

美和科技大學

100 年度教師專題研究計畫

結案報告

計畫名稱：檀香萃取物抗氧化及抗發炎活性成分之分離純化

計畫編號：AMH-100-DBS-001

計畫期間：100.01.01.~100.12.31.

計畫主持人：鄭智交

共同主持人：王正隆、陳正吉

經費總額：22,000 元

經費來源：100 年度教育部獎補助款

檀香萃取物抗氧化及抗發炎活性成分之分離純化

Isolation and purification of the antioxidative and anti-inflammation compounds from Sandalwood extracts

(一) 中文摘要。(五百字以內)

本研究主要是分離純化檀香萃取物的抗氧化及抗發炎活性成分，及其可能之作用機轉。

檀香為檀香科植物檀香 *Santalum album* L. 樹幹的心材，氣清香，燃燒時香氣更濃；味淡，嚼之微有辛辣感。主要成分含揮發油。油中主要成分為 α -檀萜香醇和 β -檀萜香醇 (α - β -Santalol)，其次為檀萜烯 (Santene)、 α -檀香烯和 β -檀香烯 (α - β -Santalene)、檀萜烯酮 (Santenone)、檀萜烯酮醇 (Santenone alcohol)、及少量的檀萜酸 (Santalic acid)、檀油酸 (Teresantalic acid)、紫檀萜醛 (Santal aldehyde) 等。其功能主治：行氣溫中，開胃止痛。用於寒凝氣滯，胸痛，腹痛，胃痛食少；冠心病，心絞痛。

我們將利用管柱層析法將檀香粗萃物分離純化並測定其抗氧化及抗發炎活性。結果顯示、萃取液經部分純化後，其分液皆有活性其中又以分液 6、分液 3 及分液 2 之作用最好其 IC₅₀ 分別為 13.6 ± 1.3 ug/mL、 19.7 ± 0.1 ug/mL 和 30.1 ± 4.3 ug/mL。然而細胞毒性試驗 (MTT assay) 卻顯示，分液 6、分液 3 及分液 2 皆具有細胞毒性。分液 4、分液 5 其 IC₅₀ 分別為 54.9 ± 5.4 ug/mL 和 30.7 ± 11 ug/mL，雖然抗發炎活性不是很強但細胞毒性較不明顯。因此，進一步觀察，其抑制 iNOS 蛋白的表現，結果顯示，分液 4 及分液 5 可以有效的抑制 iNOS 蛋白的表現。

植物有效成分之添加實為中草藥美容生技之研發重點，因而萃取液之活性分析及安全評估至為重要，以本研究初步結果為例，最有效的成分可能同時具有毒性，因此，需要藉由部分純化之技術將有毒性之分液去除，經此步驟後，即可分離出安全有效的天然植物活性成分。

關鍵詞：檀香、抗氧化、抗發炎、巨噬細胞、LPS

(二) 英文摘要。(五百字以内)

Abstract:

Isolation and purification of the antioxidative and anti-inflammation compounds of Sandalwood extracts were investigated in this study. Besides, we studied the action mechanism of Sandalwood extracts on nitric oxide (NO) production in lipopolysaccharide (LPS)-activated macrophages.

The antioxidant properties of Sandalwood extracts were evaluated by the stable free radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay system and superoxide-scavenge assay system which's radical derived from xanthine/xanthine oxidase.

The anti-inflammation activities of Sandalwood extracts were evaluated by the LPS-activated macrophages assay system which NO production. was over-expression.

According to the results , sandalwood had good performance on scavenging DPPH radical ($IC_{0.20}$: $21.1 \pm 3.2 \mu\text{g/mL}$). Besides, sandalwood significantly suppressed nitric oxide (NO) production concentration-dependent in lipopolysaccharide (LPS) -activated macrophages with IC_{50} $11.6 \pm 2.9 \mu\text{g/mL}$. It was found that the partial purified fraction 6, 4 and 5 of Sandalwood also showed suppressive effects on NO production in LPS-activated macrophages with IC_{50} 13.6 ± 1.3 , 54.9 ± 5.4 and $30.7 \pm 11.0 \mu\text{g/mL}$ respectively. In the cell viability assay by MTT methods showed that the partial purified fraction 6 may have cyto-toxicity effect. Western blot analysis indicated that the partial purified fraction 4 and 5 of Sandalwood extract showed significantly inhibitory effects on iNOS expression but not COX-2 expression.

The future work is to identify the antioxidative ingredients, which can inhibit NO production in LPS-activated macrophages, in these Chinese herbal medicines. It is anticipated that the results could contribute to the advancement of cosmetic biotechnology.

Keywords: Sandalwood 、 Antioxidant 、 Anti-inflammation 、 Macrophage 、 LPS

(三) 前言

自由基和抗氧化劑，在近代的生物及醫學領域受到了廣泛的討論。許多調查研究顯示，抗氧化劑有助於癌症 (Byers *et al.*, 1992)、心臟血管 (Hertog *et al.*, 1993) 及老化 (Helfrich *et al.*, 2008) 等疾病的預防。因此，更引起了社會大眾的關注。此外，流行病學調查結果也指出，常吃水果和蔬菜的人，可以擁有較好的抗氧化能力，而不易罹患心血管疾病及癌症。而蔬菜水果中所含的抗氧化劑種類繁多，除了大家所熟知的維生素 C，維生素 E 外，還有 phytates, flavonoids 及 carotenoids 等等。其中，維生素 E 已被證實，對於預防心血管疾病是相當有助益的 (Stampfer *et al.*, 1993)。為了進一步了解抗氧化劑和人類疾病的關係 (Halliwell, 1997)，我們得先了解自由基和人類疾病的關係。

自由基的定義

自由基係指含有一個不成對電子的分子，因為電子不成對，所以很不穩定，很活潑，半衰期很短。自由基種類非常多，以氧為中心的包括了超氧自由基 (superoxide radical, $O_2^{\cdot-}$)，alkoxyl radical (RO^{\cdot})，過氧自由基 (peroxyl radical, ROO^{\cdot})，氫氧自由基 (hydroxyl radical, OH^{\cdot}) 及一氧化氮 (nitric oxide, NO^{\cdot})。而過氧化氫 (hydrogen peroxide, H_2O_2) 雖不是自由基分子，但其活性卻和自由基相似，因此，常將其視為自由其一併討論。後來，更以“活性氧屬” (reactive oxygen species, ROS) 來統稱這些以氧為中心而具有自由基活性的分子。此外，也有以硫原子或氮原子為中心而具有自由基活性的分子也稱為自由基。ROS 中的 $O_2^{\cdot-}$ 及 H_2O_2 對人體的直接傷害並不大，但是當他們與過渡金屬 (特別是鐵或銅) 接觸後，經 Fenton reaction 或 Haber-Weiss reaction 後，便會產生傷害性很強的氫氧自由基。氫氧自由基是很活潑的分子，很容易氧化一些重要的生物分子，如蛋白質、脂質及 DNA 等。當自由基大量產生時，體內的抗氧化機制也會大量的受到損耗，若損耗太嚴重時，則會傷及組織而造成疾病。研究顯示，許多疾病的病人，其氧化代謝物都有明顯增加的情形，顯示其體內的自由基產量超過其抗氧化機制所能負荷的量，因而造成氧化性代謝物的增加。因此，自由基在這些疾病的角色扮演，似乎頗為重要 (Maxwell, 1995)。

自由基是從何而來的呢？自由基的來源非常多。粒腺體中的電子傳遞鏈，在正常情況下，會將電子經一系列傳遞，最後傳給氧分子，將氧分子還原成水。但有極少數的電子，會從電子傳遞鏈掉出來，直接將氧分子還原成超氧自由基，而超氧自由基有可能進一步產生氫氧自由基而對粒腺體 DNA 造成傷害。許多研究顯示，隨著年齡的增加，粒腺體內 DNA 的突變點及遺漏點 (deletion point) 也有增加的趨勢 (Lee, 1997)。因此許多研究者認為老化和粒腺體的損傷可能有關 (Harman, 2003)。此外有些氧化酵素在病理狀態下，便會產生自由基如 xanthine oxidase，在缺血-再灌流的組織中，便會產生超氧自由基。在發炎

時，嗜中性白血球會產生 H_2O_2 及次氯酸(hypochlorous acid, $HClO$)以殺死入侵的細菌。此外，藥物的代謝過程（如 acetaminophen），吸煙及幅射（如 X-ray, UV）都會有自由基產生，當自由基的產生增加時，便容易造成氧化性壓力（oxidative stress），即氧化與抗氧化之間的平衡，傾向了易於造成細胞傷害的氧化狀態（Sies, 1997）。

氧化性壓力可能造成的損傷

細胞膜上的不飽和脂肪酸和脂蛋白，最易受到自由基的氧化作用，且常有鐵離子的參與（Aust *et al.*, 1985），而促成氫氧自由基的形成。接著便進行自由基連鎖反應（free radical chain reaction）（Sevenian *et al.*, 1985），最後破壞了細胞膜的功能。當蛋白質受到自由基攻擊時，可能會產生斷裂（fragment），互相連結（cross-link）或凝集（aggregate）等變化（Stadtman *et al.*, 1998）。結果使得離子通道受到改變（Duprat, 1995），接受體（receptor）失去功能（Kramer, 1986）及氧化性磷酸化受阻等。而當 DNA 受到自由基攻擊時，會產生單股或雙股斷裂，或是鹼基或醣基受到破壞（Aruoma *et al.*, 1989）而導致突變或癌化（McCall *et al.*, 1999）。

事實上，身體內的抗氧化系統，對自由基造成的傷害，只能壓制到最低程度，但無法完全防止；我們身體內其實不斷的受到微量的自由基攻擊。因此，累積了這些氧化產物，如從健康人體組織分離出來的 DNA，可以發現有一小部份的鹼基被氧化了。體內有修補系統會將氧化的 DNA 切除，而由尿液中排出。因此，可以從尿液中分析 DNA 受到自由基攻擊的程度。同樣地，體內蛋白質受到自由基攻擊時，也會產生 protein carbonyls 等的氧化產物，可藉此評估蛋白質所受到的傷害。至於脂質受自由基攻擊產生的脂質過氧化物，MDA（malondialdehyde），HNE（4-hydroxynonenal），TBARS（thiobarbituric acid reactive substance）及 F_2 -isoprostanes，也可以由血漿或尿液中檢測出來（McCall *et al.*, 1999）。當細胞內大分子受損時，細胞會啟動自己的修護體系，如 DNA 的修補（1994; Kasai, 1997）。而被氧化的蛋白或脂質則進行代謝分解，並且重新補充這些受損分子。

DNA 長期受到自由基的損傷，需常常進行修補，修補次數愈多，出錯機率便愈大，出現癌化的機率便提高了。因此，一些和年齡有關的癌症，一般認為與體內自由基相當有關係（Kasai, 1997）。

Nitric oxide (NO)

Nitric oxide (NO)和超氧自由基一樣是自由基，活性雖不是很強，但具有三種重要的生理活性(1)在心血管系統中 NO 由內皮細胞產生，可活化平滑肌細胞的 guanylate cyclase，使細胞內 cGMP 升高而使血管放鬆（Ma *et al.*, 1993）。(2)在免疫系統中，巨

噬細胞產生的 NO，可以毒殺癌細胞或細胞內的病原體 (Wei *et al.*, 1995)。(3)在神經系統中，NO 可扮演細胞與細胞之間的傳遞分子(Lander, 1997)。

NO 是由 NOS (NO synthase)所合成，目前所知的 NOS 可分為三種 (Forstermann *et al.*, 1995)：(1) endothelial NOS (eNOS or NOS III)分佈於內皮細胞、表皮細胞 (epithelial cells)，心肌細胞等。(2) neuronal NOS (nNOS or NOS I)分佈於神經細胞、骨骼肌等。(3) inducible NOS (iNOS or NOS II) 分佈於巨噬細胞、肝臟細胞、平滑肌及骨骼肌等。

此三種 NOS 活化時皆需要一些輔助因子參與，包括 calmodulin (CaM)，flavin adenine dinucleotide (FAD)，flavin mononucleotide (FMN) 及 tetrahydrobiopterin (BH4)(Knowles *et al.*, 1994)。nNOS, iNOS 為 cytosolic protein，eNOS 則為 membrane-bound protein。此外 nNOS, eNOS 皆是持續性地表現，會受到細胞內鈣離子 ($[Ca^{2+}]_i$)的調控，其 NO 產量皆很少。而 iNOS 則不受 $[Ca^{2+}]_i$ 調控，且細胞未活化時是不表現的，唯有當細胞受到(lipopolysaccharide) LPS 或 pro-inflammatory cytokines 等的刺激才會表現(Morris *et al.*, 1994)，一旦表現出來，便會大量的產生 NO，而且持續很長一段時間。

愈來愈多的研究指出，NO 過量產生，可能是敗血症休克(septic shock)的病癥之一，由於 NO 過量產生使血管無法正常收縮，血液無法正常回流至心臟，使心臟供血頓減，造成低血壓，最後導致 MODS (multiple organ dysfunction)而死亡(Kilbourn, 1997)。

研究顯示，患有敗血症或敗血症休克的病人，血漿或尿液中 nitrite 和 nitrate 的含量都有明顯升高的情形 (Szabo, 1995)。Nitrite 和 nitrate 是 NO 的最終代謝產物，相當安定，而在人體內，NO 的合成，主要是由 NOS 氧化 L-arginine 而來 (Moncada, 1991)，因此，NO 過量產生，可能是 NOS 過量表現所引起。因此，綜合以上文獻顯示，NO 過量產生可能是導致血液循環系統衰竭的主因之一。

檀香為檀香科植物檀香 *Santalum album* L. 樹幹的心材，氣清香，燃燒時香氣更濃；味淡，嚼之微有辛辣感。主要成分含揮發油。油中主要成分為 α -檀香醇和 β -檀香醇 (α - β -Santalol)，其次為檀香烯 (Santene)、 α -檀香烯和 β -檀香烯 (α - β -Santalene)、檀香烯酮 (Santenone)、檀香烯酮醇 (Santenone alcohol)、及少量的檀香酸 (Santallic acid)、檀油酸 (Teresantallic acid)、紫檀香醛 (Santal aldehyde) 等。其功能主治：行氣溫中，開胃止痛。用於寒凝氣滯，胸痛，腹痛，胃痛食少；冠心病，心絞痛。此外，有研究指出檀香具有抗病毒活性(Benencia, 1999)。

檀香之功效雖然記載頗多，但是關於作用的有效成分、作用機轉與劑量使用安全範圍等皆難以確認。因此，藉此計畫之執行，希望能進一步確認檀香之功效、有效成分確認、細胞作用機轉與安全劑量之確認。

本研究主要目的是分離純化檀香萃取物的抗氧化及抗發炎活性成分，及其應用於化粧品之評估。

(四) 研究方法、步驟。

4.1 檀香粗萃液

本研究所使用的檀香為 *Santalum album* L. 樹幹的心材，先曬乾後用粉碎機將其粉碎，浸泡於 75% 酒精中五倍體積，即 10g 的檀香取 50mL 的 75% 酒精，浸泡兩週後，離心取上清液備用。

4.2 分離純化層析法

層析法 (chromatography) 是利用化合物在靜相與流動相之間的分配差異以分離混合物的方法。依據靜相與流動相之不同，分為管柱層析 (column chromatography)、薄層層析 (thin layer chromatography, TLC)、氣液層析 (gas liquid chromatography, GC) 等。

4.2.1 薄層層析

薄層層析是吸附性色層分析的一種，將吸附劑如矽膠或礬土均勻塗佈在鋁片板上形成薄層，作為層析靜相 (stationary phase)，再將樣本點附在試樣點上，以液體展開劑作為流動相 (mobile phase)，透過毛細作用由下往上移動。(Fig.1) 由於不同的樣本與靜相之吸附力，和流動相間溶解度的差異，當展開劑上升、流經所吸附的試樣點時，吸附力弱的物質移動快，吸附力強的移動慢，使混合物最後在靜相薄層上分開，達到分離目的。可用於決定樣本中至少含有多少種成分物、作為管柱層析沖提劑選擇的參考。

4.2.2 液相管柱層析

將一空的管柱填入吸附劑 silica gel (SiO_2)，再將要分離的樣本放在柱頂，加入沖提液沖提向下移動而將各個組成份沖提下來，分別收集後，除去沖提液，便達到分離的效果了。目前較常使用的是液相層析法。液相層析法屬於吸附層析法，原理類似於薄層層析法，欲分離的樣本中的各組成份分配在固定相 (stationary phase) 和移動相 (mobile phase) 之間，樣本被固定相吸附愈強，該樣本存在於流動相中就愈少，沿沖提液移動的距離就愈小。(Fig. 2)

藉著沖提作用及吸附劑同時對溶劑及溶質吸附力大小而使之成為差別移動，進而將樣

本中各組成分離。管柱層析法作用類似多次萃取，其萃取次數與管柱高度成正比，利用樣本中各組成份在固定相及移動相不同的吸附力（萃取中的分配係數）而分離。一般極性較大的物質被吸附較多，而極性較小的物質因不易被吸附，因此較易向下流動。

4.3 萃取物抗氧化及抗發炎活性評估

4.3.1 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) 試驗

DPPH 以乙醇配製成 100 μ M 的反應液，待其完全溶解後，置於冰中 30 分鐘，並避光，使其穩定。為 550nm 吸光值約為 1.12。當測試成分具有自由機清除能力時，與 DPPH 反應液混合 30 分鐘後，吸光值會明顯的下降。而評估測試成分清除自由基能力的依據是 30 分鐘內使吸光值 550nm 降低 0.20 單位時其所需之濃度(IC_{0.20})表示之。

濃度 100 μ M 之 DPPH Ethanol 溶液經 Spectrophotometer 做 Wavelength Scan，在 517nm 下有較強的吸光值，其 ABS 約為 1.25，而 490nm~560nm 之吸光值則約為 0.9(Fig3-4)，再利用不同濃度 DPPH 乙醇溶液於 550nm 吸光值所測之標準曲線，發現 DPPH 乙醇溶液的濃度與吸光值成正相關，於是本實驗採用 550nm 來檢測檀香萃取物清除 DPPH 自由基之能力。

4.3.2 超氧自由基 (superoxide) 之清除能力測試

超氧自由基可由 xanthine/xanthine oxidase 系統產生，利用 cytochrome *c* reduction 方法 (Fridovich, 1970) 來偵測超氧自由基的濃度。將欲測試的化合物加入含 0.5 mg/ml cytochrome *c*，0.3 mM K₂H₂-EDTA 與 100 μ M xanthine 之 50 μ M KH₂PO₄/K₂HPO₄ 緩衝溶液 (pH7.4)，在溫度 30°C，靜置一分半鐘，加入 0.02 U/ml xanthine oxidase 開始反應，觀察 10 分鐘，所產生的超氧自由基會使 cytochrome *c* 還原，而在 550 nm 吸光值會明顯增加。此外，利用對照品 SOD (100 U/ml) 當百分之百超氧自由基清除劑。另外，也測試化合物對 xanthine oxidase 的抑制作用，方法類似上述之條件，不過，反應液中不需加入 cytochrome *c*，並將偵測吸光波長改為 295 nm，以偵測尿酸的形成。而尿酸的吸光係數為 $\epsilon_{295}=11,000$ M⁻¹cm⁻¹ (Fridovich, 1970)。

4.3.3 抗發炎活性評估

4.3.3.1 細胞培養

RAW264.7 細胞是來自新竹菌種中心的鼠類單核-巨噬細胞株。培養於 DMEM 培養基中，其中含 10% 胎牛血清 (FBS) 和 1 mM sodium pyruvate 及 100 units/ml penicillin，置於 37°C 恆溫且含有 5% CO₂ 之培養箱中，二至三天更換培養液，細胞長滿後進行細胞繼代培養。

細胞之繼代培養為先將 flask 內之培養液倒出，取冰 PBS 倒入 flask 內，後輕拍 flask，將含有細胞之 PBS 吸取入 50ml 離心管中，離心 900 r.p.m.、10 分鐘，加入適量培養液使其均勻懸浮，在依比例分配至不同之 flask 後繼續培養。

4.3.3.2 亞硝酸試驗 (nitrite assay)

測量培養液中亞硝酸的濃度，做為 NO 產生的指標。方法是根據 Griess reaction (Green *et al.*, 1982) 而來。簡言之，將 1×10^5 cells/1ml 種在 24-well plates 或 15cm dish 上，在 phenol-red free DMEM 培養液中培養 48 小時後更換培養基，經過加藥處理適當的時間後，再給予 LPS (1 μ g/ml) 刺激 24 小時，測量培養液中 nitrite 的含量。nitrite 的測法是取 40 μ l 的 Griess reaction (其組成分為 20 μ l 6.5 M HCl、20 μ l 37.5 mM sulfanic acid 及 20 μ l 12.5 mM N-(1-naphthyl)-ethylene-diamine dihydrochloride)，加入 200 μ l 的培養液中靜置 10 分鐘後，用 EL312e microplate reader (Bio-Tek) 測 550 吸光值。nitrite 的含量可利用 NaNO₂ 標準曲線換算而來。

4.3.3.3 西方墨點法

4.3.3.3.1 收集細胞

經上述測 NO 後的 15cm dish，使用 PBS wash 其培養基，加入適量 lysis buffer (20mM Tris、100mM NaCl、1mM EDTA、1% Triton X-100、7mL complete protease inhibitor、PH=7.5)，在冰上利用刮刀將細胞刮下，以冷熱交替法破細胞，以 4°C、12000rpm. 離心 30 分鐘，取上清液到心的微量離心管中，保存於 -40°C 備用。

4.3.3.3.2 電泳檢定法 (electrophoresis)

SDS-PAGE 電泳，乃利用界面活性劑 SDS (sodium dodecyl sulfate) 附在蛋白質疏水區表面，由 SDS 本身所帶之負電荷引導泳動。由於蛋白本身所帶電荷遠小於附著之 SDS 分子，因此蛋白質本身的電荷對泳動率沒有影響，泳動率只決定於蛋白質分子量，故 SDS 電泳適合測定蛋白質的分子量。在樣本處理過程中，利用加熱破壞蛋白質的三級及四級結構，使其分子內部的疏水區暴露而與 SDS 結合；加入還原劑可破壞蛋白質分子內的雙硫鍵，常用還原劑有 β -mercaptoethanol 或 dithiothreitol。

電泳條件設定為：定電壓 150 V 進行電泳。待追蹤染料跑出膠片外，關掉電源，取出膠片中的膠體。

4.3.3.3.3 酵素免疫染色法

蛋白質經電泳之後，由電泳轉印法將蛋白質轉印至 PVDF 轉印膜，先利用專一性抗體 (一次抗體)，對抗原蛋白質進行辨識。本論文使用間接標定法 (indirect labeling)，即使用對一次抗體的抗體 (二次抗體) 再進行一次專一性的辨識結合，在二次抗體上連結有特定的呈色酵素 (horse radish peroxidase, HRP 或 alkaline phosphatase, AP)，可以經由酵素反應而呈色。此步驟可以提高抗體的專一性，染色的靈敏度也大幅的提升。

(1) HRP 呈色系統：

1. 將 Urea-PBST 洗過的轉印膜再以 PBST 洗三次，每次 10 min。
2. 加入適量的明膠-NET，反應 30 min。
3. 加入以明膠-NET 稀釋至適當倍數的一次抗體，室溫下反應 1 h。

- 4.以 PBST 洗三次，每次 10 min。
- 5.加入以明膠-NET 稀釋至適當倍數的二次抗體 (HRP-GAM 2nd-Ab)，室溫下反應 1 h。
- 6.以 PBST 洗 3 次，每次 10 min。
- 7.加入 DAB，可在 5~30 min 呈色。若天冷可置於 37°C 烘箱增快反應；在背景顏色尚未變深前，倒去呈色劑，以蒸餾水清洗數次。
- 8.免疫呈色結果的好壞，取決於每次清洗步驟是否完全、徹底；過於隨便的清洗步驟會造成染色結果不良。

(2) AP 呈色系統：

- 1.起始步驟與 HRP 系統相同，為所加之二次抗體為 biotinylated 2nd-Ab (anti-mouse)，室溫下反應 1 h。
- 2.以 PBST 洗 3 次，每次 10 min。
- 3.加入預先混合 30 min 之 A+B 試劑，反應 1 h。
 - i.以 PBST 洗 2 次，每次 10 min。
 - ii.以 AP 緩衝液 (1×) 洗 2 次，每次 10 min。
 - iii.加入呈色劑呈色，可在 5~30 min 內得到紫黑色色帶，若天冷可置於 37°C 烘箱增快反應；在背景顏色尚未變深前，倒去呈色劑，以蒸餾水清洗數次。

將呈色完全的 PVDF 膠膜，浸入 100% 甲醇 1 min，如此可避免呈色基質未洗淨而造成染好的 PVDF 背景顏色加深。

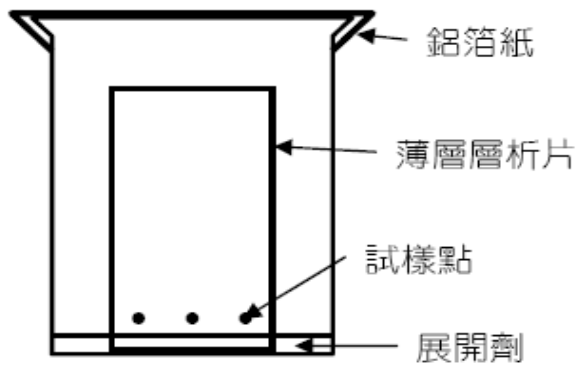
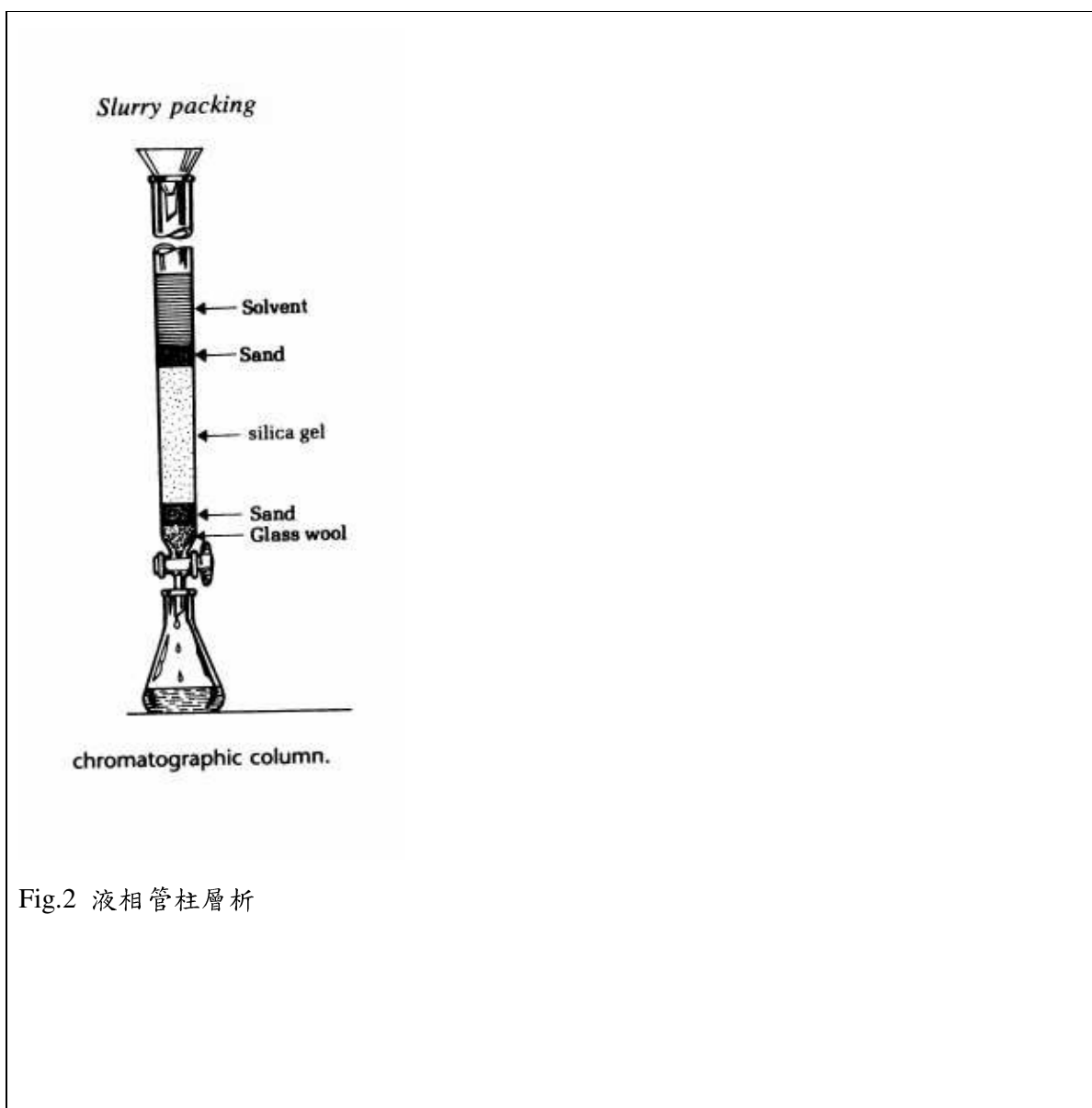


Fig. 1 薄層層析片展開



(五) 研究結果與討論

5.1. 檀香酒精萃取物對 LPS 引發巨噬細胞 NO 生成作用之影響

為了探討萃取液是否影響 RAW264.7 巨噬細胞 NO 生合成之作用，因此將 RAW264.7 細胞給予 LPS 處理 24 小時後，藉由測量細胞培養液中 nitrite 的含量作為 NO 生成指標。結果如圖 3 可知，檀香抑制效果良好，其抑制 50% 之 LPS 誘發的 NO 生成量產生時的濃度 (IC_{50}) 為檀香 $11.6 \pm 2.9 \mu g/mL$ 。

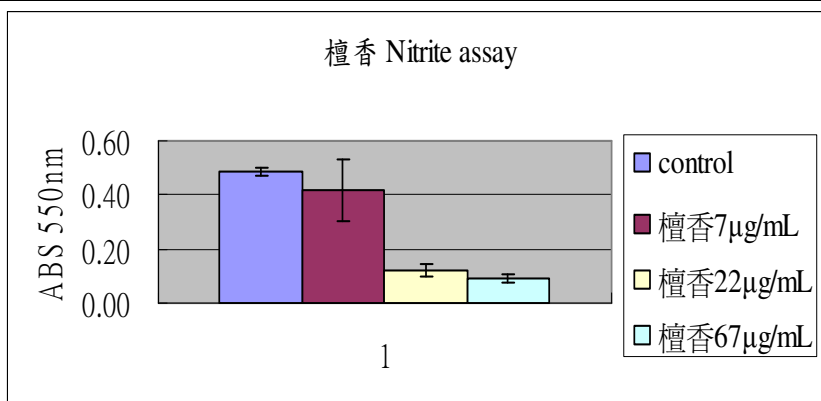


圖 3. 檀香酒精萃取液對 LPS 引發 NO 生成作用之影響

將檀香酒精萃取液之不同濃度，加入 RAW264.7 培養液中兩小時後，再進行 LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) 刺激 18~20 小時後，以 griess reaction 測培養液中 NO_2 之含量，以其 A550 nm 吸光值作表示，data 為 $\text{mean} \pm \text{S.E.}$ ($n=3$)。

3.2 以管柱層析法分離純化中草藥萃取物

將 Nitrite assay 中活性最佳的檀香粗萃液，以管柱層析法進行分離純化，首先利用不同有機溶劑比例點 TLC，決定不同比例沖提液，通 silica gel column，沖提液極性由低極性至高極性，由圖 4 顯示可知分別為 n-hexane 2.5 與 EA 1.5 分出 Fraction 1/1.12g/mL 及 Fraction 2/0.36g/mL、n-hexane 0.5 與 EA 3.5 分得 Fraction 3/0.4g/2mL、EA 2 與 Acetone 2 分得 Fraction 4/3.03g/15mL、EA 1 與 EtOH 1 分得 Fraction 5/0.36g/2mL 及 Fraction 6/0.03g/mL、EA 1 與 EtOH 2 分得 Fraction 7/0.07g/mL、EA 1 與 EtOH 3 分得 Fraction 8/0.05g/mL、EA 1 與 EtOH 4 分得 Fraction 9/0.04g/mL、最後僅用 EtOH 沖提分得 Fraction 10/0.04g/mL。

檀香 75%酒精以五倍體積配製
Silica gel 60 column
(0.063~0.200mm)

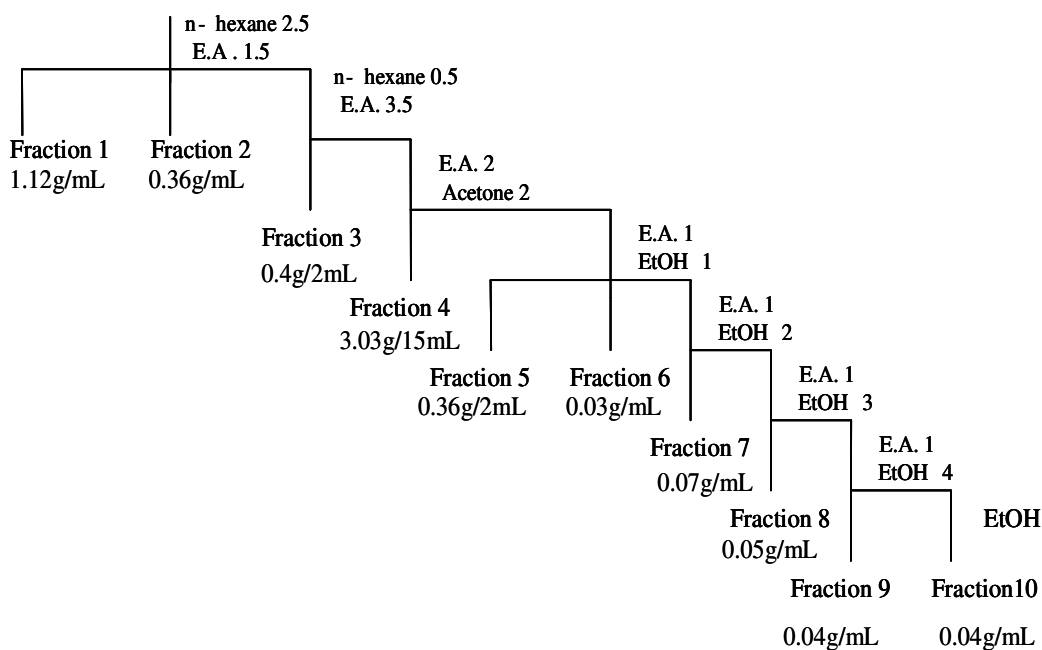


圖 4 檀香之酒精萃取液管柱分離純化流程圖

由檀香粗萃液進行管柱分離純化，首先利用不同有機溶劑比例點 TLC，決定不同比例沖提液，通 silica gel column，比例由極性低至極性高，分出 Fraction 1~10。

3.3 檀香萃取液分離純化後各分液對 LPS 引發 NO 生成作用之影響

在 Nitrite assay 活性測試 Fraction 1~10 中，由圖 5、表 1 結果可知，以 Fraction 6 效果最好，其次 Fraction 3 及 Fraction 1，而 Fraction 4 和 5 則居中，最差的是 Fraction 9，由表 2 結果可知，其抑制 50% 之有效濃度 (IC_{50}) 依序為 Fraction 6/ $13.6 \pm 1.3 \mu\text{g/mL}$ 、Fraction 3/ $19.7 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$ 、Fraction 1/ $28.5 \pm 2.0 \mu\text{g/mL}$ 、Fraction 2/ $30.1 \pm 4.3 \mu\text{g/mL}$ 、Fraction 5/ $30.7 \pm 11.0 \mu\text{g/mL}$ 、Fraction 7/ $37.5 \pm 1.1 \mu\text{g/mL}$ 、Fraction 8/ $40.0 \pm 2.8 \mu\text{g/mL}$ 、Fraction 4/ $54.9 \pm 5.4 \mu\text{g/mL}$ 、Fraction 10/ $56.8 \pm 4.2 \mu\text{g/mL}$ 及最差 Fraction 9/ $62.6 \pm 25.9 \mu\text{g/mL}$ ；在 MTT 毒性試驗中 (data not shown)，以 Fraction 4 存活率最高，其次是 Fraction 5，存活率最低是 Fraction 8。根據以上結果，本實驗選用 Fraction 4、5，雖然效果居中，但其毒性最低，若應用於化妝品中，降低對細胞之傷害。

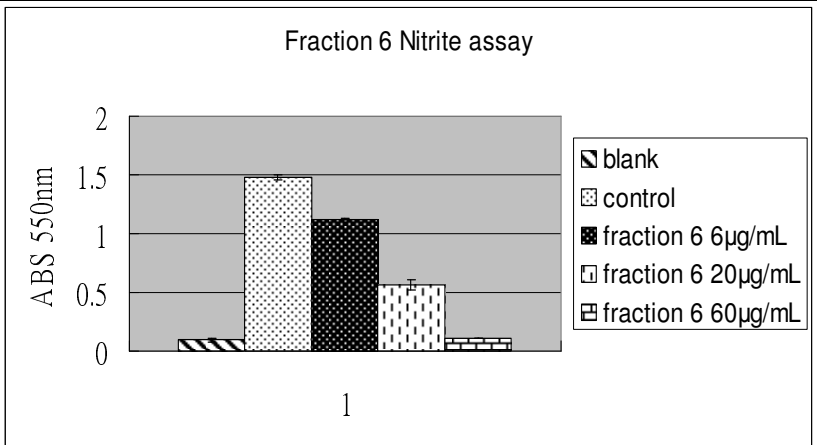


圖 5 檀香 Fraction 6 對 LPS 引發 NO 生成作用之影響

將 Fraction 6 不同濃度加入 RAW264.7 培養液兩小時後，再進行 LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) 刺激 18~20 小時後，測試培養液中 NO_2 之含量，以其 550nm 吸光值作表示，data 為 $\text{mean} \pm \text{S.E.}$ ($n=3$)。

表 1 檀香 Fraction 1~10 對 LPS 引發 NO 生成作用之影響

fraction	IC50 ($\mu\text{g/mL}$)
Fraction 1	28.5±20
Fraction 2	30.1±4.3
Fraction 3	19.7±0.1
Fraction 4	54.9±5.4
Fraction 5	30.7±11.0
Fraction 6	13.6±1.3
Fraction 7	37.5±1.1
Fraction 8	40.0±2.8
Fraction 9	62.6±25.9
Fraction10	56.8±4.2

3.4 探討檀香各分液抑制 RAW264.7 產生 iNOS 之能力

接續亞硝酸試驗後，利用巨噬細胞 RAW264.7，看其蛋白質酵素消長變化情形，偵測 iNOS 生成量，以 β -actin 進行細胞內偵測校正。由圖 6 結果可知，iNOS 校正過後，其 Fraction 4 及 5 有明顯隨著濃度改變而下降，兩者有抑制 iNOS 蛋白質合成之活性表現。

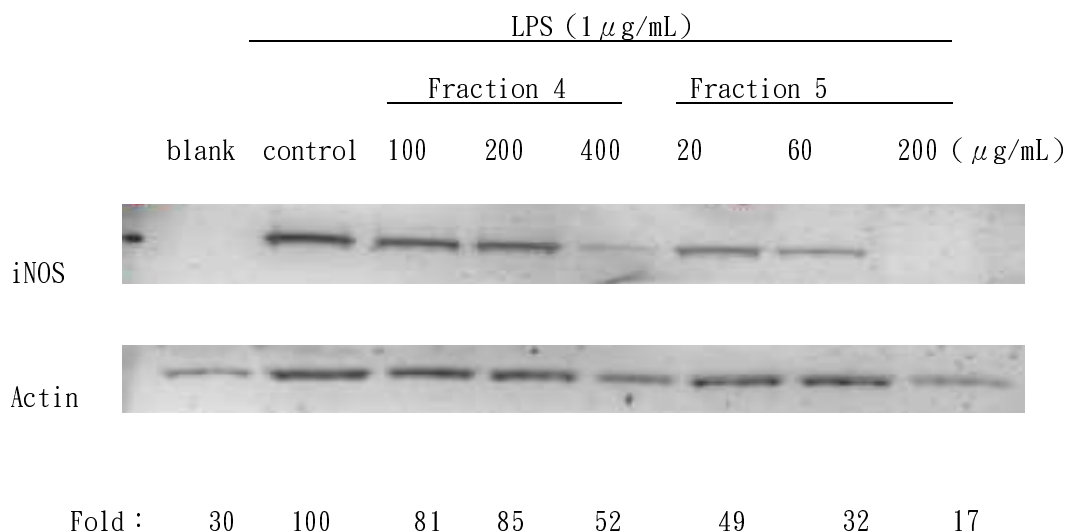


圖 6 檀香 Fraction 4、5 對 LPS 刺激 RAW264.7 細胞內 iNOS 表現之影響

檀香 Fraction 4、5 對 LPS 刺激 RAW264.7 細胞內 iNOS 表現之影響，用 Western blot analysis method，以 7.5% SDS-PAGE 加入細胞粗萃液，其蛋白質總量皆為 50 μ g/mL，Fold 代表 Fraction 4、5 經 β -Actin 校正過後，iNOS 密度之相對值。

(六) 結論

檀香進行管柱分離純化分析法，分得 Fraction 1~10。分離後檀香 Fraction 1~10 對 LPS 引發 NO 生成作用之抑制，以 Fraction 6 效果最好，其次 Fraction 3、Fraction 1，Fraction 4 和 5 在居中，最差是 Fraction 9。然而、檀香 Fraction 1~10 對 RAW264.7 之細胞毒性試驗(MTT assay, data not shown)中，以 Fraction 4 活率最高，其次是 Fraction 5。所以選用檀香 Fraction 4、5 對 LPS 刺激 RAW264.7 細胞內 iNOS 表現作分析，結果 iNOS 經過 β -Actin 校正過後，其 Fraction 4 及 5 有明顯隨著濃度而減低 iNOS 生成量，兩者皆有抑制 iNOS 蛋白質合成活性之表現。

植物有效成分之添加實為中草藥美容生技之研發重點，因而萃取液之活性分析及安全

評估至為重要，以本研究初步結果為例，最有效的成分可能同時具有毒性，因此，需要藉由部分純化之技術將有毒性之分液去除，經此步驟後，即可分離出安全有效的天然植物活性成分。

(七) 參考文獻

方春陽 (1986) 千金美容方，北京，中國古籍出版。

Aruoma, O.I., Halliwell, B. and Dizdaroglu, M. (1989) Iron ion-dependent modification of bases in DNA by the superoxide radical generating system hypoxanthine/xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* **264**: 13024-13028.

Aust, S.D., Morehouse, L.A. and Thomas, C.E. (1985) Role of metals in oxygen radical reactions. *Free Radic. Biol. Med.* **1**: 3.

Blatt, T., Muhr, G-M-, & Stab, F. (2009) Cosmetics for the elderly. In: Barel, A. O., Maibach, H., eds. Handbook of cosmetic science and technology. 3rd ed. New York : Informa, 61: 625-630

Byers, T. and Perry, J. (1992) Dietary carotenes, vitamin C, and vitamin E as protective antioxidants in human cancers. *Annu. Rev. Nutr.* **12**: 139-159.

Cefalu WT, Ye J, Zuberi A, Ribnicky DM, Raskin I, Liu Z, Wang ZQ, Brantley PJ, Howard L, Lefevre M. (2008) Botanicals and the metabolic syndrome Am J Clin Nutr. ;87(2):481S-7S.

Chen, C.C. and Wang, J.K. (1999) p38 but not p44/42 mitogen-activated protein kinase is required for nitric oxide synthase induction mediated by lipopolysaccharide in RAW 264.7 macrophages. *Mol Pharmacol.* **55**: 481-488.

Clarys, P., & Barel, A. O. (2009) New trends in antiaging cosmetic ingredients and treatments: An overview. In: Barel, A. O., Maibach, H., eds. Handbook of cosmetic science and technology. 3rd ed. New York : Informa, 27: 291-300

Duprat, F. (1995) Susceptibility of cloned K⁺ channels to ROS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92** : 11796.

Fridovich, I. (1970) Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* **245** : 4053-4057.

- Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S. and Tannenbaum, S.R. (1982) Analysis of nitrite, nitrate, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **126**: 131-138.
- Halliwell, B. (1997) Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr. Rev.* **55** :S44-S52.
- Harman, D. (2003) The free radical theory of aging. *Antioxidant Redox Signal* **5** : 557-561.
- Helfrich, Y.R., Sachs, D. L., & Voorhees, J. J. (2008) Overview of skin aging and photoaging. *Dermatology nursing*, 20(3), 177-183
- Helfrich, Y.R., .et al (2008) Overview of skin aging and photoaging. *Dermatology Nursing* **20(3)** : 177-183.
- Hertog, M.G.L., Feskens, E.J.M. and Hollman, P.C.H. (1993) Dietary antioxidant flavanoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* **342** : 1007-1011.
- Kang YJ, Jung UJ, Lee MK, Kim HJ, Jeon SM, Park YB, Chung HG, Baek NI, Lee KT, Jeong TS, Choi MS. (2008)Eupatilin, isolated from Artemisia princeps Pampanini, enhances hepatic glucose metabolism and pancreatic beta-cell function in type 2 diabetic mice. *Diabetes Res Clin Pract.* 82(1):25-32.
- Knowles, R.G. and Moncada, S. (1994) Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* **298** :249-258.
- Kramer, K. (1986) Influence of lipid peroxidation on β -adrenoceptors. *FEBS Lett.* **198**: 80.
- Lee, C.M. (1997) Age-associated alterations of the mitochondrial genome. *Free Radic. Biol. Med.* **22**: 1259.
- Maxwell, S.R.J. (1995) Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs* **49**: 345-361.
- Mellors, A. and Tappel, A.L. (1966) The inhibition of mitochondrial peroxidation by ubiquinone and ubiquinol. *J. Biol. Chem.* **241** : 4353-4356.
- Sevenian, A. and Hochstein, P. (1985) Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Annu. Rev. Nutr.* **5** : 365-375.
- Sies, H. (1997) Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* **82**: 291-295.
- Stadtman, E.R. and Berlett, B.S. (1998) Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging

and disease. *Drug Metabol. Rev.* **30**: 225-243.

Stampfer, M.J., Hennekens, C.H., Manson, J.E., Colditz, G.A., Rosner, B. and Willett, W.C. (1993) Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in women. *N. Engl. J. Med.* **328** : 1444-1449.

Stocker, R. and Frei, B. (1991) Endogenous antioxidant defences in human blood plasma. In Sies H, editor. *Oxidative stress: oxidants and antioxidants. London: Academic Press*, pp.213-243.