

第二章 實驗材料及方法

第一節 實驗材料

一、研究材料

本實驗所使用之研究材料，明日葉係自不同產地得到，描述於下：

- (一) 第一批於八十八年十一月由方冠天然食品股份有限公司提供茶粉、萃取粉，濃縮液。
- (二) 第二批於八十九年四、五月由南投縣埔里鎮大雪山農場提供新鮮明日葉及茶粉、萃取粉，濃縮液、頭粉。
- (三) 第三批於九十年二月由苗栗縣大湖鄉神農農場及霧社提供新鮮明日葉及茶粉、萃取粉，濃縮液、頭粉。
- (四) 第四批分別於：
 - (1) 中華民國九十年三月八日於溪頭森林遊樂區現場採得。
 - (2) 中華民國九十年三月九日於南投縣埔里鎮大雪山農場現場採得。
 - (3) 中華民國九十年三月十日於苗栗縣大湖鄉神農農場現場採得。
 - (4) 中華民國九十年三月十日於嘉義縣阿里山奮起湖龍雲山莊現場採得。

二、溶媒、試藥與層析材料

(一) 抗氧化試驗的試劑

Potassium dihydrogen phosphate , GR , (Merck ,Germany)。

Horseradish peroxidase (HRP) , Sigma (St. Louis , U.S.A.)。

L-ascorbic acid , Sigma (St. Louis , U.S.A.)。

2, 2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid ABTS)。

Hydrogen peroxide solution , Merck, Germany。

(二) SOD 試驗的試劑

NBT (nitroblue tetrazolium) , Sigma (St. Louis , U.S.A.)。

Methionine , Sigma (St. Louis , U.S.A.)。

Na_2HPO_4 , Merck Germany。

NaH_2PO_4 , Merck Germany。

Riboflavin , Sigma (St. Louis , U.S.A.)。

Potassium dihydrogen phosphate , GR , Merck, Germany

Dipotassium hydrogen phosphate , GR , Merck, Germany

(三) 指標成分的分離及高壓液相層析使用的材料

(1) 溶媒：

Hydrochloric acid、 n-hexane、 benzene、 chloroform、 acetone、 methanol、 ethanol、 ethyl acetate 及 CDCl_3 等光譜級溶媒均購自 Merck, Germany。

(2) 層析材料 :

Silica gel 70-230 mesh , (Art No.107734) Merck, Germany。

TLC Plates Silica gel 60 F₂₅₄ 0.2mm 20×20cm (Art No.105554) , Merck, Germany。

(3) 過濾膜 :

Millipore Type HV, 0.45 μm , Millipore Co. U.S.A.

第二節 實驗儀器

- (1) 高效液相層析儀 (High-performance Liquid Chromatography
HPLC) Shimadzu.LC-6A
偵測器(Detector) : Jasco Model UV-970 Intelligent UV/VIS
積分儀(Integrator) : Shimadzu LC-6A chromatopac

印表機(Printer) : Shimadzu LC-6A chromatopac
層析管(Column) : Inertsil 5 ODS (4.6×150mm) VERCOPAK
- (2) 質譜儀 (MS) : VG PLATFORM II Mass Spectrometer , 離子
化電壓為 70e。
- (3) 核磁共振儀 (NMR) : Bruker ARX-200 (200MHz FT-NMR)
- (4) 微量熔點測定計 : Yanaco Mmicro Melting Point Apparatus
MP-500D , 溫度未校正。
- (5) 紅外線光譜儀 : Nicolet Impact 400 FT-IR Spectrophotometer
- (6) 紫外線光譜儀 : Shimadzu UV-160A UV-Visible Recording
Spectrophotometer
- (7) 烘箱 : Eyela WFO-450ND
- (8) 電子乾燥箱 (保存 TLC 片)
- (9) 電熱板 : Frano-Geratetechnik M21/1
- (10) 超音波振盪器 : Branson 5200
- (11) 紫外線 : 具 254mm 及 366mm 兩種波長。

- (12) 玻璃展開槽 : 120mm×150mm 及 220mm×70mm×220mm
- (13) 高速離心機 : Hettich Zentrifugen D-7200 Tuttlingen ,
Germany
- (14) 吹氣濃縮裝置 (Evaporator) : Organomation Associates Inc. Model
NO 112 ,
- (15) 超音波振盪器 (Ultrasonic) : Branson.5200。
- (16) 酵素連結免疫吸附分析儀 (Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Reader) , Labsystems Multiskan RC , Finland。
- (17) 酸鹼值測定儀 (pH meter) :Model 6071 Jenco 。

第三節 實驗方法

(一) 明日葉組織切片：

以嘉義阿里山奮起湖龍雲山莊、溪頭森林遊樂區、南投埔里大雪山農場、苗栗大湖神農農場現場採得之明日葉為材料，分別就其根、莖、葉、果實部分作組織切片

實驗步驟：

- 1、取陰乾後之根、莖、葉、果實，以刀片切割適當厚度組織切片。
- 2、將切割下之組織切片浸泡於水中後，以探針取之置放玻片上，用濾紙吸乾多餘的水份。
- 3、於明日葉組織切片上滴一滴 chlorohydrate，將玻片置於酒精燈上加熱一下，用濾紙吸乾多餘的液體。
- 4、加一滴 phloroglucinol 染色，再加一滴濃鹽酸（HCl）用濾紙吸乾多餘的液體。
- 5、加一滴甘油水作為封鎖劑，以 45° 角將蓋玻片輕輕蓋上，用濾紙吸乾多餘的液體，觀察組織構造並照像。

(二) 明日葉含水量測定：

以嘉義阿里山奮起湖龍雲山莊、溪頭森林遊樂區、南投埔里大雪山農場、苗栗大湖神農農場現場採得之明日葉為材料，分別就其根、莖、葉部分，精確秤取新鮮之根、莖、葉各 5g 分別切細

備用，依中華藥典附錄⁽¹⁰²⁾生藥檢驗法之水份測定法操作，於 105 乾燥。

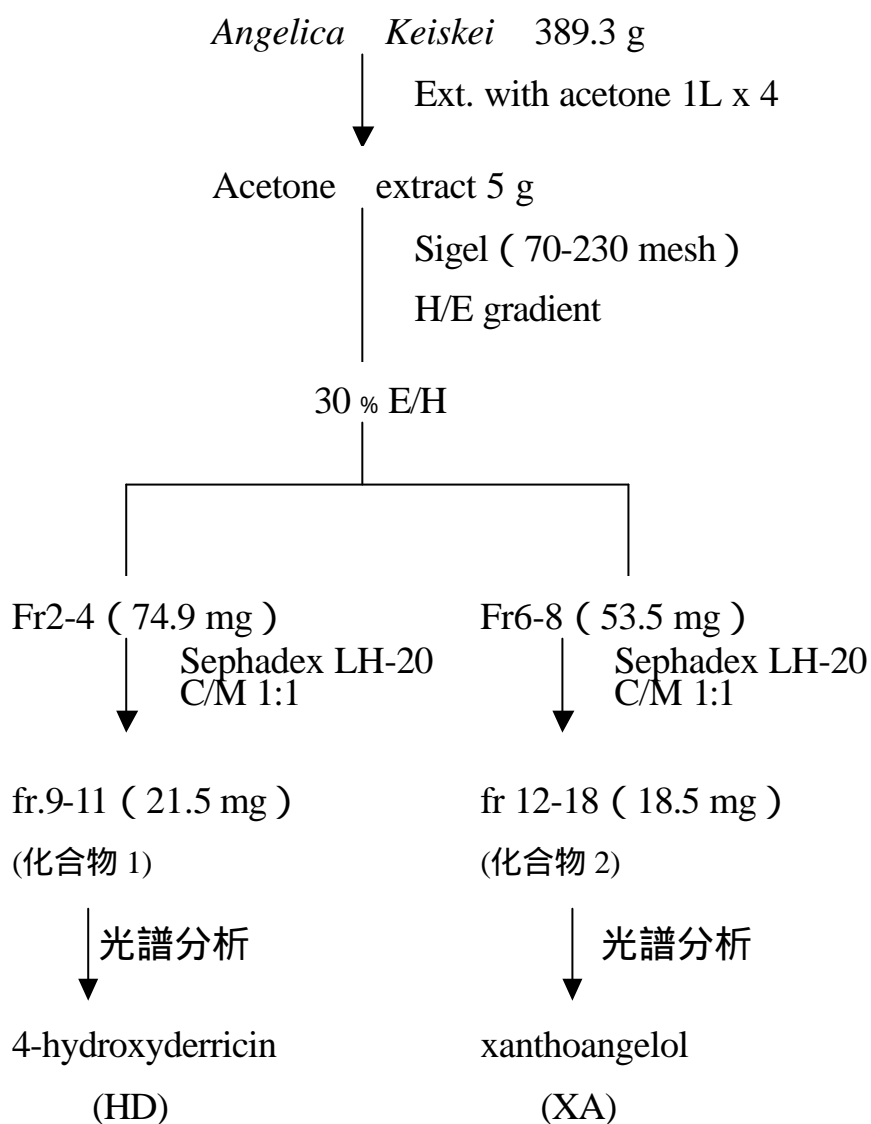
實驗步驟：

- 1、乾燥烘箱於前一天先校正溫度及穩定度。
- 2、精秤蒸發皿重量後記錄。
- 3、將秤好新鮮明日葉之根、莖、葉分別置放在蒸發皿中，後放入預熱（105）之烘箱中乾燥，五小時後秤重，繼續乾燥並每隔一小時秤重一次，至先後二次之減重相差不超過 0.25% 為止。
- 4、由最初減去最後重量計算檢品含水百分比。

（三）明日葉的指標成分之光譜分析

將南投埔里鎮大雪山農場及苗栗縣大湖鄉神農農場的明日葉新鮮莖、葉分別切細稱取 389.3 g，以量筒精確量取 4 公升丙酮，冷浸 1-2 天過濾抽提三次抽提液以減壓濃縮至乾稱取 5g，以矽膠管柱層析進行分離，利用正己烷-乙酸乙酯梯度沖提，30% 乙酸乙酯/正己烷沖提分管 fr.2-4 及 fr.6-8，反覆再經 Sephadex LH-20 管柱多次純化，用氯仿-甲醇 1:1 沖提，及用氯仿-甲醇再結晶後分別得到兩個主成分，經光譜分析鑑定其結構為 4-hydroxyderricin (HD) 及 xanthoangel (XA)。

分離步驟：



(1) 不同溶媒萃取物成分的分離：

精確秤取嘉義阿里山奮起湖龍雲山莊新鮮明日葉，根、莖、葉各 100g 分別切細，裝入 500mL 三角錐瓶，以量筒精確量取正己烷、氯仿、丙酮、甲醇、乙醇、乙酸乙酯各 300mL，浸置 2-3 天後 過濾，分別各抽提三次，抽提液經減壓濃縮秤重。

(2) 甲醇萃取物成分的分離：

- 1、精確秤取新鮮明日葉，根、莖、葉、果實各 10g，切細，後放入研鉢研磨，以量筒精確量取甲醇 200mL 少量多次研磨，分成數次用完過濾，濾液經減壓濃縮至微乾以容量瓶定容至 10mL 備用。
- 2、用可調式微量吸管 (Micropipette) 自 10 mL 量取 1mL 作為 HPLC 指標成分之含量測定，另取 1 mL 再經減壓濃縮至乾，作為 TLC 的定性分析使用，餘 8 mL 儲放冰箱冷藏備用。
- 3、以嘉義阿里山奮起湖龍雲山莊、溪頭森林遊樂區、南投埔里大雪山農場、苗栗大湖神農農場現場採得之新鮮明日葉之根、莖、葉、果實，均依前述步驟製備。

(四) 明日葉總抗氧化力測定：

- 1、精確秤取新鮮明日葉，根、莖、葉、果實各 0.2g，切細，後放入研鉢研磨，以量筒精確量取緩衝液 2mL，研磨至均質化，濾

液經離心 2500，15 分鐘後，取上清液再離心一次後備用。

- 2、以嘉義阿里山奮起湖龍雲山莊、溪頭森林遊樂區、南投埔里大雪山農場、苗栗大湖神農農場現場採得之新鮮明日葉之根、莖、葉、果實，均依上述方法製備。
- 3、新鮮配製緩衝液 0.05M Potassium phosphate buffer (pH7.0)。
- 4、新鮮配製 Horseradish peroxidase 125 μ L 於緩衝液中。
- 5、新鮮配製 50 μ M 至 1500 μ M， L-ascorbic acid 標準品。
- 6、將 160 μ L 緩衝液加 5 μ L Horseradish peroxidase 75 μ L ABTS 共 240 μ L 混合均勻備用。
- 7、設定 EIA reader 為 time scan 模式吸收波長 500nm 。
- 8、取 96 槽微量盤加入 (6) 之混合液 240 μ L。
- 9、加 sample 10 μ L 混合均勻測之此為 blank。
- 10、加 25 μ L Hydrogen peroxide solution 立刻讀值，紀錄開始產生綠色的時間。

(五) SOD 清除自由基能力測試方法：

- 1、以嘉義阿里山奮起湖龍雲山莊、溪頭森林遊樂區、南投埔里大雪山農場、苗栗大湖神農農場，各地所採得之新鮮明日葉之根、莖、葉、果實，精確秤取各 0.2g 切細，後放入研鉢研磨，以量筒精確量取緩衝液 2mL，研磨至均質化，濾液經離心

2500，15分鐘後，取上清液再離心一次後備用。

- 2、新鮮配製緩衝液 0.05mM potassium phosphate buffer (pH 7.8)。
- 3、新鮮配製 5mM riboflavin (配成之溶液需避光保存在 4)。
- 4、新鮮配製 1.22mM NBT (nitroblue tetrazolium) 配成之溶液需避光保存在 4 。

實驗步驟：

- 1、反應液:取 5mM riboflavin 20 μ L、 1.22 mM NBT 820 μ L、 methionone 14.9 mg，加緩衝液至 8mL。
- 2、每小格加入 200 μ L 反應液及 50 μ L 稀釋成不同濃度的樣品，並以 50 μ L 緩衝液當對照，並將微量分析盤置於免疫酵素分析儀中，測定波長 570 nm 的吸光值。
- 3、拿出微量分析盤在光箱上照光一分鐘後測定吸光值，同樣測定 5 分鐘的各分鐘之吸光值。
- 4、算出對照組與各稀釋濃度 5 分鐘內吸光值變化的斜率，計算樣品的抑制程度，以能抑制 50% NBT 還原的酵素量定義為 1U。