

蔓荊子之抗氧化活性研究

陸毅航、

E-mail: 364817@mail.dyu.edu.tw

摘要

本研究利用不同溶劑(水、50%乙醇、甲醇、95%乙醇、乙酸乙酯與正己烷)熱迴流萃取中藥材蔓荊子(*Vitex trifolia* L.)，並對萃取物進行總多酚化合物與類黃酮化合物含量測定及抗氧化能力分析。抗氧化能力分析包括：DPPH自由基的清除能力、還原力、亞鐵離子螯合能力、清除超氧陰離子能力及清除ABTS陽離子能力，並與標準品BHA、EDTA、Trolox、維他命C及沒食子酸比較其抗氧化能力。以不同溶劑萃取蔓荊子，其中以50%乙醇之萃取率最高，達9.49%；總多酚與總類黃酮含量以正己烷萃取時最高，分別為 53.13 ± 0.10 mg/g與 1.12 ± 0.10 mg/g。清除DPPH自由基能力試驗，以乙酸乙酯萃取物最佳，在濃度0.8 mg/mL時，達100%，IC₅₀(半數清除濃度)以50%乙醇萃取物較佳，為 0.02 ± 0.00 mg/mL。還原力以水萃取物最佳，濃度0.8 mg/mL時，還原力較標準品BHA為佳。螯合亞鐵離子試驗以水萃取物在濃度4 mg/mL時最佳，達98.8%，與EDTA之螯合力相當(99.9%)，IC₅₀以水萃取物的 0.29 ± 0.01 mg/mL較佳。清除ABTS陽離子自由基能力之試驗，以水萃取物最高，達96.3%，IC₅₀為 0.18 ± 0.01 mg/mL。清除超氧陰離子能力試驗，以水萃取物活性最高，達63.2%，IC₅₀為 0.19 ± 0.00 mg/mL。經HPLC分析各萃取物中之化合物，除50%乙醇萃取物外，各萃取物均有發現槲皮素(3,3',4',5'-7-penta-hydroxy flavone, quercetin)之存在，化合物以極性較小之溶劑萃取物含量較高，可達202.93 mg/g。蔓荊子水萃取物經試驗證明，對PC12細胞沒有太大的負面影響，但隨著萃取物濃度提高，細胞會受到滲透壓的影響而死亡。最後在H₂O₂誘導損傷保護試驗中，利用長時間(24 h)及短時間(1 h)，兩種標準品對照蔓荊子水萃取物保護活性。其保護力優良，在高濃度時略低標準品槲皮素保護力，但高於羥苯醇。實驗結果顯示，蔓荊子萃取物具有高抗氧化能力，值得進一步深入研究並開發應用。

關鍵詞：蔓荊子、熱迴流萃取、多酚類化合物、類黃酮化合物、抗氧化活性、HPLC、PC12、MTT

目錄

目錄封面內頁	簽名頁	中文摘要	iii	英文摘要	v	誌謝	vii	目錄	viii	圖目錄	xi	表目錄	xii																																																																																																																																																														
1. 緒論	1	2. 文獻回顧	2	2.1 氧化壓力	2	2.1.1 自由基與氧化傷害	2	2.1.2 氧化壓力與疾病	2	2.2 抗氧化	3	2.2.1 抗氧化物質	3	2.2.2 人工合成之抗氧化劑	3	2.2.3 天然抗氧化劑	4	2.2.4 食物中的抗氧化物	4	2.3 蔓荊子	7	2.3.1 蔓荊子簡介	7	2.3.2 蔓荊植物型態	7	2.3.3 蔓荊子之傳統療效	7	2.3.4 蔓荊子臨床療效	9	2.3.5 蔓荊子主要成分	9	2.4 槲皮素	9	2.4.1 槲皮素簡介	9	2.4.2 槲皮素的生物活性	11	2.5 木樨草素	11	2.5.1 木樨草素簡介	11	2.5.2 木樨草素的生物活性	11	2.6 紫花牡荊素	15	2.6.1 紫花牡荊素簡介	15	2.6.2 紫花牡荊素的生物活性	15	2.7 PC12	15	3. 材料與方法	19	3.1 植物材料	19	3.2 藥品	19	3.3 儀器	22	3.4 實驗方法	23	3.4.1 實驗架構	23	3.4.2 蔓荊子萃取物之製備	23	3.4.3 抗氧化成分分析	25	3.4.4 抗氧化能力分析	27	3.4.5 HPLC分析	29	3.4.6 細胞試驗	29	4. 結果與討論	31	4.1 蔓荊子以不同溶劑熱迴流萃取	31	4.1.1 萃取率	31	4.2 抗氧化成分含量分析	31	4.2.1 總多酚化合物含量	31	4.2.2 總類黃酮化合物含量	34	4.3 抗氧化能力分析	34	4.3.1 清除DPPH自由基能力	34	4.3.2 鐵離子還原抗氧化力	35	4.3.3 螯合亞鐵離子能力	39	4.3.4 清除超氧陰離子能力	39	4.3.5 清除ABTS自由基能力	42	4.4 HPLC分析	42	4.5 PC12細胞試驗	45	4.5.1 細胞存活度試驗	45	4.5.2 H ₂ O ₂ 誘導氧化壓力保護試驗	48	5. 結論	54	5.1 結論	54	5.2 未來展望	54	參考文獻	56	附錄	62	圖目錄	xi	圖2.1 TBHQ、BHA、TBMP及PG之化學結構	5	圖2.2 飲食中可攝取到的類黃酮基本結構及其衍生物	6	圖2.3 蔓荊	8	圖2.4 槲皮素的結構式	10	圖2.5 木樨草素的結構式	12	圖2.6 木樨草素誘導A549肺癌細胞株之可能途徑	13	圖2.7 木樨草素的生物活性與可能的作用機制	14	圖2.8 紫花牡荊素的結構式	16	圖3.1 實驗流程圖	24	圖3.2 抗氧化活性分析	26	圖4.1 蔓荊子不同溶劑萃取物之清除DPPH自由基能力	37	圖4.2 蔓荊子不同溶劑萃取物之三價鐵還原力	38	圖4.3 蔓荊子不同溶劑萃取物之螯合亞鐵離子能力	40	圖4.4 蔓荊子萃取物之清除超氧陰離子能力	41	圖4.5 蔓荊子萃取物清除ABTS自由基能力	43	圖4.6 不同濃度蔓荊子水萃取物處理PC12細胞1小時	46	圖4.7 不同濃度蔓荊子水萃取物處理PC12細胞24小時	47	圖4.8 不同濃度H ₂ O ₂ 處理PC12細胞1小時	49	圖4.9 不同濃度H ₂ O ₂ 處理PC12細胞24小時	50	圖4.10 抗氧化劑保護PC12細胞H ₂ O ₂ 氧化損傷1小時	51	圖4.11 抗氧化劑保護PC12細胞H ₂ O ₂ 氧化損傷24小時	52	表目錄	xii	表2.1 紫花牡荊素對腫瘤細胞的抑制活性	17	表4.1 不同溶劑萃取蔓荊子之萃取率	32	表4.2 不同溶劑萃取蔓荊子其總酚及總類黃酮含量	33	表4.3 蔓荊子不同溶劑萃取物之半數清除或螯合力(IC ₅₀)	36	表4.4 HPLC分析蔓荊子萃取物之槲皮素含量	44

參考文獻

1.田振坤,王連芝,尹永琴,閻廣利. 2005. HPLC法測定蔓荊子中的紫花牡荊素. 中草藥36(5):766-767. 2.吳永忠,朱良輝. 2000. 不

同產地蔓荊子化學成分含量比較。中藥材23(10):616-619。3.岑長春,譚業華,黃瀾,陳珍,劉強,韓長日。2010。海南島不同種類與不同生境蔓荊子稀土元素的分析與比較。稀土31(3):44-47。4.金建華。2008。中藥蔓荊子13種微量元素的綜合評價。微量元素與健康研究28(3):18-19。5.林毓姿。2011。鼠尾草酸保護在缺氧狀態下PC12細胞的研究。元培科技大學碩士論文。6.胥秀英,鄭一敏,楊艷紅,傅善權。2005。高效液相色譜法測定蔓荊子中木犀草素的含量。時珍國醫國藥16(7):609-610。7.莊鼎彬。2011。彩葉草抗氧化活性與細胞試驗。大葉大學碩士論文。彰化。8.盛習鋒,陳蓉。2007。蔓荊子化學成分及藥理活性的研究進展。湖南中醫雜誌23(3):107-108。9.陳麗,李媛。2010。蔓荊子黃酮提取物的抗癌活性的研究。安徽農業科學38(29):16234-16238。10.彭霞,台海川。HPLC測定倭藥蔓荊葉中蔓荊子黃素的含量。中國民族醫藥雜誌10:56-57。11.管仁軍,王岱杰,余宗淵,王曉,藍天鳳。2010。高速逆流色譜分離純化蔓荊子中的活性成分。色譜28(11):1043-1047。12.劉紅燕,彭艷麗,萬鵬。2006。蔓荊子本草學考證。山東中醫雜誌25(2):126-128。13.劉素君。2008。蔓荊子的研究近況。樂山師範學院學報23(5):39-41。14.劉飛,田莉,陽雲,盛習鋒,曹建國。2009。紫花牡荊素抗腫瘤作用及其作用機制。國際病理科學與臨床雜誌29(5):403-406。15.譚業華,包建華,陳珍,黃瀾。2007。中藥材蔓荊子研究現狀與展望。海南師範大學學報(自然科學版)20(4):361-364。16.顧?屈A張雪梅,江志勇,陳紀軍,周俊。2007。蔓荊的化學成分研究。中草藥38(5):656-659。17.Boesch-Saadatmandia, C., A. E. Wagner, S. Wolfram, and G. Rimbach, 2012. Effect of quercetin on inflammatory gene expression in mice liver in vivo – role of redox factor 1, miRNA-122 and miRNA-125b. *Pharmacological Research*, 65: 523 – 530。18.Cai, X. T., T. M. Ye, C. Liu, W. G. Lu, M. Lu, J. Zhang, M. Wang, and P. Cao, 2011. Luteolin induced G2 phase cell cycle arrest and apoptosis on non-small cell lung cancer cells. *Toxicol In Vitro* 25(7): 1385 – 1391。19.Cook, N. C., and S. Samman, 1996. Flavonoids – Chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 7:66 – 76。20.Dolatabadi, J. E. N., and S. Kashanian, 2010. A review on DNA interaction with synthetic phenolic food additives. *Food Research International*, 43: 1223 – 1230。21.Eze, M. O., D. J. Hunting, A. U. Ogan, and O. I. Aruoma (Eds.), 1993. Reactive oxygen associated with parasitic and other tropical infections: Carcinogenic potential. *Free radicals in tropical diseases* p. 111 – 136. Harwood Academic, UK。22.Fu, Y. J., W. Liu, Y. G. Zu, M. H. Tong, S. M. Li, M. M. Yan, T. Efferth, and H. Luo, 2008. Enzyme assisted extraction of luteolin and apigenin from pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] leaves. *Food Chemistry*, 111: 508 – 512。23.Funakoshi-Tago, M., K. Nakamura, K. Tago, T. Mashino, T. Kasahara, 2011. Anti-inflammatory activity of structurally related flavonoids, Apigenin, Luteolin and Fisetin. *International Immunopharmacology*, 11: 1150 – 1159。24.Gu, Q., X. M. Zhang, J. Zhou, S. X. Qiu, and J. J. Chen, 2008. One new dihydrobenzofuran lignan from *Vitex trifolia*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 10(6): 499-502。25.Halliwell, B., 1994. Free radicals, antioxidants, and human disease: Curiosity, cause, or consequence? *Lancet*, 344: 721 – 724。26.Halliwell, B., 2001. Role of free radicals in neurodegenerative diseases: Therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging*, 18: 685 – 716。27.Halliwell, B., 2009. The wanderings of a free radical. *Free Radical Biology & Medicine*, 46: 531 – 542。28.Harman, D., 1992. Role of free radicals in aging and disease. *Annals of New York Academy of Sciences*, 673: 126-141。29.Heim, K. E., A. R. Tagliaferro, and D. J. Bobilya, 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* 13: 572 – 584。30.Hernandez, M. M., C. Heraso, M. L. Villareal, I Vargas-Arispuro, and E. Aranda, 1999. Biological activities of crude plant extracts from *Vitex trifolia* L. *J. Ethnopharmacol*, 67: 37-44。31.Hirai, S., Tanaka, M., and Sotomatsu, 1990. A. Free radicals and degenerative diseases of the nervous system. *Nippon Ronen Igakkai Zasshi*, 27 (2): 171-6。32.Karasu, C., 2010. Glycoxidative stress and cardiovascular complications in experimentally-induced diabetes: effects of antioxidant treatment. *Open Cardiovasc Med J*, 4: 240-56。33.Kimata, M., N. Inagaki, and H. Nagai, 2000. Effects of luteolin and other flavonoids on IgE-mediated allergic reaction. *Planta Med.*, 66: 25 – 29。34.Lee, J., 2006. Effect of soy protein and genistein on blood glucose, antioxidant enzyme activities, and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sciences*, 79: 1578 – 1584。35.Lotito, S. B., and B. Frei, 2006. Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: Cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radical Biology & Medicine*, 41: 1727 – 1746。36.L?檣ez-L?檣aro, M., 2009. Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. *Mini-Review in Medicinal Chemistry*, 9: 31 – 59。37.Nayaka, M. A. H., U. V. Sathisha, and S. M. Dharmesh, 2010. Cytoprotective and antioxidant activity of free, conjugated and insoluble-bound phenolic acids from swallow root (*Decalepis hamiltonii*). *Food Chemistry*, 119: 1307 – 1312。38.Osman, A. M., K. K. Y. Wong, and A. Fernyhough, 2006. ABTS radical-driven oxidation of polyphenols: Isolation and structural elucidation of covalent adducts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 346: 321 – 329。39.Rattin, S. I. S., 2006. Theories of biological aging: Genes, proteins, and free radicals. *Free Radical Research*, 40(12): 1230 – 1238。40.Seibert, H., E. Maser, K. Schweda, S. Seibert, and M. G?荆den, 2011. Cytoprotective activity against peroxide-induced oxidative damage and cytotoxicity of flavonoids in C6 rat glioma cells. *Food and Chemical Toxicology*, 49: 2398 – 2407。41.Shoji, T., Y. Akazome, T. Kanda, and M. Ikeda, 2004. The toxicology and safety of apple polyphenol extract. *Food and Chemical Toxicology*, 42: 959 – 967。42.Willcox, J. K., S. L. Ash, and G. L. Catignani, 2004. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Food Science and Nutrition*, 44: 275-295。43.W?檣fle, U., P. R. Esser, B. Simon-Haarhaus, S. F. Martin, J. Lademann, and C. M. Schempp, 2011. UVB-induced DNA damage, generation of reactive oxygen species, and inflammation are effectively attenuated by the flavonoid luteolin in vitro and in vivo. *Free Radical Biology & Medicine*, 50: 1081 – 1093。44.Xiao, X. O., J. W. Yang, and X. C. Tang, 1999. Huperzine A protects rat pheochromocytoma cells against hydrogen peroxide-induced injury. *Neuroscience Letters*, 275(2): 73 – 76。45.Yang, T., F. Luo, Y. C. Shen, J. An, X. O. Li, X. Y. Liu, B. W. Ying, Z. L. Liao, J. J. Dong, L. L. Guo, T. Wang, D. Xu, L. Chen, and F. Q. Wen, 2012. Quercetin attenuates airway inflammation and mucus production induced by cigarette smoke in rats. *International Immunopharmacology*, 13:73 – 8。