

嘉南藥理學院專題研究計畫成果報告	
數種台灣民間藥之抗氧化研究	
計畫編號：CNPH-89-11	
執行期間：88年9月1日至89年6月30日	
計畫類別： <input checked="" type="checkbox"/> 個別型	<input type="checkbox"/> 整合型：
主持人：楊政哲	計畫總主持人：
協同研究：張建雄	協同研究：

摘 要

為確認數種台灣民間藥（台灣蒟蒻、細本山葡萄及刺仔頭等），其在抗氧化活性之作用，在本計畫中，採用下列模式來評估與比較其抗氧化作用及自由基清除作用：以化學法之細胞色素 c 還原比色法，觀察其對活性氧的清除作用；另外，以氯化亞鐵誘發產生脂質過氧化物，用 TBA 法測其 Malondialdehyde (MDA) 之含量，以評估其抗脂質過氧化之能力。結果顯示用台灣蒟蒻、細本山葡萄及刺仔頭，皆具有抗氧化活性，而台灣蒟蒻、細本山葡萄及刺仔頭 IC_{50} 分別約為 5.7 mg/ml、2.8 mg/ml、9.8 mg/ml。

關鍵字：台灣蒟蒻、細本山葡萄，刺仔頭、自由基清除作用、抗脂質過氧化

前言

近年來，自由基(free radical) 其所產生的氧化性損壞及其在人體疾病所扮演的角色，日益受到重視。自由基是一種具有高度活性的粒子，最常見的例如超氧陰離子自由基(superoxide anion radical, $\cdot\text{O}_2^-$)、羥自由基(hydroxyl radical, $\cdot\text{OH}$)和過氧化物等，能氧化許多重要的生物分子，如蛋白質、脂肪、去氧核糖核酸(DNA)。在健康的人體中，儘管體內不斷地產生自由基，但由於體內存在著許多抗氧化的防禦機構，可藉由酵素(如超氧化物歧化酶superoxide dismutase (SOD)、過氧化氫酶catalase及glutathione peroxidase等)或非酵素(如vitamin C, E、mannitol...等)兩大類分子的調控，得以預防或減緩自由基的這種氧化作用，故對個體影響不致太嚴重。但如果這些抗氧化的防禦機制受到破壞，或本身有缺陷，無法有效清除自由基時，這些過剩且具有高度活性之自由基，便會攻擊核酸、蛋白質、氨基酸、脂質、脂蛋白等有機分子，造成體內不飽和脂肪酸氧化形成過氧化脂質(lipid peroxide, 簡稱LPO)、蛋白質變性、抑制酵素活性、改變氨基酸架構、代謝異常、切斷DNA鏈、細胞突變及生物活性因子不活化等障害，於是就會產生某些疾病或加速生物老化。因此，在理論上，這類疾病的預防或惡化的延遲，可以經由抗氧化防禦機制的強化達成。

依據過去的研究結果，自由基被認為可能與下列之疾病有關，如關節炎及其他發炎性疾病、肝炎、心血管疾病、缺血後再灌注之組織傷害、肺氣腫、腎臟病、胰臟炎、輻射傷害、癌症及老化...等。最近的許多研究報告則顯示，活性氧在乙醇、角叉菜(carrageenan)、四氯化碳(CCl_4)及D-半乳糖胺(β -D-galactosamine)等物質所誘發之各種毒性反應發生過程中，扮演著重要的角色，乃因這些物質所誘生的活性氧或自由基，會造成細胞膜的脂質過氧化作用，破壞細胞膜結構的完整性。另一方面，若由體外補充抗氧化物質或自由基清除劑(free radical scavenger)時，具有減輕疾病程度及抗衰老等作用。基於這些發現，尋找可以消除或抑制活性氧及抗脂質過氧化之藥物，乃刻不容緩之事，亦為時勢之所趨。在本計畫中，選擇了多種台灣常用民間藥，如台灣蒟蒻、細本山葡萄及刺仔頭等，這些生藥在本省常用於關節炎及各種發炎之治療，推測可能具有此方面之作用，因此，便著手本研究，可以更進一步以科學方式來確認台灣民間藥之藥理作用，又可開發省產藥資源。

本文

台灣蒟蒻 *Sambucus formosanus* Nakai 為忍冬科植物，乃本省常用之生藥，又名「冇骨消」、「接骨草」，能解毒、消腫、利尿、解熱、鎮痛，民間常用來作為肺炎、風濕性關節炎、腰痛、神經痛、瘡癤、無名腫毒及水腫等之治療。細本山葡萄 *Vitis thunbergii* S. et Z. var. *adstricta* (Hance) Gagnep. 為葡萄科植物，又名「小本山葡萄」，能祛風、解毒、明目、補血，民間常用來作為肺疾、風濕性關節炎乳癰及各種無名腫毒等之治療。刺仔頭 *Acacia farnesians* Willd. 為豆科植物，又名「金合歡」、「番仔刺」、「鴉皂樹」，能消炎、消腫、收斂、止血、解熱、排膿，民間常用來作為肺結核、風濕性關節炎及外傷粘膜炎等之治療。

目前用來檢測超氧陰離子自由基(superoxide anion radical)及羥自由基(hydroxyl radical)的方法非常多，在本計畫中，採用物理方法，利用電子自旋共振(ESR)技術，直接觀察藥物對超氧陰離子自由基及羥自由基之活性氧清除能力。另外，以化學法中之細胞色素c (cytochrome c)還原比色法，測定藥物之SOD樣(SOD-like)活性，此法在國際上，被認為是SOD活性間接測定法中的經典方法。如此以直接及間接兩種檢測法比較性評估，更能增加其抗氧化活性(消除活性氧)之準確性。接著以氧化亞鐵或四氯化碳誘生脂質過氧化，用TBA法測定丙二醛(malondialdehyde, MDA)之含量，來評估生藥抗脂質過氧化之能力，因為LPO是體內不飽和脂肪酸受自由基作用而形成之脂質過氧化物，LPO可反映體內自由基代謝的情況。

研究方法及進行步驟

一. 活性氧清除作用之試驗

1. 測試樣品之製備

以 cytochrome c 法測定活性時，稱取適量的各種生藥抽出物，加入 150 mM 之 KH_2PO_4 (pH=7.8) 緩衝液，使其濃度為 10 mg/ml (w/v)，以微孔濾膜(Millipore, 0.45 μm)過濾，實驗前稀釋至所需之濃度。

2. 以細胞色素(cytochrome) c 比色法測試清除 $\cdot\text{O}_2^-$ 自由基之活性

本實驗係利用 xanthine oxidase 催化 xanthine 變化 uric acid，同時產生 superoxide anion radical，再用 cytochrome c 作檢驗劑，利用 cytochrome c 與 superoxide anion radical 之間氧化還原，造成還原型 cytochrome c 量增加，在 550nm 下具吸光度，測定 superoxide anion radical 含量及所加入藥物清除 superoxide anion radical 之活性。

實驗前先將 E 液(experimental solution)配製好備用，其配製法如下：依序加入 50 mM KH_2PO_4 2 ml、0.1 mM EDTA 2 ml、0.1 mM cytochrome c 2 ml 及 0.1 mM xanthine 40 ml。

控制組於石英 cell 中加入 E 液 400 ml，水 580 ml，混和均勻；而藥物組則於石英 cell 中加入 E 液 400 ml，水 530 ml，藥物溶液 50 ml，混和均勻。最後皆加入 xanthine oxidase 20 ml，迅速攪拌，於 550 nm 下測其吸光

度。

二、抗脂質過氧化之試驗

其原理係利用脂質過氧化的終產物之一的丙二醛(Malondialdehyde; MDA)能與TBA (Thiobarbituric acid)反應，生成紅色產物，其顏色越深MDA量越多，而MDA-TBA生成物在532nm波長有最大吸收度。

1. FeCl₂-Ascorbic acid所誘發脂質過氧化之測定

① 大白鼠肝臟homogenate之製備

將大白鼠斷頭後，迅速解剖採取肝臟，取2公克肝臟，加入10 mL 150 mM之KCl-Tris-HCl緩衝液(pH=7.2)，用均質機研碎，然後用500 Xg離心10分鐘，取上清液。

② TBA-RS (Thiobarbituric acid-reactive substances)之測定

取0.5 mL之Liver homogenate加入0.1 mL Tris-HCl緩衝液(pH=7.2)、0.2 mL 6 mM Ascorbic acid、0.1 mL 4 mM 氯化亞鐵及0.1 mL各種生藥抽出物。於37°C下incubate一小時後，加入0.5 mL 0.1 N HCl、0.5 mL 1.74% SDS 及0.5 mL水，強力振盪均勻後加入 0.5 mL 0.5% TBA。混合後在熱水浴(95°C)中加熱30分鐘，待冷卻後加入5 mL BuOH。強力振盪混合均勻後，用1000 Xg 離心10分鐘，取BuOH層，在532 nm下測其吸光度 (Shimadzu UV-2000 UV-VIS spectrophotometer)

結果

當以細胞色素c (cytochrome c)還原比色法進行清除 $\cdot\text{O}_2^-$ 自由基之活性測試時，其清除由黃嘌呤-黃嘌呤氧化-細胞色素c系統(xanthine-xanthine oxidase-cytochrome c system)所產生超氧陰離子自由基(superoxide anion radical, $\cdot\text{O}_2^-$)之抑制率如下，台灣蒟蒻水抽出物 27.3% (5.0mg/ml)、95.5% (6.6mg/ml)、100% (10mg/ml)；細本山葡萄水抽出物 54.6% (3.3mg/ml)、68.2% (5.0mg/ml)、77.3% (10mg/ml)；刺仔頭水抽出物 19.2% (5mg/ml)、50.0% (10mg/ml)。另對於FeCl₂誘發大鼠肝臟均質液(homogenate)，產生脂質過氧化物現象的抑制情形如下所示，台灣蒟蒻水抽出物 11.5% (3mg/ml)、45.3% (5mg/ml)、100% (10mg/ml)；細本山葡萄水抽出物 49.2% (3mg/ml)、60.7% (5.0mg/ml)、74.5% (10mg/ml)；刺仔頭水抽出物 12.8% (3mg/ml)、23.1% (5mg/ml)、51.4% (10mg/ml)。以上結果顯示用台灣蒟蒻、細本山葡萄及刺仔頭，皆具有抗氧化活性，而台灣蒟蒻、細本山葡萄及刺仔頭 IC₅₀分別約為 5.7 mg/ml、2.8 mg/ml、9.8 mg/ml。