

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

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

Studies on the Separation of Radical Scavengers and Hypolipidemic Components of Dehulled Adlay and Its Biological Activity

計畫編號：NSC89-2313-B-002-016

執行期限：88 年 8 月 1 日至 89 年 7 月 31 日

主 持 人：江文章

協同主持人：郭悅雄

計畫參與人員：郭靜娟、劉桂萍、余嚴尊

執行機構及單位名稱：國立台灣大學食品科技研究所暨化學系

一、中文摘要

本研究的目的，乃欲分離純化薏苡籽實中，清除 DPPH 自由基與降血脂活性成分，並進一步探討其生物活性。抗氧化方面的結果顯示，不同部位薏苡籽實甲醇萃取物中，不論抗氧化性、清除 DPPH 自由基與還原力，其能力由強而弱，分別為薏苡殼>薏苡種皮>薏苡麩皮>糙薏仁>精白薏仁；在活性氧的清除性部分，於 PMS-NADH 系統所產生的超氧陰離子自由基，在試驗的濃度系統下，薏苡殼甲醇萃取物有較佳的清除能力，薏苡種皮次之，而薏苡麩皮卻有促進超氧陰離子生成之能力，糙薏仁與精白薏仁則無影響；生物系統中的超氧陰離子抑制性試驗，薏苡籽實不同部位之甲醇萃取物皆有抑制中性白血球產生超氧陰離子之能力，其能力的強弱，依序是薏苡殼 > 薏苡種皮 > 薏苡麩皮 > 糙薏仁 > 精白薏仁。在過氧化氫的清除性試驗中，除了薏苡殼與種皮外，其它各區分的活性並不佳。以核糖核酸的降解探討經基自由基的清除能力，薏苡種皮、麩皮、糙薏仁與精白薏仁皆有促氧化的作用，薏苡殼在較低濃度表現出促氧化

的現象，然而隨著濃度的提高反而有抗氧化的情形。此外，薏苡籽實對抗自由基傷害的研究中，仍以薏苡殼甲醇萃取物表現出廣泛的生物活性，包括抑制黃嘌呤氧化酶的活性，對受到 *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BOOH) 氧化傷害的 U937 細胞具有保護作用。針對上述的結果發現在薏苡籽實中，以薏苡殼甲醇萃取物其整體的抗氧化性表現最佳，因此後續研究以薏苡殼甲醇萃取物為原料，進行清除 DPPH 自由基活性成分之分離純化。而薏苡殼甲醇萃取物中的清除 DPPH 自由基活性成分，目前已得到五個具有清除 DPPH 自由基的活性成分，分別為 5-hydroxyindole-3-carbaldehyde、dehydrodiconiferyl alcohol、4-oxopinorelinol、mayuenolide、4-hydroxy-3,5-dimethoxy-(*E*)-cinnamaldehyde。降血脂方面的結果顯示，糙薏仁甲醇萃取物具有抑制膽固醇酯轉移蛋白 (CETP) 的活性，而再經體外及體內試驗的結果比對下，發現糙薏仁甲醇萃取物的乙酸乙酯層 (M-EA) 中，存在有更強抑制 CETP 活性的成分[相對抑制性為 30% (體外)、39% (體內)]，會使倉鼠體內之 CETP 活性降低並使

HDL/VLDL+LDL 比值上升。進一步分離 M-EA, 在 20%EA/Hex 溶劑沖提之次區分物 (M-EA-sf4) 呈現出 49% 的 CETP 抑制活性, 惟其確切成分仍待分離鑑定。另外, 有趣地發現糙薏仁甲醇萃取物的正己烷層區分物 (M-H) 及渣之水萃取物 (MR-W), 雖未在體外試驗中有抑制 CETP 活性, 但在以倉鼠為對象的血液生理指標卻見同抑制 CETP 活性的表現, 此現象是否意味著糙薏仁中仍有非抑制 CETP 活性的降血脂成分, 值得進一步探討。

Abstract

The goal of our current research is to separate and purify active components of antioxidative and hypolipidemic aciton from adlay seed. Besides, we are interesting in evaluating the their biological activities. The methanolic extracts from different part of adlay seeds were named as AHM (hull), ATM (testa), ABM (bran) and PAM (polished adlay). The antioxidative activity against linoleic acid peroxidation, reducing power, and scavenging effect in DPPH radicals were follow the order of AHM > ATM > ABM > DAM > PAM. When the PMS-NADH superoxide anion radical-producing system is used, the scavenging effect of the samples were in the order of AHM > ATM. PAM was inactive on scavenging superoxide anion radicals. However, ABM promoted the formation of superoxide anion radicals. The scavenging effect of hydrogen peroxides by AHM and ATM were about 20% at a dose 250 µg/mL. PAM and ABM were not capable of reacting directly with hydrogen peroxide in this assay. Using the deoxyribose degradation method

for determination of hydroxyl radicals, AHM inhibited the damage of deoxyribose at higher concentration. And it accelerated the oxidative damage of deoxyribose at a concentration of 250 µg/mL, but its prooxidative activity was weaker than that of ATM, ABM and PAM. Inhibitory effect of the enzymatic oxidation from xanthine to uric acid was found to follow the order of AHM > ATM > ABM. However, PAM was inactive for inhibition of xanthine oxidase activity. All test samples were positive for inhibition of TPA-induced free radical formation on neutrophil-like leukocytes, and found to follow the order of AHM > ATM > ABM > PAM. When human histolytic lymphoma U937 monocytic cells exposed to *tert*-butyl hydroperoxide that AHM exhibited the protective effect against cytotoxicity. However, ATM, ABM and PAM did not show any cytoprotective effect in this model system. Our studies showed that the AHM display multiple antioxidant effects, and we already separated five DPPH scavenger. There were 5-hydroxyindole-3-carbaldehyde, dehydrodiconiferyl alcohol, 4-oxopinorelinol, mayuenolide, 4-hydroxy-3,5-dimethoxy-(*E*)-cinnamaldehyde. The hypolipidemic results of dehulled adlay showed that its methanol extracts could reduce cholesterol ester transfer protein (CETP) activity by fluorescent-CE transfer assay. Either the results *in vitro* or *in vivo*, we observed the ethyl acetate fraction (M-EA) of dehulled adlay methanol extracts exist intensive CETP inhibitors (relative CETP inhibition activity was 30% *in vitro* and 39% *in*

vivo),elevate the ratio of HDL/ VLDL + LDL in hamster. In our further separating program for CETP inhibitors from M-EA fraction, M-EA-sf4 subfraction was extracted on silica gel with 20% EA/Hex. show 49% relative CETP inhibition activity but identified component still unclear. On the other hand, despite of the n-hexane fraction (M-H) and water extract fraction (MR-W) of dehulled adlay methanol extract didn't inhibit CETP activity, but showed hypolipidemic effect in hamster and from that dehulled adlay seem like exist other hypolipidemic components not like CETP inhibitor.

二、緣由與目的

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。其籽實是藥食兼用的材料，不論在傳統醫學與近代科學的研究，皆顯示具有抑制腫瘤、免疫促進、抗過敏、降血糖、抗氧化、抗致突變、降血脂等生理機能性。因此，若能以薏苡籽實為材料，進行生理調節功能與活性成分的研究，並進而開發具保健功效的健康食品，則除了能給予國人對防治退化性疾病（癌症、腦血管疾病、心臟病、糖尿病、高血壓）提供幫助外，亦能在台灣建立薏苡健康食品產業。

我們以消除自由基和降血脂作為本年度計畫中篩選有效成分的模式，其原因有下列兩點：(1) 雖然目前有關薏仁降血脂的文獻不少，但卻都未進一步探討其活性成分；(2) 自由基與心血管疾病、癌症等退化性疾病的發生有密切的關係，因此由薏苡籽實中分離出的自由基消除劑或抗氧化劑，可能亦具有其他抗動脈粥狀硬化、

抗腫瘤等生理調節作用，故值得探討。

三、結果與討論

(一) 抗氧化方面

在抗氧化性方面，以抑制亞麻油酸過氧化為檢定模式，在系統濃度為 8 ppm 時其過氧化抑制率，分別為 BHT (98%) > α -tocopherol (85%) > 薏苡殼甲醇萃取物 (AHM) (84%) > 薏苡種皮甲醇萃取物 (ATM) (74%) > 薏苡麩皮甲醇萃取物 (ABM) (69%) > 糙薏仁甲醇萃取物 (DAM) (61%) > 精白薏仁甲醇萃取物 (PAM) (51%)。而在 DPPH 自由基之清除效應方面，薏苡籽實各區分之 EC_{50} (the efficient concentration of antioxidant decreasing DPPH by 50%) 分別為 BHT 14 μ g/mL、 α -tocopherol 31 μ g/mL、AHM 80 μ g/mL、ATM 566 μ g/mL、ABM 795 μ g/mL、DAM 1590 μ g/mL、PAM 1707 μ g/mL。此外薏苡殼甲醇萃取物也具有極佳的還原力，遠超過其他四區分的效果。薏苡籽實各區分甲醇萃取物之螯合鐵離子的能力並不強。在活性氧的清除性部分，於 PMS-NADH 系統所產生的超氧陰離子自由基，在試驗的濃度系統下，薏苡殼甲醇萃取物有較佳的清除能力，薏苡種皮次之，而薏苡麩皮卻有促進超氧陰離子生成之能力，糙薏仁與精白薏仁則無影響；生物系統中的超氧陰離子抑制性試驗，薏苡籽實不同部位之甲醇萃取物皆有抑制嗜中性白血球產生超氧陰離子之能力，其於 200 μ g/mL 的系統濃度下，抑制能力的強弱，依序是薏苡殼 (80%) > 薏苡種皮 (50%) > 薏苡麩皮 (18%) > 糙薏仁 (10%) = 精白薏仁 (10%)。在過氧化氫的清除性試驗中，除了薏苡殼與種皮外，其它各區分甲醇萃取物的活性並不佳。以核糖核酸的降解探討經基自由基的清除能力，薏苡種皮、麩皮、糙薏仁與精白薏仁皆有促氧化的作用，薏

苡殼在較低濃度表現出促氧化的現象，然而隨著濃度的提高反而有抗氧化的情形。

目前有許多的證據顯示，超氧陰離子自由基等氧化之自由基與黃嘌呤氧化酵素 (XOD) 本身會參與許多疾病的機轉。薏苡籽實各區分對 XOD 之抑制性的強弱依序為 Allopurinol > AHM > ATM = ABM > DAM = PAM。在 250 $\mu\text{g/mL}$ 的濃度下，正標準品 Allopurinol 對 XOD 之抑制性為 83%，AHM 為 60%，ATM 與 ABM 約為 40%，而 DAM 與 PAM 則約為 15%。

此外，以 *t*-BOOH 誘導 U937 細胞之氧化壓力，進而探討薏苡籽實不同部位之甲醇萃取物其對氧化迫傷之細胞的保護作用。結果發現，U937 細胞暴露於終濃度 500 μM 之 *t*-BOOH 三個小時後，約有 54% 的細胞死亡，薏苡籽實不同部位之甲醇萃取物，除了 AHM 具有對抗氧化壓力以保護細胞外，其餘四個區分 (ATM、ABM、ADM、APM) 皆不具有保護作用。AHM 對於細胞死亡的抑制率具有劑量依存之關係，於 200、100 與 50 $\mu\text{g/mL}$ 的試驗濃度下，分別具有 38.9、33.6 與 10.4 % 的抑制率 (死亡的細胞由 54.5% 分別降到 33.2、36.2 與 48.9%)。

彙整薏苡籽實不同部位之甲醇萃取物，其抗氧化性、清除自由基與對抗自由基傷害等相關生物活性之研究結果，發現薏苡殼甲醇萃取物 (AHM) 除了在螯合亞鐵離子的研究模式上不具有活性外，在其它的模式系統中皆扮演不同的調控功能；尤其在清除 DPPH 自由基與抑制 PMA 誘導嗜中性白血球產生超氧陰離子自由基的研究模式中，有最佳的作用活性，其 EC_{50} 皆約為 80 $\mu\text{g/mL}$ 左右。因此在進一步的研究中，將以薏苡殼甲醇萃取物 (AHM) 作為活性成分分離之材料，並配合清除 DPPH 自由基的檢測模式，進行分離

純化的工作。

薏苡殼甲醇萃取物中清除 DPPH 自由基活性成分，目前已得到五個活性純化合物，其中 5-hydroxyindole-3-carbaldehyde 的 EC_{50} 為 47 $\mu\text{g/mL}$ ，dehydrodiconiferyl alcohol、4-oxopinorelinol 與 mayuenolide 的 EC_{50} 為 60 ~ 80 $\mu\text{g/mL}$ ，4-hydroxy-3,5-dimethoxy-(*E*)-cinnamaldehyde 的 EC_{50} 為 150 $\mu\text{g/mL}$ 。5-Hydroxyindole-3-carbaldehyde 是經矽膠管柱層析 (EA/n-Hex=60~80%) 得到，再經 HPLC (EA/n-Hex=6/4) 純化而得的黃色不定形固體。Dehydrodiconiferyl alcohol 是經矽膠管柱層析 (EA/n-Hex=80~100%) 得到，接著以甲醇為沖提劑的 Sephadex LH-20 管柱層析，最後再經 HPLC (EA/ CH_2Cl_2 =7/3) 純化而得的白色不定形固體。4-Oxopinorelinol 是經矽膠管柱層析 (EA/n-Hex=60~80%) 得到，再經 HPLC (EA/ CH_2Cl_2 =1/4) 純化而得的棕色油狀物。Mayuenolide 是經矽膠管柱層析 (EA/n-Hex=60~80%) 得到，再經 HPLC (EA/ CH_2Cl_2 =1/4) 純化而得的淡黃色顆粒固體。4-Hydroxy-3,5-dimethoxy-(*E*)-cinnamaldehyde 是經矽膠管柱層析 (EA/n-Hex=40~60%) 得到，再經 HPLC (EA/Hex=3/2) 純化而得的固體。

(二) 降血脂方面

在 CETP 的抑制活性方面，體外試驗的結果顯示糙薏仁甲醇萃取物 (CL-M) 具有 17-23% 的抑制能力，而其經溶劑分配的區分物中，除正己烷層區分物 (M-H) 與甲醇萃後薏仁渣之水萃物 (MR-W) 未見抑制性外，乙酸乙酯層 (M-EA)、1-丁醇層 (M-B) 及水層區分物 (M-W) 層均見不同程度的抑制性，尤其 M-EA 層及 M-B 層之抑制能力更較 CL-M 為強。

這些萃取區分物經動物試驗後發現，體內的 CETP 相對活性，仍以 CL-M、M-EA 及 M-B 層區分物抑制效果好。這與體外試驗的結果有不錯的相對應性。不過，對血漿總膽固醇及血漿脂蛋白膽固醇含量的影響卻並未出現一致性。在血漿總膽固醇方面，CL-M、M-B 及甲醇萃後薏仁渣 (MR) 飼料組與高脂飼料組 (HC) 間沒有顯著性地差異，其餘飼料組皆有降低。在脂蛋白膽固醇方面，極低密度脂蛋白膽固醇 (VLDL) 與高密度脂蛋白膽固醇 (HDL) 含量各飼料組與 HC 組間未有顯性的差異。但 CL-M2、M-H 及 MR-W 飼料組的低密度脂蛋白膽固醇 (LDL) 卻有顯著地較 HC 組為低。另外，HDL/VLDL+LDL 比值，除 M-W 及 MR 與 HC 差異不大外，其他各組均大幅增加。由此結果更進一步顯示部份飼料組 (CL-M、M-EA、M-B) 雖未在個別脂蛋白膽固醇上完全呈現 CETP 抑制活性的表現，但仍見抑制 CETP 活性後整體脂蛋白膽固醇改變的趨勢。再者，有趣的是 M-H 組與 MR-W 組，其雖未能在體外及體內試驗中具有抑制 CETP 活性之能力，但卻可增加 HDL/VLDL+LDL 比值，並且由其他生理指標如肝臟及糞便脂質結果亦顯示具有降血脂的功能，這是否意味著糙薏仁中存在有非抑制 CETP 活性的降血脂成分，值得進一步研究。

由以上結果綜合顯示，選擇 M-EA 層尋找抑制 CETP 的活性成分。M-EA 層經矽膠管層析後之次區分物重量分配與其抑制 CETP 活性的結果，其中以 M-EA-sf4 (20%Hex/EA 沖提物) 及 M-EA-sf5 (100%EA 沖提物) 二個次區分物有較 CL-M 與 M-EA 層區分物更強抑制 CETP 活性的能力，分別為 49 與 27 %。此二次區分物，目前經 HPLC 分析，初步得知仍有 4-6 個以上的不同成分，其確切化學分子結構仍在分離鑑定中。

四、計畫成果自評

本研究系列性地探討薏苡籽實之抗氧化性與調節血脂之機能性，並有一些重要的發現，包括釐清薏苡籽實不同部位之抗氧化與對抗自由基傷害之作用能力，並純化出一些清除自由基之活性成分，此外，也進一步了解糙薏仁調節血脂之細部區分及其作用機制。

在機能性成分的純化部分，雖然拿到五個活性不錯的清除自由基之純化合物，但仍有許多活性成分尚未被分離出來，我們目前仍持續的進行，並期待有更令人雀躍的成果；而 CETP 活性抑制劑的分離，目前已近完成的階段，唯其確切的化學分子結構目前仍在鑑定中。

本研究的結果具有學術價值，目前以投稿到國外著名的學術期刊。整體結果，不論對薏苡機能性之科學化證明與建構健康食品開發之資訊，皆有相當大的貢獻。

五、參考文獻

1. 杜姿瑩。1999。糙薏仁降血脂作用之研究。台大食科所碩士論文。台北。
2. 劉伯康，陳惠英，顏國欽。1999。數種傳統食用植物甲醇萃取物抗氧化性之研究。中國農業化學會誌 37：105-116。
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。台大食科所碩士論文。台北。
4. 楊莉君，陳美櫻，許文音，白永河，喻小珠，蔡敬民。1998。薏仁對高血脂病患者脂質與血糖之影響。食品科學 25:727-736。
5. Su, J.D. 1992. Investigation of antioxidative activity and tocopherol

contents on Chinese crude drugs of fruits
or seeds. Food Sci. 19:12-24.