

東海大學食品科學研究所

Graduate Institute of Food Science

Tunghai University

科技組碩士論文

Master Thesis of Technology Section

指導教授 (Advisor) :

蘇正德教授 (Jeng-De Su, Professor)

喬長誠教授 (Charng-Cherng Chyau, Professor)

五味子萃取物及純化木酚素之抗氧化及

人類肝癌細胞株 Hep G2 抑制作用

Antioxidant and Human Hep G2 Cell Inhibitory Activities of  
Extracts and Isolated Lignans from *Schisandra chinensis* Fruits

研究生：范綱存 (Kang-Tsun Fan) 撰

中華民國一〇一年十一月

November, 2011

## 謝誌

回首研究生涯，充滿著溫馨與快樂，而隨著碩士論文的完成，這一切終將劃下句點，所有的辛苦也有了代價，所有的成長皆要歸功於我的恩師 蘇正德老師的悉心指導及共同指導教授 喬長誠老師的協助，不論是實驗、時事、態度到人生觀，老師總不厭煩的導正我方向，讓我看見老師對學生的犧牲與奉獻，更令我明白實驗必須具備的邏輯與嚴謹性。

文稿初成，承蒙 蔡正宗老師、盧錫祺老師與 王進崑老師，悉心審閱論文並斧正缺失，使本論文得以更加完善，在此表示由衷感謝，也特別謝謝畜產系 謝長奇老師在學生最失意之時給予鼓勵、支持及實驗上的幫助。

有許許多多的感謝想要表達，謝謝淵菘學長、雅淳及念穎學姐的指引，讓我得以走出實驗的迷宮，感謝同學柏村的相助，不論喜怒哀樂都共同度過，學妹瑄閔、怡慧的教學相長，學弟妹欣怡、建宏、昭伶對實驗的幫忙，以及在弘光給予我許多協助的霈菁學姐、學弟妹文豪、雨辰、婉琳、哲三、建旻和默默給予我助力與阻力的人們，謝謝你們讓我得以更進一步的成長。

最後要感謝我最親愛的家人和整個家族，謝謝你們給予我無後顧的支持與鼓勵，才能成就現在的我，在此與你們共同分享這份喜悅，也祝福所有關心我的家人、朋友們，平安健康。

范綱存謹致於

東海大學食品科學系研究所

中華民國一百年十一月

## 中文摘要

五味子(*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill fruits)為五味子科五味子屬植物果實，自古即用於中藥入藥，具有護肝之功效，其活性成分被報導主要為五味子素 B (schisandrin B)。本實驗研究即以五味子為研究對象，探討五味子素 B 之最適萃取及分離條件，並進行萃取物及純化物質抗氧化與對肝癌細胞株之生長抑制活性試驗。五味子乾燥果實經磨粉後，以正己烷去除油脂、再以甲醇萃取，甲醇萃取物經 XAD-7 進行液相膠體管柱層析分成 7 個區分，經分析及製備型逆相 HPLC 分析後，取其中區分 6 再以製備型逆相管柱液相層析，重覆純化出 3 個主要成分，經 UV、<sup>1</sup>H 及 <sup>13</sup>C-NMR 光譜分析，分別鑑定其為五味子素 B 及其異構物  $\gamma$ -schisandrin 以及 gomisins L<sub>1</sub>。五味子素 B 及其異構物( $\gamma$ -schisandrin)抑制 Hep G2 肝癌細胞生長之 IC<sub>50</sub> 值為 105.85±0.10 及 202.08±0.18  $\mu$ M，而對正常細胞株 BNL CL.2 之抑制率濃度則分別為 335.20±0.03 及 430.28±0.03  $\mu$ M。以過氧化氫誘導細胞產生氧化傷害試驗中，發現五味子素 B 之異構物可清除因自由基引起之氧化傷害，且五味子素 B 及其異構物在抗氧化性方面，皆有提升超氧陰離子歧化酶、觸酶及穀胱甘肽轉移酶活性的潛力。將五味子脫脂粉末以 80% 甲醇萃取，且樣品與溶劑量使用比例為 1:60 (w/v) 時，即可萃得最大量之五味子素 B。實驗結果可提供對於五味子在未來機能性保健食品或開發上之參考。

關鍵字：五味子、木酚素、五味子素 B、五味子素 B 異構物、Hep G2 細胞、細胞毒性、抗氧化性、抗氧化酵素

## Abstract

The fruits of *Schisandra chinensis* (Turcz) Baill. exhibiting hepatoprotective effect were used as Chinese medicine since ancient times. The active ingredient of the crude drug had been reported mainly as schisandrin B. In this study, the most effective conditions for extraction, separation and isolation of schisandrin B from *S. chinensis* fruits and the antioxidant and Hep G2 cell inhibitory activities were investigated. Dry fruits of *S. chinensis* were milled and extracted with *n*-hexane to remove lipid then extracted with methanol. Methanol extract was separated and isolated by XAD-7 and RP-HPLC chromatography to obtain three major components. The isolated components were identified as schisandrin B, schisandrin B isomer ( $\gamma$  - schisandrin) and gomisins L<sub>1</sub> by UV, <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-NMR instrumental analysis. The half maximal inhibitory concentrations of schisandrin B and  $\gamma$  - schisandrin on hepatoma cell Hep G2 were 105.85±0.10 and 202.08±0.18  $\mu$  M. While for the normal cell BNL CL.2 the values were 335.20±0.03 and 430.28±0.03  $\mu$  M. Schisandrin B isomer showed inhibition on oxidative damage induced by hydrogen peroxide. Schisandrin B and its isomer both had the potential to increase the activity of intracellular antioxidant enzymes including superoxide dismutase, catalase and glutathione-S-transferase. The product isolated from the most effective extraction condition of schisandrin B from *S. chinensis* fruits was analyzed by RP-HPLC. The results showed that the highest yield of schisandrin B from *S. chinensis* fruits was obtained from the conditions of 80% methanol and the solid to solvent ratio 1:60 (w/v). As the result of the studies, the potential remedy of prepared *S. chinensis* extract might be used for developing function foods with hepatoprotective effect.

**Key words** : *Schisandra chinensis*, lignan, schisandrin B, schisandrin B isomer, cytotoxicity, antioxidant activity, antioxidant enzyme

## 目錄

	頁碼
中文摘要.....	I
英文摘要.....	II
圖次.....	VII
表次.....	X
第一章 前言.....	1
第二章 文獻整理.....	2
2-1 自由基與活性氧.....	2
2-1-1 自由基與活性氧的種類.....	2
2-1-2 自由基與活性氧來源.....	4
2-1-3 自由基與活性氧對生物體的影響.....	5
2-2 抗氧化作用機制及常見的抗氧化劑.....	9
2-2-1 非酵素性抗氧化劑之作用機制.....	9
2-2-2 體內酵素性抗氧化作用之機制.....	11
2-3 五味子之文獻回顧.....	20
2-3-1 五味子簡介.....	20
2-3-2 五味子之化學組成.....	21
2-3-3 五味子中之抗氧化物質.....	21
2-3-4 五味子之生理活性.....	22
2-3-5 五味子素 B (schisandrin B, Sch B)之介紹.....	24
2-4 細胞試驗之 Hep G2 細胞株及細胞型態.....	31
2-5 細胞凋亡 (apoptosis)與細胞壞死 (necrosis).....	32
第三章 實驗設計.....	34
第四章 實驗材料與方法.....	35
4-1 實驗材料來源.....	35

4-1-1 實驗材料.....	35
4-1-2 實驗試藥.....	35
4-1-3 實驗設備.....	37
4-2 五味子脫脂甲醇萃取物之製備及最適溶劑萃取條件探討.....	39
4-2-1 樣品前處理.....	39
4-2-2 五味子脫脂甲醇萃取物之製備.....	39
4-2-3 五味子脫脂甲醇萃取物之成分分離與純化.....	39
4-2-4 甲醇萃取物各沖提區分高效液相層析分析.....	40
4-2-5 Cosmosil C <sub>18</sub> -OPN 膠體液相層析.....	42
4-2-6 Schisandrin B 之萃取最適條件探討.....	42
4-3 五味子脫脂甲醇萃取物之抗氧化力檢測.....	43
4-3-1 Trolox 當量抗氧化性 (Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC)測定.....	43
4-3-2 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 自由基清除能力測定.....	44
4-3-3 硫氰酸鐵法測定脂質氫過氧化物 (ferric thiocyanate assay) .....	44
4-3-4 總酚含量(total phenol contents)之測定.....	45
4-3-5 總類黃酮(total flavonoid contents)含量之測定.....	45
4-4 五味子萃取物之細胞生理活性試驗.....	46
4-4-1 培養液與磷酸緩衝液之製備.....	46
4-4-2 細胞培養與繼代培養.....	47
4-4-3 細胞解凍與凍存.....	47
4-4-4 細胞存活率測試 (MTT assay) .....	48
4-4-5 細胞氧化傷害保護作用.....	48
4-4-6 胞內抗氧化酵素分析.....	48

4-5 統計方法.....	51
第五章 結果與討論.....	52
5-1 五味子萃取物之製備及木酚素之分離純化.....	52
5-1-1 五味子脫脂及甲醇萃取物 XAD-7 液相層析.....	52
5-1-2 沖提區分之 Cosmosil 75 C <sub>18</sub> -OPN 液相層析及高效液相層析.....	52
5-1-3 五味子脫脂甲醇萃取物各區分之分析型高效液相層析結果.....	56
5-1-4 五味子脫脂甲醇萃取物區分 3 及 4、5 之成分分離與純化製備.....	58
5-1-5 五味子脫脂甲醇萃取物區分 6 之成分分離與純化製備.....	58
5-1-6 五味子脫脂甲醇萃取物區分 4 及區分 5 中純化物質之結構鑑定.....	61
5-1-7 五味子脫脂甲醇萃取物區分 6 中純化物質之結構鑑定.....	68
5-2 五味子脫脂甲醇萃取物之抗氧化力檢測.....	80
5-2-1 五味子脫脂甲醇萃取物各區分及純化物質之 trolox 當量抗氧化力分析(Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC) .....	80
5-2-2 五味子脫脂甲醇萃取物各區分之 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 自由基清除能力測定.....	82
5-2-3 五味子脫脂甲醇萃取物各區分之硫氰酸鐵法測定(Ferric thiocyanate assay) .....	82
5-2-4 五味子脫脂粉末不同溶劑萃取物及甲醇萃取物各區分之總酚含量(total phenol contents)分析.....	85
5-2-5 五味子脫脂粉末不同溶劑萃取物及甲醇萃取物各區分之總類黃酮(total flavonoid contents)含量分析.....	85
5-3 Schisandrin B 之最適萃取條件探討.....	88

5-4 五味子萃取物及純化木酚素對 Hep G2 細胞之生理活性探討.....	93
5-4-1 細胞存活率測試 (MTT assay) .....	93
5-4-2 細胞氧化傷害保護作用探討.....	95
5-4-3 胞內抗氧化酵素試驗.....	98
第六章 結論.....	104
第七章 參考文獻.....	105
第八章 附錄.....	122



## 圖次

	頁碼
圖一、氧與活性氧物質之關聯.....	3
圖二、氧化壓力所引起的細胞及組織傷害.....	7
圖三、輔酶 Q10 之結構式.....	17
圖四、細胞內抗氧化酵素之防禦系統.....	19
圖五、五味子果實.....	21
圖六、Schisandrin B 之立體異構物結構.....	25
圖七、五味子中已鑑定出之 dibenzocyclooctadienes 化合物基本結構.....	26
圖八、Hep G2 細胞株之生長型態.....	31
圖九、BNL CL.2 細胞株之生長型態.....	31
圖十、細胞凋亡與細胞壞死之差異性.....	33
圖十一、五味子脫脂甲醇萃取物 XAD-7 液相管柱層析圖.....	53
圖十二、五味子脫脂甲醇萃取物區分 6 之 Cosmosil 75 C <sub>18</sub> -OPN 液相管柱層析圖.....	55
圖十三、五味子脫脂甲醇萃取物區分 1、2、3、4、5、6 及 7 之分析型 HPLC 圖.....	57
圖十四、五味子脫脂甲醇萃取物區分 4 之分析型 HPLC 圖.....	59
圖十五、五味子脫脂甲醇萃取物區分 5 之分析型 HPLC 圖.....	59
圖十六、五味子脫脂甲醇萃取物區分 6 之分析型 HPLC 圖.....	59
圖十七、五味子脫脂甲醇萃取物區分 6 之製備型 HPLC 圖.....	60
圖十八、五味子區分 4 純化物質 1 之 <sup>1</sup> H-核磁共振光譜圖.....	65
圖十九、五味子區分 5 純化物質 2 之 <sup>1</sup> H-核磁共振光譜圖.....	66
圖二十、五味子區分 5 純化物質 3 之 <sup>1</sup> H-核磁共振光譜圖.....	67

圖二十一、五味子脫脂甲醇萃取物區分6純化物質4之 <sup>1</sup> H-核磁共振光譜圖.....	71
圖二十二、五味子區分6純化物質4之 <sup>13</sup> C-核磁共振光譜圖.....	72
圖二十三、五味子脫脂甲醇萃取物區分6純化物質5之 <sup>1</sup> H-核磁共振光譜圖.....	74
圖二十四、五味子脫脂甲醇萃取物區分6純化物質5之 <sup>13</sup> C-核磁共振光譜圖.....	75
圖二十五、五味子脫脂甲醇萃取物區分6純化物質6之 <sup>1</sup> H-核磁共振光譜圖.....	77
圖二十六、五味子脫脂甲醇萃取物各區分純化物質1(A)、2(B)、3(C)、4(D)、5(E)及6(F)之紫外光-可見光光譜圖.....	78
圖二十七、五味子脫脂甲醇萃取物各區分純化物質一覽.....	79
圖二十八、五味子脫脂甲醇萃取物各區分 ABTS · <sup>+</sup> 自由基清除能力.....	81
圖二十九、五味子脫脂甲醇萃取物區分及純化物質之 ABTS · <sup>+</sup> 自由基清除能力.....	81
圖三十、五味子脫脂甲醇萃取物各區分之清除 DPPH 自由基能力.....	83
圖三十一、利用硫氰酸鐵法檢測五味子脫脂甲醇萃取物各區分之抗氧化能力.....	84
圖三十二、五味子脫脂甲醇萃取物區分 6 純化物質 $\gamma$ -schisandrin、schisandrin B 及 gomisin L1 對 Hep G2 細胞存活率之影響.....	95
圖三十三、五味子脫脂甲醇萃取物區分 6 純化物質 $\gamma$ -schisandrin 及 schisandrin B 對 BNL CL.2 細胞存活率之影響.....	96

圖三十四、五味子脫脂甲醇萃取物區分 6 純化物質 $\gamma$ -schisandrin 及 schisandrin B 對 BNL CL.2 氧化傷害之保護作用 .....	97
圖三十五、正常 BNL CL.2 細胞株(A)與受到 10 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 傷害(B)後之型態 .....	97
圖三十六、五味子脫脂粉末 80% 甲醇萃取物對 BNL CL.2 細胞存活率之影響 .....	100
圖三十七、 $\gamma$ -schisandrin、schisandrin B、Trolox 及五味子脫脂粉末 80% 甲醇萃取物對 BNL CL.2 細胞株之超氧陰離子歧化酶活性影響 .....	101
圖三十八、 $\gamma$ -schisandrin、schisandrin B、trolox 及五味子脫脂粉末 80% 甲醇萃取物對 BNL CL.2 細胞株之觸酶活性影響 .....	102
圖三十九、 $\gamma$ -schisandrin、schisandrin B、trolox 及五味子脫脂粉末 80% 甲醇萃取物對 BNL CL.2 細胞株之穀胱甘肽轉移酶活性之影響 .....	103

## 表次

	頁碼
表一、活性氧物質之分類與名稱.....	6
表二、自由基與活性氧之來源.....	6
表三、活性氧物質所造成的各種臨床疾病.....	8
表四、不同金屬離子輔基與 SOD 的特性.....	13
表五、可被 glutathione (GSH)解毒的化學物質.....	16
表六、抗氧化系統中內源性與外源性抗氧化物質.....	18
表七、五味子中已分離出之 dibenzocyclooctadienes 化合物.....	27
表八、五味子脫脂甲醇萃取物各區分之產率.....	54
表九、五味子脫脂甲醇萃取物區分 6 之產率.....	55
表十、五味子脫脂甲醇萃取物各區分之總酚與總類黃酮含量....	86
表十一、五味子脫脂粉末不同溶劑萃取之產率、總酚與總類黃酮含 量.....	87
表十二、五味子脫脂粉末不同溶劑萃取物之產率.....	90
表十三、五味子脫脂粉末不同比例甲醇萃取物之產率.....	91
表十四、五味子脫脂粉末不同溶劑用量之 80% 甲醇萃取產率....	92
表十五、五味子脫脂粉末不同萃取時間之 80% 甲醇萃取產率....	92

## 附錄

	頁碼
附錄一、Schisandrin B(A)及五味子脫脂粉末水(B)、甲醇(C)萃取物之 分析型 HPLC 圖.....	122
附錄二、五味子脫脂粉末乙醇(A)、正丁醇(B)及乙酸乙酯(C)萃取物之 分析型 HPLC 圖.....	123
附錄三、五味子脫脂粉末 20(A)、40(B)及 60%(C)甲醇萃取物之分析 型 HPLC 圖.....	124
附錄四、五味子脫脂粉末 80% 甲醇(A)及甲醇萃取物(B)之分析型 HPLC 圖.....	125
附錄五、HPLC 測定之 schisandrin B 含量標準曲線圖.....	126
附錄六、Trolox 之標準曲線圖.....	126
附錄七、Gallic acid 之標準曲線圖.....	127
附錄八、Quercetin 之標準曲線圖.....	127

## 第一章 前言

陽光、空氣、水，生存的三大要素，然而當生物體開始利用氧氣產生能量的同時，也必須面對活性氧物質 (reactive oxygen species) 所帶來的不良影響。活性氧物質，為生物體有氧代謝過程中之副產物，因其不安定性及高度活性，一旦產生便有機會從各種細胞或分子上搶走電子，導致 DNA 結構、細胞膜上的多元不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid)、蛋白質分子及醣類等物質受到攻擊，而對生物體造成氧化傷害，進而產生退化性症病、發炎及癌症等症狀；為了存活下去生物體也發展了一系列酵素及非酵素性抗氧化傷害的防禦機制，但過量的活性氧還是會導致抗氧化系統的不平衡，造成不可逆的氧化傷害。而隨著國人的生活習慣改變，要應付的除了活性氧物質，還有各種的環境污染物或黑心食品添加物等額外的合成化學物質，更加重了身體所必須承受的負擔。根據衛生署所公佈國民十大死因，自民國 71 年起肝癌高居癌症死因第一位或第二位，慢性肝病和肝硬化亦常駐於榜上，市售的各種保肝產品陸續被研發推出，正說明了國民對肝臟保健的重視。本實驗即以在保肝具有顯著功效的五味子 (*Schisandra chinensis* fruits) 為研究對象，探討活性成分之最適且簡易之萃取條件，並利用 HPLC 液相層析進行保肝主要成分五味子素 B (schisandrin B) 的分離、純化及結構鑑定，再就純化物質做進一步的探究。

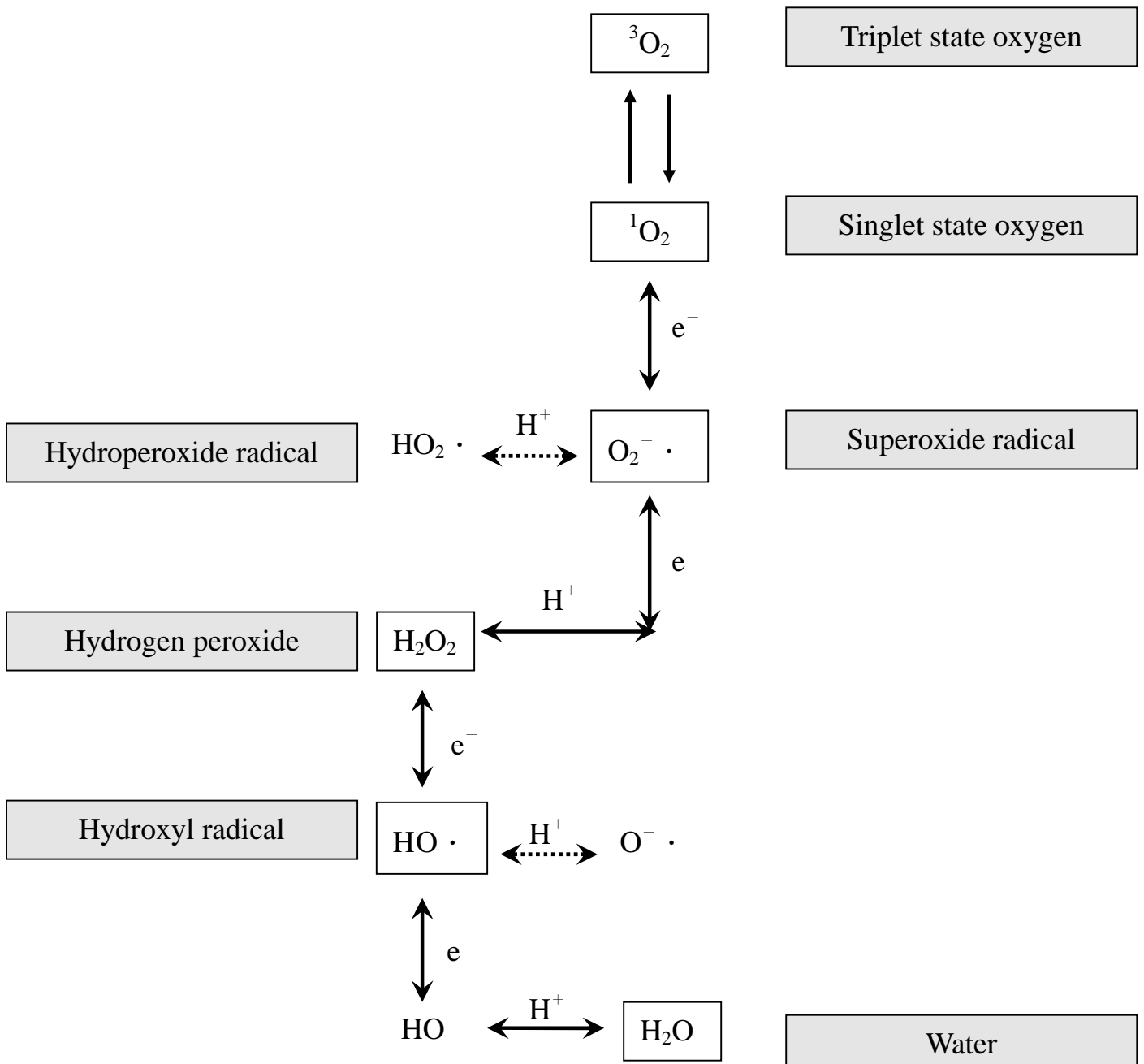
## 第二章 文獻整理

### 2-1、自由基與活性氧

#### 2-1-1 自由基與活性氧的種類

人體於正常有氧代謝途徑中會自然的產生的物質，自由基 (free radicals)，具高度活性與不安定性，為含有一個或一個以上不成對電子而獨立存在之原子、分子或離子，依其未成對電子所在位置不同，可分為以碳、氮、氧、硫為中心之自由基 (Halliwell and Gutteridge, 1994)，它可能產生於人體的任何部位，由於具高度活性，非常容易與附近的分子反應，掠奪其電子，成為能夠穩定配對的狀態並釋放出能量，而被搶走電子的物質也可能變得不穩定，可能再去搶奪其他物質的電子，於是產生一連串的連鎖反應，造成 DNA、脂質、醣類、蛋白質的受損及人體老化、退化性疾病的產生。

自然界中之氧是以安定的三旋態氧 ( $^3\text{O}_2$ , triplet state oxygen) 存在，當接受了刺激活化後會形成以氧原子為中心的高反應分子，這些物質統稱為活性氧物質 (reactive oxygen species, ROS)，其包括自由基類和非自由基兩大類 (radicals and nonradicals)。廣義的活性氧泛指所有含氧的高反應分子 (Niki, 1992)；狹義的活性氧是指生物體內經粒線體電子傳遞鏈 (electron transport chain)、觸酶 (peroxidase)、細胞色素 P450 (cytochrome P-450) 等系統代謝過程中所產生的超氧自由基 (superoxyl radical,  $\text{O}_2^- \cdot$ )、過氧化氫 (hydroperoxide,  $\text{H}_2\text{O}_2$ )、羥自由基 (hydroxyl radical,  $\text{HO} \cdot$ ) 及單旋態氧分子 (singlet oxygen,  $^1\text{O}_2$ )，其中又以  $\text{HO} \cdot$  對細胞造成的破壞性最為嚴重，在反應性上也最為激烈 (Berry *et al.*, 1994; Halliwell *et al.*, 1989; Liochev *et al.*, 1994)。



圖一、氧與活性氧物質之關聯。

Fig. 1 The relationship between oxygen and reactive oxygen species.

(遠藤和淺田, 1992)



## 2-1-2 自由基與活性氧來源

通常生物體內的自由基與活性氧來源，可分為內源性及外源性兩方面。內源性活性氧物質形成的主要原因如下：

1.於細胞中的各種氧化還原反應時產生，通常是依賴酵素的的存在而於代謝機轉中形成。氧分子自粒線體電子傳遞鏈、微粒體細胞色素P450 或其它系統，經電子轉移而產生超氧陰離子、過氧化氫和羥基自由基 (Maringanti and Imlay, 1999)。

2.脂質代謝過程中產生，花生四烯酸 (arachidonic acid)代謝時，環氧合酶 (cyclooxygenase)和脂肪加氧酶 (lipoxygenase)的作用產物。

3.發生發炎反應時，噬中性白血球 (neutrophils)、巨噬細胞 (macrophage)及內皮細胞 (endothelial cells)亦會產生大量 ROS 。

4.身體中的微量金屬離子，例如二價鐵 ( $\text{Fe}^{2+}$ )等具有高氧化力的元素所產生，游離的二價鐵離子會與過氧化氫作用，形成羥自由基 (hydroxyl radical,  $\text{HO}\cdot$ )，具高度活性，對細胞可能造成的傷害也不容小覷 (Ross *et al.*, 1993)。

外源性活性氧物質來源包括抽菸、喝酒、油炸食品、日照、環境污染物、加工食品、離子輻射或某些藥物在體內代謝過程中都有可能誘發體內自由基的產生，當然不良的生活習慣也是引起自由基及活性氧產生的原因，包括過度激烈運動、情緒緊張或熬夜。身體若長期暴露於充滿活性氧物質的環境中，將可能因氧化壓力 (oxidative stress)而造成身體的傷害與疾病 (Maxwell and Gavin, 1992)。

### 2-1-3 自由基與活性氧對生物體的影響

適量的活性氧物質是維持生命所必需的，如白血球活化時產生的超氧陰離子和過氧化氫，在殺死細菌及病毒上扮演著相當重要的角色。而活性氧物質是否會對人體造成危害，主要取決於產生的活性氧物質與身體的抗氧化防禦系統之間是否可以達到平衡，一旦失去平衡就會產生氧化壓力，造成生物體的不可逆傷害。

自由基及其間接誘發的脂質反應中間代謝物與許多疾病的形成、細胞傷害、死亡及突變有很大相關性 (Schoneich *et al.*, 1989)。然而生物體內其實並不容易發生直接由不飽和脂肪酸所誘發的過氧化反應，反而因為氧氣的活化所引起的活性氧物質與自由基間接造成的氧化傷害較為常見 (八木和五島，1981)。

當體內自由基、活性氧急遽增加或抗氧化防禦系統的能力降低時，就容易造成細胞組織及器官的傷害，包括誘發紅血球、體內各臟器及心血管方面疾病，並可能進一步引發癌症及體內其它系統疾病。常見的自由基攻擊傷害包括以下幾類：

造成 DNA 之雙股鏈結斷裂或鹼基重組，使細胞無法正常修復而突變，甚至遺傳訊息傳遞錯誤發生致癌危險。攻擊蛋白質而造成裂解或形成更大分子的蛋白質使酶變性失活，導致代謝異常產生病變。使細胞膜上之脂質發生氧化，造成細胞膜的通透性改變，營養物質出入異常產生細胞壞死 (Shigenaga *et al.*, 1989; Rikans and Hornbrook, 1997; Moskovitz *et al.*, 2002)，若細胞修復之速度不及壞死之速度則會造成組織損傷，細胞與組織的損傷又是造成器官病變及死亡的主要原因，據統計 80~90% 的疾病都直接或間接來自於自由基氧化傷害，故自由基是造成各種疾病的元兇 (Gutteridge, 1993; McCord, 2000; Moskovitz *et al.*, 2002)，圖二為氧化壓力所引起的細胞及組織傷害。

表一、活性氧物質之分類與名稱

Table 1 Classification and nomenclature of reactive oxygen species

ROS (Reactive oxygen species)			
Radicals		Nonradicals	
$O_2^- \cdot$	Superoxide radical	$^1O_2$	Singlet state oxygen
$HO_2 \cdot$	Hydroperoxide radical	$O_3$	Ozone
$HO \cdot$	Hydroxyl radical	$H_2O_2$	Hydrogen peroxide
$RO \cdot$	Alkoxy radical	$ROOH$	Hydroperoxide
$ROO \cdot$	Peroxy radical	$OCl^-$	Hypochlorite
$\cdot NO$	Nitric oxide radical	$ONOO^-$	Peroxynitrite

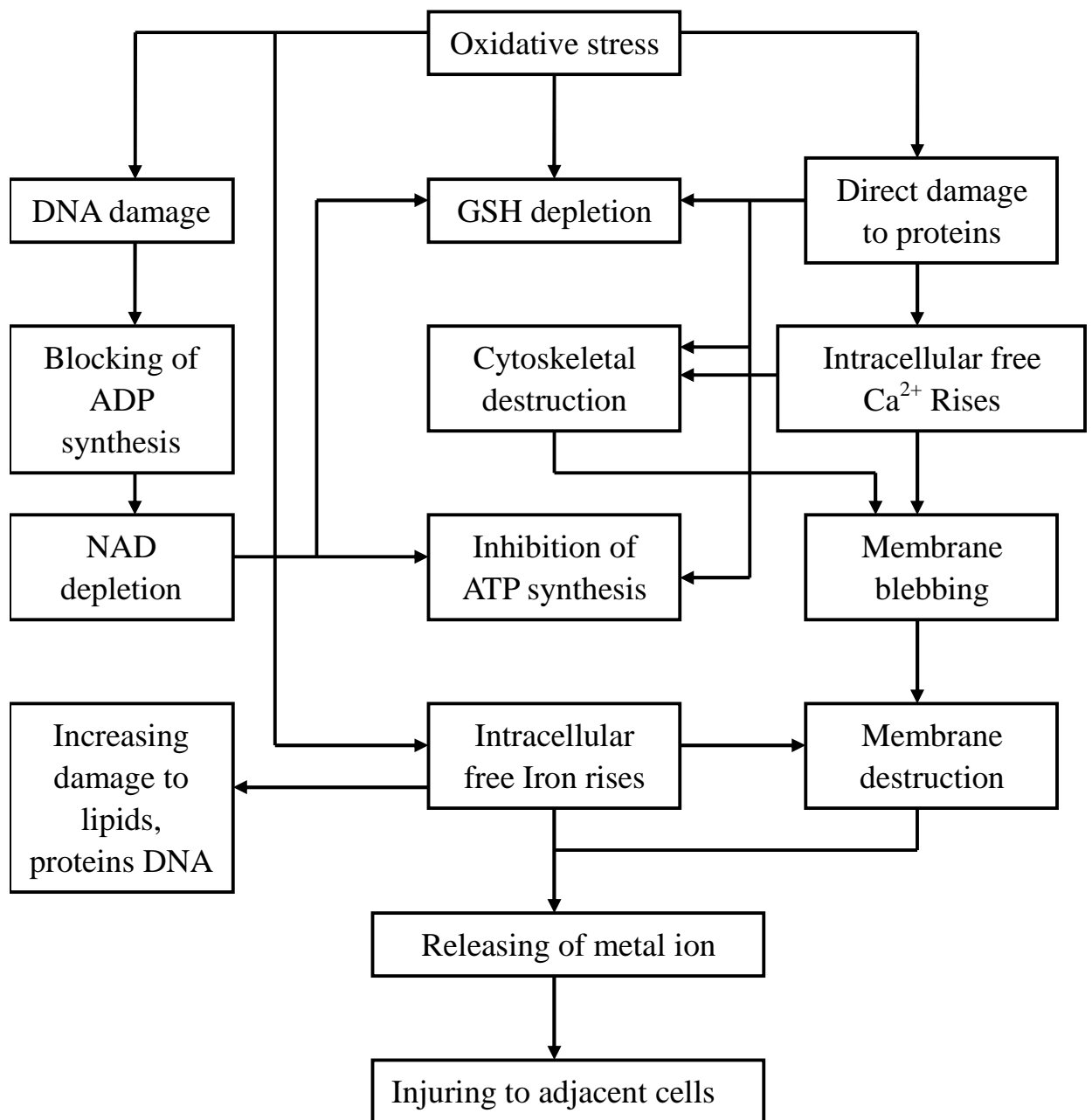
(Abuja and Albertini, 2001)

表二、自由基與活性氧之來源

Table 2 Sources of free radicals and reactive oxygen species

Intrinsic source	Extrinsic source
Auto red-ox reaction	Excessive exercise
Electron transport chain of mitochondria and microsomal oxidase	Ion radiation
Ferrous ( $Fe^{2+}$ )	Medication oxidation
Phagocytic cells	Red-ox substrate
	Smoking
	Stress
	Sun light

(Morrissey and O'Brien, 1998)



圖二、氧化壓力所引起的細胞及組織傷害。

Fig. 2 Cells and tissue damage caused by oxidative stress.

(Halliwell *et al.*, 1992)

表三、活性氧物質所造成的各種臨床疾病

Table 3 Clinical diseases caused by reactive oxygen species

Clinical diseases	
Brain	Eye
Parkinson's disease	Photic retinopathy
Vitamin E deficiency	Ocular haemorrhage
Neurotoxins	Cataractogenesis
Hypertensive cerevascular injury	Degenerative retinal damage
Aluminium overload	Retinopathy of prematurity
Potentialiation of traumatic injury	
Heart and cardiovascular system	Kidney
Atherosclerosis	Metal ion-mediated nephrotoxicity
Adriamycin cardiotoxicity	Aminoglycoside nephrotoxicity
Keshan disease	Autoimmuno nephritic syndromes
Gastro-intestinal tract	Inflammatory-immune injury
NSAID-induced GI tract lesions	Rheumatoid arthritis
Oral iron poisoning	Glomerulonephritis
Endotoxin liver injury	Autoimmuno diseases
Diabetogenic actions of alloxan	Vasculitis
Halogenated hydrocarbonliver injury	Alcoholism
FFA-induced pancreatitis	Ageing
Nutritional deficiencies	Red blood cell
Thalassaemia and other chronic	Fanconi's anaemia
Anaemias treated with multiple	Sickle cell anaemia
Blood transfusions	Favism
Dietary iron overload	Malaria
Idiopathic heamochromatosis	Protoporphyrin photo-oxidation
Lung	
Cigarette-smoke effect	Bronchopulmonary dysplasia
Emphysema	Mineral dust pneumoconiosis
ARDS	Bleomycin toxicity
Oxidant pollutants	Hypoxia

(Aruoma, 1994)

## 2-2、抗氧化作用機制及常見的抗氧化劑

有氧氣存在的情況下，食品皆會自然而然的與氧分子作用而發生氧化現象，造成食品變質，為穩定食品的品質、保障其安全性及達到延長儲存期限的目的，抗氧化劑的使用扮演著舉足輕重的角色。

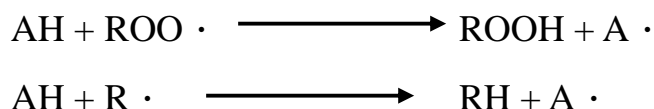
為了達到抑制或延緩因氧化而造成的食品變質，而又不影響食品本身的風味及性質，因此會希望抗氧化劑能具有於低濃度下即可有效抑制或延緩食品及生物體內各種氧化基質 (oxidizable substrate) 的氧化作用，如脂質、蛋白質及醣類等氧化基質之氧化 (Aruoma, 1999)。

### 2-2-1 非酵素性抗氧化劑之作用機制

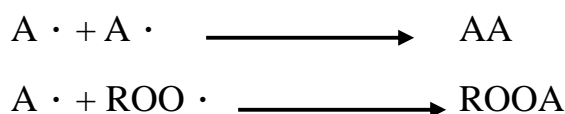
#### 2-2-1-1 自由基清除劑 (free radical scavenger)

此類抗氧化劑大多為酚類化合物，因此又稱酚類抗氧化劑，酚類化合物可藉由直接提供一個電子或提供一個質子與自由基作用，使自身形成穩定的共振結構，以終止脂質自氧化連鎖反應之增殖步驟 (propagation)，反應機制如下：

利用自由基清除劑 (AH)終止脂質自氧化連鎖反應



反應後之抗氧化劑自由基 (A·) 活性較弱，難以引起脂質自氧化連鎖反應，卻能參與一些終止反應。



自由基清除劑若要能有效達到清除的功能需滿足以下條件：一、環境中之自由基清除劑需維持一定濃度；二、必須能夠以較快的速度搶先與自由基結合；三、與自由基反應後所產生的新自由基，其毒性必需小於原本的自由基。如：butylated hydroxyanisole (BHA)、butylated hydroxytoluene (BHT)、propyl gallates (PG)，皆屬此類。

#### 2-2-1-2 單旋態氧消光劑 (singlet oxygen quencher)

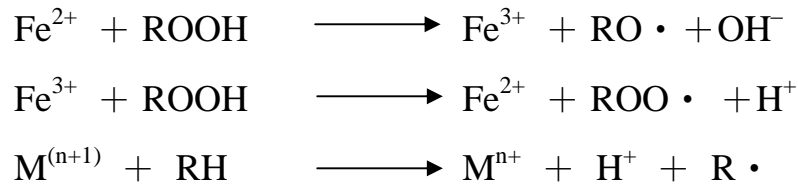
食品中常存在某些光增感劑 (photosensitizer)，如：葉綠素 (chlorophyll)、核黃素 (riboflavin)、血紫質 (haematoporphyrin)等，會吸收光能，使自身從基態 (ground state)提升至激發態 (excited state)，當激發態再度回歸至基態時會放出多餘的能量，造成空氣中基態之三旋態氧 ( $^3\text{O}_2$ )吸收能量而提升為激發態的單旋態氧 ( $^1\text{O}_2$ )，此單旋態氧就容易與食品中之不飽和脂肪酸反應產生氫過氧化物。藉由吸收光增感劑所釋放之多餘能量，使單旋態氧恢復成基態之三旋態氧，減少其與不飽和脂肪酸反應的機率 (Kellogg and Fridovich, 1975)。如：類胡蘿蔔素即具此功能。

#### 2-2-1-3 相乘劑 (synergist)

這類抗氧化劑本身並不直接與氧化因子作用，而是藉由還原已失去氫原子之酚型自由基，以達到增強酚型抗氧化劑的抗氧化能力。以抗壞血酸 (ascorbic acid)為代表，可還原失去一個質子的 $\alpha$ -生育醇 ( $\alpha$ -tocopherol)，使其恢復抗氧化能力 (Qisheng *et al.*, 2007)。

#### 2-2-1-4 金屬螯合劑 (metal chelator)

食品中大多含有過渡金屬離子，而在有微量過渡金屬離子存在的環境下易促使脂質發生氧化反應產生自由基，使氧化速率大增，其中又以銅、鐵等二價金屬離子較易發生促氧化情形。



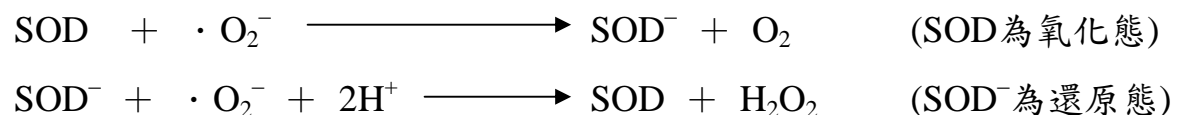
然而金屬螯合劑本身並不具有抗氧化之能力，但能與食品中之過渡金屬離子結合，消除其促氧化作用以達到抑制脂質氧化反應的作用。如檸檬酸 (citric acid)、酒石酸 (tartaric acid)、乙二胺四乙酸 (ethylene diaminetetra acetic acid, EDTA) 及焦磷酸鹽 (pyrophosphate salts) 等 (Bors, 1999; Khokhar and Apenten, 2003)。

### 2-2-2 體內酵素性抗氧化作用之機制

為保護細胞免於受活性氧和自由基造成的氧化傷害，生活在空氣中的生物體都發展出一套完整的抗氧化防禦系統以保護自身免受傷害，而抗氧化酵素正是體內的主要防線，其包括了 superoxide dismutase、catalase、glutathione peroxidase (GPx)、glutathione reductase (GR)、glutathione S-transferase (GST) 等酵素。下列幾個酵素為生物體中較重要之抗氧化酵素：

#### 2-2-2-1 超氧陰離子歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)

幾乎所有的真核生物細胞中都廣泛存在著 SOD，能將超氧陰離子歧化為過氧化氫及氧分子，以減輕超氧陰離子對細胞所造成的傷害，其反應速度極快，近乎擴散極限 (Beyer, 1994)，反應式如下：



全反應式如下：





對所有的 SOD 而言，金屬離子輔基 (prosthetic group) 的存在主導著酵素的活性，而依其輔基不同可將 SOD 分為三類：

(1) Cu/Zn – SOD：存在於真核細胞的細胞質及胞器中，為細胞內最主要之 SOD，結構穩定，耐熱性極高，由 2 個次單元所組成，每個次單元具有一活性中心，含一個銅離子與一個鋅離子，銅離子扮演著氧化與還原的角色，無法以其它金屬離子取代，暴露於酵素外側作為活性部位；鋅離子則位於酵素內部以安定酵素結構，鋅可被銀或鈷取代而酵素不致活性 (Lin *et al.*, 1998; Fridovich, 1986)。

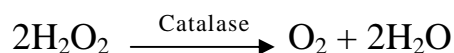
(2) Mn – SOD：存在於真核細胞與原核細胞粒線體中，原核細胞中由 2 個次單元組成，真核細胞中由 4 個次單元組成，每個次單元含一個錳離子。

(3) Fe – SOD：存在於原核生物和高等植物葉綠體中，動物組織中無此類 SOD 存在，由 2~4 個次單元組成，對 pH 變化及熱較敏感 (Stallings *et al.*, 1984)。

不同金屬離子輔基之 SOD 其分子量、組成型態、於生物體之分佈、SOD 性質及對環境因子的敏感性也都有所不同，詳述如表四。

#### 2-2-2-2 觸酶 (catalase, CAT)

觸酶主要存在於細胞的過氧化小體 (peroxisome) 內，肝細胞及紅血球中含量較多，其它細胞，如內皮細胞、神經細胞等，也存在著觸酶，主要作用為將過氧化氫還原成水與氧分子。觸酶屬於 Fe (III) – heme proteins，由四個次單元所組成，每個次單位包含一個紅血素及 NADPH 分子，分子量 58~62 kDa。



表四、不同金屬離子輔基與 SOD 的特性

Table 4 Properties of different metal ion prosthetic group to superoxide dismutase

<b>Properties</b>	<b>Cu/Zn-SOD</b>	<b>Mn-SOD</b>	<b>Fe-SOD</b>
Molecular form	Dimer, identical subunits	Dimmer (prokaryote) tetramer (eukaryote) identical subunits	Dimer or tetramer, identical subunits
Molecular weight (dimer)	32k Da	42~46 kDa	40~46 kDa
Metal ion prosthetic group	copper ( II ) x1 Zinc ( II ) x1 per unit	Manganese ( II ) x1 per unit	Iron ( II ) x1 per unit
Effect of pH on enzyme activity	No effect at pH 5~10	Decrease at pH > 8	Decrease at pH > 8
Inhibited by H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	At 0.5 mM	No effect	At 0.5 mM
Inhibited by ethanol (EtOH)	No effect	Inhibited	Inhibited
Inhibited by chloroform (CHCl <sub>3</sub> )	No effect	Inhibited	Inhibited

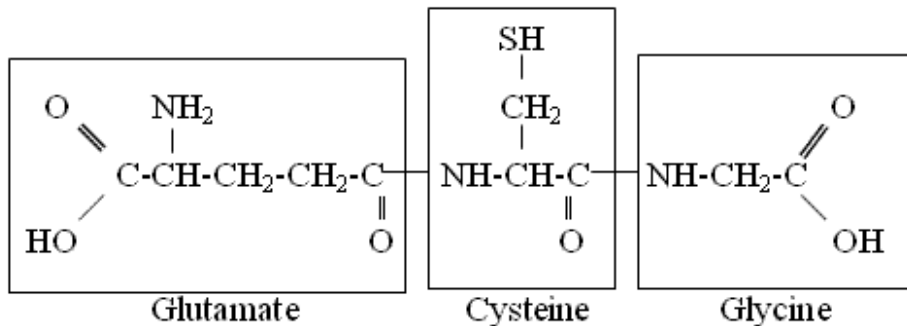
(Donnelly *et al.*, 1989)

然而僅靠觸酶之作用並不足以清除體內所產生之過氧化氫，因此還必須依賴GSH-Px來協同清除體內過氧化氫，以保護細胞不受氧化傷害 (Meyer and Isaksen, 1995; Kirkman *et al.*, 1987)。

2-2-2-3 穀胱甘肽、穀胱甘肽過氧化酶及轉移酶 (glutathione, GSH ; glutathione peroxidase, GPx ; glutathione-S-transferase, GST)

GPx 一般多存在於血液、肝臟、粒線體及細胞質中，體內分佈狀態約 70%位於細胞質中，25%則分佈於粒線體中 (Zakowski *et al.*, 1978)，其作用機制是將還原態的 GSH (glutathione)氧化為氧化態的 GSSG (glutathione disulfide)，同時清除過氧化氫和產生水分子。GPx 分子量大小約 80 kDa，由四個 22 kDa 的次單元所組成，各個次單元的反應位置皆需要一個硒 (selenium)作為輔因子，缺乏硒時 GPx 之活性也隨之下降 (Jacob, 1994; Mills, 1960)。

GSH 大量存在於肝臟細胞質中，身體之各細胞亦具有，是由 cysteine (半胱氨酸)、glutamic acid (穀氨酸)及甘氨酸 (glycine)三種胺基酸所組成，結構式如下圖所示：

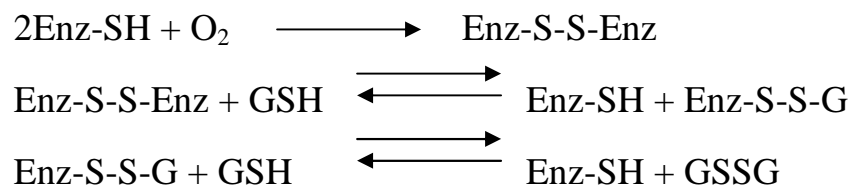


為體內之天然抗氧化劑，可分為還原態 (GSH)及氧化態 (GSSG)，主要功能如下：

(1)作為 GPx 清除自由基時的電子供應者，之後形成 GSSG。

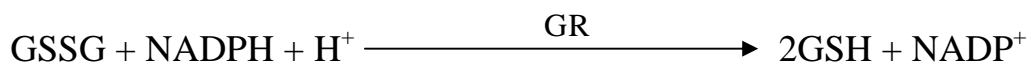


- (2) 由 2 個 GSH 直接與自由基作用後形成 GSSG，清除自由基。
- (3) 作為去氫抗壞血酸還原酶 (dehydroascorbic acid reductase) 之輔因子，將氧化態之抗壞血酸 (dehydroascorbic acid) 還原成抗壞血酸，自身形成 GSSG 狀態。
- (4) 將被氧化失去活性之含 SH 基酵素 (carboxylase, lipase, trypsin) 再度活化，反應如下：



- (5) GSH 與毒性物質作用後，形成 mercapturic acid conjugate，增加毒性物質之親水性，以利於排出體外，達到解毒的作用，可解毒的對象如表五所示。

氧化態的 GSSG 可經由 glutathione reductase (GR) 及 NADPH 還原再生成 GSH，反應式如下：



(Fang *et al.*, 2002; Meister, 1994; Townsend *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2004)

穀胱甘肽轉移酶 (glutathione-S-transferase, GST) 分佈於細胞質中，負責外來物質或體內代謝產物的解毒，使 GSH 與帶有 -O、-N 或 -S 等親水性基團的受質產生硫酯鍵 (thioester bond) 鍵結，以形成 glutathione-S-conjugate，將毒性物質去活化，避免與細胞膜脂質結合造成傷害，同時增加毒性物質的水溶性，以利於排出體外，降低毒性物質在體內停留的半衰期，以達到解毒的目的 (Townsend and Tew., 2003)。

表五、可被glutathione (GSH)解毒的化學物質

Table 5 Chemicals can be detoxified by GSH

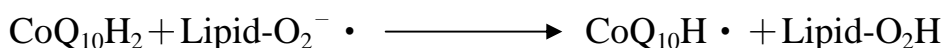
Sources of chemicals
Drugs
Acetaminophen (tylenol, atasol, others)
Other pharmaceuticals (adriamycin, steroids, phenobarbital, etc.)
Industrial products and its by products
Common solvents (acetone, alcohol, industrial agent, etc.)
Aliphatic hydrocarbons (vinyl chloride, hexachlorohexane, plastics, etc.)
Aromatic hydrocarbons (fuels, bromobenzenes, chlorobenzenes, etc.)
Carbamates, thiocarbamates
Arylamines, arylhalides (industrial exposures, etc.)
Sulfates, nitrocompounds, naphthalene (fuel, fuel by-products, etc.)
Foods
Aflatoxin B <sub>1</sub> (natural toxin, carcinogen from moldy nuts, etc.)
Nitrosamines (smoked foods, hot dogs, others)
Benzopyrenes (barbecued foods, fuel exhaust, cigarettes, etc.)
Isothiocyanates
Peroxides (lipid peroxides, cholesterol peroxides, others)
Environment
Heavy metals (lead, mercury, cadmium, cobalt, copper, etc.)
Organophosphate pesticides (parathione, others)

(Gutman and Schettini, 2000)

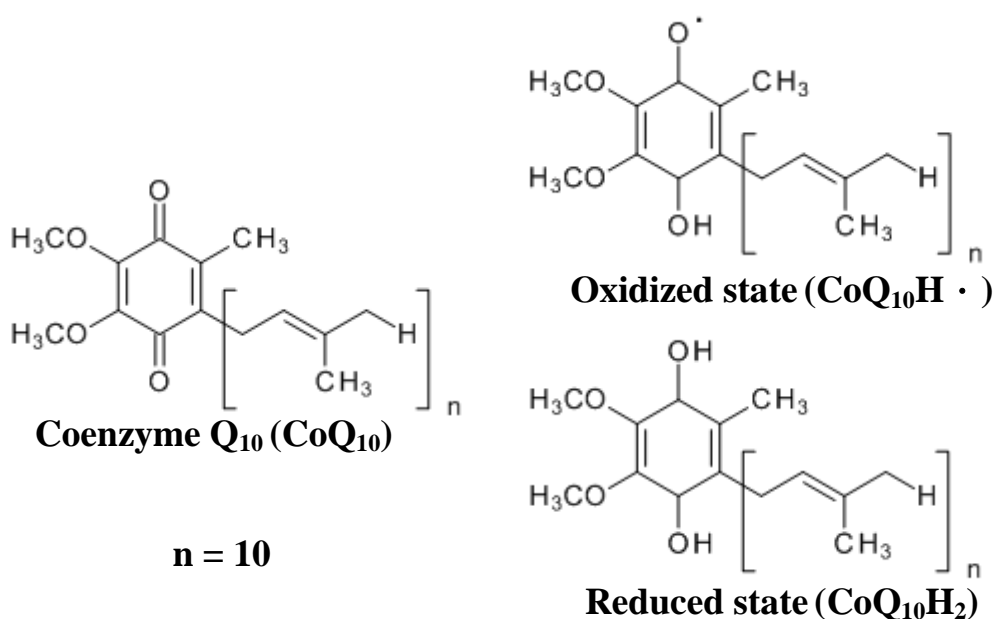
#### 2-2-2-4 輔酶 Q<sub>10</sub> (coenzyme Q<sub>10</sub>, CoQ<sub>10</sub>)

輔酶 Q<sub>10</sub>，又稱泛醌 (ubi-quinone)，因其無所不在的存於人體每一細胞粒線體中而得名，為內生性的脂溶醌類化合物，coenzyme Q 有許多種型態 CoQ<sub>1</sub> ~ CoQ<sub>13</sub>，而人體中主要存在型態為 coenzyme Q<sub>10</sub>，因其聚異戊烯基 (unsaturated trans-isoprene) 聚合度為 10 而來，也可由食物中獲取來源，但主要還是以內生性為主 (Sakiko *et al.*, 2006; Ernster and Dallner, 1995)。

CoQ<sub>10</sub>之主要功能為粒線體酵素進行三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP)合成時之輔酶，負責電子傳遞鏈中電子的接收與傳遞，將碳水化合物與脂肪酸之能量轉換為 ATP，因此 CoQ<sub>10</sub> 缺乏與否決定著人體中各組織、器官是否能正常運作 (Crane, 2001)。在抗氧化方面，CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> (還原態之 CoQ<sub>10</sub>)為細胞膜上之有效脂溶性抗氧化劑，負責提供質子，以保護細胞膜不受自由基的攻擊，並終止脂質過氧化連鎖反應的進行 (Weber *et al.*, 1994)，而 CoQ<sub>10</sub>H· (氧化態之 CoQ<sub>10</sub>)可於粒線體電子傳遞鏈中再被還原成 CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> 的型態 (Murray, 1996)，CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> 終止脂質過氧化反應如下：



CoQ<sub>10</sub>在體內的含量於20歲時達到尖峰，而隨著年齡的增長，粒線體DNA受到內源性氧自由基的傷害，體內自主合成之CoQ<sub>10</sub>濃度降低，細胞能量供給受影響，體內各細胞代謝功能下降，而對於高耗能的心臟來說，代謝功能下降的尤其嚴重，身體出現的老化現象也更加明顯 (Harman, 1972; Ernster and Forsmark-Andree, 1993)。



圖三、輔酶Q<sub>10</sub>之結構式。

Fig. 3 Structures of coenzyme Q<sub>10</sub>.

(Ernster and Dallner, 1995.)

表六、抗氧化系統中內源性與外源性抗氧化物質

Table 6 Endogenous and exogenous components of antioxidant system

---

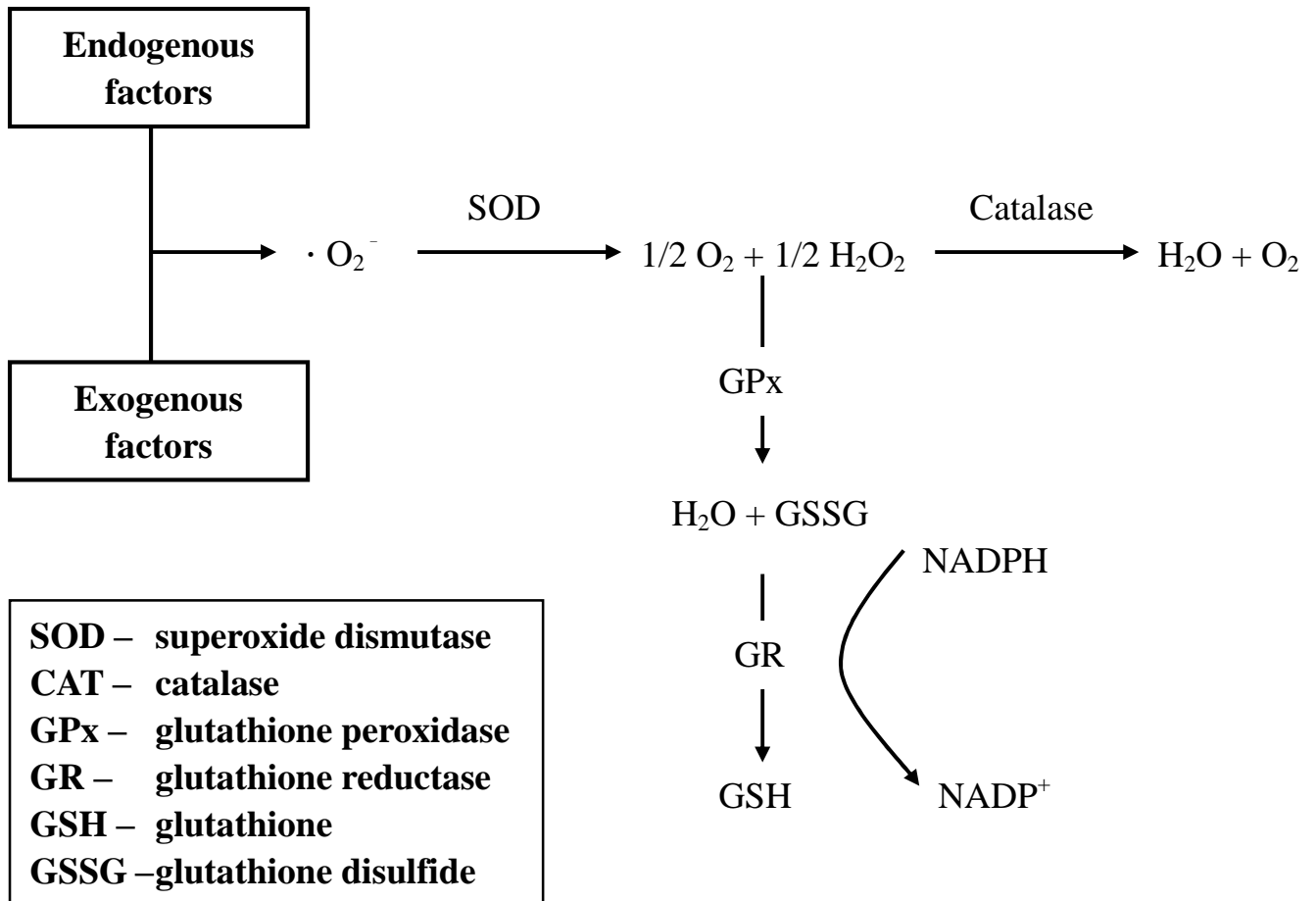
<b>Endogenous components of the antioxidant system</b>
Mn, Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD)
Fe-catalase
Glutathione (GSH, also present in foods) and Se-glutathione peroxidase
Ubiquinol-10 (reduced coenzyme Q <sub>10</sub> )
NADPH
Uric acid
Lipoic acid
Hormones with antioxidant activity (melatonin, DHEA, etc.)
Metal binding proteins (albumin and albumin bound thiols and bilirubin), Fe and Cu-binding proteins (transferrin, ceruloplasmin) and Fe-complex binding proteins (heptoglobin, hemopexin)

---

<b>Dietary and exogenous antioxidants</b>
Tocopherols and tocotrienols (vitamin E)
Ascorbate (vitamin C)
Vitamin A and carotenoids ( $\beta$ -carotene, lycopene, lutein, etc.)
Essential metals (Se and other metals for the function of antioxidant enzymes)
Phytochemicals with antioxidant activity
Dietary and other supplements (CoQ <sub>10</sub> , glutathione, lipoic acid, etc.)
Food antioxidants (BHA, BHT, propyl gallate, TBHQ, rosemary extract)

---

(Papas, 1999)



圖四、細胞內抗氧化酵素之防禦系統。

Fig. 4 Cellular antioxidative enzymatic defense system.

(Mruka *et al.*, 2002)



## 2-3 五味子之文獻回顧

### 2-3-1 五味子簡介

五味子又可分北五味子 (*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. fruits) 及南五味子 (*Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils fruits)，皆為五味子科 *Schisandra* 屬。其性味歸經及主治功效無異，但以中藥入藥效果來說，北五味子則較南五味子品質為優，本實驗所使用之五味子為北五味子，以下皆以五味子稱之 (中藥大辭典，2000)。由於五味子生長地域廣闊因此使用之名稱也因地而異，中文英譯 wu-wei-zi，日本稱之 gomishi，韓國則為 omicha，也因各地區皆對五味子有所研究，因此常有一個物質兩種名稱的問題，例如 schisandrin C 亦稱 wuweizisu C，而俄國人則使用 schizandrin C 稱之 (Hancke *et al.*, 1999)。

五味子因具五種味道，酸、甜、苦、辛、鹹而得名，別名-玄及 (吳普本草)、五梅子 (遼寧主要藥材)、山花椒，為五味子科植物五味子之果實，落葉木質藤本植物，纏繞生長於其它植物上，長可達 8 米，漿果球形，成熟時呈深紅色，內含種子 1~2 枚，果期 8~9 月。主要產地分布在東北、華北、韓國、日本與東俄羅斯等地。霜降後果實完全成熟時即可採收，揀去果枝、雜質後曬乾貯藏於乾燥通風處。五味子中藥果實呈球形或扁球形，直徑 5~8 毫米。外皮紫紅色至暗紫色，泛油脂潤澤，具不整齊的皺縮。果肉香氣微弱，味酸；種子破碎後具強烈香氣，味辛而苦，以紫紅色、粒大、肉厚、有油性及泛光澤者為佳 (中藥大辭典，2000)。

五味子之毒性測試中發現，將小鼠餵食以每公斤體重 5 克之五味子果實種子混合液，2 天並未見死亡，餵食每公斤體重 1.2 克之乙醇萃取液連續 10 天僅出現活動力減少的輕度中毒現象，對各臟器並無明顯之影響，說明五味子之毒性為相對的較低 (Song and Song, 1988)。



圖五、五味子果實。

Fig. 5 Fruits of *S. chinensis*.

### 2-3-2 五味子之化學組成

五味子具大量的多酚類化合物-木酚素，藤莖中含量約 10%，果實及種子中含量較高，可達 19.2%，最主要的木酚素有以下幾種：五味子素 (schisandrin: 0.75 – 1.86%；schisandrin B: up to 5%；schisandrin C: 0.01 – 0.34%)、去氧五味子素 (deoxyschisandrin: 0.07 – 1.09%)、五味子酯 (schisantherin 又名 gomisin；gomisin A: 0.13 – 0.90%；gomisin N: 0.24 – 1.49%)、 $\gamma$ -、 $\epsilon$ -五味子素，偽- $\gamma$ -五味子素 (pseudo- $\gamma$ -schisandrin) 及五味子醇 (schizandrol A: up to 5.17%) 等成分與 3% 油脂、多醣類、有機酸、微量金屬及一些揮發性香氣成分，各成分的含量差異性會因各地之有機物質及生長環境有別而有所不同 (中藥大辭典, 2000; Slanina *et al.*, 1997; Upton, 1999; Zhu *et al.*, 1999)。

### 2-3-3 五味子中之抗氧化物質

五味子中較具矚目的焦點除了木酚素外，還有許多其它的酚類化合物，如 cinnamic acid, quercetin 及 kaempferol 等皆是五味子中之重

要抗氧化來源 (Sladkovsky *et al.*, 2001)，而五味子果實與萃取液中所呈現出的深紅顏色主要貢獻自花青素類 (anthocyanidin) 化合物，此高親水性物質常與五味子中的糖類形成衍生物，其中的 cyanidin-3-*O*-xylosylrutinoside 更是一具有強抗氧化力的物質，同時也是五味子萃取物中主要的酚類抗氧化力來源 (Kim *et al.*, 2009)。

經甲醇萃取後之五味子殘渣部分，常被做為廢棄物丟棄，然而將此殘渣部分再經水萃處理後可得五味子之多醣類化合物，其對油脂具一定抗氧化能力，水萃所得之粗多醣產率可達 9.14%，而其中多醣的含量更高達 42.33%，具抑制脂質過氧化物丙二醛 (MDA) 生成之能力，其 IC<sub>50</sub> 為 1.32 mg/ml，除抗氧化力外更具有抗運動疲勞、維持血糖恆定及降低四氯化碳所造成之肝損傷等功能 (陳等，2009)。

#### 2-3-4 五味子之生理活性

傳統中藥用藥上，五味子主治肺虛喘咳、津傷口渴、脾腎虛寒久瀉不止、失眠健忘及滋補強身；鎮靜中樞神經系統、提升工作效率、協調腦部與肢體活動，對一些需要高度注意力、靈活性和耐力的工作都具改善作用 (中藥大辭典，2000)。

近代研究文獻指出，五味子具各種生理活性功能，尤其以肝臟保護效果最為突出，因五味子含有大量的木酚素成分，而其中五味子特有的聯苯環辛烯結構 (dibenzocyclooctadienes) 正是五味子提供肝臟保護作用的來源 (Hancke *et al.*, 1999; Upton, 1999)，以下就各文獻中提及五味子所具有的生理活性功能作介紹：

##### 2-3-4-1 肝臟保護功能

五味子萃取物具有保肝的效果，可用於治療急性、慢性及化學物質所造成的肝臟傷害，改善肝功能欠佳及肝臟解毒的狀況，藉由增加

肝臟血流量並增進肝臟細胞的修復與新生速度以達到保肝功效 (Hancke *et al.*, 1999)。

五味子乙醇萃取物可降低四氯化碳 (CCl<sub>4</sub>)及對乙醯胺基酚 (paracetamol)等化學物質所引起的 AST (aspartate aminotransferase, 又名 glutamyl oxaloacetic transaminase, GOT)及 ALT (alanine aminotransferase, 又名 glutamyl pyruvic transaminase, GPT)上升 (Pao *et al.*, 1974), 此實驗於人體試驗中亦得相同驗證, 75%的肝炎患者其 AST 及 ALT 值皆有所下降 (Chang and But, 1996)。其中的 gomisin A 不僅對化學性肝損傷, 甚至於細胞毒素所引起的免疫性肝損傷亦能降低其 ALT 及小鼠死亡率 (Yasuhiro *et al.*, 1991)。

#### 2-3-4-2 解毒功能

Gomisin A 可刺激肝醣合成, 其作用能力甚至媲美 cortisone, 為肝臟提供充足的養分, 使其可有效的修復與新生 (Hikino and Kiso, 1988)。Schisandrin A、B、C 及 schisandrol 可提升肝細胞 cytochrome P-450、NADPH-cytochrome C reductase 等酵素的蛋白質表現量, 使致癌物質易於代謝出體外而達到解毒功能 (Li and Liu, 1987)。

#### 2-3-4-3 抗氧化功能

Schisandrol A 及 B 具有提升小鼠肝細胞中 SOD、CAT 及整體 GSH 的抗氧化系統活性之能力 (Lu and Liu, 1991)。Schisandrin B 可降低 CCl<sub>4</sub> 及急性酒精中毒所造成的肝臟細胞脂質過氧化, 降低脂質過氧化物 MDA (malondialdehyde) 產生及細胞的各種損傷 (Zhang *et al.*, 1989; Lu and Liu, 1991)。Schisandrin B 可抑制脂質過氧化而不產生促氧化作用, 此同時還能達到解毒的功能, 這也就是五味子為何保肝能力如此良好之原因 (Mak *et al.*, 1996)。

#### 2-3-4-4 抑制癌細胞增生作用之功能

Gomisin A 可抑制因  $\text{CCl}_4$  造成的肝臟纖維化組織增生，並加速肝臟細胞的修復與增生速度 (Takeda, *et al.*, 1987)。Deoxyschisandrin 及 gomisin N 具抑制人類大腸癌細胞 HT-29 的增生作用，但目前作用機制未明 (Gnabre *et al.*, 2010)。五味子中萃取出之 schisandrin 具誘導人類胸腺癌細胞 T47D 產生細胞週期阻滯 (cell cycle arrest) 以達到阻止癌細胞增生的作用 (Kim *et al.*, 2010)。

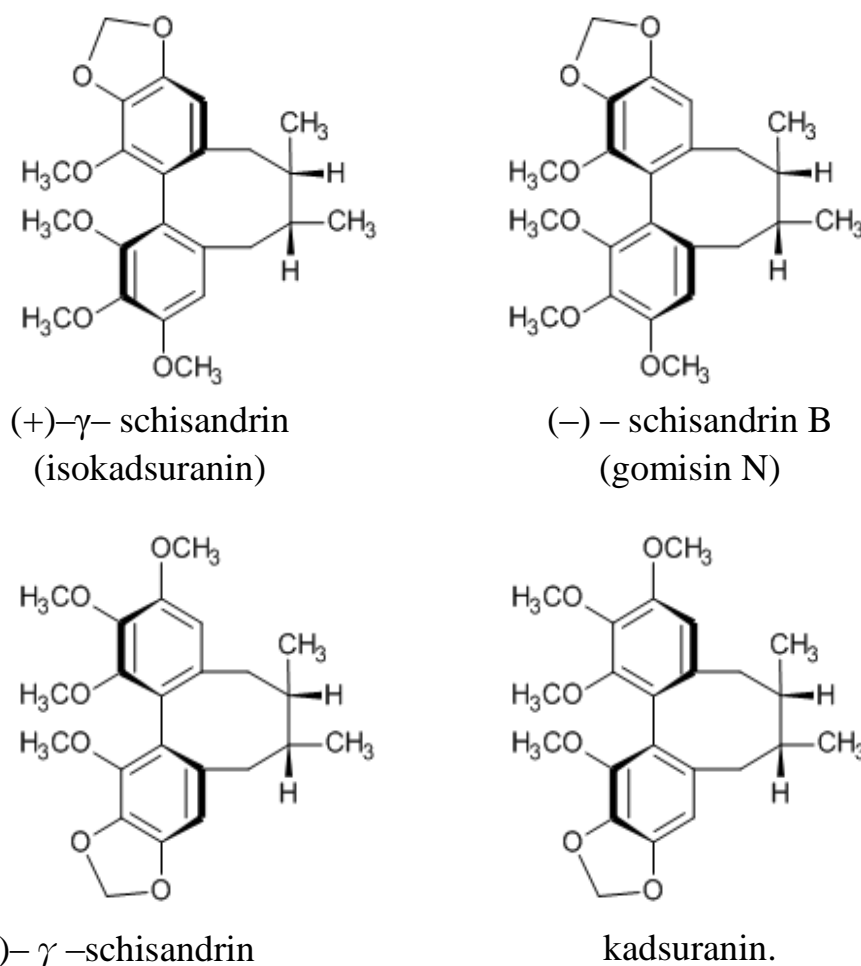
#### 2-3-4-5 其它生理功能

五味子萃提取物具消除疲勞、增加耐力及提升運動員的生理表現 (Hancke *et al.*, 1994)，改善腦部機能、增進思考能力，使神經細胞正常化改善神經衰弱及焦慮等問題 (Chang and But, 1996)，gomisin A 可改善鎮靜劑 scopolamin 所造成的短期記憶障礙副作用 (Kim *et al.*, 2006.)，活化中樞神經系統、增加呼吸深度及次數，增強心臟肌肉收縮及血管舒張，降低因嗎啡引起的呼吸抑制問題 (Huang, 1999)。

#### 2-3-5 五味子素 B (schisandrin B, Sch B) 之介紹

Schisandrin B 之基本結構為十八碳的雙酚化合物 dibenzocyclooctadiene 加以四個 methoxy 及一個 methylenedioxy 基團，此意味著其可能具有四種不同的立體異構物，如圖六所示。而 Sch B 也具備有許多之生理活性，如保護腦部、肝臟及心臟不受氧化傷害影響，降低穀胺酸所誘導產生的神經毒性，誘發細胞凋亡，抑制 P-glycoprotein 表現，以降低癌細胞的多重抗藥性，增加 heat shock protein (Hsp) 25 及 70 的表現，以抵抗不利於細胞生存的各種因子 (高溫、紫外線、機械性損傷、酸鹼及氧化劑等)，減少蛋白質摺疊錯誤 (folding error)，將蛋白質重新拆解並摺疊等各種對生物體有利之功能 (Luk, *et al.*, 2008)。有別於化學性抗氧化劑  $\alpha$ -tocopherol、Trolox 等，

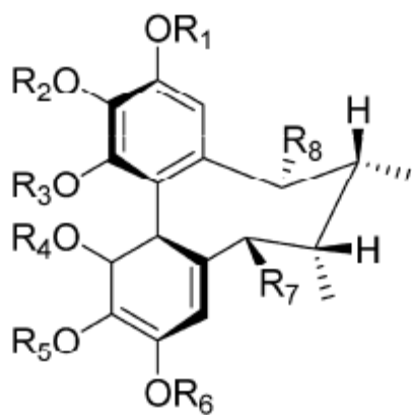
雖具有抗氧化能力，但另一方面卻也同時隱藏著促氧化的副作用，而 Sch B 則僅具有抗氧化能力卻不會引發促氧化傷害，主要原因為其結構 dibenzocyclooctadiene 有提升穀胱甘肽含量及穀胱甘肽過氧化酶活性的能力並可降低細胞過氧化物的生成，以達到清除超氧陰離子及羥自由基的功能，而非一般抗氧化劑僅藉由提供氫質子與電子以穩定結構消除自由基。也正因為 Sch B 之結構上不具有酚類的 OH 基團無法提供氫質子因此其化學性抗氧化能力，如 DPPH 與 ABTS 自由基的清除能力較弱，故 Sch B 抗氧化能力在細胞模式上的探討為較具意義的 (Karel *et al.*, 2010)。



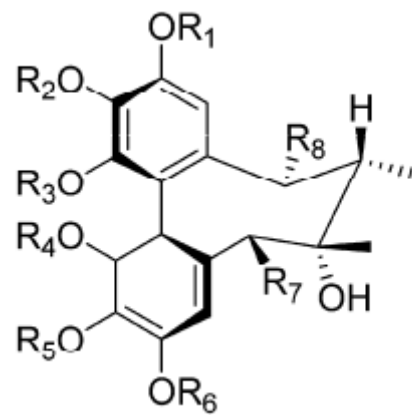
圖六、Schisandrin B 之立體異構物結構。

Fig. 6 Stereoisomers of schisandrin B.

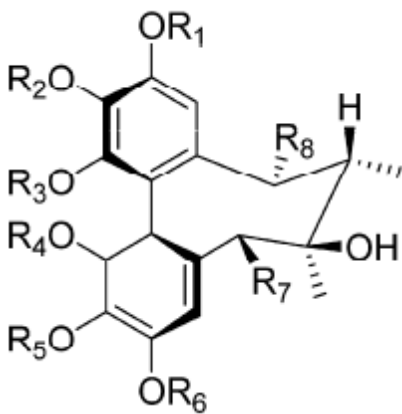
(Luk, *et al.*, 2008)



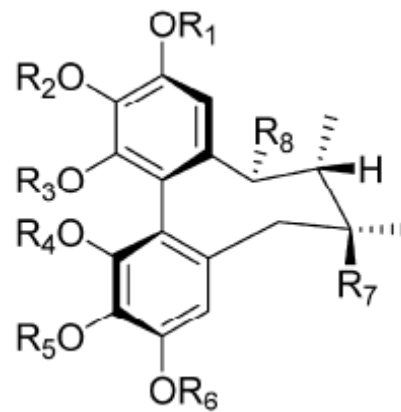
結構圖序號 1~8



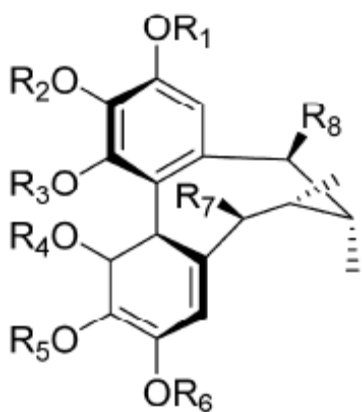
結構圖序號 9~15



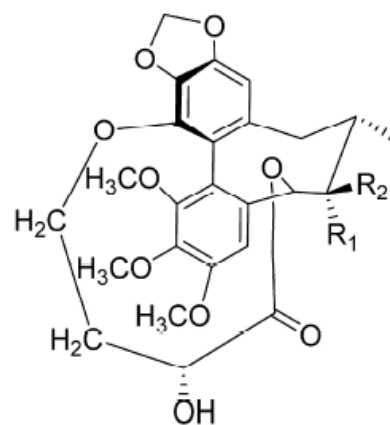
結構圖序號 16~18



結構圖序號 19~34



結構圖序號 35~40



結構圖序號 41~42

圖七、五味子中已鑑定出之 dibenzocyclooctadienes 化合物基本結構。

Fig. 7 Basic structures of dibenzocyclooctadienes compounds have been isolated from *S. chinensis* fruits.

表七、五味子中已分離出之 dibenzocyclooctadienes 化合物

Table 7 Dibenzocyclooctadienes compounds have been isolated from *S. chinensis* fruits

化合物名稱	結構圖序號	結構	文獻
schisandrin C (wuweizisu C)	1	R1+R2=R5+R6=CH <sub>2</sub> , R3=R4=CH <sub>3</sub> , R7=R8=H	Ikeya <i>et al.</i> , 1982
gomisin N	2	R1+R2=CH <sub>2</sub> , R3=R4=R5=R6=CH <sub>3</sub> , R7=R8=H	Ikeya <i>et al.</i> , 1978
(-)-gomisin K1	3	R1=R7=R8=H, R2=R3=R4=R5=CH <sub>3</sub>	Ikeya <i>et al.</i> , 1980
(-)-gomisin L1	4	R1=R2=CH <sub>3</sub> , R3=R7=R8=H,	Ikeya <i>et al.</i> , 1982
(-)-gomisin L2	5	R1=R7=R8=H, R2=R3=CH <sub>3</sub>	Ikeya <i>et al.</i> , 1982
gomisin J	6	R1=R6=R7=R8=H, R2=R3=R4=R5=CH <sub>3</sub>	Ikeya <i>et al.</i> , 1978
epigomisin O	7	R1+R2=CH <sub>2</sub> , R3=R4=R5=R6=CH <sub>3</sub> , R7=α-OH, R8=H	Ikeya <i>et al.</i> , 1979
gomisin S	8	R1=R8=H, R2=R3=R4=R5=R6=CH <sub>3</sub> , R7=α-OH, R8=H	Ikeya <i>et al.</i> , 1988
gomisin B	9	R1+R2=CH <sub>2</sub> , R3=R4=R5=R6=CH <sub>3</sub> , R7=OAng, R8=H	Ikeya <i>et al.</i> , 1979
gomisin C (schisantherin A)	10	R1+R2=CH <sub>2</sub> , R3=R4=R5=R6=CH <sub>3</sub> , R7=OBz, R8=H	Ikeya <i>et al.</i> , 1979
gomisin F	11	R1=R2=R3=R4=CH <sub>3</sub> , R5+R6=CH <sub>2</sub> , R7=OAng, R8=H	Taguchi <i>et al.</i> , 1977



(承上頁)

化合物命名	結構圖序號	官能基位置	參考文獻
gomisin G	12	R1=R2=R3=R4=CH <sub>3</sub> , R5+R6=CH <sub>2</sub> , R7=OBz, R8=H	Taguchi <i>et al.</i> , 1977
angeloylgomisin Q	13	R1=R2=R3=R4=R5=R6=CH <sub>3</sub> , R7=OAng, R8=H	Ikeya <i>et al.</i> , 1979
schisantherin C	14	R1+R2=CH <sub>2</sub> , R3=R4=R5=R6=CH <sub>3</sub> , R7=OTig, R8=H	Liu <i>et al.</i> , 1978 Ikeya <i>et al.</i> , 1979
schisantherin D	15	R1+R2=R5+R6=CH <sub>2</sub> , R3=R4=CH <sub>3</sub> , R7=OBz, R8=H	Liu <i>et al.</i> , 1978 Ikeya <i>et al.</i> , 1982
deangeloylgomisin B	16	R1+R2=CH <sub>2</sub> , R3=R4=R5=R6=CH <sub>3</sub> , R7=H, R8=H	Ikeya <i>et al.</i> , 1979
tigloylgomisin P	17	R1+R2=CH <sub>2</sub> , R3=R4=R5=R6=CH <sub>3</sub> , R7=OTig, R8=H	Ikeya <i>et al.</i> , 1978
angeloylgomisin P	18	R1+R2=CH <sub>2</sub> , R3=R4=R5=R6=CH <sub>3</sub> , R7=OAng, R8=H	Ikeya <i>et al.</i> , 1980
(+)-deoxyschizandrin (schisandrin A, wuweizisu A)	19	R1=R2=R3=R4=R5=R6=CH <sub>3</sub> , R7=R8=H	Chen <i>et al.</i> , 1976
(+)- $\gamma$ -schisandrin (schisandrin B, wuweizisu B)	20	R1+R2=CH <sub>2</sub> , R3=R4=R5=R6=CH <sub>3</sub> , R7=R8=H	Chen <i>et al.</i> , 1976 Ikeya <i>et al.</i> , 1979

(承上頁)

化合物名稱	結構圖序號	結構	文獻
(+)-gomisin K2	21	R1=R7=R8=H,	Ikeya <i>et al.</i> , 1980
(+)-gomisin K3	22	R1=R2=R4=R5=R6=CH <sub>3</sub> ,	Ikeya <i>et al.</i> , 1980
Schisanhenol	23	R1=R2=R3=R5=R6=CH <sub>3</sub> ,	Liu <i>et al.</i> , 1978
schisanhenol acetate	24	R1=R2=R4=R5=R6=CH <sub>3</sub> , R3=Ac, R7=R8=H	Wang and Chen, 1985 Ikeya <i>et al.</i> , 1980
(±)-gomisin M1	25	R1=R2=R4=CH <sub>3</sub> , R5+R6=CH <sub>2</sub> , R3=R7=R8=H	Ikeya <i>et al.</i> , 1982
(+)gomisin M2	26	R1=R2=R3=CH <sub>3</sub> , R5+R6=CH <sub>2</sub> , R4=R7=R8=H	Ikeya <i>et al.</i> , 1982
gomisin A (schisandrol B)	27	R1+R2=CH <sub>2</sub> , R3=R4=R5=R6=CH <sub>3</sub> , R7=OH, R8=H	Ikeya <i>et al.</i> , 1979
Schisandrin (schisandrol A)	28	R1=R2=R3=R4=R5=R6=CH <sub>3</sub> , R7=OH, R8=H	Ikeya <i>et al.</i> , 1979
gomisin H	29	R1=R2=R4=R5=R6=CH <sub>3</sub> , R7=OH, R3=R8=H	Ikeya <i>et al.</i> , 1979
angeloylgomisin H	30	R1=R2=R4=R5=R6=CH <sub>3</sub> , R3=Ang, R7=OH, R8=H	Ikeya <i>et al.</i> , 1978
tigloylgomisin H	31	R1=R2=R4=R5=R6=CH <sub>3</sub> , R3=Tig, R7=OH, R8=H	Ikeya <i>et al.</i> , 1978
benzoylgomisin H	32	R1=R2=R4=R5=R6=CH <sub>3</sub> , R3=Tig, R7=OH, R8=H	Ikeya <i>et al.</i> , 1978

(承上頁)

化合物名稱	結構圖序號	結構	文獻
gomisin T	33	R2=R3=R4=R5=R6=CH <sub>3</sub> , R1=R8=H, R7=OH	Ikeya <i>et al.</i> , 1988
Isoschizandrin	34	R1=R2=R3=R4=R5=R6=CH <sub>3</sub> , R7=OH, R8=H	Ikeya <i>et al.</i> , 1988
gomisin O	35	R1+R2=CH <sub>2</sub> , R3=R4=R5=R6=CH <sub>3</sub> , R7=OH, R8=H	Ikeya <i>et al.</i> , 1979
angeloylgomisin O	36	R1+R2=CH <sub>2</sub> , R3=R4=R5=R6=CH <sub>3</sub> , R7=OAng, R8=H	Ikeya <i>et al.</i> , 1982
angeloylisogomisin O	37	R1=R2=R3=R4=CH <sub>3</sub> , R5+R6=CH <sub>2</sub> , R7=OAng, R8=H	Ikeya <i>et al.</i> , 1982
6-O-benzoylgomisin O	38	R1+R2=CH <sub>2</sub> , R3=R4=R5=R6=CH <sub>3</sub> , R7=OBz, R8=H	Chen <i>et al.</i> , 1994
benzoylisogomisin O	39	R1=R2=R3=R4=CH <sub>3</sub> , R5+R6=CH <sub>2</sub> , R7=OBz, R8=H	Ikeya <i>et al.</i> , 1982
gomisin R	40	R1+R2=R5+R6=CH <sub>2</sub> , R3=R4=CH <sub>3</sub> , R7=OH, R8=H	Ikeya <i>et al.</i> , 1982
gomisin D	41	R1=CH <sub>3</sub> , R2=OH	Ikeya <i>et al.</i> , 1976
gomisin E	42	R1=H, R2= CH <sub>3</sub>	Ikeya <i>et al.</i> , 1979

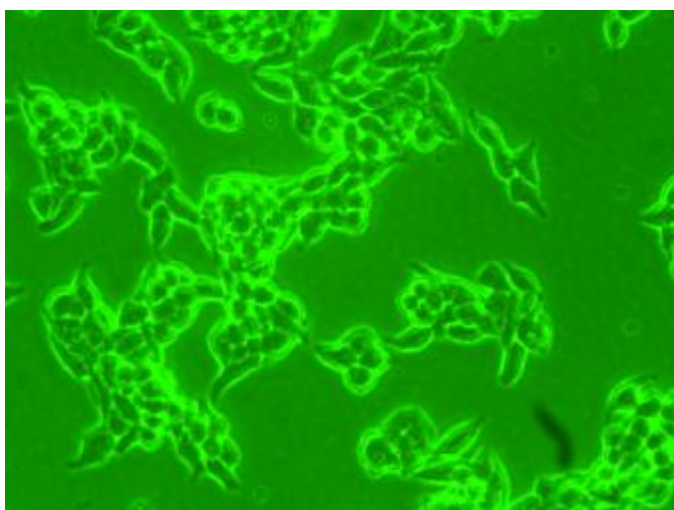
縮寫 - Ang : angeloyl; Tig : tigloyl; Bz : benzoyl

(許等, 2008)

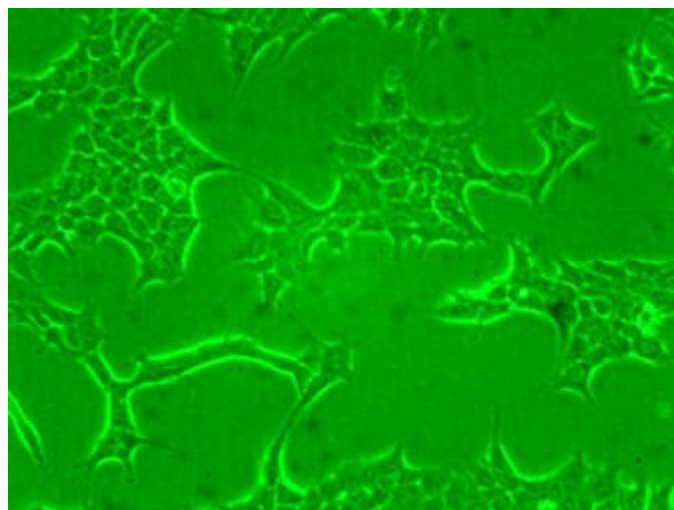
## 2-4 細胞試驗之 Hep G2 細胞株與細胞型態

為探討五味子脫脂甲醇萃取物對於肝臟細胞組織之各種生理活性，且五味子中所具物質為多酚類化合物，代謝上勢必需要經過肝臟的作用，才可轉換為具活性的物質，因此實驗上皆選擇以肝細胞進行實驗。

實驗用細胞購自新竹食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心 (Food Industry Research and Development Institute, Bioresource Collection and Research Center, Hsinchu, Taiwan)。分別為人類肝臟癌細胞株 (Hep G2 cell, human)用以測試五味子脫脂甲醇萃取物是否具有誘導凋亡的可能性；正常小鼠胚胎肝臟細胞株 (BNL CL. 2, mouse, BALB/c)測試添加了五味子脫脂甲醇萃取物後正常細胞的抗氧化能力及胞內抗氧化酵素活性是否有提升現象，兩種細胞之生長型態皆為貼附生長，下二圖分別為兩種細胞之正常生長型態。



圖八、Hep G2 細胞株之生長型態。  
Fig. 8 Morphology of Hep G2 cell line  
(100x).



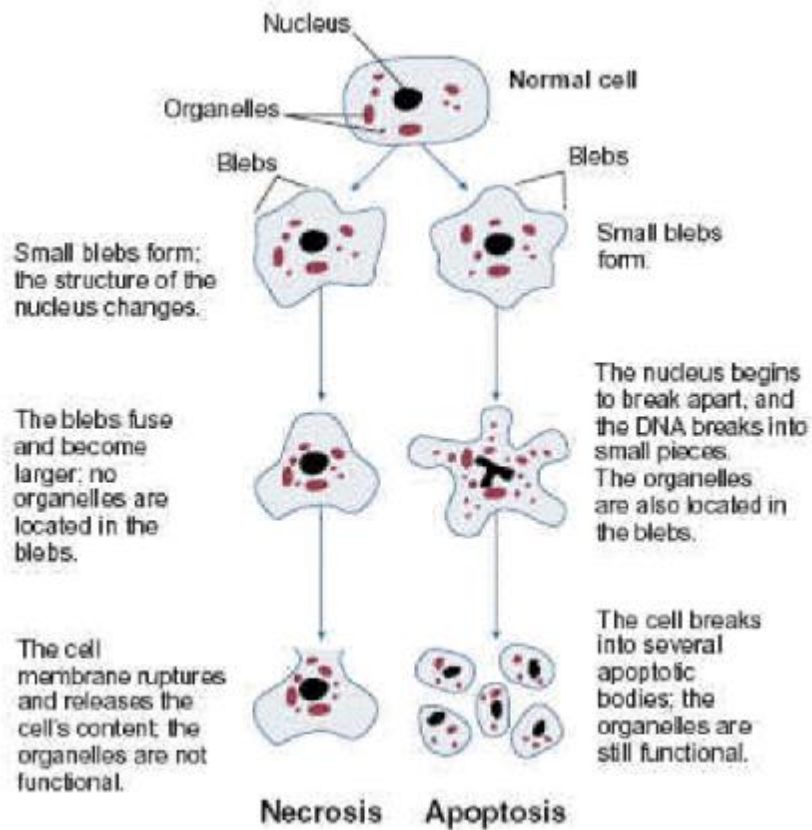
圖九、BNL CL.2 細胞株之生長型態。  
Fig. 9 Morphology of BNL CL.2 cell line  
(100x).

## 2-5 細胞凋亡 (apoptosis)與細胞壞死 (necrosis)

細胞凋亡 (apoptosis)是一種生物體於分化、發育等許多過程中之細胞去除機制 (deleting mechanism)，由多種基因調控 (gene programmed)使細胞可按部就班的自我凋亡，透過此機制生物體可將衰老及畸形的細胞去除，細胞凋亡的發生尤以胚胎為甚，經常大量的細胞同時進行凋亡，若細胞凋亡受阻，則可能會產生癌症、自體免疫疾病 (autoimmune diseases)與退化性疾病 (retrograde diseases)。細胞凋亡發生時並不會引起病理的發炎反應，其與壞死 (necrosis)有許多顯著的不同。

細胞凋亡為一連串精密且嚴格調控之複雜過程，又稱為計畫性死亡 (programmed cell death)。當細胞受到生理性或病理性刺激時，若無法自行修復，便會啟動調控程序產生凋亡，細胞開始萎縮，並且細胞膜將各種胞器與染色質碎片包覆成許多的凋亡小體，而後由吞噬細胞進行清除，由於凋亡細胞的內容物均在吞噬細胞內分解，因此並不會引起免疫反應。此種細胞程序性自殺不引起劇烈的免疫反應，因此較不會對其他的細胞與組織造成傷害。

細胞壞死發生時，當細胞受到病理性刺激或劇烈損傷時細胞會出現漲大及細胞膜破損等現象發生，粒線體漲大破裂，DNA、RNA被水解，細胞內的各種胞器與物質大量外漏至組織間而造成嚴重的發炎現象 (Wyllie, *et al.*, 1980; Kerr, *et al.*, 1980)。



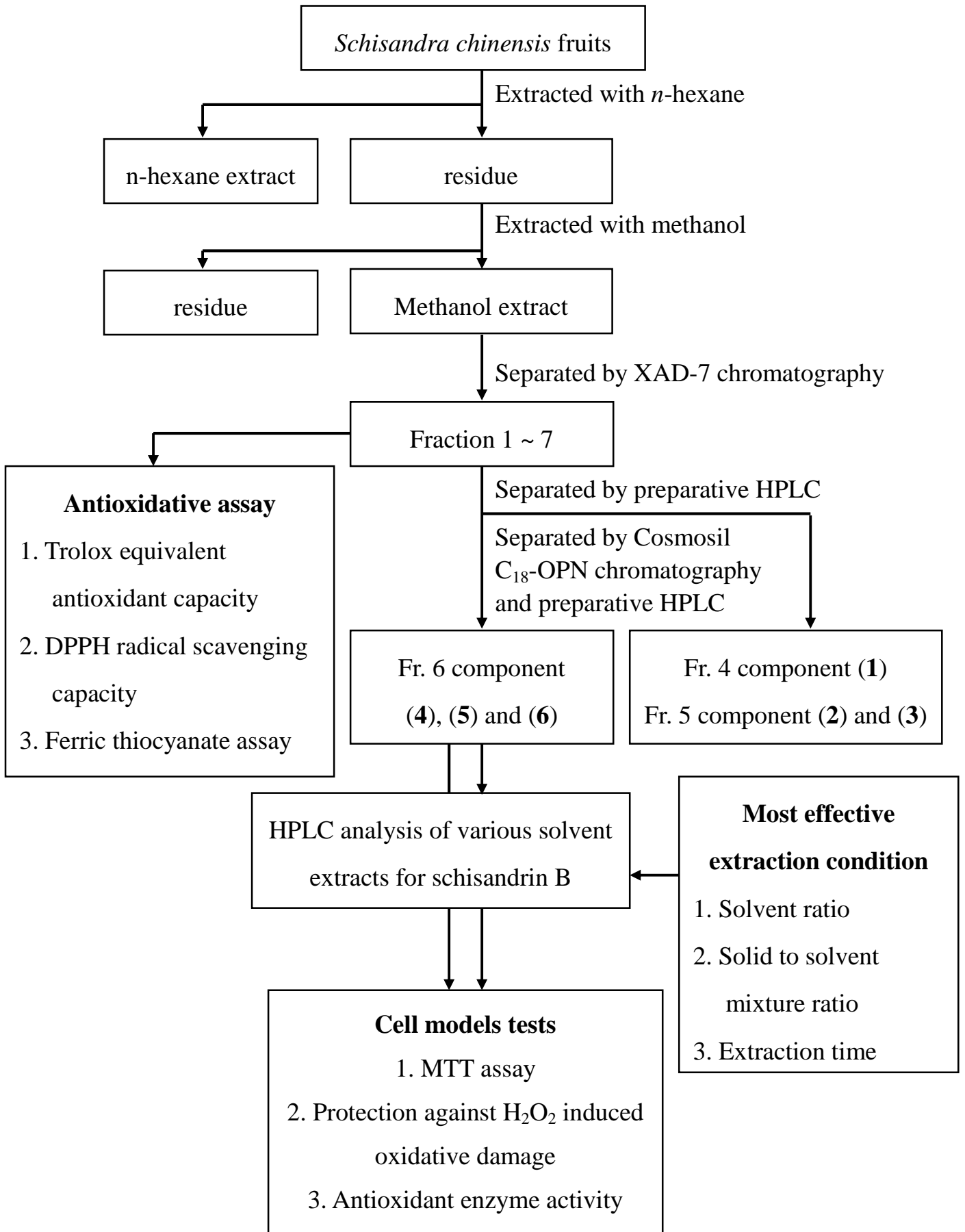
	細胞壞死 (Necrosis)	細胞凋亡 (Apoptosis)
起因	病理性或劇烈損傷	生理或病理性
死亡型態	相鄰一群細胞死亡	單一細胞死亡
發炎反應	有 (胞內物質釋出)	無
細胞外觀	腫脹變大	皺縮變小
細胞膜	破裂	完整
凋亡小體	無 (碎片被巨噬細胞吞噬)	有 (被巨噬細胞吞噬)
DNA	隨機降解 (電泳圖譜呈塗佈狀)	片段化 (電泳圖譜上呈梯狀)
調節過程	未受基因調控	受基因調控

圖十、細胞凋亡與細胞壞死之差異性。

Fig. 10 Differences between cell apoptosis and cell necrosis.

(Kerr, *et al.*, 1980)

### 第三章 實驗設計



## 第四章 實驗材料與方法

### 4-1 實驗材料來源

#### 4-1-1 實驗材料

本次實驗所使用之中藥樣品為五味子 (*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. fruits)，受贈於順天生物科技公司。

#### 4-1-2 實驗試藥

##### 4-1-2-1 化學試藥

以下藥品購自 Sigma-Aldrich 公司(St. Louis, MO, USA)：

2,2-Azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate ) (ABTS)

Bovine serum albumin (BSA)

Butylated hydroxytoluene (BHT)

3-(4,5-Dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)

Ethylene diaminetetra-acetic acid (EDTA)

Ferric chloride ( $\text{FeCl}_3$ )

Gallic acid

6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox)

Peroxidase (Type VI-A from Horseradish)

Potassium ferricyanide ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ )

Quercetin

Starch

Trypan blue

以下藥品購自 Fluka 公司(Buchs, Switzerland)：

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

Folin-Ciocalteau's phenol reagent



以下藥品購自 Merck 公司(Darmstadt, Germany)：

Acetone

Acetonitrile (ACN)

Aluminium nitrate ( $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ )

Di-potassium hydrogen phosphate ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )

Sodium hydroxide (NaOH)

Sodium phosphate monobasic ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )

以下藥品購自 Riedel-deHaen 公司(Steinheim, Germany)：

Dimethylsulfoxide (DMSO)

Sodium chloride (NaCl)

以下藥品購自 Shimakyu's Pure Chemicals 公司(Osaka, Japan)：

Acetic acid

Sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )

以下藥品購自 J.T. Baker 公司(Phillipsburg, USA)：

Tris-base

Hexane

以下藥品購自 Honeywell Burdick & Jackson 公司(Muskegon, USA)：

Methanol

以下藥品購自 Union Chemical Works 公司(Hsinchu, Taiwan)：

Hydrochloric acid (HCl)

Phosphoric acid ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ )

以下藥品購自 景明化工公司(Hsinchu, Taiwan)：

Ethyl acetate

以下藥品購自 Wako Pure Chemicals 公司(Osaka, Japan)：

Ferrous chloride tetrahydrate ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )

Hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

Potassium chloride (KCl)

Linoleic acid (經充氮減壓蒸餾後再製，分裝於褐色指形瓶中)

以下藥品購自培峯化學公司(Hsinchu, Taiwan)：

1-Butanol

以下藥品購自臺灣省菸酒公賣局(Taipei, Taiwan)：

95% Ethanol (EtOH)

以下藥品購自 Acros organics 公司(New Jersey, USA)：

Pyrogallol

4-1-2-2 細胞培養使用試藥

以下藥品購自 Bio-Rad (Hercules, CA, USA)：

Bio-Rad Protein assay kit.

以下藥品購自 Hyclone (Logan, UT, USA)：

Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)

以下藥品購自 Biological Industries (Beit Haemek, Israel)：

Fetal bovine serum (FBS)

L-glutamine solution (100 mM)

Sodium bicarbonate (NaHCO<sub>3</sub>)

Penicillin-streptomycin

4-1-2-3 管柱層析使用膠體

以下藥品購自 Nacalai Tesque Inc.公司(Kyoto, Japan)

Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN

以下藥品購自 Sigma-Aldrich 公司(St. Louis, MO, USA)

XAD-7 Amberlite (20 – 60 mesh)

### **4-1-3 實驗設備**

分光光度計 Biomate3 Thermo Spectronic 公司(Madison, WI, USA)

冷凝器 Mode 911, Polyscience 公司(Warrington, Pa, USA)

倒立式顯微鏡 CK40-F100, Olympus 公司(Tokyo, Japan)

高壓滅菌釜 TM-329, Tomin Medical Equipment 公司(Taipei, Taiwan)

高速離心機 Mode 3740, Kubota 公司(Osaka, Japan)

高效液相層析儀 L- 7000 Interface, L-7100pump, L-7450A diode array  
UV detector, Hitachi 公司(Tokyo, Japan)

加熱攪拌器 PC-420 Hot Plate/Stirrer , Corning 公司(USA)

極低溫冷凍櫃 SL-1388D, Kendro Laboratory 公司(Newtown, CT,  
USA)

減壓濃縮機 R-114, Buchi 公司(Allschwil, Swizerland)

精密天秤 B204-S, Mettler Toledo 公司(Zurich, Switzerland)

酵素免疫分析儀 VERSA max 公司(Sunnyvale, USA)

超音波震盪器 DC200H, Delta 公司(Taichung, Taiwan)

水浴槽 WB212-B2, Kansin 公司(Sunnyvale, USA)

酸鹼測定儀 S20K, Mettler Toledo 公司(Zurich, Swizerland)

液態氮桶 Locator Plus 公司(Iowa, USA)

無菌操作台 VCM-620, Cherng Huei 公司(Taipei, Taiwan)

二氧化碳培養箱 RCO3000T-5-T, Forma Scientific Inc 公司(Marietta,  
USA)

## 4-2 五味子脫脂甲醇萃取物之製備及最適溶劑萃取條件探討

### 4-2-1 樣品前處理

秤取乾燥五味子約 1 公斤以磨粉機粉碎後通過 20 mesh 篩網，續以正己烷進行脫脂，秤取總量 755.11 g 的五味子粉末，浸泡於 2 L 正己烷中攪拌萃取去除油脂部分，並以正己烷及水重覆進行三次的分層動作確保油脂分離，經濾紙過濾後正己烷溶液部分以旋轉式減壓濃縮機於低於 40°C 的溫度進行減壓濃縮，濃縮後得 130 ml 油狀濃縮液，定量後得知共有 110.73 g 油狀正己烷濃縮液，脫脂部分儲存於 4°C 冰箱備用，濾紙上脫脂萃殘物置於抽氣櫃中自然風乾。

### 4-2-2 五味子脫脂甲醇萃取物之製備

待脫脂殘留物風乾後稱重為 633.04 g，將其與甲醇以體積比 1 : 5 (w/v) 進行攪拌萃取，重覆萃取三次，收集所得之濾液，經過濾及減壓濃縮後得到甲醇萃取物總重 361.37 g，將甲醇萃取物儲存於 4°C 冰箱備用。

### 4-2-3 五味子脫脂甲醇萃取物之成分分離與純化

取約 800g 之乾燥 XAD-7 膠體，浸泡於甲醇中並攪拌活化膠體，之後去除上部漂浮的膠體，排除膠體內多餘的氣體後，邊攪拌邊填充入總體積 1L 的玻璃管柱 (700 x 45 mm)，以大量去離子水置換掉玻璃管柱中多餘的甲醇，待膠體沉降完全且緊實後填入脫脂五味子甲醇萃取物 100 ml (約 103.25 g)，依序以下列比例溶劑進行沖提，水：甲醇 (v/v) = 100 : 0、80 : 20、60 : 40、40 : 60、20 : 80、0 : 100，最後以甲醇：丙酮 (v/v) = 50 : 50 之混合溶劑將低極性物質沖提出來，每個比例沖提量 2L，沖提液以每瓶 200 ml 為一收集單位，共收集 70 瓶，以分光光度計預先掃瞄的波長 UV 240 nm 為偵測波長，依吸光值大

小對收集瓶號作圖，可粗略的將其分為 7 個區分，各區分再進一步進行高效液相層析分析、抗氧化測試及 Cosmosil C<sub>18</sub>-OPN 液相層析。

#### 4-2-4 甲醇萃取物各沖提區分之高效液相層析分析

將上述經 XAD-7 膠體純化分離後的區分 1 至區分 7，利用高效液相層析儀進行分析，先以梯度變化尋找分離條件，再依各物質波峰的滯留時間推斷其最適合條件，將此條件進行微調後應用於製備型高效液相層析，重複分離、純化及收集各物質。經製備型高效液相層析分離後之物質，經減壓濃縮及過濾等步驟後進行結構鑑定。高效液相層析條件如下：

##### 4-2-4-1 梯度分析型高效液相層析

管 柱：Phenomenex Luna<sup>®</sup> 3  $\mu$  C<sub>18</sub> 100A

(150 x 2.0 mm, Phenomenex, USA)

沖提劑：

使用之移動相 A 為 H<sub>2</sub>O，移動相 B 為 acetonitrile，兩者皆添加 0.1% acetic acid，梯度沖提條件設定為 0 分鐘時 A : B = 50 : 50，隨著時間移動相 B 逐漸增加，至 50 分鐘時 A : B = 5 : 95，維持 10 分鐘之後，逐漸減少移動相 B 的比例，至 70 分鐘時梯度恢復為 A : B = 50 : 50。

流 速：0.5 ml/min

偵測波長：240 nm

##### 4-2-4-2 區分 3 之等梯度分析型高效液相層析

管 柱：Develosil 60 - 5 (250 x 4.6 mm, Nomura, Japan)

沖提劑：Ethyl acetate : Hexane (v/v) = 10 : 90

流 速：1 ml/min

偵測波長：267 nm

#### 4-2-4-3-1 區分 4 之等梯度分析型高效液相層析

管 柱：Develosil ODS-HG-5 (250 x 4.6 mm, Nomura, Japan)

沖提劑：H<sub>2</sub>O：MeOH (v/v) = 30：70

流 速：0.7 ml/min

偵測波長：250 nm

#### 4-2-4-3-2 區分 4 之等梯度製備型高效液相層析

管 柱：Develosil ODS-HG-5 (250 x 20 mm, Nomura, Japan)

沖提劑：H<sub>2</sub>O：MeOH (v/v) = 30：70

流 速：4 ml/min

偵測波長：250 nm

#### 4-2-4-4-1 區分 5 之等梯度分析型高效液相層析

管 柱：Develosil ODS-HG-5 (250 x 4.6 mm, Nomura, Japan)

沖提劑：H<sub>2</sub>O：MeOH (v/v) = 30：70

流 速：0.7 ml/min

偵測波長：250 nm

#### 4-2-4-4-2 區分 5 之等梯度製備型高效液相層析

管 柱：Develosil ODS-HG-5 (250 x 20 mm, Nomura, Japan)

沖提劑：H<sub>2</sub>O：MeOH (v/v) = 30：70

流 速：4 ml/min

偵測波長：250 nm

#### 4-2-4-5-1 區分 6 之等梯度分析型高效液相層析

管 柱：Develosil ODS-HG-5 (250 x 4.6 mm, Nomura, Japan)

沖提劑：H<sub>2</sub>O：MeOH (v/v) = 15：85

流 速：0.7 ml/min

偵測波長：240 nm

#### 4-2-4-5-2 區分 6 之等梯度製備型高效液相層析

管 柱：Develosil ODS-HG-5 (250 x 20 mm, Nomura, Japan)

沖提劑：H<sub>2</sub>O：MeOH (v/v) = 10：90

流 速：4 ml/min

偵測波長：240 nm

#### 4-2-5 Cosmosil C<sub>18</sub>-OPN 膠體液相層析

經分析型高效液相層析儀分析並與文獻相對照後，取 Sch B 可能存在之區分，區分 6 濃縮物 2.13 g 再以 Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN 膠體進行液相管柱層析 (430 x 20 mm)，沖提梯度依序為去離子水：甲醇 (v/v) = 30：70、20：80、10：90 及 0：100，每個沖提梯度使用 250 ml 沖提液，沖提液每 5 ml 收集一管，依然以紫外線 - 可見光吸光光譜儀預先掃描的波長 UV 240 nm 為偵測波長，藉由吸光值大小對收集瓶號作圖，可再分成 6 個子區分。

#### 4-2-6 Schisandrin B 之萃取最適條件探討

##### 4-2-6-1 最適萃取溶劑種類

取約 2 g 五味子脫脂粉末，分別以水、甲醇、乙醇、正丁醇、乙酸乙酯 (1：20, w/v) 進行超音波振盪萃取 30 分鐘，重覆萃取三次，過濾後合併萃取液，經減壓濃縮並以 HPLC 進行定量後繼續後續實驗。

##### 4-2-6-2 最適萃取溶劑與水之比例

相同取約 2 g 五味子脫脂粉末，分別以上述實驗所得最佳萃取溶劑：水 = 20：80、40：60、60：40、80：20 及 100：0 (1：20, w/v) 進行振盪萃取 30 分鐘，重覆萃取三次，過濾後合併萃取液，進行減壓濃縮，並以 HPLC 進行定量再進行後續實驗。

#### 4-2-6-3 最適溶劑百分率之用量比

找出最佳溶劑及最適比例後，取 2 g 五味子脫脂粉末進行溶劑用量測試，分別以溶劑用量 1:10、1:20、1:40、1:60 及 1:80 (w/v) 進行三重覆萃取 30 分鐘，合併之萃取液進行減壓濃縮後稱重以找出最佳溶劑用量，再進行後續實驗。

#### 4-2-6-4 最適萃取時間

固定上述三項條件後，取 2 g 五味子脫脂粉末進行最適時間測試，分別進行 15、30、45 及 60 分鐘超音波振盪萃取，三重覆、合併萃取液後濃縮，稱重得知最適萃取時間條件。

### 4-3 五味子脫脂甲醇萃取物之抗氧化力檢測

#### 4-3-1 Trolox 當量抗氧化性 (Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC)測定

參考 Miller 等人 (1993) 之方法加以修飾，分別新鮮配製 ABTS、 $H_2O_2$  及觸酶後依序加入 1.5 ml 去離水、0.25 ml ABTS、0.25 ml  $H_2O_2$  及 0.25 ml 觸酶，均勻混合，使最終系統濃度分別為 ABTS (0.1 mM)、 $H_2O_2$  (50  $\mu$ M) 及觸酶 (4.4 unit / ml)，避光室溫下反應 1 小時，以生成穩定的藍綠色  $ABTS \cdot^+$  自由基，再加入 250  $\mu$ l 的五味子甲醇萃取物反應 10 分鐘，以分光光度計測定 734 nm 下之吸光值。TEAC 法所測得的吸光值越低，代表樣品清除  $ABTS \cdot^+$  的效果愈佳；反之則愈差，亦可藉由不同濃度的 Trolox 清除自由基的能力來換算樣品相當於 Trolox 的當量。計算內容如下：

ABTS  $\cdot^+$  自由基清除力 (%) =

$$\frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})}{(A_{\text{control}} - A_{\text{blank}})} \times 100\%$$



$A_{\text{blank}}$  代表空白組於 734 nm 下之吸光值

$A_{\text{control}}$  代表控制組於 734 nm 下之吸光值

$A_{\text{sample}}$  代表樣品組於 734 nm 下之吸光值

#### 4-3-2 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 自由基清除能力測定

參考 Shimada (1992) 等人之方法進行實驗，取 0.1 ml 五味子甲醇萃取物，加入 0.1 ml 現配之 0.5 mM DPPH 溶液，混合均勻後，室溫下避光反應 30 分鐘，以酵素免疫分析儀測定 517 nm 下之吸光值，若所測得的吸光值越低，表示樣品清除 DPPH 自由基之效果愈佳；反之則愈差。計算內容如下：

$$\text{DPPH 自由基清除能力}(\%) = [ 1 - (A_{\text{sample}} / A_{\text{control}}) ] \times 100\%$$

$A_{\text{sample}}$  代表樣品組於 517 nm 下之吸光值

$A_{\text{control}}$  代表控制組於 517 nm 下之吸光值

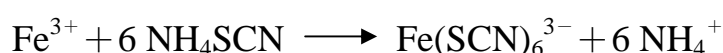
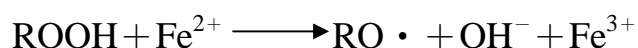
#### 4-3-3 硫氰酸鐵法測定脂質氫過氧化物 (ferric thiocyanate assay)

參考滿田 (1967) 及蘇 (1991) 等之方法加以修飾，於具磨砂口及瓶蓋的三角錐形瓶中加入 1/30 M 之磷酸緩衝溶液 10 ml (pH 7.0)，將  $\alpha$ -生育醇 ( $\alpha$ -tocopherol)、丁基羥基甲氧苯 (butylated hydroxyanisole, BHA) 及五味子甲醇萃取物分別配製濃度 1 mg/ml，取 200  $\mu$ l 萃取物、 $\alpha$ -生育醇或 BHA 加入三角錐形瓶中 (控制組僅加入乙醇)，再加入 10 ml 的 1.3% 亞麻油酸甲醇溶液 (linoleic acid in ethanol)，最後以去離子水定量至 25 ml，蓋上瓶蓋後放入恆溫箱中，固定溫度 40°C，每 24 小時進行一次顯色分析試驗。

顯色分析試驗：

取上述混合溶液 200  $\mu$ l 加入含 9.4 ml 的 75% 乙醇水溶液之試管，再依次加入 0.2 ml 氯化亞鐵鹽酸溶液 ( $3.88 \times 10^{-2}$  g  $\text{FeCl}_2$  in 10 ml 3.5

% HCl)及 0.2 ml 硫氰酸鉍溶液 (3g NH<sub>4</sub>SCN in 7ml distilled H<sub>2</sub>O), 均勻混合, 反應 3 分鐘後, 以分光光度計檢測 500 nm 下之吸光值。油脂的氧化程度愈高時, 氫過氧化物的生成便愈多, 致使二價鐵 (Fe<sup>2+</sup>) 被氧化成三價鐵 (Fe<sup>3+</sup>), 三價鐵與硫氰酸鉍形成紅色的硫氰酸鐵。化學變化反應式如下:



Fe(SCN)<sub>6</sub><sup>3-</sup> 呈現深紅色, 於 500 nm 下測其吸光值, 可由顏色的深淺程度得知抗氧化能力的強弱, 吸光值愈低, 其氧化性就愈強; 反之則抗氧化性越弱。

#### 4-3-4 總酚含量 (total phenol contents)之測定

參考 Taga 等人 (1984) 之方法進行實驗, 取 500 μl 的五味子甲醇萃取物, 加入 500 μl 的 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 混合反應 2 分鐘後, 加入 50 μl 的 50% Foiln-Ciocalteau's reagent, 靜置反應 30 分鐘後, 以分光光度計測 750 nm 下之吸光值, 並以沒食子酸 (gallic acid) 為標準品, 製作標準曲線, 總酚含量以每克樣品中所含沒食子酸之當量表示 (mg/g)。

#### 4-3-5 總類黃酮 (total flavonoid contents)含量之測定

參考 Zhishen 等人 (1999) 之方法進行實驗, 取 125 μl 之五味子甲醇萃取物, 加入 37.5 μl 的 NaNO<sub>2</sub> 及去離子水 625 μl, 混合均勻後反應 6 分鐘, 再加入 75 μl 的 10% AlCl<sub>3</sub> · H<sub>2</sub>O (w/v), 混勻、反應 5 分鐘, 加入 250 μl 的 1 M NaOH, 補足去離子水至總體積為 1.25 ml, 以分光光度計測 510 nm 下之吸光值。可利用標準品槲皮酮 (quercetin) 所製出的標準曲線, 將樣品吸光值代入公式中, 求得每克樣品中所含之槲皮酮當量 (mg/g), 以表示總類黃酮之含量。

## 4-4 五味子萃取物之細胞生理活性試驗

### 4-4-1 培養液與磷酸緩衝液之製備

各細胞株之培養方法、培養液及磷酸緩衝液製備技術皆參考新竹食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心 (Food Industry Research and Development Institute, Bioresource Collection and Research Center, Hsinchu, Taiwan)所提供之資料。

#### 4-4-1-1 培養液之製備

取 800 ml 無菌水，加入 13.4 g DMEM/High glucose 粉末及 3.7 g sodium bicarbonate 攪拌至完全溶解後，以 HCl 調整 pH 值至 7.2 至 7.4 之間，補足無菌水至 870 ml，於無菌操作台中以 0.22  $\mu$ m 濾膜過濾細胞培養液至滅菌後的血清瓶中，每瓶分裝約 435 ml，各瓶取 2 ml 培養液置於培養皿中 37°C 培養 2 天，進行無菌測試，其餘細胞培養液保存於 4°C 冰箱。

Hep G2 細胞株之培養液需額外添加 50 ml FBS (佔總量的 10%)、5 ml L-glutamate (佔總量的 1%)、5 ml sodium pyruvate 及 5 ml penicillin/streptomycin (5000 units/ml, 5 mg/ml streptomycin)。

BNL CL. 2 細胞株之培養液需額外添加 50 ml FBS、5 ml L-glutamate、5 ml sodium pyruvate、5 ml penicillin/streptomycin (5000 units/ml, 5 mg/ml streptomycin)及 5 ml nonessential amino acids。

#### 4-4-1-2 磷酸緩衝液之製備 (phosphate buffer saline, PBS)

取去離子水 900 ml，加入  $K_2HPO_4$  1.0587 g、0.6119 g  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 、8.0 g NaCl 及 0.2 g KCl 均勻混合攪拌至完全溶解，以 NaOH 調整 pH 值至 7.2 至 7.4 之間，補足去離子水至 1L，分裝至血清瓶，經滅菌釜 121°C、30 分鐘滅菌處理，放冷後儲存於 4°C 冰箱。

#### 4-4-2 細胞培養與繼代培養

Hep G2 及 BNL CL.2 細胞株之培養條件皆為 37°C、5%CO<sub>2</sub> 培養，當細胞生長量達到約培養皿的 8 分滿時，即可進行繼代培養。首先抽去舊的細胞培養液，以 2 ml PBS 清洗 2 次後去除 PBS，加 1 ml trypsin-EDTA 後放入培養箱中 37°C 反應 5 min 破壞細胞與培養皿間的附著蛋白，抽除 trypsin-EDTA，加入 1 ml 培養液以中止 trypsin-EDTA 的反應，反覆吸排將培養皿上附著的細胞沖下，取適當細胞量回種於新的培養皿中，視情況加入 6 至 12 ml 培養液，培養液約 2 至 3 天更換一次。

#### 4-4-3 細胞解凍與凍存

細胞解凍進行前先取 3 ml 回溫之培養液置入培養皿中，由液態氮桶中依編號取出冷凍小管，迅速放入 37°C 水浴槽中回溫 2 分鐘，吸出細胞液緩慢加入培養皿中，與培養液混合均勻後，再依次加入 3 ml 培養液、混勻，補足培養液至 12 ml，移入培養箱中 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培養 24 小時後進行換液，待細胞生長至 8 分滿後可進行繼代培養，繼代培養 2 次後細胞型態、生長速度皆無異常即可進行細胞試驗。

細胞凍存前 12 至 24 小時須進行換液動作，確認細胞型態無異常後才可進行細胞凍存。將細胞收集下後先進行細胞計數，取 0.9 ml 細胞液加至事先預冷且含 0.1 ml DMSO 的冷凍小管後冰浴，迅速放入 -20°C 冰箱，於 -20°C 冰箱降溫 30 分鐘後，放入 -80°C 冷凍櫃，隔日再移至液態氮桶中儲存，並定期補充液態氮桶之液態氮。

#### 4-4-4 細胞存活率測試 (MTT assay)

參考 Mosmann (1983) 的方法，取細胞濃度  $0.8 \times 10^4$  cell/ml 接種於 96 孔盤中培養 24 小時，使細胞生長量達到 8~9 分滿後加入不同濃

度的五味子純化物質，schisandrin B、其異構物及 gomosin L1，樣品加入 24 小時後，再加入 MTT (最終濃度 0.5 mg/ml) 反應 2 小時，去除培養液，加入 DMSO 反應 30 分鐘，溶出細胞內的 formazan，取出紫色溶液，以酵素免疫分析儀檢測 570 nm 之吸光值。細胞存活率之計算內容如下：

$$\text{細胞存活率 (\%)} = A_{\text{sample}} / A_{\text{control}} \times 100\%$$

$A_{\text{sample}}$  代表樣品組於 570 nm 下之吸光值

$A_{\text{control}}$  代表控制組於 570 nm 下之吸光值

#### 4-4-5 細胞氧化傷害保護作用

參考 Yoo 等人 (2000) 之方法加以修飾，經檢量及 MTT 試驗後找出正常小鼠胚胎肝細胞 BNL CL.2 對於  $\text{H}_2\text{O}_2$  造成氧化傷害的  $\text{IC}_{50}$  約在 10~20 mM 附近，取傷害較低的 10 mM 做為實驗用量，與五味子純化後物質同時加至已培養 24hr 之細胞中，再經 24hr 之培養後測其細胞存活率，以得知樣品對細胞氧化傷害是否具保護作用。

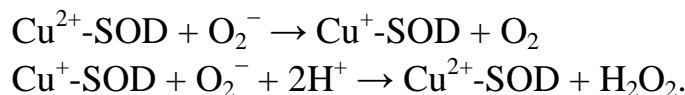
#### 4-4-6 胞內抗氧化酵素分析

取 BNL CL.2 細胞  $0.8 \times 10^6$  cell/ml 濃度接種於 6 孔盤培養皿中培養 24 小時後加入五味子純化物質 (50  $\mu\text{g/ml}$ )，再培養 24 小時，移除細胞培養液，以冰 PBS 清洗後，加入 300  $\mu\text{l}$  冰 PBS，使用 scraper 將細胞自培養皿上刮下，利用超音波破膜機破碎細胞膜，高速離心 13000 rpm、10 分鐘後取出細胞上清液，以 Bio-rad protein assay kit 進行蛋白質含量測定，細胞上清液可儲存於  $-20^\circ\text{C}$  冰箱中至多 7 天。

##### 4-4-6-1 超氧陰離子歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD) 活性測定

參考 Marklund and Marklund (1974) 之方法，將細胞上清液 40  $\mu\text{l}$  與 1 ml 的 10 mM Tris-HCl (pH 8.2) 均勻混合後，加入 5  $\mu\text{l}$  的 50 mM

pyrogallol，以分光光度計測其 325 nm 吸光值於 3 分鐘內的變化，超氧陰離子歧化酶的活性以 U / mg protein 表示，反應式及計算內容如下：



輔因子可為 Cu、Mn、Fe 或 Ni.

SOD (U / mg protein) =

$$\frac{(\Delta A_{\text{control}} - \Delta A_{\text{sample}}) \times V_{\text{sample}}}{(\Delta A_{\text{control}} / 2) \times V_{\text{total}} \times P}$$

$\Delta A_{\text{control}}$  代表控制組 3 分鐘與 0 分鐘間吸光值差

$\Delta A_{\text{sample}}$  代表樣品組 3 分鐘與 0 分鐘間吸光值差

$V_{\text{sample}}$  與  $V_{\text{total}}$  分別代表細胞上清液體積及反應總體積 (ml)

P 代表蛋白質含量 (mg)

#### 4-4-6-2 觸酶 (catalase, CAT) 活性測定

參考 Cohen 等人 (1970) 之方法，取 40  $\mu\text{l}$  去離水子、50  $\mu\text{l}$  Tris HCl-EDTA (pH 8.0) 與 900  $\mu\text{l}$  的 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  混合後於 37°C 反應 10 分鐘，加入 10  $\mu\text{l}$  的細胞上清液或 10  $\mu\text{l}$  的去離子水後，立刻以分光光度計檢測 240 nm 下 2 分鐘內之吸光值變化，觸酶的活性以  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 / \text{min} / \text{mg protein}$  表示，計算內容如下：

Catalase ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 / \text{min} / \text{mg protein}$ ) =

$$\frac{(\Delta A_{\text{sample}} - \Delta A_{\text{control}}) \times V_{\text{total}}}{\epsilon_{240} \times V_{\text{sample}} \times P}$$

$\Delta A_{\text{control}}$  代表控制組 2 分鐘與 0 分鐘間吸光值差

$\Delta A_{\text{sample}}$  代表樣品組 2 分鐘與 0 分鐘間吸光值差

$\epsilon_{240}$  代表  $\text{H}_2\text{O}_2$  於 240 nm 的分子莫耳吸光係數 ( $\epsilon_{240} = 40 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

$V_{\text{sample}}$  與  $V_{\text{total}}$  分別代表細胞上清液體積及反應總體積 (ml)

P 代表蛋白質含量 (mg)

#### 4-4-6-3 穀胱甘肽轉移酶 (Glutathione-S-transferase, GST) 活性測定

參考 Habig 等人 (1974) 之方法，取 880  $\mu\text{l}$  的 1 mM GSH (in 100 mM potassium phosphate buffer, pH 6.5)、20  $\mu\text{l}$  的 50 mM CDNB、95  $\mu\text{l}$  potassium phosphate buffer 及 5  $\mu\text{l}$  的細胞上清液或去離水子後，即以分光光度計測量 340 nm 下 3 分鐘內之吸光值變化。GST 酵素活性可藉由受質 CDNB 與其結合的速率，經計算後而得知，穀胱甘肽轉移酶的活性以 nmol / min / mg protein 表示，計算內容如下：

GST (nmol / min / mg protein) =

$$\frac{(\Delta A_{\text{control}} - \Delta A_{\text{sample}})}{\epsilon_{340} \times V_{\text{sample}} \times P}$$

$\Delta A_{\text{control}}$  代表控制組 3 分鐘與 0 分鐘間吸光值差

$\Delta A_{\text{sample}}$  代表樣品組 3 分鐘與 0 分鐘間吸光值差

$\epsilon_{340}$  代表 CDNB-GST 於 340 nm 的分子莫耳吸光係數 ( $\epsilon_{340} = 9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

$V_{\text{sample}}$  代表細胞上清液體積 (ml)

P 代表蛋白質含量 (mg)

#### 4-5 統計方法

實驗之結果以平均值±標準誤差 (mean ± SD)表示，數據分析採用 Student's t-test 檢定不同樣品及劑量與對照組間之差異，顯著性差異 (statistical differences)分析上利用 Duncan's multiple range test 來區別不同樣品間之差異性，以  $P < 0.05$  為顯著差異。統計分析處理以統計分析軟體 Statistical Analysis System (SAS) 8.1 版進行。



## 第五章 結果與討論

### 5-1 五味子萃取物之製備及木酚素之分離純化

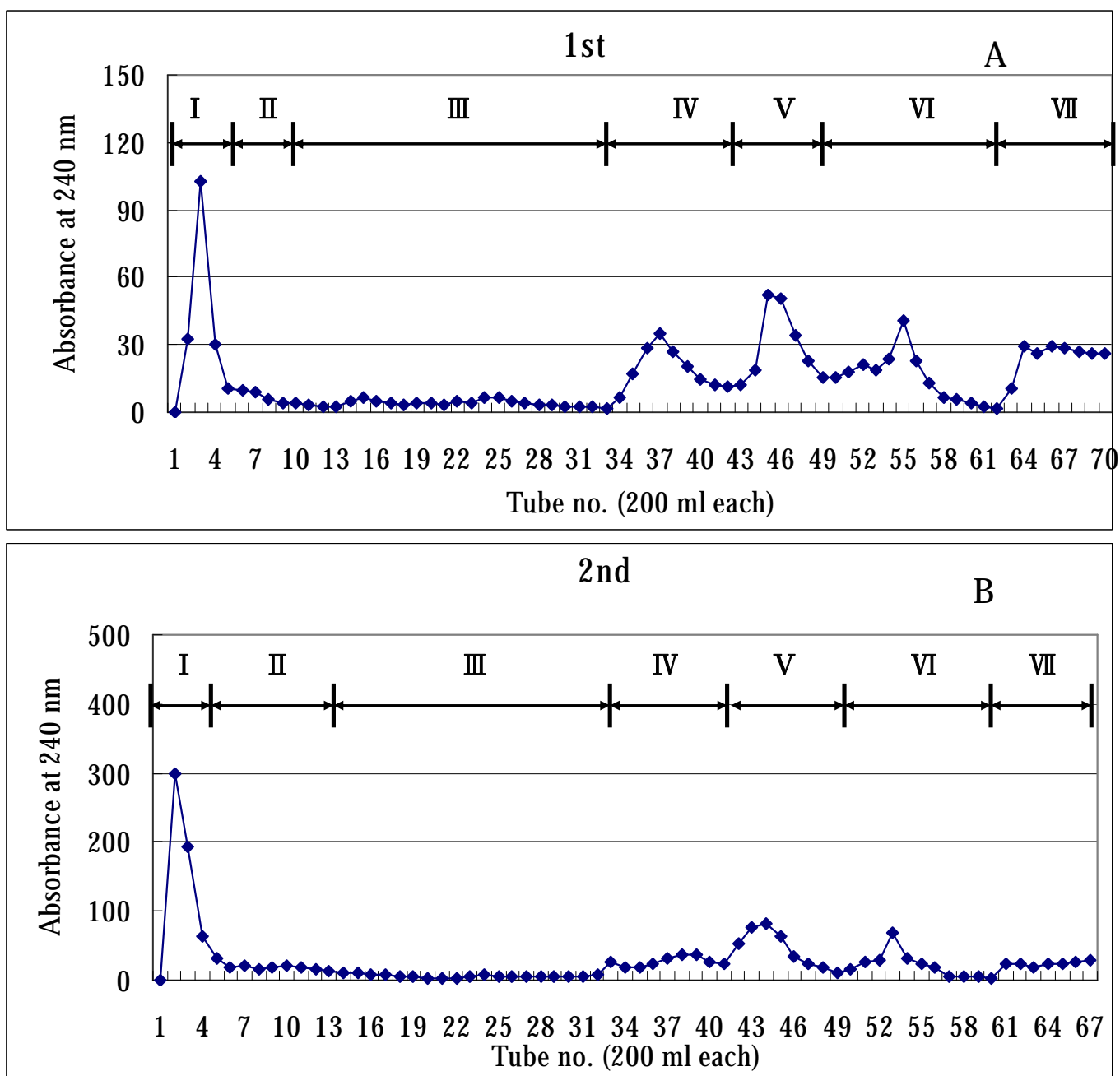
#### 5-1-1 五味子脫脂及甲醇萃取物 XAD-7 液相層析

經磨粉後的五味子 755.11 g，以 2L 正己烷脫脂，將濾液減壓濃縮，可得正己烷減壓濃縮液稱重後回推得重量為 110.73 g；脫脂後粉末以甲醇進行萃取，減壓濃縮後的甲醇萃取物其重量為 361.37±1.72 g。

取 100 ml 五味子脫脂甲醇萃取物 (約 103.25 g) 進行 XAD-7 膠體液相層析 (700 x 45 mm)，沖提條件依序為去離子水：甲醇 (v/v)= 100：0、80：20、60：40、40：60、20：80、0：100 及甲醇：丙酮 (v/v)= 50：50，各梯度沖提總量為 2L，沖提液每 200 ml 為一收集單位，依其 240 nm 下吸光值變化及收集瓶號，分為 7 個區分。同樣取 100 ml (約 105.46 g) 五味子脫脂甲醇萃取物進行重覆試驗，也依其於 240 nm 下的吸光值變化對瓶號做圖，將其分成 7 個區分，如圖十一及表八所示，分隔後之各區分再進行 HPLC 分析。

#### 5-1-2 沖提區分之 Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN 液相層析及高效液相層析

從 HPLC 分析結果與文獻對照，推論 Sch B 所在區分為區分 6，因此取五味子脫脂甲醇萃取物之區分 6 萃取物重量 2.13 g，以 Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN 膠體液相層析 (430 x 20 mm) 進行分離，沖提梯度為去離子水：甲醇 (v/v) = 30：70、20：80、10：90 及 0：100，各梯度沖提總量 250 ml，以 5 ml 為一收集單位，依 240 nm 之吸光值變化與瓶號做圖，共可分成六個子區分，區分 6-1 (1~58 瓶)、區分 6-2 (59~71 瓶)、區分 6-3 (72~90 瓶)、區分 6-4 (91~157 瓶)、區分 6-5 (158~172 瓶)、區分 6-6 (173~198 瓶)，其分隔位置及瓶號、重量、收率分別如圖十二及表九所示 (Wei *et al.*, 2010)。



圖十一、五味子脫脂甲醇萃取物 XAD-7 液相管柱層析圖。

Fig. 11 XAD-7 liquid chromatograms of eluted fractions from defatted methanol extracts of *S. chinensis* fruits.

註：

A- 第一次 XAD-7 液相層析瓶數對吸光值作圖 (sample-103.25 g)。

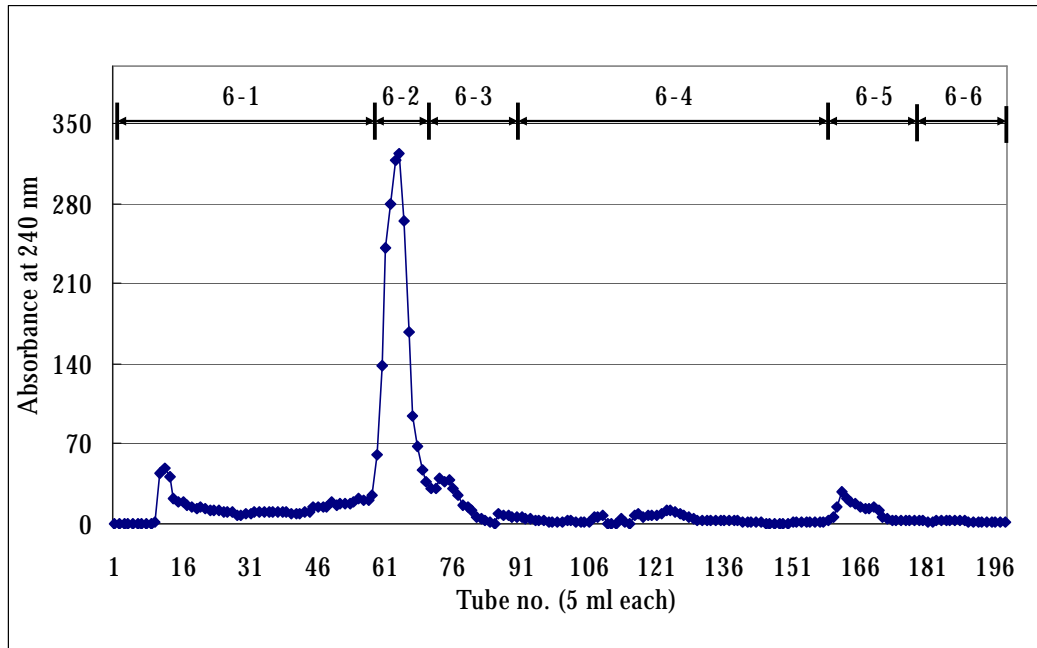
B- 第二次 XAD-7 液相層析瓶數對吸光值作圖 (sample-105.46 g)。

表八、五味子脫脂甲醇萃取物各區分之產率

Table 8 Yields of eluted fractions from defatted methanol extracts of *S. chinensis* fruits

Extracts	Weight (g)	Yield (%) <sup>1</sup>
Fraction 1 (1~4)	38.16	36.96
Fraction 2 (5~8)	1.35	1.30
Fraction 3 (9~33)	2.03	1.96
Fraction 4 (34~42)	1.25	1.21
Fraction 5 (43~49)	0.39	0.38
Fraction 6 (50~62)	3.80	3.68
Fraction 7 (63~70)	0.87	0.84
Total	47.83	46.33

<sup>1</sup>sample weight – 103.25 g



圖十二、五味子脫脂甲醇萃取物區分 6 之 Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN 液相管柱層析圖。

Fig. 12 Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN liquid chromatogram of the fraction 6 from defatted methanol extracts of *S. chinensis* fruits.

表九、五味子脫脂甲醇萃取物區分 6 之產率

Table 9 Yields of the fraction 6 from defatted methanol extracts of *S. chinensis* fruits

Extracts	Weight (g)	Yield (%) <sup>*</sup>
Fraction 6-1 (1~58)	0.30	13.88
Fraction 6-2 (59~71)	0.13	6.19
Fraction 6-3 (72~90)	0.05	2.30
Fraction 6-4 (91~157)	0.20	9.22
Fraction 6-5 (158~172)	0.02	1.08
Fraction 6-6 (173~198)	0.05	2.32
Total	0.75	34.98

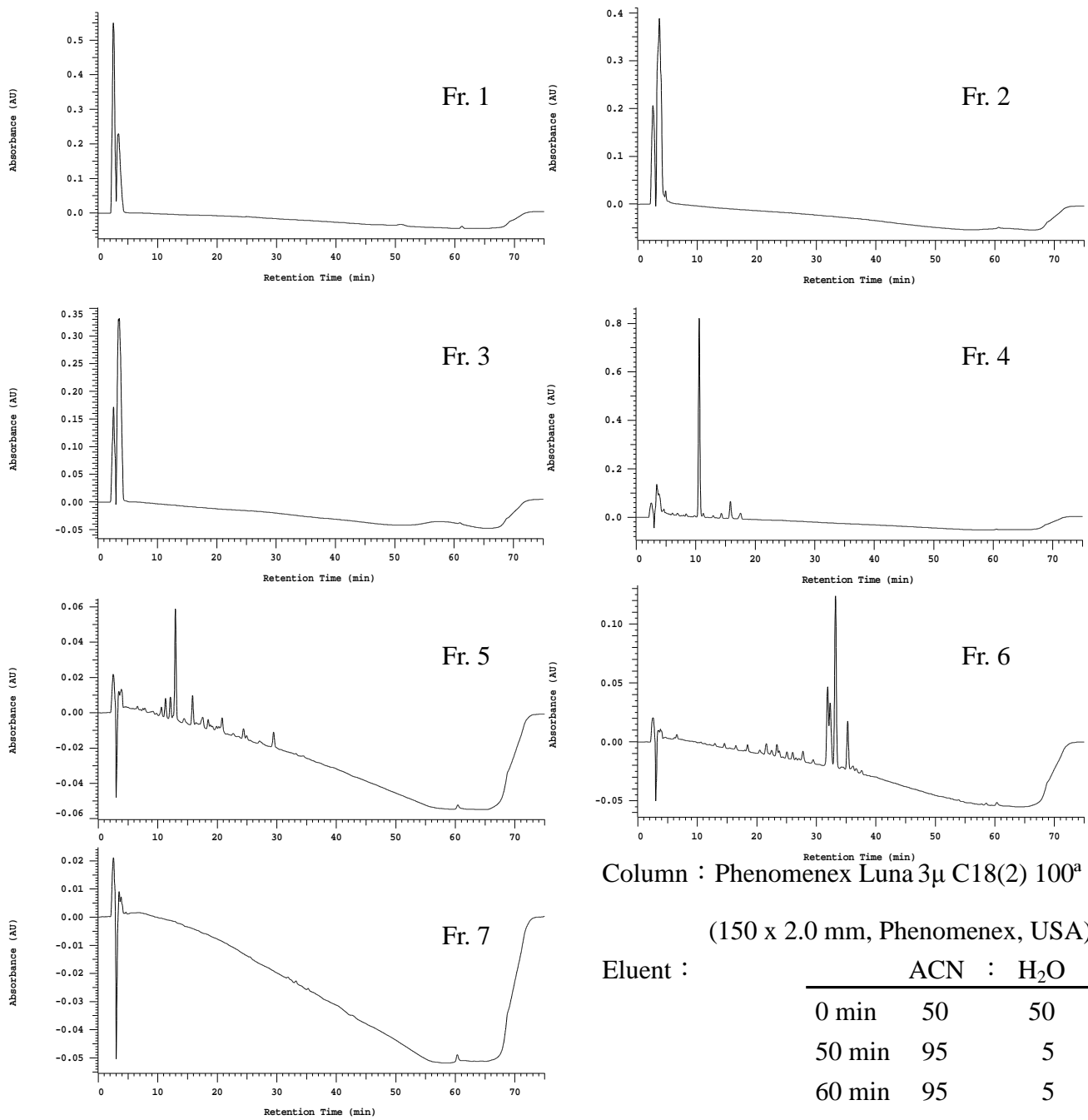
\*sample weight – 2.13 g

### 5-1-3 五味子脫脂甲醇萃取物各區分之分析型高效液相層析結果

在未知分析條件的情況下，先使用 Phenomenex Luna C<sub>18</sub> 100A (150 x 2.0 mm, 3 μ)管柱，以梯度沖提進行五味子脫脂甲醇萃取物中各波峰滯留時間之分析，再以其極性推斷可能的標的物 Sch B 的可能分佈位置並與文獻互相比較確認。使用的沖提劑為移動相 A (H<sub>2</sub>O)與移動相 B (acetonitrile)，各含 0.1% 甲酸，並以比例進行分配，沖提條件設定如下，於 0 分鐘時 A : B = 50 : 50，隨著時間移動相 B 逐漸增加，至 50 分鐘時 A : B = 5 : 95，滯留 10 分鐘後，再逐漸減少移動相 B 的比例，至 70 分鐘時梯度恢復為 A : B = 50 : 50，流速固定 0.5 ml/min，偵測波長為 240 nm。

由圖十三結果與文獻相比較可得知，區分 1 至區分 3 在沖提一開始時即被沖提而出，可能為極性較高且易溶於水的多醣類化合物 (王, 2003)，而區分 7 的結果圖中無明顯的化合物波峰，則可能為 XAD-7 液相層析沖提時最後所收集下的甲醇、丙酮混合液，然而較有可能為目標物質 Sch B 的區分為區分 4 至區分 6，且從沖提出的時間推估，其極性也較低，因此再將此些區分做進一步的純化分離 (Chen *et al.*, 2011 ; Ma *et al.*, 2011)。

依文獻上滯留時間回推計算後發現溶劑比例在大於 75% 的 acetonitrile : H<sub>2</sub>O 沖提才有可能將 Sch B 分離出 (Wei *et al.*, 2010)，與實驗上所使用的沖提條件相符的時間大約為 30 分鐘之後，所以 Sch B 最有可能座落於區分 6，因此將區分 6 中積分面積較大之主要波峰皆先進行收集。



圖十三、五味子脫脂甲醇萃取物區分 1、2、3、4、5、6 及 7 之分析型 HPLC 圖。

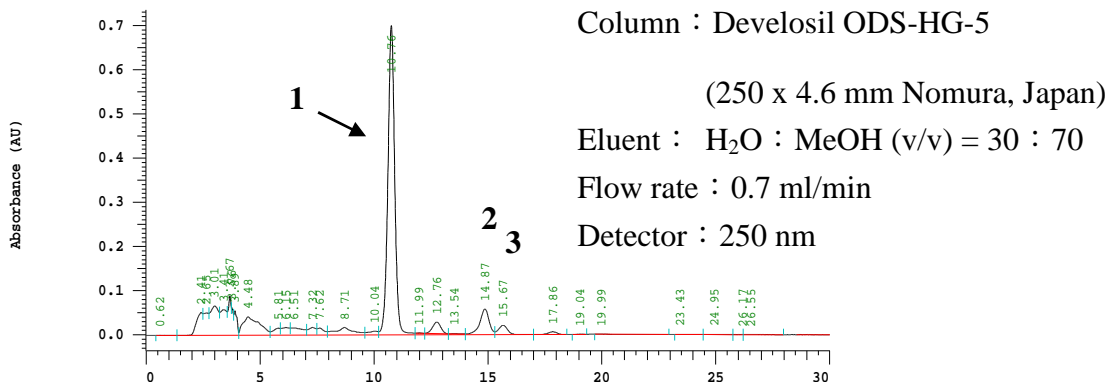
Fig. 13 Analytical HPLC chromatograms of the fraction 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 from defatted methanol extracts of *S. chinensis* fruits.

#### 5-1-4 五味子脫脂甲醇萃取物區分 3 及 4、5 之成分分離與純化製備

更換另一分析型管柱後，探尋各區分最適的等梯度沖提條件，利用此條件加以微調後進行製備型管柱的分離與純化。區分 4 及區分 5 之分離純化條件與分析型所使用之條件相同，因此直接延用分析型之條件進行分離純化，區分 4 收集之位置為分析型層析圖上滯留時間 10.76 分鐘之波峰 1，由所收集得之純化物質 1 重量回推可得知其佔區分 4 總量的  $38.52 \pm 3.73\%$ ，區分 5 收集之位置為分析型層析圖上滯留時間 15.31 及 16.18 分鐘的波峰 2、3，回推後得知其分別佔區分 5 中  $10.64 \pm 1.11$  及  $31.99 \pm 0.24\%$ 。由於區分 3 分離所使用的管柱為正相 (normal phase) 管柱，滯留時間上之位置會漸漸後移，因此暫緩收集。將各純化物質以 HPLC、紫外光-可見光光譜儀及  $^1\text{H-NMR}$  分析並鑑定其結構。

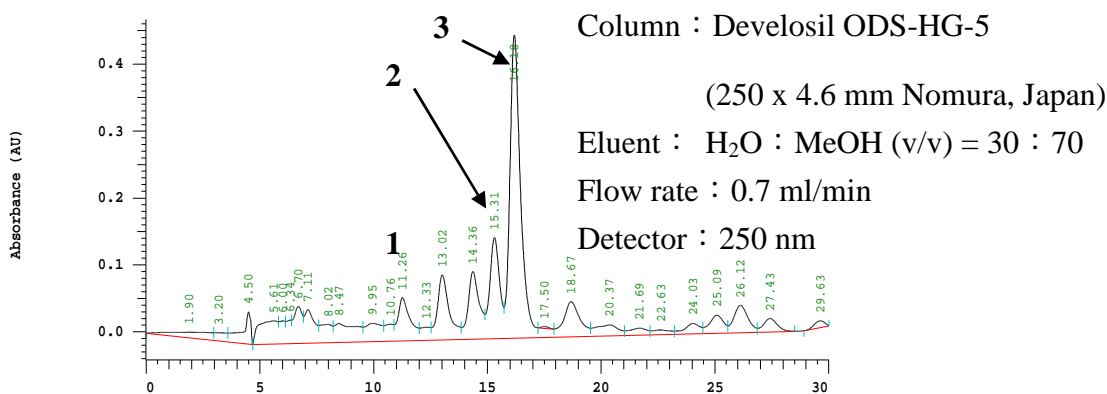
#### 5-1-5 五味子脫脂甲醇萃取物區分 6 之成分分離與純化製備

因 Cosmosil 75  $\text{C}_{18}$ -OPN 膠體液相層析後結果不佳，主要波峰皆難以分離，故直接以區分 6 等梯度分析型條件作為依據，將流速及溶劑比例稍進行調整後再套用於製備型管柱上，流速由 0.8 調整為 4 ml/min，溶劑比例調整為水：甲醇 (v/v) = 10：90，重覆進行收集及純化的動作。收集五味子脫脂甲醇萃取物區分 6 中所有可能為 Sch B 的波峰，收集的波峰位置為分析型管柱滯留時間 15.63(4)、16.56(5) 及 21.65(6) 分鐘的波峰，即同型號製備型管柱滯留時間上的 27.63(4)、28.85(5) 及 34.69(6) 分鐘之波峰，每注入 30 針 ( $200 \mu\text{l}$ /針) 後對收集的物質進行定量，推算得知純化物質 4、5 及 6 之產率分別佔區分 6 總量之  $10.58 \pm 1.87\%$ 、 $32.67 \pm 3.59\%$  及  $12.81 \pm 0.03\%$ 。各純化物質先以分析型 HPLC 判斷純度、再以紫外光-可見光光譜、 $^1\text{H-NMR}$  及  $^{13}\text{C-NMR}$  分析並鑑定其結構。



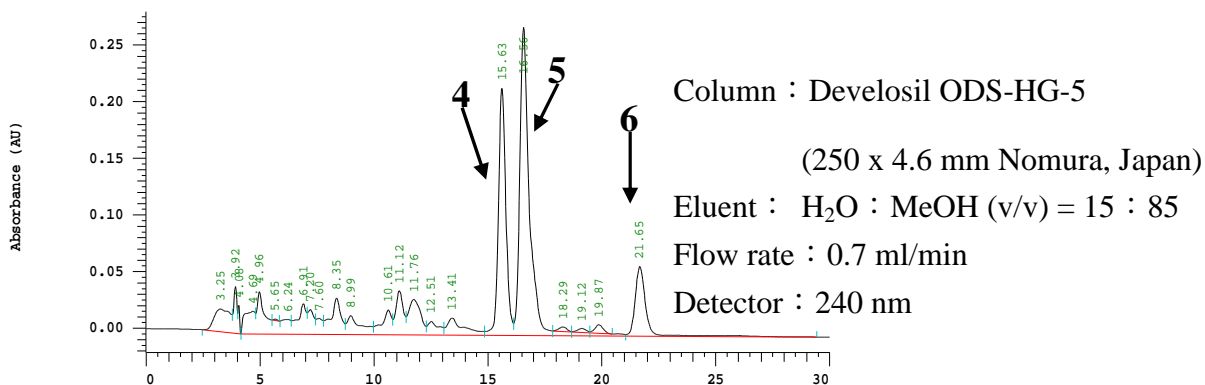
圖十四、五味子脫脂甲醇萃取物區分 4 之分析型 HPLC 圖。

Fig. 14 Analytical HPLC chromatogram of the fraction 4 from defatted methanol extracts of *S. chinensis* fruits.



圖十五、五味子脫脂甲醇萃取物區分 5 之分析型 HPLC 圖。

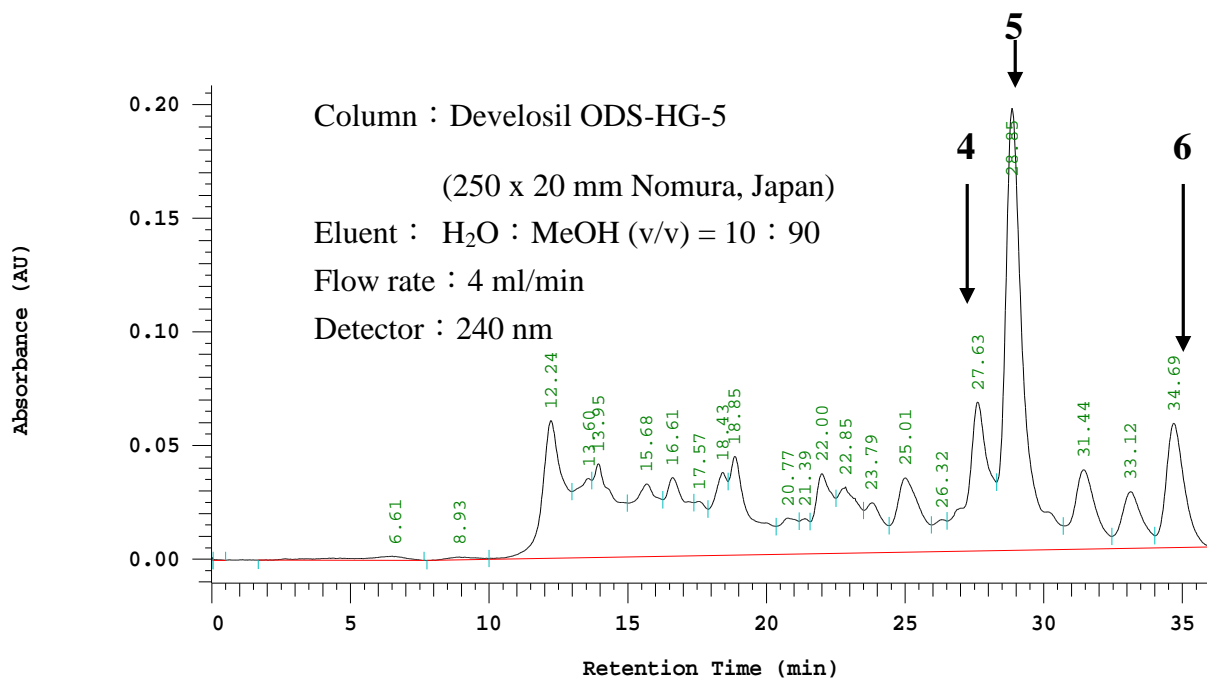
Fig. 15 Analytical HPLC chromatogram of the fraction 5 from defatted methanol extracts of *S. chinensis* fruits.



圖十六、五味子脫脂甲醇萃取物區分 6 之分析型 HPLC 圖。

Fig. 16 Analytical HPLC chromatograms of the fraction 6 from defatted methanol extracts of *S. chinensis* fruits.





圖十七、五味子脫脂甲醇萃取物區分6之製備型 HPLC 圖。

Fig. 17 Preparative HPLC chromatograms of the fraction 6 from defatted methanol extracts of *S. chinensis* fruits.

## 5-1-6 五味子脫脂甲醇萃取物區分 4 及區分 5 中純化物質之結構鑑定

### 5-1-6-1 區分 4 純化物質 1 之結構鑑定

純化物質 1 為白色粉末，最大吸收波峰 ( $\lambda_{\max}$ -MeOH)位置位於：217、251(sh)及 285(sh)。從  $^1\text{H-NMR}$  上之判讀結果與 An 等人 (2006) 之文獻相比對，推測區分 4 之純化物質 1 為 schisandrin (schisandrol A)。Schisandrin 具有抑制 LPS (lipopolysaccharide)誘導產生的發炎反應 (Park *et al.*, 2011)及抑制癌細胞的多重抗藥性等功能 (Fong *et al.*, 2007)。

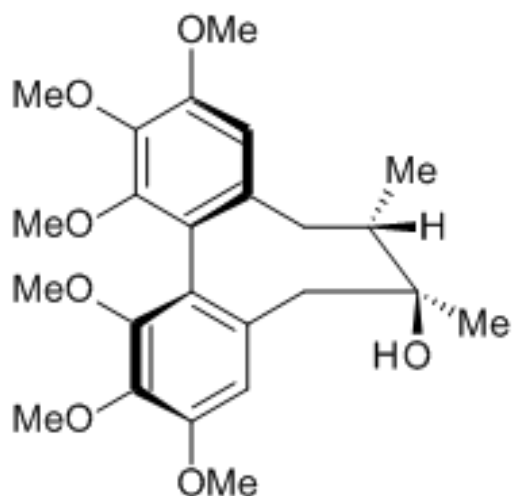
### 5-1-6-2 區分 5 純化物質 2 之結構鑑定

純化物質 2 為白色粉末，最大吸收波峰 ( $\lambda_{\max}$ -MeOH)位置位於：214、251(sh)及 280(sh)。從  $^1\text{H-NMR}$  上之判讀結果與 Ookawa 等人(1994) 之文獻相比對，推測區分 5 之純化物質 2 為 angeloyl binankadsurin B。目前關於 angeloyl binankadsurin B 之相關文獻多為結構鑑定，生理活性功能之文獻尚缺。

### 5-1-6-3 區分 5 純化物質 3 之結構鑑定

純化物質 3 為白色粉末，最大吸收波峰 ( $\lambda_{\max}$ -MeOH)位置位於：215、256(sh)及 285(sh)。從  $^1\text{H-NMR}$  上之判讀結果與 Chen 等人 (1997) 及 Ikeya 等人 (1982)之文獻相比對，推測區分 5 之純化物質 3 為 Sch B 之立體異構物。因目前所分離出之樣品量不足以進行  $^{13}\text{C-NMR}$  鑑定，因此僅能確認為 Sch B 之異構物。

區分 4 純化物質 1 為：schisandrin (schisandrol A)



UV  $\lambda_{\max}$  (nm, MeOH) : 217, 251(sh), 285(sh)

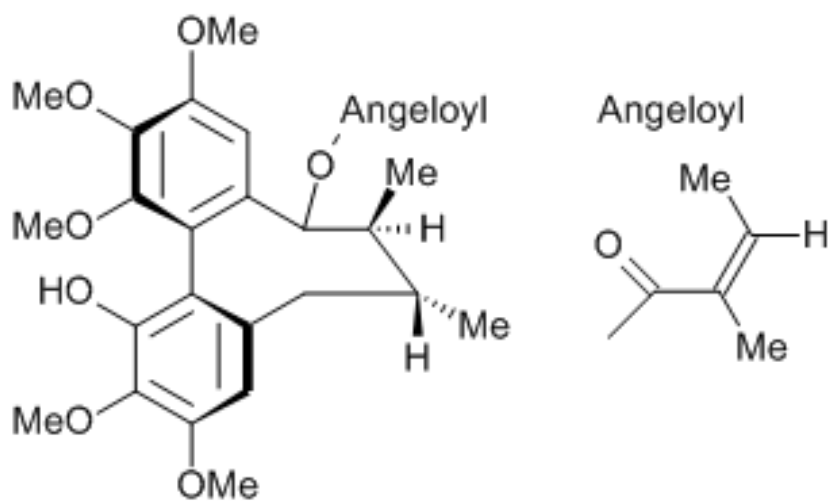
EI-MS 431 [ $M^+$ , base ion]

Chemical formula :  $C_{24}H_{32}O_7$

$^1H$ -NMR (300 MHz,  $CD_3OD, \delta$ )

0.81 (3H, d,  $J=7.2\text{Hz}$ , 17- $CH_3$ ) , 1.21 (3H, s, 18- $CH_3$ ) , 1.81 (1H, m, 8-H, 8-H) , 2.37 (1H, d,  $J=13.5\text{Hz}$ , 6a-H) , 2.39 (1H, dd,  $J=6.0, 14.1\text{Hz}$ , 9a-H) , 2.56 (1H, d,  $J=13.5\text{Hz}$ , 6b-H), 2.84 (1H, dd,  $J=2.1, 14.1\text{Hz}$ , 9b-H), 3.45, 3.84, 3.85, 3.89 (3H x4, s, 1, 2, 3, 14- $OCH_3$ ) , 3.86 (3H, s, 12, 13- $CH_3O$ ) , 3.89 (3H, s, 14- $OCH_3$ ), 6.68 (1H, s, 11-H) , 6.73 (1H, s, 4-H)

區分5純化物質2為：Angeloyl binankadsurin B



UV  $\lambda_{\max}$  (nm, MeOH) : 214, 251(sh), 280(sh)

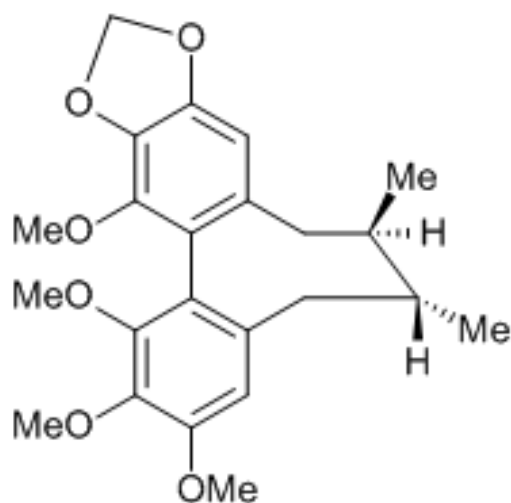
EI-MS 499 [ $M^+$ , base ion]

Chemical formula :  $C_{28}H_{36}O_8$

$^1H$ -NMR (300 MHz,  $CD_3OD, \delta$ )

0.87 (3H, d,  $J=6.9$ Hz, 17- $CH_3$ ) , 1.21 (1H, s, 18- $CH_3$ ) , 1.74 (6H, m, 4', 5'-H) , 3.43 (3H, s, 1- $OCH_3$ ) , 3.78 (6H, s, 2,3 - $OCH_3$ ) , 3.88 (3H, s, 12- $OCH_3$ ), 3.91 (3H, s, 13- $OCH_3$ ), 6.68 (1H, s, 11-H) , 6.85 (1H, s, 4-H)

區分5純化物質3為：schisandrin B之立體異構物



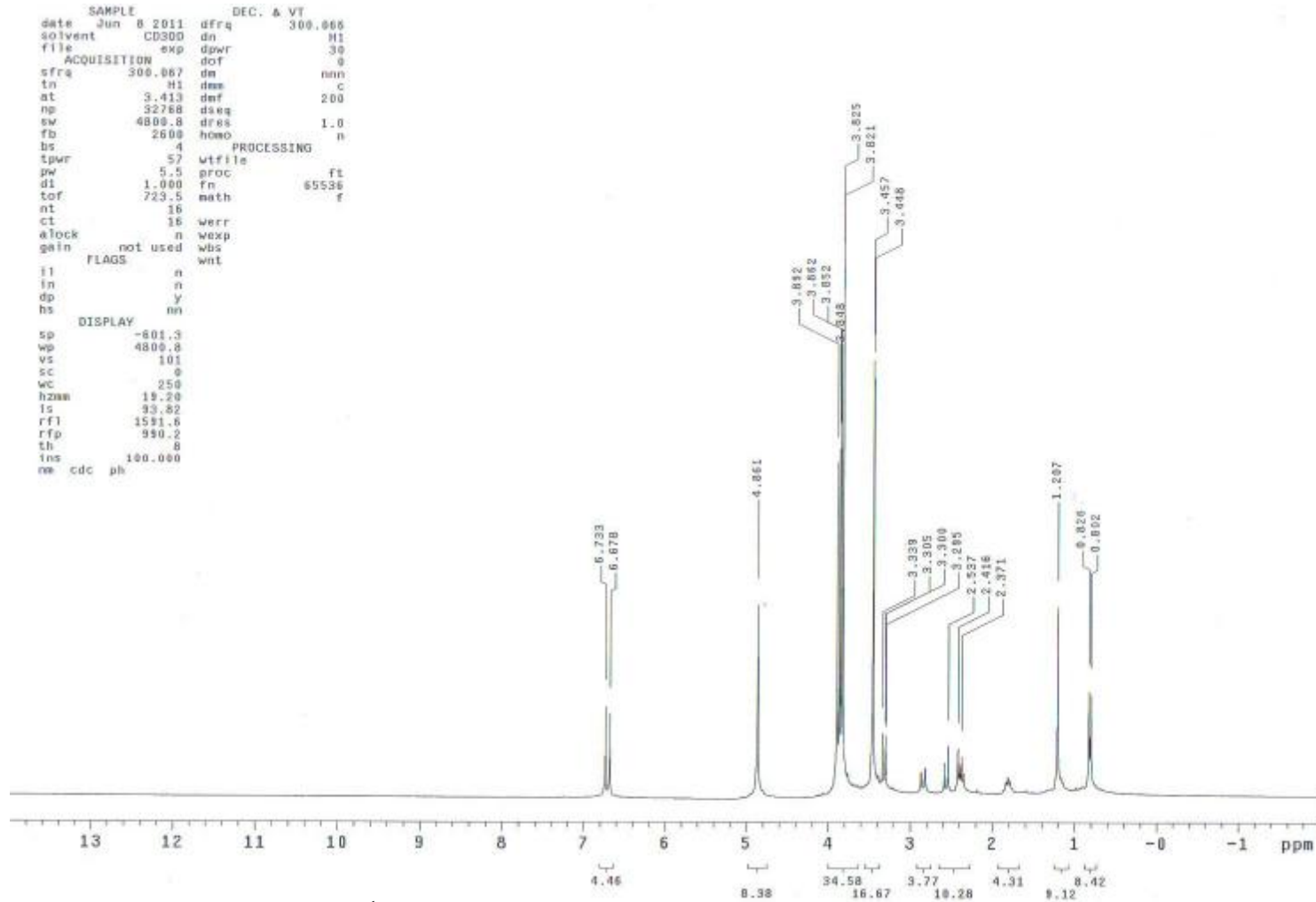
UV  $\lambda_{\max}$  (nm, MeOH) : 215, 256(sh), 285(sh)

EI-MS 399 [ $M^+$ , base ion]

Chemical formula :  $C_{23}H_{28}O_6$

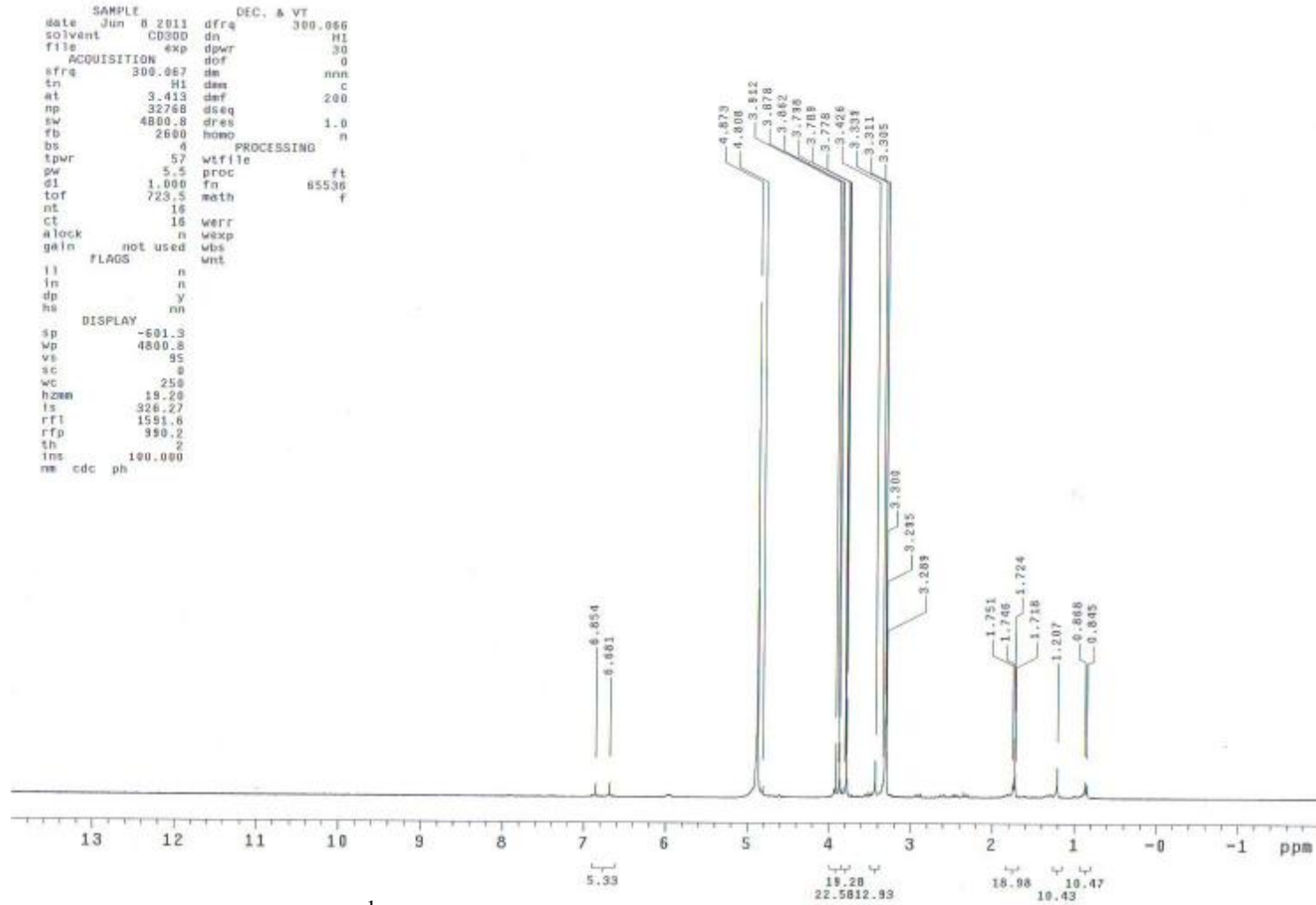
$^1H$ -NMR (300 MHz,  $CD_3OD$ ,  $\delta$ )

0.80 (3H, d,  $J=7.2$ Hz, 17- $CH_3$ ), 1.20 (3H, d,  $J=7.2$ Hz, 18- $CH_3$ ), 1.80 (2H, m, 7-H, 8-H), 2.33 (1H, d,  $J=13.5$ Hz, 6b-H), 2.35 (1H, d,  $J=14.1$ Hz, 9b-H), 2.56 (1H, d,  $J=13.5$ Hz, 6a-H), 2.79 (1H, dd,  $J=2.1, 14.1$ Hz, 9a-H), 3.434 (3H, s, 1- $OCH_3$ ), 3.74 (3H, s, 2- $OCH_3$ ), 3.83 (3H, s, 3- $OCH_3$ ), 3.89 (3H, s, 14- $OCH_3$ ), 5.93 (2H, s,  $OCH_2O$ ), 6.51 (1H, s, 11-H), 6.72 (1H, s, 4-H)



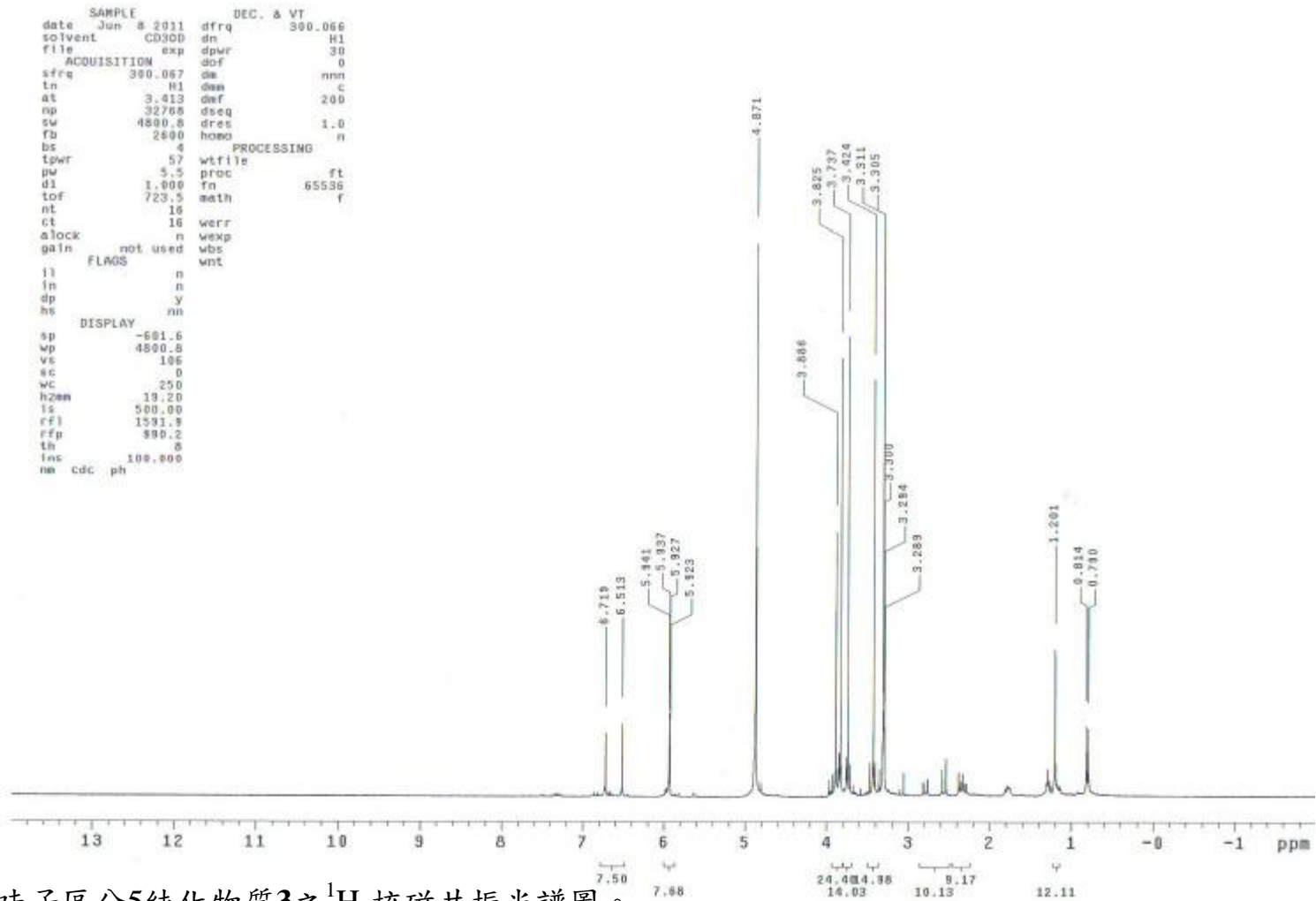
圖十八、五味子區分4純化物質1之<sup>1</sup>H-核磁共振光譜圖。

Fig. 18 <sup>1</sup>H-NMR spectrum of the purified component 1 from fraction 4 of defatted methanol extracts of *S. chinensis* fruits.



圖十九、五味子區分5純化物質2之<sup>1</sup>H-核磁共振光譜圖。

Fig. 19 <sup>1</sup>H-NMR spectrum of the purified component 2 from fraction 5 of defatted methanol extracts of *S. chinensis* fruits.



圖二十、五味子區分5純化物質**3**之<sup>1</sup>H-核磁共振光譜圖。

Fig. 20 <sup>1</sup>H-NMR spectrum of the purified component **3** from fraction 5 of defatted methanol extracts of *S. chinensis* fruits.



## 5-1-7 五味子脫脂甲醇萃取物區分6中純化物質之結構鑑定

### 5-1-7-1 區分 6 純化物質 4 之結構鑑定

純化物質 4 為白色針狀粉末，最大吸收波峰( $\lambda_{\max}$ -MeOH)位置位於：219、256(sh)及 279(sh)。由於  $^1\text{H-NMR}$  光譜上位置純化物質 4、5 皆非常相近，難以鑑別兩者之差異性，且  $^{13}\text{C-NMR}$  光譜上皆具有一直向上 (axial)  $\delta$  12.4 的甲基及一平向上 (equatorial)  $\delta$  21.9 的甲基、兩個 methines ( $\delta$  33.9、 $\delta$ 40.8)、benzylic methylenes ( $\delta$ 35.5、 $\delta$ 38.9)、一個 methylenedioxy moiety ( $\delta$ 100.7)及四個 aromatic methoxyls ( $\delta$ 55.9、 $\delta$ 59.6、 $\delta$ 60.5 及  $\delta$ 60.9)，不僅所擁有的官能基相同，結構也相當雷同，唯一不同處在於 C-4 及 C-11 上的結構，C-4 之光譜  $\delta$  107.5 靠近 methoxyl 側，其方向為平向 (equatorial)，C-11 之光譜  $\delta$  105.9 靠近 methylenedioxy moiety 側，其方向為直向 (axial)，再經由逆相管柱沖提出的滯留時間先後順序與積分面積比例等依據，判斷此為 schisandrin B 之異構物  $\gamma$ -schisandrin (Ikeya, Y. *et al.*, 1982)。 $\gamma$ -schisandrin 具降低四氯化碳造成之肝損傷、提升粒線體中 GSH 含量 (Ip and Ko, 1996)。

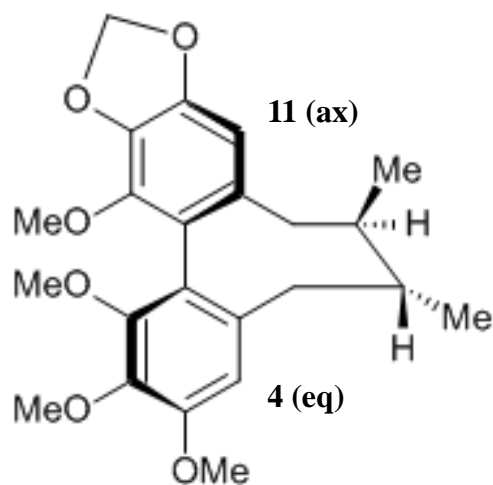
### 5-1-7-2 區分 6 純化物質 5 之結構鑑定

純化物質 5 幾乎與純化物質 4 相同，不同處在於 C-4 的光譜  $\delta$  110.7 靠近 methoxyl 側，其方向為直向 (axial)，C-11 的光譜  $\delta$  103.0 靠近 methylenedioxy moiety 側，其方向為平向 (equatorial)，恰好與純化物質 4 相反。此外於 HPLC 的層析圖上積分面積之比例，schisandrin B 與其異構物間比例為 2:8 判斷，此為 schisandrin B (gomisin N) (Ikeya, Y. *et al.*, 1982; Ka, *et al.*, 2008)。

### 5-1-7-3 區分 6 純化物質 6 之結構鑑定

純化物質 6 為白色針狀粉末，最大吸收波峰 ( $\lambda_{\max}$ -MeOH)位置位於：220、256(sh)及 282(sh)，最大吸收波峰類似於 schisandrin B，且同樣具有 methylenedioxy moiety ( $\delta$  100.8)及三個位於芳香環上的 methoxyl ( $\delta$  151.7, 147.8, 141.2)官能基，但可從  $^1\text{H-NMR}$  光譜上發現其具酚羥基 (phenolic hydroxyl)官能基於  $\delta$  5.35–5.78 的位置上因此可推測其為 gomisins L<sub>1</sub> (Ikeya, Y. *et al.*, 1982)。

區分 6 純化物質 **4** 為：schisandrin B 之立體異構物( $\gamma$ -schisandrin)



UV  $\lambda_{\max}$  (nm, MeOH) : 219, 256(sh), 279(sh)

EI-MS 399 [ $M^+$ , base ion]

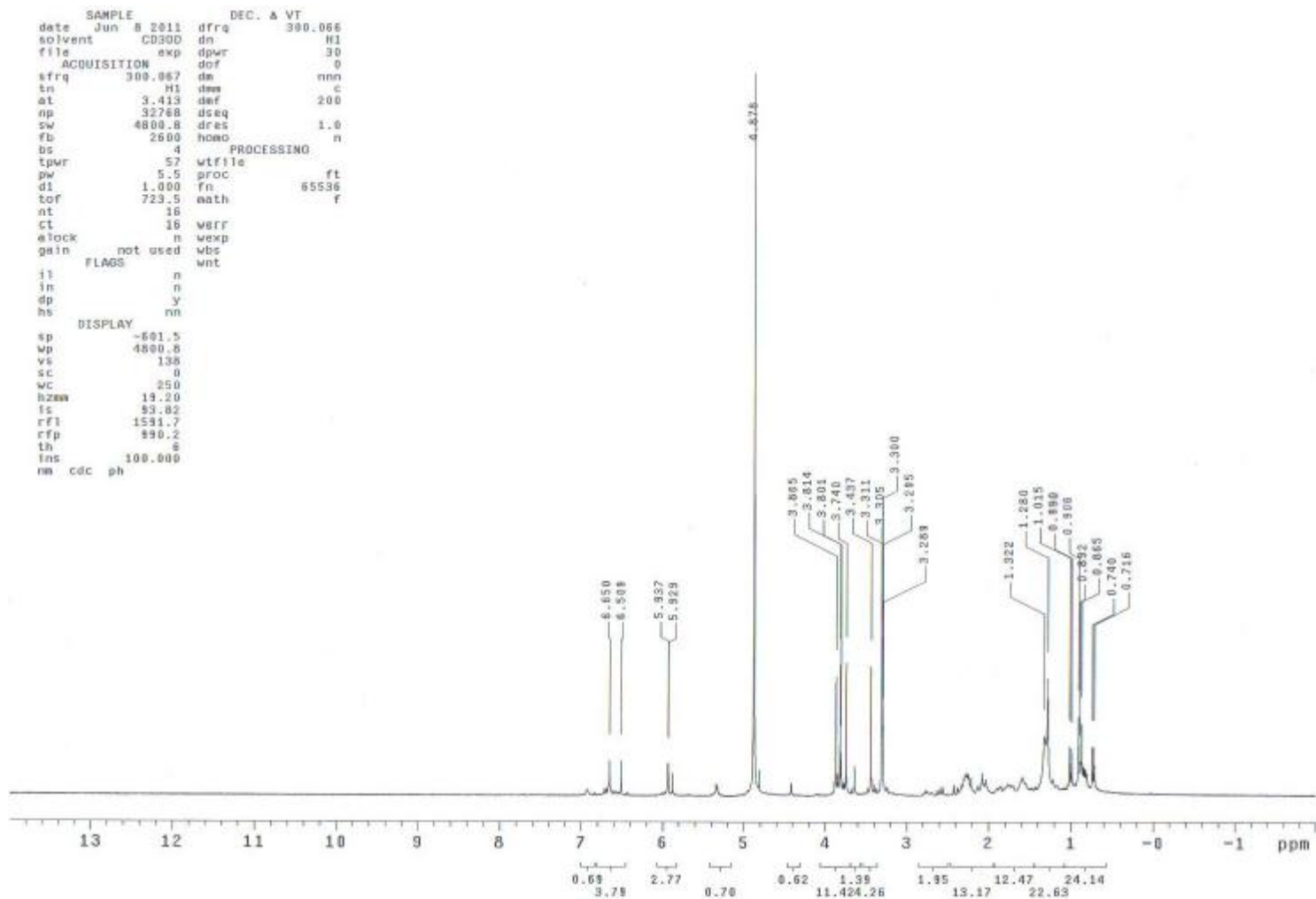
Chemical formula :  $C_{23}H_{28}O_6$

$^1H$ -NMR (300 MHz,  $CD_3OD$ ,  $\delta$ )

0.73 (3H, d,  $J=7.2$ Hz, 7- $CH_3$ ), 0.97 (3H, d,  $J=7.2$ Hz, 8- $CH_3$ ), 1.85 (2H, m, 7-H, 8-H), 2.10 (2H, m, 9-H), 2.55 (2H, m, 6-H), 3.55, 3.74, 3.81, 3.86 (3H x4, 1, 2, 3, 14- $OCH_3$ ), 5.93 (2H, s,  $OCH_2O$ ), 6.49 (1H, s, 11-H), 6.56 (1H, s, 4-H)

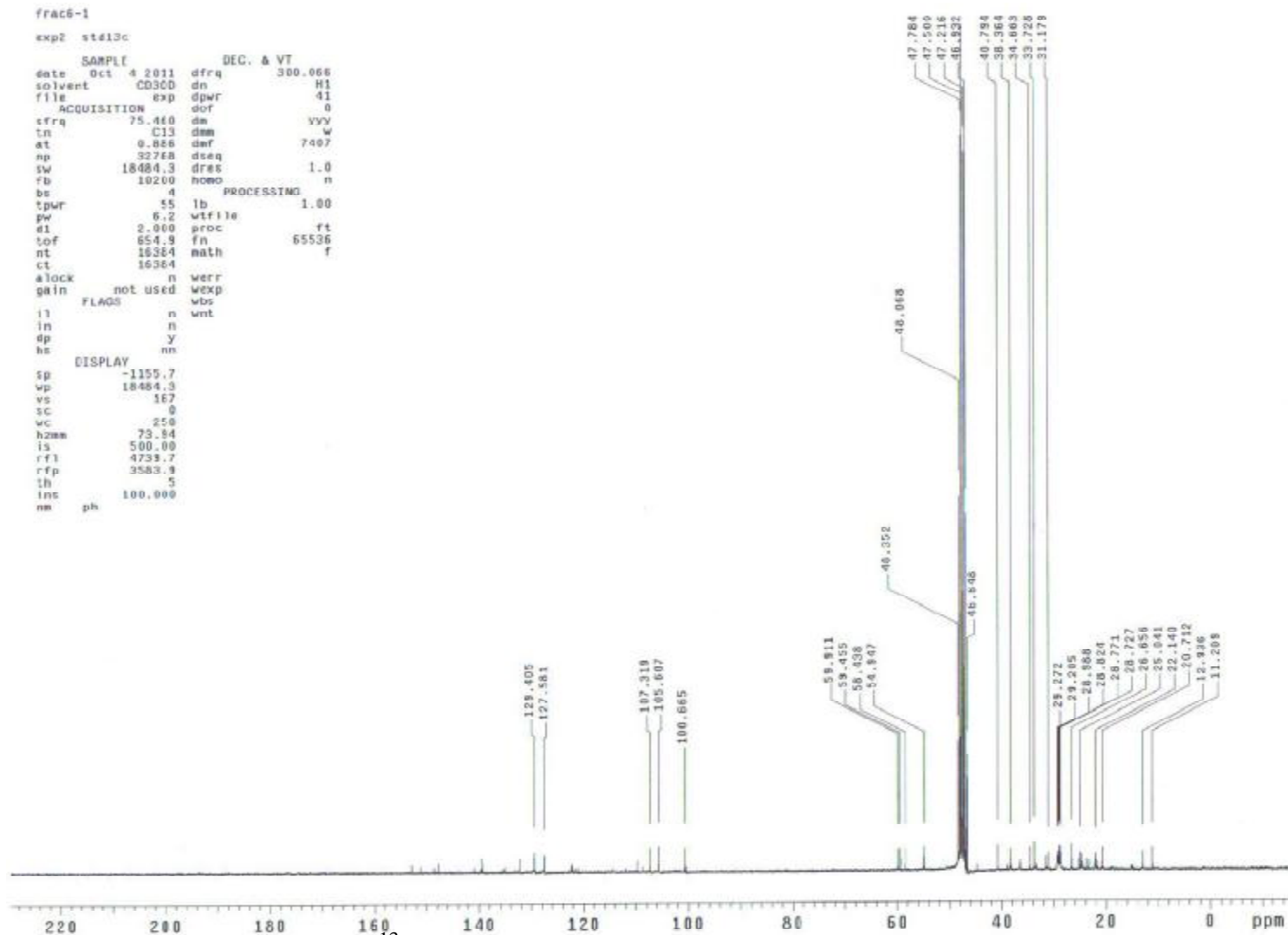
$^{13}C$ -NMR (75 MHz,  $CD_3OD$ ,  $\delta$ )

12.85 (C-18), 21.5 (C-17), 33.65 (C-7), 35.72 (C-9), 38.36 (C-6), 40.92 (C-8), 55.87 (C-3- $OCH_3$ ), 59.65 (C-14- $OCH_3$ ), 60.45 (C-1- $OCH_3$ ), 60.90 (C-2- $OCH_3$ ), 100.65 ( $OCH_2O$ ), 103.20 (C-11), 106.75 (C-4), 121.39 (C-15), 123.45 (C-16), 134.08 (C-5), 134.62 (C-13), 137.82 (C-10), 140.25 (C-2), 141.36 (C-14), 148.65 (C-12), 151.65 (C-3), 151.82 (C-1)



圖二十一、五味子脫脂甲醇萃取物區分6純化物質**4**之 $^1\text{H}$ -核磁共振光譜圖。

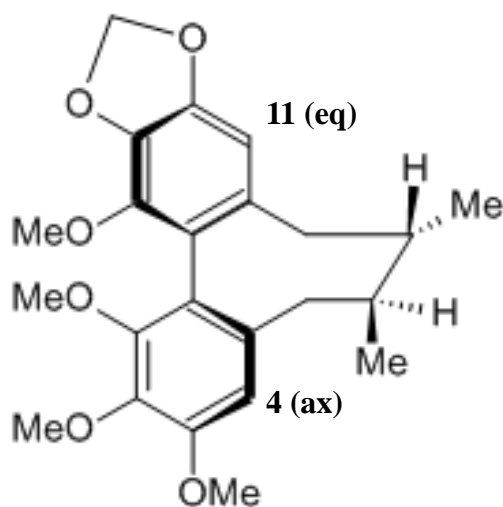
Fig. 21  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of the purified component **4** from fraction 6 of defatted methanol extracts of *S. chinensis* fruits.



圖二十二、五味子區分6純化物質**4**之 $^{13}\text{C}$ -核磁共振光譜圖。

Fig. 22  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of the purified component **4** from fraction 6 of defatted methanol extracts of *S. chinensis* fruits.

區分 6 純化物質 5 為：schisandrin B (gomisin N)



UV  $\lambda_{\max}$  (nm, MeOH) : 218, 256(sh), 281(sh)

EI-MS 399 [ $M^+$ , base ion]

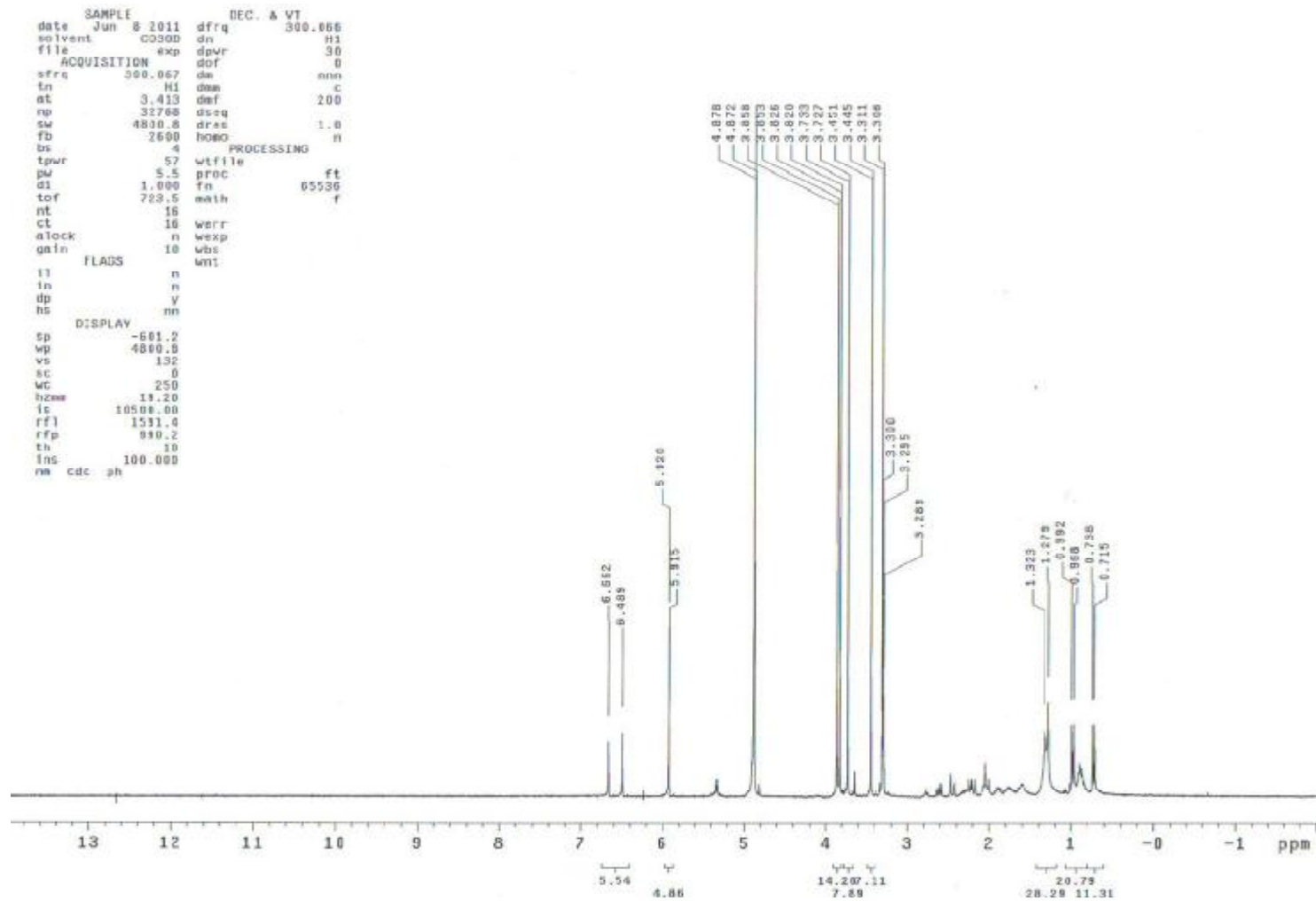
Chemical formula :  $C_{23}H_{28}O_6$

$^1H$ -NMR (300 MHz,  $CD_3OD$ ,  $\delta$ )

0.73 (3H, d,  $J=7.2$ Hz, 7- $CH_3$ ) , 1.00 (3H, d,  $J=7.2$ Hz, 8- $CH_3$ ) , 1.85 (2H, d, m, 7-H, 8-H) , 2.10 (2H, m, 9-H) , 2.55 (2H, m, 6-H) , 3.55, 3.74, 3.81, 3.86 (3H x4, s, 1, 2, 3, 14- $OCH_3$ ) , 5.93 (2H, s,  $OCH_2O$ ) , 6.49 (1H, s, 11-H) , 6.56 (1H, s, 4-H)

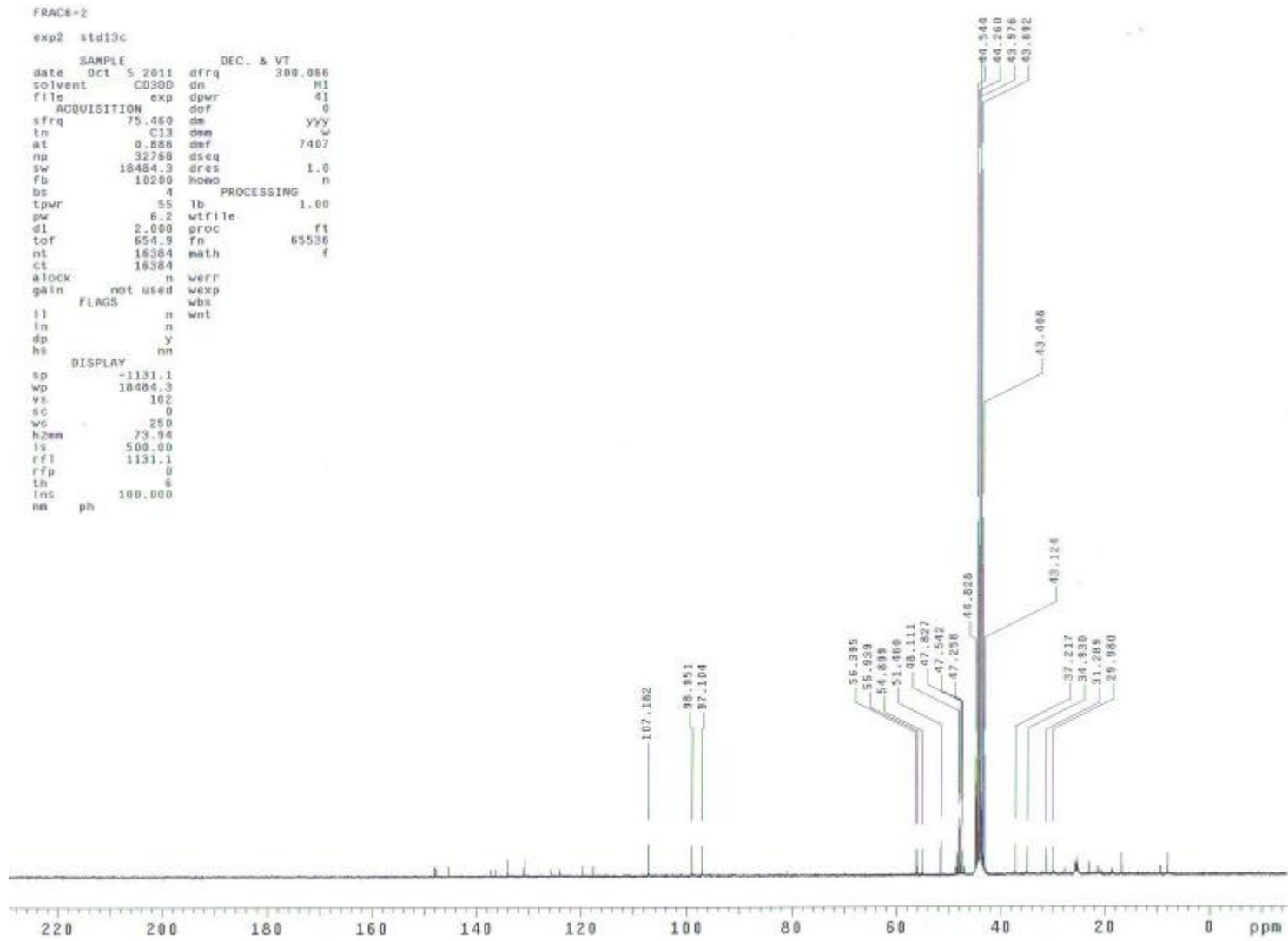
$^{13}C$ -NMR (75 MHz,  $CD_3OD$ ,  $\delta$ )

12.75 (C-17) , 21.53 (C-18) , 33.47 (C-8) , 35.41 (C-6) , 39.03 (C-9) , 40.63 (C-7) , 55.78 (C-3- $OCH_3$ ) , 59.56 (C-14- $OCH_3$ ) , 60.49(C-1- $OCH_3$ ) , 61.20 (C-2- $OCH_3$ ) , 100.65 ( $OCH_2O$ ) , 103.10 (C-11) , 110.67 (C-4) , 121.20 (C-15) , 123.18 (C-16) , 134.01 (C-10) , 134.44 (C-13) , 137.72 (C-2,) , 139.90 (C-5) , 140.96 (C-14) , 148.55 (C-12) , 151.16 (C-1) , 151.51 (C-3)



圖二十三、五味子脫脂甲醇萃取物區分6純化物質**5**之<sup>1</sup>H-核磁共振光譜圖。

Fig. 23 <sup>1</sup>H-NMR spectrum of the purified component **5** from fraction 6 of defatted methanol extracts of *S. chinensis* fruits.

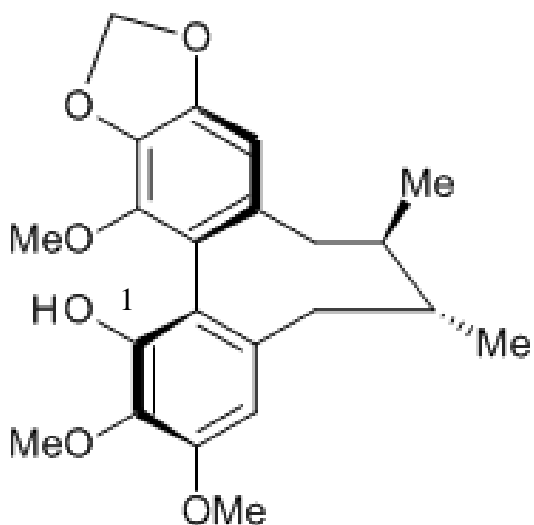


圖二十四、五味子脫脂甲醇萃取物區分6純化物質**5**之 $^{13}\text{C}$ -核磁共振光譜圖。

Fig. 24  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of the purified component **5** from fraction 6 of defatted methanol extracts of *S. chinensis* fruits.



區分 6 純化物質 6 為：gomisin L<sub>1</sub>



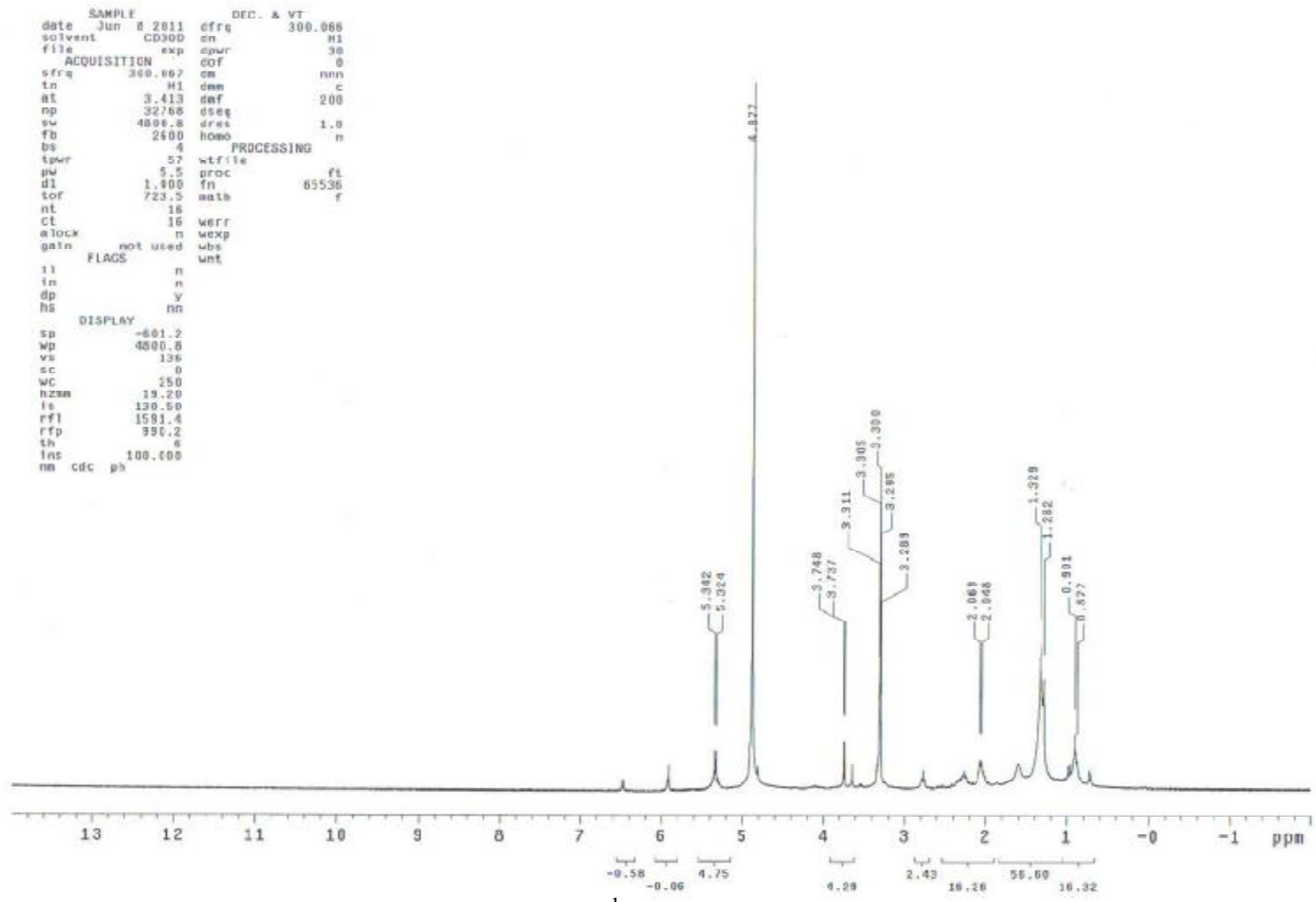
UV  $\lambda_{\max}$  (nm, MeOH) : 220, 256(sh), 282(sh)

EI-MS m/z, 385 [ $M^+$ , base ion]

Chemical formula : C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>O<sub>6</sub>

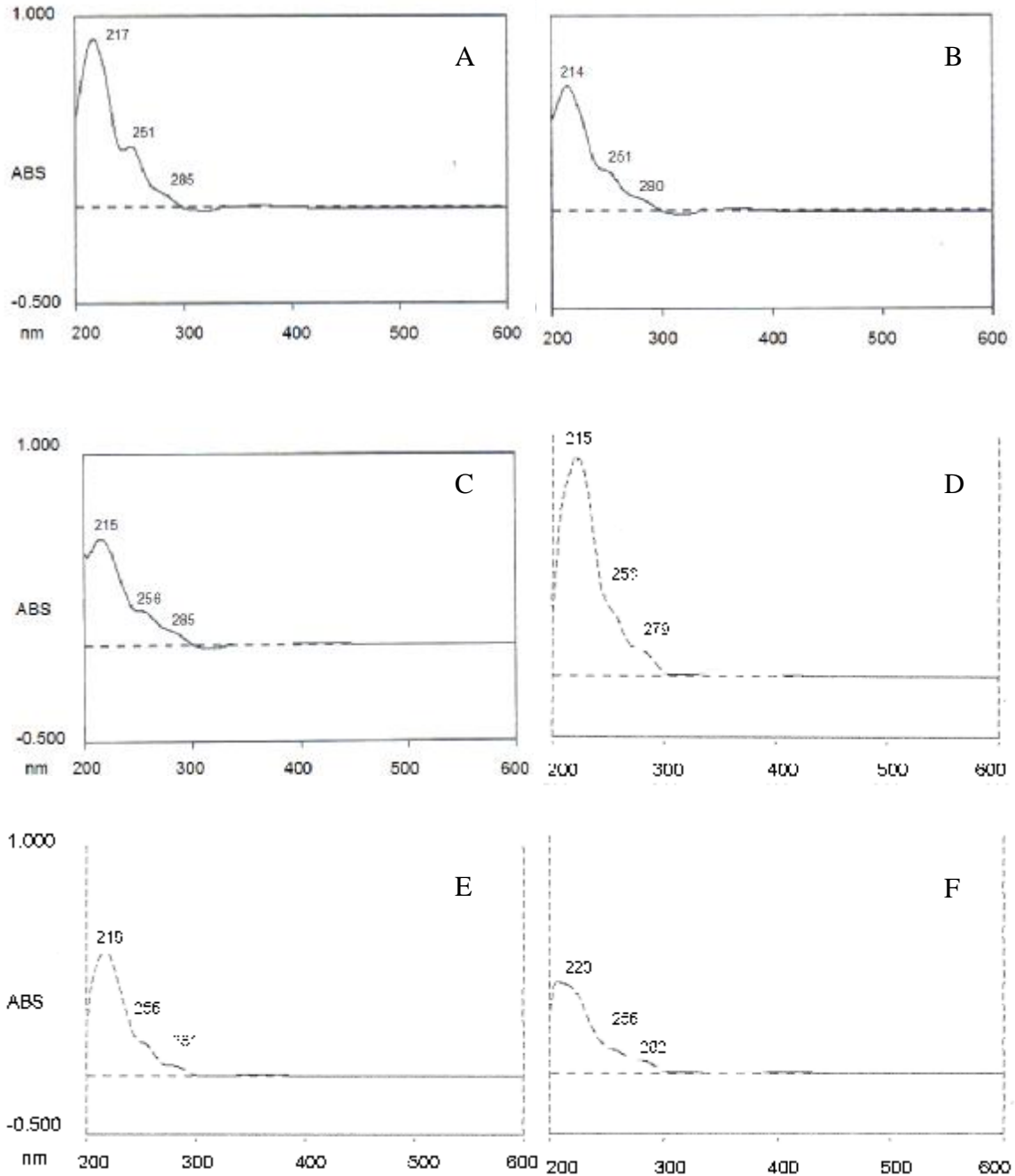
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$ )

0.72 (3H, d,  $J=7.0$  Hz, 8-CH<sub>3</sub>) , 0.96 (3H, d,  $J=7.0$  Hz, 7-CH<sub>3</sub>) , 1.85 (2H, m, 7-H, 8-H) , 2.05 (2H, m, 6-H) , 2.50 (2H, m, 9-H) , 3.89 (3H, s, OCH<sub>3</sub>) , 3.91 (6H, s, OCH<sub>3</sub> x2) , 5.95 (2H, s, OCH<sub>2</sub>O) , 6.38 (1H, s, 4-H) , 6.53 (1H, s, 11-H)



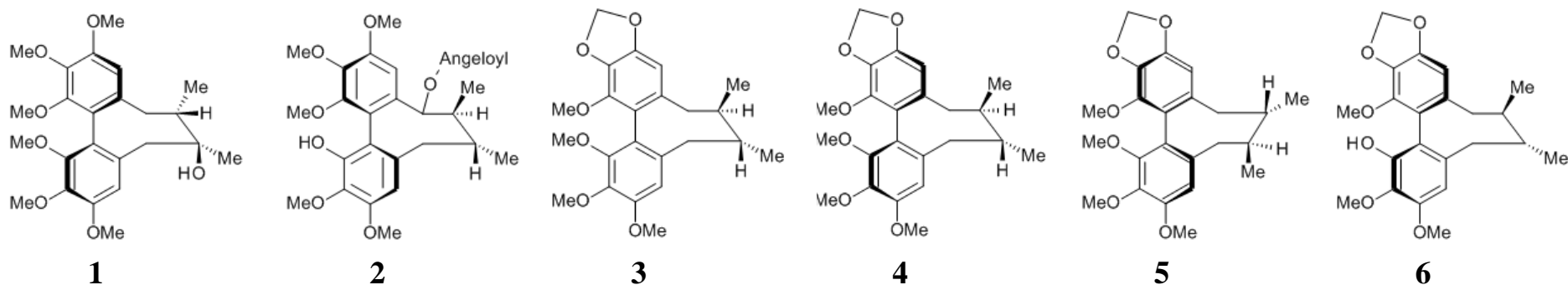
圖二十五、五味子脫脂甲醇萃取物區分6純化物質6之<sup>1</sup>H-核磁共振光譜圖。

Fig. 25 <sup>1</sup>H-NMR spectrum of the purified component 6 from fraction 6 of defatted methanol extracts of *S. chinensis* fruits.



圖二十六、五味子脫脂甲醇萃取物各區分純化物質**1**(A)、**2**(B)、**3**(C)、**4**(D)、**5**(E)及**6**(F)之紫外光-可見光光譜圖。

Fig. 26 UV-visible spectrum of the purified component **1**(A), **2**(B), **3**(C), **4**(D), **5**(E) and **6**(F) from fractions of defatted methanol extracts of *S. chinensis* fruits.



代號	純化物質名稱	分子式	分子量	UV光譜	回收率	Reference
<b>1</b>	schisandrin	$C_{24}H_{32}O_7$	432	217, 251(sh), 285(sh)	0.22%±0.02	An <i>et al.</i> , 2006
<b>2</b>	angeloyl binankadsurin B	$C_{28}H_{36}O_8$	500	214, 251(sh), 280(sh)	0.02%±0.00	Ookawa <i>et al.</i> , 1994
<b>3</b>	Isomer of schisandrin B	$C_{23}H_{28}O_6$	400	215, 256(sh), 285(sh)	0.06%±0.00	Ikeya <i>et al.</i> , 1982
<b>4</b>	$\gamma$ - schisandrin	$C_{23}H_{28}O_6$	400	219, 256(sh), 279(sh)	0.19%±0.03	Ikeya <i>et al.</i> , 1982
<b>5</b>	schisandrin B	$C_{23}H_{28}O_6$	400	218, 256(sh), 281(sh)	0.58%±0.06	Ikeya <i>et al.</i> , 1982
<b>6</b>	gomisin L <sub>1</sub>	$C_{22}H_{26}O_6$	386	220, 256(sh), 282(sh)	0.23%±0.00	Ikeya <i>et al.</i> , 1982

圖二十七、五味子脫脂甲醇萃取物各區分純化物質一覽。

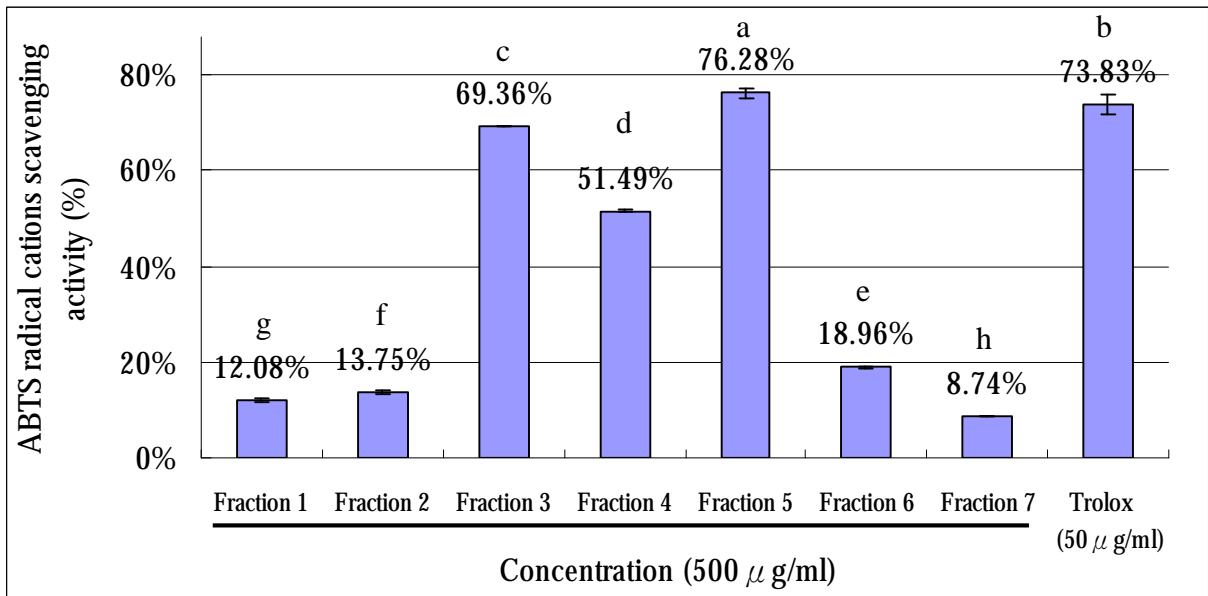
Fig. 27 List of purified component **1**, **2**, **3**, **4**, **5** and **6** from fractions of defatted methanol extracts of *S. chinensis* fruits.

## 5-2 五味子脫脂甲醇萃取物之抗氧化力檢測

### 5-2-1 五味子脫脂甲醇萃取物各區分及純化物質之 Trolox 當量抗氧化力分析 (Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC)

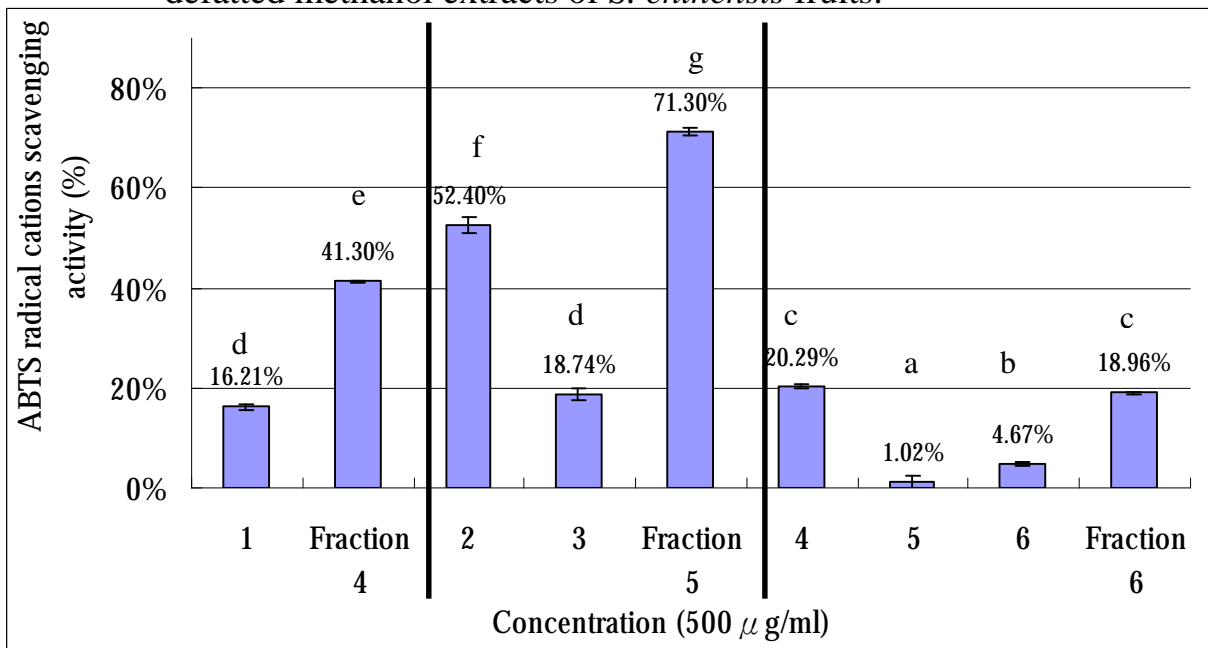
作用之原理是由於在具有過氧化氫 ( $H_2O_2$ )及 ABTS 同時存在的情況下，經由觸酶 (peroxidase)的作用，產生藍綠色的穩定  $ABTS \cdot^+$  自由基，之後再加入具抗氧化性的標準品或樣品，反應一定時間後， $ABTS \cdot^+$  自由基被抗氧化物質消除，使吸光值漸漸下降，所測得的吸光值代入以 Trolox 所製作的檢量線，即可求得其當量，也可與 control 組之吸光值相除計算清除百分比。

五味子脫脂甲醇萃取物各區分 1~7 對  $ABTS \cdot^+$  自由基之清除能力分別為 (1)  $12.08 \pm 0.49\%$ 、(2)  $13.75 \pm 0.28\%$ 、(3)  $69.36 \pm 0.07\%$ 、(4)  $51.49 \pm 0.21\%$ 、(5)  $76.28 \pm 0.95\%$ 、(6)  $18.96 \pm 0.14\%$  及 (7)  $8.74 \pm 0.07\%$ ，其清除能力強弱為區分 5 > 區分 3 > 區分 4 > 區分 6 > 區分 2 > 區分 1 > 區分 7。進一步將區分 4、5 及目標區分，區分 6 進行純化，以純化物質 1、2、3 與 4、5 及 6 進行實驗。相同濃度下 ( $500 \mu g/ml$ ) 純化物質 1 與區分 4 相比較，自由基清除力卻較低，僅  $16.21 \pm 0.67\%$ ，代表區分 4 中抗氧化物質非僅僅區分 4 之主要波峰而已，極有可能有其他物質如三萜類化合物 (triterpenes) 藉由相乘作用共同參與而產生強抗氧化性 (Li *et al.*, 2011)。而純化物質 2 及 3 亦較同濃度下的區分 5 稍弱，分別為  $52.40 \pm 1.58\%$  及  $18.74 \pm 1.08\%$ ，亦可歸諸於相乘作用。區分 6 中之抗氧化性則明顯可看出源自於純化物質 4 ( $\gamma$ -schisandrin)，自由基清除力可達  $20.29 \pm 0.42\% >$  純化物質 6 為  $4.67 \pm 0.42\% >$  純化物質 5 (schisandrin B) 為  $1.02 \pm 1.21\%$ ，由抗氧化力的強弱上判斷純化物質 4 確實較有可能為  $\gamma$ -schisandrin B，化學性抗氧化力大於純化物質 5 (schisandrin B) (Li *et al.*, 1990; Karel *et al.*, 2010)。



圖二十八、五味子脫脂甲醇萃取物各區分 ABTS·<sup>+</sup> 自由基清除能力。

Fig. 28 Scavenging percentage of ABTS radical for eluted factions from defatted methanol extracts of *S. chinensis* fruits.



圖二十九、五味子脫脂甲醇萃取物區分及純化物質之 ABTS·<sup>+</sup> 自由基清除能力。

Fig. 29 Scavenging percentage of ABTS radical from purified components of fraction 4, 5 and 6 from defatted methanol extracts of *S. chinensis* fruits. Each value represents the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

## 5-2-2 五味子脫脂甲醇萃取物各區分之 DPPH

### (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 自由基清除能力測定

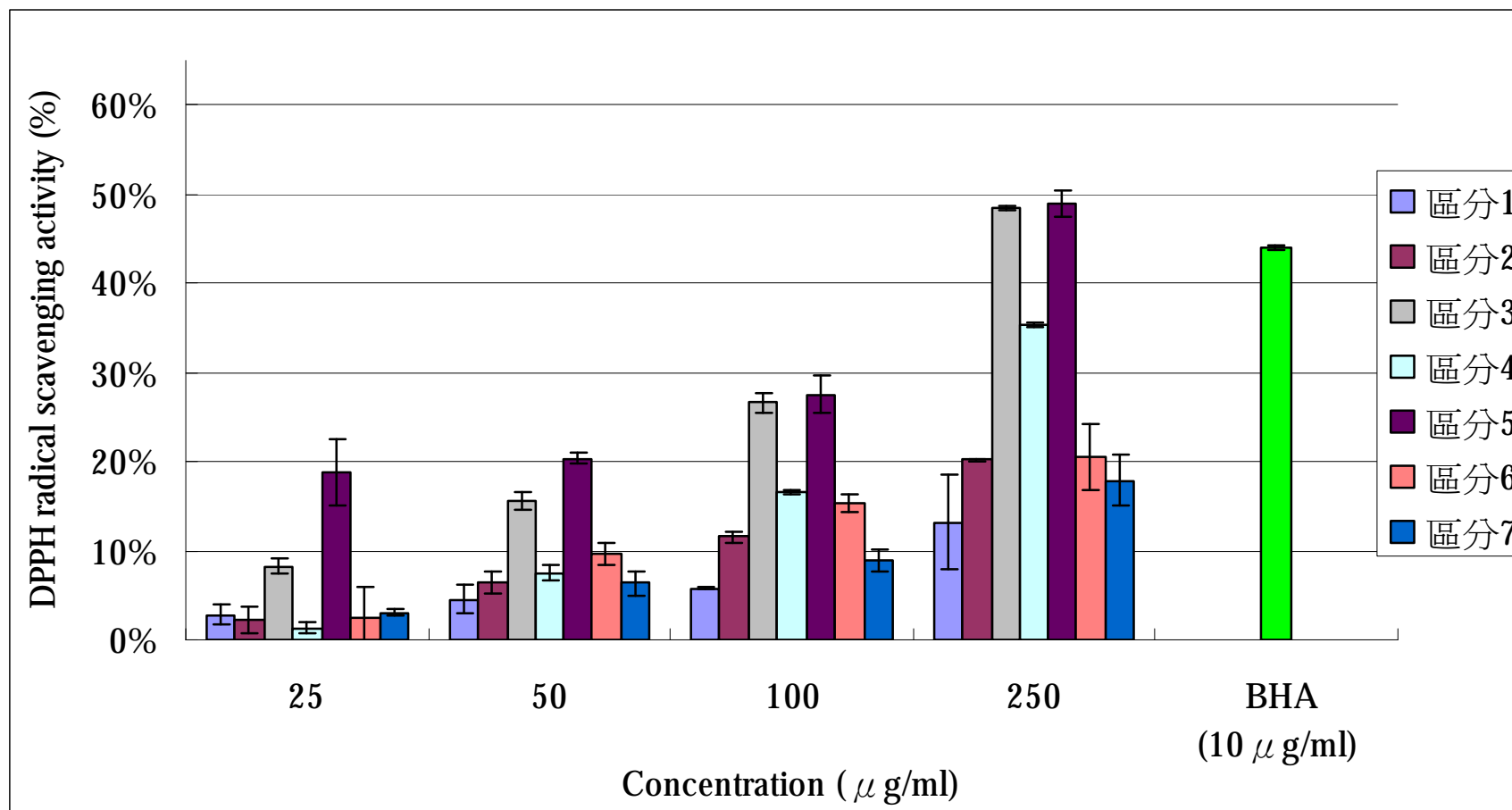
原理為 DPPH 溶於甲醇時，會產生深紫色的自由基 (DPPH·)，當接受樣品中提供的氫質子時，顏色漸漸轉黃，於 517 nm 的吸光值漸下降，藉此得知抗氧化力強弱。由於其分析簡易性、高靈敏度及自由基穩定性且已大量商品化，因此在抗氧化上應用相當廣泛，一般皆使用 DPPH 來測定醇溶性抗氧化物質之抗氧化力。

結果顯示，7 個區分中的 DPPH 自由基清除能力以區分 3 至區分 5 之間清除能力較強，由 50% 自由基清除力所需濃度來看，分別為  $253.15 \pm 2.70$ 、 $344.91 \pm 5.51$  及  $279.81 \pm 38.19 \mu\text{g/ml}$ ，得知 DPPH 自由基清除能力區分 3 > 區分 5 > 區分 4 > 區分 2 及 6 > 區分 1 及 7。

## 5-2-3 五味子脫脂甲醇萃取物各區分之硫氰酸鐵法測定 (Ferric thiocyanate assay)

脂質於自氧化的過程中會產生一連串的連鎖反應而造成不可逆的脂質酸敗現象，隨著脂質氧化的程度愈厲害，則所產生的氫過氧化物也就越多，致使顯色試驗中試劑的  $\text{Fe}^{2+}$  被氧化成  $\text{Fe}^{3+}$ ， $\text{Fe}^{3+}$  再與  $\text{NH}_4\text{SCN}$  形成紅色  $\text{Fe}(\text{SCN})_6^{3-}$ ，每隔 24 小時測量一次 500 nm 下之吸光值變化，可得知較長時間下抗氧化物質的抗氧化能力，實驗中之吸光值偵測以 1 為終點，當吸光值突破 1 之後即不再進行測量。

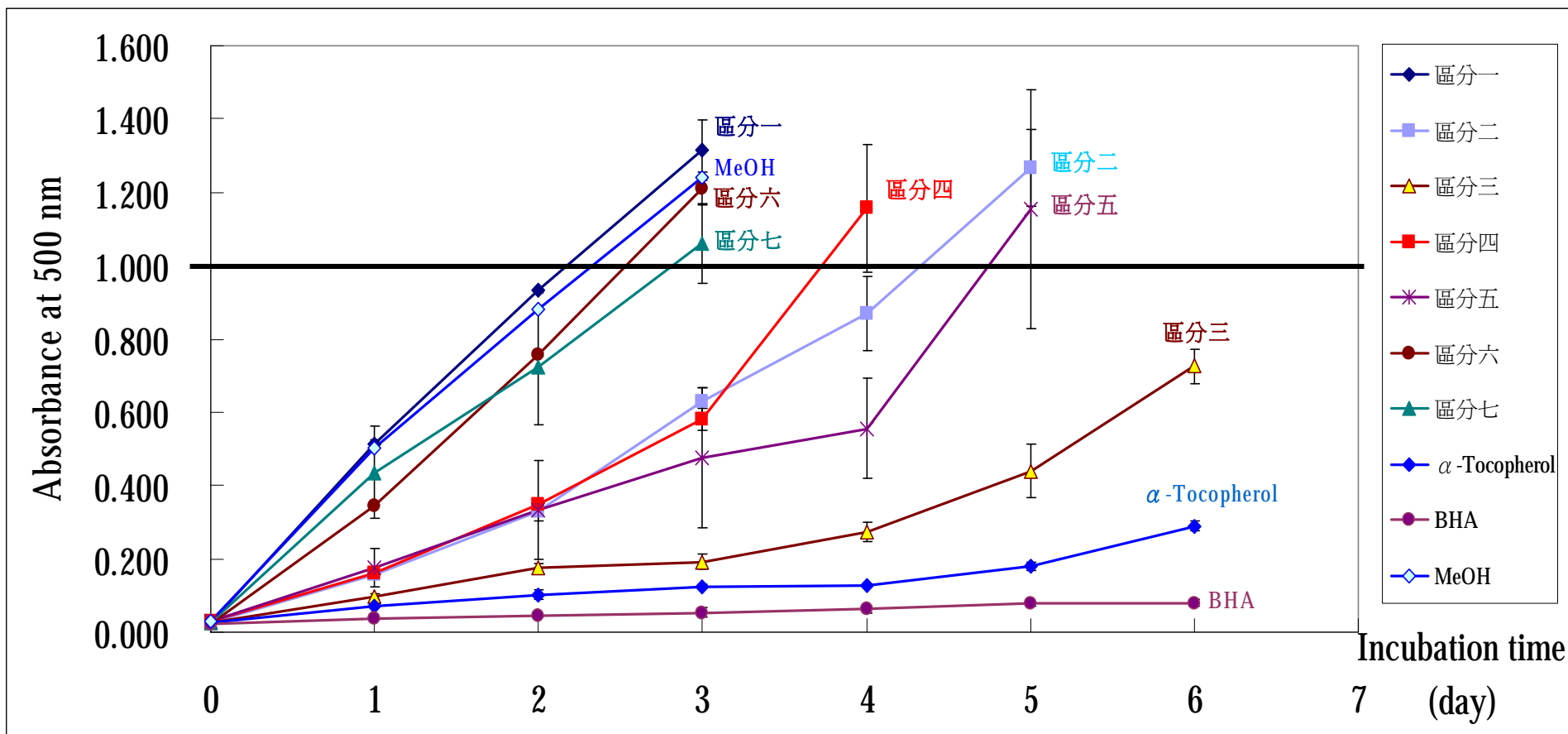
由圖三十一可得知，實驗開始後 24 小時，區分 1、6、7 及控制組 MeOH 已較其餘六組吸光值為高，72 小時後，此四組的吸光值即突破 1，代表此三組與控制組一樣，抗氧化力較弱。區分 4 也在第 4 天時吸光值突破 1，區分 2 及 5 則於第 5 天突破 1，明顯的可看出，區分 3 之抗氧化力較其餘各區分為佳。抗氧化能力強弱為區分 3 > 區分 2 = 5 > 區分 4 > 區分 1 = 6 = 7 = 控制組。



圖三十、五味子脫脂甲醇萃取物各區分之清除 DPPH 自由基能力。

Fig. 30 DPPH radical scavenging activities for eluted fractions from defatted methanol extracts of *S. chinensis* fruits.





圖三十一、利用硫氰酸鐵法檢測五味子脫脂甲醇萃取物各區分之抗氧化能力。

Fig. 31 Antioxidative activities of eluted fractions from defatted methanol extracts of *S. chinensis* fruits by ferric thiocyanate method.

而由分析實驗的結果得知五味子中 schisandrin B 分離條件後，為提升從五味子中所能萃取獲得的 schisandrin B 含量，因此從萃取部分再尋找最佳的萃取條件，以得到一系列完整的分離純化及量產製程，並也將不同溶劑萃取的部分進行總酚及總類黃酮的含量分析。

#### 5-2-4 五味子脫脂粉末不同溶劑萃取物及甲醇萃取物各區分之總酚含量 (total phenol contents)分析

利用 Folin-Ciocalteu 試劑於鹼性環境下會與酚類化合物結構的羥基反應，使 Folin-Ciocalteu 試劑由原本的黃色轉為藍色，於 750 nm 下吸光值漸增，可藉此特性測量樣品中的總酚含量。

實驗中先以五味子脫脂甲醇萃取物分出的 7 個區分進行實驗，由表十及表十一的結果可知，區分 3、4 及 5 為酚類化合物較多的區分，此三個區分的抗氧化力也較其它區分為強，不同溶劑萃取部分則以甲醇萃取及乙酸乙酯萃取所得的總酚含量較高。酚類化合物為植物中的主要抗氧化成分，防止脂質過氧化、單旋態氧的消除、自由基清除，皆有賴酚類化合物的作用 (Kalt *et al.*, 1999; Wang and Lin, 2000)。

#### 5-2-5 五味子脫脂粉末不同溶劑萃取物及甲醇萃取物各區分之總類黃酮 (total flavonoid contents)含量分析

利用顯色劑三氯化鋁 ( $\text{AlCl}_3$ )於鹼性環境下會與類黃酮作用，產生紅褐色錯合物，偵測其 510 nm 下之吸光值，以 quercetin 進行檢量線製作，藉以判斷類黃酮含量多寡。

實驗結果如表十及表十一所示，五味子脫脂甲醇萃取的各區分中也是區分 3、4、5 所含之類黃酮含量較多，而不同溶劑萃取部分則以乙酸乙酯萃取部分明顯較多，正丁醇次之，水萃部分明顯較少，甲醇與 80% 甲醇萃取則無顯著差異性。

表十、五味子脫脂甲醇萃取物各區分之產率、總酚與總類黃酮含量

Table 10 The yields, total phenol and flavonoid contents of solvent extracts and methanol extract fractions from *S. chinensis* fruits

Extracts	Yield (DW/g) <sup>1</sup>	Total phenol (mg/g) <sup>2</sup>	Total flavonoid (mg/g) <sup>3</sup>
Fraction 1	38.16	9.76±0.03 <sup>e</sup>	3.01±0.00 <sup>f</sup>
Fraction 2	1.35	50.71±0.51 <sup>d</sup>	33.11±0.03 <sup>d</sup>
Fraction 3	2.03	223.57±2.53 <sup>a</sup>	92.37±0.28 <sup>a</sup>
Fraction 4	1.25	107.62±0.87 <sup>c</sup>	58.30±0.07 <sup>c</sup>
Fraction 5	0.39	177.38±2.67 <sup>b</sup>	76.07±0.12 <sup>b</sup>
Fraction 6	3.80	43.10±0.17 <sup>d</sup>	15.87±0.12 <sup>e</sup>
Fraction 7	0.87	2.38±0.01 <sup>e</sup>	6.87±0.06 <sup>f</sup>

<sup>1</sup> Yield: dry weight /g.

<sup>2</sup> mg gallic acid equivalent/g sample weight.

<sup>3</sup> mg quercetin equivalent/g sample weight.

表十一、五味子脫脂粉末不同溶劑萃取之產率、總酚與總類黃酮含量

Table 11 The yields, total phenol and flavonoid contents of solvent extracts from *S. chinensis* fruits

Extracts <sup>1</sup>	Yield (DW/g) <sup>2</sup>	Total phenol (mg/g) <sup>3</sup>	Total flavonoid (mg/g) <sup>4</sup>
80%ME	0.31±0.01	35.14±0.29 <sup>c</sup>	12.84±0.03 <sup>cd</sup>
WE	0.33±0.03	33.05±0.10 <sup>c</sup>	9.88±0.03 <sup>e</sup>
ME	0.28±0.02	59.05±0.56 <sup>a</sup>	14.92±0.03 <sup>bc</sup>
EE	0.20±0.02	34.19±0.39 <sup>c</sup>	11.51±0.02 <sup>de</sup>
BE	0.05±0.02	34.00±0.27 <sup>c</sup>	16.84±0.05 <sup>b</sup>
EAE	0.02±0.00	49.81±0.89 <sup>b</sup>	22.47±0.09 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> 80%ME : 80% methanol extract, WE : water extract, ME : methanol extract, EE : ethanol extract, BE : 1-butanol extract, EAE : ethyl acetate extract.

<sup>2</sup> Yield: dry weight /g.

<sup>3</sup> mg gallic acid equivalent/g sample weight.

<sup>4</sup> mg quercetin equivalent/g sample weight.

Each value represents the mean ± SD of triplicate experiments.

### 5-3 Schisandrin B 之萃取最適條件探討

從 HPLC 分析的結果可得知五味子中 schisandrin B 的最佳分析條件，而接下來為了提升從五味子中所能萃取獲得的 schisandrin B 含量，因此再回到萃取部分重新開始尋找最佳的萃取溶劑、較合適的萃取溶劑比例、樣品與溶劑使用量的分配及最適宜的萃取時間，以得到一系列較完整的分離純化及量產製程。

將 100.15 g 乾燥五味子粉末經過篩、脫脂後得油脂部分重為 12.91 ±0.07 g，脫脂粉末乾燥後重 86.38±0.13 g。接續取約 2 g 脫脂粉末以水、甲醇、乙醇、正丁醇及乙酸乙酯，不同溶劑萃取，結果如表十二所示。雖然所萃得的重量上以水萃較多，但其中所萃得的 schisandrin B 含量則必須以 HPLC 定量之後才能進行判斷，經檢量計算與樣品重量回乘後所得的重量才為可能萃得之 schisandrin B 含量，由表十二可知，甲醇萃取所能萃得的量為最多 0.85±0.09 mg/g，其次為乙醇萃取可得 0.41±0.05 mg，因此樣品以甲醇萃取進行後續實驗，此結果與 Lenka 等人 (2009)所述相同，實驗再更進一步尋找較佳溶劑比例。

不同比例的甲醇萃取結果也是以含水比例較高者，所萃得重量較重，但以 HPLC 進行檢量後，得結果如表十三，80% 甲醇萃取所能獲得的量最多，可達 0.89±0.01 mg/g，純粹從 HPLC 積分面積上來看甲醇萃取所佔積分面積較大，但萃得的總重量卻較少，相比較後還是 80% 甲醇萃取所能萃得的 schisandrin B 總量較多，因此後續實驗將以 80% 甲醇進行。

不同溶劑用量的萃取結果如表十四所示，樣品與溶劑用量上只要大於樣品：溶劑 = 1：60 (w/v)即可獲得甲醇萃取物之產率達 32%，去除可能影響萃取重量的因素-水，所萃得的 schisandrin B 會與重量成正比關係，因此直接以所萃得的重量進行萃出量判斷，所以使用之

樣品 – 溶劑量比定為 1 : 60 (w/v)。

不同萃取時間，對於所萃得的重量來說影響不如溶劑種類及比例變化來的如此劇烈，而依所得到的趨勢來看，肯定的是萃取時間越長所能獲得的萃取物重量越重，相對於短時間的超音波振盪萃取，15~60 min 之間產率的變化都在 1% 範圍內，得到的結果較不具代表性。

從整體結果來看，在已將五味子進行脫脂的情況下，使用 80% 的甲醇萃取，且樣品與溶劑量使用的比例為 1 : 60 (w/v) 時，可萃得最大量的 schisandrin B。Halstead 等人 (2007) 之實驗提及，就所能萃得最多的 schisandrin B 萃取條件來說，在水、50% 甲醇、甲醇、乙醇與正己烷，五種不同溶劑萃取中以甲醇萃取並配合 4 小時的索氏萃取 (soxhlet extraction) 所能萃出的含量最多，相較於 30 分鐘超音波振盪萃取 (sonication) 產量上多達 5% 之差距，且索氏萃取法對於五味子中之木酚素成份皆能有效萃出，惟索氏萃取所需時間較超音波振盪萃取時間多達 8 倍。

表十二、五味子脫脂粉末不同溶劑萃取物之產率

Table 12 Yields of extracts from defatted powder of *S. chinensis* fruits with different solvents

Extracts <sup>1</sup>	Yield (mg/ g sample)	Sch B content (mg / g extracts) <sup>2</sup>	Calculated Sch B (mg/g sample) <sup>3</sup>
WE	327.63±28.87 (32.71±2.89%) <sup>a</sup>	< 1	< 0.33 <sup>b</sup>
ME	281.62±31.09 (28.12±3.12%) <sup>b</sup>	3.01±0.10	0.85±0.09 <sup>a</sup>
EE	197.08±21.98 (19.69±2.20%) <sup>c</sup>	2.10±0.18	0.41±0.05 <sup>b</sup>
BE	50.78±19.98 ( 5.07±2.00%) <sup>d</sup>	2.99±0.34	0.15±0.06 <sup>c</sup>
EAE	15.58± 1.90 ( 1.56±0.19%) <sup>d</sup>	9.98±0.44	0.16±0.02 <sup>c</sup>

<sup>1</sup>WE : water extract, ME : methanol extract, EE : ethanol extract, BE : 1-butanol extract, EAE : ethyl acetate extract.

With solvent volume 1 : 20 (w/v), extract time 30 minutes. Sample weight: 2 g.

<sup>2</sup>Schisandrin B content was detected by HPLC per 50 mg extracts.

<sup>3</sup>Schisandrin B content was calculated by standard curve of HPLC and multiply with extracted sample weight.

Each value represents the mean ± SD of triplicate experiments.

表十三、五味子脫脂粉末不同比例甲醇萃取物之產率

Table 13 Yields of extracts from defatted powder of *S. chinensis* fruits with different percentage methanol

Extracts <sup>1</sup>	Yield (mg/ g sample)	Sch B content (mg / g extracts) <sup>2</sup>	Calculated Sch B (mg/g sample) <sup>3</sup>
20%ME	392.09± 6.62 (39.21±0.66%) <sup>a</sup>	< 1	< 0.39 <sup>c</sup>
40%ME	387.98± 7.36 (38.80±0.73%) <sup>a</sup>	< 1	< 0.39 <sup>c</sup>
60%ME	355.59±15.21 (35.56±1.51%) <sup>b</sup>	< 1	< 0.36 <sup>c</sup>
80%ME	311.29± 4.99 (31.13±0.39%) <sup>c</sup>	2.86±0.07	0.89±0.01 <sup>a</sup>
ME	253.69±11.00 (25.37±1.09%) <sup>d</sup>	3.15±0.01	0.80±0.03 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>20%ME : 20% methanol extract, 40%ME : 40% methanol extract, 60%ME : 60% methanol extract, 80%ME : 80% methanol extract, ME : 99.99% methanol extract. With solvent volume 1 : 20 (w/v), extract time 30 minutes. Sample weight: 2 g.

<sup>2</sup>Schisandrin B content was detected by HPLC per 50 mg extracts.

<sup>3</sup>Schisandrin B content was calculated by standard curve of HPLC and multiply with extracted sample weight.

Each value represents the mean ± SD of triplicate experiments.



表十四、五味子脫脂粉末不同溶劑用量之 80% 甲醇萃取產率

Table 14 Yields of 80% methanol extract with different solvent volume from *S. chinensis* fruits

Extracts <sup>*</sup>	Yield (%)	Weight (mg/g sample)
1 : 10	27.97±0.72 <sup>d</sup>	280.63±7.73
1 : 20	30.24±0.46 <sup>c</sup>	303.04±4.60
1 : 40	31.30±0.73 <sup>bc</sup>	314.09±7.26
1 : 60	32.78±0.24 <sup>ab</sup>	328.73±2.17
1 : 80	32.45±0.16 <sup>a</sup>	324.92±1.77

\* 1 : 10, 1:20, 1:40, 1:60, 1:80 – 80% methanol extract with solvent volume 1 : 10, 1:20, 1:40, 1:60 and 1:80 (w/v), extract time 30 minutes. Sample weight: 2 g. Each value represents the mean ± SD of triplicate experiments.

表十五、五味子脫脂粉末不同萃取時間之 80% 甲醇萃取產率

Table 15 Yields of 80% methanol extract with different extract times from *S. chinensis* fruits

Extracts <sup>*</sup>	Yield (%)	Weight (mg/g sample)
15 min	33.28±2.08 <sup>a</sup>	333.27±20.92
30 min	32.10±0.03 <sup>a</sup>	321.62± 0.10
45 min	32.57±0.65 <sup>a</sup>	326.29± 6.25
60 min	32.75±0.49 <sup>a</sup>	328.14± 4.84

\* 15, 30, 45, 60min : extract time 15, 30, 45 and 60 minutes, extract with 80% methanol, solvent volume 1 : 60 (w/v). Sample weight: 2 g. Each value represents the mean ± SD of triplicate experiments.

## 5-4 五味子萃取物及純化木酚素對 Hep G2 細胞之生理活性探討

不論食品或藥品，首重安全性，因此美國癌症研究中心 (National Cancer Institute) 將體外細胞毒性訂為抗癌藥物篩選的第一步，而本實驗藉由測定活體細胞粒線體中才具有的琥珀酸脫氫酶以判定純化物質之安全性。

### 5-4-1 細胞存活率測試 (MTT assay)

活細胞體中具琥珀酸脫氫酶 (succinate dehydrogenase)，可將黃色水溶性之 MTT 的 tetrazolium 環進行開環，產生非水溶性的 formazan，再以 DMSO 將其溶解後得紫色溶液，測其 570 nm 之吸光值，以吸光值計算其存活率。

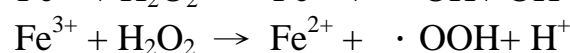
Hep G2 人類肝癌細胞株分別以  $\gamma$ -sch(4)、Sch B(5)、gomisin L<sub>1</sub>(6) 進行毒殺測試，其結果如圖三十二所示，可從各純化物質所需的 IC<sub>50</sub> 值為 202.08±0.18、105.85±0.10 及 237.23±0.07  $\mu$ M 可知，以毒殺肝癌細胞效果來說，雖然純化物質  $\gamma$ -sch 及 Sch B 互為立體異構物但 Sch B 的毒殺能力卻明顯為  $\gamma$ -sch 的兩倍。

在同樣的細胞濃度  $0.8 \times 10^4$  cell/ml 下，以 BNL CL.2 小鼠正常肝細胞株進行實驗，使用  $\gamma$ -sch 及 sch B 進行存活率測試，如圖三十三所示，並一樣計算其 50% 存活率，分別為 430.28±0.03 及 335.20±0.03  $\mu$ M，可見  $\gamma$ -sch 及 Sch B，對於肝癌細胞可能亦具有誘導凋亡之作用，而對於正常的肝細胞毒性則較弱。據 Hwang 等人 (2011) 及 Kim 等人 (2010) 兩篇研究結果表示，五味子萃取物具有誘導人類結腸癌細胞 HCT-116 及人類胸腺癌細胞 T47D 凋亡之功效。

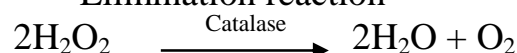
#### 5-4-2 細胞氧化傷害保護作用探討

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 本身雖比其他的自由基穩定，但對細胞的傷害較大，因其在水相或油相系統中均可輕易的進行擴散而通過細胞膜，和胞內元素鐵或銅發生 fenton reaction，因而產生羥基自由基 (·OH)，與胞內的各種有機物質進行反應，造成胞內脂質過氧化而破壞細胞膜 (Stadtman and Oliver, 1991)。

##### Fenton reaction

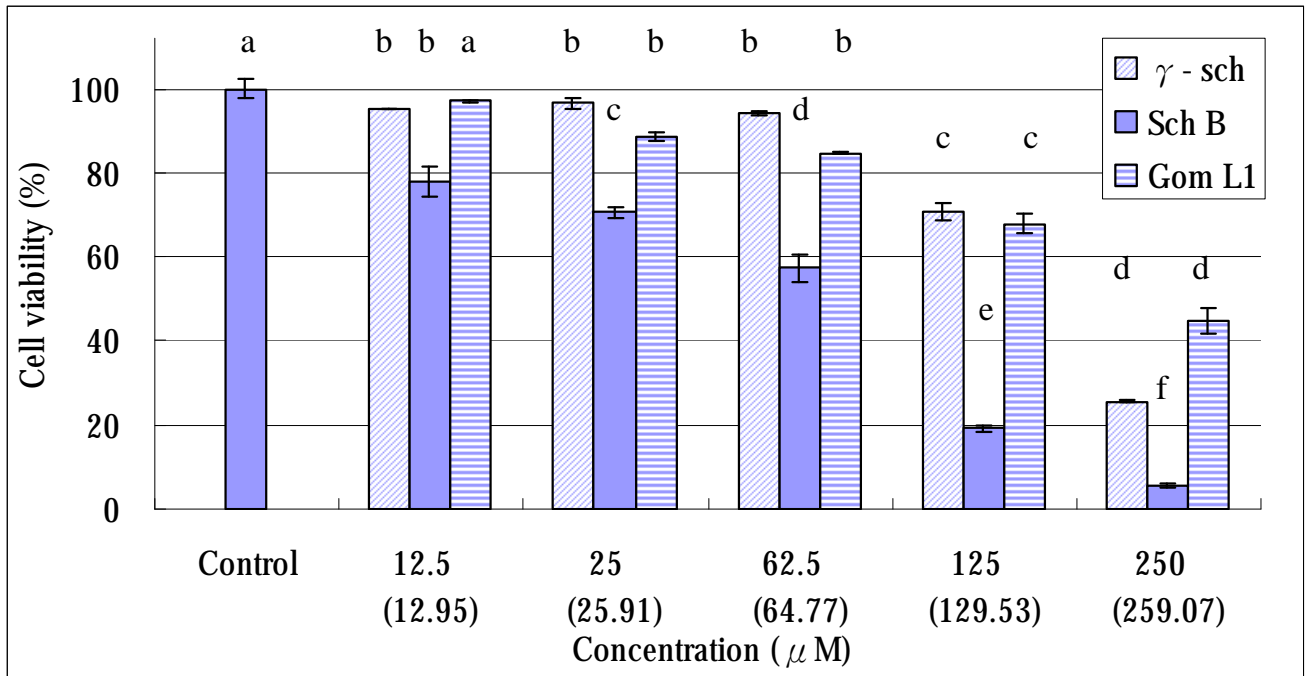


##### Elimination reaction



細胞氧化傷害保護試驗中樣品之使用濃度為 50 μg/ml，正控制組 Trolox 亦使用相同濃度 50 μg/ml (200 μM)，結果如圖三十四所示，γ-sch 及 Trolox 皆具有氧化傷害保護能力，與 control 組之間無顯著差異，而 sch B 與 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 組所造成之細胞傷害無顯著差異，表示 sch B 較不具保護能力。可從圖三十五中，H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 傷害後之細胞與正常細胞之型態，明顯看出受傷害後之細胞邊界較不明顯，代表其細胞膜已受氧化傷害損傷。研究指出 Sch B 對 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 引起的大鼠肝細胞脂質過氧化損傷具保護作用，且可減少 fenton reaction 所造成的傷害 (王，2005)，然而 Chiu 等人(2011)之實驗發現，加入 Sch B 培養 0 至 6 小時 GSH 及抗氧化酵素蛋白表現量皆隨著時間增加，但超過 18 小時後則皆急遽下降，此次實驗所使用之加藥處理時間為 24 小時，可能是造成所測得之 Sch B 抗氧化能力較弱原因。

與 ABTS 自由基清除力結果對照，為釐清 γ-sch 之保護能力，是否僅來自化學性抗氧化，因此取相同樣品濃度 50 μg/ml 再進行胞內抗氧化酵素活性測定，以確定其保護能力可能來源。

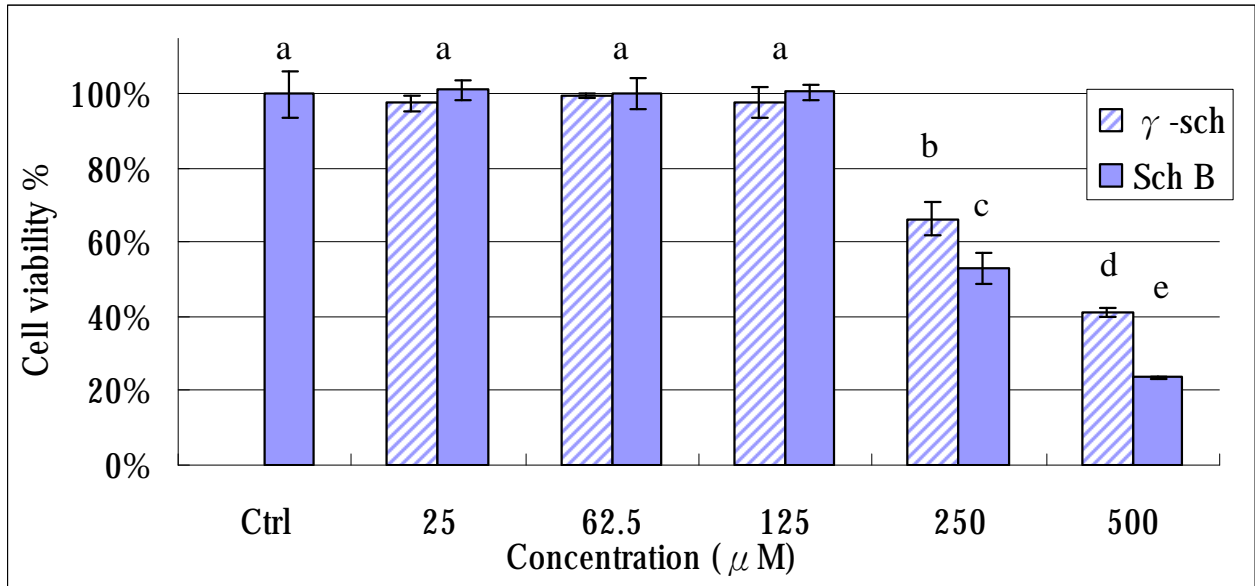


圖三十二、五味子脫脂甲醇萃取物區分 6 純化物質  $\gamma$ -schisandrin、schisandrin B 及 gomisin L1 對 Hep G2 細胞存活率之影響。

Fig. 32 Effect of  $\gamma$ -schisandrin, schisandrin B and gomisin L1 from fraction 6 of defatted methanol extracts of *S. chinensis* fruits in Hep G2 cell viability.

$\gamma$ -Sch :  $\gamma$ -schisandrin, Sch B: schisandrin B. Gom L1 : gomisin L1.

Each value represents the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

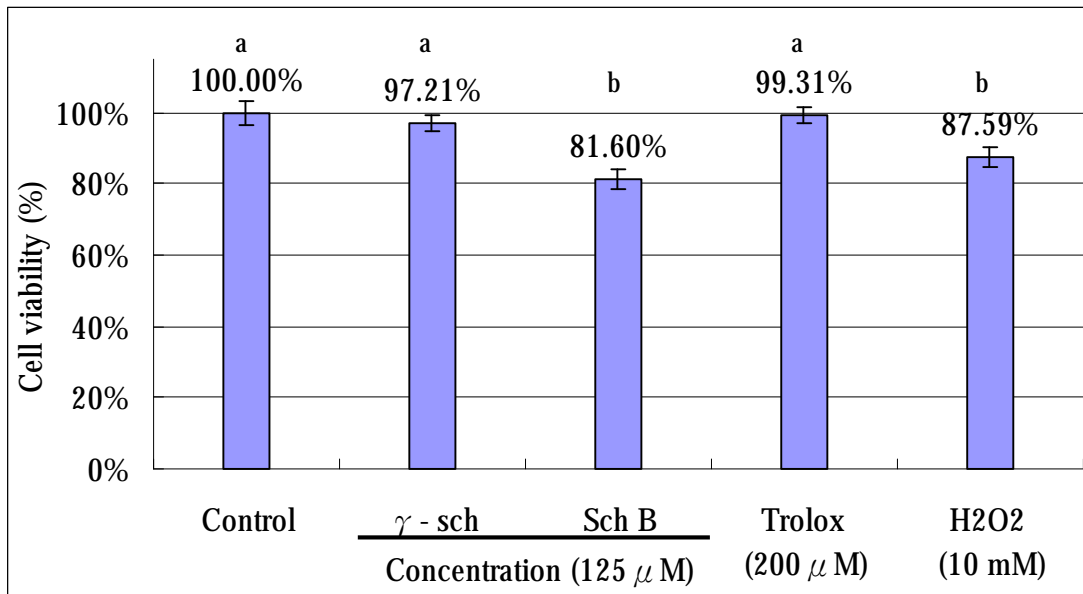


圖三十三、五味子脫脂甲醇萃取物區分 6 純化物質  $\gamma$ -schisandrin 及 schisandrin B 對 BNL CL.2 細胞存活率之影響。

Fig. 33 Effect of  $\gamma$ -schisandrin and schisandrin B from fraction 6 of defatted methanol extracts of *S. chinensis* fruits in BNL CL.2 cell viability.

$\gamma$ -Sch :  $\gamma$ -schisandrin, Sch B : schisandrin B.

Each value represents the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

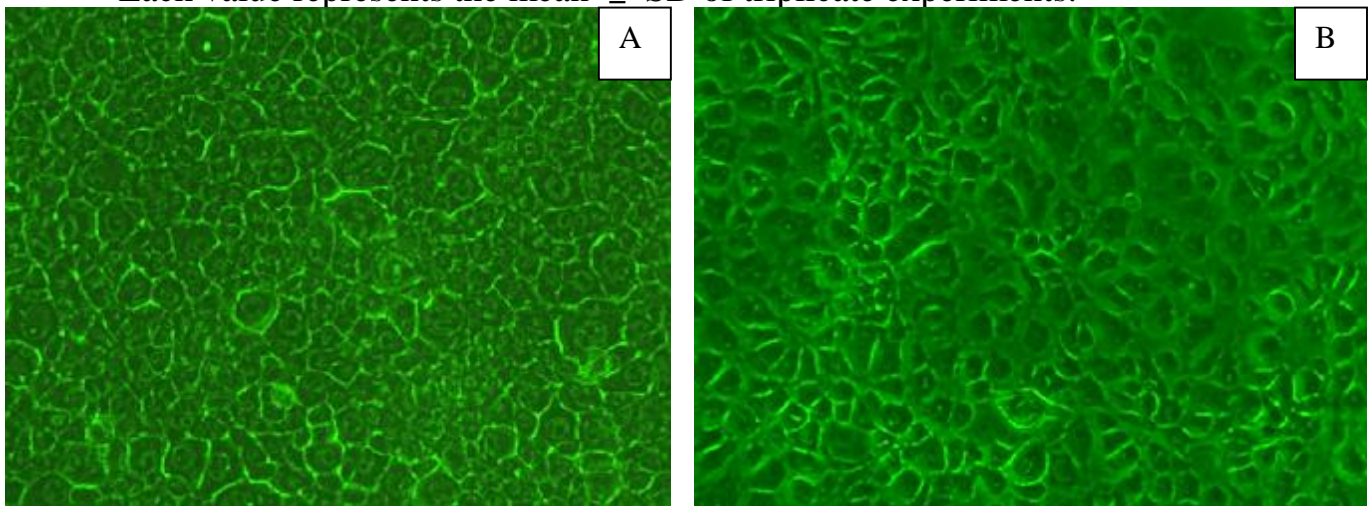


圖三十四、五味子脫脂甲醇萃取物區分 6 純化物質  $\gamma$ -schisandrin 及 schisandrin B 對 BNL CL.2 氧化傷害之保護作用。

Fig. 34 Protection effect of  $\gamma$ -schisandrin and schisandrin B from fraction 6 of defatted methanol extracts of *S. chinensis* fruits against oxidative stress in BNL CL.2 cell line.

$\gamma$ -sch :  $\gamma$ -schisandrin, Sch B: schisandrin B.

Each value represents the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.



圖三十五、正常 BNL CL.2 細胞株(A)與受到 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 傷害(B)後之型態。

Fig. 35 Morphology of normal BNL CL.2 (A) and pretreated with 10 mM hydrogen peroxide (B) (40x).

### 5-4-3 胞內抗氧化酵素試驗

除了純化物質之外，實驗也併入五味子粉末 80% 甲醇萃取物，一方面測試 schisandrin B 是否具提升胞內抗氧化酵素活性之能力，另一方面也觀察五味子 80% 甲醇萃取物在粗萃的情況下是否即具有提升抗氧化酵素活性的能力，並同時測試在不對細胞存活率造成影響的情況下，粗萃物所能使用的最大濃度及所能提升酵素活性之程度，但首步還是需先對五味子粉末 80% 甲醇萃取物進行毒性測試。

#### 5-4-3-1 超氧陰離子歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD) 活性測定

SOD 活性的測定為利用 pyrogallol 在 pH 大於 7.0 之環境下會發生自氧化，產生超氧陰離子自由基，同時以一定速率生成紅色之中間產物，而 SOD 可將超氧陰離子自由基歧化為氧及過氧化氫，降低 pyrogallol 的自氧化速率，依照抑制自氧化的程度可換算出 SOD 的活性，表示方法為每單位蛋白質所含的酵素量 (U / mg protein)。

由圖三十六可得知，五味子脫脂粉末 80% 甲醇萃取物於 0.8 mg/ml 的濃度下已開始對 BNL CL.2 細胞有較顯著的毒性，但對細胞造成的傷害尚未非常劇烈，且為所能使用的粗萃物最高濃度，因此後續實驗使用的濃度即以 0.8 mg/ml 進行，而不再使用更高的濃度。胞內抗氧化酵素實驗結果如圖三十七所示， $\gamma$ -schisandrin 與 schisandrin B 皆能提升 SOD 的活性，也有顯著的差異性，但效果不如 200  $\mu$ M 的 Trolox 如此明顯，而 0.8 mg/ml 的五味子脫脂粉末 80% 甲醇萃取物雖然也看似有造成 SOD 的提升，此實驗結果與使用小鼠進行的動物實驗結果也相符合 (Chang *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2007)，schisandrin B 添加確有提升 SOD 之活性。

#### 5-4-3-2 觸酶 (catalase, CAT)活性測定

在 catalase 存在的情況下  $H_2O_2$  於 240 nm 的吸光值會逐漸減少由單位時間內吸光值的改變量，可推算測得 catalase 的活性。酵素活性單位以每分鐘消耗的  $\mu\text{mol}$  過氧化氫表示 (Aebi, 1983)。

此部分如圖三十八，加入  $50\ \mu\text{g/ml}$  ( $125\ \mu\text{M}$ )的  $\gamma$ -Sch B 或 Sch B 培養 24 小時後之 BNL CL.2 細胞與控制組相比較下，catalase 活性明顯增加，而  $0.8\ \text{mg/ml}$  的五味子脫脂粉末 80% 甲醇萃取物也明顯提升 CAT 活性，然而  $200\ \mu\text{M}$  的 Trolox 卻未提升 CAT 的活性。

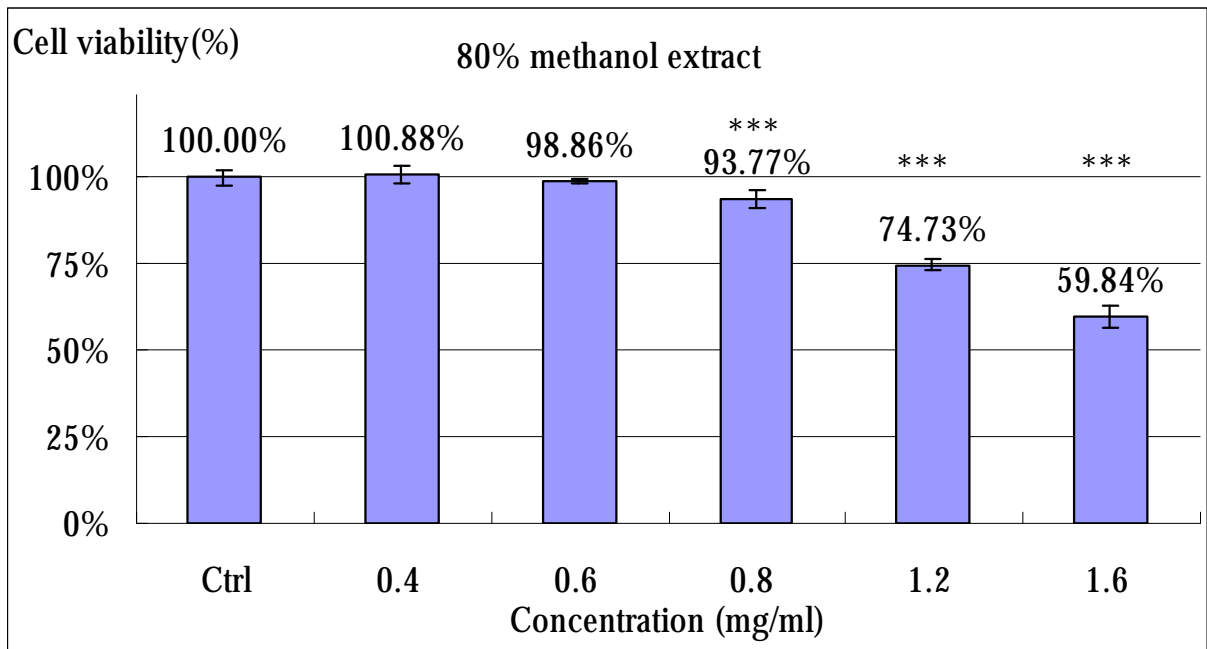
#### 5-4-3-3 穀胱甘肽轉移酶 (Glutathione-S-transferase, GST)活性測定

該反應為透過觀察 CDNB 與還原態的 GSH 結合，而於 340 nm 的吸光值漸增。於  $25^\circ\text{C}$  下，每單位酵素可與  $10.0\ \text{nmol}$  的 CDNB 結合，以其結合速率計算得知 glutathione-S-transferase 活性 (Mannervik, 1985)。

實驗結果上雖然都沒有顯著性的差異，然而  $\gamma$ -sch 對於 GST 活性有著提升的趨勢，五味子脫脂粉末 80% 甲醇萃取物也有上升效果，Sch B 則似乎沒有提升也沒有明顯的抑制，Trolox 卻有造成 GST 活性下降的情形，如圖三十九。Ip 等人之兩篇研究皆顯示，Sch B 具提升 GST 及 GR 活性之能力，可增加肝臟中 GSH 含量，提升整個抗氧化系統功能 (Ip and Ko, 1996)，然而實驗結果卻與文獻不盡相同，或許與 Chiu 等人 (2011) 之實驗發現，當加入 Sch B 且超過 18 小時培養後會造成 GSH 及各種蛋白之表現量皆急遽下降，甚至低於原控制組有關。

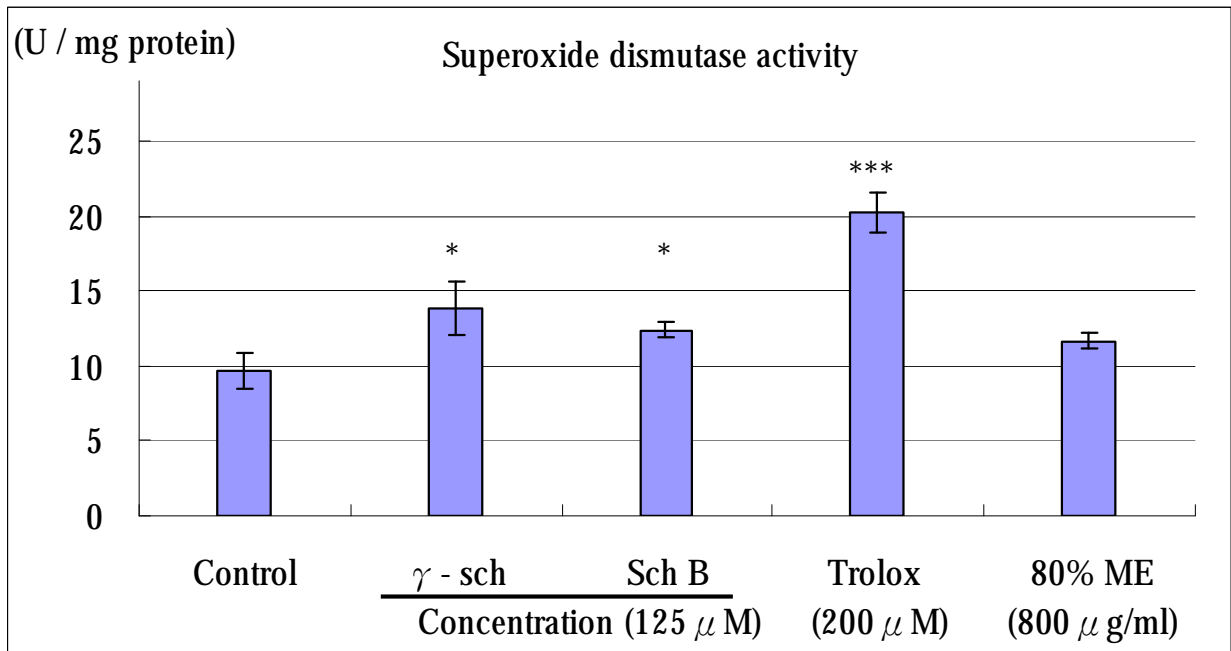
由三種胞內抗氧化酵素試驗可看出， $\gamma$ -schisandrin 及 schisandrin B 對於此三種抗氧化酵素皆有提升活性的作用或趨勢，五味子脫脂粉末 80% 甲醇萃取物則於添加濃度  $0.8\ \text{mg/ml}$  時可提高酵素活性，Trolox 則僅對 SOD 有顯著提升活性效果，CAT 及 GST 則有抑制的現象。





圖三十六、五味子脫脂粉末 80% 甲醇萃取物對 BNL CL.2 細胞存活率之影響。

Fig. 36 Effect of 80% methanol extracts from defatted powder of *S. chinensis* fruits in BNL CL.2 cell viability. Each value represents the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

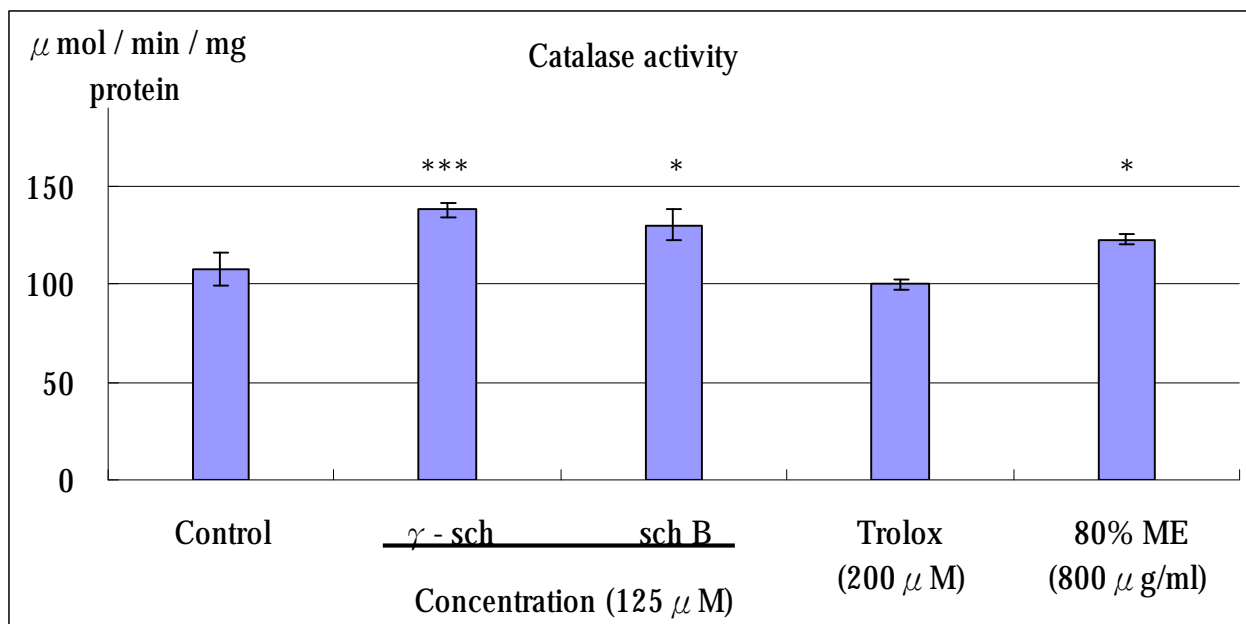


圖三十七、 $\gamma$ -schisandrin、schisandrin B、Trolox 及五味子脫脂粉末 80% 甲醇萃取物對 BNL CL.2 細胞株之超氧陰離子歧化酶活性影響。

Fig. 37 Effect of  $\gamma$ -schisandrin, schisandrin B, Trolox and 80% methanol extracts from defatted powder of *S. chinensis* fruits on superoxide dismutase activity in BNL CL.2 cell.

$\gamma$ -sch:  $\gamma$ -schisandrin, Sch B: schisandrin B, 80% ME: 80% methanol extract from defatted powder of *S. chinensis* fruits.

Each value represents the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

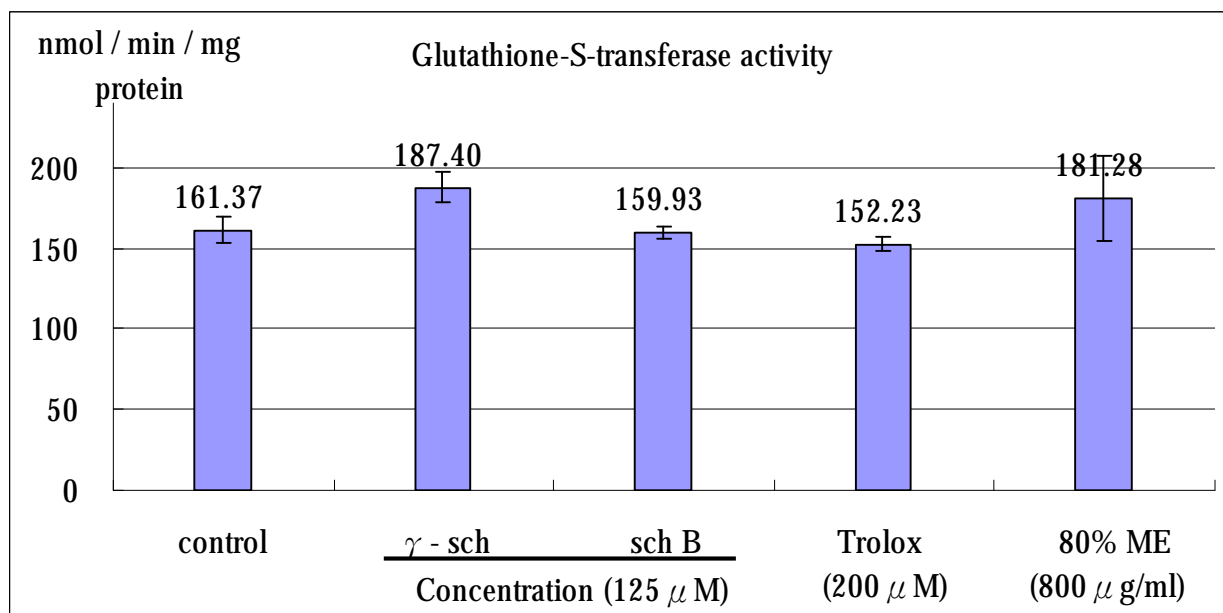


圖三十八、 $\gamma$ -schisandrin、schisandrin B、Trolox 及五味子脫脂粉末 80% 甲醇萃取物對 BNL CL.2 細胞株之觸酶活性影響。

Fig. 38 Effect of  $\gamma$ -schisandrin, schisandrin B, Trolox and 80% methanol extracts from defatted powder of *S. chinensis* fruits on catalase activity in BNL CL.2 cell.

$\gamma$ -sch :  $\gamma$ -schisandrin, Sch B : schisandrin B, 80% ME : 80% methanol extract from defatted powder of *S. chinensis* fruits.

Each value represents the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.



圖三十九、 $\gamma$ -schisandrin、schisandrin B、Trolox 及五味子脫脂粉末 80% 甲醇萃取物對 BNL CL.2 細胞株之穀胱甘肽轉移酶活性之影響。

Fig. 39 Effect of  $\gamma$ -schisandrin, schisandrin B, Trolox and 80% methanol extracts from defatted powder of *S. chinensis* fruits on glutathione-S-transferase activity in BNL CL.2 cell.

$\gamma$ -sch :  $\gamma$ -schisandrin, Sch B : schisandrin B, 80% ME : 80% methanol extract from defatted powder of *S. chinensis* fruits.

Each value represents the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

## 第六章 結論

1. 研究結果指出 schisandrin B 及其異構物( $\gamma$ -schisandrin)難以直接以 Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN 等液相層析管柱進行分離，較佳的分離方式為直接利用製備型 HPLC 進行分離及純化。
2. 脫脂後之五味子粉末在經 80% 甲醇萃取且樣品與溶劑量使用比例為 1:60 (w/v)時可獲得最大產率之 schisandrin B，以其它溶劑或比例進行萃取所獲得之 schisandrin B 總含量皆較低。
3. 木酚素化合物  $\gamma$ -schisandrin 及 schisandrin B 對於 Hep G2 肝癌細胞生長抑制 IC<sub>50</sub> 值分別為 202.08±0.18 與 105.85±0.10  $\mu$ M，而對於正常細胞株 BNL CL.2 則為 430.28±0.03 及 335.2±0.03  $\mu$ M，約為肝癌細胞的兩倍多。
4.  $\gamma$ -schisandrin 可消除過氧化氫造成的氧化傷害，且  $\gamma$ -schisandrin、schisandrin B 及五味子脫脂粉末 80% 甲醇萃取物皆有提升超氧陰離子歧化酶、觸酶及穀胱甘肽轉移酶活性的潛力。
5. 脫脂五味子甲醇萃取物中主要的抗氧化能力區分 3、4 及 5 之抗氧化能力皆源自於酚類化合物，其成分組成有待進一步分析。
6. 未來將進一步探討 schisandrin B 誘導肝癌細胞株凋亡之機制，以明確其誘發凋亡之原因，研發一能抗氧化、保肝又具備抗癌能力的機能性保健食品。

## 第七章 參考文獻

- 八木國一，五島雄一郎。過酸化脂質と疾患。1981。
- 王魯石，杜華，王新兵。五味子多醣的提取及含量測定。陝西中醫。2003, 24(3), 267-268.
- 王蕾，龔慕辛，孔慶利。五味子及有效成分抗氧化作用的實驗研究概況。 *Chinese Journal of the Practical Chinese with Modern Medicine*。2005, 18(17), 920-921.
- 中藥大辭典。江蘇新醫學院編。上海科學技術出版社。2003。
- 高馥君，李敏雄。食品保存與抗氧化劑。食品工業。1998, 30(12):17-24。
- 郁凱衡。酚類抗氧化劑(上)－合成類。食品資訊。1999, 157:34-38。
- 許利嘉，劉海濤，彭勇，肖培根。五味子科藥用植物親緣學初探。植物分類學報。2008, 46(5):692-723。
- 陳榮華，吳向陽，仰榴青，鄒艷敏，張蓉仙。五味子醇提殘渣中粗多醣的體外抗氧化活性研究。時珍國醫國藥。2009, 20(6):392-394。
- 遠藤 剛，淺田浩二。活性酸素在生物中之生存、消去、作用。食品工業。1992。5月30日，20-25。
- 滿田久輝，安本教傳，岩見公和。抗氧化成分對亞麻油酸之自氧化的影響。營養與糧食。1967, 19, 210-214。
- 鄭雅今，古國隆。質譜在植物防禦素研究上之應用。*CHEMISTRY*. 2007, 65(2):157-167。
- 蘇正德，陳雅瑛。省產稻米外殼抗氧化性之研究調查。東海學報。1991, 32, 719-730。
- 蘇正德，蔡文騰，張基煌，蘇女淳。茶湯與茶渣兒茶酚含量及抗氧化性之調查研究。食品科學。1991, 18, 234-248。
- Abuja, P.M. and Albertini, R., 2001. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin. Chim. Acta*. 306:1-17.

- Aebi, HU., 1983. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.* 105:121-126.
- An, RB., Oh, SH., Jeong, GS. and Kim, YC., 2006. Gomisin J with protective effect against t-BHP-induced oxidative damage in HT22 cells from *Schisandra chinensis*. *Natural Product Sciences.* 12(3):134-137.
- Anguelova, T. and Warthsen, J., 2000. Degradation of lycopene,  $\alpha$ -carotene, and  $\beta$ -carotene during lipid peroxidation. *J. Food Sci.* 65:71-75.
- Aruoma, O.I., 1994. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chem.* 72:145-171.
- Aruoma, O.I., 1999. Antioxidant actions of plant foods: use of oxidative DNA damage as a tool for studying antioxidant efficacy. *Free Radic. Res.* 30:419-427.
- Bernfeld, P., 1955. Amylases, alpha and beta. *Methods in Enzymology.* 1:149–158.
- Berry, M.F., 1994. A radical departure. *Emerge.* 83-86.
- Beyer, W.F.Jr. and Fridovich, I., 1987. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Anal Biochem.* 161(2):559-566.
- Beyer, R.E., 1994. The role of ascorbate in antioxidant protection of biomembranes: Interaction with vitamin E and coenzyme Q. *J Bioenerg Biomembr.* 26(4):349-358.
- Bors, W. and Michel, C., 1999. Antioxidant capacity of flavonols and gallate esters: pulse radiolysis studies. *Free Radic. Biol. Med.* 27:1413–1426.
- Branen, A.C., 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole. and butylated hydroxytoluene. *J. Am. Oil Chem.* 5:53-59.

- Burton, G.W., 1994. Vitamin E: molecular and biological function. *Pro. Nutr. Soc.* 53:251-262.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, Mei and Corke H., 2003. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, 74:2157-2184.
- Cantrell, A., McGarvey, D.J., Truscott, T.G., Rancan, F. and Bohm, F., 2003. Singlet oxygen quenching by dietary carotenoids in a model membrane environment. *Arch. Biochem. Biophys.* 412:47-54.
- Chang, C.T., Hsu, C.K., Chou, S.T., Chen, Y.C., Huang, F.S. and Chung, Y.C., 2009. Effect of fermentation time on the antioxidant activities of tempeh prepared from fermented soybean using *Rhizopus oligosporus*. *International Journal of Food Science and Technology*. 44:799-806.
- Chang, CY., Chen, YL., Yang, SC., Huang, GC., Tsi, D., Huang, CC., Chen JR. and Li JS., 2009. Effect of schisandrin B and sesamin mixture on CCl<sub>4</sub>-induced hepatic oxidative stress in rats. *Phytother Res.* 23:251-256.
- Chang, H. and But, P.P., 1996. Pharmacology and Applications of Chinese Materia Medica. Vol 1. Hong Kong:World Scientific. 199-209.
- Chen, DF., Zhang, SX., Xie, L., Xie, JX., Chen, K., Kashiwada, Y., Zhou, BN., Wang, P., Cosentino, L.M. and Lee, KH., 1997. Anti-AIDS Agents-XXVI. Structure-Activity Correlations of Gomisin-G-Related Anti-HIV Lignans From *Kadusura* interior and of Related Synthetic Analogues. *Bioorganic & Medical Chemistry*. 5(8):1715-1723.
- Chen, WW., He, RR., Li, YF., Li, SB., Tsoi, B. and Kurihara, H., 2011. Pharmacological studies on the anxiolytic effect of standardized



- Schisandra lignans extract on restraint-stressed mice.  
*Phytomedicine.*
- Chiu, PY., Chen, N., Leong, PK., Leung, HY. and Ko, KM., 2011.  
Schisadrin B elicits a glutathione antioxidant response and protects against apoptosis via the redox-sensitive ERK/Nrf2 pathway in H9c2 cells. *Mol Cel Biochem.* 350:237-250.
- Claudine, M., Augustin, S., Christine, M., Christian, R. and Liliana, J., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition.* 79(5):727-747.
- Cohen, G., Dembiec, D. and Marcus, J. 1970. Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Anal. Biochem.* 34:30-38.
- Cook, N.C. and Samman, S., 1996. Flavonoids: Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J. Nutr. Biochem.* 7:66-76.
- Crane, F.L., 2001. Biochemical functions of coenzyme Q10. *J. Am. Coll. Nutr.* 20:591-598.
- Crush, K.G., 1970. Carnosine and related substances in animal tissues. *Comp. Biochem. Physiol.* 34:413-419.
- Donnelly, J.K., McLellan, K.M., Walker, J.L. and Robinson, D.S., 1989. Superoxide dismutase in foods: a review. *Food Chemistry* 33:243-270.
- Ernster, L. and Forsmark-Andree, P., 1993. Ubiquinol: an endogenous antioxidant in aerobic organisms. *Clin Invest.* 71:60-65.
- Ernster, L. and Dallner, G., 1995. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochem Biophys Acta.* 127:195-204.
- Fang, YZ., Yang, S. and Wu, GY., 2002. Free radicals, Antioxidants, and Nutrition. *Nutrition.* 18(10):872-879.

- Fang, Y.Z., 2002. Free radicals and nutrition. Theory and application of free radical biology. Beijing: Scientific Press, 647.
- Fong, WF., Wan, CK., Zhu, GY., Chattopadhyay, A., Dey, S., Zhao, Z. and Shen, XL., 2007. Schisandrol A from *Schisandra chinensis* reverses P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by affecting Pgp-substrate complexes. *Planta Medica*. 73(3):212-220.
- Fridovich, I., 1995. Superoxide radical and superoxide dismutase. *Annu. Rev. Biochem.* 64:97-112.
- Gnabre, J., Unlue, I., Chang, TC., Lisseck, P., Boume, B., Scolnik, R., Jacobsen, N.E., Bates, R. and Huang, R.C., 2010. Isolation of lignans from *Schisandra chinensis* with anti-proliferative activity in human colorectal carcinoma: Structure-activity relationships. *Journal of Chromatography B*. 878:2693-2700.
- Gutman, J. and Schettini, S., 2000. Glutathione (GSH): your body's most powerful healing agent. *Health Books*.
- Gutteridge, JMC., 1993. Free radicals in disease process: A complication of cause and consequence. *Free Radical Research Communications*. 19:141-158.
- Griffiths, HR. and Lunec, J., 2001. Ascorbic acid in the 21st century: more than a simple antioxidant. *Environ Toxicol Pharmacol*. 10:173-182.
- Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249:7130-7139.
- Halliwell, B. and Gutteridge, JMC., 1989. Free Radicals in Biology and Medicine. 2<sup>nd</sup> Edition. Clarendon Press, London.
- Halliwell, B., 1992. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.* 59:1609-1623.

- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., 1994. In "Antioxidants in nutrition, health and disease." 90-110
- Halliwell, B., Murcia, M.A., Chirico, S. and Aruoma, O.I., 1995. Free radicals and antioxidants in food and *in vivo*: What they do and how they work. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 35:7-20.
- Halstead, C.W., Lee, S., Khoo, C.S., Hennell, J.R. and Bensoussan, A., 2007. Validation of a method for the simultaneous determination of four schisandra lignans in the raw herb and commercial dried aqueous extracts of *Schisandra chinensis* (Wu Wei Zi) by RP-LC with DAD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 45:30-37.
- Halvorson, H., 1966.  $\alpha$ -Glucosidase from yeast. *Methods in Enzymology.* 8:559-562.
- Hancke, J.L., Burgos, R.A. and Ahumada, F., 1999. *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. *Fitoterapia* 70:451-471.
- Hancke, J.L., Burgos, R.A., Wikman, G., Ewertz, E. and Ahumada, F., 1994. *Schizandra chinensis*, a potential phytoergogenic for recovery of sport horses. *Fitoterapia.* 65:113-118.
- Harman, D., 1972. "The biologic clock: the mitochondria?" *J Am Geriatr Soc* 20(4):145-147.
- Hasenah, A., Houghton, P.J. and Soumyanath, A., 2006. Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *Journal of Ethnopharmacology.* 107:449-455.
- Hikino, H., and Kiso, Y., 1988. Natural Products for Liver Disease. *Economic and Medicinal Plant Research.* Vol.2:53-72.
- Huang, K.C., 1999. The Pharmacology of Chinese Herbs (2<sup>nd</sup> ed.) USA: CRC Press Publishing. 255-257.

- Hwang, D., Shin, S.Y., Lee, Y., Hyun, J., Yong, Y. and Park, J.C., 2011. A compound isolated from *Schisandra chinensis* induces apoptosis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 21:6054-6057.
- Ikeya, Y., Taghchi, H. and Yosioka, I., 1978. The constituents of *Schisandra chinensis* Baill. The structures of three new lignans, angeloylgomisin H, tigloylgomisin H and benzylgomisin H, and the absolute structure of schizandrin. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 26:328-331.
- Ikeya, Y., Taghchi, H., Yosioka, I. and Kobayashi, H., 1979. The constituents of *Schisandra chinensis* Baill. I. Isolation and structure determination of five new lignans, gomisin A, B, C, E and F, and the absolute structure of schizandrin. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 27:1383-1394.
- Ikeya, Y., Taghchi, H. and Yosioka, I., 1982. The constituents of *Schisandra chinensis* Baill. X. The structures of  $\gamma$ -schizandrin and four new lignans, (-)-gomisin L1 and L2, ( $\pm$ )-gomisin M1 and (+)-gomisin M2. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 30:132-139.
- Ip, SP., and Ko, K., 1996. The crucial antioxidant action of schizandrin B in protecting against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice: a comparative study with butylated hydroxytoluene. *Biochemical Pharmacology*. 52:1687-1693.
- Ip, SP., Poon, MKT. and Che, CT., 1996. Schizandrin B protects against carbon tetrachloride toxicity by enhancing the mitochondrial glutathione redox status in mouse liver. *Free Radic. Biol. Med.* 21:709-712.
- Ito, N., Tsuda, H., Sakata, T., Hasegawa, R. and Tamano, S., 1983. Inhibitory effect of BHA and ethoxyquin on the induction of neoplastic lesions in rat liver after an initial treatment with

- N-ethyl-N-hydroxyethylnitrosamine. *Gann.* 74:466-468.
- Jacob, R.A., 1994. Nutrition, health and antioxidants. *INFORM.* 11:1271-1275.
- Jacob, R.A. and Burri, B.J., 1996. Oxidative damage and defense. *American Journal of Clinical Nutrition.* 63:985-990.
- Johnsson, P., 2004. Phenolic compounds in flaxseed:Chromatographic and spectroscopic analyses of glucosidic conjugates. A Ph. D. thesis from department of food science, Uppsala, Swedish University of Agricultural Sciences. 1-36.
- Kalt, W., Fomey, F.C., Martin, A. and Prior, R.L., 1999. Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *J. Agric. Food Chem.* 47:4638-4644.
- Kamal-Eldin, A. and Appelqvist, L.A., 1996. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids.* 31:671-701.
- Karel, S., Tereza, S., Pavel, K., Renata, K., Pavel, S., Stefano, D.A., Gabbriella, I., Jan, V., Karolina K., Margita, D., Jiri, S., Eva, K., Jan, M. and Milan, Z., 2010. Evaluation of Antiradical Activity of *Schisandra Chinensis* Lignans Using Different Experimental Models. *Molecules.* 15:1223-1231.
- Kellogg, E.W. III and Fridovich, I., 1975. Superoxide, hydrogen peroxide and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. *J. Biol. Chem.* 250:8812-8815.
- Kerr, JF., Wyllie, AH. and Currie, AR., 1972. Apoptosis: a basic biological phenonmenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer.* 26:239-257.
- Khokhar, S. and Apenten, R.K.O., 2003. Iron binding characteristics of phenolic compounds: Some tentative structure-activity relations.

- Food Chem.* 81:133-140.
- Kim, D.H., Hung, T.M., Bae, K.H., Jung J.W., Lee, S., Yoon, B.H., Cheong J.H., Ko, KH. and Ryu, JH., 2006. Gomisins A improves scopolamine-induced memory impairment in mice. *European Journal of Pharmacology.* 542:129-135.
- Kim, S.H., Joo, M.H. and Yoo, S.H., 2009. Structural Identification and Antioxidant Properties of Major Anthocyanin Extracted from Omija (*Schizandra chinensis*) Fruit. *Journal of Food Science.* 74(2):134-140.
- Kim, S.J., Min, H.Y., Lee, E.J., Kim, Y.S., Bae, K.H. Kang, S.S. and Lee, S.K., 2010. Growth Inhibition and Cell Cycle Arrest in the G0/G1 by Schizandrin, a Dibenzocyclooctadiene Lignan Isolated from *Schisandra chinensis*, on T47D Human Breast Cancer Cells. *Phytother.* 24:193-197.
- Kirkman, HN., Galiano, S. and Gaetani, GF., 1987. The function of catalase-bound NADPH. *J. Biol Chem.* 262(2):660-666.
- Larson, R.A., 1988. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry.* 4:969-978.
- Lenka, B., Helena V., Ladislav H., Otakar H. and Jiri, S., 2009. Validated method for bioactive lignans in *Schisandra chinensis in vitro* cultures using a solid phase extraction and a monolithic column application. *Biomedical Chromatography BMC.* 24:954-960.
- Li, B., Meng, X., Liu, H. and Guo, X., 2011. Antioxidant activity of triterpenes from Caculis of *Schisandra Chinensis*(Turcz.) baill. International Conference on Human Health and Biomedical Engineering. 268-271.
- Li, L., Pan, QG., Han, WD., Liu, Z., Li, L. and Xu, X., 2007. Schisandrin B prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity via enhancing

- glutathione redox cycling. *Clin Cancer Res.* 13:6753-6760.
- Li, XJ., Zhao, BL., Liu, GT. and Xin, WJ., 1990. Scavenging effects on active oxygen radicals by schisandrins with different structures and configurations. *Free Rad Biol.* 9:99-104.
- Li, Y. and Liu, GT., 1987. Effects of schizandrins and biphenyl dimethyl dicarboxylate on enzymes of liver smooth and rough endoplasmic reticula in rat. *Acta Pharmacol. Sin.* 8:560-562.
- Lin, M.T., Kuo, T.J. and Lin, C.T., 1998. Molecular cloning of a cDNA encoding copper/zinc-superoxide dismutase from papaya fruit and overexpression in *Escherichia coli*. *J Agri Food Chem.* 46:344-348
- Liochev, SI. and Fridovich, I., 1994. The role of  $O_2^-$  in the production of HO: in vitro and in vivo. *Free Radical Biology and Medicine.* 16:29-33.
- Lu, H. and Liu, GT., 1991. Effect of dibenzo (a,c) cyclooctene lignans isolated from Fructus Schisandrae on lipid peroxidation and anti-oxidative enzyme activity. *Chem-Biol. Inter.* 78:77-84.
- Luk, K.F., Ko, K.M. and Ng, K.M., 2008. Separation and Purification of Schisandrin B from Fructus Schisandrae. *Ind. Eng. Chem. Res.* 47:4193-4201.
- Ma, C.H., Liu, T.T., Yang, L., Zu, Y.G., Wang, S.Y. and Zhang, R.R., 2011. Study on ionic liquid-based ultrasonic-assisted extraction of biphenyl cyclooctene lignans from the fruit of *Schisandra chinensis* Baill. *Analytica Chimica Acta* 689:110-116.
- Mak, D.H.F., Ip, S., Li, P., Poon, M.K.T. and Ko, K., 1996. Effects of Schisandrin B and alpha-tocopherol on lipid peroxidation, *in vitro* and *in vivo*. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 165:161-165.
- Mannervik, B. 1985. The isozymes of Glutathione Transferase. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 57:357-417.

- Marklund, S. and Marklund, G., 1974. Involvement of superoxide anion radical in the auto oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47:469-474.
- Maringanti, S. and Imlay, J., 1999. An intracellular iron chelator pleiotropically suppresses enzymatic and growth defects of superoxide dismutase-deficient *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 181:3792-3802
- Maxwell, L. and Gavin, J., 1992. Anti-oxidant therapy improves microvascular ultrastructure and perfusion in postischemic myocardium.. *Microvasc. Res.* 43:255-266.
- McCord, J.M., 2000. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am. J. Med.* 108(8):652-659.
- Meister, A., 1994. Antioxidant functions of glutathione. *Life Chem. Rep.*, 12:23-27.
- Meyer, A.S. and Isaksen, A., 1995. Application of enzymes as food antioxidants. *Trends in Food Sci. and Tech.* 6:300-304.
- Milic, B.L., Djilas, S.M. and Canadanovic-Brunet, J.M., 1998. Antioxidative activity of phenolic compounds on the metal-ion breakdown of lipid peroxidation system. *Food Chem.* 61:443-447.
- Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V. and Milner, A. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science.* 84:407-412.
- Mills, GC., 1960. Glutathione peroxidase and destruction of hydrogen peroxide in animal tissues. *Arch Biochem Biophys* 86:1-5
- Morrissey, P.A. and O'Brien, N.M., 1998. Dietary antioxidants in health and disease. *Int. Dairy J.* 8:463-472.



- Moskovitz, J. and Yim, M.B., 2002. Free radicals and disease. *Arch. Biochem. Biophys.* 397(2):354-359.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 65:55-63.
- Murakami, H., Asakawa, T., Terao, T. and Matsushitai, S., 1984. Antioxidative stability of tempeh and liberation of isoflavones by fermentation. *Agricultural and Food chemistry.* 48:2971-2975.
- Murray, M., 1996. Encyclopedia of Nutritional Supplements: The Essential Guide For Improving Your Health Naturally. Three river Press 1ed. *Rocklin, CA* 296-308.
- Mruka, D.D., Silvestrinib, B., Moa, M.Y. and Chenga, C.Y., 2002. Antioxidant superoxide dismutase - a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception.* 67:305-311.
- Narwar, W.W., 1996. Lipids. In: Frennema (3rd Ed.) O.R., Marcel Dekker, Inc., New York. *Food Chemistry.* 225-319.
- Niki, E., 1992. Active oxygens and free radicals in biology. *J. Jpn. Oil Chem. Soc.* 41:768-773.
- Ookawa, N., Ikeya, Y., Sugama, K., Taguchi, H. and Maruno, M., 1994. Dibenzocyclooctadiene lignans from *Kadsura japonica*. *Phytochemistry.* 39(5):1187-1191.
- Pao, T.T., Liu, K.I., Hsu, K.F. and Sung, C.Y., 1974. Studies on Schizandra fruit. I. Its effect on increased SGPT levels in animals caused by hepatotoxic chemicals. *National Medical Journal of China.* 54:275-278.
- Papas, A.M., 1999. Diet and antioxidant status. *Food Chem. Toxic.* 37:999-1007.

- Park, S.Y., Park, D.J., Kim, Y.H., Kim, Y.H., Kim, S.G., Shon, K.J., Choi, Y.W. and Lee, S.J., 2011. Upregulation of heme oxygenase-1 via PI3K/Akt and Nrf-2 signaling pathways mediates the anti-inflammatory activity of Schisandrin in *Porphyromonas gingivalis* LPS-stimulated macrophages. *Immunology Letters*. 139:93-101.
- Pistia-Brueggeman, G. and Hollingsworth, R. I., 2001. ChemInform Abstract: A Preparation and screening strategy for glycosidase inhibitors. *Cheminform*. 33(5):8773-8778.
- Pokomy, J., 1987. In "Autoxidation of unsaturated lipids." Edited by Chan, H. Academic Press, London. 141-206.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Paganga, G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20:933-956.
- Rikans, L.E. and Hornbrook, K.R., 1997. Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochim Biophys. Acta.* 1362:116-127.
- Ross, D., Siegel, D., Beall, H., Prakash, A.S., Mulcahy, R.T. and Gibson, N.W., 1993. DTdiaphorase in activation and detoxification of quinones. *Cancer Metastasis Res.* 12:83-101.
- Sakiko, T., Yuki, O. and Hiroaki, K., 2006. Metabolic engineering of coenzyme Q by medication of isoprenoid side chain in plant. *FEBS Letters*. 580:955-959.
- Scalbert, A. and Williamson, G., 2000. Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *J. Nutr.* 130:2073-2085.
- Schoneich, C., Bonifacic, M. and Asmus, K.D., 1989. Reversible H-atom abstraction from alcohols by thiyl radicals: determination of absolute rate constants by pulse radiolysis. *Free Radic Res Commun.* 6(6):393-405.

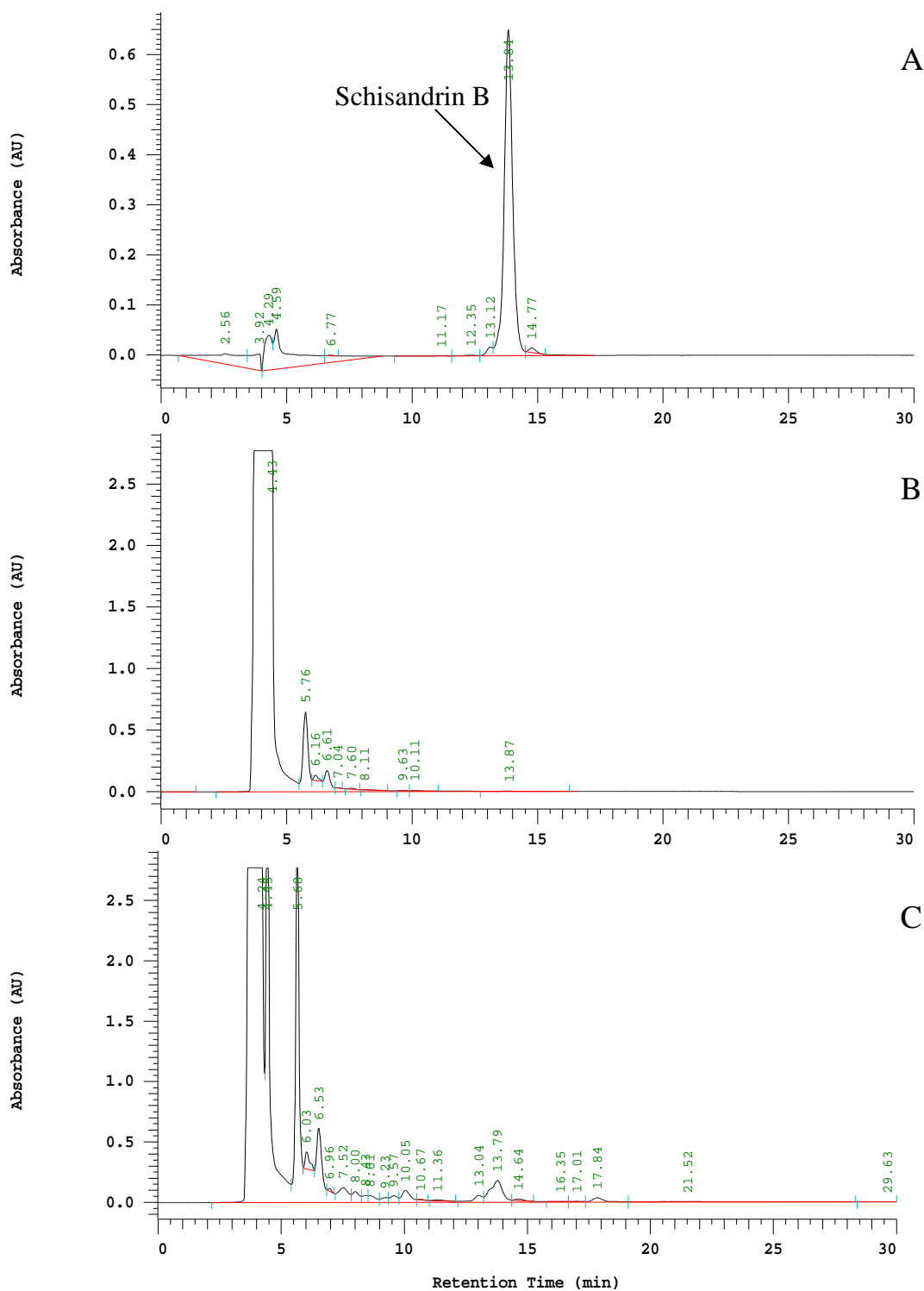
- Shigenaga, M.K., Gimeno, C.J. and Ames, B.N., 1989. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 86:9697-9701.
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, T. and Nukamura, T. 1992. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J. Agric. Food Chem.* 48:2122-2126.
- Sladkovsky, R., Solich, P. and Opletal, L., 2001. Simultaneous determination of quercetin, kaempferol and (E)-cinnamic acid in vegetative organs of *Schisandra chinensis* Baill. by HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 24:1049-1054.
- Slanina, J., Taborska, E. and Loujkova, L., 1997. Lignans in the Seeds and Fruits of *Schisandra chinensis* Cultured in Europe. *Planta Med.* 63:277-280.
- Smith, T.J. and Yang, C.S., 1994. Phenolic compounds in food and their effects on health I :Fruits and vegetables. *American Chemical Society.* Washington.
- Song, Z.Q. and Song, P.Y., 1988. 50cases in severe asthma treatment with 3 herbs. *Journal of Traditional Chinese Medicine.* 29(9):47.
- Stadtman, E.R. and Oliver, C.N. 1991. Metal-catalyzed oxidation of proteins. *The Journal of Biological Chemistry.* 266:2005-2008.
- Stallings, W.C., Patridge, K.A., Strong, R.K. and Ludwig, M.L., 1984. Manganese and iron superoxide dismutases are structural homologs. *J. Biol. Chem.* 259:10695-10699.
- Taga, M.S., Miller, E.E. and Pratt, D.E. 1984. China seeds as a source of natural antioxidants. *J. Am. Oil Chem.* 61:928-931.
- Takeda, S., Arai, I., Kase, Y., Ohkura, Y., Hasegawa, M., Sekiguchi, Y., Sudo, K., Aburada, M. and Hosoya, E., 1987. Pharmacological studies on antihepatotoxic action of

- (+)-(6S,7S,R-biar)-5,6,7,8-tetrahydro-1,2,3,12-tetramethoxy-6,7-dimethyl-10,11-methylenedioxy-6-dibenzo [a,c] cyclooctenol (TJN-101), a lignan component of Schisandra fruits. Influences of resolvents on the efficacy of TJN-101 in the experimental acute hepatic injuries. *Yakugaku Zasshi*. 107(7):517-524.
- Townsend, D.M. and Tew K.D., 2003. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*. 22:7369-7375.
- Townsend, D.M. Tew, K.D. and Tapiero, H., 2003. The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 57:145-155.
- Upton, R., 1999. Schisandra Berry: *Schisandra chinensis* analytical, quality control and therapeutic monograph. American Herbal Pharmacopeia and Therapeutic Compendium. Santa Cruz:American Herbal Pharmacopeia.
- Wang, L.Q., 2002. Mammalian phytoestrogens:enterodiol and enterolactone. *Journal of Chromatography B*. 777:289-309.
- Wang, S. Y. and Lin, H.S. 2000. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *J. Agric. Food Chem*. 48:140-146.
- Weber, C., Jakobsen, T.S. and Mortensen, S.A., 1994. Effect of dietary coenzyme Q10 as an antioxidant in human plasma. *Mol Aspect Med*. 15:97-107.
- Wei, H., Sun, L., Tai, Z.G., Gao, S.H., Xu, W. and Chen, W.S., 2010. A simple and sensitive HPLC method for the simultaneous determination of eight bioactive components and fingerprint analysis of *Schisandra sphenanthera*. *Analytica Chimica Acta* 662:97-104.

- Wu, G., Fang, YZ., Yang, S., Lupton, JR. and Turner, ND., 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. *J. Nutr.* 134:489-492.
- Wyllie, AH., Kerr, JF. and Curri, AR., 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68:251-306.
- Xu, B.J., Yuan, S.H. and Chang, S.K.C., 2007. Comparative analysis of phenolic composition, antioxidant capacity and color of cool season legumes and other selected food legumes. *J. Food Sci.*, 72:167-177.
- Yasuhiro, M., Tohkan, S. and Seiji, M., 1991. Effects of Gomisin A in an immunological induced acute hepatic failure model. *Planta Med.* 57:11-14.
- Yoo, J.C., Pae, H.O., Choi, B.M., Kim, W.I., Kim, J.D., Kim Y.M. and Chung, H.T. 2000. Ionizing radiation potentiates the induction of nitric oxide synthase by interferon-g (IFN-g) or IFN-g and lipopolysaccharide in BNL CL.2 murine embryonic liver cells: role of hydrogen peroxide. *Free Radical Biology & Medicine.* 28:390-396.
- Zakowski, JJ., Forstrom, JW., Condell, RA. and Tappel, AL., 1978. Attachment of selenocysteine in the catalytic site of glutathione peroxidase. *Biochem Biophys Res Commun.* 84(1):248-253.
- Zhang, Q., Major, M.B., Takanashi, S., Camp, N.D., Nishiya, N., Peters, E.C., Ginsberg, M.H., Jian, X., Randazzo, P.A., Schultz, P.G., Moon, R.T. and Ding S., 2007. Small-molecule synergist of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *PNAS.* 104(18):7444-7448
- Zhang, TM., Wang, BE. and Liu, GT., 1989. Action of Schizandrin B, and antioxidant, on lipid peroxidation in primary cultured hepatocytes. *Acta Pharmacol Sin.* 10(4):353-356.

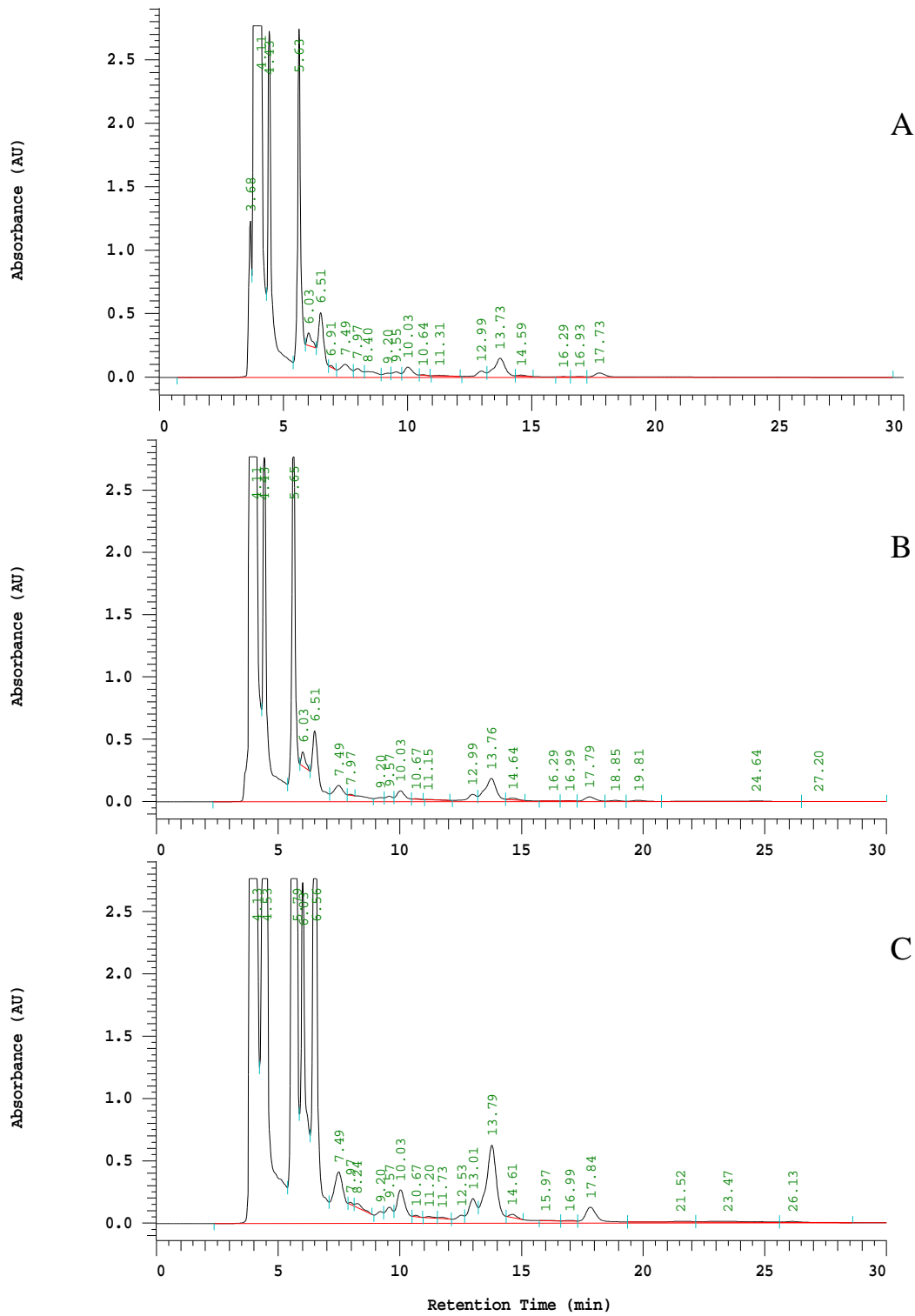
- Zhishen J., Mengcheng T. and Jianming W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 64:555-559.
- Zhu, M., Lin, K.F., Yeung, R.Y. and Li, R.C., 1999. Evaluation of the protective effects of *Schisandra chinensis* on phase 1 drug metabolism using a CCl<sub>4</sub> intoxication model. *Journal of Ethnopharmacology.* 67:61-68.

## 第八章 附錄



附錄一、Schisandrin B(A)及五味子脫脂粉末水(B)、甲醇(C)萃取物之分析型 HPLC 圖。

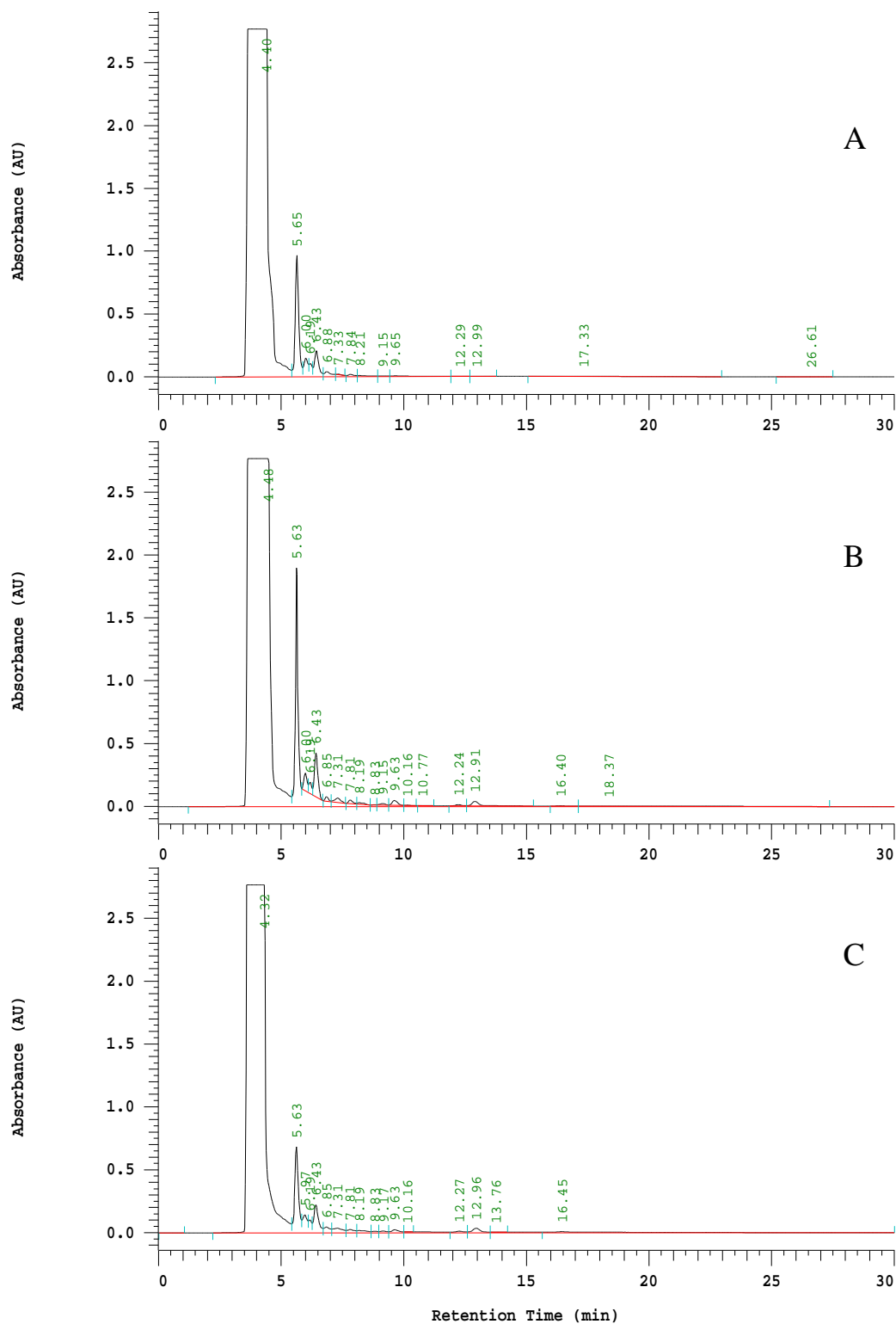
App. 1 Analytical HPLC chromatograms for schisandrin B (A), water (B) and methanol (C) extracts from defatted powder of *S. chinensis* fruits.



附錄二、五味子脫脂粉末乙醇(A)、正丁醇(B)及乙酸乙酯(C)萃取物之分析型 HPLC 圖。

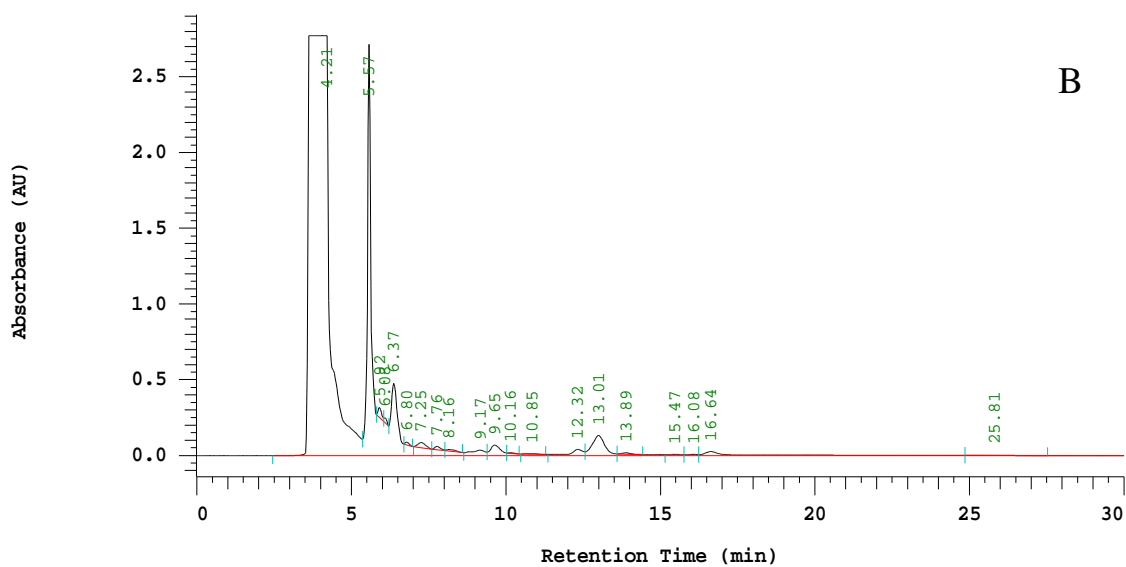
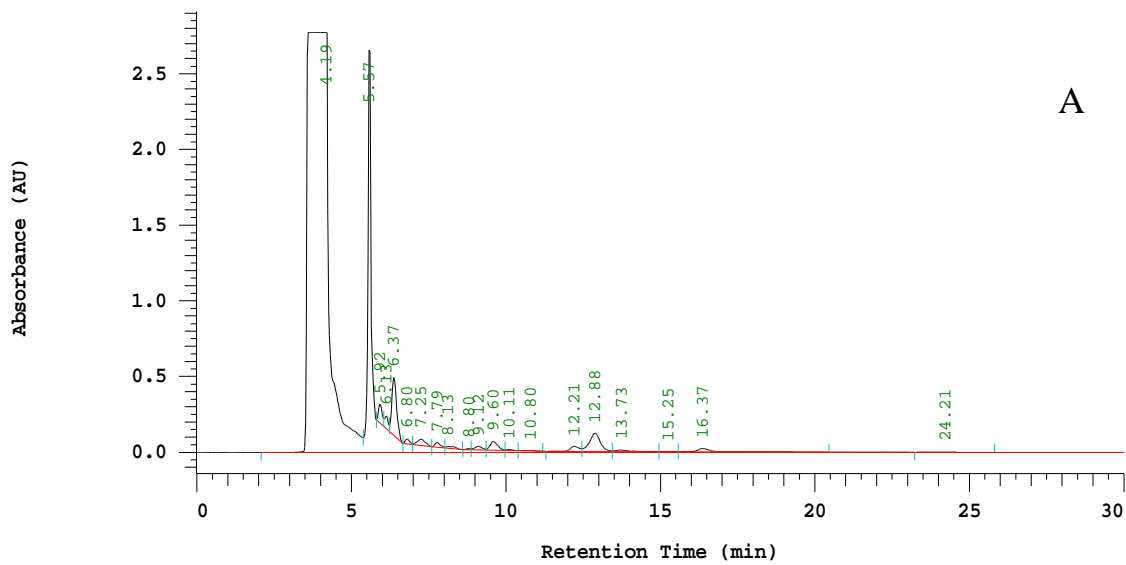
App. 2 Analytical HPLC chromatograms for ethanol (A), 1-butanol (B) and ethyl acetate (C) extracts from defatted powder of *S. chinensis* fruits.





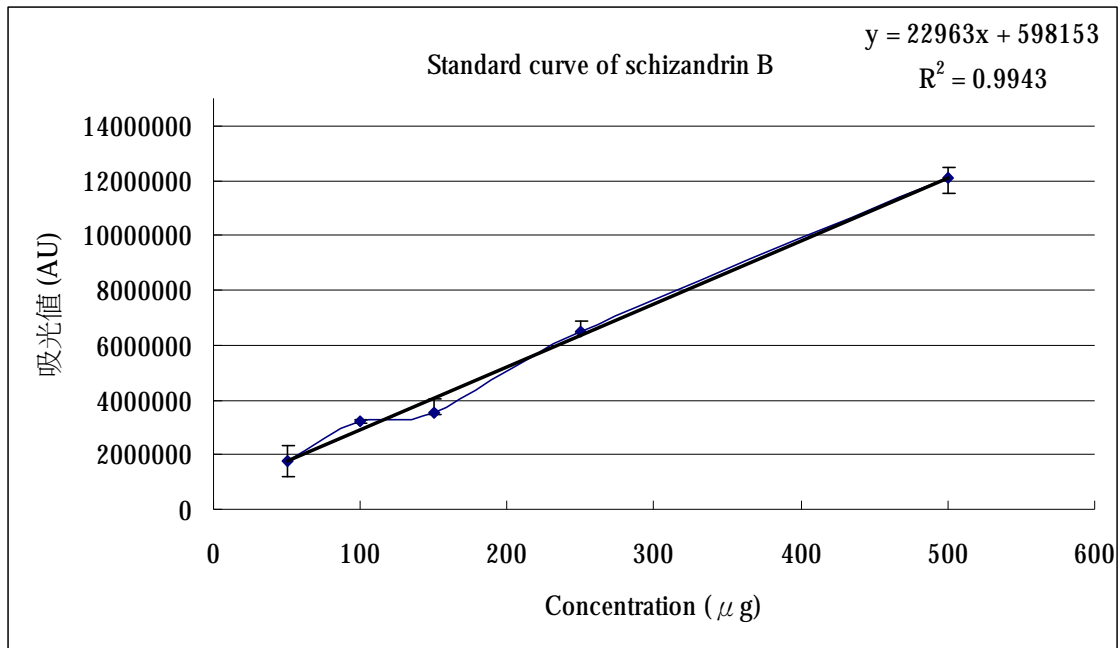
附錄三、五味子脫脂粉末 20(A)、40(B)及 60%(C) 甲醇萃取物之分析型 HPLC 圖。

App. 3 Analytical HPLC chromatograms for 20 (A), 40 (B) and 60% (C) methanol extracts from defatted powder of *S. chinensis* fruits.



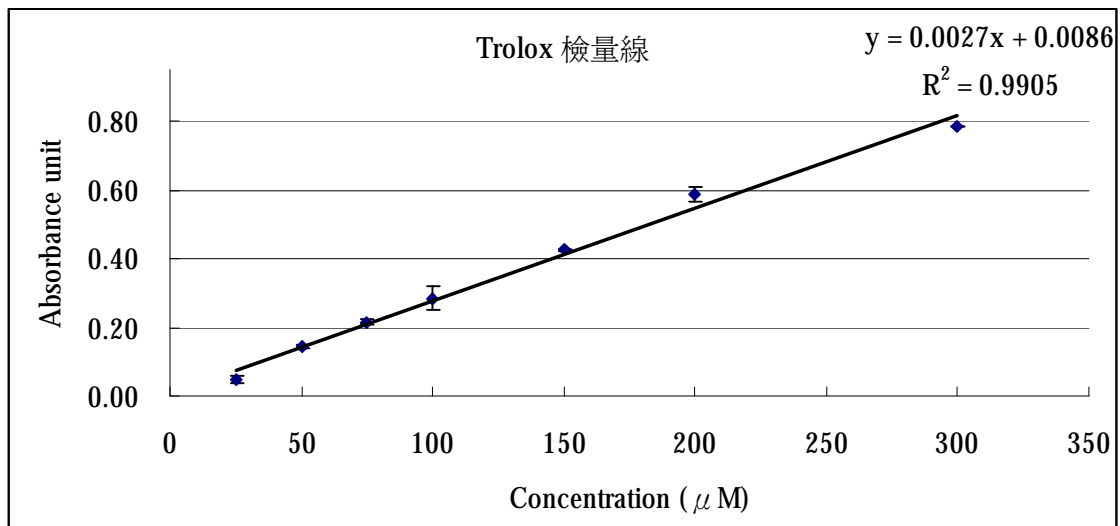
附錄四、五味子脫脂粉末 80% 甲醇(A)及甲醇萃取物(B)之分析型 HPLC 圖。

App. 4 Analytical HPLC chromatograms for 80% methanol (A) and methanol (B) extracts from defatted powder of *S. chinensis* fruits.



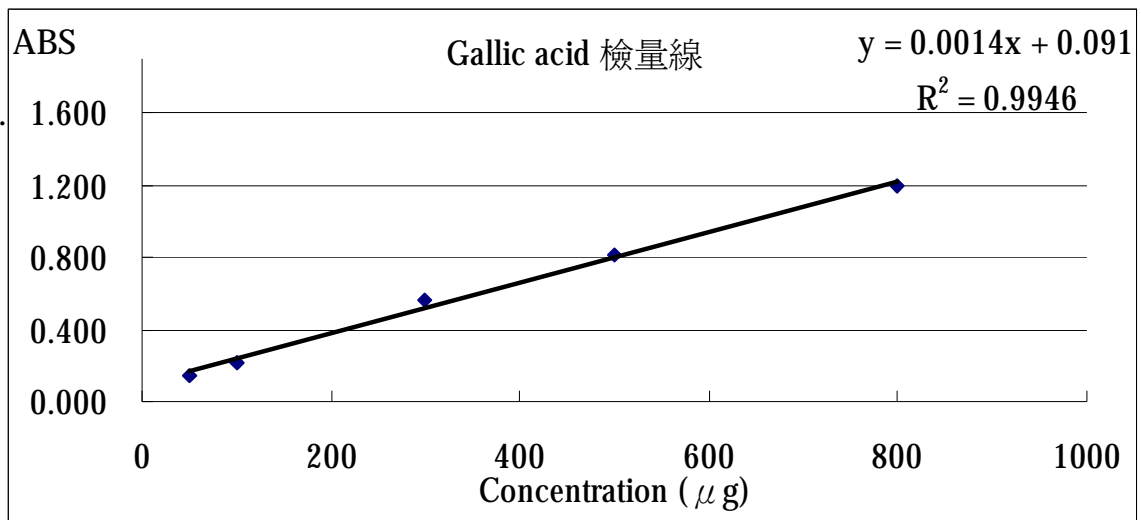
附錄五、HPLC 測定之 Schisandrin B 含量標準曲線圖。

App. 5 Standard curve of schisandrin B contents detected by analytical HPLC chromatography.



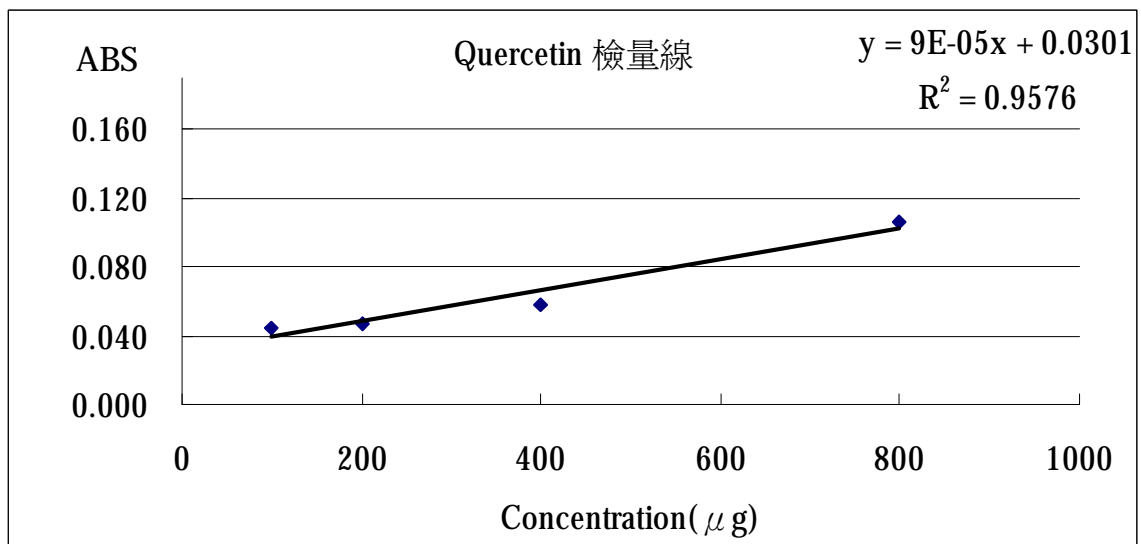
附錄六、Trolox 之標準曲線圖。

App. 6 Standard curve of Trolox.



附錄七、Gallic acid 之標準曲線圖。

App. 7 Standard curve of gallic acid.



附錄八、Quercetin 之標準曲線圖。

App. 8 Standard curve of quercetin.