

計畫編號：DOH89-TD-1050

行政院衛生署八十九年度科技研究發展計畫

**保健食品材料-杜仲抗氧化機能性之研究**  
**Studies on Antioxidant Functionality of Du-zhong**  
**- Health Food Material**

研究報告

執行機構：國立中興大學食品科學系

計畫主持人：顏國欽

研究人員：謝秋蘭

執行期間：88年7月1日至89年6月30日

# 目錄

中文摘要.....	4
英文摘要.....	5
前言.....	6
材料與方法.....	8
結果.....	16
一、杜仲水萃取物對 Cu <sup>2+</sup> 誘導 LDL 氧化生成 TBARS 之影響.....	16
二、杜仲水萃取物對 Cu <sup>2+</sup> 誘導 LDL 氧化生成共軛雙烯之影響.....	16
三、杜仲水萃取物對 Cu <sup>2+</sup> 誘導 LDL 氧化相對電泳移動量之影響.....	17
四、杜仲葉水萃取物之乙酸乙酯之區分物在製備型 TLC 板上之分離.....	17
五、杜仲葉水萃取物之區分物抑制銅離子誘導 LDL 氧化修飾之影響.....	18
六、抗氧化成分的結構鑑定.....	18
七、杜仲水萃取物酚類化合物之水解及分析.....	19
八、原兒茶酸與杜仲水萃取物對 Cu <sup>2+</sup> 誘導 LDL 氧化修飾之影響.....	20
討論.....	21
結論與建議.....	24
參考文獻.....	25

## 圖次

圖 一、不同銅離子濃度對LDL之氧化修飾.....	31
圖 二、杜仲水萃取物對銅離子誘導 LDL 氧化修飾形成 TBARS 之影響..	32
圖 三、杜仲水萃取物對銅離子誘導 LDL 形成共軛雙烯之影響.....	33
圖 四、杜仲水萃取物對銅離子誘導 LDL 氧化修飾之電泳圖.....	34
圖 五、杜仲葉水萃取物、杜仲葉水萃取物之乙酸乙酯區分層及其 TLC 之 區分層對對銅離子誘導 LDL 氧化修飾之影響.....	36
圖 六、杜仲葉水萃取物 X 之 $^1\text{H}$ 核磁共振光譜圖.....	37
圖 七、杜仲葉水萃取物 X 之 $^{13}\text{C}$ 核磁共振光譜圖.....	38
圖 八、杜仲葉水萃取物 X 之質譜圖.....	39
圖 九、多酚化合物及杜仲水萃取物之 HPLC 層析圖.....	40

# 表次

表 一、杜仲葉水萃取物之乙酸乙酯區分物於製備型 TLC 板上展開後之不同區分層產率、 $R_f$ 值及 UV 光照顏色.....	35
表 二、杜仲水萃取物中原兒茶酸的含量.....	41
表 三、杜仲水萃取物及原兒茶酸對銅離子誘導 LDL 氧化修飾之影響.....	42

## 摘要

本研究主要是探討杜仲水萃取物對銅離子所誘導人類低密度脂蛋白(low-density lipoprotein; LDL)氧化修飾之影響。隨著銅離子(0-50  $\mu\text{M}$ )濃度的提高，LDL 的氧化修飾也隨之增加。在  $\text{Cu}^{2+}$  誘導 LDL 氧化修飾的系統中加入杜仲水萃取物，經由 TBA 反應物(TBARS)、共軛雙烯(CD)的形成及電泳相對移動量(REM)的測定，結果顯示杜仲水萃取物皆有抑制銅離子所誘導 LDL 氧化修飾之效應，其中以杜仲葉水萃取物效果最佳，其次為炒杜仲，最差者為生杜仲。將抗氧化效果最佳的杜仲葉水萃取物，以乙酸乙酯萃取後，經製備型 TLC 板分離後可得六個 Band。以抗 LDL 氧化修飾效果最佳的 Band 2 ( $R_f=0.40$ )，經製備型 HPLC 再純化，收集單一 peak 進行 NMR 及 MS 之分析，結果得 Band 2 主要的抗氧化物質為原兒茶酸(protocatechuic acid; PCA)。將杜仲水萃取物經酸水解再以 HPLC 分析其中原兒茶酸的含量，發現杜仲水萃取物中含有高量的原兒茶酸，其中杜仲葉含量最高 17.17 mg/g，再其次為炒杜仲 2.99 mg/g，最少者為生杜仲 1.16 mg/g。在相同濃度下(10  $\mu\text{g/mL}$ )，將 PCA 與杜仲水萃取物對銅離子所誘導 LDL 氧化修飾之影響做比較，結果發現 PCA 之抗 LDL 氧化修飾的能力優於杜仲葉水萃取物及 ascorbic acid，顯示 PCA 可能是杜仲葉水萃取物中提供抗 LDL 氧化修飾能力的主要來源之一。

中文關鍵詞：杜仲、人類低密度脂蛋白、銅離子、氧化修飾、原兒茶酸

## Abstract

This study investigated the effect of water extracts from leaves, raw cortex, and roasted cortex of Du-zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) on the oxidative modification of human low-density lipoprotein (LDL) induced by copper ion ( $\text{Cu}^{2+}$ ). With increasing concentration of  $\text{Cu}^{2+}$ , oxidative modification of LDL also increased. Through determination of the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and conjugated diene (CD) as well as relative electrophoretic mobility (REM), all extracts of Du-zhong were found to possess inhibitory effect on the oxidative modification of LDL induced by  $\text{Cu}^{2+}$ . The leaf extract had the most significant inhibitory effect, the roasted cortex extract exhibited modest inhibition while the raw cortex extract had the least inhibitory effect. The ethyl acetate extract from leaf extract of Du-zhong was separated into six bands by preparative TLC. Band 2 ( $R_f=0.40$ ), which was most inhibitory to LDL oxidative modification, was analyzed by HPLC; and the single, main peak was collected and further examined by NMR and MS. The antioxidant compound thus identified was protocatechuic acid (PCA). The leaf extract of Du-zhong had the highest PCA content (17.17 mg/g), and that of roasted cortex and raw cortex had 2.99 mg/g and 1.16 mg/g PCA, respectively. At the concentration of 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , PCA showed the stronger inhibitory effect toward LDL oxidative modification induced by  $\text{Cu}^{2+}$  than that of Du-zhong extracts and ascorbic acid at the same concentration. The results suggest that in leaf extract of Du-zhong, PCA could be a major source for its inhibitory effect on LDL oxidative modification induced by  $\text{Cu}^{2+}$ .

Key words : Du-zhong, human low-density lipoproteins, copper ion, oxidative modification, protocatechuic acid

## 前言

動脈硬化所造成之腦血管疾病、心臟與高血壓疾病一直位居國內十大死因之前茅。研究指出動脈粥狀硬化(atherosclerosis)與 LDL 的氧化修飾有密切的關係(Steinberg et al., 1989; Esterbauer et al., 1992)。LDL 的氧化修飾會受巨噬細胞(macrophage)表面清除受體(scavenger receptor)的攝入(uptake)，隨之形成泡沫細胞，再隨著時間的累積，膽固醇、脂蛋白、血小板、結締組織及鈣質等會沈積於動脈血管內膜而形成板塊(plaque)，最後導致動脈增厚變狹，因此種下動脈粥狀硬化的病灶(Berliner and Heinecke, 1996; Jialal et al., 1996)。為了預防動脈粥狀硬化早期脂肪條(fatty streak)的形成，抑制 LDL 的過氧化及降血脂藥物的使用為目前最常用的方法(Tangney, 1997)。抗氧化劑的使用可有效的抑制 LDL 過氧化，其主要的機制是藉由清除自由基及螯合金屬離子，而終止 LDL 過氧化的作用。

雖然天然及合成的抗氧化劑皆有抑制 LDL 過氧化之作用，進而減少心血管疾病(Diaz et al., 1997)，但是一些合成的抗氧化劑於動物試驗發現會有一些負面影響，如 BHA、BHT 會導致老鼠前胃(forestomach)產生腫瘤及引起染色體變異(Phillips et al., 1989; Shahidi and Wanasundara, 1992)。因此如何由天然抗氧化劑的攝取來抑制 LDL 的過氧化，進而改善動脈粥狀硬化是目前重要的研究課題。

研究顯示茶葉及葡萄汁(Vinson et al., 1995; Frankel et al., 1998)中的多酚化合物具有良好的抑制 LDL 過氧化的特性。另外，植物中的類黃酮(flavonoid)及酚酸化合物(phenolic acid) 亦有不錯的清除自由基及螯合金屬離子的能力，進而抑制 LDL 的過氧化。Hagerman

等(1998)指出高分子量的植物多酚化合物(單寧)具有良好的清除 peroxy radical 的效果，可當為生物性抗氧化劑。由前面的實驗發現杜仲有抑制脂質過氧化生物分子及細胞氧化傷害之效應，此可能與其中的多酚含量有良好的正相關。研究發現杜仲茶具有降低膽固醇的功能及抑制脂肪肝的發生(Nakasa et al., 1995)。Nakazawa (1997)也指出杜仲茶具有降低血壓的功能，而高膽固醇及高血壓與動脈硬化有某些程度的相關性，且動脈粥狀硬化與 LDL 的氧化修飾有密切的關係。因杜仲水萃取物有良好降低膽固醇及高血壓及抑制脂質過氧化的功能，因此杜仲是否具有抑制 LDL 氧化修飾的功能，且其中的抗氧化物質是何種化合物，此物質的抗氧化性又如何，皆未有文獻探討。因此本研究主要是探討杜仲水萃取物抑制銅離子所誘導 LDL 氧化修飾的能力，及其中抗氧化成分的鑑定及抗氧化成分的抗氧能力探討。

# 材料與方法

## 一、實驗材料

### (一) 杜仲

本研究所採用之杜仲(*Eucommia ulmoides* Oliv.)包括葉、生杜仲及炒杜仲皮購自台中市明興蔘藥房。

### (二) 試藥

Protocatechuic acid、ascorbic acid、butylated hydroxytoluene (BHT)、phosphotungstic acid、1,1,3,3-tetramethoxypropane、sodium dodecyl sulfate (SDS)等購自美國Sigma公司。Copper sulfate pentahydrate ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )、sodium chloride (NaCl)、thiobarbituric acid (TBA)及trichloroacetic acid (TCA)等購自德國E. Merck公司。Sodium dihydrogen-phosphate、disodium hydrogenphosphate、potassium bromide、ethylenedinitrilotetra-acetic acid disodium salt dihydrate (EDTA)等購自日本和光純藥公司。Agarose gel、barbital buffer、sudan black等購自法國Biomidi公司。n-Hexane、methanol、ethyl acetate、chloroform、n-butanol、tetrahydrofuran、o-phosphoric acid等購自台灣皓鋒公司。

### (三) 血液來源

由志願者提供。

## 二、實驗方法

### (一) 杜仲水萃取物之製備

將10 g樣品剪碎或磨碎後，加入100 mL去離子水，然後於100°C迴流1小時，冷卻後過濾，再以冷凍乾燥去除水分，分別計算萃取率後於-20°C凍藏備用。

### (二) LDL 的分離

根據Yamanaka等(1997)的方法，將血液以3000 rpm離心10 min，即可取得血清。取2.7 mL血清於超高速離心管中，加入0.9 mL的0.15 M NaCl和0.3 mM EDTA (pH 7.4)，以超高速離心機(Himac CS 120 GX, Hitachi)在100000 rpm、10°C下離心7 min。離心後，將上層白色部分的乳糜微粒去除，取出2.7 mL再加入0.9 mL的0.15 M NaCl和0.3 mM EDTA (pH 7.4)，再以100000 rpm、10°C下離心2.5 h。離心後，將上層的VLDL去除，再取出2.7 mL加入225 mg的KBr，再以100000 rpm、10°C下離心2.5 h。離心後可在上層看到一層金黃色的LDL，將其取出進行透析。

### (三) LDL 的透析

取長度約10 cm的透析膜(SnakeSkin™ Pleated Dialysis Tubing, code No. 68700)一端封緊，加入適當量的LDL於透析膜中，並儘量使內部不要殘留空氣，再加入100倍體積的phosphate buffer saline

[PBS (125 mM NaCl, 4.28 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 0.14 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), pH=7.4]。在 4°C 冷房進行透析，2.5 h 之後更換新 PBS，於 3 h 後再更換新 PBS，最後隔夜透析。將其取出以 Bio-Rad protein assay kit 定量蛋白質濃度。透析後的 LDL 可充氮氣，以鋁箔紙包住避光於 4 °C 冷房下儲存約一星期。

PBS 的配法為取 1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 60 mL，加入 10 mL 的 1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 混和均勻後備用。取 5 mL 上述溶液加進 7.305 g 的 NaCl，並加入去離子水使總體積至 1 L。

#### (四) 杜仲水萃取物對銅離子誘導 LDL 氧化修飾之影響

##### 1. LDL 之氧化

將透析且蛋白質定量後的 LDL 以適當濃度加入杜仲水萃取物、其他標準品及 Cu<sup>2+</sup> (CuSO<sub>4</sub> 水溶液)，對照組則以 PBS 取代杜仲水萃取物、其他標準品及 Cu<sup>2+</sup>。將此置入 37 °C、120 rpm 的振盪保溫箱中進行氧化反應，不同時間取出量測各種氧化因子之變化量，以評估 LDL 氧化情形。

##### 2. TBA 反應物(Thiobarbituric acid reactive substances; TBARS)生成的測定

根據 Yagi (1989) 的方法。將 LDL (100 µg protein/mL)、10 µM Cu<sup>2+</sup> 和 10 µg/mL 的樣品，於 37 °C 下反應不同時間後，取出 100 µL，加入 50 µL 4% (w/v) BHT、500 µL 0.3% (w/v) SDS、2 mL 0.1 N HCl 及

0.3 mL 10% (w/v) phosphotungstic acid。混和均勻後加入 1 mL 0.8% (w/v) TBA，於 100 °C 水浴加熱 45 min。經冷卻再以 3 mL 之 n-butanol 萃取後，取上層液以螢光光度計 (650-40 Fluorescence spectrophotometer, Hitachi) 測 Ex. 515 nm 和 Em. 555 nm 之螢光值。以 1,1,3,3-Tetramethoxypropane 做標準曲線，求算 MDA 的含量。

### 3. 共軛雙烯(conjugated diene, CD)生成的測定

根據 Bourne 和 Rice-Evans (1997) 的方法。將 LDL (100 µg protein/mL)、10 µM Cu<sup>2+</sup> 和 10 µg/mL 的樣品，在 96-well plate 中反應，於不同氧化時間後，加入 150 µL EDTA (1.2 mM) 混合均勻。取出 100 µL 加入 900 µL iso-propanol 並以 12000 rpm 離心 10 min。取其上清液，以分光光度計測波長 232 nm (U-3000 Spectrophotometer, Hitachi) 之吸光值之變化，直至 conjugated diene 生成量達最高，不再有明顯變化為止。

結果的判定乃先計算出誘導 LDL 氧化之 Lag phase (以 Propagation phase 的切線對 X 軸的截距代表 Lag phase)。若樣品有抑制 LDL 的氧化修飾作用，則其 lag phase 時間會增加，其時間愈長表示其抑制 LDL 氧化修飾效果愈佳。

### 4. LDL 電泳檢測其相對移動量(relative electrophoretic mobility, REM)改變之測定

根據 Miura 等(1994)的方法。先以蒸餾水配製(勿用去離子水，可保存一個月)電泳緩衝液 Barbital buffer，定量成 1 L。以 80 mL ethanol 與 4 mL sudan blank 攪勻，再加上 40 mL NaCl (20 g/L) 配成

染劑。以 150 mL ethanol 加 150 mL NaCl (20 g/L) 配成去染劑。以 90 mL Distilled H<sub>2</sub>O、30 mL 冰醋酸及 180 mL ethanol 配成固定液。

先將 buffer 倒入電泳槽中。取出 MIDIDEL LIPO (購自法國 Biomodi 公司)，以 blotters 將 gel 上的水吸乾，吸乾後在 gel 上放置 templates (其中含 10 well)。將 LDL (100 µg protein/mL)、10 µM Cu<sup>2+</sup> 和 10 (或 100) µg/mL 的樣品，反應 24 h 後，取 4 µL 點入 well 中，並將其置於室溫 5 min，使其滲入。然後用 blotter 將過多的反應液吸除。將 MIDIDEL LIPO 的正極朝電泳槽之正極，負極置於負極，皆浸入 buffer，通電 80 V，35 min，完畢後取出(儘量勿碰 gel 面)，取出 MIDIGEL 朝上於固定液中 10 min，然後置於蒸餾水中 5 min，最後將 MIDIGEL 取出乾燥(可用 70°C oven 乾燥 30 min 或用吹風機 5 min)，倒入染劑染色 10 min。將染劑置換成去染劑，脫色 2 次，MIDIGEL 以蒸餾水潤漬，乾燥 gel。計算其相對電泳移動量(relative electrophoretic mobility, REM)。

#### (五) 製備型 TLC 板層析杜仲葉水萃取物之乙酸乙酯區分物

取杜仲葉水萃取物之乾燥粉末 10 g 溶於 300 mL 水，再以等體積 (300 mL) 乙酸乙酯萃取 5 次(共 1500 mL)，得乙酸乙酯區分物，收率為 6.89 %。將此乙酸乙酯區分物以乙酸乙酯回溶，以此回溶溶液點於製備型矽膠薄層層析板上(5×20 cm, Kieselgel 60F, 厚度 0.25 mm, 購自德國 E. Merck 公司)。在展開系統 chloroform : methyl alcohol : acetic acid = 80 : 20 : 1 (v/v/v) 中展開。約 120 分鐘後出現 6 個 bands (band 1-band 6)。

## (六) 製備型高效能液相層析(HPLC)純化 TLC 板的區分物

高效能液相層析儀採用日本 Hitachi 公司之 LC-organizer，配備包括 Model L-6200 intelligent pump、Model D-2500 Chromato-integrator。固定相採用製備型管柱(Mightysil RP-18, 5  $\mu$ m, 250 $\times$ 20 mm i.d., Kanto Chemical Co., Tokyo, Japan)。移動相為 A 溶劑(2.4%tetrahydrofuran 及 0.25% *o*-phosporic acid 之水溶液)及 B 溶劑(甲醇)以所設定比例混合分析(如下表)，注射量 100-200  $\mu$ L。以 Hitachi L-4200 UV-Vis 偵測器偵測 280 nm 吸光值。從製備型 TLC 板層析所得到的 band 2 區分物，以製備型 HPLC 純化分離主要 peak (化合物 X)，再將此化合物 X 減壓濃縮至乾燥，將乾燥後的化合物 X 進行 NMR、MS 及 UV 分析。

HPLC 分析條件：

時間 (min)	A 溶劑 (%)	B 溶劑 (%)	流速 (mL/min)
0	98	2	1.0
4	88	12	1.0
32	35	65	1.0
55	60	40	1.0
65	98	2	1.0

## (七) 核磁共振光譜(NMR)分析

化合物 X 溶於 CD<sub>3</sub>OD 等溶劑，裝於 NMR tube 中，以 NMR 光譜儀器(Varian VXR-300S FT-NMR spectrometer, Harbor City, USA)測

試氫核或碳核在磁場作用下的吸收及其相對位置( $^1\text{H}$  NMR 以 299.95 MHz 磁場,  $^{13}\text{C}$  NMR 以 75.43 MHz 磁場)。光譜解析 tetramethylsilane (TMS)作為內部標準, 以  $\delta$  表示化學位移(Chemical shifts); s 表示單重峰(singlet); d 表示雙重峰(doublet); t 表示三重峰(triplet); q 表示四重峰(quartet); br 表示寬峰(broad); m 表示多重峰(multiplet)。

#### (八) 質譜儀

使用日本電子公司之 JEOL JMS-SX/SX 102A 型質譜儀(Tokyo, Japan), 以 EI-MS (electron impact mass spectra) 之方法分析。溫度由  $100^\circ\text{C}$  上升到  $300^\circ\text{C}$ , 每分鐘增加  $119.7^\circ\text{C}$ 。

#### (九) 紫外線-可見光光譜分析

使用日本 Hitachi 公司之 U-3000 Spectrophotometer 檢測。將樣品溶於甲醇, 正確測出樣品甲醇溶液之最大吸收值的波長。

#### (十) 酚類化合物之水解及分析

分別精秤杜仲葉、生杜仲、炒杜仲水萃取物各 2 g, 再加入 2.5 M 的  $\text{H}_2\text{SO}_4$  各 50 mL 及 20 mg 的內標 BHA (因 BHA 安定性佳且是在 HPLC 中能與樣品成分分開之酚類化合物, 故以此為內標), 混合均勻後個別拿至沸水水浴中酸水解 2 h。之後再加 50 mL 乙酸乙酯酸水解 30 min, 然後倒入分液漏斗分層, 個別收集上層之乙酸乙酯層及下層之水層後, 將水層再加入 50 mL 乙酸乙酯酸水解 30 min, 最後再以分液漏斗分層, 將上層的乙酸乙酯與之前所收集的合併, 而

水層則加入乙酸乙酯萃取至乙酸乙酯顏色幾乎呈無色為止，將乙酸乙酯合併，減壓濃縮定量即可。並取適當量注入 HPLC 分析，以 BHA 當內標計算其萃取過程之流失率，並以原兒茶酸標準品換算其真正之含量。

HPLC 分析條件：

管柱：LiChrosorb RP-18 (150× 4 mm，粒徑5 μM)德國E.

Merck公司

移動相：A液：2%醋酸、B液：氬甲烷

Gradient：

Time (min)	Mobile phase
0	100% A液
20	87% A液
60	60% A液
70	100% A液

流速：1 mL/min

偵測器：UV 偵測器 (280 nm)

### (十一) 數據統計分析

本研究之分析項目皆進行三重複之測定，所得實驗數據使用教育部工作站之統計分析系統(Statistical Analysis System, SAS, 1985 ) 進行分析。變異數分析則以 PROC ANOVA 及 Duncan's multiple range test 進行分析。

# 結果

## 一、杜仲水萃取物對Cu<sup>2+</sup>誘導LDL氧化生成TBARS之影響

以不同濃度的銅離子(0-50  $\mu\text{M}$ )，誘導 LDL 的氧化。由圖一發現，未加入銅離子(0  $\mu\text{M}$ )誘導氧化之 LDL，隨著時間的增加其螢光值未有明顯的增加。隨著銅離子濃度的增加，其螢光值最高點也會越早出現，亦即銅離子濃度越高其對 LDL 的氧化修飾就越明顯。因此以 Cu<sup>2+</sup> (10  $\mu\text{M}$ )誘導 LDL (100  $\mu\text{g protein/mL}$ )之氧化修飾，探討杜仲水萃取物對 LDL 氧化修飾之影響，結果如圖二所示。杜仲水萃取物(10  $\mu\text{g/mL}$ )，皆有抑制銅離子誘導 LDL 氧化修飾之效果。其中以杜仲葉水萃取物效果最明顯，其與 ascorbic acid 之抑制效果相近，在 24 h 前兩者沒有顯著差異( $p < 0.05$ )。未加入樣品僅有銅離子的系統中，在 11 h 其 TBARS 已達到最高量 52 nM MDA/mL，此時杜仲葉水萃取物尚未有明顯的 TBARS 產生。而生杜仲及炒杜仲水萃取物雖有抑制效果，但效果並不是很明顯。

## 二、杜仲水萃取物對Cu<sup>2+</sup>誘導LDL氧化生成共軛雙烯(CD)之影響

在 LDL (100  $\mu\text{g protein/mL}$ )、Cu<sup>2+</sup> (10  $\mu\text{M}$ )系統中加入杜仲水萃取物(10  $\mu\text{g /mL}$ )，探討其對於Cu<sup>2+</sup>誘導LDL氧化形成共軛雙烯之影響。由圖三，可看出系統中僅有LDL與銅離子(即未加入樣品)之控制組，其遲滯時間(lag time)為66 min。然而加入杜仲水萃取物皆有抑制LDL氧化修飾之作用，因此當系統內加入杜仲水萃取物，其lag time皆有延長之現象，其中以杜仲葉水萃取物及ascorbic acid效果最

佳，其lag time 可增加2倍，即其抑制LDL氧化修飾之效果可提高2倍，lag time為128 min。而生杜仲及炒杜仲水萃取物效果較差，其lag time分別為87及104 min，其中以生杜仲水萃取物抑制效果最差。

### 三、杜仲水萃取物對Cu<sup>2+</sup>誘導LDL氧化相對電泳移動量(REM)之影響

當 LDL 氧化時，其會增加其表面的電荷，氧化越嚴重其電荷增加越明顯，在經電泳後可區分其氧化程度的差異。當 LDL 移動距離越遠，表示 LDL 氧化的越嚴重，此時相對電泳移動量(REM)越大。由圖四結果顯示，以原態的 LDL 其 REM 為 1，加入 Cu<sup>2+</sup>(10 μM)後其 REM 增加為 3.8，即銅離子會明顯的促進 LDL 的氧化。此系統若再加入杜仲水萃取物(100 μg/mL)後，即能減少 LDL 氧化，而減少 REM。在反應 24 h 的 LDL 電泳片上發現，杜仲水萃取物中仍然以杜仲葉水萃取物及 ascorbic acid 效果最佳。將杜仲葉水萃取物稀釋 10 倍(10 μg/mL)後，其 REM 與生杜仲及炒杜仲水萃取物(100 μg/mL)效果相近，抑制 LDL 氧化修飾的能力效果不佳，因此其 REM 與僅有銅離子之 LDL(即未加入樣品之控制組)相近。

### 四、杜仲葉水萃取物之乙酸乙酯之區分物在製備型 TLC 板上之分離

以抑制銅離子所誘導 LDL 氧化修飾效果最佳的杜仲葉水萃取物，進一步純化鑑定其主要抗 LDL 氧化修飾之化合物。將杜仲葉水萃取物再經乙酸乙酯之區分，得乙酸乙酯區分物，將此區分物在製備型 TLC 板上進行分離純化，經分離後可得 6 個 band，其產率、Rf

值、UV 照射後之呈色，如表一所示。其中以 band 2 ( $R_f=0.40$ )的產率最高，可得到 42%。而 band 3 到 band 6 的產率相近都在 10-14% 左右。由於此展開系統的溶媒為 chloroform:methyl alcohol:acetic acid =80:20:1(V/V/V)，此固定相為 silica gel，因此 band 2 可斷定是屬於極性較高的化合物。

## 五、杜仲葉水萃取物之區分物抑制銅離子誘導 LDL 氧化修飾之影響

將杜仲葉水萃取物、杜仲葉水萃取物之乙酸乙酯區分物和經 TLC 板分離的各 band 的區分物，一起比較其抑制 LDL 氧化修飾之影響，結果如圖五。Band 2-4 及乙酸乙酯區分物的抗氧化性並沒有顯著差異( $p<0.05$ )，LDL 之氧化修飾之抑制率皆在 89%左右，與杜仲葉水萃取物之乙酸乙酯之區分物之抑制率相近。經分析型 HPLC 分析得知 band 2 純度最高，由於 band 2 的產率多且純度又高，因此以此區分物在製備型 HPLC 再進一步的純化，可得純度較高的化合物 X (由積分面積得化合物 X 佔總面積的 95%以上)，乾燥後此粉末為白色粉末，進行進一步的結構鑑定。

## 六、抗氧化成分的結構鑑定

經 HPLC 純化而得之純化物質為一白色粉末，再以 NMR 及 MS 等光譜方法進行結構鑑定，結果如圖六、圖七及圖八。此物質之質譜圖顯示其分子離子( $M^+$ )之質量為 154，而由裂片離子 137 ( $M-OH$ )<sup>+</sup> 及 109 ( $M-COOH$ )<sup>+</sup>，推測此物質可能有 OH 及 COOH 兩種官能基。由於 <sup>13</sup>C-NMR 光譜中有七個碳的訊號，表示此化合物最少應含有七個碳，再加上由質譜的斷裂模式可以判斷此物質有 OH 及 COOH 的

官能基，且分子量為 154，故推測分子式為  $C_7H_6O_4$ 。將化合物溶於甲醇檢測其 UV 光譜，得 UV 光譜之吸收峰為 248、258 及 293 nm，顯示純化物質 X 屬於 benzenoid 類。由  $^1H$ -NMR 光譜中，僅有三個在低磁場(down field)的氫吸收峰( $\delta$  7.43, 7.42 及 6.75)，可以得知此物質可能是一個三個取代基的苯環。這些氫之間的偶合分裂模式(splitting pattern)比較複雜，無法直接判斷其取代基的相對位置。但其中有一個吸收峰看似為單峰，故推測其所接的碳的相鄰位置之碳上無氫原子。但因  $^1H$ -NMR 中僅有三個氫的信號，使用之溶劑為  $CD_3OD$ ，故判斷其他三個氫應該屬 OH 或 COOH 等可交換之氫，故在氫光譜中無法測得。 $^{13}C$ -NMR 中，在  $\delta$  170.2 ppm 的吸收峰應為 COOH 之碳，其餘的六個吸收峰出現在 151.5-115.8 之間，顯示均屬  $sp^2$  之碳，亦即均為苯環上的碳。同時在  $^{13}C$ -NMR 中共有七個吸收峰，表示有七種不同的碳原子，再加上若由質譜所推測之分子式 ( $C_7H_6O_4$ ) 是正確的，則表示此分子沒有對稱。出現在 151.5 及 146.1 ppm 的兩個吸收峰可知此兩個碳原子應接有陰電性較大的原子，亦即可能接了 OH 基，故推測此分子有兩個 OH。以上的資訊，可以判斷此物質為一苯甲酸之衍生物，其苯環上有兩個 OH 取代基。配合其氫光譜偶合模式，可以推斷此化合物應為原兒茶酸(protocatechuic acid; PCA)。於是我們將 PCA 標準樣品(購自美國 Sigma 公司)之光譜與此物質之光譜詳細比對，發現其光譜均相同，且再配合文獻比對 (Pouchert, 1978; Zhang et al., 1998)，也確定為原兒茶酸，故可證實此純化物質為 PCA。

## 七、杜仲水萃取物之酚類化合物之水解及分析

將杜仲水萃取物水解後，經 HPLC 分析其酚類化合物之組成，

結果如圖九所示。圖九 a 為酚類化合物標準品之層析圖，圖九 b、圖九 c 及圖九 d 分別為杜仲葉生杜仲及炒杜仲之層析圖。由標準品層析圖之滯留時間可知杜仲水萃取物皆具有 11.26 min 之 PCA，其中以杜仲葉水萃取物之含量最高，且其中大部分都是 PCA。將 PCA 以 BHA 為內標換算其流失率，再以不同濃度之 PCA 為外標製得一標準曲線( $r>0.99$ )，計算杜仲水萃取物樣品中之 PCA 之含量，結果如表二，其含量依序為杜仲葉>炒杜仲>生杜仲。由此可知杜仲葉水萃取物中 PCA 是其酚類化合物中的主要酚類物質。

#### 八、原兒茶酸與杜仲水萃取物對 $\text{Cu}^{2+}$ 誘導 LDL 氧化修飾之影響

將杜仲水萃取物與杜仲葉水萃取物純化得到的純化合物 PCA，比較其對 LDL 氧化修飾之影響，結果如表三。在共軛雙烯 lag time、TBARS 及 REM 的測試，結果發現 LDL 加入 10  $\mu\text{M}$  的銅離子時，LDL 有明顯的氧化修飾，其 lag time 為 62.5 min、在反應 8 h 時 TBARS 產生量為 51.6 (nM MDA/mL) 及 REM 為 3.8。加入杜仲葉水萃取物其 lag time 為 115 min、TBARS 產生量降為 1.7，REM 也降為 2.0。加入 PCA 後，其抑制 LDL 氧化修飾之效果最佳。由表三之結果可看出抑制 LDL 氧化修飾之效果依序為 PCA>杜仲葉 $\geq$ ascorbic acid>炒杜仲>生杜仲水萃取物。由此可知杜仲水萃取物中的 PCA 在抑制 LDL 氧化修飾上扮演重要角色。

## 討論

由本年度結果發現杜仲葉水萃取物具有良好的抑制銅離子所誘導 LDL 的氧化修飾，其中以杜仲葉水萃取物效果最佳。LDL 中含有多量的脂質及膽固醇極易受金屬離子的誘導而發生氧化修飾作用，尤其是  $\text{Cu}^{2+}$ ，氧化修飾後的 LDL 被認為與心臟動脈粥狀硬化有密切的相關性(Steinberg et al., 1989; Esterbauer et al., 1992)。由本部分的研究發現杜仲葉水萃取物有良好的抑制 LDL 氧化修飾之功能，或許將來杜仲葉水萃取物在動脈粥狀硬化的預防上有良好的應用潛力。且依據 Nakazawa (1997)之研究指出杜仲茶(即杜仲葉水萃取物)有良好的降血壓及降血脂之功能，亦有降低膽固醇的功能及抑制脂肪肝的發生(Nakasa et al., 1995)。因此杜仲葉水萃取物未來在抑制動脈粥狀硬化上有進一步探討的空間。

流行病學顯示人們在一些疾病的罹患如癌症等與飲食有很大的關連，多攝取蔬菜水果可降低癌症的罹患，且其中主要的活性成分為酚類或類黃酮化合物(Block et al., 1992; Hollman and Katan 1999)，食物中的酚類化合物包括類黃酮及非類黃酮的多酚化合物。許多研究指出酚類化合物是紅酒及蔬果中的主要抑制 LDL 氧化的抗氧化物質，其中酚酸化合物是酚類化合物中重要的成分(Frankel et al., 1993; 1995; Meyer et al., 1997)。植物中的酚酸化合物大部分為 hydroxycinnamic acid (chlorogenic acid 和 caffeic acid)，hydroxybenzoic acid (protocatechuic acid) 及 ellagitannins 等，這些化合物具有很多的生理功能如抗致突變、抗氧化及抗癌性等(Tanaka et al., 1993; 1994)。

杜仲葉水萃取物中經分離純化鑑定，發現主要的抗氧化成分為

原兒茶酸(protocatechuic acid; PCA)，在同濃度下其抑制效果優於杜仲葉及 ascorbic acid。杜仲葉水萃取物中多酚物質含量高達 20% 以上，杜仲葉水萃取物的萃取率約為 10% (第一年度)，且杜仲葉水萃取物中的 PCA 含量也達 1.7 %。因此取 100 g 的杜仲葉，約可萃取得 10 g 的杜仲葉水萃取物；此 10 g 的杜仲葉水萃取物可得 2 g 多酚化合物；2 g 的多酚化合物中約可得 170 mg 的 PCA。Frankel 等(1998) 研究發現葡萄果汁中相當於含 10  $\mu$ M 的 gallic acid 的酚類含量即能抑制 62-75% 的 LDL 氧化，且由表 7-2TBARS 之結果發現 PCA 在 10  $\mu$ g/mL 的濃度下即可抑制 99% 的 LDL 氧化。因此每日飲用 10 g 的杜仲葉，其中可萃得 1 g 的杜仲葉水萃取物及含 17 mg 的 PCA，此劑量在體外即能有良好抑制 LDL 氧化修飾之效果。PCA 是一個簡單的酚酸化合物，許多可食植物水果及蔬菜中皆有含之，且被認為是一個強抗氧化劑(Ueno, 1993)。Ohnishi 等(1997)亦指出 PCA 能有效的抑制 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene 所誘導 hamster 臉頰的憩室癌。PCA 亦能有效的抑制 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)所誘導的老鼠皮膚癌的發生，因此 PCA 被認為是一個良好的化學防護劑(chemoprevention agent) (Tseng, et al., 1998)。由本部分結果也證明杜仲葉水萃取物中 PCA 在銅離子所誘導 LDL 氧化修飾的抑制上扮演重要角色。

紅酒中的多酚化合物一直被認為是抑制動脈粥狀硬化的重要化合物(Fuhrman et al., 1995)，且葡萄酒中的多酚化合物也被用來解釋，為何法國人民大吃魚肉而罹患心臟血管疾病卻少於歐美地區其他國家的所謂“法國式矛盾(France paradox)”理論。紅酒中的多酚化合物能抑制 LDL 的氧化修飾，Abu-Amsha 等(1996)認為其中牽涉的機制有兩種：1. 金屬離子的螯合能力 2. 自由基的清除能力。Yashino 和

Murakami (1998)也指出非類黃酮類的多酚化合物如 protocatechuic acid 及 chlorogenic acid 與  $Fe^{2+}$ ，能形成不活性化的  $Fe^{2+}$ -polyphenol 複合物，此複合物不能與氧起氧化反應；且 protocatechuic acid 及 chlorogenic acid 能清除活性氧，因此可當為一良好的抗氧化劑。PCA 能抑制 t-butylhydroperoxide 所誘導肝細胞的細胞及基因毒性，其中主要機制被認為是清除自由基所致(Tseng et al., 1996)。因此本研究發現 PCA 是杜仲葉水萃取物中有效的抑制 LDL 氧化修飾的重要化合物，其中所牽涉機制應不外是金屬離子的螯合及自由基的清除。

雖然 PCA 在體外有良好的抗氧化性，但在體內並未有文獻報導。然而有報告指出未接糖苷鍵的花青素(cyanidin)在體內被代謝成 protocatechuic acid，因此 PCA 被 Tsuda 等(1999)認為是血清中主要的抗氧化物質。由此似乎可間接證明 PCA 在體內是有其抗氧化特性的，由本實驗結果得知杜仲葉水萃取物有良好的抑制 LDL 氧化修飾之功能，且 PCA 在杜仲水萃取物的抑制 LDL 氧化修飾上佔有重要的角色。因此建議每日多飲用杜仲茶應能對自由基及活性氧所引發的疾病有相當程度的抑制作用，且其中所含的 PCA 在體內應能提供一定程度的抗氧化作用。

## 結論與建議

由本研究結果得知不論是在 TBARS、共軛雙烯(CD)的形成及電泳相對移動量(REM)上，杜仲水萃取物皆有抑制銅離子所誘導 LDL 氧化修飾之效應，其中以杜仲葉水萃取物效果最佳，其次為炒杜仲，最差者為生杜仲。將抗氧化效果最佳的杜仲葉水萃取物，進一步分離純化鑑定，得主要的抗氧化物質為原兒茶酸。將杜仲水萃取物經酸水解再以 HPLC 分析其中酚類化合物發現杜仲水萃取物中含有高量的原兒茶酸，其中杜仲葉含量最高 17.17 mg/g，再其次為炒杜仲 2.99 mg/g，最少者為生杜仲 1.16 mg/g。此 PCA 含量與抗 LDL 氧化修飾呈正相關，顯示 PCA 可能是杜仲葉水萃取物中提供抗 LDL 氧化修飾能力的主要來源之一。

由本部分的研究發現杜仲葉水萃取物有良好的抑制 LDL 氧化修飾之功能，或許將來杜仲葉水萃取物在動脈粥狀硬化的預防上有良好的應用潛力，值得進一步探討。

## 参考文献

- Abu-Amsha, R., Croft, K. D., Puddey, I. B., Proudfoot, J. M. and Beilin, L. J. 1996. Phenolic content of various beverages determines the extent of inhibition of human serum and low density lipoprotein oxidation in vitro: identification and mechanism of some cinnamic derivatives from red wine. *Clin. Sci.* 4: 49-58.
- Berliner, J. A. and Heinecke, J. W. 1995. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* 20: 707-727.
- Block, G., Patterson, B. and Subar, A. 1992. Fruit, Vegetables, and cancer prevention: a review of epidemiological evidence. *Nutrition and Cancer* 18: 1-29.
- Bourne, L. and Rice-Evans, C. A. 1997. The effect of the phenolic antioxidant ferulic acid on the oxidation of low density lipoprotein depends on the pro-oxidant used. *Free Rad. Res.* 27: 337-344.
- Diaz, M. N., Frei, B., Vita, J. A. and Keaney, J. F. 1997. Antioxidant and atherosclerotic heart disease. *N. Engl. J. Med.* 337: 408-416.
- Esterbauer, H., Gebicki, J., Puel, H. and Jurgens, G. 1992. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic. Biol. Med.* 13: 341-390.
- Frankel, E. N., Bosanek, C. A., Meyer, A. S., Silliman, K. and Kirk, L. L. 1998. Commercial grape juices inhibit the in vitro oxidation of human low-density lipoproteins. *J. Agric. Food Chem.* 46: 834-838.
- Frankel, E. N., Kanner, J., German, J. B., Parks, E. and Kinsella, J. E. 1993. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 341: 454-457.
- Frankel, E. N., Waterhouse, A. L. and Teissedre, P. L. 1995. Principal

- phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *J. Agric. Food Chem.* 43: 890-894.
- Fuhrman, B., Lavy, A. and Aviram, M. 1995. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am. J. Clin. Nutr.* 61: 549-554.
- Hagerman, A. E., Riedl, K. M., Alexander Jones, G., Sovik, K. N., Ritchard, N. T., Hartzfeld, P. W. and Riechel, T. L. 1998. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidant. *J. Agric. Food Chem.* 46: 1887-1892.
- Hertog, M. S. L., Feskens, E. J. M., Hollman, P. C. H., Katan, M. B. and Kromhout, D. 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 342: 1007-1011.
- Hertog, M. S. L., Hollman, P. C. H., Katan, M. B. and Kromhout, D. 1993. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. *Nutr. Cancer* 20: 21-29.
- Hollman, P. C. H. and Katan, M. B. 1999. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chem. Toxicol.* 37: 937-942.
- Hsieh, C. L. and Yen, G. C. 2000. Antioxidant actions of du-zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) toward oxidative damage in biomolecules. *Life Sci.* 66: 1387-1400.
- Jialal, I., Facn, M. D. and Fuller, C. J. 1996. Oxidatively modified LDL and atherosclerosis: an evolving plausible scenario. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 29:341-353.
- Kearney, J. F. and Frei, B. 1994. Antioxidant protection of low-density lipoprotein and its role in the prevention of atherosclerosis vascular disease. In "Nature Antioxidants in Human Health and Disease". ed. by B. Frei, Academic Press, San Diego, CA. 303-351.

- Kono, Y., Kashine, S., Yoneyama, T., Sakamoto, Y., Matsui, Y. and Shibata, H. 1998. Iron chelation by chlorogenic acid as a natural antioxidant. *Biosci. Biotech. Biochem.* 62: 22-27.
- Kono, Y., Kobayashi, K., Tagawa, S., Adachi, K., Ueda, A., Sawa, Y. and Shibata, H. 1997. Chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen. *Biochem. Biophys. Acta.* 1335: 335-342.
- Laranjinha, J., Alemeida, L. and Madeira, V. 1994. Reactivity of dietary phenolic acids with peroxy radicals: antioxidant activity upon low density lipoprotein peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* 48: 487-494.
- Laranjinha, J., Vieira, O., Madeira, V. and Alemeida, L. 1995. Two related phenolic : antioxidants with opposite effects on vitamin E content in low density lipoproteins oxidized by ferrylmyoglobin: consumption vs regeneration. *Arch. Biochem. Biophys.* 323: 373-381.
- Meyer, A. S., Yi, O-S., Pearson, D. A., Waterhouse, A. L. and Frankel, E. N. 1997. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation in relation to composition of phenolic antioxidants in grapes (*Vitis vinifera*). *J. Agric. Food Chem.* 45: 1638-1643.
- Miura, S., Watanabe, J., Tomita, T., Sano, M. and Tomita, I. 1994. The inhibitory of tea polyphenols (flavan-3-ol derivatives) on Cu<sup>2+</sup> mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *Biol. Pharm. Bull.* 17: 1567-1572.
- Nakamura, T. Nakazawa, Y., Onizuka, S. Satoh, S., Chiba A., Sekihashi, K., Miura, A., Yasugahira, N. and Sasaki, Y. F. 1997. Antimutagenicity of Tochu tea (an aqueous extract of *Eucommia ulmoides* leaves): 1. The clastogen-suppressing effects of Tochu tea in CHO cells and mice. *Mutat. Res.* 388: 7-20.
- Nakasa, T., Yamaguchi, M., Okinaka, O., Metori, K. and Takashi, S. 1995. Effects of Du-Zhong leaf extract on plasma and hepatic lipids in rats

- fed on a high fat plus high cholesterol diet. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* (in Japanese) 69: 1491-1498.
- Nakazawa, Y. 1997. Application of Du-Zhong tea in functionality and healthy properties. *Food industry* (in Japanese) 40: 6-15.
- Ohnishi, M., Yoshimi, N., Kawamori, T., Ino, N., Hirose, Y., Tanaka, T., Yamahara, J., Miyata, H. and Mori, H. 1997. Inhibition effects of dietary protocatechuic acid and costunolide on 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster cheek pouch carcinogenesis. *Jpn. J. Cancer Res.* 88: 111-119.
- Phillips, B. J., Carroll, P. A., Tee, A. C. and Anderson, D. 1989. Microsome-mediated clastogenicity of butylated hydroxyanisole (BHA) in cultured Chinese hamster ovary cell: The possible role of reactive oxygen species. *Mutat. Res.* 214: 105-114.
- Pouchert, C. J. 1978. *The Aldrich Library of Infrared Spectra*, 2nd ed., Aldrich Chem. Co. Inc., 2: 212B.
- SAS 1985. *SAS User's Guide: Statistics*, SAS Institute, Inc., Cary, NC.
- Shahidi, F. and Wanasundara, P. K. J. P. D. 1992. Phenolic antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 32: 67-103.
- Steinberg, D. 1992. Metabolism of lipoproteins and their role in pathogenesis of atherosclerosis. *Atherosclerosis Rev.* 18: 1-6.
- Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T. E., Khoo, J. C. and Witztum, J. L. 1989. Beyond cholesterol: Modifications of low density lipoprotein that increases its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.* 320: 915-924.
- Tanaka, T., Kojim, T., Kawamori, T., Wang, A., Suzui, M., Okamoto, K. and Mori, H. 1993a. Inhibition of 4-nitroquinoline-1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis by the naturally occurring phenolic caffeic, ellagic, chlorogenic and ferulic acids. *Carcinogenesis* 14: 1321-1325.

- Tanaka, T., Kojim, T., Kawamori, T., Yoshimi, N. and Mori, H. 1993b. Chemoprevention of diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis by a simple phenolic acid protocatechuic acid in rats. *Cancer Res.* 53: 2775-2779.
- Tangney, C. 1997. Vitamin E and cardiovascular disease. *Nutr. Today* 32: 13-22.
- Tseng, T. H., Hsu, J. D., Lo, M. H., Chu, C. Y., Chou, F. P., Huang, C. L. and Wang, C. J. 1998. Inhibitory effect of *Hibiscus* protocatechuic acid on tumor promotion in mouse skin. *Cancer Lett.* 126: 199-207.
- Tseng, T. H., Wang, C. J., Kao, E. S. and Chu, H. Y. 1996. *Hibiscus* protocatechuic acid protects against oxidative damage induced by tert-butylhydroperoxide in rat primary hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.* 101: 137-148.
- Tsuda, T., Horio, F. and Osawa, T. 1999. Absorption and metabolism of cyanidin 3-O- $\beta$ -D-glucoside in rats. *FEBS Letters* 449: 179-182.
- Ueno, A. 1993. The studies on the constituents and the utilization in Citrus species. *Food Ingredients J.* 157: 46-53.
- Vinson, J. A., Dabbagh, Y. A., Serry, M. M. and Jang, J. 1995. Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease. *J. Agric. Food Chem.* 43: 2800-2802.
- Yagi, K. 1989. A simple fluorometric assay for lipid peroxides in blood serum or plasma. in "CRC hand book of free radicals and antioxidants in biomedicine." Vol III, p. 215.
- Yamanaka, N., Oda, O. and Nagao, S. 1997. Prooxidant activity of caffeic acid, dietary non-flavonoid phenolic acid, on Cu<sup>2+</sup>-induced low density lipoprotein oxidation. *FEBS Letters* 405: 186-190.
- Yen, G. C. and Hsieh, C. L. 1998. Antioxidant activity of extracts from Du-zhong (*Eucommia ulmoides*) toward various lipid peroxidation

models in vitro. *J. Agric. Food Chem.* 46: 3952-3957.

Yoshino, M. and Murakami, K. 1998. Interaction of iron with polyphenolic compounds: application to antioxidant characterization. *Anal. Biochem.* 257: 40-44.

Zhang, H. L., Nagatsu, A., Okuyama, H., Mizukami, H. and Sakakibara, J. 1998. Sesquiterpene glycosides from cotton oil cake. *Phytochemistry* 48: 665-668.

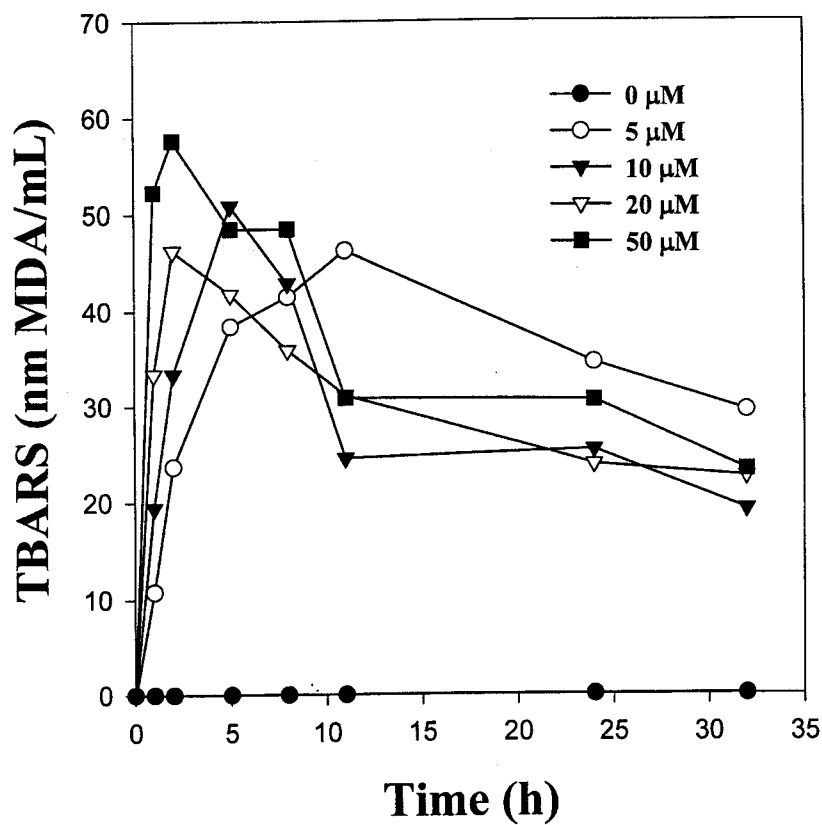


圖 一. 不同銅離子濃度對 LDL 之氧化修飾

Figure 1. Different concentrations of copper ion on LDL oxidative modification. LDL (100  $\mu\text{g}$  protein/mL) was incubated with different concentrations of copper sulfate at 37°C for various times.

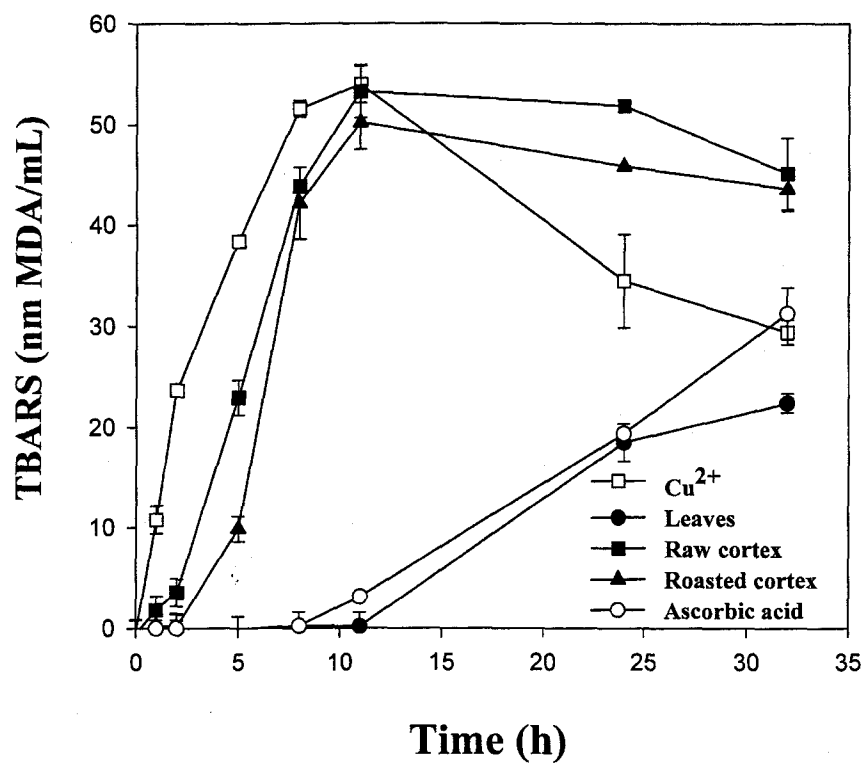


圖 二、杜仲水萃取物對銅離子誘導 LDL 氧化修飾形成 TBARS 之影響

Figure 2. Effect of water extracts from Du-zhong on Cu<sup>2+</sup> mediated TBARS formation in LDL. LDL (100 µg protein/mL) was incubated with 10 µM CuSO<sub>4</sub> at 37°C in the absence or presence of water extracts of Du-zhong (10 µg/mL). Data represent mean ± standard deviation from three experiments.

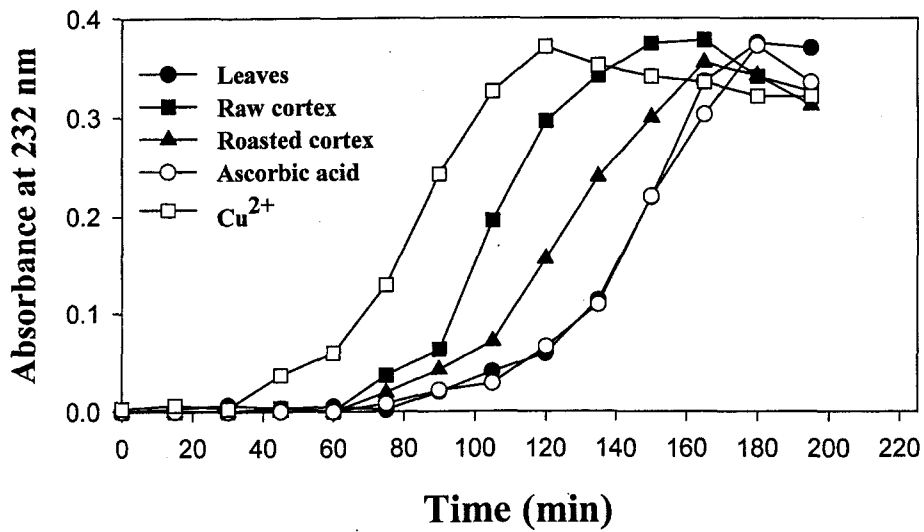


圖 三、杜仲水萃取物對銅離子誘導 LDL 形成共軛雙烯之影響

Figure 3. Effects of water extracts from Du-zhong on Cu<sup>2+</sup> mediated conjugated diene formation in LDL. LDL (100 µg protein/mL) was incubated with 10 µM CuSO<sub>4</sub> at 37°C in the absence or presence of water extracts of Du-zhong (10 µg/mL). Conjugated diene formation was measured by determining the absorbance at 234 nm every 15 min for 195 min and the results are expressed as relative absorbance at 234 nm.



圖 四、杜仲水萃取物對銅離子誘導 LDL 氧化修飾之電泳圖

Figure 4. The eletrophoretic pattern of human LDL incubated with Cu<sup>2+</sup> with or without water extracts from Du-zhong. LDL (100 µg protein/mL) was oxidized with Cu<sup>2+</sup> (10 µM) in the presence of Du-zhong extract for 24 h. Lanes 1, 8: native LDL; lane 2: LDL and Cu<sup>2+</sup>; lane 3: LDL and Cu<sup>2+</sup> and 100 µg/mL leaf extract; lane 4: LDL and Cu<sup>2+</sup> and 10 µg/mL leaf extract; lane 5: LDL and Cu<sup>2+</sup> and 100 µg/mL raw cortex extract; lane 6: LDL and Cu<sup>2+</sup> and 100 µg/mL roasted cortex extract; lane 7: LDL and Cu<sup>2+</sup> and 100 µg/mL ascorbic acid.

表一、杜仲葉水萃取物之乙酸乙酯區分物於製備型 TLC 板上展開後之不同區分層產率、 $R_f$  值及 UV 光照顏色

Table 1. Yield,  $R_f$  value and the color after UV-irradiation of ethyl acetate fraction from Du-zhong leaf extract developed on the preparative TLC plate

Band	Yield (%)	$R_f$ value	color after UV-irradiation <sup>a</sup>
1	8.70 <sup>b</sup>	0.18	Light green
2	41.90	0.40	Dark purple
3	13.41	0.45	Dark green
4	10.46	0.58	Light purple
5	14.38	0.62	Light purple
6	11.15	0.70	Light brown

<sup>a</sup>UV-irradiation was at 280 nm.

<sup>b</sup>Each value is the mean of three replicate analyses.

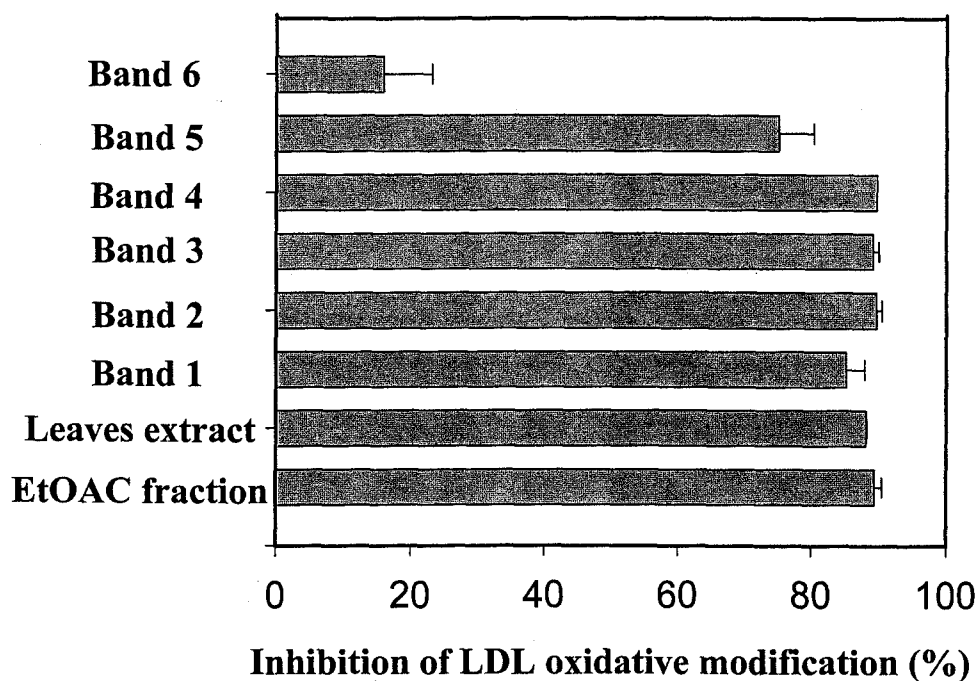
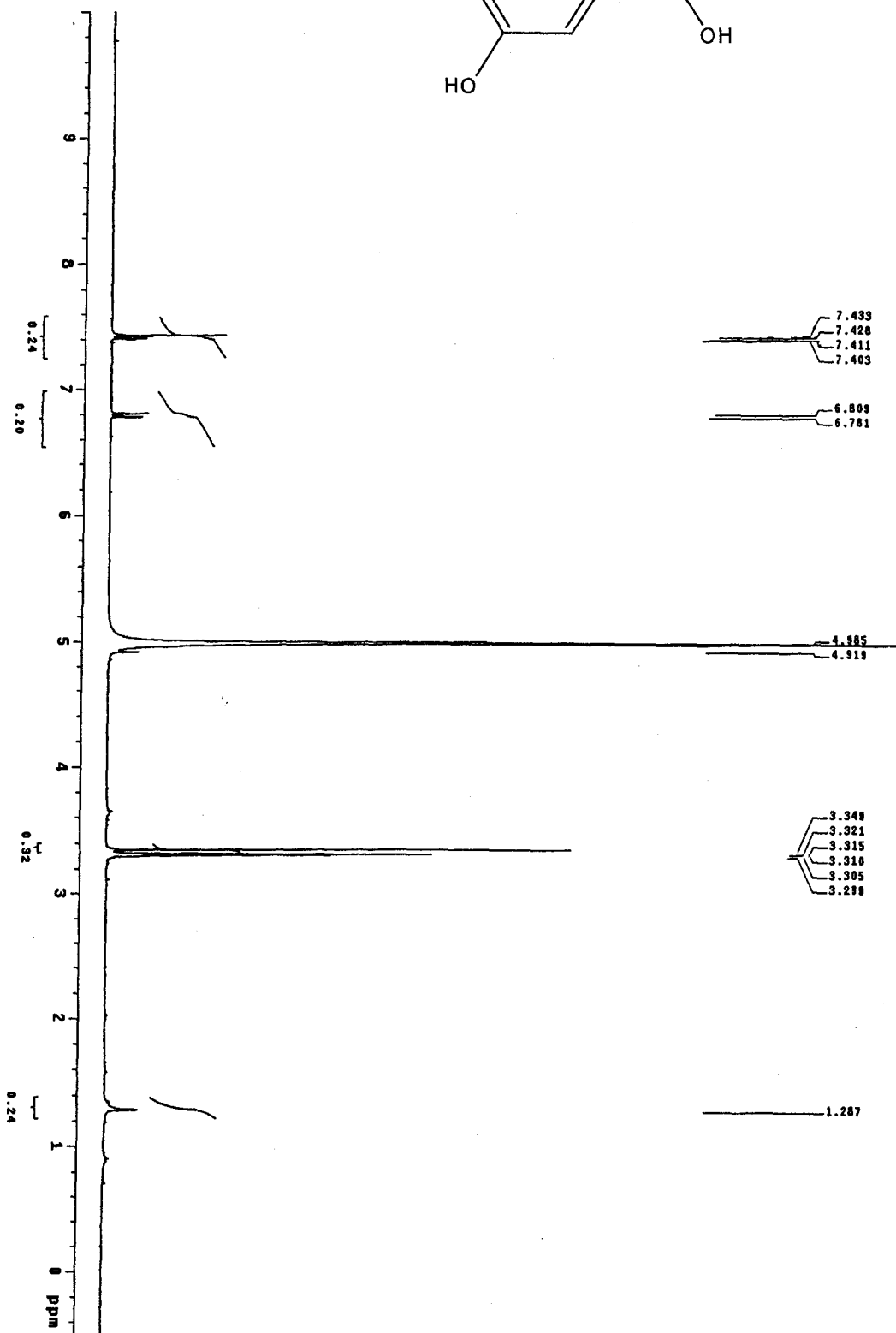
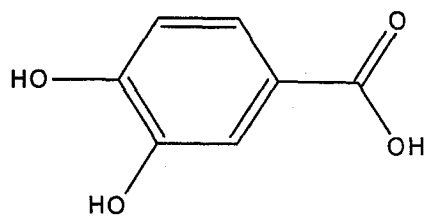
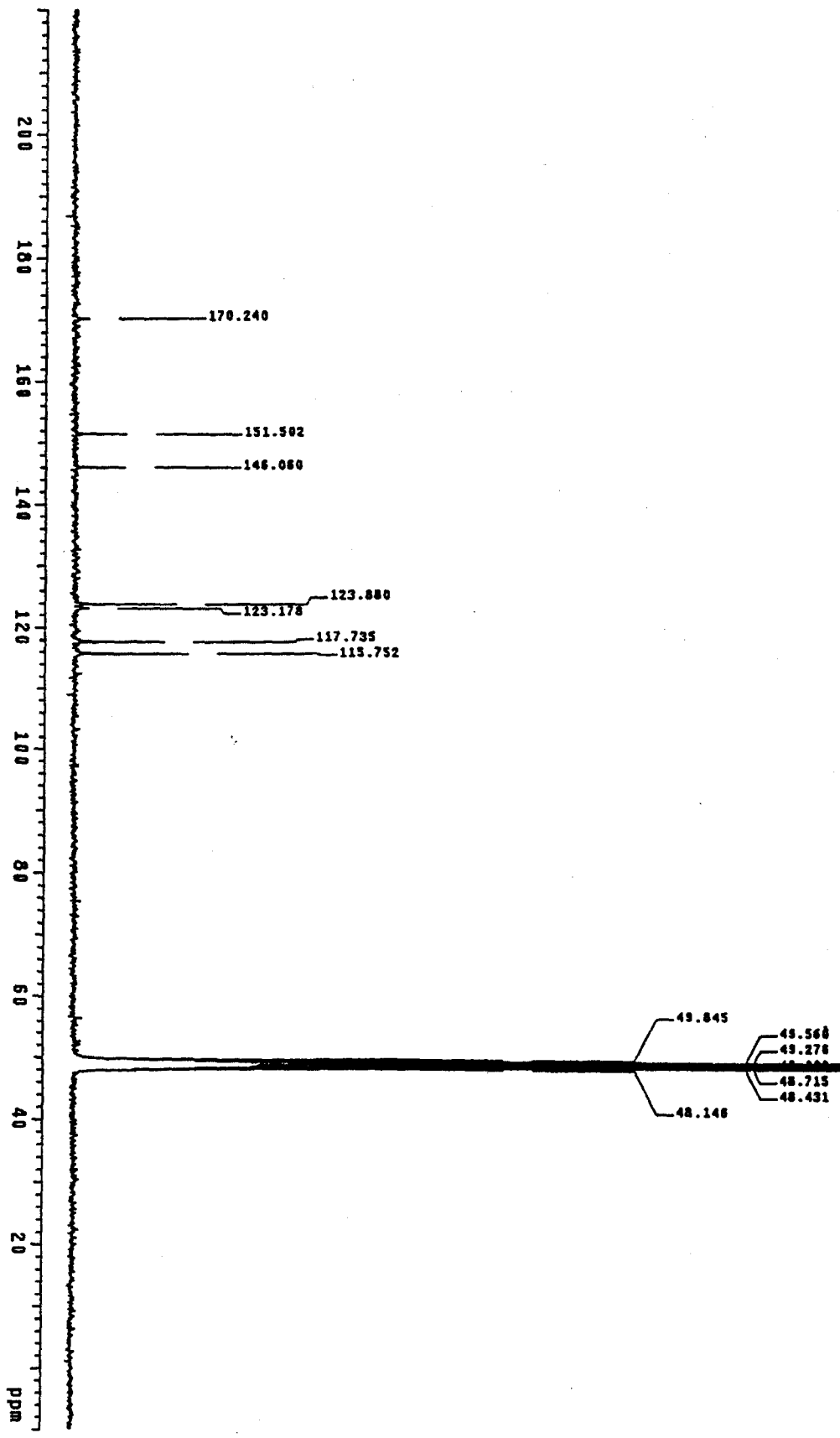


圖 五、杜仲葉水萃取物、杜仲葉水萃取物之乙酸乙酯區分層及其 TLC 之區分層對對銅離子誘導 LDL 氧化修飾之影響

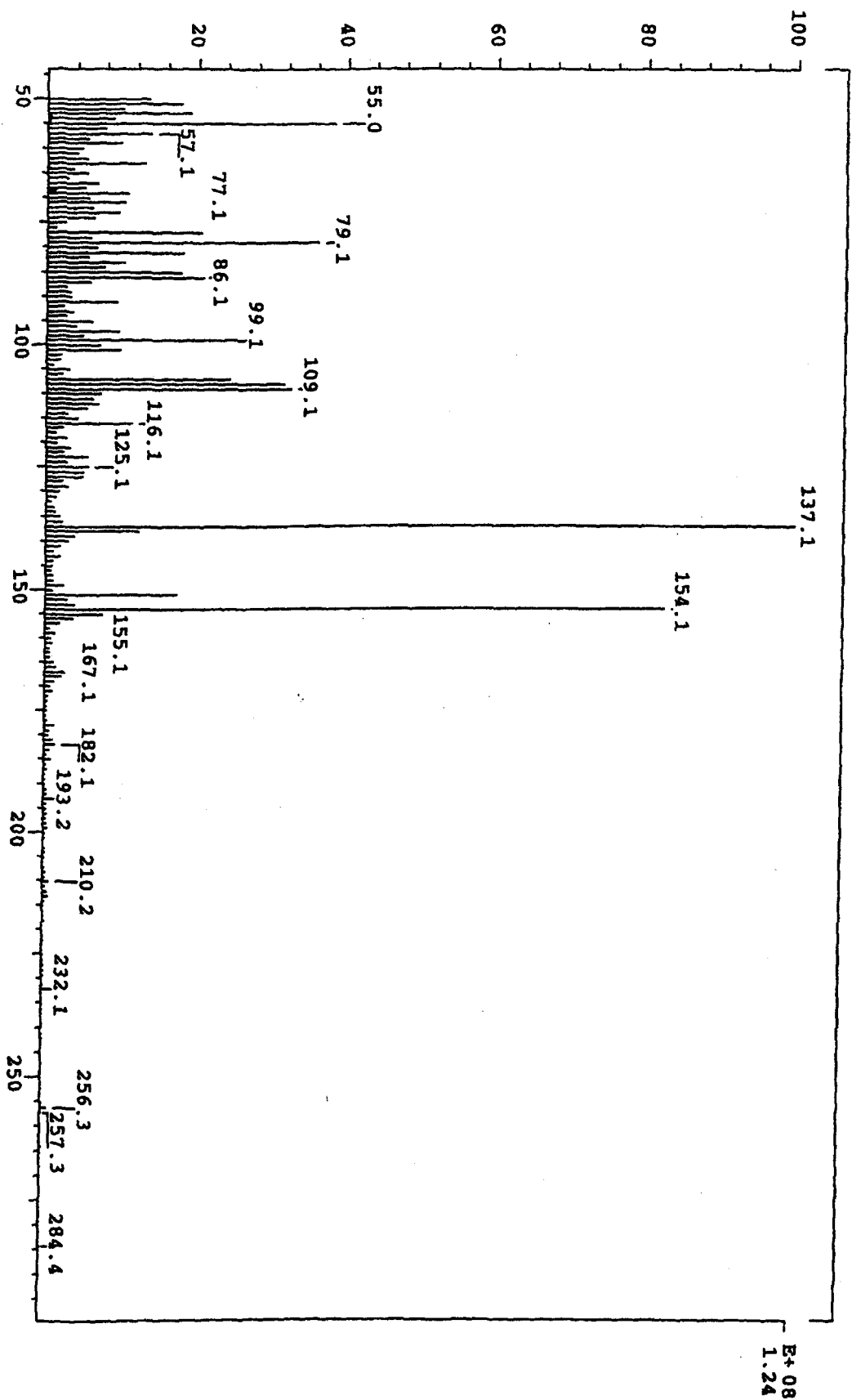
Figure 5. Effect of Du-zhong leaf extract, ethyl acetate fraction from leaf extract and its TLC fractions on the  $\text{Cu}^{2+}$ -mediated LDL oxidation. LDL (100  $\mu\text{g}$  protein/mL) was incubated with  $\text{Cu}^{2+}$  (10  $\mu\text{M}$ ), Du-zhong leaf extract, ethyl acetate fraction from leaf extract and its TLC fractions (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 12 hours at 37  $^{\circ}\text{C}$ .



圖六、杜仲葉水萃取物 X 之 <sup>1</sup>H 核磁共振光譜圖  
 Figure 6. <sup>1</sup>H NMR spectrum of compound X isolated from Du-zhong leaf extract.



圖七、杜仲葉水萃取物 X 之  $^{13}\text{C}$  核磁共振光譜圖  
 Figure 7.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound X isolated from Du-zhong leaf extract.



圖八、杜仲葉水萃取物 X 之質譜圖

Figure 8. Mass spectrum of compound X isolated from Du-zhong leaf extract.

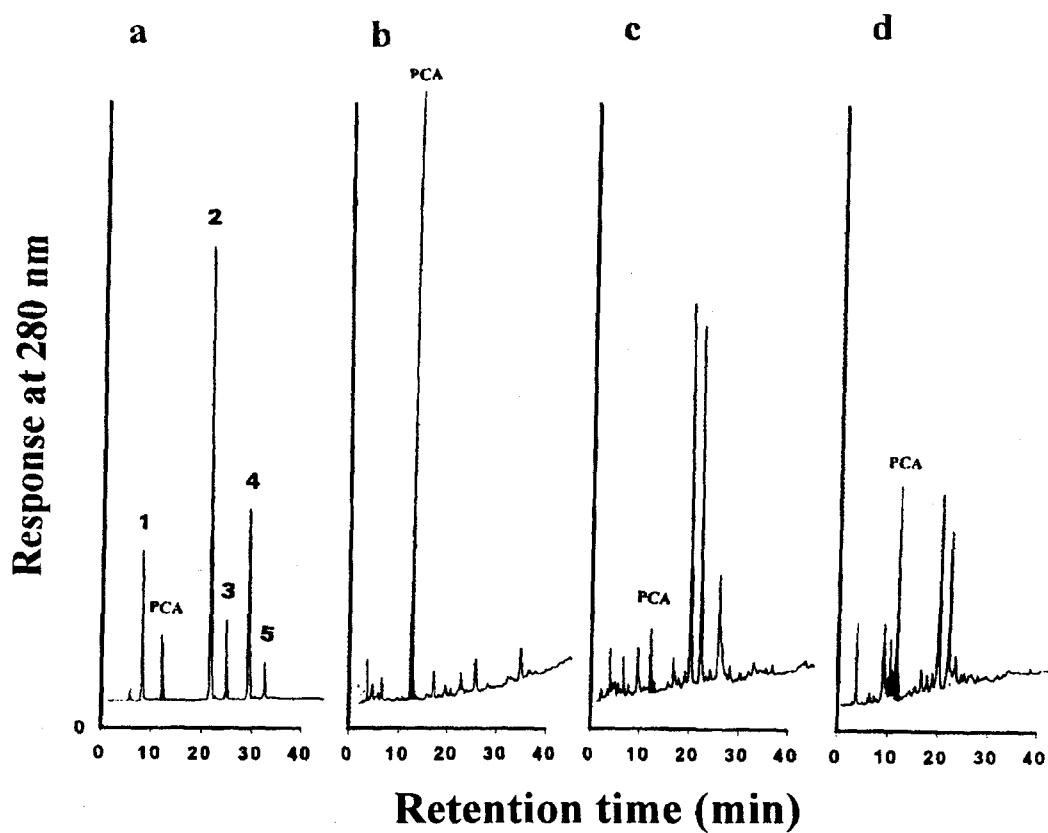


圖 九、多酚化合物及杜仲水萃取物之 HPLC 層析圖

Figure 9. HPLC chromatogram of polyphenol standards and water extract from Du-zhong (WEDZ). (a) polyphenol standards; peak identification: 1. gallic acid; 2. chlorogenic acid and caffeic acid; 3. catechin; 4. epicatechin; 5. ellagic acid; PCA: protocatechuic acid. (b) leaves extract; (c) raw cortex; (d) roasted cortex.

表 二、杜仲水萃取物中 protocatechuic acid 的含量

Table 2. The amounts of protocatechuic acid in water extract from Du-zhong (WEDZ)

Sample	Protocatechuic acid (mg/g of Du-zhong extracts lyophilized powder)
Leaves	$17.17 \pm 0.01^{aa}$
Raw cortex	$1.16 \pm 0.01^c$
Roasted cortex	$2.99 \pm 0.02^b$

<sup>a</sup> Each value is the mean  $\pm$  standard deviation of three replicate analyses.

Values in a column with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

表 三、杜仲水萃取物及原兒茶酸對銅離子誘導 LDL 氧化修飾之影響  
 Table 3. Effect of water extracts of Du-zhong and protocatechuic acid (PCA) on the  $\text{Cu}^{2+}$  - mediated LDL oxidation

Sample	Lag time (min) <sup>b</sup>	TBARS ( $\mu\text{M}$ ) <sup>c</sup>	REM <sup>d</sup>
Control <sup>a</sup>	64.25±2.47	51.58±0.83	3.8±0.08
Leaves	121.5±9.19	1.65±0.02	2.0±0.02
Raw cortex	89.25±3.18	43.86±0.16	3.5±0.07
Roasted cortex	104.5±0.71	42.18±0.19	3.3±0.01
PCA	>200	0.26±0.00	1±0.02
Ascorbic acid	118.5±13.44	1.63±0.05	2.2±0.01

<sup>a</sup> LDL was incubated with 10  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  without samples.

<sup>b</sup> LDL (100  $\mu\text{g}$  protein/mL) was incubated with 10  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  at 37°C in the absence or presence of 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  water extracts of Du-zhong.

<sup>c</sup> TBARS: thiobarbituric acid reactive substabces. LDL (100  $\mu\text{g}$  protein/ mL) was incubated with 10  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  at 37°C in the absence or presence of 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  water extracts of Du-zhong for 8 h.

<sup>d</sup> REM: relative electrophoretic mobility. LDL (100  $\mu\text{g}$  protein/mL) was incubated with  $\text{Cu}^{2+}$  (10  $\mu\text{M}$ ) in the presence of Du-zhong extract (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 24 h.