

薏苡籽實中具有抗過敏與對抗自由基傷害之活性成分的研究

Studies on anti-allergic activity and antagonism of free radical-induced damage by active components from adlay seed

計畫編號：NSC 89-2316-B-002-033

執行期限：89年8月1日至90年7月31日

主持人：江文章

協同主持人：郭悅雄、林璧鳳

執行機構及單位名稱：國立台灣大學食品科技研究所

一、中文摘要

本研究計畫之目的，乃欲分離純化出薏苡籽實中的抗氧化物質，並且進一步了解其對抗自由基傷害、消炎與抗過敏相關之機能性。研究結果顯示，由抗氧化活性最佳的薏苡殼正丁醇區分中，分離出二十一個純化合物，其中包括兩個新化合物 mayuenchinol 與 mayueninol。DPPH 自由基清除試驗的結果顯示，酚類化合物中之酚酸、酚醇與木酚素成分為主要活性之提供者，其中自由基清除活性優於 α -tocopherol 的化合物，包括 coniferyl alcohol、syringic acid、ferulic acid、syringaresinol 與新化合物 mayueninol。生物活性的檢定結果顯示，syringaldehyde、vanillin、*p*-hydroxybenzaldehyde、ferulic acid、naringenin、syringic acid、*p*-coumaric acid 與 coniferyl alcohol 能抑制 PMA 誘導嗜中性白血球產生超氧陰離子自由基；sinapaldehyde 與 coniferyl alcohol 具有抑制 LPS/IFN- γ 誘導巨噬細胞產生 \bullet NO 之能力；*p*-hydroxybenzaldehyde 與 sinapaldehyde

則能抑制 Con A 誘導小鼠脾臟細胞之增殖。這些結果顯示薏苡中的抗氧化活性成分具有抗發炎之能力。

二、英文摘要

The goal of our current research is to purify antioxidants from adlay seed. Besides, we are interesting in evaluating their ability on antagonism of free radical-induced damage and anti-inflammatory properties. Our studies showed that the butanol-soluble fraction from the methanolic extract of adlay hull (AHMP3) display multiple antioxidant effects, and we already separated 21 pure compounds from AHMP3. Two of them, mayuenchinol and mayueninol, are new compounds. Phenolic acid, phenolic alcohol and lignan were major free radical scavengers. Five active compounds, coniferyl alcohol, syringic acid, ferulic acid, syringaresinol and mayueninol demonstrate the higher ability than α -tocopherol on

DPPH scavenging. Syringaldehyde, vanillin, *p*-hydroxybenzaldehyde, ferulic acid, naringenin, syringic acid, *p*-coumaric acid and coniferyl alcohol were positive for inhibition of PMA-induced superoxide anion radical formation on neutrophil-like leukocytes. Sinapaldehyde and coniferyl alcohol inhibited nitric oxide production on LPS/IFN- γ activated macrophage. *p*-Hydroxybenzaldehyde and sinapaldehyde inhibited Con A-induced mouse splenocyte proliferation. These results suggest the antioxidants of adlay seed as anti-inflammatory agents.

三、緣由與目的

近年來活性氧屬 (reactive oxygen species, ROS) 在人類疾病所扮演的角色逐漸明朗。許多文獻指出，活性氧不僅是許多疾病的主因，更隨著組織傷害的發生而造成病灶更加惡化。目前已知與活性氧自由基相關的疾病多達五十多種。此類疾病之生成可能源自生物細胞內自由基之不正常過度產生或抗氧化保護系統之缺損而造成細胞內外之功能性胞器或生物分子氧化性破壞，因此自由基清除劑或抗氧化劑均可用於預防或治療某些相關疾病；如中風後腦細胞受氧化退化性傷害或粥狀動脈硬化症等，皆可以使用抗氧化劑進行預防與治療。

薏苡屬禾本科 (Gramineae) 一年生草本植物，目前在本省中南部地區栽培面積約有 200 公頃。在中國與日本的民間療法中，薏苡籽實一直被認為具有消炎與抗過敏等功效。由於自由基反應與一些炎性疾病的發生有密切的關係，因此，實有必

要探討薏苡籽實的清除自由基活性，以及是否藉此角色參與消炎與抗過敏的生理調節作用。

本研究計畫乃延續上年度之研究成果，繼續分離純化出薏苡籽實中活性更佳的抗氧化物質，並進一步探討其對抗自由基傷害、消炎、抗過敏與防癌等生物活性之相關研究。主要的研究項目為 (1) 以化學分離技術，配合清除 DPPH 自由基的檢定模式，分離純化出清除自由基之活性成分。(2) 將分離所得的清除 DPPH 自由基活性成分，進行生物系統中活性氧與活性氮自由基之清除試驗。此外並進一步探討清除自由基活性成分對與發炎相關生物研究模式之抑制效應。

四、研究方法

1. 清除自由基活性成分之分離與純化：以化學分離技術 (包括溶劑分配層析、Diaion HP-20 樹脂管柱層析、LH-20 膠體過濾層析、矽膠管柱層析、RP-18 膠體管柱層析、正相與逆相高效液相層析等方式)，配合清除 DPPH 自由基的檢定模式，分離純化出清除自由基之活性成分。
2. 清除自由基活性成分對生物系統活性氧與活性氮之清除試驗：包括 PMA 誘導嗜中性白血球產生超氧陰離子自由基以及對 LPS/IFN- γ 誘導巨噬細胞產生一氧化氮自由基之生物檢定。
3. 消炎相關生物研究模式之檢定：以抑制 Con A 誘導小鼠脾臟細胞增殖作為指標。

五、結果與討論

在蕙苡籽實中，由於 DPPH 自由基清除劑主要存在於蕙苡殼甲醇萃取物中之正丁醇層 (AHMP3) (上年度國科會計畫 NSC89-2313-B-002-016 之部分成果)，因此，本年度的研究乃以 AHMP3 為材料，進行活性成分的純化工作。AHMP3 以 Diaion HP-20 樹脂管柱層析得到的六個次區分 (D1 ~ D6)，其中以 AHMP3D2 具有最高的活性；其活性可媲美抗氧化劑 α -tocopherol。因此後續的分離純化工作乃選擇此區分，進行整體性的研究。

研究的進行首先以 TLC 片作初步篩選，以便檢索各區分中所含化合物的種類與數目，並藉此尋求區分物後續最佳的分離策略。之後以不同的層析方式，包括溶劑分配層析 (partition chromatography, PC)、開放管柱層析 (open column chromatography, OCC)、快速管柱層析 (flash column chromatography, FCC)、高效液相層析 (HPLC) 與製備型薄層分析 (PTLC) 等，配合不同的分離膠體或管柱 (如 Diaion HP-20 樹脂、矽膠、Sephadex LH-20 膠體、RP-18 膠體) 來進行分離與純化的工作。純化後的區分，初步以 $^1\text{H-NMR}$ 光譜分析檢測其純度。光譜分析之不純物再以上述的層析方式純化之；若為純化合物則利用熔點、紅外線光譜、一維核磁共振光譜、二維核磁共振光譜、質譜等進行結構之解析。之後並進行活性之分析。

結果顯示，AHMP3D2 主要由酚類化合物組成，經純化後得到 21 個純化合物，包括十九個酚類化合物 vanillin、*p*-hydroxybenzaldehy、syringaldehyde、sinapaldehyde、coniferyl alcohol、

ω -Hydroxypropioquiainone、 α -hydroxyacetovanillone、*trans-p*-coumaric acid、syringic acid、ferulic acid、1,3-*O*-diferuloylglycerol、4-ketopinonesinol、mayuenolide、syringaresinol、dehydroconiferyl alcohol、mayueninol、mayuenchinol、tricin、naringenin，以及兩個非酚類之長鏈化合物 methyl azlate 和 methyl 9-acetoxynononoate。

其中 mayueninol 與 mayuenchinol 為新化合物，而 coniferyl alcohol、 α -hydroxyacetovanillone、syringic acid、ferulic acid、1,3-*O*-diferuloylglycerol、syringaresinol、methyl azlate 與 methyl 9-acetoxynononoate 為首次由蕙苡中所分離出來之化合物。DPPH 自由基清除性試驗的結果顯示，酚類化合物中之酚酸、酚醇與木酚素成分為主要活性之提供者，其中自由基清除活性優於 α -tocopherol 的化合物，包括 coniferyl alcohol、syringic acid、ferulic acid、syringaresinol 與新化合物 mayueninol。

對生物系統中清除活性氧與活性氮之探討上，由於部分所純化出的抗氧化成分含量太少，故只選擇其中分離得到的量較多的成分進行研究。對 PMA 誘導似嗜中性白血球產生超氧陰離子自由基抑制效應，結果顯示試驗的八種化合物皆具有抑制 PMA 誘導似嗜中性白血球產生超氧陰離子自由基之作用，naringenin、syringic acid、*p*-coumaric acid 與 coniferyl alcohol 在 100 $\mu\text{g/mL}$ 的濃度下，其抑制率大約 20%，ferulic acid 的抑制率約 31%，而酚醛類化合物的抑制效果最好，並且隨著其苯環結構上甲氧基數目的增加，抑制活性也隨之上升，分別是 syringaldehyde (57%) > vanillin (42%) > *p*-hydroxybenzaldehyde

(41%)。

在 LPS/IFN- γ 誘導巨噬細胞產生一氧化氮自由基的研究模式中發現，sinapaldehyde 與 coniferyl alcohol 具有抑制 $\cdot\text{NO}$ 生成之能力，在 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的濃度下，其約可抑制 20% $\cdot\text{NO}$ 之產生。由於 $\cdot\text{NO}$ 在慢性發炎疾病中扮演重要角色，此結果顯示 sinapaldehyde 與 coniferyl alcohol 可能為薏苡抗發炎作用的有效成分之一。

目前有許多的證據指出，T 淋巴球的增殖與活化，對發炎性反應的病灶之持續，扮演十分重要之角色；此乃因 T 淋巴球可以活化發炎性細胞，包括肥大細胞、嗜伊紅性白血球、嗜中性白血球與巨噬細胞等，進而造成一些發炎媒介物質的產生，而加深了發炎的病況。因此，目前學者們利用此 Con A 誘導 T 細胞活化的模式，可初步了解所測試的樣品是否具有抑制 T 淋巴球介發炎反應之功能。結果顯示 *p*-hydroxybenzaldehyde 與 sinapaldehyde 具有劑量依存性的抑制 Con A 誘導小鼠脾臟細胞增殖之效果，因此其對因 T 淋巴球的增殖與活化，而導致的發炎性疾病具有抗發炎之潛力。

六、計畫成果自評

綜合本研究結果，我們認為以薏苡殼藉由其所含有的特殊抗氧化活性成分而具有多元清除自由基以及消炎等之機能性。目前在台灣的市場的薏苡相關產品中，除了極少數是含有薏苡殼為機能性素材所開發的產品外，大多皆屬於薏苡仁之產品。由於整粒薏苡籽實中薏苡殼約佔總重量百分比之 35.8%，如此高含量的薏苡殼，目

前皆被作為廢棄物處理，因此根據本研究的結果，以薏苡殼或其萃取物當作機能性素材，來開發新的保健食品，除了對薏苡原料進行充分的利用之外，亦可增加產品本身的附加價值。感謝國科會對本研究計畫之補助，本計畫成果不僅有極高的學術價值，對於開發新的保健食品亦提供有利佐證。

七、參考文獻

1. 江文章。2000。糙薏仁中具有消除自由基和降血脂活性成分之分離及其生物活性之研究。八十九年度保健食品研究開發計畫心得發表會論文集。行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告。台北。
2. 郭靜娟。2001。薏苡籽實之抗氧化成分及其抑制自由基傷害之研究。國立台灣大學食品科技研究所博士論文。台北。
3. 劉桂萍。2000。薏苡殼甲醇萃取物清除自由基成分之分離與純化。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文。台北。
4. Kuo, C.C., Shih, M.C., Kuo, Y.H. and Chiang, W. 2001. Antagonism of free-radical induced damage of adlay seed and its antiproliferative effect in human histolytic lymphoma U937 monocytic cells. *J. Agric. Food Chem.*49:1564-1570.