): 96-101.

18、X.D. Chao,¹ Jun Zhou,¹ T. Chen,¹ W.B. Liu,¹ W.P. Dong, Y. Qu, X.F. Jiang, X.T. Ji, H.N. Zhen, Z. Fei: Neuroprotective effect of Osthole against acute ischemic stroke on middle cerebral ischemia occlusion in rats *Brain Research* 2010; 1363: 206-211.

19、K.Y. Wang, L. Yao, Y.H. Du, J.B. Xie, J.L. Huang, Z.Q. Yin : Anthelmintic activity of the crude extracts, fractions, and Osthole from radix angelicae pubescentis against *Dactylogyrus intermedius* in goldfish (*Carassius auratus*) in vivo. *The Journal Parasitology Research* 2011; 108(1): 195-200.

20、C.M. Wang, W. Guan, S. Fang, H. Chen, Y.Q. Li, C. Cai, Y.J. Fan, Z.Q. Shi: Antifungal activity of the Osthol derivative JS-B against *Phytophthora capsici*. *The Journal of Asian Natural Products Research*. 2010 Aug; 12(8): 672-679.

21、M.R. Okos, O. Campanella, G. Narsimhan, R.K. Singh, A.C. Weitnauer:
Handbook of Food Engineering ; Chapter 10: 711.

22、李衛民，金波，馮毅凡：中藥現代化與超臨界流體抽提技術。中國醫藥科技出版社 2002；106。

23、羅明生，高天惠，宋民憲：中國藥用輔料。化學工業出版社；523-526、571-572、608-609、625-627、815-817。

24、萬洪芸：衛生署食品資訊網；食品新知：微生物生產之食用膠簡介(上)
<http://210.69.111.56/foodnew/library/KnowledgeDetail.aspx?idCategory=126&KnowledgeID=88>。

25、B. Benova, M. Adam, P. Pavlikova, J. Fischer: Supercritical fluid extraction of piceid, resveratrol and emodin from Japanese knotweed *Journal of Supercritical Fluids* 2010; 51: 325-330.

26、孫文基，謝世昌：天然藥物成分定量分析。中國醫藥科技出版社；333。

27、典靈輝，吳鐵，崔燎：蛇床子二氧化碳超臨界抽提物中有效成分的

含量測定。時珍國醫國藥；2009年；20卷第4期。

28、余建志：蛇床子素之分離與蛇床子作為抗陰道滴蟲製劑之研發。民國90年。

29、洪珮雯：Osthole 奈米粒子之製備及其性質探討。民國94年。

