

行政院農業委員會林務局暨所屬機關
101 年度委託研究計畫

桃花心木葉對心肌與腎臟保護之探討分析(4/4)

成果報告

Heart and kidney protective activities of
Swietenia macrophylla Leaves (4/4)



計畫編號:tfbc-1010519

委託機關：行政院農業委員會林務局

執行機關：中國醫藥大學臨床醫學研究所

中國醫藥大學附設醫院中醫藥轉譯研究中心

計畫主持人：楊玲玲教授

中 華 民 國 1 0 2 年 0 8 月

目 錄

摘要	3
壹、 計畫前言	5
貳、 工作項目	9
參、 材料與方法	10
一、 執行程序	10
二、 實驗材料與儀器	10
三、 實驗方法	14
肆、 結果與討論	21
伍、 結論	26
陸、 工作進度	28
柒、 參考文獻	29
期中報告審查修正對照	34
期末報告審查修正對照表	37

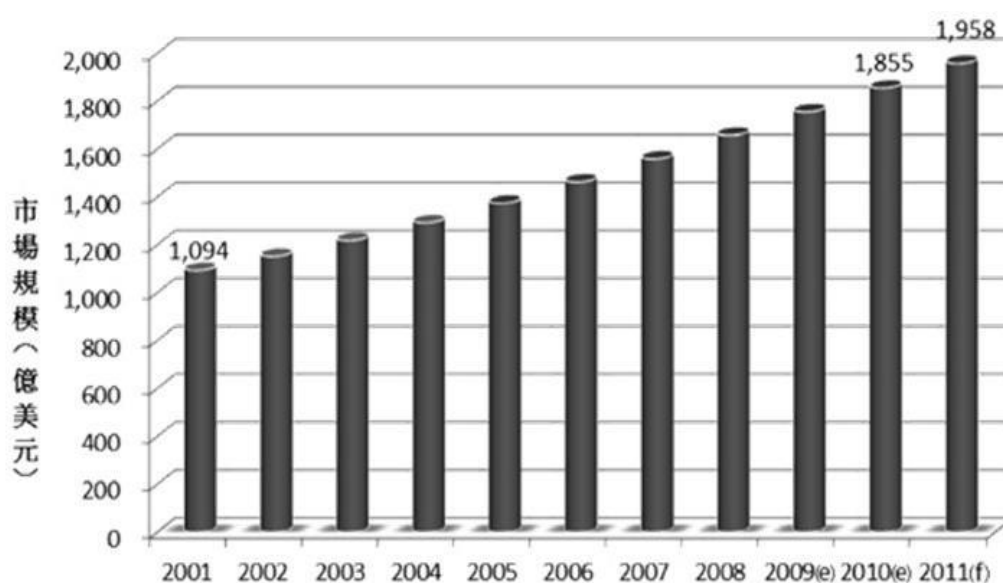
摘 要

本年度針對大葉桃花心木葉保護肝臟之活性抽出物，對心臟與腎臟之保護作用進行探討，評估方法包括品質再現性測定，利用植物成分分析(phytochemical analysis)及自由基清除活性評估活性抽出物中總多酚含量(total phenolic content)、總黃酮含量(total flavonoid content)、總黃烷醇含量(total flavanol content)以及測定 DPPH 自由基清除率(free radical scavenging capability)，並進行活性抽出物對心臟細胞及腎臟細胞之毒性或保護試驗。由實驗結果顯示活性抽出物每毫克總多酚量相當於 244.7 μg 沒食子酸(gallic acid)；每毫克總黃酮含量相當於 189.6 μg 芸香素(rutin)；每毫克總黃烷醇含量則相當於 36.2 μg 兒茶素(epicatechin)。抗氧化活性測定結果顯示，活性抽出物中抑制因亞鐵離子所誘導產生丙二醛(malondialdehyde, MDA)的能力分別高達 88.9%, 98.2%，與正對照組的維他命 E 抑制能力相當。同時也發現活性抽出物不會誘導心臟肌肉細胞與腎臟細胞產生脂質過氧化現象，顯示活性抽出物並不會對細胞粒線體造成傷害。因此發現大葉桃花心木葉活性抽出物除了有保肝的作用，同時也具有心臟與腎臟的保護作用。進一步將大葉桃花心木葉活性抽出物運用於心臟肌肉細胞與腎臟細胞進行毒性(cytotoxicity)試驗，結果對心臟肌肉細胞 H9c2 以及腎臟細胞 HK-2 均不具毒性。總結以上結果大葉桃花心木葉活性抽出物具有安全之保肝、心及腎臟作用。此計畫之進行不但使大葉桃花心木葉的價值增加，同時對推廣林產資源利用、厚植森林資源及創新林產加工將有很

大的貢獻，是為極具開發天然保肝及抗氧化之保健食品潛力之本土植物，並可提升臺灣整體本土森林資源經濟價值。

壹、前言

隨著民眾保健意識的抬頭，保健食品在近年來的市場更是迅速的增加。根據臺經院生物科技產業研究中心 2010 年的研究資料統計，全球保健食品的市場(劉翠玲，2012)約有 1855 億美元，較十年前增加約 70%，且逐年以約 5.6% 的速度在成長，2011 年約達到 1958 億美元(圖 1)，顯示民眾對於保健食品的需求逐漸提昇。



(資料來源：Global Industry Analysts, 2010；臺經院生物科技產業研究中心繪製。)

圖 1、全球保健食品之歷年市場規模

經研究探討發現有些疾病都與體內的氧化物質有關係，顯示出民眾對於「抗氧化」的需求也越來越高，而抗氧化的相關保健食品或是營養食品，也變成市場主流之一，如保肝類(Parés et al., 1998；Shaker et al., 2010；Flora et al., 1998)。「抗氧化」主要為清除生物體內過多的自由基(free radicals)(Gutteridge, 1993)。自由基為任何帶有不成對電子的原子，分子或離子，並分別帶正電荷，負電荷或是不帶電

荷，而在生物體中最主要的自由基為活性氧物質(reactive oxygen species, ROS)以及活性氮物質(reactive nitrogen species, RNS)，其來源可以分為內源性以及外源性兩類。內源性的來源主要來自粒線體(mitochondrial)、內質網(endoplasmic)、核膜(nuclear membrane)的電子傳遞鏈、催化自由基形成的酵素系統，以及吞噬細胞活化作用，外生性來源包括空氣污染、高能量離子輻射、吸菸等 ROS 在生物體代謝中具有調控細胞生長的機能，如調控生長因子(epidermal growth factor, EGF)以及血小板衍生生長因子(platelet-derived growth factor, PDGF)，調控轉錄因子，但是過量的 ROS 會使得生物體內氧化還原反應失去平衡，造成氧化壓力(oxidative stress)，引發細胞膜產生脂質過氧化 (lipid peroxidation, LPO)(Poli et al., 1987；Yamazaki et al., 1985；Chapple, 1997；Baeet et al., 1997)。

LPO 主要是細胞膜上多元不飽和脂肪酸(polyunsaturated fatty acids, PUFAs)發生氧化現象，破壞細胞膜上的膽固醇以及脂肪酸的不飽和鍵，引起氧化反應如亞鐵離子(Fe^{2+})，誘導產生費頓反應(Fenton reaction)所引起的。LPO 的產物丙二醛(malondialdehyde, MDA)，會耗損穀胱甘肽(glutathione)及蛋白質硫醇(protein thiols)、擾亂細胞內鈣離子的平衡，也會使得細胞內遺傳基因(DNA)受到損傷，加速細胞凋亡或產生變異，細胞凋亡會使組織器官無法發揮正常機能，而細胞變異則容易形成癌細胞，因此脂質過氧化與許多疾病有密切關係，尤其是許多慢性病如癌症、肝病、心臟病、腎臟病、心血管疾病等(Sundaresan et al., 1995；Rupeć et al., 1995；

Holley et al., 1993 ; Jomova et al., 2011) ，若能抑制脂質過氧化的產生，便能減少疾病的發生率。

根據衛生署九十九年六月二日公告之最新統計數據，顯示臺灣每年約有五千人死於肝癌，四千人死於肝硬化和慢性肝炎，甚至於從民國七十年以來，肝癌一直國人死亡癌症的第二位，而臺灣洗腎病患在國民健康局公布的資料中表示，臺灣慢性腎病末期洗腎病患人數在 2008 年世界各國中排名第一，由此可知國人慢性腎病盛行率很高，且恢復率也低。另，因生活習性工作壓力飲食習慣心臟疾病日益增加，心血管疾病已列居國人十大死因當中第二位，因此預防肝、腎及心臟疾病保健對國人之健康十分重要，更是具有開發潛力之保健食品項目。國有林地 160 餘萬公頃之森林資源十分豐沛，目前僅只有幹材提供為木材用，本計畫以大葉桃花心木葉為主要研究材料，全程計畫以進行抗氧化及肝，心，腎保護之研究分析為主，提供作為開發預防肝病、心臟病及腎保護之保健食品之實證依據。本年度以大葉桃花心木葉活性抽出物進行心臟細胞與腎臟細胞保護為主軸，並為維持活性抽出物之品質，也針對植物成分分析(phytochemical analysis)評估其所含抗氧化類成分(Faller et al., 2010 ; Erlund, 2004 ; Lamaison et al., 1991 ; Fiuza et al., 2004)之總多酚含量(total phenolic content)、總黃酮含量(total flavonoid content)、總黃烷醇含量(total flavanol content)定量以及自由基清除之活性之測定。大葉桃花心木葉除已發現具有保肝的作用外，同時若亦能增加心臟與腎臟的保護作用，則更可以提

升其作為保健食品的競爭力，使大葉桃花心木葉的價值增加。推廣林產資源利用、厚植森林資源及創新林產加工，開發具有潛力之本土植物作為天然保肝、心、腎及抗氧化之保健食品，提升臺灣整體本土森林資源經濟價值(馮豐隆等, 2010)。

本計畫全程目標：

一、篩選具有保肝活性潛力之木本植物葉：分析探討林務局獎勵節能減碳之木本植物葉為主。

二、探討大葉桃花心木保肝之活性物質：大葉桃花心木葉之保肝活性抽出物，為其甲醇抽出物之丙酮可溶部。

三、大葉桃花心木葉之保肝活性抽出物之保肝及毒性實驗：保肝體內外活性測定及毒性試驗以致癌性(carcinogen)、基因毒性及亞急性毒性為重點。101年度進行心肌與腎臟保護，分別為：(一)大葉桃花心木葉活性抽出物對於心臟細胞的保護及(二)大葉桃花心木葉活性抽出物對於腎細胞的保護。

四、經證實無毒且具保肝之活性物質：進行大葉桃花心木葉保肝活性抽出物對心肌與腎臟之保護作用探討，使大葉桃花心木葉活性抽出物除了有保肝的作用，同時增加心臟與腎臟的保護作用。本計畫結果將可以提升其作為保健食品的競爭力，使大葉桃花心木的價值增加。

貳、工作項目

101 年度以大葉桃花心木葉活性抽出物進行心肌與腎臟保護二大研究為主軸，並進行植物成分分析及自由基清除活性能力，以維持大葉桃花心木葉活性抽出物之品質。

- 一、大葉桃花心木葉活性抽出物之植物成分分析(phytochemical analysis) :將包含總多酚含量(total phenolic content)、總黃酮含量(total flavonoid content)、總黃烷醇含量(total flavanol content)。
- 二、大葉桃花心木葉活性抽出物之 DPPH 自由基清除能力測定
- 三、大葉桃花心木葉活性抽出物對於心臟及腎臟粒線體細胞的保護
 - (一)大葉桃花心木葉對於大鼠心臟粒線體受活性氧物質(reactive oxygen species, ROS)傷害產生之脂質過氧化抑制作用分析，以及分析大葉桃花心木葉是否會自行促使大鼠心臟粒線體產生脂質過氧化之毒性?
 - (二)大葉桃花心木葉對於大鼠腎臟粒線體受活性氧物質(reactive oxygen species, ROS)傷害誘生之脂質過氧化抑制作用分析，以及分析大葉桃花心木葉是否會自行促使大鼠腎粒線體產生脂質過氧化之毒性?
- 四、分析大葉桃花心木葉活性抽出物對正常心臟及腎細胞之毒性實驗分析
 - (一)大葉桃花心木葉對於大鼠心肌細胞株 H9c2 之細胞毒性試驗
 - (二)大葉桃花心木葉對於人腎肌細胞株 HK-2 之細胞毒性試驗

參、材料與方法

一、執行程序

本計畫以大葉桃花心木之葉部為主要研究材料，進行植物成分抗氧化及心、腎保護之健康食品之研發，首期已完成開發探討及篩選出具有潛力之保肝活性素材，進行保健食品之開發。在先前計畫中已得知，大葉桃花心木葉甲醇抽出物之丙酮可溶部在抑制肝脂質過氧化試驗(體外試驗)，以及在四氯化碳 (CCl₄) 誘導大鼠急性肝損傷的動物實驗模式之肝病理切片中，顯示口服粗抽出物 (100mg/kg)比正對照組 silymarin(400mg/kg)有更大程度的保護現象(體內試驗)，同時其在於 28 天的動物實驗沒有毒性，亦不會造成細胞毒性及基因毒性，以此為開發依據，進行 ROS (radical oxidative stress) 誘生心臟肌肉細胞與腎臟細胞脂質過氧化脂抑制作用及對正常心及腎細胞之毒性分析，以期開發具心臟及腎臟之保護作用之營養補充或保健食品。

二、實驗材料與儀器

(一)植物材料

前比較大葉桃花心木葉與小葉桃花心木葉之抗氧化活性結果，以大葉桃花心木葉之效價高且在臺灣之生長分布廣泛易採收。另其含多酚類成分與抗氧化活性及肝腎心保護有關。因此吾之研究發現雨季或下雨之多酚類成分與抗氧化活性均明顯低。本研究大葉桃花心木葉為 2012 年 5 月

晴天採集自海拔 600-700 公尺南投縣魚池鄉之大葉桃花心木(*Swietenia macrophylla* King)葉子，大葉桃花心木(*Swietenia macrophylla* King)為楝科(Meliaceae)桃花心木屬(*Swietenia*)植物，經孫正春老師鑑定後，洗淨低溫乾燥。

(二)細胞株

由臺灣新竹食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心 (Bioresource Collection and Research Center, BCRC, Taiwan 臺灣新竹) 購入 American Type Culture Collection (ATCC, USA)之大鼠心肌母細胞株 heart/myocardium)H9c2(BCRC 60096)，以及人腎細胞株 (cortex/proximal tubule)HK-2(ATCC® CRL-2190™)。

(三)試藥及試劑

1. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Sigma, Germany.
2. Gallicacid , Sigma, Germany.
3. Methanol, ACS grade, Merck, Germany.
4. Dimethyl sulfoxide (DMSO), Sigma, France.
5. 2,4,6-Tri(2-pyridinyl)-1,3,5-triazine (TPTZ), Sigma, Switzerland.
6. Sodium acetate, anhydrous (CH₃COONa), J. T. Baker, U.S.A.
7. Tetraethoxypropane (TEP), Sigma, Germany.

8. Thiobarbituric acid (TBA), Sigma, Germany.
9. Acetic acid, J. T. Baker, U.S.A.
10. Iron(III) chloride hexahydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), Sigma, Germany.
11. 4-Dimethylaminocinnamaldehyde (DMACA), Sigma, Germany.
12. Trolox, Sigma, U.S.A.
13. Sodium bicarbonate (NaHCO_3), Sigma, U.S.A.
14. Potassium chloride (KCl), Sigma, U.S.A.
15. Sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4), Sigma, U.S.A.
16. Potassium dihydrogenphosphate (KH_2PO_4), Sigma, U.S.A.
17. Trypsin-EDTA Solution 10X, Sigma, U.S.A.
18. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT),
Sigma, U.S.A.
19. Hydrochloric acid (HCl), Sigma, U.S.A.
20. Isopropanol, J. T. Baker, U.S.A.

(四)細胞培養基

1. Minimum essential medium eagle (MEM), Sigma, U.S.A.
2. 1% Non-essential amino acids (NEAA), Sigma, U.S.A.
3. 1mM Sodium pyruvate (NaP), Sigma, U.S.A.

(五)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.

(六)實驗動物

Sprague-Dawley (SD)大鼠購自樂思科公司並經臺北醫學大學動物實驗中心動物實驗審查委員會審查通過,符合相關動物實驗法規規定。

體重約 125~150 g。大鼠購入後飼養在實驗動物中心,飼養在透明塑膠籠中(47 × 34 × 20 公分),並且有固定 12 小時日間以及 12 小時夜間之作息,給予充足且營養均衡之食物以及乾淨的飲用水。

三、實驗方法

(一)大葉桃花心木葉活性抽出物之製備

1. 大葉桃花心木葉採集後洗淨於攝氏 40°C 鼓風乾燥以供萃取
2. 大葉桃花心木葉活性抽出物之分離(甲醇抽出物之丙酮可溶部)：

依據前計畫將具保肝活性之大葉桃花心木葉經低溫乾燥及粉碎(600g)，以 6L 甲醇進行萃取。採集之大葉桃花心木葉浸泡甲醇一夜後再放入水浴鍋裡加熱迴流萃取四小時，過濾後的葉再次加入新的甲醇萃取四小時，共兩次八小時。合併濾液再減壓濃縮得甲醇抽出物後，將甲醇抽出物經丙酮加熱迴流萃取四小時共兩次八小時合併率濾液再減壓濃縮得丙酮劃分萃取可溶部分之丙酮抽出物。

(二)活性抽出物之自由基清除能力及植物成分(phytochemical analysis)分析

1. 自由基清除活性測試(Shimada et al., 1992)

利用樣品清除 DPPH 的能力來評估抗氧化力，同時確保抽出物的活性品質。將樣品以 DMSO 溶解，依 200µg/mL 的濃度進行 DPPH 清除能力測試，結果以清除率(%)表示。

$$\text{清除率(\%)} = \{[\text{控制組吸光值}-\text{實驗組(或標準品)吸光值}]/\text{控制組吸光值}\} \times 100$$

2. 植物成分分析定量

(1)總多酚含量(total phenolic content)(Slinkard et al., 1977)

以 gallic acid 為標準品，測試 200 μ g/mL 樣品與稀釋 Folin-Ciocalteu's 試劑反應後，計算樣品相當於 gallic acid 的含量(μ g/mg)

(2)總黃酮含量(total flavonoid content) (Lee et al., 2007)

以 rutin 為標準品，測試 200 μ g/mL 樣品與 AlCl₃ 甲醇溶液反應後，計算樣品相當於 rutin 含量(μ g/mg)

(3)總黃烷醇含量(total flavanol content)(Lamaison et al., 1990)

以(-)-epicatechin 為標準品，測試 200 μ g/mL 樣品與 0.1% (w/v) DMACA 反應後，計算樣品相當於(-)-epicatechin 含量(μ g/mg)

(三)大葉桃花心木葉對於心臟與腎臟的保護

1.動物

SD rat (male) 200 \pm 20 g，由樂思科生物科技公司購入。依臺北醫學大學實驗委員會通過，動物飼育於臺北醫學大學實驗動物中心、皆依動物實驗保育法，將以較低使用量為原則，進行實驗設計及經訓練之人員進行實驗。

2.TEP 標準曲線製作

將 TEP 標準溶液，以去離子水稀釋至最終濃度為：100，80，40，20，10，5，2.5，1.25 μ M，分別加入反應試劑（0.44 M phosphoric acid

solution, 42 mM TBA 溶液和去離子水), 均勻混合並於 100 °C 水浴鍋中持續加熱 90 分鐘後, 冰浴冷卻 2-3 分鐘, 加入等量終止試劑 (MeOH-NaOH 溶液), 最後以 ELISA reader 測各濃度 TEP 在波長 532 nm 之吸光值, 製作標準曲線, 並以此標準曲線換算抽出物之 MDA(TBA)₂ 含量。

3. 活性氧物質(ROS) 刺激粒線體產生脂質過氧化之抑制作用

(1) 大鼠心肌粒線體液之製備

將大鼠犧牲後馬上取心臟剪碎, 加入約一倍體積之 PBS buffer, 接著將心臟磨至無塊狀。倒入離心管中, 再以 PBS buffer 補至心臟重之三倍體積。以 2000rpm, 4°C 離心 10 分鐘, 取上清液倒入微量離心管中。再以 13000rpm, 4°C 離心 10 分鐘, 取下層, 以 PBS 清洗微量離心管則得大鼠粒線體液。

(2) 腎粒線體液之製備

方法同心肌粒線體液之製備。

(3) 蛋白質定量(Wong et al., 1987)

取適量粒腺體蛋白質樣品, 並以 1 N NaOH 來調整使其最終體積為 100 μL, 加入 200 μL 去離子水及 100 μL 反應混合液(25% Na₂CO₃ : 2% Na-K-tartrate : 1% CuSO₄ = 8 : 1 : 1, v/v/v), 然後在室溫下靜置

10 分鐘，加入 1 mL Folin reagent (Folin : H₂O = 1 : 19.5)後於 37 °C 水浴 20 分鐘，並在室溫下冷卻，最後在分光光度計以波長 660 nm 測其吸光值(25 °C)。然後將標準曲線做線性回歸，得一方程式，將所得樣品之吸光值代入此一元一次方程式，換算後即可得知樣品之蛋白質含量。

(4)細胞粒線體脂質過氧化抑制之生物活性測定

將動物心臟及腎臟粒線體經蛋白質定量後，使用誘導劑誘導氧化 (ferrous ion)並加入樣品培養 1 小時後加入 TBA 反應後再加入 Methanol-NaOH solution 終止反應，並在波長 532 nm 下測量吸光值，用以判斷心肌細胞粒線體脂質過氧化的程度。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來評估個體受到氧化傷害的程度。

抑制脂質過氧化計算公式

$$\text{Inhibition effect percentage} = [(C-A)/(C-B)] \times 100\%$$

A = average of sample MDA(TBA)₂ value at 532 nm

B = average of blank MDA(TBA)₂ value at 532 nm

C = average of control MDA(TBA)₂ value at 532 nm

Blank 為抽出物及誘導劑以去離子水代替

Control 為抽出物以離子水代替

(5)大葉桃花心木葉對大鼠心臟與腎臟粒線體產生脂質過氧化測定

依照上述測定法，不經氧壓力刺激大鼠心臟與腎臟粒線體產生脂質過氧化值測定，可分析大葉桃花心木葉是否對心臟與腎臟具有毒性瞭解其是否安全？

(四)大葉桃花心木葉對於心肌細胞及腎細胞毒性測試(Alley et al., ; 1988

Patrina et al., 2010)

由 ATCC 購入大鼠心肌母細胞(heart/myocardium)H9c2 以及人腎細胞(cortex/proximal tubule)HK-2 進行測試。

1.細胞培養液之調製

取 MEM 粉末與 1.5 g NaHCO_3 溶於 1 L 之二次水(pH 7.0)，調整 pH 至 7.2，以 0.22 μm 之過濾膜過濾，再加入 1% NEAA、1 % sodium pyruvate 及 10 % FBS。

2.PBS 之配製

精秤 0.2 g KCl、0.8 g NaCl、1.14 g Na_2HPO_4 及 0.2 g KH_2PO_4 ，溶於 500 mL 之二次水(pH 7.0)中，稀釋成 2 倍後，經高壓蒸氣滅菌後使用。

3.Trypsin-EDTA 之配製

以高壓蒸氣滅菌後之滅菌水稀釋成 10 倍後使用。

4.MTT solution 之配製

精秤 50 mg MTT溶於10 mL之PBS中，以0.22 μm 之過濾膜過濾後使用。

5.0.04 N HCl

取 2 mL 1N HCl 再加入 48 mL isopropanol，儲存於室溫下備用。

6.冷凍細胞之活化

將裝有細胞之冷凍小管置於37°C水浴中，使迅速解凍後，以 70% 的酒精擦拭外管並移入無菌操作臺內。於T-25 flask中滴入經解凍之細胞懸浮液1mL，再緩慢加入9mL之細胞培養液，並輕微振搖使均勻分散後，置於37°C之5% CO₂ incubator中培養。待隔日確認細胞生長或貼附良好後，立即更換新的細胞培養液。

7.細胞株之繼代培養

當細胞生長至八分滿時，將T-25 flask中舊的細胞培養液全部移除，加入5mL PBS清洗1次並移除後，再加入1 mL Trypsin-EDTA，置於37°C之5% CO₂ incubator中約5分鐘後，於顯微鏡下觀察細胞懸浮狀況。取4 mL細胞培養液將細胞沖洗下來，置於離心管中，經 1000 rpm離心5分鐘後，移除上清液並加入適量之細胞培養液稀釋，將細胞移入新的細胞培養液中並輕微振搖使均勻分散後，置於37°C之5% CO₂ incubator中培養之。

8.細胞毒性測定

參考 Alley 等之方法。藉由 MTT reagent 中水溶性的黃色 tetrazolium

在活細胞中會被粒線體的脫氫酵素還原，產生非水溶性的紫色結晶 formazan，當細胞活性越高或細胞數目越多，所產生的 formazan 也越多。

將細胞以 3×10^5 cells/mL 分別種植於 24 well plate 中，置於 37°C 之 5% CO_2 incubator 中培養 24 小時，細胞貼附後移除培養液，並加入 450 μL 之細胞培養液及 50 μL 各種濃度之大葉桃花心木葉活性抽出物，置於 37°C 之 5% CO_2 incubator 中作用 24 小時。將 24 well plate 中與藥物作用後之細胞去除上清液，並以 PBS 清洗，每個 well 再加入以培養液稀釋之 250 μL MTT solution，於 incubator 中培養 4 小時後，再加入 250 μL 之 0.04 N HCl 將紫色結晶 formazan 溶解後，以 ELISA reader 測其於 600 nm 波長下之吸光值。

Cytotoxicity index (CI) (%) =

$[1 - (\text{實驗組之 O.D.值} / \text{對照組之 O.D.值})] \times 100$

肆、 結果與討論

一、大葉桃花心木葉活性抽出物之自由基清除活性及成分含量

在進行分離有效活性之大葉桃花心木葉甲醇抽出物之丙酮活性抽出物可溶部的品質管制方面，將以測定可溶部內總多酚、類黃酮以及總黃烷醇之含量為基礎。生物活性分析以自由基清除力代表抗氧化活性，其中較常被使用的是 DPPH 測定法，DPPH 是一種穩定的自由基可以接受電子或者氫原子(Flora et al., 1998)，在波長 517 nm 下有較強的吸光值(Shimada et al., 1992)，並以 gallic acid 作為標準品。gallic acid 在前二次計畫報告中提過其作用，且常用來測試多酚類的含量(Lamaison et al., 1991；Slinkard et al., 1977)。依照樣品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。

200 μ g/mL 大葉桃花心木葉對於 DPPH 自由基清除率相當於標準品 200 μ g/mL gallic acid 之自由基清除能力，且 50%清除率濃度 10.5 \pm 0.1 μ g/mL 比標準品 gallic acid 14.6 \pm 0.5 μ g/mL 更低，相關數據列於圖 2 及表 1。在有效活性之大葉桃花心木葉甲醇抽出物之丙酮可溶部之品質管制評估發現，大葉桃花心木葉活性抽出物每毫克中總多酚量相當於 244.7 μ g 的 gallic acid；每毫克中總黃酮量相當於 189.6 μ g 的 rutin；每毫克中總黃烷醇量則相當於 36.2 μ g 的 epicatechin，相關數據列於下表 2，結果顯示大葉桃花心木葉活性抽出物確實含有抗氧化的作用，對於開發相關健康食品具有很大的潛力。

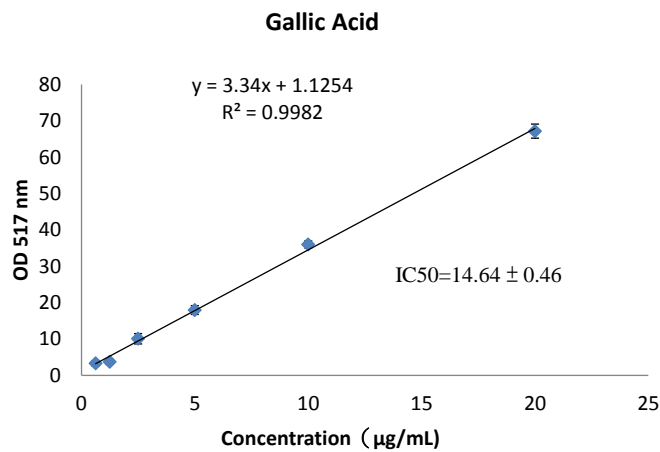


圖 2 Gallic acid 自由基清除率之濃度曲線及 IC₅₀

表 1 大葉桃花心木葉活性抽出物之自由基清除活性

	DPPH Radical scavenging (%)	IC ₅₀ µg/mL
活性抽出物 (200µg/mL)	91.2±0.6	10.5±0.1
gallic acid (200µg/mL)	91.3±0.6	14.6±0.5
Positive control: Gallic acid		

表 2 大葉桃花心木葉活性抽出物之化學定量分析 (產率=5%)

成分	含量	每 10g 葉含量
總多酚含量	244.7±4.5 (µg gallic acid/mg)	12.2 mg
總黃酮含量	189.6±2.1 (µg Rutin/mg)	9.5 mg
總黃烷醇含量	36.2±0.3 (µg (-) epicatechin/mg)	0.2 mg

二、大葉桃花心木葉活性抽出物對於心臟及腎臟粒腺體的保護

脂質過氧化主要是細胞膜上多元不飽和脂肪酸發生過氧化的現象，是因細胞膜上的膽固醇及脂肪酸上的不飽和鍵被破壞所引起的，本研究主要是由非醇

素型之亞鐵離子誘導產生脂質過氧化來進行實驗。MDA 是發生脂質過氧化的產物，具有許多傷害細胞機制的作用，加速細胞凋亡或產生變異，因此若能抑制細胞脂質過氧化的產生便能有效減少疾病的發生機率。本研究即以大葉桃花心木葉的甲醇抽出物之丙酮抽出物(大葉桃花心葉活性抽出物)，對於亞鐵離子誘導大鼠心臟與腎臟粒腺體細胞脂質過氧化的保護作用進行評估，

由表 3 實驗結果發現濃度 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 大葉桃花心葉活性抽出物，在心臟與腎臟粒腺體細胞脂質過氧化實驗中抑制 MDA 產生的能力分別高達 88.9%、98.2%，與正對照組的維他命 E 抑制能力相當。並進一步測定大葉桃花心木葉甲醇抽出物之丙酮可溶部(大葉桃花心葉活性抽出物)，抑制亞鐵離子誘導產生脂質過氧化的 50%抑制濃度($\text{IC}_{50}\mu\text{g}/\text{mL}$)，由表 4 結果發現在心臟與腎臟粒腺體細胞 IC_{50} 分別為 111.9、98.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，結果顯示均略高於 Trolox。

表 3 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 大葉桃花心葉活性抽出物抑制亞鐵離子(Fe^{2+})誘導大鼠心臟、腎臟粒腺體細胞產生 LPO 的能力

MDA scavenging activity (%)	心臟粒腺體	腎臟粒腺體
大葉桃花心木葉活性抽出物(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	88.9 \pm 5.9	98.2 \pm 2.8
Trolox(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	89.3 \pm 2.6	97.3 \pm 2.1

Positive control: Trolox (water soluble Vitamin E)

表 4 大葉桃花心木葉活性抽出物抑制亞鐵離子(Fe^{2+})誘導大鼠心臟、腎臟粒腺體細胞產生 LPO 50%抑制濃度

50%抑制濃度(IC_{50} , $\mu\text{g}/\text{mL}$)	心臟粒腺體	腎臟粒腺體
大葉桃花心木葉活性抽出物	111.9 ± 3.4	98.1 ± 0.6
Trolox	92.2 ± 2.5	62.1 ± 0.9

Positive control: Trolox (water soluble Vitamin E)

三、大葉桃花心木葉對大鼠心臟與腎臟粒線體產生脂質過氧化測定

細胞受氧壓力刺激時即產生各種自由基，而傷害細胞粒線體之脂質過氧化產生即屬其最先表現。大葉桃花心木葉活性抽出物對大鼠心臟與腎臟粒線體細胞，在不受外來氧壓力之物質或因子傷害下，經由脂質過氧化測定法(不經氧壓力刺激下)，由表 3 結果顯示對心腎粒線體均不會產生脂質過氧化，由此結果知大葉桃花心葉活性抽出物在正常狀況下，對心臟與腎臟不會產生脂質過氧化而傷害細胞。

四、大葉桃花心木葉活性抽出物之細胞毒性測定

大葉桃花心葉活性抽出物對細胞毒性，透過對細胞存活率的觀察，由圖 3 及圖 4 可知其對心、腎細胞皆不會影響細胞存活率，當大葉桃花心葉活性抽出物，在最高濃度 $200\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度下，大鼠心肌細胞株 H9c2 之存活率約達空白組(不加藥)的 85% 存活率(見圖 3)，而大葉桃花心葉活性抽出物，在最高濃度 $200\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度下，對人腎細胞株 HK2 之存活率更約達空白組(不加藥)的 90% 存活率(見圖 4)，確認大葉桃花心葉活性抽出物在對心、腎細胞臟粒線體脂質過氧

化抑制濃度 IC_{50} (約 $100\mu\text{g/mL}$)時是不影響細胞之存活。

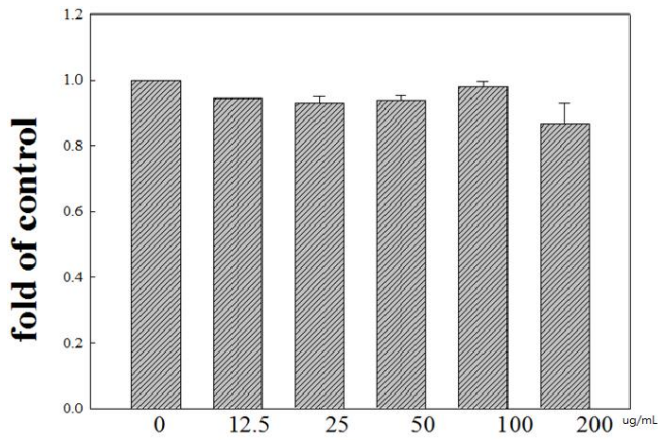


圖 3 大葉桃花心木葉活性抽出物對大鼠心肌細胞株 H9c2 之毒性檢測。X 軸為大葉桃花心木葉活性萃取物之濃度，Y 軸為細胞存活倍率。

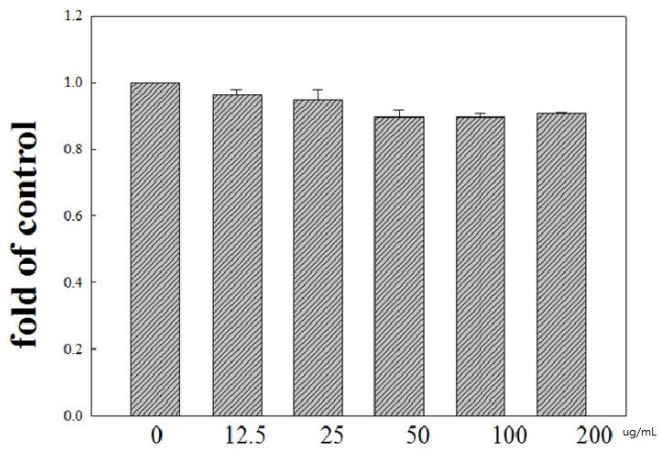


圖 4 大葉桃花心木葉活性抽出物對人腎細胞株 HK-2 之毒性檢測。X 軸為大葉桃花心木葉活性萃取物之濃度，Y 軸為細胞存活倍率。

伍、結論

一、延續前三期的計畫發現大葉桃花心木葉之保肝及抗氧化力之分析探討，已證實甲醇抽出物之丙酮可溶部為大葉桃花心木葉之保肝活性抽出物，本研究為維持其活性抽出物品質均一及再現性，建立抗自由基清除活性測試及化學成分分析定量多酚含量。大葉桃花心木葉之活性物在保護心臟及腎臟作用均呈現明顯之保護作用。

二、大葉桃花心木葉活性抽出物對大鼠心臟與腎臟粒線體不會產生脂質過氧化作用，且對正常心、腎細胞亦不具有毒性。大葉桃花心木葉是未來開發安全有效之肝、心、腎保護劑或營養補充保健物。

三、近年來雖然已有許多植物抽出物之抗氧化研究，然而大多數都尚未被應用於醫療治療(因需經新藥審查)，且由文獻中發現國內大多數植物抽出物所具有之自由基清除能力大都偏弱，自由基清除之半有效濃度如2013年 *Silybum marianum*(>1 mg/mL)，2011年 *Taxillus liquidambaricola*(88.72 μ g/mL)，2006年 *Bupleurum kaoi*(0.36mg/mL)(Ayshaet al., 2013 ; Deng et al., 2011 ; Liu et al., 2006)等，且所查得之相關文獻中大多仍以討論silymarin為主，另部分討論中藥方劑處方。目前用於醫療的抽出物僅有銀杏抽出物(治療心血管保護)及水飛薊(治療肝病)(Q.a'dan et al., 2011 ; Asghar et al., 2008)，就自由基清除能力之50%清除率濃度而言，銀杏葉在2011年Qa'dan等人報告中顯示濃度為15.5 μ g/mL，2008年Asghar等報告silymarin之濃度為1.34 mg/ml，而本計畫之大葉桃花心木葉之濃度

為 $10.5\pm 0.1 \mu\text{g/mL}$ ，相較之下，大葉桃花心木葉對於未來自由基清除能力之開發利用價值上較現有品項更具優勢。

陸、工作執行進度預定進度及經費分配

重要工作項目	工作比重% 及 查核項目	預定進度				預算金額 (860 千元)	
		101 年度				林務局 經費	其他配合 經費
		101 年 7-9 月	101 年 10-12 月	102 年 1-3 月	102 年 4-6 月		
大鼠心肌細胞 株 H9c2 之細 胞培養	20%	20%				172,000	
	查核項目	H9c2 細 胞保護 試驗結 果					
大鼠腎肌細胞 株 HK-2 之細 胞培養	20%		20%			172,000	
	查核項目		HK-2 細 胞保護 試驗結 果				
大鼠心臟粒線 體之脂質過氧 化抑制作用	30%			30%		258,000	
	查核項目			心臟粒 線體之 脂質過 氧化抑 制作用			
大鼠腎臟粒線 體之脂質過氧 化抑制作用	30%				30%		
	查核項目				腎臟粒 線體之 脂質過 氧化抑 制作用	258,000	
合計	累計 百分比	20%	40%	70%	100%	860,000	

註 1：已完成

柒、參考文獻

劉翠玲(2012)從預防醫學的角度出發-全球保健食品產業趨勢。臺灣經濟研究月刊
35(3):66-72.

馮豐隆、張愷玲、張鈞媛(2010) 大葉桃花心木的生物、生態與利用。生物科學
52(2):15-24.

Alley M. C., Scudiero D. A., Monks A., Hursey M. L., Czerwinski M. J., Fine D. L.,
Abbott B. J., Mayo J. G., Shoemaker R. H., Boyd M. R. (1988) Feasibility of Drug
Screening with Panels of Human Tumor Cell Lines Using a Microculture
Tetrazolium Assay. *Cancer Research*, 48:589-601.

Asghar Z., Masood Z. (2008) Evaluation of antioxidant properties of silymarin and its
potential to inhibit peroxy radicals in vitro. *Pakistan journal of pharmaceutical
sciences*, 21(3): 249-254.

Ayesha, N. Jahan, K. Rahman, S. Nosheen (2013) Gemmomodification: an emerging
source of natural antioxidants from *Silybum marianum*. *Pakistan Journal of
Pharmaceutical Sciences*, 26(3):585-591.

Bae Y. S., Kang S. W., Seo M. S., Baines I. C., Tekle E., Chock P. B. and Rhee S. G.
(1997) Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide.
Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *The Journal of biological*

chemistry, 272:217-221.

Chapple I. L. (1997) Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases.

Journal of Clinical Periodontology, 24:287-296.

Deng J. S., Chi C. S., Huang S. S., Shie P. H., Lin T. H., Huang G. J. (2011)

Antioxidant, analgesic, and anti-inflammatory activities of the ethanolic extracts of

Taxillus liquidambaricola. Journal of Ethnopharmacology, 137(3):1161-1171.

Erlund I. (2004) Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary

sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. Nutrition Research,

24:851-874.

Faller A. L. K., Fialho E. (2010) Polyphenol content and antioxidant capacity in organic

and conventional plant foods. Journal of Food Composition and Analysis,

23:561-568.

Fiuza S. M., Gomes C., Teixeira L. J., Girão da Cruz M. T., Cordeiro M. N. D. S.,

Milhazes N., Borges F. and Marques M. P. M. (2004) Phenolic acid derivatives with

potential anticancer properties – a structure – activity relationship study. Part 1:

Methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids. Bioorganic & Medicinal

Chemistry, 12:3581-3589.

- Flora K., Hahn M., Rosen H., Benner K. (1998) Milk thistle (*Silybum marianum*) for the therapy of liver disease. *The American Journal of Gastroenterology*, 93:139-143.
- Gutteridge J. M. C. (1993) Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free Radical Research Communications*, 19: 141-158.
- Holley A. E. and Cheeseman K. H. (1993) Measuring free radical reactions in vivo. *British Medical Bulletin*, 49:494-505.
- Jomova K. and Valko M. (2011) Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 283:65-87.
- Lamaison J. L., Ptijean-Freytet C. and Carnet C. A. (1991) Medicinal Lamiaceae with antioxidant properties, a potential source of rosmarinic acid. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 66(7):185-188.
- Lamaison J. L., Carnat A. and Petitjean-Freytet C. (1990) Tannin content and inhibiting activity of elastase in Rosaceae. *Annales Pharmaceutiques Francaises*, 48: 335-340.
- Lee H. H., Lin C.T. and Yang L.L. (2007) Neuroprotection and free radical scavenging effects of *Osmanthus fragrans*. *Journal of Biomedical Science*, 14:819-827.
- Liu C. T., Chuang P. T., Wu C. Y., Weng Y. M., Chen W., Tseng C. Y. (2006) Antioxidative and in vitro hepatoprotective activity of *Bupleurum Kaioi* leaf infusion.

Phytotherapy Research, 20(11):1003-1008

Parés A., Planas R., Torres M., Caballería J., Viver J. M., Acero D., Panés J., Rigau J.,

Santos J., Rodés J. (1998) Effects of silymarin in alcoholic patients with cirrhosis of the liver: results of a controlled, double-blind, randomized and multicenter trial.

Journal of Hepatology 28:615-621.

Patrina G., Katarina A., Kazuhiro K., Shinya I., Gideon K. (2010) Comparison of the

novel HK-2 human renal proximal tubular cell line with the standard LLC-PK1 cell line in studying drug-induced nephrotoxicity, Canadian Journal of Physiology and

Pharmacology, 88(4):448-455.

Poli G., Albano E., Dianzani M. U. (1987) The role of lipid peroxidation in liver

damage. Chemistry and Physics of Lipids, 45:117-142.

Q.a'dan F., Mansoor K., AL-Adham I., Schmidt M., Nahrstedt A. (2011)

Proanthocyanidins from Ginkgo biloba leaf extract and their radical scavenging activity. Pharmaceutical Biology, 49(5): 471–476.

Rupec R. A. and Baeuerle P. A. (1995) The genomic response of tumor cells to hypoxia

and reoxygenation, Differential activation of transcription factors AP-1 and

NF-kappa B. European Journal of Biochemistry / FEBS, 234: 632-640.

Shaker E., Mahmoud H., Mnaa S. (2010) Silymarin, the antioxidant component and Silybum marianum extracts prevent liver damage. Food and Chemical Toxicology 48(3): 803-806.

Shimada K., Fujikawa K., Yahara K. and Nakamura T. (1992) Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40:945-948.

Slinkard K. and Singleton V. L. (1977) Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. American Journal of Enology and Viticulture, 28:49-55.

Sundaresan M., Yu Z. X., Ferrans V. J., Irani K. and Finkel T. (1995) Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. Science, 270:296-299.

Wong S. H., Knight J. A., Hopfer S. M., Zaharia O., Leach C. N. Jr., Sunderman F. W. Jr. (1987) Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. Clinical Chemistry, 33: 214-220.

Yamazaki I., Tamura M., Nakajima R. and Nakamura M. (1985) Physiological aspects of free-radical reactions. Environmental Health Perspectives, 64:331-342.

林務局 101 年度林產化學類委辦計畫

期中報告審查修正對照表

桃花心木葉對心肌與腎臟保護之探討分析(4/4)

編號	審查意見	修正處
1-1.	摘要部分仍請參酌一般投稿方式，宜就本報告之內容作更扼要之敘述	依委員意見修正於 P3 摘要
1-2.	第 8 頁，三、實驗方法、2、3)、0.1%DMACA，其濃度為 W/V，但前報告為 M/V，何者正確?	應為 W/V
1-3.	第 10 頁、5)、(2)、稀釋成 1 倍，是否以稀釋成 2 倍表示較妥?而(3) 是否為稀釋成 10 倍?	已依委員意見分別修正於 P.12
1-4.	本報告中之圖一、表一~表四，其數目字一~四，宜改為一般自然科學報告 XX 慣用之阿拉伯數字 1~4 等	已依委員意見進行修正於本報告之圖表
1-5.	表 3 中「桃花心木」欄，建議改為如表 2 中之「大葉桃花心木葉活性萃取物」。	已依委員意見修正於 P.14
1-6.	表 3、表四標題及表四中，大葉桃花心葉活性萃取物應為大葉桃花心木葉活性萃取物。	已依委員意見修正於 P.14
1-7.	表 1 中，Gallic acid 之 IC50 為 14.64 ± 0.46 ，然而口頭表示實所顯示者為 64.64 ± 0.46 ，顯然有誤，不可能為萃取物之 6 倍之多。	謝謝委員指正，確為口誤
2-1.	第 3 頁，摘要第 3 行及第 13 頁，結論第 2 行「丙酮劃分部」，建議修正為「丙酮可溶部」使全文一致。	已依委員意見修正於 P.3 及 P.15
2-2.	第 3 頁，摘要第 11 行；第 5 頁，第 17 行；第 6 頁，第 7 行中「黃烷醇」之英文「flavone」是否為「flavanol」之筆誤，建議查明修正。	已依委員意見修正於 P.3,P.5,P.7
2-3.	第 3 頁，倒數第 11 行「malondialdehyde(MDA)」，建議修飾為「丙三醛(malondialdehyde，MDA)」，使全文一致。	已依委員意見修正於 P. 3
2-4.	第 4 頁，倒數第 10 行「EGF」及第 9 行「PDGF」，第一次出現簡稱，建議先寫全稱再括號附註前述簡稱為宜。	已依委員意見修正於 P.4
2-5.	第 5 頁，第 11-12 行僅說明國有林地的面積，但並無大葉桃花心木的面積，無法顯示本計畫採用樹種	

	的蓄積量及作為原料的潛力，建議補充說明。	
2-6.	第 5 頁，倒數第 4 行及第 5 行「大葉桃花心木葉對於心臟細胞...」及文中相類似香類似說明，建議修改為「大葉桃花心木葉活性萃取物對於心臟細胞...」	已依委員意見修正於 P.5
2-7.	第 6 頁，「植物材料」，大葉桃花心木葉之說明，建議附註學名及英文名稱即可，並補列產地、樹齡、採取季節，新葉或老葉，鑑定者等資料。	
2-8.	第 6 頁，「試藥及試劑」第 10 項及第 21 項輸寫格式與其他各項不一致，建議修正。	已依委員意見修正於 P.8-9
2-9.	第 7 頁，「細胞培養基」所列藥品，建議補充生產之國家。	已依委員意見修正於 P.9
2-10.	第 8 頁，第 12 行及 14 行「合併率濾液」，文字不明確，建議修飾。	已依委員意見修正於 P.9-10
2-11.	第 11 頁，「結果與討論」標題 1 類似試驗方法之標題，建議修飾。又倒數第 7 行「50%清除綠濃度甚至高於標準品」，從表一知應該是低於標準品，建議查明修正。又到倒數第 4 行「總多分量相當於 244.67mg」，建議修飾為「總多分量相當於 244.7mg」，使全文數據知小數點保留位數一致。	已依委員意見修正於 P.13
2-12.	第 11 頁，表一排版不完整，建議移至第 12 頁使表格完整。	已依委員意見修正於 P.13
2-13.	第 12 頁，表 2 標題建議刪除「分析定量」及表中「大葉桃花心木葉活性萃取物」。	已依委員意見修正於 P. 13
2-14.	第 12-13 頁，表三及表四合併成一表格。	已依委員意見修正於 P.14
2-15.	表格的製作格式，建議依科學論文的形式撰寫，橫線儘量減少，縱線全部刪除為宜，作表格更清晰美觀。	已依委員意見修正於 P.13-14
3-1.	摘要應簡化，僅就上半年度試驗內容及重要成果呈現即可，其餘背景說明資料應移至前言或討論	依委員意見修正於 P3
3-2.	名詞應統一，如「總類黃酮」↔「總黃酮」，「總類黃烷醇」↔「總黃烷醇」。	依委員意見修正於全文中
3-3.	第 3 頁，摘要 L.16，ROS 為活性氧物質；第 9 頁，3)為養壓力(ROS)；兩者名詞是否一致。	依委員意見修正統一為活性氧物質
3-4.	第 11 頁，結果與討論，L.2，「生物活性分析以代表...並以 Gallic acid 作為標準品」，語意不清楚。	已依委員意見修正於 P.13

3-5.	第 11 頁，表 1；第 12 頁，表四，同一表之內容應在同一頁。	依委員意見修正於 P. 13-14
3-6.	第 12 頁，表一中大葉桃花心木葉活性萃取物與 Gallic acid 為何採用不同表示單位?(200ug/mL)與 (50mM)是否為等量?	
3-7.	第 13 頁，4.H9C2 之細胞培養未見相關結果及內容說明。	因本部分現正進行中
3-8.	第 13 頁，結論 1，本年度再次就大葉桃花心木葉活性萃取物進行化學成分分析及自由基清除能力測試，其結果與前三年之差異性如何?	
3-9.	參考文獻之呈現格式應統一。	依委員意見修正於 P.17-18
3-10.	第 10 頁，抑制脂質過氧化計算公式中 Blank 及 Control 代表意義應加以說明。	依委員意見修正於 P.11
3-11.	報告中錯字、段落編排格式及部分語意不清楚處請再檢查修正。	依委員意見修正於全文中
4-1.	報告排列为壹、一、(一)、1、(1)，排列整齊	依委員意見修正於全文中
4-2.	第 13 頁，肆、第 12 行「在於有效...之發現」請再文字修飾。	依委員意見修正於 P.13
4-3.	第 9 頁，3)、(1)第 5 行「取上請讓列入...」語意不清；第 6 行「取下屬，以 PBS 大眾清洗微量」PBS 大眾，語意不清。	依委員意見修正於 P.12
4-4.	伍、結論倒數第 12 行 1/4 是指 102 年 1 月 4 日或是 4 分之 1，請說明。	謝謝委員指正，1/4 是指 102 年 1 月 4 日

林務局 101 年度林產化學類委辦計畫

期末報告審查修正對照表

桃花心木葉對心肌與腎臟保護之探討分析(4/4)

編號	意見	修正處
1-1	P.13, 第 3 行,「在進行分離有效...為基礎」,本段語意不明確,應加以修改。	依委員意見修正於 P.21
1-2	P.13, 第一段倒數第 5 行,「大葉桃花心木葉每毫克的總多酚量相當於 244.7 μ g 的 gallic acid」,應修正為「大葉桃花心木葉活性萃取物每毫克中總多酚量相當於 244.7 μ g 的 gallic acid」	依委員意見修正於 P.21
1-3	表 1 及表 2,除標題欄外,其餘橫分隔線建議刪除;小數點取至一位即可,表 2 建議增加各成分對實際葉重量所佔之比例一欄,如此方能評估其經濟效益。Gallic acid 的 IC ₅₀ 單位為 μ g/mL 或 mM。	依委員意見修正於 P.22
1-4	P.14,表 3 呈現格式不符合一般文獻報告,建議修改;數據之小數點位數取至一位即可,又表 3 之相關文字說明似未完成。	依委員意見修正於 P.23
1-5	由表 3 及相關說明,本研究大葉桃花心木葉活性萃取物對粒線體保護機制在抑制細胞脂質過氧化?亦或在捕捉 MDA?本研究是否有對其作用機制加以確認?	大葉桃花心葉活性抽出物對心臟與腎臟粒腺體細胞目前是呈現抑制脂質過氧化之產生,而其作用機制在本計畫中並未安排。
1-6	表 1 及表 3 均有 IC ₅₀ 之數據,此 IC ₅₀ 為不同濃度試劑之試驗結果經迴歸運算所得,建議將不同試劑濃度與試驗值之關係做圖呈現,一方面充實報告內容,另一方面可明確呈現藥劑之作用效果。	依委員意見修正於 P.22
1-7	P.14,「三、」,本段僅由無脂質過氧化現象及推斷對心臟及腎臟不具毒性,此結論說服力不足,建議應有更充分之證據,在此之前,宜修改表達方式。又由「四、」之內容,85%及 90%存活率代表意義?	依委員意見修正說明於 P.24 結果與討論之第三點及第四點
1-8	圖 1 及圖 2,標題名稱應置於圖下方,X 軸名稱?Y 軸單位?	依委員意見修正說明於 P.25。

1-9	近年來已有許多生物萃取物應用於醫療之相關研究，建議應多引用較近期之參考文獻，並就本研究之成果與國內外其他學者之結果作比較。	依委員意見修正說明於 P.26，並經國內外進行文獻搜尋近十年(2002- 2013)之研究報告屬於國際學術期刊發表，且已經衛生福利部核准之植物萃取物之植物性藥且應用於醫療為銀杏及水飛薊萃取物兩種
1-10	文章段落格式建議採左右對齊，整體呈現效果較佳。	依委員意見修正於全文
2-1	符合期末審查標準。	謝謝委員
2-2	期末報告書內容，建議將期中報告部份一齊融入使報告書更完整。	依委員意見修正於全文
2-3	Page3，建議摘要之撰寫再精減；文中不宜出現 I、II、...及 i)、ii)...等分項；單位採公制；第 8 行"free radical scavenging capability"宜先中文再括弧()英文名稱，使全文一致。	依委員意見修正於 P.3 摘要部分
2-4	本報告書漏字、英文名稱第 1 個字母大小字或筆誤之處查接修改在文內，建請參考修正。	依委員意見修正於全文
2-5	page7，(一)植物材料。第一年計畫發現產地、採集季節、海拔高度等因子皆會影響大葉桃花心木葉抽出物的抗氧化活性，建議植物材料的說明能夠包括上述因子。	依委員意見修正說明於 P.10-11
2-6	page13，結果與討論第 10~11 行"由大葉桃花心木葉對於 DPPH 自由基清除率結果來看其自由基清除率與標準品 50mM gallic acid 之能力相當"，建議補充桃花心木葉萃取物濃度(200 μ g/mL)，且試問 gallic acid 濃度 50mM(約為 8.5 μ g/mL)，兩者濃度不同如何比較其 DPPH 自由基清除率。	依委員意見修正文字敘述於 P.21。
2-7	page14，三、大葉桃花心木葉對大鼠心臟與腎臟粒線體產生脂質過氧化測定，談及初步結果顯示大葉桃花心木活性萃取物對心臟與腎臟不具有毒性，建議補充試驗數據。	依委員意見本段落修正文字敘述於 P.24。
2-8	page15，圖 1 及圖 2 之標題，建議置於圖底，且圖文	依委員意見修正於

	不清楚亦請重畫及打字。	P.25
2-9	page16， 結論太簡略，建請重新撰寫。	依委員意見修正於 P.26
3-1	「摘要」仍建議遵照一般慣例，最好限於敘述本篇報告研究結果之重點。即使是多年連續研究之前報結果亦不宜在摘要中描述，而改在前言中敘述為妥。	依委員意見刪除前報結果並修正於 P.3 摘要部分
3-2	第 8 頁，三，實驗方法，只有(一)之 1.2 兩點，第 9 頁四至 12 頁全部應都屬於實驗方法之範疇，因此第 9 頁之四應改為(二)，五應改為(三)，而其他細項目應重新編排。	依委員意見修正於 P.14-20
3-3	表 1 中大葉桃花心木葉活性萃取物之濃度單位為 $\mu\text{g/mL}$ ，而標準品 Gallic acid 之濃度則為 mM，兩者之實際濃度恐差異不少，不宜直接做自由基消除率之比較，建議以 $\mu\text{g/mL}$ 為濃度重新計算 Gallic acid 之 DPPH Radical scavenging 之%。又 IC ₅₀ 之單位是否同為 $\mu\text{g/mL}$ ，亦請一併查明	依委員意見修正於 P.22
3-4	第 13 頁，結果與討論一，倒數第 5 行，應非大葉桃花心木葉每毫克的總多酚量，而是大葉桃花心木葉活性萃取物每毫克中之總多酚量。	依委員意見修正於 P.21
3-5	第 14 頁，倒數第 3 行，進一步測定...抑制亞鐵離子誘導產生脂質過氧化的 50% 抑制濃度(IC ₅₀ $\mu\text{g/mL}$)。其結果如何?請加以說明。	依委員意見修正於 P.23
3-6	第 14 頁，三，只是初步顯示不具毒性，實際情形如何?是否應有更進一步較可靠之證據說明。	依委員意見本段落修正於 P.24，
3-7	第 15 頁之圖 1 及圖 2 應為圖 2 及圖 3，且各圖之標題應移至各圖之下方。	依委員意見修正於 P.25
3-8	第 14 頁，四，H9c2 之存活率約達空白組的 85% 存活率，HK2 存活率約達空白組的 90%，與空白組相差約 10-15% 之多，是否能視為不影響細胞存活率，值得探討。	由於本實驗劑量最高為 200 $\mu\text{g/mL}$ ，在此濃度下所得之 85~90% 存活率，降低至 IC ₅₀ 之劑量時，並不影響細胞之存活。
3-9	參考文獻第 18 應移至第 2，以符合中文在先外文在後之慣例。	依委員意見修正 P.29
4-1	全文標點符號使用須統一，如第 7 頁及第 8 頁冒號的使用。	依委員意見修正於全文

4-2	全文中括弧()的使用，如第 7 頁，(楝科(Meliaceae) 桃花心木屬...、第 9 頁，清除率...，請修正。	依委員意見修正於全文
4-3	內文中"台"灣建議改成"臺"灣。	依委員意見修正於全文
4-4	第 13 頁，表 1 中數值 91.22 ± 0.6 及表 2 數值 36.16 ± 0.289 小數位數應統一為小數位數 2 位。	依李委員意見修正至小數位數 1 位
4-5	全文中有許多內容無標點符號，如第 14 頁，表 3 標題，請修正。	依委員意見修正於全文
4-6	第 14 頁，四，第 3 行 H9c2 大小寫需全文統一。	依委員意見修正於全文
4-7	第 17 頁，預定進度表之月份需將其年度敘明清楚。	依委員意見修正於 P.28
4-8	全文及參考文獻寫作格式請參考中華林學季刊格式。	依委員意見修正於全文