

行政院農業委員會林務局委託研究計畫系列 98-00-5-26

桃花心木保健食品之開發研究

Liver damage protective and antioxidant
phytonutrients from *Swietenia macrophylla* King



委託機關：行政院農業委員會林務局

執行機關：台北醫學大學

中華民國 98年 12月

目 錄

目錄.....	I
圖表目錄.....	II
摘要.....	III
壹、計畫前言.....	1
貳、工作項目.....	4
參、材料與方法.....	5
一、實驗材料.....	5
二、實驗方法.....	7
肆、結果與討論.....	18
一、甲醇萃取物之各劃分部之自由基清除活性測試.....	18
二、甲醇萃取物之各劃分部之總還原能力測試.....	19
三、甲醇萃取物之各劃分部之抑制超氧陰離子測試.....	20

四、	甲醇萃取物之各劃分部之清除超氧陰離子測試.....	21
五、	甲醇萃取物之各劃分部之螯合鐵離子能力.....	22
六、	甲醇萃取物之各劃分部之體外保肝活性.....	23
七、	甲醇萃取物之丙酮劃分部之體內保肝活性.....	24
伍、	結論.....	26
陸、	工作進度.....	27
一、	預定時程與完成項目.....	27
二、	工作執行進度.....	29
柒、	參考文獻.....	30
捌、	審查委員意見回應表.....	32

圖表目錄

圖 1. 用大葉桃花心木葉所做成的樂器.....	2
圖 2. 大葉桃花心木葉所做成的家具.....	2
圖 3. 大葉桃花心木葉，經測量長度為 21.7 (cm)	8
圖 4. 大葉桃花心木葉，經測量長度為 16.1 (cm)	8
圖 5. 低溫鼓風乾燥箱.....	8
圖 6. 乾燥後之大葉桃花心木葉.....	8
圖 7. 恆溫回流水浴萃取鍋.....	8
圖 8. 旋轉減壓濃縮機.....	8
圖 9. 大葉桃花心木葉之保肝萃取物及劃分部之分離示意圖.....	10
圖 10. 自由基清除實驗簡圖.....	11
圖 11. 總還原能力實驗簡圖.....	12
圖 12. 抑制超氧陰離子實驗簡圖.....	13

圖 13.清除超氧陰離子實驗簡圖.....	14
圖 14.螯合鐵離子能力實驗簡圖.....	15
圖 15.體外保肝活性實驗簡圖.....	16
圖 16.體內保肝活性實驗簡圖.....	17
表 1. 甲醇萃取物之各劃分部之自由基清除效率.....	18
表 2. 甲醇萃取物之各劃分部之總還原能力.....	19
表 3、甲醇萃取物之各劃分部之抑制超氧陰離子能力.....	20
表 4、甲醇萃取物之各劃分部之清除超氧陰離子能力.....	21
表 5、甲醇萃取物之各劃分部之螯合鐵離子能力.....	22
表 6、甲醇萃取物之各劃分部之體外保肝活性.....	23
表 7、甲醇萃取物之丙酮劃分部之體內保肝活性.....	24
表 8、工作執行進度甘特圖.....	29
表 9、林務局歷年抗氧化活性比較表.....	34

摘要

大葉桃花心木之原產地位於中南美洲地區，樹幹質地堅硬，色澤呈桃紅色且紋理瑰麗，令人賞心悅目，故中文稱它為大葉桃花心木，於台灣的桃花心木絕大多數皆是大葉桃花心木，因其生長期短，約栽種 12 年即可開花結果，在家具材料上，大葉桃花心木已成為世界著名的家具用材，而大葉桃花心木一詞幾乎已經成為高級家具之同義字，大葉桃花心木於樹幹部份已有廣泛應用，唯枝葉利用於保健醫療效果尚待開發，以利進一步提升大葉桃花心木之經濟價值與林務局林木資源開發與應用。將大葉桃花心木葉以甲醇萃取後，再分別以正己烷 (n-Hexane)、乙酸乙酯 (Ethyl Acetate)、丙酮 (Acetone)、甲醇 (Methanol) 萃取，所得之萃取物進行清除自由基活性測試，分別獲得 IC50 ($\mu\text{g/ml}$) 為：23.63、16.79、6.01、4.65。總還原能力測試，每毫克之正己烷、乙酸乙酯、丙酮與甲醇相當於 Trolox 的含量分別為：82.56 (微克)、101.46 (微克)、97.55 (微克)、88.77 (微克)。於體外保肝活性 (抑制肝臟粒線體脂質過氧化) 之 IC50 ($\mu\text{g/ml}$) 分別為：105.52、58.16、29.86、50.75。整體而言，大葉桃花心木葉的四個劃分部極具有自由基清除與抗氧化潛力，綜合以上結果，丙酮劃分部有最佳抗氧化能力，故進一步以丙酮劃分部測定體內保肝活性。結果顯示，丙酮劃分部於 100 (mg/Kg) 之劑量下，能明顯降低血清中 GOT、GPT 值，證實大葉桃花心木葉具有保肝活性。

關鍵字：大葉桃花心木、抗氧化、清除自由基、脂質過氧化、四氯化碳

Abstract

For the Taiwanese plants diversity research and the possible antioxidant activity of polyphenol bioresources were survey by ferric chloride reaction. Leaves of *Swietenia macrophylla* King is considered to play an important role as dietary antioxidants for the defense against free radicals. The leaves were extracted with methanol. Furthermore, the methanol extract was fractionated. The fractions were concentrated to dryness under reduced pressure using a vacuum rotary evaporator. The results of each fractions showed, especially, the MeOH fraction indicated the highest DPPH scavenging (IC₅₀ of each fraction is MeOH: 4.65, acetone: 6.01; n-hexane: 23.63 and EtOAc: 16.79 μ g/ml). But, the potency of ferric reducing antioxidant power (trolox equivalent of each fraction is EtOAc fraction: 101.46 > acetone fraction: 97.55 > MeOH fraction: 88.77 > n-hexane: 82.56 μ g/mg). Otherwise, on the rat mitochondria lipid peroxidation assay, acetone fraction exerted a significantly different from the control group (IC₅₀ is 29.86 μ g/ml). The results suggest that acetone fraction had the highest hepatoprotective activity.

Keyword: *Swietenia macrophylla* King, free radicals scavenging, antioxidation, carbon tetrachloride

研究團隊說明

計畫主持人：楊玲玲

所屬機關：台北醫學大學 藥學系

職稱：教授

學歷：日本名古屋市立大學藥學博士

台北醫學大學藥學系學士

經歷：國立嘉義大學生命科學院院長

教育部醫學教育委員會委員

研究領域

1. 中草藥之腦神經保護

2. 抗癌天然物

3. 保肝中草藥之研究

4. 台灣式安寧照顧

5. 活性天然物化學

6. 腎保護之中草藥

兼任研究助理：王啟任

所屬機關：台北醫學大學 生藥學研究所

職稱：學生

壹、計畫前言

大葉桃花心木葉之原產地位於中南美洲地區，樹幹質地堅硬，色澤呈桃紅色且紋理瑰麗，令人賞心悅目，故中文稱它為大葉桃花心木葉，公元 1809 年自宏都拉斯引進台灣栽種；目前在台灣各地栽植越來越普遍，高雄縣選他為縣樹；在其原產地的「多明尼加」將桃花心木推舉為國花（張育森、陳韶妤, 2003）。大葉桃花心木在植物分類學上屬於木蘭綱；無患子目；楝科；桃花心木屬，同一屬之植物約有 23 種，其中的 2 種於台灣校園與南部地區較為普遍栽種，分別是桃花心木 (*Swietenia mahagoni* (L.) Jacq.) 和大葉桃花心木 (*Swietenia macrophylla* King)，這兩種植物於形態學上極為相似，主要的差別在於葉子的大小，桃花心木屬的葉子皆是羽狀複葉，羽狀複葉內的葉子稱為小葉，前者之小葉長度約 3 到 7.5 公分，後者之小葉長度約 9 到 21 公分，此次則是針對大葉桃花心木葉進行研究，於台灣的桃花心木絕大多數皆是大葉桃花心木，因其生長期短，約栽種 12 年即可開花結果，而小葉桃花心木則因生長較緩慢而少被栽種，大葉桃花心木有極高的商業價質，由於其質地堅硬、不易彎曲變形且耐磨損，因此很容易進行加工製造(Gillies *et al.*, 1999)，目前市面上常用來製做傢俱及壁板等，品質高雅，且成品帶有華麗的紅褐色或金褐色，是一種非常好的木材，由於生長快速，台灣林業界亦廣為推廣栽種，台灣南部與校園中可較常看到他高大的身影。

大葉桃花心木目前廣泛的被應用於造林、行道樹、庭園樹、高級傢俱、器具、建材、船艦裝潢、樂器（如：製作鋼琴、六弦琴等高級樂器）等，在家具材料上，大葉桃花心木已成為世界著名的家具用材 (Gullison *et al.*, 2008)，而大葉桃花心木一詞幾乎已經成為高級家具之同義字。大葉桃花心木之心材常具桃紅色波紋，其紋理變化多端，故在設計師的巧手下產品亦多采多姿，因大葉桃花心木價格昂貴，故有將其它木材偽裝成類似大葉桃花心木的材質，但事實上並非真正的大葉桃花心木 (Melissa *et al.*, 2008)，因其高度的商業價值，因此造林中最應該被重視的即是大葉

桃花心木的栽植，原產地在熱帶的小葉桃花心木（如：西印度群島地區，中美洲、南美洲、非洲之奈及利亞等），在台灣亦有小面積人工栽培林，而目前於台灣主要栽植的是大葉桃花心木，木材性質用途兩者大致相同，心材皆能以各色各樣的色調（如：紅、黃、漂白、光亮或無光等）進行塗裝，如在其上塗以無色之蜂蠟，則漸漸成為淡褐色，大葉桃花心木能迅速吸收無色光線，磨擦油質塗裝及光亮而質硬之亮漆塗裝，由於其具備多種優良性質，例如美觀、紋理花樣多、適於塗裝、質地穩定而又易於割削及雕刻，較許多木材柔軟而以重量比較，其強度卻相當大，大葉桃花心木板較其它大多數闊葉樹材缺點為少 (Nick *et al.*, 2003)，故製造容易，利用率高，此外，其產量相當豐富，真正大葉桃花心木所製成之家具及單板，毫無疑問，其品質確實優良，木材價格雖高，然因耗廢材料少，且可鋸製成大料，接合較少，故成本較其它闊葉樹材實際上為低，因其性質優良，木理均勻，故可平削成薄單板，又其開放之導管孔，使膠合容易牢固，大葉桃花心木只需定期噴蠟或擦蠟即可使其煥然一新。



圖 1、用大葉桃花心木所做成的樂器

(摘自：<http://www.lookguitar.com>)



圖 2、大葉桃花心木所做成的家具

(摘自：<http://www.yuexing-home.com/index.aspx>)

大葉桃花心木於樹幹部份已有廣泛應用，唯枝葉利用於養生醫療效果尚待開發，以利進一步提升大葉桃花心木之經濟價值與林務局林木資源開發與應用。本計畫擬將大葉桃花心木葉以甲醇萃取後，再分別以正己烷(**n-Hexane**)、乙酸乙酯(**Ethyl Acetate**)、丙酮(**Acetone**)、甲醇(**Methanol**)萃取，所得之萃取物進行自由基與抗氧化活性評估，並將最有效之劃分部更進一步的進行四氯化碳(**CCl₄**)誘導大(小)白鼠急性肝損傷的實驗動物模式，探討大葉桃花心木葉有效之萃取部分處理對於大(小)白鼠急性肝損傷保護之影響。

貳、工作項目

- 一、大葉桃花心木葉之採集鑑定、乾燥、粉碎、萃取技術之建立。
- 二、大葉桃花心木葉之保肝萃取物及劃分部之分離。以甲醇萃取後，再分別以正己烷 (n-Hexane)、乙酸乙酯 (Ethyl Acetate)、丙酮 (Acetone)、甲醇 (Methanol) 萃取。
- 三、甲醇萃取物之各劃分部之自由基清除活性測試 (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging, DPPH)。
- 四、期中報告。
- 五、甲醇萃取物之各劃分部之抗氧化活性測試。測試項目包含：
 - (1) 抑制超氧陰離子 (Superoxide anion radical inhibition)
 - (2) 清除超氧陰離子 (Superoxide anion radical scavenging)
 - (3) 總還原能力測定 (Ferric reducing ability of plasma, FRAP)
 - (4) 螯合鐵離子能力 (Ferrous ion chelating)
- 六、體外保肝活性之測定。
- 七、體內保肝活性之測定。
- 八、期末報告

參、材料與方法

一、實驗材料

(一)、植物材料

本計畫所取得的植物樣品來自於台南縣後壁鄉之大葉桃花心木葉

(二)、試藥及試劑

1. DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Sigma, Germany)
2. Gallic acid (Sigma, Germany)
3. 試藥級甲醇 (Merck, Germany)
4. Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma, France)
5. 二次水
6. 2,4,6-Tris(2-pyridyl-s-triazine) (TPTZ) (Sigma, Switzerland)
7. Sodium acetate, anhydrous (CH_3COONa) (J. T. Baker, U.S.A.)
8. Acetic acid (J. T. Baker, U.S.A.)
9. Iron(III) chloride hexahydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Sigma, Germany)
10. Trolox (Sigma, U.S.A.)
11. Bovine serum albumin (BSA) (Sigma, U.S.A.)
12. Ferrous chloride (FeCl_2) (Aldrich, Germany)
13. Phosphoric acid (H_3PO_4) (Riedel-deHaen, Germany)
14. Protein assay dye reagent (Bio-Rad, U.S.A)
15. Silymarin (Sigma, China)
16. Sodium hydroxide (NaOH) (J. T. Baker, Sweden)
17. 1,1,3,3-Tetraethoxypropane (TEP) (Sigma, U.S.A.)
18. 2-Thiobarbituric acid (TBA) (Sigma, U.S.A.)
19. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) (Merck, Germany)
20. Sodium chloride (J. T. Baker, USA)

21. Xanthine oxidase (Sigma, USA)
22. Xanthine (Sigma, USA)
23. 2,4,6-Tris(2-pyridyl-s-triazine) (TPTZ) (Sigma, Switzerland)
24. Ferrous chloride (FeCl_2) (Aldrich, Germany)
25. Sodium acetate, anhydrous (CH_3COONa) (J. T. Baker, USA)
26. 3-(2-pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-4',4''-di-sulfonic acid sodium salt (Ferrozine) (Sigma, Canada)

(三)、儀器

1. 低溫迴流水浴萃取鍋 (6 Channel, WB6P)
2. 恆溫鼓風乾燥機 (中全儀器, CH-100)
3. 旋轉減壓濃縮機 (Eyela, SB-1000)
4. 酵素免疫分析儀 (*ELISA reader*) (μ -Quant, Bio-Tek instruments, INC.)
5. 電子天秤 (AND, FX-200)
6. 電子混合器 (MS-1000, Digisystem LAB. Instruments, INC.)
7. 微量滴管 (Nichiryo)
8. 96孔細胞培養盤 (Falcon)
9. 圓底萃取瓶 (Eyela)
10. 冷凍真空乾燥機 (Savant, SVC100H)
11. 微量天秤 (Sartorius, CP225D)
12. 超音波震盪器 (Branson, 5510)
13. 低溫離心機 (Labnet, C0160-R)
14. 純水製造機 (Millipore)
15. 電磁加熱磁力攪拌器 (HS 30, U.S.A.)
16. pH meter (Jenco, Microcomputer pH-Vision 6071)
17. Electric incubator (Kwang Shen, KS-32)
18. Water bath (6 Channel, WB6P)
19. Micro shaker (MS-1000, Digisystem LAB. instruments, INC.)

二、實驗方法

(一)、大葉桃花心木葉之採集鑑定、乾燥、粉碎、萃取技術之建立

本計畫實驗樣本取自台南縣後壁鄉之大葉桃花心木葉，經測量葉片約九到二十一公分（見圖 3 及圖 4），以圖鑑比對（章錦瑜, 2004）其形態學，判定為大葉桃花心木葉（*Swietenia macrophylla* King），將自台南縣後壁鄉取得的大葉桃花心木葉之葉子洗淨，並以衛生紙擦乾，放入 40°C 之低溫鼓風乾燥箱中，鼓風乾燥三天，三天後自乾燥箱中取出，將乾燥後的大葉桃花心木葉子立刻置於高轉速電子粉碎機中，進行粉碎十五分鐘，待其完全研磨成粉狀，精秤大葉桃花心木葉粉五十公克（剩餘粉末置於密封保鮮瓶並儲藏於乾燥箱中），放入圓底萃取瓶中，加入十倍(體積/重量)體積之甲醇，分批進行迴流萃取二次，每次達六小時，趁熱迅速以濾紙抽真空過濾，合併分批萃取之濾液經旋轉減壓濃縮機，濃縮至十分之一的體積後，進行冷凍乾燥二十四小時，置於乾燥箱保存（Kumaran *et al.*, 2006），以供實驗使用。



圖 3、大葉桃花心木葉，經測量長度為 21.7 (cm)



圖 4、大葉桃花心木葉，經測量長度為 16.1 (cm)



圖 5、恆溫鼓風乾燥箱



圖 6、乾燥後之大葉桃花心木葉



圖 7、低溫回流水浴萃取鍋



圖 8、旋轉減壓濃縮機

(二)、大葉桃花心木葉之保肝萃取物及劃分部之分離

取出乾燥箱中之大葉桃花心木葉冷凍乾燥樣品，精秤甲醇之凍乾樣品二公克，放入圓底萃取瓶中，加入十倍（體積/重量）體積之正己烷，分批進行迴流萃取二次，每次達六小時，趁熱迅速以濾紙抽真空過濾（殘渣以乙酸乙酯進行萃取，於下段中介紹），合併分批萃取之濾液經旋轉減壓濃縮機，濃縮至十分之一的體積後，進行冷凍乾燥二十四小時，置於乾燥箱保存，以供實驗使用 (Rajbir *et al.*, 2008)。

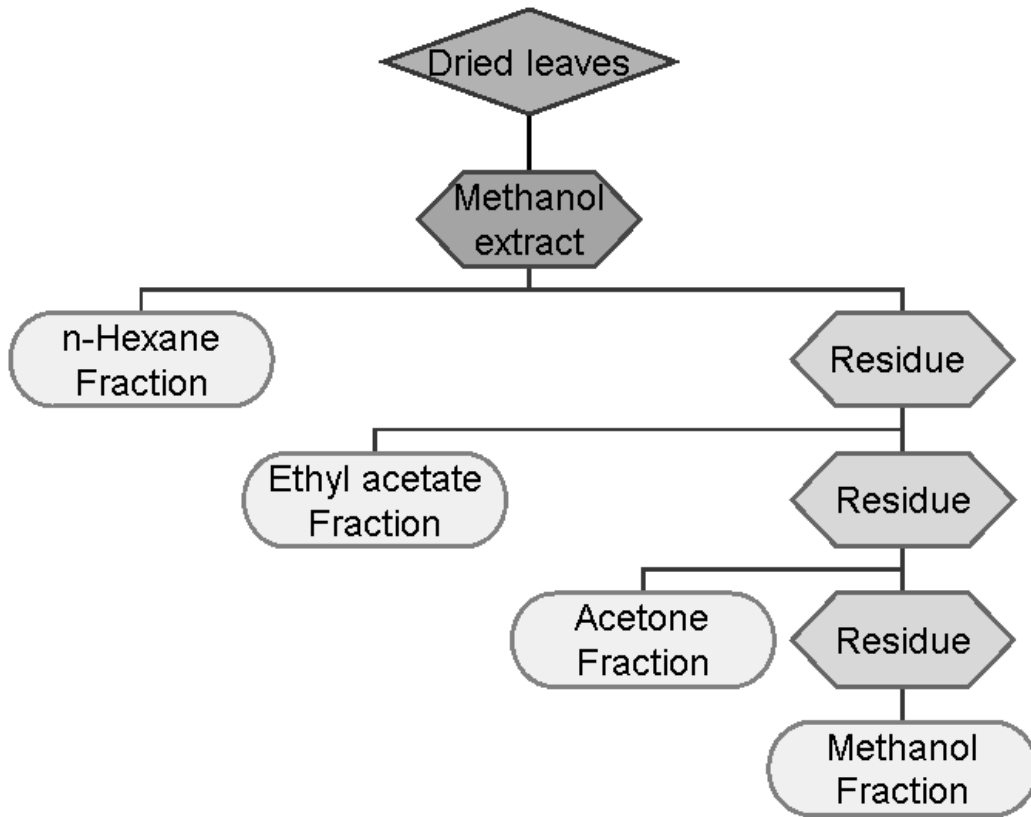
將上述殘渣秤重，加入十倍（體積/重量）體積之乙酸乙酯，分批進行迴流萃取二次，每次達六小時，趁熱迅速以濾紙抽真空過濾（殘渣以丙酮進行萃取，於下段中介紹），合併分批萃取之濾液經旋轉減壓濃縮機，濃縮至十分之一的體積後，進行冷凍乾燥二十四小時，置於乾燥箱保存，以供實驗使用。

將上述殘渣秤重，加入十倍（體積/重量）體積之丙酮，分批進行迴流萃取二次，每次達六小時，趁熱迅速以濾紙抽真空過濾（殘渣以甲醇進行萃取，於下段中介紹），合併分批萃取之濾液經旋轉減壓濃縮機，濃縮至十分之一的體積後，進行冷凍乾燥二十四小時，置於乾燥箱保存，以供實驗使用。

將上述殘渣秤重，加入十倍（體積/重量）體積之甲醇，分批進行迴流萃取二次，每次達六小時，趁熱迅速以濾紙抽真空過濾，合併分批萃取之濾液經旋轉減壓濃縮機，濃縮至十分之一的體積後，進行冷凍乾燥二十四小時，置於乾燥箱保存，以供實驗使用。（以上敘述，有關甲醇萃取物之各劃分部之分離，請參見圖 9 之分離示意圖。）

分別精秤二十毫克上述甲醇萃取物之各劃分部之正己烷、乙酸乙酯、丙酮與甲醇萃取物，放入樣品瓶中，溶解於一毫升之 Dimethyl sulfoxide (DMSO)，置於 4°C 冰箱，低溫冷藏，進行下列生物活性測定。

圖 9、大葉桃花心木葉之保肝萃取物及劃分部之分離示意圖

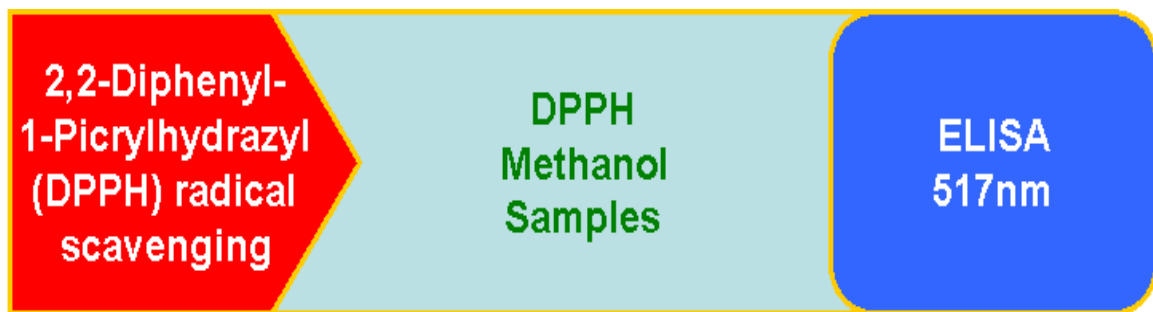


(三)、甲醇萃取物之各劃分部之自由基清除活性測試

人體內的脂質在自我氧化的過程中會產生帶有單電子的自由基 (radical)，進而造成脂質的酸敗，而常見的抗氧化物是透過提供氫原子 (hydrogen)，以清除脂質酸敗所產生的脂質過氧化物自由基，達到抑制發生自由基之連鎖反應的進行。

在自由基清除活性的研究上，較常被使用的是DPPH，事實上DPPH是一種穩定的自由基可以接受電子或者氫原子 (Gutteridge, 1993)，因此可用來評估抗氧化物的提供氫原子或電子之能力，參考Miliauskas等 (2004) 之方法，將待測大葉桃花心木葉甲醇萃取物之各劃分部配成濃度為200(μg/ml)，於96孔盤內，將甲醇萃取物之各劃分部(100μl)與DPPH(100μl)進行混合，DPPH 在波長 517 nm下有較強的吸光值 (Lamaison *et al.*, 1992)，並以Gallic acid作為標準品，Gallic acid是一種有機酸，常用來測試多酚類的含量 (Slinkard *et al.*, 1977)，普遍的存在於茶葉、葡萄等的綠色植物與水果中 (Fiuza *et al.*, 2004)，把樣品或標準品與DPPH混合後，因為樣品會清除自由基造成吸光值的降低可藉此算出清除率，吸光值越低表示抗氧化物質之還原力越強。

圖 10、自由基清除實驗簡圖

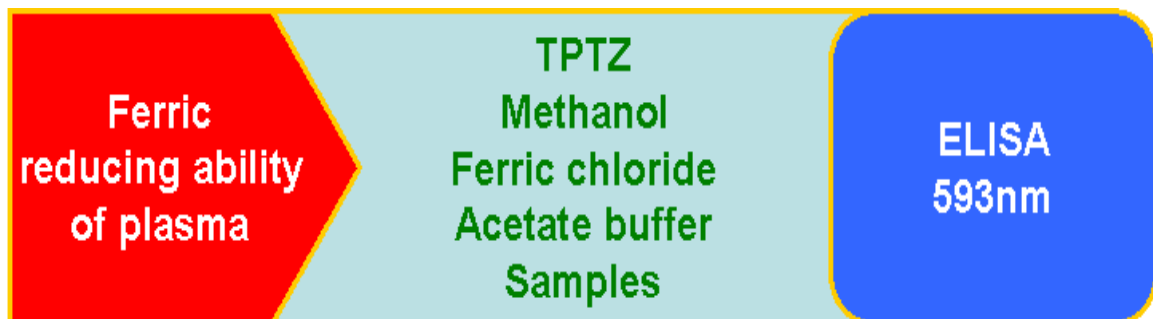


(四)、甲醇萃取物之各劃分部之總還原能力測試

總還原能力法並非利用樣品中的抗氧化物來清除特定的自由基，而是以樣品整體的還原能力作為抗氧化力。於酸性環境(pH 3.6 以下)，FRAP 試劑中的三價鐵(Fe³⁺)會因抗氧化物質的作用而還原成二價鐵(Fe²⁺)，利用 TPTZ (2,4,6,-tripyridyl-*s*-triazine) 的呈色特性可測得樣品的還原能力 (Carlos *et al.*, 2008) 。

各種樣品的還原能力 (Ferric reducing ability of plasma, FRAP) 是經由電子傳遞，將黃色 Fe³⁺-TPTZ 化合物還原成藍色 Fe²⁺-TPTZ 化合物，參考 Benzie 與 Strain (1996) 之方法，將大葉桃花心木葉甲醇萃取物之各劃分部與 acetate buffer、TPTZ、Ferric chloride 進行混合，混合均勻後以微量滴管置於 96 孔盤中，在波長 593nm 可以測定抗氧化物之還原力，還原力越強表示抗氧化能力越好，Trolox 為水溶性之維他命 E，常被用於抗氧化之標準品 (Robin *et al.*, 1999) ，實驗結果以每毫克之樣品相當於標準品 (Trolox) 之微克數。

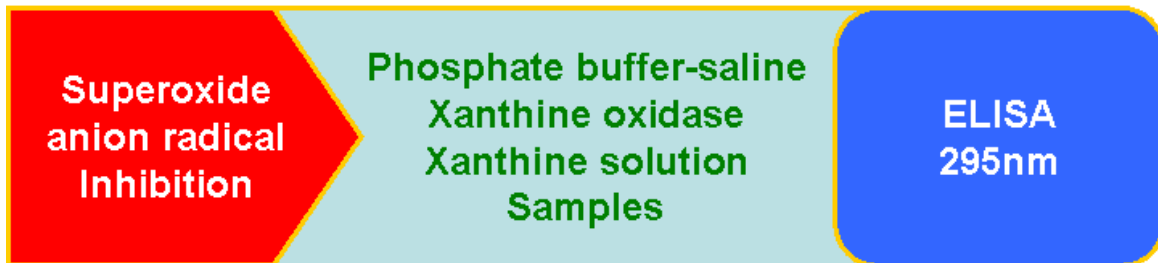
圖 11、總還原能力實驗簡圖



(五)、甲醇萃取物之各劃分部之抑制超氧陰離子測試

當兩個化合物：黃嘌呤 (Xanthine)與黃嘌呤氧化酶 (Xanthine oxidase)交互作用後，轉變為尿酸 (Uric acid)，同時間也會產生超氧陰離子 ($\cdot\text{O}^2$) 及過氧化氫 (H_2O_2)。參考 Kong 等 (2000) 之方法，由於尿酸在波長 295nm 有最大吸收波，此實驗是透過樣品抑制黃嘌呤氧化酶，若抑制的作用越強，則尿酸的吸光值越低，所以可以利用尿酸吸光質之變化，評估樣品抑制黃嘌呤氧化酶之活性。

圖 12、抑制超氧陰離子實驗簡圖



(六)、甲醇萃取物之各劃分部之清除超氧陰離子測試

使用化學試劑產生超氧陰離子，參考 Jadwiga 等 (1987) 之方法，這是採用非酵素系統產生超氧陰離子，再以 Nitro blue tetrazolium chloride (NBT)來監測樣品清除超氧陰離子的能力。由兩個化學試劑：Phenazine methosulphate (PMS)與 β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide, reduced form (NADH)交互作用後產生超氧陰離子，再利用 NBT 還原成 Diformazan，Diformazan 在 560nm 有最大吸光值，藉由檢測 560nm 吸光值的變化，分析超氧陰離子被清除的效率，吸光值愈低，表示清除率愈高。

圖 13、清除超氧陰離子實驗簡圖



(七)、甲醇萃取物之各劃分部之螯合鐵離子能力

參考Dinis等 (1994) 之方法，自然界中存在促進酯質氧化作用的許多金屬離子中，尤以 Fe^{2+} 最具有影響力，是強的促氧化劑。參考Dinis等(1994)之方法。 Fe^{2+} 與 Ferrozine螯合會形成Ferozine- Fe^{2+} 之錯合物，此錯合物會增加吸光值，然而當樣品萃取物能與 Fe^{2+} 螯合時則會降低Ferozine- Fe^{2+} 的含量，進而降低吸光值，藉由此方法可以得知樣品萃取物螯合 Fe^{2+} 的能力。

利用 Fe^{2+} 與 Ferrozine 生成之複合物在波長 562 nm 下有最大吸收波，可以測定評估樣品對 Fe^{2+} 之螯合能力。

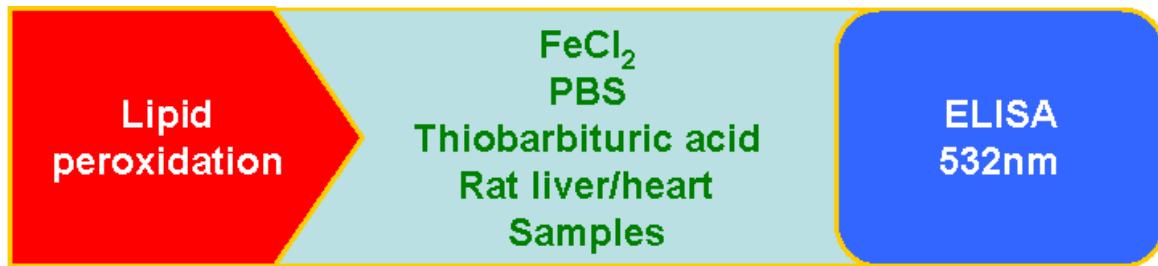
圖 14、螯合鐵離子能力實驗簡圖



(八)、甲醇萃取物之各劃分部之體外保肝活性

參考 Wong 等 (1987) 之方法，當超氧自由基遇到不飽和脂肪酸時，會使此不飽和脂肪酸形成新的自由基，此自由基再去與其他不飽和脂肪酸反應，進而造成脂肪酸的連鎖反應，此被稱為脂質過氧化反應，細胞膜是由脂質所構成，而細胞膜的脂質過氧化會降低膜的通透性、離子梯度無法維持，使細胞功能損壞，導致細胞腫大、組織發炎等病徵。丙二醛(malondialdehyde, MDA)：為脂質過氧化的最終產物，我們藉由觀察丙二醛含量的多寡可以用來評估個體受到氧化傷害的程度。

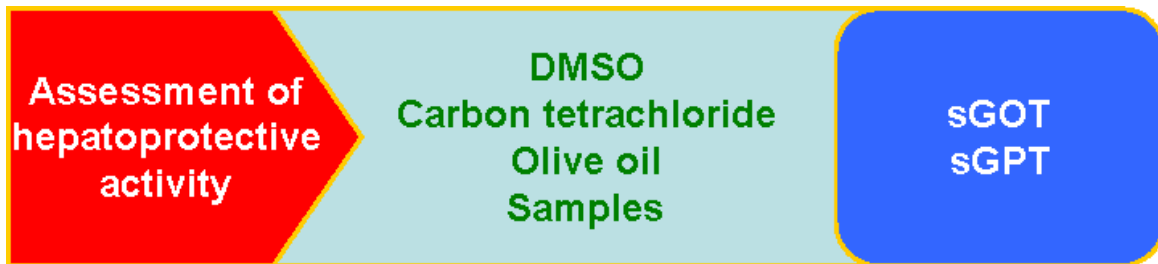
圖 15、體外保肝活性實驗簡圖



(九)、甲醇萃取物之各劃分部之體內保肝活性

自由基 (free radical) 與過氧化脂質對於肝細胞的損害，普遍以四氯化碳 (CCl₄) 誘導的老鼠肝損傷之動物模式最為人所知。參考 Chung 等 (2005) 之方法，四氯化碳會經由肝微粒體中之細胞色素 P-450 (Cytochrome P-450) 的氧化酵素 (mixed function oxidase, MFO) 代謝，生成三氯甲烷自由基(trichloromethyl) CCl₃· 及 CCl₃OO·，這些自由基會與肝細胞反應，形成脂質過氧化(LPO)的連鎖反應，或者與蛋白質結合，造成肝損傷。

圖 16、體內保肝活性實驗簡圖



肆、結果與討論

一、甲醇萃取物之各劃分部之自由基清除活性測試

從實驗結果中，可以很意外的發現，大葉桃花心木葉甲醇萃取物之各劃分部皆有非常好的自由基清除活性，抑制率達百分之五十的濃度皆在每毫升25微克以下，只需極少量的萃取物就可以達到相當好的效果，而標準品Gallic acid是一種純的多酚化合物，抑制率達百分之五十的濃度是最低的，只要每毫升1.34微克，是目前已知能有效清除自由基的化合物，然而，大葉桃花心木葉之甲醇劃分部是所有劃分部裡清除自由基效果最佳的，抑制率達百分之五十的濃度只需每毫升4.65微克，相當接近於標準品的有效濃度，因此，就自由基清除活性而言，甲醇劃分部是最具有清除自由基潛力的。

甲醇萃取物之各劃分部於自由基清除能力上，其排序為：

甲醇 > 丙酮 > 乙酸乙酯 > 正己烷

表 1、甲醇萃取物之各劃分部之自由基清除效率。

Assays	Fractions/standard	IC ₅₀ (µg/ml)
DPPH radical scavenging	Gallic acid	1.34
	Hexane	23.63
	Ethyl acetate	16.79
	Acetone	6.01
	Methanol	4.65

註 1：IC₅₀ 為抑制率達 50%時之濃度 (微克/毫升)。

二、甲醇萃取物之各劃分部之總還原能力測試

由總還原能力的結果，可以用來評估甲醇萃取物之各劃分部之整體抗氧化能力，其中以乙酸乙酯擁有最佳的總還原能力，其還原能力為每毫克之乙酸乙酯萃取物相當於標準品 (Trolox) 的含量 101.46 微克，於清除自由基活性中表現最佳的甲醇劃分部於總還原能力中則表現不如預期，每毫克之甲醇萃取物相當於標準品 (Trolox) 的含量 88.77 微克，因此可以推測其提供電子的能力略低於乙酸乙酯，因此在清除自由基的機制上，應是提供氫原子為主，事實上，四個劃分部的總還原能力皆相差不遠，每毫克之萃取物相當於標準品 (Trolox) 的含量僅差在 20 微克以內，四個劃分部皆有不錯的還原能力。

甲醇萃取物之各劃分部於總還原能力上，其排序為：

乙酸乙酯 > 丙酮 > 甲醇 > 正己烷

表 2、甲醇萃取物之各劃分部之總還原能力。

Assays	Fractions (200µg)	Trolox equivalent (µg/mg)
Ferric reducing ability of plasma (FRAP)	Hexane	82.56
	Ethyl acetate	101.46
	Acetone	97.55
	Methanol	88.77

註 1：Trolox equivalent 為每毫克樣品相當於 Trolox 含量(微克)。

三、甲醇萃取物之各劃分部之抑制超氧陰離子測試

由表3 中的實驗結果可以得知，大葉桃花心木葉甲醇萃取物之各劃分部在抑制超氧陰離子的測試中，最佳的劃分部為丙酮，丙酮在每毫升200微克的抑制率為39.78%，標準品Allopurinol及其代謝物Oxipurinol (Alloxanthine)，抑制超氧陰離子的機制是藉由與黃嘌呤氧化酶Xanthine oxidase的作用，降低其酵素活性，而減少尿酸之生成。標準品Allopurinol是臨床上常用來降低尿酸的藥物，抑制率達百分之五十的濃度是最低的，只要每毫升0.61微克，是目前已知能有效抑制超氧陰離子生成的化合物。

甲醇萃取物之各劃分部於抑制超氧陰離子上，其排序為：

丙酮 > 乙酸乙酯 > 正己烷 = 甲醇

表 3、甲醇萃取物之各劃分部之抑制超氧陰離子能力。

Assays	Fractions/standard	IC ₅₀ (µg/ml)
Superoxide anion radical inhibition	Allopurinol	0.61
	Hexane	NA
	Ethyl acetate	>200
	Acetone	>200
	Methanol	NA

註 1：IC₅₀ 為抑制率達 50%時之濃度 (微克/毫升)。

註 2：NA 表示不具有活性 (於每毫升 200 微克之抑制率為 0)

註 3：>200 表示 IC₅₀ 之濃度大於每毫升 200 微克。

四、甲醇萃取物之各劃分部之清除超氧陰離子測試

從表4 的實驗結果中，可以觀察到，大葉桃花心木葉在乙酸乙脂、丙酮、甲醇有好的清除超氧陰離子活性，抑制率達百分之五十的濃度皆在每毫升150微克以下，證實只需少量的萃取物就可以達到相當好的清除超氧陰離子效果，而標準品SOD(超氧化物歧化酶) 是一種自然存在於生命體的活性酵素，他的作用是能夠催化超氧化物進行歧化反應，將超氧化物轉化為氧氣和過氧化氫的酵素，SOD 廣泛的存在於各種動植物與微生物中，是一種體內重要的抗氧化劑，能夠保護細胞免於傷害，抑制率達百分之五十的濃度是最低的，只要每毫升17.73微克，是目前已知能有效清除超氧陰離子的酵素，而大葉桃花心木葉之丙酮劃分部是所有劃分部裡清除自由基效果最佳的，抑制率達百分之五十的濃度只需每毫升48.9微克，因此，在清除超氧陰離子活性實驗中，丙酮劃分部是最具有清除超氧陰離子潛力的。

甲醇萃取物之各劃分部於清除超氧陰離子上，其排序為：

丙酮 > 甲醇 > 乙酸乙酯 > 正己烷

表 4、甲醇萃取物之各劃分部之清除超氧陰離子能力。

Assays	Fractions/standard	IC ₅₀ (µg/ml)
Superoxide anion radical scavenging	SOD	17.73
	Hexane	>200
	Ethyl acetate	122.64
	Acetone	48.90
	Methanol	79.81

註 1：IC₅₀ 為抑制率達 50%時之濃度 (微克/毫升)。

註 2：>200 表示 IC₅₀ 之濃度大於每毫升 200 微克。

五、甲醇萃取物之各劃分部之螯合鐵離子能力

由表5 中的實驗結果可以得知，大葉桃花心木葉甲醇萃取物之各劃分部在螯合鐵離子的測試中，最佳的劃分部為甲醇，甲醇在每毫升200微克的抑制率為6.72%，標準品EDTA，通常叫作乙二胺四乙酸，是一種有機化合物，它是由一個六齒配體所組成的化合物，可以螯合許多種的金屬離子，結構上4個酸和2個胺的部分都可作為配體的螯合位，與錳（II）、銅（II）、鐵（II）及鈷（III）等金屬離子以離子鍵結組成螯合物，標準品EDTA是實驗上常用的螯合劑，抑制率達百分之五十的濃度是最低的，只要每毫升8.31微克，是目前已知能有效螯合鐵離子生成的化合物。

甲醇萃取物之各劃分部於抑制超氧陰離子上，其排序為：

丙酮 > 乙酸乙酯 > 正己烷 = 甲醇

表 5、甲醇萃取物之各劃分部之螯合鐵離子能力。

Assays	Fractions/standard	IC ₅₀ (µg/ml)
Ferrous ion chelating	EDTA	8.31
	Hexane	NA
	Ethyl acetate	>200
	Acetone	NA
	Methanol	>200

註 1：IC₅₀ 為抑制率達 50%時之濃度（微克/毫升）。

註 2：NA 表示不具有活性（於每毫升 200 微克之抑制率為 0）

註 3：>200 表示 IC₅₀ 之濃度大於每毫升 200 微克。

六、甲醇萃取物之各劃分部之體外保肝活性

參考表6 的實驗結果，大葉桃花心木葉甲醇萃取物之各劃分部在體外保肝表現了非常好的抑制肝臟粒腺體脂質過氧化的活性，抑制率達百分之五十的濃度皆在每毫升150微克以下，而標準品Trolox，又稱為水溶性維他命E，是強效抗氧化劑，主要功能是防止非飽和性脂肪酸的過氧化作用，它們是細胞膜、磷酸脂的結構成分，Trolox抑制率達百分之五十的濃度是最低的，只要每毫升12.97微克，是目前已知能有效抑制肝臟粒腺體脂質過氧化的化合物，然而，大葉桃花心木葉之丙酮劃分部是所有劃分部裡抑制脂質過氧化效果最佳的，抑制率達百分之五十的濃度只需每毫升29.86微克，相當接近於標準品的有效濃度，因此，就抑制肝臟粒腺體脂質過氧化而言，丙酮劃分部是最具有保肝活性的。

甲醇萃取物之各劃分部於體外保肝活性上，其排序為：

丙酮 > 甲醇 > 乙酸乙酯 > 正己烷

表 6、甲醇萃取物之各劃分部之體外保肝活性。

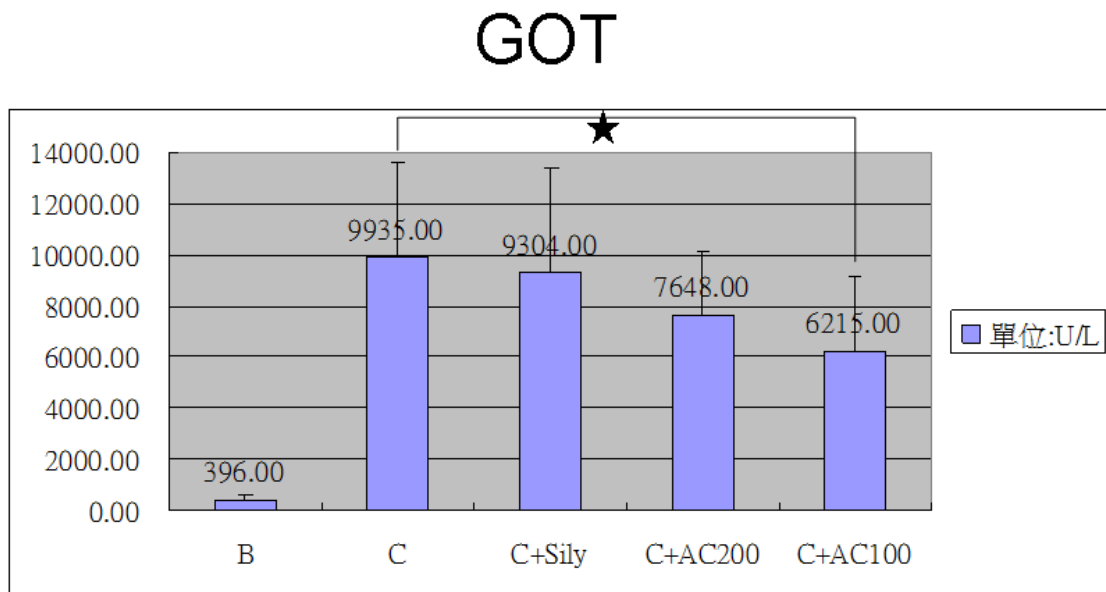
Assays	Fractions/standard	IC ₅₀ (μg/ml)
Lipid peroxidation (liver mitochondria)	Trolox	12.97
	Hexane	105.52
	Ethyl acetate	58.16
	Acetone	29.86
	Methanol	50.75

註 1：IC₅₀ 為抑制率達 50%時之濃度（微克/毫升）。

七、丙酮劃分部之體內保肝活性

參考表7 的實驗結果，服用 CCl_4 的老鼠血清中GOT、GPT值分別為：9935、13945 (U/L) ，與未服用的Blank組比較，確實成功誘導小鼠肝臟損傷，大葉桃花心木葉之丙酮劃分部在體內保肝活性測試中，於每公斤200毫克的劑量下血清中GOT、GPT值分別為：7648、15572 (U/L) ，於每公斤100毫克的劑量下，血清中GOT、GPT值分別為：6215、10160 (U/L) ，證實能有效降低血清中GOT、GPT值 ($P < 0.05$) ，因此丙酮劃分部確實具有體內保肝活性。

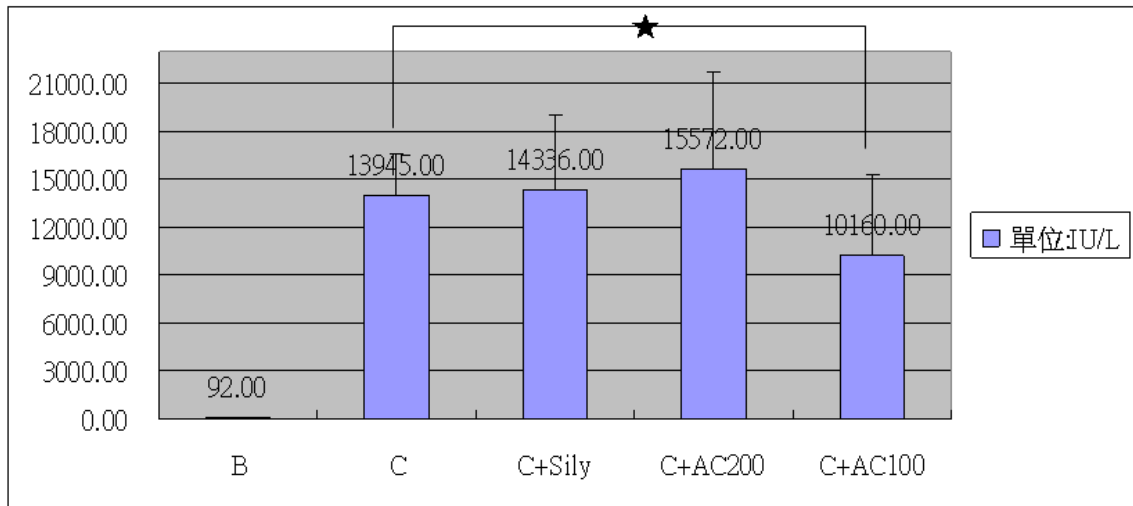
表 7、丙酮劃分部之體內保肝活性。



★ $P < 0.05$

- B: blank
- C: CCl_4
- C+Sily: CCl_4 +Silymarine
- C+AC200: CCl_4 +Acetone fraction 200mg/Kg
- C+AC100: CCl_4 +Acetone fraction 100mg/Kg

GPT



★ P<0.05

- B:blank
- C:CCl₄
- C+Sily:CCl₄+Silymarin
- C+AC200:CCl₄+Acetone fraction 200mg/Kg
- C+AC100:CCl₄+Acetone fraction 100mg/Kg

伍、結論

順利的從最具有保肝與抗氧化潛力的甲醇初萃物進行了正己烷 (n-Hexane) 、乙酸乙酯 (Ethyl Acetate) 、丙酮 (Acetone) 、甲醇 (Methanol) 分離出四個劃分部。

正如上一章節 (結果與討論) 中所示，丙酮劃分部於清除自由基與四種抗氧化測試中皆有良好的活性表現，尤其在體外的保肝活性測試中，丙酮劃分部抑制肝臟粒腺體脂質過氧化的能力為四個劃分部中最好的，因此進一步測試其在體內的保肝活性，透過監測血清中 GOT、GPT 值證實，丙酮劃分部於每公斤 100 毫克的劑量下能有效的降低血清中 GOT、GPT 值。

陸、工作進度

一、預定時程與完成項目

(I)、實驗建立

- 大葉桃花心木葉之採集與鑑定 (已完成)
- 大葉桃花心木葉以低溫乾燥、粉碎取得粉末樣品 (已完成)
- 大葉桃花心木葉之低溫回流萃取技術 (已完成)

(II)、大葉桃花心木葉之保肝萃取物及劃分部之分離

- 以甲醇取得大葉桃花心木葉之初萃取物 (已完成)
- 將甲醇萃取物，以正己烷、乙酸乙酯、丙酮、甲醇萃取，進行甲醇萃取物之各劃分部之分離 (已完成)

(III)、自由基清除活性測試

- 將甲醇萃取物之各劃分部分別進行自由基清除活性測試 (已完成)

(IV)、抗氧化活性測試

- 甲醇萃取物之各劃分部進行抑制超氧陰離子 (已完成)
- 甲醇萃取物之各劃分部進行清除超氧陰離子 (已完成)
- 甲醇萃取物之各劃分部進行總還原能力測定 (已完成)
- 甲醇萃取物之各劃分部進行螯合鐵離子能力 (已完成)

(V)、體外保肝活性

- 將甲醇萃取物之各劃分部以 Liver mitochondria lipid peroxidation 進行

體外保肝活性評估 (已完成)

(VI)、體內保肝活性

- 以四氯化碳(CCl_4)誘導大(小)白鼠急性肝損傷的實驗動物模式進行體內保肝活性評估 (已完成)

二、工作執行進度

表 8、工作執行進度甘特圖

重要工作項目	工作比重(%)	預定進度			
		98年度			
		98年04-05月	98年06-07月	98年08-09月	98年10-12月
1.大葉桃花心木葉之採集鑑定、萃取技術之建立	20	■			
2.大葉桃花心木葉之保肝萃取物及劃分部之分離	10	■	■		
3.甲醇萃取物之各劃分部之自由基清除活性測試	10		■		
期中報告			■		
4.甲醇萃取物之各劃分部之抗氧化活性測試	30		■	■	■
5.甲醇萃取物之各劃分部之體外保肝活性	15			■	■
6.甲醇萃取物之各劃分部之體內保肝活性	15			■	■
期末報告					■
合計	累計百分比	20%	40%	70%	100%

註 1：已完成 ■

柒、參考文獻

- J.M. Gutteridge, *Free Radic. Res. Commun.* **19** (1993), p. 141.
- J.I. Lamaison, C. Ptijean-Freytet and C.A. Carnet, *Pharm. Acta. Helv.* **66** (1991), p. 185.
- G. Miliauskas, P.R. Venskutonis and T.A. Van Beek, *Food Chemistry.* **85** (2004), p.231-237
- Iris F. F. Benzie and J. J. Strain, *Analytical biochemistry.* **239** (1996), p. 70-76
- S.M. Fiuza, C. Gomes, L.J. Teixeira, M.T. Girão da Cruz, M.N.D.S. Cordeiro, N. Milhazes, F. Borges and M.P.M. Marques, *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* **12** (2004), p. 3581-3589
- Slinkard K. and Singleton V. L., *American Journal of Enology and Viticulture.* **28** (1977), p. 49-55
- Robin van den Berg, Guido R. M. M. Haenen, Henk van den Berg and Aalt Bast, *Food Chemistry.* **66** (1999), p. 511-517
- R.E. Gullison, S.N. Panfil, JJ. Strouse and S.P. Hubbell, *Botanical Journal of the Linnean Society.* **122** (2008), p. 9-34
- A. C. M. Gillies, C. Navarro, A. J. Lowe, A. C. Newton, M. Hernández, J. Wilson and J. P. Cornelius, *Heredity.* **83** (1999), p. 722–732
- Nick Brown, Steve Jennings and Tom Clements, *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics.* **6** (2003), p. 37-49
- Melissa H. Morris, Patricia Negreros-Castillo and Carl Mize, *Forest Ecology and Management.* **132** (2000), p. 173-181

Rajbir Kaur, Saroj Arora and Bikram Singh, *Bioresource Technology* **99** (2008), p. 7692–7698

A. Kumaran and R. Joel karunakaran, *Food Chemistry*. **97** (2006), p. 109-114

Carlos L. Céspedes, Mohammed El-Hafidi, Natalia Pavon and Julio Alarcon, *Food Chemistry*. **107** (2008), p. 820-829

Wong, S. H., Knight, J. A., Hopfer, S. M., Zaharia, O., Leach, C. N. Jr., and Sunderman, F. W. Jr. *Clinical Chemistry*. **33** (1987), p. 214-220

Dinis, T. C. P., Madeira, V. M. C., and Almeida, L. M. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **315** (1994), p.161-169

Chung, H., Hong, D. P., Jung, J. Y., Kim, H. J., Jang, K. S., Sheen, Y. Y., Ahn, J. I., Lee, Y. S., and Kong, G. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **206** (2005), p. 27-42

Kong, L. D., Cai, Y., Huang, W. W., Cheng, C. H., and Tan, R. X. *Journal of Ethnopharmacology*. **73** (2000), p. 199-207

Jadwiga Robak and Ryszard J. Gryglewski. *Biochemical Pharmacology*. **37** (1988), p. 837-841

張育森、陳韶妤 (2003) 第 30 期台大校友雙月刊。11 月號。

章錦瑜 (2004) 喬木賞花圖鑑。台中：晨星出版有限公司。

捌、 審 查 委 員 意 見 回 應 表

期 末 報 告 審 查 意 見 回 應 表

審 查 委 員 意 見	回 應
(一)符合期末審查標準。	謝謝委員。
(二) 依研究計畫說明書預定完成體內外保肝活性之實驗，小葉桃花心木有無做同樣之實驗，如有結果請做一比較。	曾作初步比較，大葉桃花心木之效果較佳。
(三) 天然林之桃花心木已被列為保育樹種，不能國際上進行貿易，但人工林之桃花心木如能得到永續森林認證則不在此限。請列入評估考量。	謝謝委員建議。本計畫乃採用桃花心木之葉部，桃花心木葉於平時仍需修剪，將來若能順利通過永續森林認證，將與林務局協商使用。
(四) 計畫使用的老葉或任嫩葉其成分可能不同？請加以說明。	本次計畫所選用的是老葉，嫩葉與老葉的比較會於下年度計畫中提出。