

中國醫藥大學 藥學院 中國藥學研究所 博士論文

編號：ICPS-D69

指導教授：張永勳 教授

共同指導教授：黃順爵 助理教授

三點金草抗氧化及鎮痛抗發炎研究

Study on the antioxidant, antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Desmodium triflorum* DC.

研究生：賴尚志

Lai, Shang-chih

中華民國九十九年一月

謝 辭

本論文得以順利完成，承蒙恩師張永勳教授的諄諄教誨，在課業及生活上無私的指導和關愛，特別要感謝黃順爵老師在生活及實驗上不辭辛勞悉心指導；何玉鈴博士、彭文煌博士、吳啟瑞博士及黃太鴻博士在實驗上的協助及關懷；感謝謝明村校長、鄧正賢博士、童承福博士、詹旭川博士、高駿彬博士、黃冠中博士、劉淑鈴博士、賴振榕主任及謝伯舟組長在日常生活中的鼓勵，使我得以蛻變與成長。由衷感謝郭盛助校長、李水盛教授、蔡金川教授、賴東淵副教授、蔡輔仁教授、邱泰惠教授及李英雄副校長，在博士學位論文審查時之指正並惠賜寶貴意見。

在求學期間，感謝同學蔡仁傑、學妹王靜瑩、李昆錚及學弟廖繼仁在實驗過程中的協助，此外感謝學長林立偉、黃世勳；學姊江瑩真、廖慧伶、簡慈美、楊琇米、劉夙真；同學黃元照、蔡汎修、呂宗俊、鄭皓元、陳華鑫、張恒源、林宣霈；學弟盧冠宏、陳兆群、許榮麒、蔡宗翰、楊松峻、鄭朝駿、邱勇嘉、蕭富擎、楊博仁、吳國任；學妹劉盈君、傅涵嫻、陳怡如、田芸禎、陳典加；助理國元、俊評、怡蓓、怡蓁、玉茹及國倫等在研究期間的關心及協助，並對所有關心及鼓勵的師長與朋友，在此一併致上最誠摯之謝意。最後，感謝我的父母及親友給予的支持與鼓勵，使我可以順利完成學業。

目 錄

謝 辭	I
目 錄	II
略字表	IX
圖目錄	XI
表目錄	XV
中文摘要	XVII
英文摘要	XIX
第一章 緒論	1
第一節 研究動機背景	1
第二節 研究目的	5
第二章 總論	7
第一節 山螞蝗屬(<i>Desmodium</i>)植物及藥用植物之文獻考察	7
一、山螞蝗屬之植物考察	7
二、台灣山螞蝗屬之植物的檢索表	9
三、山螞蝗屬之藥用植物考察	12

第二節 臺灣產山螞蝗屬植物之化學成分考察.....	27
第三節 臺灣產山螞蝗屬植物之藥理考察.....	31
第四節 藥理實驗及研究方法相關文獻考察.....	36
一、鎮痛實驗.....	36
二、抗發炎試驗.....	38
三、抗急性肝損傷實驗.....	40
第五節 抗氧化實驗及研究方法相關文獻考察.....	42
一、黃酮化合物的基本結構.....	42
二、黃酮類化合物與金屬鹽類試劑的螯合反應.....	44
三、自由基介紹.....	47
四、DPPH 自由基染色法.....	47
五、中藥指紋圖譜的介紹.....	49
第三章 實驗材料及方法.....	50
第一節 植物材料之採集及萃取.....	50
第二節 三點金草活性成分之 HPLC 指紋圖譜.....	52
第三節 三點金草之鎮痛抗發炎實驗.....	55

一、三點金草之急性毒性試驗.....	56
二、三點金草之鎮痛實驗.....	57
1. 扭體反應試驗.....	57
2. 福馬林試驗.....	58
三、三點金草之抗發炎試驗.....	59
四、三點金草之抗發炎機轉探討.....	60
(一)、肝組織抗氧化酵素活性測定.....	60
1. 超氧歧化酶(super oxide dismutase assay, SOD)之測定.....	60
2. 麩胱甘肽還原酶(glutathione reductase, GRd)之測定.....	61
3. 麩胱甘肽過氧化酶(glutathione peroxidase, GPx)之測定.....	62
4. 肝組織中總蛋白之測定.....	62
(二)、足蹠組織抗發炎相關活性測定.....	64
1. 足蹠組織中 IL-1 β 濃度測定.....	64
2. 足蹠組織中 TNF- α 濃度測定.....	67
3. 足蹠組織中 NO 含量測定.....	71
4. 足蹠組織中丙二醛(Malnodialdehyde; MDA)濃度測定.....	73

五、統計學分析	76
第四節 三點金草之抗小鼠急性肝損傷實驗.....	77
一、四氯化碳(CCl ₄)誘發急性肝炎	78
二、肝功能血清生化指數之檢測.....	78
1.血清中麩氨酸草乙酸轉氨酶(GOT)之測定	79
2.血清中麩氨酸丙氨基轉氨酶(GPT)之測定.....	79
3.肝組織中總蛋白之測定(TP).....	80
第五節 三點金草對 Hep G2 及 PC 3 細胞毒殺試驗.....	81
第六節 三點草之抗氧化活性評價.....	83
一、抗氧化活性之評價.....	84
1.DPPH 自由基清除能力	84
2.總抗氧化能力測定	86
3.還原力測定	87
二、抗氧化成分類之評價.....	88
1.總多酚類(polyphenols)含量測定	88
2.總黃酮類(flavonoids)含量測定	89

第七節 DPPH 去除儀器新應用	90
一、光之三原色介紹	90
二、實驗步驟	92
三、溫溼度對反應的影響	92
四、不同時間點反應結果的評估	93
五、DPPH 不同點注量的比較	93
六、清除 DPPH 自由基試驗	94
第四章 結果	95
第一節 植物材料之萃取	95
第二節 三點金草活性成分之 HPLC 指紋圖譜	97
第三節 三點金草之鎮痛抗發炎實驗	100
一、三點金草之急性毒性試驗	100
二、三點金草之鎮痛實驗	101
1. 扭體反應試驗	101
2. 福馬林試驗	102
三、三點金草之抗發炎試驗	104

四、三點金草之抗發炎機轉探討.....	105
一、肝組織抗氧化酵素活性測定.....	105
二、足蹠組織抗發炎相關活性測定.....	106
1.足蹠組織中 IL-1 β 濃度測定.....	106
2.足蹠組織中 TNF- α 濃度測定.....	107
3.足蹠組織中 NO 含量測定.....	108
4.足蹠組織中脂質過氧化物丙二醛濃度測定.....	109
第四節 三點金草之抗小鼠急性肝損傷實驗.....	110
一、肝功能血清生化指數之檢測.....	110
1.血清中麩氨酸草乙酸轉氨酶(GOT)之測定.....	110
2.血清中麩氨酸丙氨基轉氨酶(GPT)之測定.....	111
第五節 三點金草對 Hep G2 及 PC 3 細胞毒殺試驗.....	112
第六節 三點金草之抗氧化活性評價.....	114
一、抗氧化活性之評價.....	114
1.DPPH 自由基清除能力.....	114
2.總抗氧化能力測定.....	118

3.還原力測定	120
二、抗氧化成分類之評價.....	122
1.總多酚類(polyphenols)含量測定	122
2.總黃酮類(flavonoids)含量測定	123
第七節 DPPH 去除率儀器新應用	124
一、參數設定	124
二、溫溼度對反應的影響.....	127
三、不同時間點反應結果的評估.....	128
四、DPPH 不同點注量的比較	129
五、清除 DPPH 自由基試驗	130
第五章 討論	132
第六章 結論	140
第七章 參考文獻	142

略字表

ABTS	2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulphonic acid
BHT	butylate hydroxytoluene
CMC	carboxymethyl cellulose
COX	cyclooxygenase
DMEM	dulbecco's minimal essential medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
EC ₅₀	effective concentration 50
FBS	fetal bovine serum
GSH-Px	glutathione peroxidase
GSH-Rd	glutathione reductase
Hep G2	a human hepatoma cell line
HPLC	high performance liquid chromatography
IL-1 β	interleukin-1 beta
ITS	internal transcribed spacer
LD ₅₀	lethal dose 50 %
MDA	malondialdehyde
MDT	methanol extract of the of <i>Desmodium triflorum</i>

MTT	[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]
NO	nitric oxide
NOS	nitric oxide synthase
PBS	phosphate buffered saline
PC 3	a human prostate carcinoma cell line
PCR	polymerase chain reaction
ROS	reactive oxygen species
GOT	glutamate oxaloacetate transminase
GPT	glutamate pyruvate transminase
SOD	superoxide dimutase
TCA	trichloroacetic acid
TEAC	trolox equivalent antioxidant capacity
TLC	thin layer chromatography
TNF- α	tumor necrosis factor alpha
TP	total protein

圖目錄

圖 2-1 三點金草(<i>Desmodium triflorum</i>)植物形態圖.....	23
圖 2-2 三點金草(<i>Desmodium triflorum</i>)之植株外觀.....	24
圖 2-3 三點金草(<i>Desmodium triflorum</i>)花之外觀.....	24
圖 2-4 三點金草(<i>Desmodium triflorum</i>)之果莢.....	25
圖 2-5 黃酮類化合物與鋁的螯合反應.....	45
圖 2-6 黃酮類化合物與鹽酸-鎂粉反應.....	46
圖 3-1 扭體反應試驗實驗流程.....	57
圖 3-2 福馬林試驗實驗流程.....	58
圖 3-3 λ -角叉菜膠誘導小鼠足蹠腫脹實驗流程.....	59
圖 4-1 分畫萃取流程.....	96
圖 4-2 Vitexin 標準品 HPLC 層析圖.....	98
圖 4-3 三點金草甲醇萃取物 HPLC 層析圖.....	98
圖 4-4 三點金草乙酸乙酯層 HPLC 層析圖.....	98
圖 4-5 三點金草正丁醇層 HPLC 層析圖.....	98

圖 4-6 Apigenin 標準品 HPLC 層析圖.....	99
圖 4-7 Genistin 標準品 HPLC 層析圖.....	99
圖 4-8 Vitexin 標準品 HPLC 層析圖.....	99
圖 4-9 三點金草甲醇萃取物 HPLC 層析圖.....	99
圖 4-10 Analgesic effects of the methanol extract of the <i>D. triflorum</i> (MDT) and indomethacin on acetic acid-induced writhing.....	101
圖 4-11 Effects of the methanol extract of the <i>D. triflorum</i> (MDT) and indomethacin on the early phase in formalin test in mice.....	102
圖 4-12 Effects of the methanol extract of the <i>D. triflorum</i> (MDT) and indomethacin on the late phase in formalin test in mice.....	103
圖 4-13 Effects of the methanol extract of the <i>D. triflorum</i> (MDT) and indomethacin (Indo) on hind paw edema induced by λ -carrageenan in mice.....	104
圖 4-14 Effects of the methanol extract of the <i>D. triflorum</i> (MDT) and indomethacin on the tissue IL-1 β concentration of paw in mice..	106

圖 4-15 Effects of the methanol extract of the <i>D. triflorum</i> (MDT) and indomethacin on the tissue TNF- α concentration of paw in mice.	107
圖 4-16 Effects of the methanol extract of <i>D. triflorum</i> (MDT) and indomethacin on nitrate/ nitrite concentration of edema paw in mice.	108
圖 4-17 Effects of the methanol extract of the <i>D. triflorum</i> (MDT) and indomethacin on the tissue MDA concentration of paw in mice ...	109
圖 4-18 Effect of the MDT and silymarin on GOT activities of CCl ₄ acute treated mice.	110
圖 4-19 Effect of the MDT and silymarin on GPT activities of CCl ₄ acute treated mice.....	111
圖 4-20 Affect of samples on Hep G2 cell viability.....	112
圖 4-21 Affect of samples on PC 3 cell viability.	113
圖 4-22 The methanolic crude extract and its fraction from <i>D. triflorum</i> in scavenging DPPH radicals.....	115
圖 4-23 標準品 rutin 之檢量線.....	123

圖 4-24 The digital image of TLC plate..... 131

圖 4-25 The digital image via data acquisition was converted into peak ... 131



表目錄

表 2-1 NAPRALERT 資料庫中三點金草已被分離出之成分.....	29
表 2-2 黃酮的分類及結構.....	43
表 2-3 自由基的主要種類.....	48
表 3-1 移動相溶媒比率.....	54
表 3-2 IL-1 β 標準品濃度之配製表.....	65
表 3-3 IL-1 β 實驗步驟流程表.....	66
表 3-4 TNF- α 標準品濃度之配製表.....	68
表 3-5 TNF- α 實驗步驟流程表.....	70
表 3-6 NO 標準品濃度配製.....	72
表 3-7 MDA 標準品濃度配製表.....	73
表 3-8 加入 MDA 試劑流程表.....	74
表 3-9 光之三原色及其互補色.....	91
表 4-1 Effects of the methanol extract of <i>D. triflorum</i> (MDT) and indomethacin (Indo) on SOD, GPx, and GRd activities in mice' s livers.....	105

表 4-2	The equivalent of α -tocopherol of the methanolic crude extract and its fraction from <i>D. triflorum</i> in scavenging DPPH radicals ...	117
表 4-3	The trolox equivalent of the methanolic extract and its fractions from <i>D. triflorum</i> in scavenging ABTS ^{•+} radicals	119
表 4-4	Reducing power of the methanolic extract and its fractions from <i>D. triflorum</i>	121
表 4-5	Total phenolic content of the methanol crude extract and its fraction from <i>D. triflorum</i>	122
表 4-6	Percentage (%) of radical scavenging activity of the influence of humidity and temperature.	127
表 4-7	Percentage (%) of radical scavenging activity at different time	128
表 4-8	The integration area of different DPPH spraying volumes.	129
表 4-9	The antioxidant activity of the methanolic crude extract of <i>D.</i> <i>triflorum</i> (MDT).	130

三點金草抗氧化及鎮痛抗發炎研究

賴尚志

中國醫藥大學 藥學院 中國藥學研究所

摘要

三點金草為豆科山蚂蝗屬植物三點金草 (*Desmodium triflorum* (L.) DC)的全草，為台灣民間常見之藥用植物。本研究探討三點金草之藥理活性、抗氧化效價及清除DPPH自由基儀器新應用，在藥理活性方面以鎮痛、抗發炎及保肝試驗作為評價。三點金草對醋酸扭體及福馬林舔足試驗所引起之疼痛皆具有抑制作用；在抗發炎方面，測定 λ -carrageenan誘導後第3小時小鼠浮腫足蹠組織之丙二醛(MDA)、NO、TNF- α 、IL1- β 濃度及肝組織之抗氧化酵素(SOD、GSH-Rd、GSH-Px)之活性之含量變化。實驗結果顯示三點金草抗發炎作用與抗氧化活性有關，經由抑制脂質過氧化作用及提昇肝臟中酵素SOD及GSH-Rd濃度，進而降低NO、TNF- α 、IL1- β 濃度，減少氧化壓力所造成的組織及細胞的損傷，以達到抗發炎的作用，但其對於四氯化碳誘導急性肝損傷並不具保護作用。

在化學抗氧化活性方面，以DPPH自由基清除試驗、TEAC、總原力試驗、總多酚及總黃酮含量測定來評價抗氧化活性，實驗結果顯示，三

點金草所具有的抗氧化活性，與其所含多酚類含量有關。本研究更以清除DPPH自由基為基礎，結合影像處理軟體開發新的分析方法。而三點金草是個具有抗氧化、鎮痛及抗發炎藥理活性，三點金草在台灣民間藥用上確有其使用上的價值，且具有進一步開發成新藥的潛力。

關鍵詞：三點金草、抗氧化活性、抗發炎、鎮痛。



Study on the antioxidant, antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Desmodium triflorum* D.C.

Lai, Shang-chih

Graduate Institute of Chinese Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, China Medical University

Abstract

Desmodium triflorum D.C. (Fabaceae) is a medicinal plant in Taiwan. In this study, we evaluated the analgesic effect of the methanol extract of *D. triflorum* (MDT) by using animal models of acetic acid-induced writhing response and formalin test. The anti-inflammatory effect of *D. triflorum* was investigated by λ -carrageenan-induced paw edema in mice. We detected the activities of glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GRd) in the liver, the levels of interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor (TNF- α), malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) in the edema paw tissues. In the analgesic test, *D. triflorum* decreased the acetic acid-induced writhing response and licking time in the late phase of the formalin test. In the anti-inflammatory test, *D. triflorum* also decreased the paw edema due to λ -carrageenan administration. Furthermore, MDT increased the activities of SOD and GRd in liver tissues and decreased MDA level in the edema paws at the 3rd hour after λ -carrageenan-induced inflammation. *D. triflorum* also

affected the levels of interleukin- 1β , tumor necrosis factor- α , NO and MDA which were induced by λ -carrageenan. The anti-inflammatory mechanism of *D. triflorum* might be related to the decreases in the level of MDA in the edema paw via increasing the activities of SOD and GRd in the liver, and the NO level via regulating the IL- 1β production and the level of TNF- α in the inflamed tissues. Our study also found that *D. triflorum* did not have significant hepatoprotective activity.

This study evaluated the antioxidant and antiproliferative activities of the crude extract and fractions of *D. triflorum*. In this study, the total phenolic content, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity, trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC), reducing power, total flavonoid content of *D. triflorum* were evaluated for the exploration of its antioxidant activities. Furthermore, its antiproliferative activities were investigated through the MTT method. The above experimental data indicated that *D. triflorum* was a potent antioxidant medicinal plant, and such efficacy may be mainly attributed to its polyphenolic compounds. This paper developed a new analytical method for the evaluation of antioxidant activity using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and digital processing method. In conclusion, *D. triflorum* is an important medicinal plant in Taiwan that is worth investigating for the

development of new medicines in the future.

Keywords : *Desmodium triflorum*; Antioxidant activity; Anti-Inflammation;
Analgesia.



第一章 緒論

第一節 研究動機背景

山螞蝗屬植物在台灣植物誌第二版中收載共 18 種，有近十種為台灣民間藥用植物⁽¹⁾，其中又以三點金草是民間最常見及應用最多的台灣民間藥，因其葉子外型遠觀有如蒼蠅之翅膀，故又名蠅翅草。其主要效用可治跌打損傷、調經止痛、頭痛、關節痛，解毒及黃疸等⁽¹⁻²⁾。

傳統醫藥以植物藥為主，在文獻典籍上記載及民間用藥的經驗，保留了大量臨床使用資料，在1970年代Ghosal等人對山螞蝗屬植物進行一系列的化學及藥理活性評估⁽³⁻⁷⁾，往後數十年未見更進一步的研究，直至近十年來山螞蝗屬的藥用植物逐漸受到重視，針對其生藥學、藥理學及植物化學研究，其中又以藥理活性鎮痛抗發炎及抗氧化方面的研究文獻為主。在2005年印度Kawshik等人對三點金草進行鎮痛抗發炎的藥理研究，但只針對實驗動物疼痛及發炎等行為進行觀察，並未進一步探討其機轉⁽⁸⁾。

隨著交通的便捷及物質生活條件上改善，雖然有普及的醫療保健或完善的醫療保險制度，但是面臨全球人口老化問題，人們不只要活得老，也要活好，對於新藥開發上的需求及健康食品的使用，有與日俱增的趨勢。然而某些人體的老化及疾病與體內自由基存在的含量及活性氧

(reactive oxygen species, ROS)損傷有關，包括支氣管炎、肺氣腫、動脈粥狀硬化、類風濕性關節炎、癌症、肝炎、白內障及神經退化性疾病等數以百計的疾病。目前仍然有許多疾病(例如：感染性疾病、癌症、糖尿病等)常會伴隨著全身或局部性的發炎症狀，這些發炎的病症在西方醫學中雖有治療或預防的相關藥物可供選擇與使用，傳統醫學在治療或預防疾病上中草藥的使用更是歷史悠久，其中也不乏一些高療效低副作用的中草藥可供選擇與使用。近年來在歐美地區，中草藥及具抗氧化活性相關的保健產品不斷推陳出新，對於中草藥資源的利用及開發，漸漸引起人們及相關研究人員的注意與高度的興趣。

發炎反應是病理過程中疾病發病的病灶之一。而發炎在臨床上的一般表現為紅、腫、熱、痛和功能障礙等特徵。從病理及生理的觀點來看，熱和紅是血管擴張和血流增加的表現；痛是局部熱、機械及化學接受器受到刺激的結果；腫表示血管壁滲透性增加；功能障礙是指細胞產生有毒的物質，或特異性蛋白酶所造成組織損傷或更複雜的傷害。病因所引起的急性發炎反應，主要是白血球快速的聚集，到達損傷的部位，白血球經由消除有害物質或損傷的組織細胞。在分子層次方面，有多種炎症介質的生成、多種細胞因子(cytokine)、趨化因子(chemokine)、激肽及相關受體，扮演著促進和調控發炎的作用⁽⁹⁾。其發炎反應與肥大細胞、巨

噬細胞、嗜伊紅性白血球及嗜中性白血球活化，產生大量 $O_2^{\cdot-}$ (superoxide anion radical)有關，而其機轉與高反應性含氧分子(reactive oxygen species, ROS)：如一氧化氮 (nitric oxide, NO)、自由基生成釋出等在發炎過程中扮演重要的角色^(10,11)。在發炎反應過程中，一氧化氮在發炎過程中可促進發炎物質如：細胞間質素(Interlukin-1, IL-1)及腫瘤壞死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α) 誘導生成，間接或直接的參與巨噬細胞所調控的發炎反應，其中一氧化氮主要是經由活化一氧化氮合成酵素(nitric oxide synthase, NOS)而將細胞內之L-arginine轉變成為L-citrulline而產生，且NO對NOS具有可逆性回饋抑制⁽¹²⁻¹³⁾。

關於中草藥的用藥安全，因為中草藥成分多元化及未明確性，加上植物之基原鑑定的問題，影響了中草藥在使用上的成效。有些中草藥缺乏符合現代科學的實驗佐證，以至於民間上所使用的中草藥不是療效不明就是被坊間過分誇大其療效，使得一般民眾對中草藥的價值產生負面的看法，因此亦無法廣泛的被西方醫學所接受，所以利用藥理活性的評估，並以活性成分指紋圖譜的分析為手段，使中草藥的使用價值受到正面的肯定，促使中草藥資源的開發及利用，成為保健食品及新藥研發的焦點。

對於中草藥品質管制方面的研究，經由紫外光譜、紅外光譜、薄層

層析及高效液相層析等方式已被大量的應用；中草藥成分大部分可經由HPLC進行分析檢測，且累積大量的分析資料，因此HPLC的分析已成為中草藥指紋圖譜的首選。然而中草藥指紋圖譜是採用一定的分析方法，取得能標示中草藥所具有之化學特徵的圖譜或光譜資料，例如：將HPLC指紋圖譜上所有的的層析峰訊息，經由相似度計算或中藥指紋圖譜相似度的計算及評價系統進行比較計算，利用數學及統計學的應用，作為品質管制上的參考依據，如此可以避免摻假偽劣的發生，更進一步對於中草藥藥理活性成分進行研究。

綜合上述可知，篩選具抗氧化及鎮痛抗發炎藥理作用之中草藥，建立活性成分之指紋圖譜，對於中草藥開發新的抗發炎藥物及品質管制上，提供新的思維及評價方法。

第二節 研究目的

三點金草為豆科山蚂蝗屬植物三點金草(*Desmodium triflorum* (L.) DC.)的全草。民間常用於調經止痛、跌打損傷、去風解熱、黃疸、淋病、解毒等，為常用的民間藥⁽²⁾，在台灣全境平野、路旁、園圃、田畔、草地上可見其分佈，而三點金草其鎮痛抗發炎藥理及抗氧化活性，至目前雖有相關之研究報導^(8,14)，卻無更進一步之研究探討。

在人體內原本具有抗氧化防禦機制，可從日常飲食中的蔬菜水果補充具有抗氧化之物質，以及在人體內的抗氧化酵素，可以對抗自由基在體內的過度生成而避免氧化壓力所造成的損傷，達到氧化還原調節系統的平衡。但當體內對抗氧化的能力會伴隨著年齡增長而降低，或因生態環境改變與飲食失衡，而使自由基的生成增加，形成過氧化物蓄積，造成細胞的凋亡，進而導致器官病變與提早人體老化。因此篩選具有抗氧化作用且具有藥理活性之中草藥，更能突顯其在治療疾病上的應用價值。

首先本研究探討三點金草之鎮痛、抗發炎藥理作用，起因為其鎮痛及抗發炎作用機轉仍未見探討，藉由鎮痛、抗發炎作用之藥理實驗模式來評價三點金草之活性，其中以醋酸扭體試驗、福馬林試驗及 λ -carrageenan 試驗為藥理研究方法；分析浮腫腳掌組織之丙二醛(MDA)、NO、TNF- α 、IL1- β 濃度及肝臟組織中之3種抗氧化酵素(SOD (superoxide

dismutase)、GSH-Rd (glutathione reductase)、GSH-Px (glutathione peroxidase)) 活性來探討其藥理機轉。經由活性成分指紋圖譜的建立，以進一步確定三點金草之藥理機轉及藥用價值。

接著本研究以三點金草甲醇萃取物(MDT)，經有機溶媒分劃得正己烷、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇及水層，以清除自由基及抗氧化之活性試驗，來評估三點金草甲醇抽出物及各分劃層的抗氧化的活性。其中使用DPPH自由基清除率來評估抗氧化物之活性，廣泛用於篩選評估具有抗氧化活性之食品、中草藥、化粧品及保健康食品，此分析方法簡便快速、再現性高。利用CAMAG Video Store and Video Scan數位影像處理系統在抗氧化活性評估上應用的新方法，以1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl hydrate (DPPH)及 α -tocopherol (Vitamin E)為分析試劑，將檢品點注在TLC薄片上，再經由數位影像處理系統處理。上述方法分別採用各種不同點注量及時間點監測評估，找出最適當的分析條件，建立此分析方法的標準流程，這個新的分析方法之優點如下：所需檢品及DPPH的分析量少，只需要各1 μ l即可進行分析，此分析的再現性高而且經濟方便。

第二章 總論

第一節 山螞蝗屬(*Desmodium*)植物及藥用植物之文獻考察⁽¹⁵⁻¹⁷⁾

一、山螞蝗屬之植物考察

山螞蝗屬(*Desmodium*)全世界約有 350 多種，分佈於熱帶和亞熱帶地區，為草本、灌木或亞灌木，有時近攀緣狀。常見的葉為羽狀三出複葉，五出葉則較少見，退化為只有單小葉則很少，小葉具小托葉。花較小，組成腋生或頂生的於圓錐花序或總狀花序的每一節上；苞片子膜質，具線紋，早落。花萼鐘形或筒狀，4~5 裂，上面 2 裂齒常合生；花冠白色、綠色、黃白色、粉紅、淡紫色或桃紅色，伸出萼外，旗瓣橢圓形、寬橢圓形、倒卵形、寬倒卵形至近圓形，翼瓣多少與龍骨瓣貼連，花瓣具柄，花瓣蝶形。雄蕊單體或二體(9+1)；子房通常無柄，有胚珠數顆。莢果扁平，不開裂，腹面深收縮，成熟時斷裂成 1 節 1 粒種子的莢節。在台灣有 18 種，特有種有 2 種，台灣植物誌收載共有 18 種。在中國大陸約有 27 種 5 變種，分布於西南部經中南部至東南部。

在 2005 年張肇元以台灣產波葉山螞蝗和排錢樹進行生藥學研究，利用光學及電子顯微鏡的觀察，透過生藥組織切片的比較，並

清楚描述分別這兩植物在外部形態及組織上的差異，另外萃取這兩種植物的 DNA，經由 PCR 的技術對其遺傳物質進行定序⁽¹⁸⁾。

在 2007 年林怡仁針對台灣產山螞蝗屬十種植物之基原進行鑑定研究，該研究先以五官鑑別法，對台灣產山螞蝗屬十種植物之外觀形態、果皮與種子表面之細微特徵加以描述，經由比較山螞蝗屬十種植物之生藥組織切片圖及掃描式電子顯微鏡圖；更進一步利用聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction ; PCR)，將核糖 DNA 的內轉錄間隔(internal transcribed spacer; ITS)區域放大並且進行定序，上述研究為台灣產山螞蝗屬植物之鑑別上提供生藥組織切片圖及其它植物學上大量的參考資訊⁽¹⁹⁾。

二、台灣山螞蝗屬之植物的檢索表⁽²⁰⁾

以下為台灣維管束植物簡誌中所記載之分類：

1. 三出複葉

2. 頂小葉長於 2 cm

3. 葉上無毛

4. 頂小葉短於 3 cm

5. 花序梗具鉤毛..... 假地豆 a. *D. heterocarpum*

5. 花序梗具直毛... 直毛假地豆 5b. *D. heterocarpum* var. *strigosum*

4. 頂小葉長於 3 cm

6. 葉柄具翼..... 小槐花 1. *D. caudatum*

6. 葉柄不具翼。

7. 花梗 5-12 mm 長..... 細梗山螞蝗 9b. *D. laxum* var. *leptopum*

7. 花梗短於 5 mm。

8. 頂小葉菱形..... 圓菱葉山螞蝗 12a. *D. podocarpum*

8. 頂小葉披針形..... 12b. *D. podocarpum* subsp. *oxyphyllum*

3. 葉上面有毛

9. 托葉扇形，包圍枝條..... 蝦尾山螞蝗 14. *D. scorpiurum*

9. 托葉披針形，不包圍枝條。

10. 莢果 2-4 節.....琉球山螞蝗 9a. *D. laxum* subsp. *laterale*

10. 莢果超過 5 節

11. 莢節之長寬約略相等

12. 小葉菱形.....波葉山螞蝗 15. *D. sequax*

12. 小葉卵形至倒卵形

13. 草本；頂小葉窄於 4 cm.. 西班牙三葉草 7. *D. intortum*

13. 灌木；頂小葉寬過 4 cm... 多花山螞蝗 11. *D. multiflorum*

11. 莢節長約為寬的 3 倍以上

14. 莢果側邊平滑無紋.....散花山螞蝗 2. *D. diffusum*

14. 莢果側邊有條紋脈...疏花山螞蝗 8. *D. laxiflorum*

2. 葉短於 2 cm

15. 半灌木；莢果在節處兩面收縮.....小葉山螞蝗 10. *D. microphyllum*

15. 草本；莢果在節處僅在腹面收縮

16. 小葉先端圓形.....變葉山螞蝗 6. *D. heterophyllum*

16. 小葉尖端凹形.....蠅翼草 16. *D. triflorum*

1. 單葉

16. 葉 1-1.5 cm 長.....腎葉山螞蝗 13. *D. renifolium*

16. 葉長過 3 cm

17. 葉兩面被毛

18. 托葉披針形；枝條密被毛.....大葉山螞蝗 3. *D. gangeticum*

18. 托葉錐形；枝條疏毛.....絨毛葉山螞蝗 17. *D. velutinum*

17. 葉上面無毛，背面披毛

19. 葉三角狀心臟形 細葉山螞蝗 4. *D. gracillium*

19. 葉長橢圓形.....單葉拿身草 18. *D. zonatum*



三、山螞蝗屬之藥用植物考察^(1,2,17,21,22)

1. *Desmodium caudatum* (Thunb. ex Murray) DC. 小槐花^(1,17,21)

- 1.別名：小槐花(植物名實圖考)、清酒缸(中藥大辭典)、餓螞蝗(廣西藥用植物名錄)、銳葉小槐花(台灣藥用植物資源名錄)。
- 2.型態：直立灌木，分枝多枝條無毛。高 1-2 公尺。三出複葉，頂小葉披針形至倒披針形，長 7-12 cm，寬 2-3 cm，無毛，先端漸尖；托葉刺針狀，長 5-10 cm。花黃色或綠白色。莢果 4-6 節，兩面收縮，長 5-7 cm。花期 7-9 月，果期 9-11 月。
- 3.分佈：台灣、中國長江以南，分佈海拔 150-1000 公尺，潮溼或半陰性灌木叢中。
- 4.效用：根、葉供藥用，能祛風活血、利尿、殺蟲、亦可供作牧草。

2. *Desmodium diffusum* DC. 散花山螞蝗⁽²²⁾

- 1.別名：彌散山螞蝗
- 2.型態：半灌木，枝條匍匐，密佈短毛。三出複葉，頂小葉卵形，長 4-7 cm，寬 2-5 cm，披毛，先端漸尖至銳形；托葉長 5-6 mm。花紫色。莢果 5-7 節，兩面收縮，長約 3 cm。
- 3.分佈：台灣中低海拔潮溼或半陰性林木中。

3. *Desmodium gangeticum* (L.) DC. 大葉山螞蝗^(1,17)

1. 別名：粘人草、粘草(雲南藥用植物名錄)，小百解菜、籽螞蝗(廣西藥用植物名錄)。

2. 型態：直立半灌木，枝條疏披毛。高可達 1 公尺。單葉，長橢圓形，長 8-11 cm，寬 3-5 cm，上面近無毛，背面披疏毛，先端銳形；托葉線形，長 7-10 mm。花粉紅色。莢果 5-8 節，腹面收縮，長 1.5-2 cm。

3. 分佈：台灣中南部低海拔灌木叢及草生地。

4. 效用：消炎、殺菌、調經止痛及解熱。

4. *Desmodium gracilium* Hemsl. 細葉山螞蝗⁽²⁰⁾

1. 型態：草本，披短白毛。高 30-60 cm。單葉，三角狀心臟型，長 2-3cm，寬 2-2.5cm，上面疏被毛，背面密佈白毛，先端鈍形；托葉披針形，長 4-5 mm。花紫紅色。莢果 3-5 節，兩面收縮，長 2-3 cm。

2. 分佈：台灣南部特有種。生於低海拔濕性及半陰性次生林及灌木叢中。

5. *Desmodium heterocarpum* (L.) DC.

a. var. *heterocarpum* 假地豆^(1,17,21)

1.別名：大葉青、山花生(全國中草藥匯編)，小槐花、木本山土豆(台灣藥用植物誌)。

2.型態：半灌木或小灌木，枝條密披伏毛。高 30-150 cm。三出複葉，頂小葉長橢圓至倒卵長橢圓形，長 2-3 cm，寬 1-2 cm，上面無毛，葉脈微凸，背面被灰毛，先端圓形至凹形；托葉披針形，約 10 mm 長。蝶形花冠，花紫紅色。莢果 4-7 節，腹面收縮，長 1.5-2 cm，有鉤毛。花期 7-9 月，果期 9-11 月。

3.分佈：台灣，生於森林、灌木叢及草地，分佈於平地至低海拔山區，海拔 250-480 公尺。

4.效用：清熱、利尿、消癰解毒。

b. var. *strigosum* van Meeuwen 直毛假地豆

1.型態：與原變種區別在於莢果具有直毛。

2.分佈：台灣，生於灌木叢及草地，分佈海拔 450-900 公尺。

6. *Desmodium heterophyllum* (Willd.) DC. 變葉山螞蝗^(1,17)

1. 別名：月兔草(台灣藥用植物資源名錄)，鐵線草、假地豆(廣西藥用植物名錄)。
2. 型態：一年生匍匐性草本，莖披長疏毛。高 10-70 cm。三出複葉，頂小葉橢圓形至卵狀長橢圓形，長 5-18 mm，寬 3-10 mm，上面無毛，葉背面被柔毛，先端圓形；托葉披針形，約長 5 mm。蝶形花冠，花紫紅色或淡粉紅色。莢果 4-6 節，腹面收縮，長 1.5-2 cm。花、果期 7-10 月。
3. 分佈：中國東南部、台灣，生於河邊、田邊、路旁草地，分佈於平地至低海拔，海拔 250-480 公尺。
4. 效用：清熱解毒、利尿通淋。

7. *Desmodium intortum* (DC.) Urb. 西班牙三葉草⁽²⁰⁾

1. 別名：營多藤、扭曲山綠豆、旋扭山綠豆、綠葉山螞蝗。
2. 型態：攀緣性草本，被直毛和鈎毛。三出複葉，頂小葉卵形至卵狀橢圓形，長 4-6 cm，寬 2.5-3.5 cm，兩面被毛，先端銳形，托葉披針形，約長 6 mm。花白色、黃色或淡紫色。莢果 6-10 節，兩面收縮，長 2-3 cm。

3.分佈：台灣中低海拔林緣及荒廢地。為歸化種。

4.效用：可供作牧草。

8. *Desmodium laxiflorum* DC. 疏花山螞蝗^(1,17,22)

1.別名：大葉拿身草(台灣藥用植物資源名錄)、白古蘇草(台灣原住民藥用植物彙編)，路螞蝗、粘衣草、山螞蝗、野毛豆(雲南藥用植物名錄)，羊帶歸、白花餓螞蝗(廣西藥用植物名錄)。

2.型態：多年生半灌木，枝條匍匐，植株高 1.5 公尺，密被短毛。葉互生，三出複葉，頂生小葉卵形至廣長橢圓形，長 4-7 cm，寬 2-5 cm，兩面被毛，先端銳形；托葉長 5-6 mm。花苞細小，蝶形花冠，花紫紅色或淡紅色。莢果 5-7 節，兩面收縮，長約 3 cm，花果期夏、秋間。

3.分佈：台灣低、中海拔山區次生林和灌叢中。

4.效用：活血、平肝、清熱、利濕、解毒；台灣原住民用於治胃痛、腹瀉及痢疾⁽²²⁾。

9. *Desmodium laxum* DC.

a. subsp. *laterale* (Schindl.) Ohashi 琉球山蚂蝗⁽²⁰⁾

1. 別名：細梗山蚂蝗

2. 型態：多年生草本，莖被疏毛。三出複葉，頂小葉披針形，長 5-10 cm，寬 1.5-3 cm，上面有毛或無毛，背面葉脈明顯，脈上有毛，先端漸尖；托葉披針形，長 5-7 mm。蝶形花冠，花淡紫紅色。莢果 2-4 節，腹面收縮，長 1-2 cm，各節半菱形。

3. 分佈：生長於中、低海拔山區、灌木叢及森林。

b. subsp. *leptopum* (Benth.) Ohashi 細梗山蚂蝗⁽²⁰⁾

1. 別名：琉球山蚂蝗

2. 型態：與前亞種區別在於葉微卵形，無毛，背面葉脈不明顯，背面具白點，莢果各節較細長，呈長純三角形。

3. 分佈：台灣低海拔森林及灌叢中。

10. *Desmodium microphyllum* (Thunb. ex Murray) DC. 小葉山蚂蝗^(1,17)

1. 別名：碎米柴、小葉山綠豆(台灣藥用植物資源名錄)小葉山綠豆(海南植物誌)，小葉三點金(中國植物誌)。

2. 型態：多年生草本，微毛。三出複葉，頂小葉橢圓形，長 5-10 mm，寬 4-6 mm，上面無毛，背面微被伏毛，先端銳形；托葉線狀披針形，長 3-5 mm。花粉紅色。莢果 2-4 節，兩面深收縮，約長 1 cm。花期 5-9 月，果期 9-11 月。
3. 分佈：中國長江以南、台灣，生於荒地草叢或灌木林中，分佈海拔 150-2500 公尺。
4. 效用：根供藥用，有清熱解毒、止咳、祛痰之效。

11. *Desmodium multiflorum* DC. 多花山螞蝗^(1,17,22)

1. 別名：野黃豆(台灣藥用植物資源名錄)，粘身草、胃痛草(全國中草藥匯編)，餓螞蝗、吊馬花(廣西藥用植物名錄)，紫藤小槐花(台灣原住民藥用植物彙編)、野黃豆(台灣藥用植物誌)。
2. 型態：直立灌木，密被伏毛。高 1-1.5 公尺。三出複葉，頂生小葉倒卵形或寬橢圓形，長 4.5-8.5 cm，寬 2.5-5 cm，兩面被毛，先端銳形；托葉披針形，長 7-10 mm。花密生，花冠蝶形，花粉紫色。莢果 4-7 節，兩面收縮，長 3-5 cm。
3. 分佈：台灣，分佈海拔 500-2800 公尺灌叢及空地。

12. *Desmodium podocarpum* DC.

a. subsp. *podocarpum* 圓菱葉山螞蝗^(15,20)

1. 別名：長柄山螞蝗(中國植物誌)。

2. 型態：灌木，密被毛。三出複葉，頂小葉寬菱形，長 3-8 cm，寬 2-5 cm，先端銳形。花粉紅色。莢果單節，長 5-8 mm。

3. 分佈：台灣中部中海拔山區空曠地。

b. subsp. *oxyphyllum* (DC.) Ohashi 小山螞蝗

1. 型態：與原亞種區別在於植株草本，全株近無毛，頂小葉寬卵形，莢果 2-3 節，腹面深收縮。

2. 分佈：台灣北部中海拔山區濕性及半陰性林地。

13. *Desmodium renifolium* (L.) Shindl. 腎葉山螞蝗⁽¹⁷⁾

1. 別名：圓節山螞蝗(新華本草綱要)。

2. 型態：匍匐性無毛草本。高 30-50 cm。單葉，腎形，長 1-1.5 cm，寬 2-2.5 cm，無毛，先端凹形或截形；托葉甚小，線形，早落。莢果 3-5 節，腹面微縮，長 2 cm，莢節長遠大於寬。

3. 分佈：台灣南部低分佈海拔 100-1600 公尺草地及灌木叢中。

4. 效用：祛風、利尿、止帶、止咳。

14. *Desmodium scorpiurus* (Sw.) Desv. 蝦尾山螞蝗^(15,20)

1. 別名：蝎尾山螞蝗(中國植物誌)。
2. 型態：多年生匍匐性草本，莖被鈎毛。三出複葉，頂小葉橢圓形，長 1.5-3.5 cm，寬 8-30 mm，兩面被毛，先端鈍形；托葉葉狀，長 1-2 cm。花粉紅色或淡紫紅色。莢果 3-8 節，細長，被鈎毛，兩面於種子間收縮，長 2-5 cm，莢節長約為寬之 3-4 倍。花、果期 8-10 月。
3. 分佈：原產於熱帶美洲，台灣中南部平地與低海拔，生長於荒地、草坪及路旁。
4. 效用：抗菌。



15. *Desmodium sequax* Wall. 波葉山螞蝗^(17,22)

1.別名：山毛豆花(台灣原住民藥用植物彙編)、烏山黃檀草、滿鼎糊草(台灣藥用植物誌)，長波狀葉山螞蝗(廣西藥用植物名錄)。

2.型態：多年生灌木，莖密被銹色鉤毛。高 1-2 公尺。葉互生，具長柄，三出複葉，頂小葉菱形，長 5-10 cm，寬 4-8 cm，兩面微被毛，先端銳形，前半部波狀緣；托葉披針形，約長 5 mm。花粉紅色或淡紫紅色，蝶形花冠，花期春季。莢果 8-12 節，被短鉤毛，兩面於種子間收縮，長 4-5 cm，果期夏、秋之間。

3.分佈：分佈台灣低中海拔山區，生長在路旁、荒地、林緣，海拔 1000-2800 公尺。

4.效用：清熱瀉火、活血祛瘀、斂瘡；台灣原住民將其葉貼於頭部治頭痛或以其根煎服治胸痛，若為創傷則將根或葉搗碎以其汁液塗於患部⁽²⁰⁾。

16. *Desmodium triflorum* (L.) DC. 三點金(蠅翼草)^(1-2,17,20-21)

1.別名：小本土豆藤、蝴蝶翅(台灣藥用植物資源名錄)，八字草(植物名實圖考)，哮喘草(全國中草藥匯編)，蠅翅草、胡蠅翼、三

硯、四季春、三耳草、珠子草(台灣藥用植物誌)。

2.型態：一年生草本，莖被細柔毛(圖 2-1 三點金草植物形態)。三出複葉，頂小葉倒寬卵形或倒卵形，長 6-10 mm，寬 7-8 mm，上面無毛，背面被柔毛，先端截形或凹形(圖 2-5 三點金草植株及葉之外觀)；托葉長 3-4 mm。蝶形花冠，花紫紅色 (圖 2-3 三點金草花之外觀)。莢果 2-5 節，腹面收縮，長 8-15 mm (圖 2-4 三點金草之果莢)。花期 7-8 月,果期 9-10 月。

3.分佈：台灣中、低海拔山區，生長於空地、路旁及開闊草坪 (圖 2-2 三點金草植株外觀)。

4.效用：行氣止痛、溫經散寒、解毒、去風解熱，亦可供作牧草。





Pl. 130. *Desmodium triflorum* (L.) DC. (LEGUMINOSAE)

1. habit; 2. leaves (lower surface); 3. flower; 4. calyx; 5. corolla; 6. stamens; 7. pistil; 8. pods (outer surface); 9. dissected pod; 10. seed; 11. portion of stem.

圖 2-1 三點金草(*Desmodium triflorum*)植物形態圖⁽¹⁶⁾

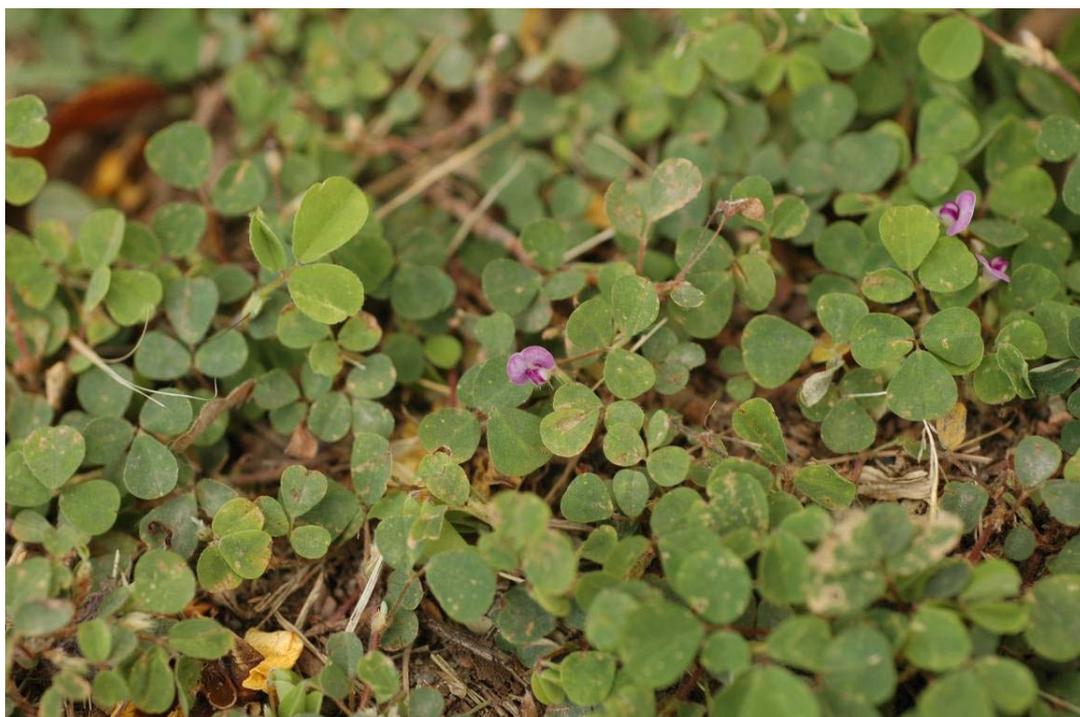


圖 2-2 三點金草(*Desmodium triflorum*)之植株外觀

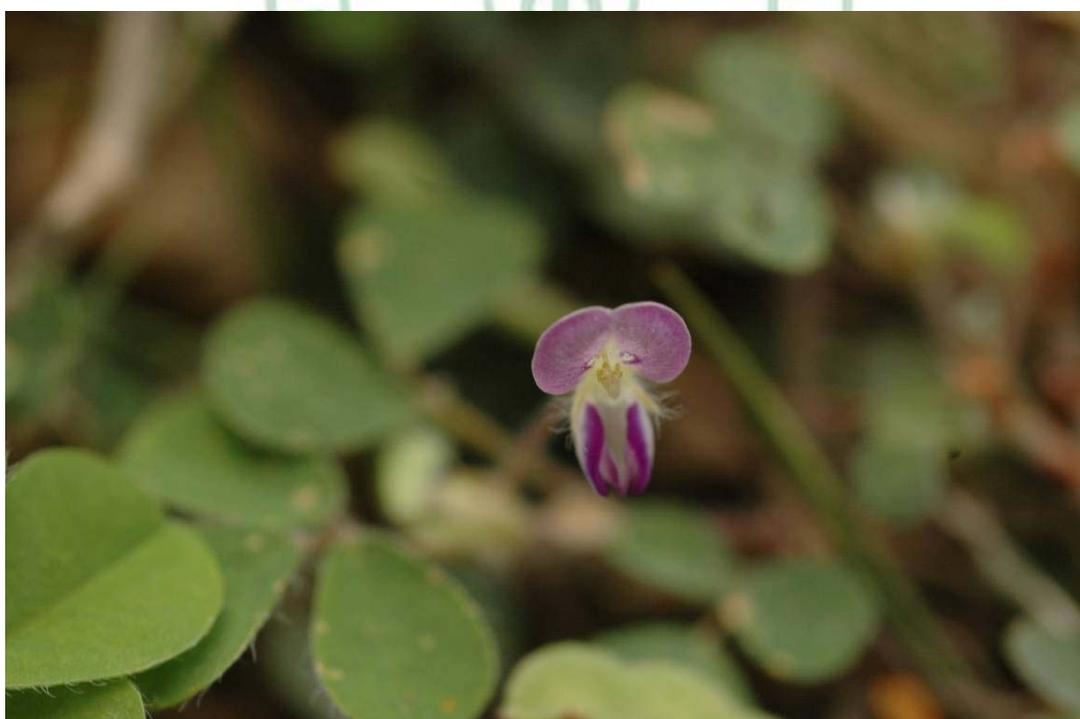


圖 2-3 三點金草(*Desmodium triflorum*)花之外觀



圖 2-4 三點金草(*Desmodium triflorum*)之果莢



17. *Desmodium velutinum* (Willd.) DC. 絨毛葉山螞蝗^(1,17,15,20)

1. 別名：白白香、大葉拿身草(台灣藥用植物資源名錄)，絨毛山螞蝗(中國植物誌)，絨毛山綠豆(海南植物誌)。

2. 型態：半灌木，密被褐色絨毛。高 150 cm。單葉，卵形，長 4-6 cm，寬 3-4 cm，兩面被毛，先端銳形至圓形，微波狀緣；托葉鐮形。花紫紅色。莢果 4-5 節，腹面收縮，上面微縮，長 2 cm。花、果期 9-11 月。

3. 分佈：台灣南部低分佈海拔 100-900 公尺空地及溼地。

4. 效用：全株治黃疸，葉治梅毒⁽²¹⁾。

18. *Desmodium zonatum* Miq. 單葉拿身草^(17,20)

1. 別名：山槐樹(廣西藥用植物名錄)，長莢山螞蝗(新華本草綱要)。

2. 型態：半灌木，嫩部具細柔毛。單葉，長橢圓披針形，長 4-6 cm，寬 1.5-2 cm，上面無毛，背面被毛，先端尾狀銳形，托葉披針形，約長 5 mm，宿存。花粉紅色。莢果 4-8 節，兩面收縮，長 4-6 cm。

3. 分佈：台灣北部及東部中海拔山區林緣。

4. 效用：清熱消滯。

第二節 臺灣產山螞蝗屬植物之化學成分考察

1. *Desmodium microphyllum* (Thunb. ex Murray) DC. 小葉山螞蝗

小葉三點金有揮發油化學成分方面的研究⁽²³⁾，經由GC-MS的分析發現，其揮發油化學成分多為烷烴和酯類化合物。小葉三點金的莖和葉中主要含有脂肪烴和酯類化合物，2-甲基庚烷、甲苯氧基丁酯在莖和葉中的含量高，而根中則主要含三萜類、烷烴類化合物。小葉三點金其它化學成分方面的研究⁽²⁴⁾，在2007年有10種化合物被分離出：
2-methyl-3-carbonyl dioxan-1-methoxy-4,5,6-trihydroxycyclohexane，
octyl-4,5-dihydroxy-3-(4-noneneacyloxy) pyrrolidine-2-carboxylic ester,
 β -sitosterol-3- β -D-glucopyranoside, salicylic acid, tridecyl salicylate,
hexadecyl salicylate, pinitol, α -D-glucopyranosyl- β -L-rhamnopyranoside,
undecatrienyl decanoate。

2. *Desmodium triflorum* (L.) DC. 三點金草(蠅翼草)

從美國伊利諾大學之 NAPRALERT 資料庫中，針對 *Desmodium triflorum* 成分進行檢索，其結果如表 2-1⁽²⁵⁻²⁹⁾：

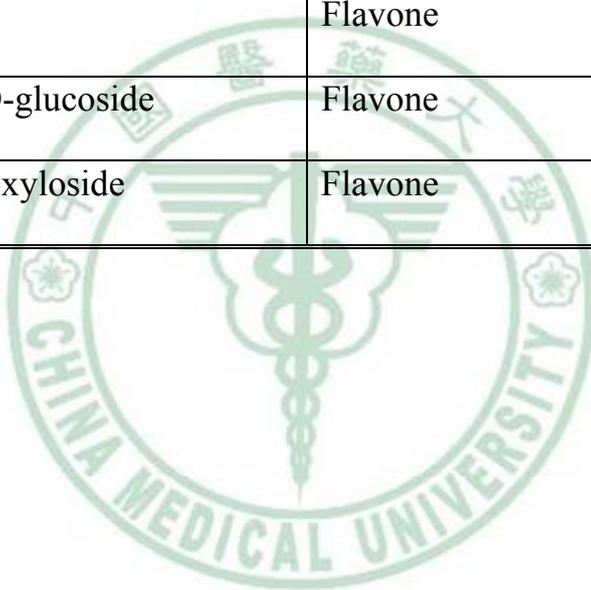
台中靜宜大學應用化學系邱麗琴對三點金草的化學成份進行研究，由三點金草全草的甲醇萃物進行成分之分離，其分離出之成分如下⁽³⁰⁾：

長鏈碳氫化合物：aliphatic alcohols, aliphatic acids。植物固醇：campesterol, stigmasterol, β -sitosterol。三萜類化合物：ursolic acid, oleanolic acid。植物固醇配糖體：campesterol-3-*O*- β -D-glucose, stigmasterol-3-*O*- β -D-glucose, sitosterol-3-*O*- β -D-glucose。碳水化合物：(+)-pinitol。黃酮類化合物；vitexin, genistin。

表 2-1 NAPRALERT 資料庫中三點金草已被分離出之成分

化合物名稱	化合物分類	成分分離部位
Apigenin	Flavone	Entire Plant ⁽²⁵⁾
Apigenin-7-O-rutinoside	Flavone	Flowers ⁽²⁶⁾
Bufotenine	Indole Alkaloid	Entire Plant ⁽²⁷⁾
Bufotenine-N-Oxide	Indole Alkaloid	Entire Plant ⁽²⁷⁾
Cholest-5-en-3- β -ol,24-ethyl	Steroid	Not Specified ⁽²⁸⁾
Cholest-5-en-3- β -ol,24-methyl	Steroid	Not Specified ⁽²⁸⁾
Chrysanthemim	Flavonoid	Flowers ⁽²⁶⁾
Fucosterol	Steroid	Aerial Parts ⁽²⁹⁾
Gramine	Indole Alkaloid	Entire Plant ⁽²⁹⁾
Iridin	Isoflavone	Flowers ⁽²⁶⁾
Paeonidin-3-O-arabinoside	Flavonoid	Flowers ⁽²⁶⁾
Pinitol	Carbohydrate	Entire Plant ⁽²⁵⁾
Tryptamine	Indole Alkaloid	Entire Plant ⁽²⁷⁾
Tryptamine,5-hydroxy:Methyl	Indole Alkaloid	Entire Plant ⁽²⁷⁾
Tryptamine,N-methyl-methoxy	Indole Alkaloid	Entire Plant ⁽²⁷⁾
Tryptamine, N-N-dimethyl	Indole Alkaloid	Entire Plant ⁽²⁷⁾

化合物名稱	化合物分類	成分分離部位
Trytamine,N-N-Dimethyl:Methoxy: N-Oxide	Indole Alkaloid	Entire Plant ⁽²⁷⁾
Trytamine,N-N-Dimethyl:Methoxy	Indole Alkaloid	Entire Plant ⁽²⁷⁾
Trytamine,N-N-Dimethyl:N-Oxide	Indole Alkaloid	Entire Plant ⁽²⁷⁾
Vitexin	Flavone	Aerial Parts ⁽²⁵⁾
Iso-vitexin	Flavone	Entire Plant ⁽²⁵⁾
Vitexin-2"-O-β-D-glucoside	Flavone	Entire Plant ⁽²⁵⁾
Vitexin-2-O-β-D-xyloside	Flavone	Aerial Parts ⁽²⁹⁾



第三節 臺灣產山螞蝗屬植物之藥理考察

1. *Desmodium gangeticum* (L.) DC. 大葉山螞蝗

在台灣 2006 年薛閔鐘針對台灣產山螞蝗屬及其近源植物抗氧化活性及其神經細胞保護作用機轉進行探討，結果發現大葉山螞蝗甲醇萃取物，具有超氧陰離子及氫氧自由基之清除能力⁽³¹⁾。

2007 年盧易鮮針對大葉山螞蝗粗抽物對於肺癌細胞的等相關藥理活性進行探討，其中大葉山螞蝗粗抽物對於福馬林試驗具有劑量依存性。在抑菌試驗評估結果發現，大葉山螞蝗粗抽物在高濃度下，幾乎可完全地抑制綠膿桿菌及部分大腸桿菌的生長，但對於克雷白氏菌則無影響。在抗肺癌細胞方面的研究發現，大葉山螞蝗粗抽物對肺癌細胞 A549 及 LLC 之生長，具有劑量及時間依賴性之抑制作用，對於 A549 肺癌細胞的作用發現可使細胞停留在 G1 期，並導致 P21、P27 的蛋白增加，Cyclin A 及 B1 被抑制。上述論文研究結果發現，大葉山螞蝗粗抽物具有抗菌、鎮痛及抗發炎的藥理活性，對於抗 A549 肺癌細胞活性評估，發現可使其細胞週期靜止在 G1 期⁽³²⁾。

在印度大葉山螞蝗被民間廣泛使用於治糖尿病、解熱、鎮痛抗發炎及止嘔等，2003 年 Raghavan 等人對於大葉山螞蝗進行抗氧化活性方面的研究，發現大葉山螞蝗 50 % 之乙醇萃取物在體外試驗具有清除 DPPH、

ABTS^{•+}、NO[•]、HOC 及 H₂O₂ 自由基的能力，並具有螯合鐵離子的作用，在體內試驗且能抑制大鼠腦組織脂質過氧化物丙二醛的生成，而目前大量研究文獻發現丙二醛(Malondiadehye, MDA)與 DNA 損傷、癌症及老化等疾病有關，然而該研究指出大葉山螞蝗 50 %之乙醇萃取物具抗氧化的活性可能與其含有黃酮苷和異黃酮苷有關⁽³³⁾；2005 年 Gino 等人研究發現，大葉山螞蝗之根部水萃取物對於 isoproterenol 誘發大鼠之心肌梗塞具保護作用，該研究結果發現大鼠口服大葉山螞蝗根部水萃取物後，能降低誘發心肌梗塞實驗大鼠心臟組織、肝臟組織及血清中肌酸磷激酶(creatinine, CPK)、乳酸脫氫酶(lactate dehydrogenase, LDH)、鹼性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)及血清麩胺草酸轉胺酶(SGOT)活性，其機轉為抗氧化作用及降低總膽固醇有關⁽³⁴⁾。

2004 年印度 Anshu 等人，研究大葉山螞蝗藥理活性及其鎮痛抗發炎作用，大葉山螞蝗之根部水萃取物，對棉球誘導的大鼠肉芽腫具有抑制及抗發炎的作用，而其地上部及根部水萃取物，對醋酸誘發扭體行為顯示中度的鎮痛作用⁽³⁵⁾；2006 年 Govindarajan 等人研究報導進一步從大葉山螞蝗分離出活性成分綠原酸及咖啡因酸，並指出大葉山螞蝗所含之多酚類化合物(如：綠原酸及咖啡因酸)具抗氧化活性及抗關節炎的作用⁽³⁶⁾；Govindarajan 等人在 2007 年取大葉山螞蝗部分純化萃取層，經由 λ -

角叉菜膠誘導大鼠足蹠浮腫試驗，並分析實驗大鼠肝臟及脾臟中抗氧化酵素 SOD、GPX 及 CAT(catalase)含量變化，結果顯示黃酮類成分萃取層比生物鹼成分萃取層更具抗發炎的效果⁽³⁷⁾。

Govindarajan 等人在抗糖尿病方面的研究，發現大葉山螞蝗之半醇水萃取物，對於 STZ 誘發高血糖大鼠具有降低血糖的作用，經由刺激胰島素的分泌作用，和降低三酸甘油酯、總膽固醇及增加 HDL 效果，高血糖大鼠具有抗糖尿病的保護作用⁽³⁸⁾。在改善學習記憶方面研究，Johi 等人發現大葉山螞蝗之水萃取物，對於 scopolamine 誘導大鼠在十字迷宮及被動實驗之學習障礙，具有改善學習作用活性⁽³⁹⁾。Ghosal 等人發現大葉山螞蝗所含之生物鹼 β -carbolines、indol-3-alkyl-amine 具有抗膽鹼、中樞神經刺激作用及對平滑肌的刺激作用等活性⁽⁴⁰⁾。

2. *Desmodium microphyllum* (Thunb. ex Murray) DC. 小葉山螞蝗

中國王峰等人研究發現，小葉三點金(*Desmodium microphyllum*)具有抗蛇毒拮抗 ET21 (Endothelin, ET) 和 S6b (sarafortoxin 6b)作用的研究，而內皮素 21 (ET21)是由 21 個胺基酸組成的多肽，是目前已知對人體血管收縮活性最強的物质，目前已知的疾病，特別是心血管方面的疾病，病灶的發生及形成過程都與 ET 的參與，然而經過基因序列的分析發現，

ET 和蛇毒 S6b 是由同系基因演化而來。其中小葉三點金的水或醇提物給小鼠灌胃後，靜脈注射 ET21 後其死亡時間明顯地較對照組延長 ($P<0.05$)，說明小葉三點金水或醇提物的成分對於 ET21 有一定的拮抗作用⁽⁴¹⁾。

3. *Desmodium triflorum* (L.) DC. 三點金草(蠅翼草)

1972年Ghosal等人對三點金草所含之生物鹼進行化學及藥理評估，在化學方面所得的結果發現，三點金草葉部所含之生物鹼約0.01~0.015%，根部所含之生物鹼約0.01~0.018%，莖部所含之生物鹼約0.008%；在藥理活性評估方面，則是將三點金草生物鹼萃取物進行急性毒性試驗，以小鼠腹腔注射投藥，記錄前30分鐘並連續觀察4小時，結果發現其生物鹼萃取物LD₅₀ 為215.5 mg/kg⁽⁴²⁾。

2005年在印度Kawshik等人針對三點金草之鎮痛及抗發炎活性進行研究，結果發現三點金草之正己烷、乙酸乙酯及甲醇萃取物，在鎮痛方面，對於醋酸扭體及熱板試驗所引發之疼痛具有緩解作用，其中以乙酸乙酯萃取物鎮痛作用效果最好；在抗發炎方面，由λ-角叉菜膠誘導大鼠足蹠浮腫試驗，在口服300 mg/kg 正己烷、乙酸乙酯及甲醇萃取物，皆具有抗急性發炎的作用⁽⁸⁾。

2007年中國大陸毛紹春等人針對三種山螞蝗屬植物的抗氧化性能進行研究⁽¹⁴⁾，其研究植物分別為三點金草(*Desmodium triflorum* L. DC.)、廣金錢草(*Desmodium styracifolium* Osbeck Melf.)、紅母雞草(*Desmodium gangeticum* L. DC)。其檢測項目有：抗羥自由基性能檢測、抗超氧陰離子自由基性能檢、對脂質過氧化抑制活性的檢測及抗香煙煙氣自由基的檢測。測定之結果如下，對超氧陰離子自由基的清除能力其順序為：三點金草>廣金錢草>紅母雞草。對羥自由基的清除能力其順序為：紅母雞草>三點金草>廣金錢草。對煙氣氣相及粒相自由基的清除能力順序為：三點金草>廣金錢草>紅母雞草。對羥自由基的清除能力其順序為：紅母雞草>三點金草>廣金錢草。上述研究結果推論三點金草、廣金錢草、紅母雞草所具有的生物活性，與其所含有之主要成分為黃酮類、生物鹼類和有機酸類化合物有關。

第四節 藥理實驗及研究方法相關文獻考察

一、鎮痛實驗

在藥理實驗上引起實驗動物疼痛的方式可分為四大類：電、熱、機械及化學刺激法；經由誘導產生疼痛的實驗動物模型包括：(1)短暫疼痛刺激(phasic pain)，常以物理性的刺激為主，如熱刺激：甩尾試驗、縮蹠試驗、熱板試驗及冷刺激試驗；(2)強直疼痛刺激(tonic pain)，則以化學性的刺激為主，如：福馬林試驗、醋酸扭體試驗⁽⁴³⁾。

上述誘導產生疼痛的實驗動物模型中，如：醋酸扭體試驗、福馬林試驗及 λ -角叉菜膠誘導發炎反應試驗為最常用的實驗模型。其中醋酸扭體試驗，是將醋酸經由腹腔注射到動物腹腔，造成動物體內組織損傷，促進 cyclooxygenase 活化及引起 serotonin、histamine、bradykinin、prostaglandin 的釋放，醋酸會誘發巨噬細胞釋放發炎介質，如：TNF- α 及 interleukin-1⁽⁴⁴⁾。醋酸亦會刺激化學敏感型接受體引起疼痛反應，經由觀察實驗動物因疼痛產生腹部內縮、身體扭曲、後足蹠蹬直或匍匐潛行等扭體行為，來評估藥物是否具有週邊鎮痛作用⁽⁴⁵⁾。

然而醋酸扭體試驗雖然便利，卻無法區別藥物所具有之鎮痛作用是在中樞或是在週邊，因此須經由福馬林試驗來進一步評價鎮痛的作用是屬於週邊或是中樞。福馬林注射到小鼠後足蹠所引起之疼痛為雙向性的

痛覺反應，小鼠因疼痛而舔足的時期有兩個高峰期，前期的舔足是福馬林注入後5分鐘內所引起的前期疼痛反應，主要為 substance P 及 bradykinin 等神經傳遞物質之釋放，刺激痛覺接受體經由 A δ 及 C 神經纖維，將疼痛感覺傳入中樞，因此前期的痛覺反應屬於中樞神經性，可歸屬為非發炎性疼痛⁽⁴⁶⁾；後期的舔足為福馬林注射後的20~30分鐘，主要是福馬林讓受到損傷的組織釋放出 histamine、serotonin、prostaglandin、kinin 等傳遞物質而引起發炎反應，造成福馬林後期的疼痛反應，可歸屬為發炎性疼痛⁽⁴⁷⁾。

在福馬林試驗中，福馬林的濃度對於疼痛的誘導，扮演著重要的角色，當福馬林濃度低0.2%時，只能誘導出前期的舔足反應，觀察組織切片並無明顯變化；當福馬林濃度在1%以上時，可誘導出前期及後期反應，當福馬林濃度在5%以上時，觀察組織切片可發現，顆粒性白血球聚集及紅血球滲出造成細胞浸潤，並可誘導出急性發炎反應⁽⁴³⁾。

在目前福馬林試驗的研究文獻，常以非類固醇抗發炎藥 indomethacin 為正對照組^(12,48)，indomethacin 對於福馬林誘導出的前期舔足反應無抑制作用，只對福馬林誘導出之後期的舔足反應有抑制作用。

二、抗發炎試驗

誘導發炎的實驗模式中，基本可歸納為以下三種模式：1.增加血管通透性(測定血漿蛋白滲出量或腫脹程度)；2.肉芽組織增生(棉球肉芽腫)；3.量測白血球細胞活化⁽⁴⁹⁾。目前文獻最常以量測腫脹程度來研究抗發炎藥物，實驗中所用的致發炎劑包括： λ -角叉菜膠(λ -carrageenan)、右旋糖(dextrose)、白蛋白(albumin)及酵母(yeast)等致發炎劑，上述致發炎劑中又以 λ -角叉菜膠最常被用來評價抗發炎藥物研究，因為 λ -角叉菜膠較上述之致發炎劑有專一性，其優點為誘導局部的發炎反應、無抗原反應、無全身性作用及良好的再現性⁽⁵⁰⁾。

λ -角叉菜膠是由藻類角叉菜(*Chondrus crispus*，愛爾蘭海蘚)，所抽提出的植物多醣體，對動物組織具有刺激作用，一般常用的 λ -角叉菜膠注射濃度為1%，注射體積為50 μ l，當經由足蹠注射 λ -角叉菜膠時，實驗動物的局部微血管擴張，血管通透性增高，足蹠產生腫脹，類似於人體急性發炎的反應，是一個經典的誘發急性發炎模式，常被廣泛應用於評價及篩選具有抗發作用的中草藥^(8,12,37,48)。

當 λ -角叉菜膠誘導後1個小時內的足蹠腫脹，稱為前期發炎反應，主要是histamine、5-hydroxytryptamine(5-HT)及bradykinin的釋出⁽⁵¹⁾，無法被非類固醇抗發炎藥抑制初期的腫脹，如：indomethacin或aspirin。接下

來1-6小時的足蹠腫脹，稱為後期的發炎反應，此時期的發炎反應與 prostaglandins的產生、活化cyclo-oxygenase(COX-2)、自由基如：超氧陰離子(O_2^-)及氫氧基自由基及一氧化氮(NO)的生成有關⁽⁵²⁾。

在1996年Salvemini等人研究發現，一氧化氮(NO)在 λ -角叉菜膠誘導的急性發炎反應中扮演著重要的介質，發炎前期所釋出的histamine、5-hydroxytryptamine(5-HT)及bradykinin會活化cNOS，促使NO產生，發炎後期iNOS被活化，亦會產生大量的NO，而NO會與超氧陰離子(O_2^-)反應形成過氧亞硝酸根($ONOO^-$)，而過氧亞硝酸根會引脂質過氧化及造成細胞的損傷⁽⁵²⁾。



三、抗急性肝損傷實驗

人體內最大、最重要、最複雜的代謝器官非肝臟莫屬，所代謝的物質包括：醣類、脂質、蛋白質、維生素、激素、膽汁等；此外肝臟還具有分泌、排泄、生物轉化等方面的重要功能。肝細胞能合成許多肽和某些凝血因子，儲存和釋放造血因子，對血液的凝固和造血過程扮演著重要的角色。肝臟的解毒功能對人體則具有保護作用。當肝臟功能受到損傷時，體內的物質代謝受阻，更會影響到其它臟器的正常生理功能而危及生命。

肝臟因有大量血液循環，所以肝細胞與血液間進行有著效率的物質交換。許多有毒物質易引起肝細胞損傷，肝臟具有良好的再生和代償能力，一般對輕度或局部性損傷，還不致於引起肝功能障礙。肝臟對各種致病因子的反應，主要是肝實質細胞和星狀細胞增生與肝實質細胞的變性和壞死，及肝間質的滲出和增生。當部分肝細胞壞死後，所剩餘肝細胞再生時，則會發生纖維增生導致肝硬化。在肝硬化時使靜脈血流受阻，導致肝靜脈與門靜脈壓上升，促使肝內動靜脈吻合支的形成，使肝細胞供血減少，進而發生變性或壞死、纖維增生，肝硬化更加嚴重而形成惡性循環。當肝臟受到嚴重損傷，且代償能力顯著減弱時，則會出現嚴重

肝功能障礙或稱肝功能不全，進而造成肝臟功能衰竭，引起中樞神經系統功能障礙，出現肝昏迷。

造成肝臟疾病之主要因素有病毒性、酒精性與化學性三大類，而在老鼠實驗動物模型之病理切片中與人體有一致之病理現象者為化學性肝損傷。由於造成病毒性、酒精性肝損傷之動物模式不易建立，因此目前文獻主要針對化學性肝損傷進行中草藥保肝功能之研究。依據衛生署修訂之健康食品之護肝功能評估方法，實驗所測定分析項目包括血清及肝臟中與肝臟傷害相關之成分或酵素活性。

化學性肝損傷主要是以四氯化碳(CCl_4)誘導大(小)白鼠慢性肝損傷的實驗模式，探討不同試驗樣品之處理對於大(小)白鼠慢性肝損傷之影響。

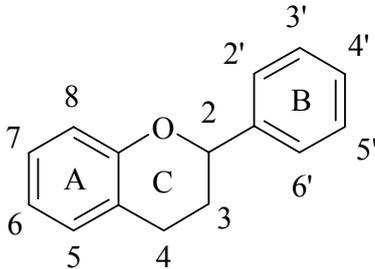
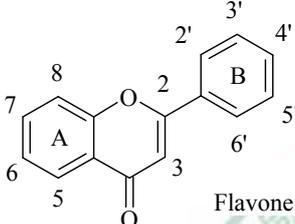
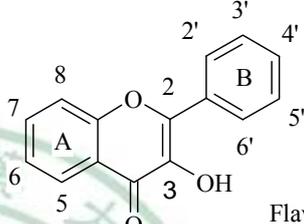
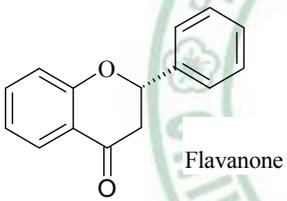
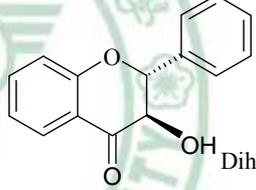
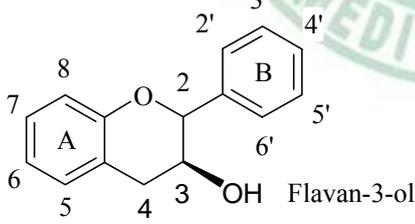
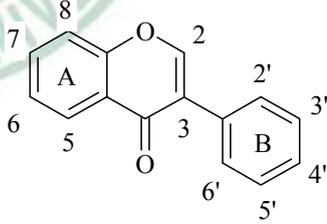
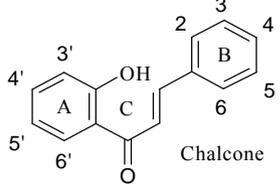
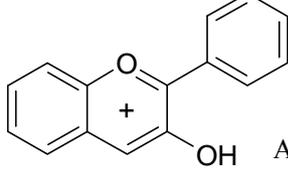
四氯化碳誘導肝損傷之原理，主要是因四氯化碳受肝微粒酵素活化成三氯甲烷自由基，然後與蛋白質結合導致蛋白質合成受阻，並引起脂質分解代謝失衡，引起肝細胞內三酸甘油酯蓄積，另外三氯甲烷自由基所形成之過氧化物，導致脂質過氧化而使得肝細胞膜損傷，造成肝臟中酵素滲出及細胞病變而壞死⁽⁵³⁾。

第五節 抗氧化實驗及研究方法相關文獻考察

一、黃酮類化合物的基本結構

黃酮類化合物(flavonoids)是一類其骨架具有 15 個碳原子組成的化合物(C6-C3-C6)，骨架中含有兩個苯環，兩個苯環由一個 C3 部分連接，C3 部分可以是脂肪鏈，也可以與 C6 部分形成六員或五員氧雜環。因此，多數黃酮由 A、B 和 C 三個環組成，根據 C3 的部分的成環、氧化和取代方式的差異，可分為黃酮類、黃酮醇類、查耳酮、橙酮、異黃酮及花青素以及上述各類的二氫衍生物(表 2-2 黃酮的分類及結構)。而這樣的分類主要基於以下結構特徵：(1)C3 連接是開環還是與 C6 部分形成氧雜環；(2)如果成環是五員環還是六員環；(3)B 環的連接位置；(4)C 環的氧化程度；(5)化合物是單體、二聚體或是多聚體⁽⁵⁴⁾。

表 2-2 黃酮的分類及結構⁽⁵⁶⁾

 <p>C6-C3-C6 Flavonoids</p>	
 <p>Flavone</p>	 <p>Flavonol</p>
 <p>Flavanone</p>	 <p>Dihydroflavonol</p>
 <p>Flavan-3-ol</p>	 <p>Isoflavone</p>
 <p>Chalcone</p>	 <p>Anthocyanidin</p>

二、黃酮類化合物與金屬鹽類試劑的螯合反應

常用試劑為 1% 三氯化鋁 AlCl_3 或硝酸鋁 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 。黃酮類化合物可與鋁鹽形成黃色螯合物，主要用於鑑定黃酮分子中是含有 3-OH/4-羰基、5-OH/4-羰基，或是鄰二羥基；而三氯化鋁試劑能使 3-OH 或 5-OH 與 4-羰基相螯合，其螯合物在酸中較穩定不易分解(圖 2-5 黃酮類化合物與鋁的螯合反應)。此外三氯化鋁試劑也能與相鄰雙羥基反應形成不穩定螯合物，此螯合物在酸中易分解，在 415 nm 處有最大吸收，在紫外燈下有螢光。因此使用該法不但可以進行定性鑒別，還可以用於定量分析樣品中總黃酮量⁽⁵⁴⁾。

鹽酸-鎂粉反應是鑑別黃酮的最常用的反應(圖 2-6 黃酮類化合物與鹽酸-鎂粉反應)⁽⁵⁵⁾。黃酮、黃酮醇、二氫黃酮及二氫黃酮醇類化合物呈橙紅~紫紅色，少數呈紫色~藍色⁽⁵⁴⁾。

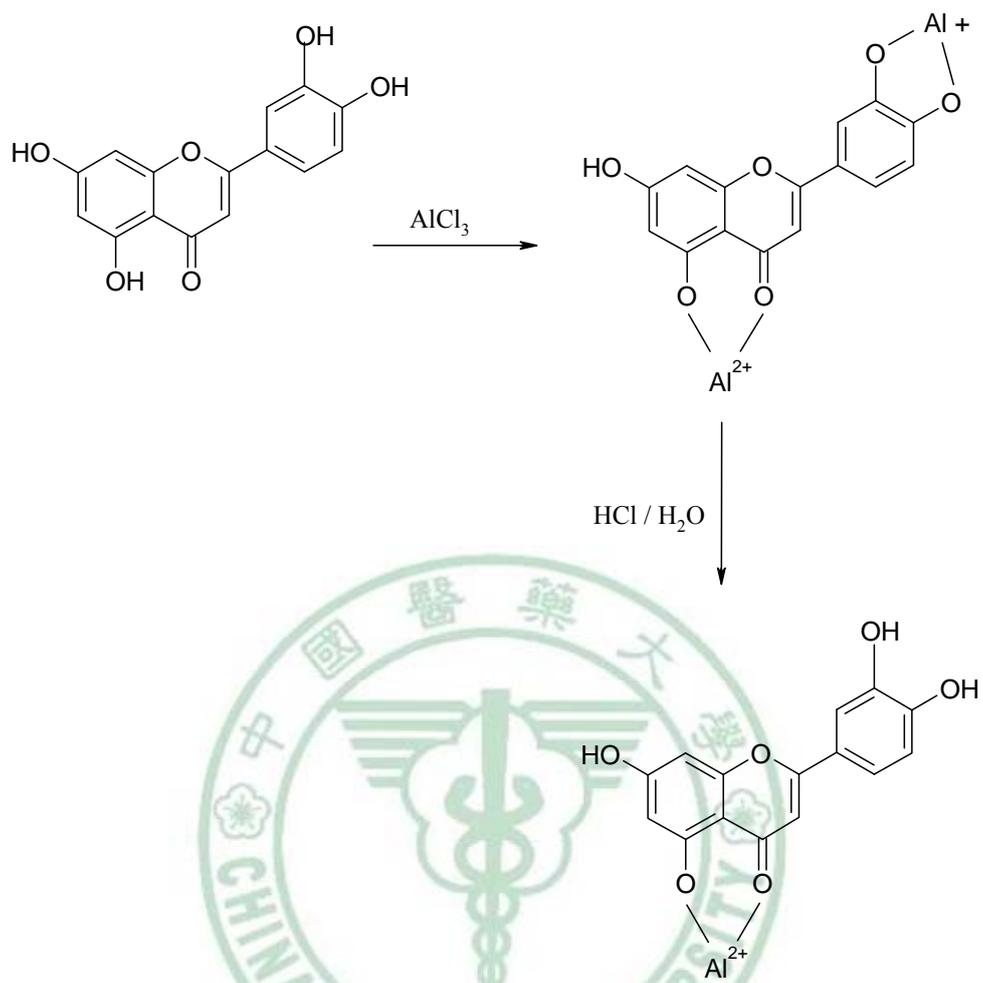


圖 2-5 黃酮類化合物與鋁的螯合反應⁽⁵⁴⁾

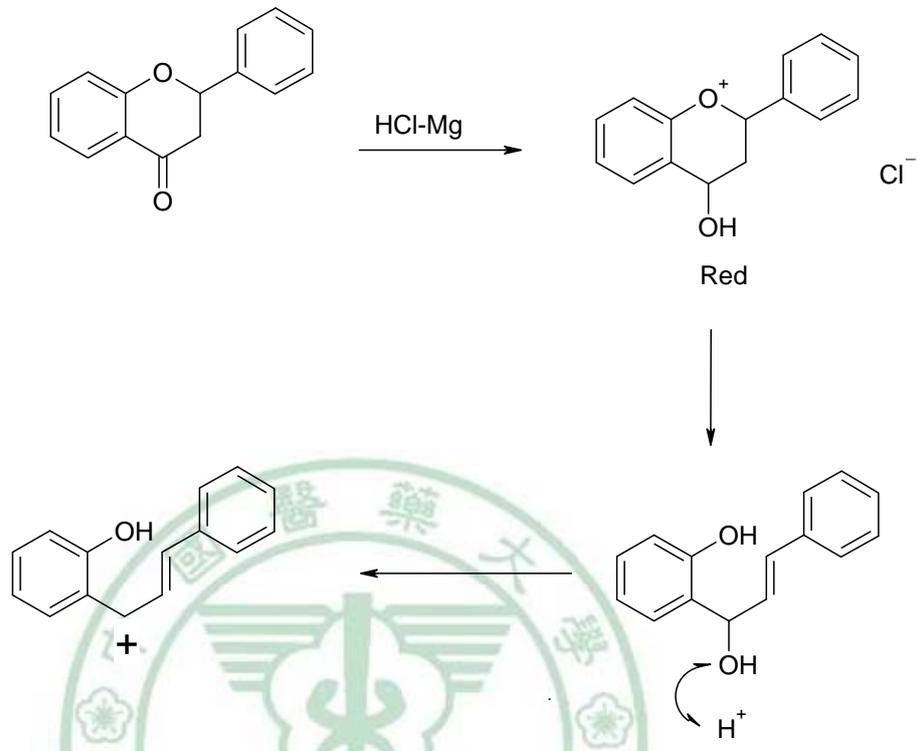


圖 2-6 黃酮類化合物與鹽酸-鎂粉反應⁽⁵⁵⁾

三、自由基介紹

自由基在化學結構上，是指未配對電子的基團、分子、或原子，以小圓點•來表示未配對的電子(表 2-3 自由基的主要種類)。各種化合物分子之共價鍵受外在環境如光、熱等因素作用下分裂含有不成對的價電子的原子或原子團，成為不穩定的自由基，可從其它穩定的原子或分子奪取一個電子以達到平衡，然而被奪走電子的原子或分子，反而成為不穩定的新自由基，形成連鎖反應，不斷形成新的自由基。在人體內自由基是組織中許多生化反應的中間代謝產物。在正常情況下，人體內的自由基總是處於不斷產生和不斷消除的動態平衡中。若自由基產生過多或清除過少，就會造成對組織的傷害⁽⁵⁶⁾。

四、DPPH 自由基染色法

2000 年 Cristina 開發一個快速且簡單方法，利用紫色的 DPPH 自由基來分析檢品清除自由基能力的強弱，其方法是將 TLC 片浸泡在 0.4 mM DPPH 甲醇溶液中 10 秒，取出染上紫色 DPPH 自由基的 TLC 片並用吹風機吹乾，將 2 μ l 的檢品溶液點注於 TLC 片上，若檢品溶液具有清除 DPPH 自由基能力，則會使紫色的 TLC 片背景呈現白點，藉由判斷白點的大小及深淺來評價清除自由基的能力⁽⁵⁷⁾。

表 2-3 自由基的主要種類⁽⁵⁶⁾

分類	名稱	電子配置	表示式
氧自由基	超氧陰離子	$\begin{array}{c} \cdot\cdot \quad \cdot\cdot \\ \cdot\text{O}:\text{O}\cdot \\ \cdot\cdot \quad \cdot\cdot \end{array}$	$\text{O}_2^- \cdot$
	羥自由基	$\begin{array}{c} \cdot\cdot \\ \text{H}:\text{O}\cdot \\ \cdot\cdot \end{array}$	$\text{HO}\cdot$
	氫過氧基	$\begin{array}{c} \cdot\cdot \quad \cdot\cdot \\ \text{H}:\text{O}:\text{O}\cdot \\ \cdot\cdot \quad \cdot\cdot \end{array}$	$\text{HOO}^- \cdot$
	烷氧基	$\begin{array}{c} \cdot\cdot \\ \text{R}:\text{O}\cdot \\ \cdot\cdot \end{array}$	$\text{RO}\cdot$
	烷過氧基	$\begin{array}{c} \cdot\cdot \quad \cdot\cdot \\ \text{R}:\text{O}:\text{O}\cdot \\ \cdot\cdot \quad \cdot\cdot \end{array}$	$\text{ROO}\cdot$
非氧自由基	氫自由基	$\text{H}\cdot$	$\text{H}\cdot$
	有基自由基	$\text{R}\cdot$	$\text{R}\cdot$
氮自由基	一氧化氮	$\begin{array}{c} \cdot\cdot \quad \cdot \\ \cdot\text{N}-\text{O}\cdot \\ \cdot\cdot \quad \cdot\cdot \end{array}$	$\text{NO}\cdot$
	二氧化氮	$\begin{array}{c} \cdot\cdot \quad \cdot\cdot \quad \cdot\cdot \\ \cdot\text{N}-\text{O}:\text{O}\cdot \\ \cdot\cdot \quad \cdot\cdot \quad \cdot\cdot \end{array}$	$\text{NO}_2\cdot$

五、中藥指紋圖譜的介紹

中國藥典 1990 年版以來，其有關中藥及中成藥的鑑別有了很大的進展和變化，其中最顯著的變化就是薄層層析鑑別增加了對照藥材，以補充或取代過去依靠單一化學標準品鑑別的方法。由於對照藥材提供的是完整的特徵層析資料，可以快速的鑑別藥材的真偽，基本解決了沒有化學標準品就無法鑑別的問題，以人參皂苷為例：人參皂苷 Rb_1 或 Rg_1 都代表不了人參、西洋參或三七，人參莖葉中人參皂苷 $Re+Rg_1$ 含量比人參根高 9 倍⁽⁵⁸⁾。一般測定小檗鹼(berberine)不能辨認中藥製劑中添加的是黃連或黃柏，只能確認製劑中可能有黃連或黃柏；曾經發現銀杏萃取物中被添加蘆丁(rutin)，依一般常用的標準為分析萃取物中總黃酮之含量，測得結果比國外的標準萃取物規定平均量超出許多，因此單靠單一成分含量多寡並不能反映中草藥製劑品質優劣，實際上對照藥材的設置和層析資料特徵鑑別已經具備了指紋圖譜鑑別分析的雛形⁽⁵⁹⁾。

中藥指紋圖譜的分析不僅是從點(標準品的定性或定量)出發，而是考量到在特定分析條件下，所測得的完整分析資料進行分析比對。從 1990 年代初中藥指紋圖譜的提出到目前，關於中藥指紋圖譜的研究，也慢慢被廣泛的應用在中草藥的活性篩選及品質管制上。

第三章 實驗材料及方法

第一節 植物材料之採集及萃取

一、植物採集及前處理

本實驗研究材料為台灣產之藥用植物三點金草，三點金草 (*Desmodium triflorum* (L.) DC.) 為豆科植物三點金的全草，三點金草採自台中市惠來公園及市區草地，藥材經本校藥學院藥學系黃順爵老師協助採集及鑑定，經參照台灣植物誌⁽¹⁶⁾及藥用植物形態學^(1-2,17)等相關書籍，並比對所採集藥材之外部形態，而確定其基原，藥材樣本並保存於本校中國藥學研究所。

二、主要化學試劑

Methyl alcohol (CH_3OH), *n*-Hexane (C_6H_{14}), Chloroform (CHCl_3), Ethyl acetate ($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$), *n*-Butanol ($\text{C}_4\text{H}_8\text{OH}$) 皆購自 Merck。

三、主要實驗儀器

1. 迴轉式大型減壓濃縮機 (Rotavapor R-153DW, Buchi, Switzerland)
2. 迴轉式小型減壓濃縮機 (Rotavapor R200 Series, Buchi, Switzerland)
3. 真空控制器組 (VC-7600/VP-60D, Panchum, Taiwan)
4. 恆溫冷卻循環裝置 (CA-1100, Eyela, Japan)
5. 冷卻循環機 (CC-3000, Panchum, Taiwan)

6. 電子分析天平 (CP225D, Satorius, Germany)
7. 電子天平 (Toledo PB602, Metter, Switzerland)
8. 超純水製造機 (TK-5/FM-120D/ZROS6016Y/ZMQS600, Millipore Milli-Q, USA)
9. 超音波震盪器 (SONOREX Super PK1028BH, BANDELIN, UK)
10. 烘箱 (Drying Oven OV602, CHANEL, Taiwan)
11. 高速粉碎機 (110V-MA4A, 金田電工廠, Taiwan)

四、實驗萃取方法

先將採集來之三點金草鮮品經過淨選處理後陰乾，再以粉碎機將藥材乾品製備成粗粉末，藥材經甲醇室溫浸泡72小時後，先用紗布過濾，收集濾液，所得濾液再以濾紙過濾，藥材再以甲醇浸泡共萃取四次，所收集甲醇萃取液在40 °C下以減壓濃縮機濃縮至乾，即得到三點金草甲醇萃取物。甲醇萃取物放置於4°C冰箱中冷藏，提供抗氧化及藥理實驗，用並於實驗當天新鮮配製。

甲醇萃取物加入純水成懸浮，再依序以有機溶媒正己烷、氯仿、乙酸乙酯及正丁醇進行分配分離，經各有機溶媒分劃之萃取液在40 °C下減壓濃縮至乾，將各有機溶媒分劃層放置於4°C冰箱中冷藏，提供抗氧化活性評價實驗用，並於實驗當天以甲醇新鮮配製。

第二節 三點金草活性成分之HPLC指紋圖譜

一、主要化學試劑

Apigenin, genistin, vitexin購自Sigma-Aldich公司(USA)。Formic acid (HCOOH), Acetonitrile (CH₃CN)購自Merck。

二、主要實驗儀器

1. Waters Alliance 2695 separations module (Waters, USA)
2. Waters 996 photodiode array Detector (Waters, USA)
3. RP-18 endcapped 5 μm, 4.6×250 mm column (LiChroCART, Merck, Germany)
4. Syringe Filter 0.45 μm pore size (PVDF, MILLIPORE, USA)
5. 無油式真空幫浦 (VP-60D, 泛群科技有限公司, Taiwan)
6. 溶劑過濾器組 (HPLC Filtration System, MILLIPORE, USA)
7. 電子分析天平 (Toledo AT201, Mettler, Switzerland)
8. 超純水製造機 (TK-5/FM-120D/ZROS6016Y/ZMQS600, Millipore Milli-Q, USA)

三、實驗方法

1. 三點金草甲醇萃取物及牡荊素(vitexin)之HPLC分析

本實驗針對三點金草甲醇萃取物及vitexin⁽³⁰⁾，以高效液相層析分析三點金草甲醇萃取物及其分層，是否含有活性成分牡荊素(vitexin)，而vitexin所具有的藥理活性為降血壓、抗發炎及解痙攣之作用⁽⁶⁰⁾。先將樣品及標準品溶於甲醇中，樣品濃度為1 mg/mL，標準品濃度為0.1 mg/mL，以0.45 μm濾膜過濾樣品或標準品。分析條件如下：以5 μm, 4.6×250 mm的LiChroCART RP-18 endcapped為層析管柱，移動相(mobile phase)比例為0.2 % formic acid: acetonitrile (80:20)，流速為0.8 mL/min，分析樣品注入量為10 μl，在波長為336 nm下檢測，層析30分鐘。

2.三點金草甲醇萃取物及黃酮類成分之HPLC指紋圖譜分析

本實驗針對三點金草甲醇萃取物及黃酮類成分(apigenin, genistin, vitexin)⁽³⁰⁾，以高效液相層析進行分析，其中染質木苷genistin又屬於大豆異黃酮類，存在許多豆科植物中，尤其大豆中所含之大豆異黃酮最為豐富，建立三點金草甲醇萃取物HPLC指紋圖譜。先將樣品或標準品分別溶於甲醇中，樣品濃度為5 mg/mL，標準品濃度為0.1 mg/mL，以0.45 μm濾膜過濾樣品或標準品。分析條件如下：以5 μm, 4.6×250 mm的LiChroCART RP-18 endcapped為層析管柱，移動相作比例不同之梯度變化進行沖提，溶媒配比如表3-1，流速為0.8 mL/min，分析樣品注入量為10 μl，在波長為260 nm下檢測，層析60分鐘。

表3-1 移動相溶媒比率

時間(分鐘)	0.2 % formic acid	acetonitrile
0	80 %	20 %
10	80 %	20 %
50	20 %	80 %
60	20 %	80 %



第三節 三點金草之鎮痛抗發炎實驗

一、實驗動物：

本實驗採用之動物購於樂斯科生技股份有限公司，買進體重約16公克，ICR系雄性小鼠。飼養於中國醫藥大學動物中心，溫度控制在 $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相對濕度在 $55\pm 5\%$ 的空調飼養室，採12小時亮12小時暗(08:00燈亮，20:00燈暗)燈光控制系統，食物與飲水之供應不予限制，飼養至少1週始進行實驗，取體重約20~25公克小鼠當實驗鼠。實驗動物均依中華民國實驗動物學會出版之實驗動物飼養與管理指南之規定管理與照顧。

二、主要化學試劑：

福馬林 (formalin) 購自日本試藥株式會社。Indomethacin、 λ -carrageenan、1,1,3,3-Tetraethoxypropane (TEP)、thiobarbituric acid (TBA)、butylated hydroxytoluene (BHT) 購自Sigma-Aldrich。Acetic acid 購自Merck。SOD、GSH-Px、GSH-Rd、Protein等kits購自羅氏公司(UK)。IL-1 β kits及TNF- α kits購自Assay Designs公司(USA)。NO kits購自Cayman公司(USA)。

三、主要實驗儀器：

- 1.浮腫測定儀器 (NK-101 CMP plethysmometer, Muromachi Kikai, Japan)
- 2.酵素免疫分析儀 (VersaMax microplate reader, USA)
- 3.高速冷凍離心機 (Z233MK-2, Hermle, Germany)
- 4.全自動生化分析儀 (Cobas Mira plus, Roche , Switzerland)
- 5.均質機 (Polytron PT-1200, Kinematica, , Switzerland)
- 6.-80 °C 超低溫冷凍櫃 (VXE-570, JOUAN, France)
- 7.96孔微量盤 (96-well microplates, NUNC, Denmark)

四、實驗方法

一、三點金草之急毒性試驗

將不同劑量之三點金草甲醇萃取物(MDT) 10、5 及 2.5 g/kg 口服給予，隨機將小鼠分為 4 組，每組 10 隻(正常組組、MDT 10、5 及 2.5 g/k 口服給藥組)，觀察並記錄實驗動物在三天內是否出現毒性反應或死亡。然而實驗動物致死所需劑量稱 lethal dose (LD)，而致死量與毒性成反比，如致死量愈大，毒性愈小；致死量愈小，則毒性愈大。然而半數致死量(百分之五十的實驗動物發生死亡的劑量，即 LD₅₀)常用於衡量中草藥之毒性⁽⁶¹⁾。

二、三點金草之鎮痛實驗

1. 扭體反應試驗

扭體反應試驗(Writhing Response Test)，將不同劑量之三點金草甲醇萃取物(MDT) 0.1、0.5 及 1.0 g/kg 口服給予，給藥後 60 分鐘由腹腔注射 1%醋酸溶液(每 10 g 體重投予 0.1 ml)，用以誘發扭體反應，將小鼠置於觀察箱中，5 分鐘後開始觀察，並以計數器記錄注射醋酸後 5-15 分鐘內，小鼠腹部因醋酸溶液引起的肌肉收縮，其所伴隨之扭體次數，並以 indomethacin 10 mg/kg 為正對照組，於注射 1%醋酸溶液前 30 分鐘注射給藥^(49,62)。

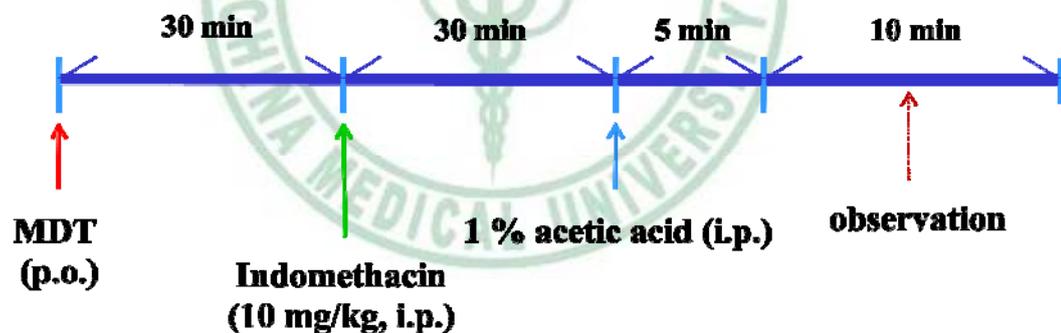


圖 3-1 扭體反應試驗實驗流程

2. 福馬林試驗

福馬林誘發舔蹠反應試驗(Formalin Test)，採用 Dubuisson 及 Dennis 修飾後的方法，將不同劑量三點金草甲醇萃取物 0.1、0.5 與 1.0 g/kg 口服給予，給藥後 60 分鐘，用微量注射器以 27 號針頭，在小鼠右後足背，皮下注射 20 μ l 的 5 % 福馬林溶液⁽⁶³⁾，立即將鼯鼠置入觀察箱中觀察，並每隔 5 分鐘紀錄一次，小鼠舔其右後足蹠注射福馬林部位，計算舔蹠所累積之秒數，共記錄 30 分鐘^(46,49)。首先將 0-5 分鐘之累積舔蹠秒數稱為早期或第一相(early phase；first phase)為痛覺反應時間。然而 20-30 分鐘之累積舔蹠秒數稱為晚期或第二相(late phase；second phase)為痛覺反應時間。並以 indomethacin 10 mg/kg 為正對照組，於注射福馬林前 30 分鐘腹腔注射給藥。

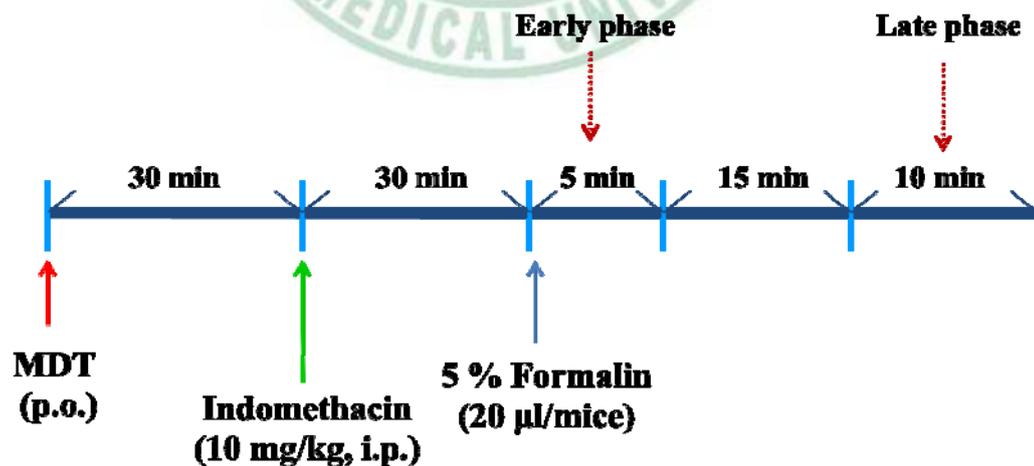


圖 3-2 福馬林試驗實驗流程

三、三點金草之抗發炎試驗

此實驗以 λ -角又菜膠誘導小鼠足蹠腫脹為實驗模式，用記號筆在小鼠右後肢踝關節周圍做一標記，將小鼠右後足蹠浸入浮腫測定儀器，測量正常足蹠容積後分別在小鼠右後足蹠皮下注射1% λ -角又菜膠混懸液(50 μl /隻)誘導發炎⁽⁶⁴⁾。誘導2小時後，將小鼠分別以不同劑量之三點金草甲醇萃取物(0.1、0.5、1.0 g/kg)以口服方式投藥，誘導後1.5小時腹腔注射正對照組indomethacin (10 mg/kg)，給藥量皆為0.1 mL/10 g。經注射1% λ -角又菜膠混懸液(50 μl /隻)誘導發炎後，每隔1小時，各測定一次足蹠容積，連續測6小時，紀錄結果，並分別計算誘導發炎後每小時足蹠體積與誘導前個別足蹠體積差(ΔV)。

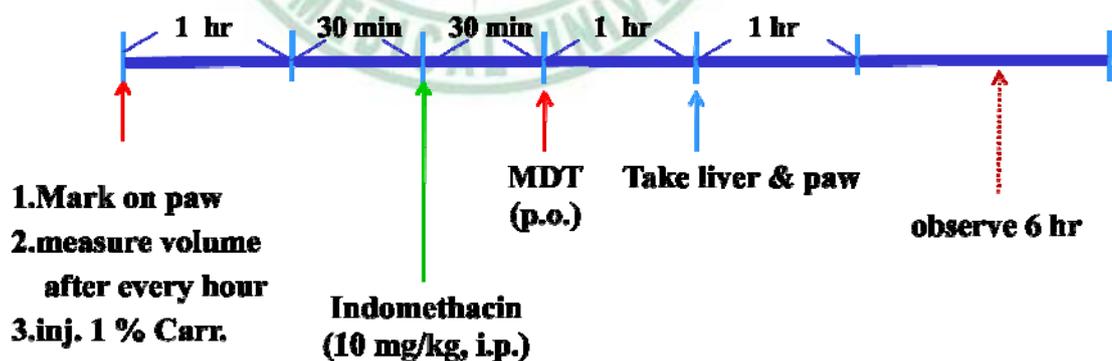


圖3-3 λ -角又菜膠誘導小鼠足蹠腫脹實驗流程

四、三點金草之抗發炎機轉探討

分別在小鼠右後肢足蹠皮下注射1 % λ -角叉菜膠混懸液(50 μ l/隻)誘導發炎。誘導2小時後，分別將不同劑量之三點金草甲醇萃取物(0.1、0.5、1 g/kg)以口服方式投予；於誘導後1.5小時腹腔注射正對照組 indomethacin (10 mg/kg)。誘導後第3個小時將部分動物犧牲，並取其肝臟組織及足蹠組織。測定小鼠肝臟組織之超氧歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、麩胱甘肽還原酶(glutathione reductase, GRd)及麩胱甘肽過氧化酶(glutathione peroxidase, GPx)活性之變化。足蹠組織中丙二醛(MDA)濃度、NO含量、IL-1 β 活性及TNF- α 活性，探討抗發炎活性之機轉。

(一)、肝組織抗氧化酵素活性測定

1. 超氧歧化酶(super oxide dismutase assay, SOD)之測定

本實驗方法依據1984年，Kakkar和Viswanathan提出之方法，取肝組織0.5 g，加入0.5 ml的Normal Saline，以均質機均質，取300 μ l均質液於試管中，加入1.8 ml 冷的二次去離子水，4 $^{\circ}$ C、冷藏15分鐘，混合均勻。取20 μ l的混合液加入120 μ l 0.1M Phosphate buffer (CAPS 40 mM、EDTA 0.94 mM，pH 7.0)均勻混合，最終，取5 μ l混合液加入340 μ l Mixed

Substrate1 (xanthine 0.05 mM、I.N.T 0.025 mM)，再加入xanthine oxidase 呈色，混合均勻後於波長505 nm，反應溫度37 °C下測量吸光值，每隔30秒測量一次，總共測量3分鐘，計算每分鐘吸光值變化速率，以多重校正曲線計算濃度。SOD活性以單位時間內抑制I.N.T自動氧化速率為一單位(U)，肝組織內SOD 比活性以U/mg protein 表示⁽⁶⁵⁾。

2. 麩胱甘肽還原酶(glutathione reductase, GRd)之測定

本實驗方法依據1966年Guntherberg 與Rost提出之方法⁽⁶⁶⁾，主要利用NADPH來測量GSH-Rd 的活性，NADPH在波長340 nm下具有吸光值，而NADPH經由GSH-Rd作用下代謝變成NADP，吸光值會下降，所以GSH-Rd 活性與吸光值呈反比。取肝組織0.5 g，加入0.5 mL的normal saline 均質，取10 µl的均質液，加入190 µl 的precipitating reagent (trichloroacetic acid in water)混合均勻，離心3000 rpm，4 °C、10分鐘。取上清液50 µl 於Cuvette中，依序加入等量50 µl 的Buffer (potassium phosphate、diethylenetriamine pentaacetic acid、Lubrol、pH 7.8)、Reducing agent(tris(2-carboxyethyl) phosphine in HCl)，Chromogen (1-methyl-4-chloro-7-trifluoromethyl-quinolinium methylsulfate in HCl)，Color developer (NaOH in water)混合均勻，於波長340 nm下測量吸光值，肝組織內glutathione reductase 活性以U/mg protein表示⁽⁶⁷⁾。

3. 麩胱甘肽過氧化酶(glutathione peroxidase, GPx)之測定

本法根據Paglia及Valentine (1967)所提出之方法為基礎⁽⁶⁸⁾，利用 glutathione 及 cumene hydroperoxide 與 GSH-Px 作用，再以 NADPH 與 glutathione reductase 將氧化態的 GSSG (oxidised glutathione) 迅速轉成還原態，伴隨著 NADPH 氧化成 NADP^+ ，以吸光值之減少速率來定義 GSH-Px 之活性。取肝組織 0.5 g，加入 0.5 ml 的 normal saline 均質，取均質液 50 μl ，加入 1 mL 的 diluting agent 稀釋，隨即加入 Reagent 1 (glutathione 4 mM、glutathione reductase 0.5 U/L、NADPH 0.28 mM) 混合均勻，再加入 Reagent 2 (cumene hydroperoxide 0.18 mM) 作用，於溫度 37°C、波長 340 nm 下測量吸光值，計算吸光值變化速率 (U/L)，肝組織內 glutathione peroxidase 活性以 U/mg protein 表示。

4. 肝組織中總蛋白之測定

取肝組織 0.5 g，加入 0.5 mL 的 normal saline 均質，取肝均漿 50 μl ，加入 350 μl 的 normal saline 混和均勻，加入 Biuret reagent (sodium hydroxide 100 mM、Na-K-tartrate 16 mM、potassium iodide 15 mM、cupric sulphate 6 mM) 使反應變化呈增色反應，波長 550 nm 條件下測量吸光值，

每隔25秒測量一次吸光值變化，於反應第15分鐘達反應終點，以人血清為protein standard，濃度(6.0 g/dL) 產生吸光值變化扣除blank reagent (Sodium hydroxide 100 mM、Na-K-tartrate 16 mM) 之吸光度差，換算出轉換係數(F)，進而換算出肝組織total protein之濃度，肝組織total protein以mg/g tissue表示⁽⁶⁹⁾。



(二)、足蹠組織抗發炎相關活性測定：

1.足蹠組織中IL-1 β 濃度測定：

本分析是採用定量的三明治酵素免疫分析法(quantitative sandwich enzyme immunoassay technique)來測定mouse IL-1 β 的濃度。一種對IL-1 β 有特異性的monoclonal antibody已經先被結合在microplate上，當標準品和樣品被加入wells後，加入對IL-1 β 有特異性的enzyme-linked polyclonal antibody，最後加入substrate reagent等顏色呈現後便終止反應，在波長450 nm的吸光值下得到樣本中IL-1 β 的濃度。

(1)足蹠組織前處理

- ↓ 秤取蹠組織，加入 4 倍量生理食鹽水均質。
- ↓ 於 4°C，以 12,000 rpm 離心 5 分鐘，取上清液為檢品(此檢品可與 TNF- α 、NO 的測定共用)。

(2)製備IL-1 β 標準曲線

- ↓ 取4管ependorf(分別為Stock、Std1~3)，均加入300 μ l standard diluent。
- ↓ 加入100 μ l IL-1 β standard置於Stock tube，之後從Stock中取100 μ l加入 Std 1 tube內；再從Std 1取100 μ l加入Std 2 tube內；再從Std 2取100 μ l

加入Std 3 tube內。

上述標準品濃度之配製，如表3-2。

表3-2 IL-1 β 標準品濃度之配製表

Test tube	Standard diluents (μ l)	Standard 4,000 (pg/mL)	IL-1 β Concentration (pg/mL)
Stock	300	100 μ l	1,000
Std 1	300	從Stock 取100 μ l	250
Std 2	300	從Std 1 取100 μ l	62.5
Std 3	300	從Std 2 取100 μ l	15.6

(3)檢品分析步驟

↓ 加入50 μ l IL-1 β 抗體至每個well，再將標準品及檢品50 μ l加到指定wells(除Blank外)，室溫下，振搖96孔微量盤，2小時後，用400 μ l wash buffer沖洗3次。

↓ 加入100 μ l streptavidin-HRP conjugate後，室溫下，振搖96孔微量盤，2小時後，用400 μ l wash buffer沖洗3次。

↓ 加入100 μ l TMB substrate後，避光振搖96孔微量盤，30分鐘。

↓ 加入100 μ l stop solution。

↓ 在波長450 nm下測定其吸光值。

上述流程如表3-3之說明。

表3-3 IL-1 β 實驗步驟流程表

Well	Blank (μ l)	Standard (μ l)	Sample (μ l)
IL-1 β antibody	50	50	50
Standard diluent	50	—	—
Standard & sample	—	50	50
Tap plate gently to mix	→→→→	→→→→	→→→→
Room temperature 2 hr, sealed	→→→→	→→→→	→→→→
Wash 3次 × 400 μ l	→→→→	→→→→	→→→→
Streptavidin-HRP conjugate	100	100	100
Room temperature 2 hr, sealed	→→→→	→→→→	→→→→
Wash 3次 × 400 μ l	→→→→	→→→→	→→→→
TMB substrate	100	100	100
Room temperature 30 min, in dark	→→→→	→→→→	→→→→
Stop solution	100	100	100

—：表示該步驟不加任何試劑。

→→→→：表示等候時間內於室溫下振搖或是清洗數次

2. 足蹠組織中TNF- α 濃度測定：

本分析是採用定量的三明治酵素免疫分析法(quantitative sandwich enzyme immunoassay technique)來測定mouse TNF- α 的濃度。一種對TNF- α 有特異性的monoclonal antibody已經先被結合在microplate上，當標準品和樣品被加入wells後，加入對TNF- α 有特異性的enzyme-linked polyclonal antibody，加入substrate solution，incubation一段時間後，加入substrate reagent使顏色呈現出來，終止反應後，在波長490 nm下測得該樣品所含TNF- α 濃度⁽⁷¹⁾。

(1) 製備TNF- α 標準曲線

↓ 取8管eppendorf(分別為Stock、Std 1~7)，stock加入450 μ l assay buffer；

Std 1~7加入250 μ l assay buffer。

↓ 加入50 μ l TNF- α standard置於Stock tube，之後從Stock中取250 μ l加入

Std 1 tube內；再從Std 1取250 μ l加入Std 2 tube內；再從Std 2取250 μ l

加入Std 3 tube內，以此類推，連續稀釋到Std 7。

上述標準品濃度之配製，如表3-4。

表3-4 TNF- α 標準品濃度之配製表

Test tube	Assay buffer (μ l)	TNF standard (μ l) 20,000 (pg/mL)	TNF Concentration (pg/mL)
Stock	450	50	2,000
Std 1	250	Stock 250	1,000
Std 2	250	Std 1 250	500
Std 3	250	Std 2 250	250
Std 4	250	Std 3 250	125
Std 5	250	Std 4 250	62.5
Std 6	250	Std 5 250	31.25
Std 7	250	Std 6 250	15.625

(2) 檢品分析步驟

- ↓ 加入50 μl 標準品及檢品到指定wells(除Blank外)，室溫下，振搖96孔微量盤，2小時後，用400 μl wash buffer沖洗3次。
- ↓ 加入50 μl TNF- α 抗體，室溫下，振搖96孔微量盤，2小時後，用400 μl wash buffer沖洗3次。
- ↓ 加入100 μl streptavidin-HRP conjugate後，室溫下，振搖96孔微量盤，30分鐘後，用400 μl wash buffer沖洗3次。
- ↓ 加入100 μl TMB substrate後，振搖96孔微量盤，30分鐘。
- ↓ 加入100 μl stop solution。
- ↓ 在波長490 nm下測定其吸光值。
- ↓ 上述流程如表3-5之說明。

表3-5 TNF- α 實驗步驟流程表

Well	Blank (μ l)	Standard (μ l)	Sample (μ l)
Standard diluent	50	—	—
Standard & sample	—	50	50
Tap plate gently to mix	→→→	→→→	→→→
Room temperature 2 hr, sealed	→→→	→→→	→→→
Wash 3次 \times 400 μ l	→→→	→→→	→→→
TNF antibody	50	50	50
Room temperature 2 hr, sealed	→→→	→→→	→→→
Wash 3次 \times 400 μ l	→→→	→→→	→→→
Streptavidin-HRP conjugate	100	100	100
Room temperature 30 min, sealed	→→→	→→→	→→→
Wash 3次 \times 400 μ l	→→→	→→→	→→→
TMB substrate	100	100	100
Room temperature 30 min, sealed	→→→	→→→	→→→
Stop solution	100	100	100

—：表示該步驟不加任何試劑。

→→→：表示等候時間內於室溫下振搖或是清洗數次

3.足跡組織中NO含量測定

測定組織中 NO 含量的方法，一般利用 NO_2^- 可與 sulfanilamide 發生重氮化，再與 naphthylethylenediamine 偶合反應(coupling reaction)，生成紫紅色產物，此紫紅色產物在波長 540 nm 下測定吸光值，經由此原理可用分光光度法測定分析 NO 含量⁽⁷²⁾。

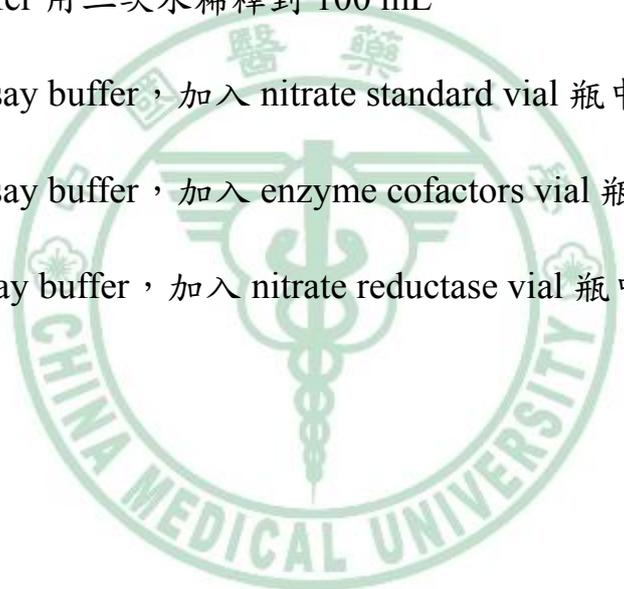
(1) NO 分析溶液配製

↓ 將 assay buffer 用二次水稀釋到 100 mL

↓ 取 1.0 ml assay buffer，加入 nitrate standard vial 瓶中

↓ 取 1.2 ml assay buffer，加入 enzyme cofactors vial 瓶中

↓ 取 1.0ml assay buffer，加入 nitrate reductase vial 瓶中



(2) NO 標準品溶液配製

如下表 3-6 依序加入試劑，配製 NO 標準品濃度

表 3-6 NO 標準品濃度配製

Nitrate conc (μM)	Nitrate standard (μl)	Assay buffer (μl)
0	0	80
5	5	75
10	10	70
15	15	65
20	20	60
25	25	55
30	30	50
35	35	45

(3) NO 含量測定步驟

↓ 取 80 μl NO 標準品或檢品放置於 96 孔微量盤中

↓ 先加入 10 μl 的 enzyme cofactors

↓ 再加入 10 μl 的 nitrate reductase 於室溫下靜置三小時

↓ 加入 50 μl 的 Griess reagent R1

↓ 加入 50 μl 的 Griess reagent R2 於室溫下靜置 10 分鐘

↓ 於 540 nm 測定吸光值

4.足跡組織中丙二醛(Malnodialdehyde; MDA)濃度測定

其測定方法利用丙二醛MDA與硫代巴比妥酸thiobarbituric acid (TBA)，在酸性高溫下縮合，形成紅色複合物TBARS。此複合物在波長532 nm下有最大吸光值，經由此原理可用分光光度法測定分析MDA含量⁽⁷³⁾。

(1) MDA標準品溶液配置

- ↓ 取 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP) 50 μl 以 40 % 乙醇定容至 25 ml
 - ↓ 取上述配製溶液 250 μl ，以 40 % 乙醇定容至 50 mL，完成 TEP 試液配製 (置於 4°C 避光，可儲存 2 週)
 - ↓ 以 0.01N 的鹽酸，將 TEP 試液稀釋成 MDA 標準溶液 (0.625/1.25/2.5/5/10/20/40 μM) 備用。(置於 4°C 避光，可儲存 1 週)
- 詳如 3-7 MDA 標準品濃度配製

表 3-7 MDA 標準品濃度配製表

MDA濃度(μM)	0.625	1.25	2.5	5	10	20
TEP intermediate	0.15	0.3	0.6	1.2	2.4	4.8
standard solution (mL)						
0.01 N HCl(mL)	9.85	9.7	9.4	8.8	7.6	5.2

(2)MDA含量測定溶液配製

↓ 0.2 g TBA加入50 mL、0.2 N HCl，以磁石攪拌器攪拌溶解（置於4°C下，可儲存4週）。

↓ 0.1 g BHT(butyhydroxytoluene)，加入50 mL 95%乙醇溶解(避光，於4°C下，可儲存1週)。

↓ 取eppendorf (包裹鋁箔)，見表3-8依次序加入藥品。

表3-8 加入MDA試劑流程表

孔 \ 試藥	標準品或樣品(μl)	BHT試液(μl)	TBA試液(μl)
Blank	100 (0.01N HCl)	45	300
MDA standard	100	45	300
Sample	100	45	300

(3) 組織前處理

↓ 秤取組織，加入 4 倍量 0.9 % 生理食鹽水均質

↓ 於 4°C，以 12,000 rpm 離心 5 分鐘，取上清液為檢品

↓ 測定組織中蛋白質含量(如前述)

(4) MDA 含量測定步驟

↓ 取 100 μl MDA 標準品或檢品放置於微量離心管

- ↓ 先加入保護劑 45 μl BHT 試液於微量離心管
- ↓ 再加入 300 μl 呈色劑 TBA 試液於微量離心管
- ↓ 將上述試液震盪混合均勻
- ↓ 於 90°C 水浴加熱 45 分鐘
- ↓ 取出靜置冷卻，加入 445 μl 正丁醇，混合搖盪
- ↓ 以 12,000 rpm 離心 5 分鐘
- ↓ 取上層液於 532 nm 下測吸光值



五、統計學分析

本研究所得之數據，均以Oneway ANOVA analysis 分析變異數，再以Scheffe's multiple range test 檢定其間差異之顯著性，凡 p 值小於0.05時，則認為有統計意義。



第四節 三點金草之抗小鼠急性肝損傷實驗

一、實驗動物

本實驗採用之動物購於國立台灣大學醫學院實驗動物中心，ICR系雄性小鼠，體重約22-25公克。飼養於溫度控制在 23 ± 1 °C的空調飼養室，採12小時亮12小時暗(08:00燈亮，20:00燈暗)的燈光控制系統，食物與飲水之供應不予限制。實驗動物依中華民國實驗動物學會出版之實驗動飼養與管理指南之規定管理與照顧。

二、主要化學試劑

福馬林(formalin)購自日本試藥株式會社。Carbon tetrachloride, silymarin, carboxymethyl cellulose (CMC), sodium phosphate購自Sigma-Aldrich公司。Ethyl ether, olive oil購自Wako公司。sGOT (glutamate oxaloacetate transaminase)、sGPT (glutamate pyruvate transaminase)、TP (total protein)等kits購自羅氏公司(UK)。

三、主要實驗儀器

- 1.全自動生化分析儀 (Cobas Mira plus, Roche, Switzerland)
- 2.組織均質機 (K54,Glas-col, USA)
- 3.高速冷凍離心機 (Z233 MK-2, Hermle, Germany)
- 4.電子計數秤 (HILAYOKA, Japan)

四、實驗方法

一、四氯化碳(CCl_4)誘發急性肝炎

本實驗保肝模式採用 CCl_4 誘導小鼠急性肝炎^(74,75)，操作方式如下：小鼠預養 7 天後，隨機將小鼠分為 4 組 (正常組、 CCl_4 組、Silymarin 組、MDT 1.0 g/kg)，每組 8 隻，實驗時正常組與 CCl_4 組口服投與 0.5 % CMC，Silymarin 組及 MDT 組分別口服給予 Silymarin (200 mg/kg in 0.5 % CMC)及 MDT (1.0 g/kg in 0.5 % CMC)，連續 5 天。最後一天給藥後 1 小時，正常組腹腔注射 olive oil，其他各組腹腔注射 CCl_4 (1 ml/kg in olive oil, 2 %)。

在 CCl_4 注射後 24 小時，動物以乙醚麻醉後，由頸動脈採血，全血離心 (3,000 rpm, 10 min, 4 °C)，分離血清，取上清液，使用全自動生化分析儀分別測定 GOT、GPT 活性。

二、肝功能血清生化指數之檢測^(74,75)

小鼠血液樣品在室溫下放置 1 小時以使其凝結。再以冷凍離心機於 4 °C 下、每分鐘 3,000 rpm、離心 5 分鐘，分離血清，再以自動生化分析儀檢測肝功能生化指數。

1.血清中麩氨酸草乙酸轉氨酶(GOT)之測定

以Randox kit分析。取1mL反應試劑(100 mM Tris buffer, 500 mM L-asparate, 15 M α -ketoglutarate, 0.18 mM NADH, 1,200 U LDH, 500 U MDH/1,000 mL), 加入200 μ l血清, 混合均勻37 $^{\circ}$ C下反應1分鐘, 靜置90秒後, 於波長340 nm下, 以自動生化分析儀檢測。

測定原理: 試驗樣品和受質-酵素混合物作出反應, 經由在樣品中的AST催化, L-asparate + α -ketoglutarate形成oxaloacetate + L-glutamate 產生oxaloacetate, 藉蘋果酸脫氫(MDH)轉成蘋果酸(malate), 同時NADH被氧化成NAD, 測NADH的減少量就能計算出GOT的活性值。

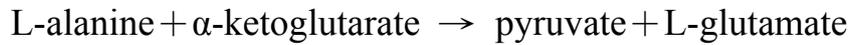


2.血清中麩氨酸丙氨基轉氨酶(GPT)之測定

以Randox kit分析。取1 mL反應試劑(100 mM Tris buffer, 500 mM L-alanine, 15 M α -ketoglutarate, 0.18 mM NADH, 1,200U LDH, 500U MDH/1,000mL), 加入200 μ l血清混合均勻, 於37 $^{\circ}$ C下反應1分鐘, 靜置90秒後, 於波長340 nm下, 以自動生化分析儀檢測。

測定原理: 試驗樣品和受質-酵素混合物作出反應, 經由在樣品中的ALT催化, L-alanine + α -ketoglutarate形成pyruvate + L-glutamate, 而

pyruvate藉乳酸脫氫酶(LDH)轉成乳酸(lactate)，同時NADH被氧化成NAD⁺，測NADH的減少量就能計算出GPT的活性值。



3.肝組織中總蛋白之測定(TP)

取肝組織0.5 g，加入0.5 mL 的normal saline均質，取肝均漿50 μl ，加入350 μl 的normal saline 混和均勻，加入Biuret reagent (sodium hydroxide 100mM、Na-K-tartrate 16 mM、potassium iodide 15 mM、cupric sulphate 6 mM) 使反應變化呈增色反應，波長550 nm條件下測量吸光值，每隔25秒測量一次吸光值變化，於反應第15分鐘達反應終點，以人血清為protein standard，濃度(6.0 g/dL) 產生吸光值變化扣除blank reagent (Sodium hydroxide 100 mM、Na-K-tartrate 16 mM) 之吸光度差，換算出轉換係數(F)，進而換算出肝組織total protein之濃度，肝組織total protein以mg/g tissue表示⁽⁶⁹⁾。

第五節 三點金草對Hep G2及PC-3細胞毒殺試驗^(76,77)

一、主要化學試劑：

Acrylamide/Bis購自生工公司(臺灣)。BSA (bovine serum albumin)、DMSO (dimethyl sulfoxide)、PI (propidium iodide)、triton X-100、RIPA buffe購自Sigma-Aldrich公司(USA)。DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)、MEM (minimum essential medium)、FBS(fetal bovine serum)、trypsin-EDTA購自Gibco/BRL公司(USA)。MTT kit購自Chemicon international公司(USA)。

二、主要實驗儀器：

1. 無菌操作臺 (Nature Class-II type A/B3, USA)
2. 細胞培養箱 (HEPA Class 100, USA)
3. 微量天平 (GR-200; A&D, Japan)
4. 酸鹼值測定計 (Sartorius basic meter PB-10, Germany)
5. 酵素免疫分析儀 (VersaMax microplate reader, USA)
6. 細胞培養皿、冷凍小管、離心管 (騰達行, Taiwan)

三、實驗方法：

這部分的試驗以三點金草之甲醇萃取物及各分層萃取物對Hep G2(a human hepatoma cell line)及PC-3(a human prostate carcinoma cell line)進行24小時細胞存活率試驗。將Hep G2及PC-3細胞分別培養於96 wells培養盤中，每well的細胞數以 2×10^4 cells置入，體積為100 μ l，培養液為含10% FBS(fetal bovine serum)之DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)，培養於5 % CO₂、37°C之高濕度恆溫培養箱中。培養24小時，待細胞貼附好後，對每well分別加入10 μ l不同之待測萃取物，其最終濃度為100 μ g/mL，再培養24小時後，始進行MTT試驗。

Hep G2細胞屬於分化程度較高的人類肝癌細胞，各項生理活性及表現較為接近發育完全的組織肝癌細胞，除了保有正常人體肝細胞型態外，還能表現正常肝細胞大部分的特徵，因此，除了癌症研究，亦經常被使用於各種研究正常肝細胞生理反應的實驗中，本實驗所用細胞株購自新竹食品工業發展研究所(Food Industry Research and Development Institute, Hsin Chu, ROC)。

第六節 三點草之抗氧化活性評價

一、主要化學試劑：

α -tocopherol (Vitamin E), 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH), ascorbic acid (Vitamin C), (+)-catechin, Rutin, potassium peroxodisulfate ($K_2S_2O_8$), potassium ferricyanide ($K_3Fe(CN)_6$), trichloroacetic acid (TCA), ferric chloride ($FeCl_3$), aluminum chloride hexahydrate ($AlCl_3 \cdot 6H_2O$), sodium bicarbonate (Na_2CO_3), 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulphonic acid (ABTS), Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4), sodium phosphate monobasic (NaH_2PO_4) 皆購自 Sigma-Aldrich。Folin-Ciocalteu solution, Methyl alcohol (CH_3OH) 及 95 % Ethyl alcohol (C_2H_5OH) 則購自 Merck。

二、主要實驗儀器及耗材：

1. 酵素免疫分析儀 (PowerWave X 340 Microplate Spectrophotomete, Bio-Tek, USA)
2. 離心機 (HermLe Z300, Germany)
3. 電子分析天平 (CP225D, Sartorius, Germany)
4. 超純水製造機 (TK-5/FM-120D/ZROS6016Y/ZMQS600, Millipore)

Milli-Q, USA)

- 5.震盪混合器 (Vortex-genie 2, Scientific industries, USA)
- 6.微量分注器 (BOECO / GILSON , Germany / France)
- 7.96孔微量盤 (96-well microplates, NUNC, Denmark)
- 8.微量吸管尖 (tips, Axygen, USA)
- 9.超音波震盪器 (SONOREX Super PK1028BH, BANDELIN, UK)
- 10.電動連續分注器 (Handystep® electronic, BRAND, Germany)
- 11.微量離心管 (Microtubes, Axygen, USA)

三、實驗方法：

一、抗氧化活性之評價：

1.DPPH自由基清除能力^(78,79)

DPPH自由基是一種很穩定的以氮為中心的自由基，在DPPH甲醇溶液中若所加入的樣品能將其清除，則表示樣品具有降低羥自由基、烷自由基或過氧化自由基的能力和中止脂質過氧化的鏈鎖反應作用。DPPH有個單電子，在517 nm有強吸收，其甲醇溶液呈深紫色，加入樣品後在517 nm波長下以分光光度計測定，可測定其對DPPH的清除效果。

在96孔微量盤中加入25 μl 不同濃度的樣品之溶液與正對照組 (Vitamin E)，隨即加入175 μl 0.3 mM DPPH甲醇溶液，使最後體積為200 μl 。振盪均勻混合15秒後，於室溫下避光靜置30分鐘，以分光光度計在波長517 nm下，測定其吸光值。當DPPH自由基被清除越多時，其吸光值會下降的愈多，利用相對於空白對照組的吸光值下降百分比，可判斷樣品清除 DPPH自由基能力之強弱，亦即表示樣品供氫能力之強弱。本實驗以抗氧化劑 α -tocopherol (Vitamin E)為標準品做成檢量線，再利用標準曲線方程式，計算出同濃度樣品相當於多少Vitamin E的含量，結果用Vitamin E /sample ($\mu\text{g}/\text{mg}$)表示。

自由基清除能力計算公式如下：

$$\text{Scavenging percentage (\%)} = [1 - (\text{Ab}_{517\text{sample}} / \text{Ab}_{517\text{control}})] \times 100 \%$$

2. 總抗氧化能力測定^(80,81)

總抗氧化能力測定是經由 Trolox 等價抗氧化能力試驗(trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC), ABTS^{●+} 自由基水溶液配製: 7 mM ABTS^{●+} [2,2'-Azinobis-(3-ethylbezothiazoline-6-sulfonic acid)] 溶液, 再加入 2.45 mM Potassium persulfate 等量混合均勻, 於避光常溫下反應 16~24 小時, 使其生成穩定之藍綠色 ABTS^{●+} 自由基。此反應試液再以乙醇稀釋, 1 分鐘後測其在 734 nm 的吸光值為 0.70 (± 0.05) ABTS^{●+} 離子溶液備用。在 96 孔微量盤中加入 25 μl 不同濃度的樣品溶液與正對照組(Trolox), 隨即加入 175 μl ABTS^{●+} 溶液, 使最後體積為 200 μl。振盪均勻混合 15 秒後, 在一分鐘內由分光光度計 734 nm 下測其吸光值。當 ABTS^{●+} 自由基被清除越多時, 其吸光值會下降的愈多, 利用相對於空白對照組的吸光值下降百分比, 可判斷樣品清除 ABTS^{●+} 自由基能力之強弱。自由基清除能力計算公式如下:

$$\text{Scavenging percentage (\%)} = [1 - (\text{Ab}_{734\text{sample}} / \text{Ab}_{734\text{control}})] \times 100 \%$$

3. 還原力測定⁽⁸⁰⁾

還原力測定原理為利用鐵氰化鉀還原成亞鐵氰化鉀，亞鐵氰化鉀與鐵離子形成 $\text{Fe}_4[\text{F}(\text{CN})_6]_3$ 普魯士藍(prussian blue)。取25 μl 適當濃度的樣品溶液，加入50 μl 磷酸緩衝液(pH 6.6)與50 μl 0.1 % 鐵氰化鉀試液(potassium ferricyanide)。之後於50 °C 反應10分鐘，待靜置冷卻後，加入100 μl 1 % trichloroacetic acid 溶液。於3000 rpm離心10分鐘。取上清液175 μl 及加入25 μl 5 mM ferric chloride ($\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$)溶液混合均勻後，以分光光度計測定700 nm之吸光值。吸光值愈高，則表示樣品還原力愈強。本實驗以抗氧化劑ascorbic acid (Vitamin C)為標準品做成檢量線，再利用標準曲線方程式，計算出同濃度樣品相當於多少Vitamin C的含量，結果用Vitamin C /sample ($\mu\text{g}/\text{mg}$)表示。

其計算公式如下：

ABS sample-ABS control (Δ 700 nm)

二、抗氧化成分類之評價

1. 總多酚類(polyphenols)含量測定^(79,80)

總多酚類物質含量的測定，一般常用Folin-Ciocalteu比色法，試劑的濃度為2 mol/L液體，使用前將其稀釋2倍。多酚類化合物在鹼性溶液中，可以將鎢鉬酸還原(使 W^{6+} 變為 W^{5+})生成藍色化合物，顏色的深淺與多酚的含量呈正比，而所生成的藍色化合物在725 nm處有最大吸收，一般常用catechin或gallic acid作為參照標準品，萃取物中之總多酚的含量以等同於(catechin/sample (mg/g))的表示。

取50 μ l 樣品溶液或catechin標準品，接著加入50 μ l 的Folin-Ciocalteu試劑，再加入125 μ l 之10%碳酸鈉(sodium carbonate)溶液，靜置5分鐘，混合振盪均勻15秒後，再以分光光度計於725 nm測其吸光值並計算總多酚類含量。以catechin為標準品，做成檢量線，再利用標準曲線方程式算出測驗樣品總多酚類的含量，結果用Catechin/sample (mg/g)表示。

2. 總黃酮類(flavonoids)含量測定⁽⁷⁸⁻⁸¹⁾

總黃酮含量一般常以Rutin為參照標準品，經由分光光度法測定，黃酮類化合物經由甲醇萃取後，可以與鋁鹽(三氯化鋁或硝酸鋁)產生螯合，經分光光度計在430 nm波長下，測定其吸光值。萃取物中之總黃酮類的含量以等同於(rutin/sample (mg/g))的表示。黃酮類化合物若在鹼性的環境下，可以與鋁鹽(三氯化鋁或硝酸鋁)產生螯合，可呈現紅色的螯合物反應，可經分光光度計在510 nm波長下，測定其吸光值。

取100 μ l 樣品溶液，加入100 μ l 2 %之 $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 甲醇溶液，振盪混合均勻，靜置10分鐘，再以430 nm測其吸光值，並以rutin為標準品，配成濃度為0.01/0.025/0.05/0.1/0.15/0.2 mg/mL，做成檢量線計算總黃酮類含量。總黃酮類含量以mg rutin equivalent/g dry weight表示。

第七節 DPPH去除率儀器新應用

一、主要化學試劑

α -tocopherol (Vitamin E), 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH)

購自 Sigma-Aldrich。Methyl alcohol (CH₃OH) 則購自 Merck。

二、主要實驗儀器及耗材

1. 影像處理設備 (Reprostar 3 Video Store, CAMAG, Switzerland)
2. 影像處理軟體 (Video Scan, CAMAG, Switzerland)
3. 半自動點樣儀 (Linomate 5, CAMAG, Switzerland)
4. 微量注射器 (Microsyringe 100 μ l, Hamilton, Switzerland)
5. 薄層層析板 (Kieselgel 60 silica gel pre-coated aluminum plate 0.2 mm, Merck, Germany)
6. 電子防潮箱 (D-126A, 防潮家, Taiwan)
7. 微量離心管 (Microtubes, Axygen, USA)

三、實驗方法

一、光之三原色介紹

眼睛能看見各種色彩是因為光線有不同波長所造成的，在正常的人體生理下，對其中三種波長光線的颜色感覺特別強烈，這三種波長光線稱為光的三原色(RGB)，就是紅光(red)、綠光(green)，藍光(blue)。

只要調整這三種可見光的強度，就可以讓人類感受到大部分所有的色彩。

然而將其中任兩種波長的光線相混合可以得到中間色例如：黃(yellow)、青(cyan)、洋紅(magenta)；當三種波長等量相加可得到白色，例如：將紅、綠、藍三種顏色的光源同時照射在白紙上，則會在交集處呈現白色。至於互補色則是完全不含另一種顏色，例如：黃色是由紅、綠兩種波長的光線混合，完全不含藍色，因此黃色稱為藍色的互補色；洋紅色則是綠色的互補色；青色則是紅色的互補色(表 3-9 光之三原色及其互補色)。

本實驗所用之紫色 DPPH 自由基，其互補色為綠色，將一定量的樣品及 DPPH 點注在 TLC 上，若樣品具有清除 DPPH 自由基的能力時，則會使紫色變淡，利用數位影像及軟體處理，將綠色濾除再以量化則可評價樣品清除自由基的能力。

表 3-9 光之三原色及其互補色

Light 光	互補色
紅色 R(red)	青色 C(cyan)
綠色 G (green)	洋紅色 M(mygenta)
藍色 B(blue)	黃色 Y(yellow)

二、實驗步驟

1. 檢品製備

配製 0.3 mM DPPH 及 300、150、75、37.5、18.75 $\mu\text{g/mL}$ 之 α -Tocopherol 甲醇溶液避光供點樣用。

2. 測定方法

檢品及試劑經 CAMAG Linomate 5 半自動點樣儀點注在 TLC 薄片後，以 CAMAG Reprstar 3 Video Store and Video Scan 數位影像處理系統處理影像。

3. 參數設定

CAMAG Linomate 5 半自動點樣儀點樣準確度優於 0.5 %；點樣重現性優於 1.0 %；點樣方式為噴霧點樣；點樣帶長度 1 mm；點樣平台最大可放 20*20 cm 薄板；進樣針規格為 100 μl 。

2. CAMAG Reprstar 3 Video Store and Video Scan 數位影像處理系統，其光源為 400-750 nm 白光管，光源頻率為 25-30KHz；數位影像成像處理軟體 Video Store；數位影像積分處理軟體 Video Scan。

三、溫溼度對反應的影響

實驗方式以 0.3 mM DPPH 及不同濃度 Vitamin E 75/37.5/18.75 /9.375 $\mu\text{g/mL}$ ，點樣長度為 3 mm，點注量各為 1 μl ，分別點樣在薄層

層析板上反應，置入 60 °C 飽和蒸氣中，分成實驗組及對照組，40 分鐘後讀取資料。DPPH 自由基清除率計算公式如下：

$$\text{DPPH 自由基清除率} = (A_D - A_E) / A_D \times 100 \%$$

A_D : DPPH 經影像處理所得的積分面積

A_E : DPPH 及 Vitamin E 經影像處理所得的積分面積

四、不同時間點反應結果的評估

實驗方式以 Vitamin E 濃度為 150、75、37.5、18.75 $\mu\text{g/mL}$ 及 0.3 mM DPPH 經由 CAMAG Linomate 5 半自動點樣儀點樣，Vitamin E 每點點注量皆為 12 μl ，0.3 mM DPPH 每點點注量皆為 6 μl ，點在同一片 TLC 薄片上，分別點出 6 mm 的點樣長度；先點上 Vitamin E 3 個點，接著再點上 0.3 mM DPPH 6 個點，前面 3 個點須蓋過 Vitamin E 的 3 個點，將點樣完之 TLC 薄片靜置每間隔 10 分鐘，以 CAMAG Reprostar 3 Video Store and Video Scan 數位影像處理系統處理影像，由 10 分鐘監測直到 100 分鐘，比較以 Vitamin E 來清除 DPPH 自由基在不同時間之差異。

五、DPPH 不同點注量的比較

實驗方式以 0.3 mM DPPH 經由 CAMAG Linomate 5 半自動點樣儀點樣，0.3 mM DPPH 點在同一片 TLC 薄片上，相同點樣長度點上

6 點，將點樣完之 TLC 薄片靜置 40 分鐘後，以 CAMAG Reprostar 3 Video Store and Video Scan 數位影像處理系統處理影像，比較不同點注量彼此間之差異。

六、清除 DPPH 自由基試驗^(78-79,82)

配製 0.4 mg/mL 三點金草甲醇萃取物，並以(20/40/60/80/100 µg/mL)Vitamin E 為對照標準品，將樣品溶液及 0.3 mM DPPH 經由 CAMAG Linomate 5 半自動點樣儀點樣，每點點注量為 1 µl，點在同一片 TLC 薄片上，點出 3 mm 的點樣長度；先點上 0.3 mM DPPH 接著再點上 Vitamin E 各 5 點，彼此之間須重疊，若樣品帶有顏色則須另外點樣當背景值，將點樣完之 TLC 薄片以 CAMAG Reprostar 3 Video Store and Video Scan 數位影像處理系統處理影像，將所測得的積分面積代入，DPPH 自由基清除率計算公式，計算樣品對 DPPH 自由基清除率。

第四章 結果

第一節 植物材料之萃取

陰乾後之三點金草重 1.8 公斤，經甲醇萃取濃縮後萃取物重 253 g，萃取率約 14 %。將甲醇萃取物懸浮於水中，以正己烷、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇進行分畫萃取，共得五個分畫，依序各重 67 g、2.8 g、9.3 g、65.2 g 及水層 108.29 g。各分畫所佔甲醇萃取物之重量百分比依序為 26.48 %、1.11 %、3.68 %、25.77 % 及水層 42.8 %。其分畫萃取流程圖 4-1 如下：



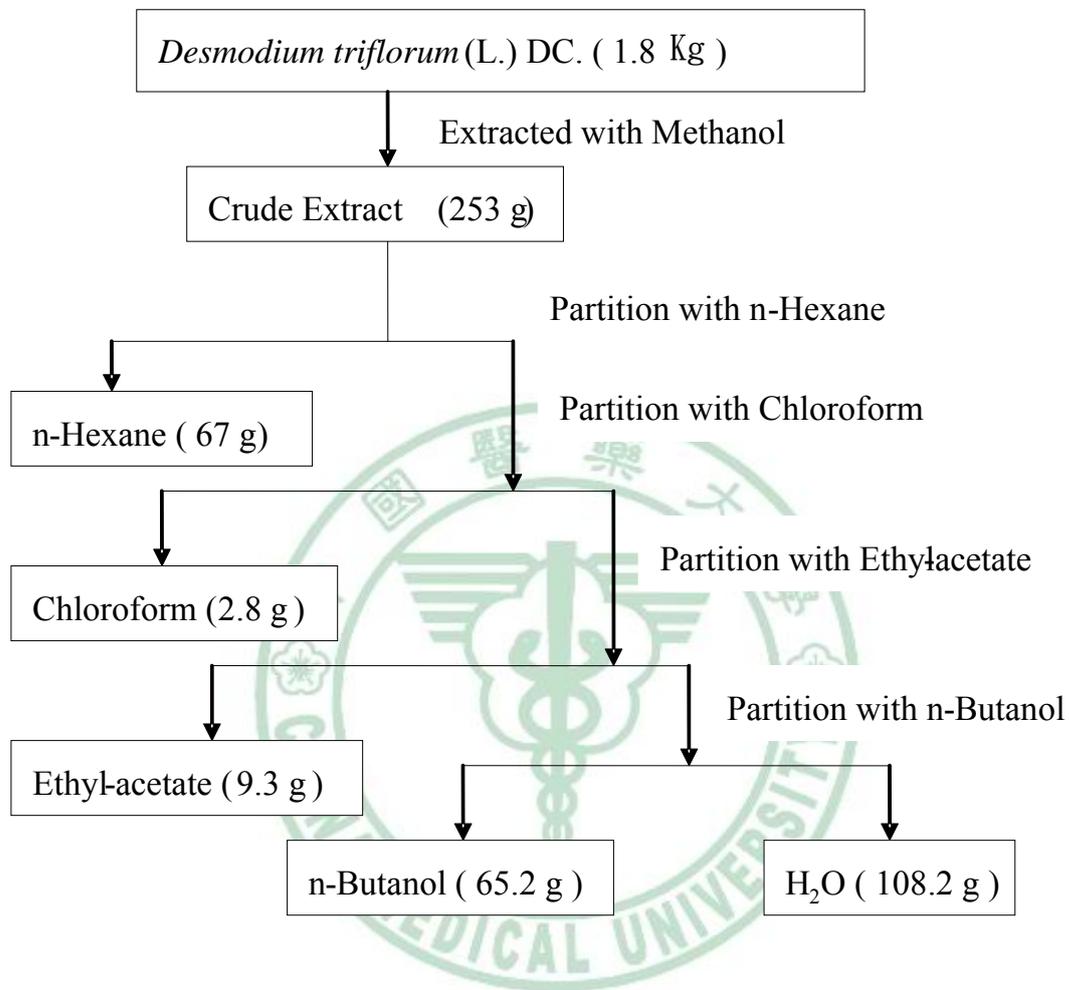


圖 4-1 分畫萃取流程

第二節 三點金草活性成分之 HPLC 指紋圖譜

目前研究報告提出黃酮類化合物具有多種生物活性，本實驗以 vitexin 為對照標準品(圖 4-2)，在 336 nm 波長下分析三點金草之甲醇(圖 4-3)、乙酸乙酯層(圖 4-4)及正丁醇層(圖 4-5)萃取物活性成分 vitexin 之 HPLC 指紋圖譜；本實驗以 Apigenin(圖 4-6), Genistin(圖 4-7) 及 Vitexin(圖 4-8)為對照標準品，在 260 nm 波長下標示出三點草甲醇萃取物所含之上述黃酮類成分(圖 4-9)，結果如下：



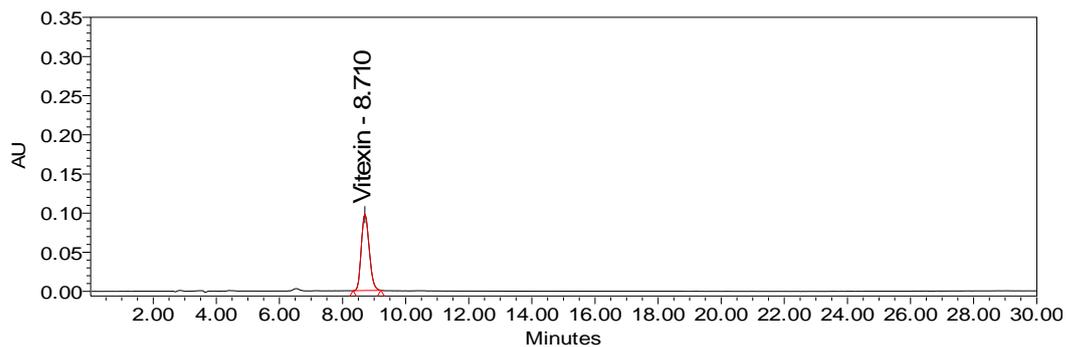


圖4-2 vitexin標準品HPLC層析圖

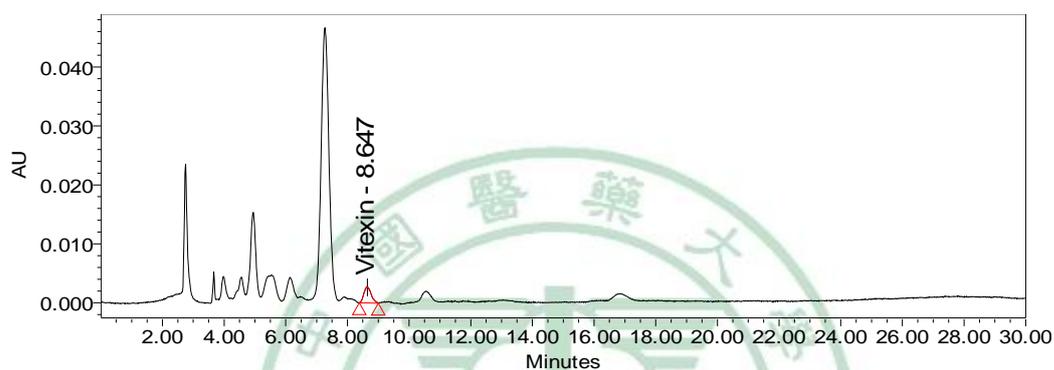


圖4-3 三點金草甲醇萃取物HPLC層析圖

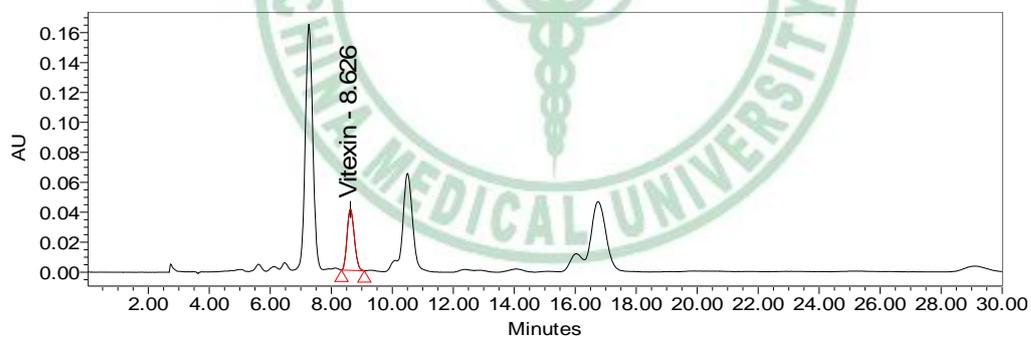


圖4-4 三點金草乙酸乙酯層HPLC層析圖

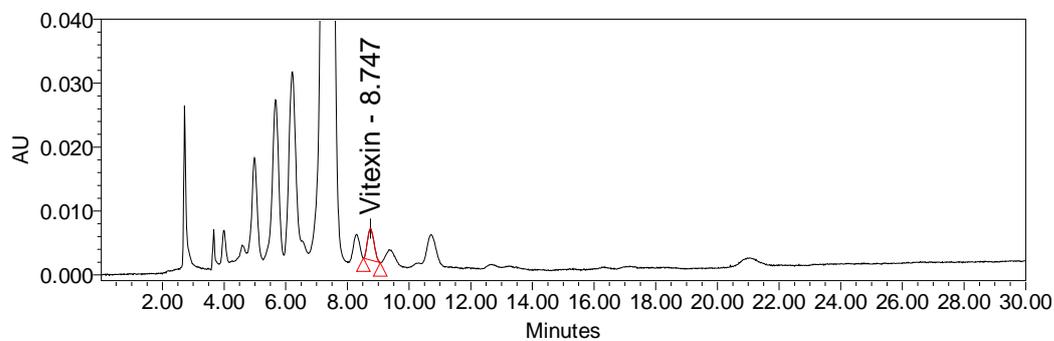


圖 4-5 三點金草正丁醇層 HPLC 層析圖

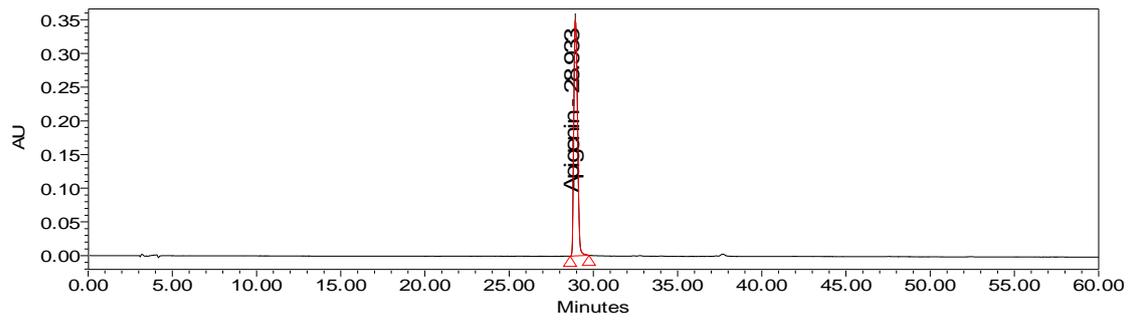


圖 4-6 Apigenin 標準品 HPLC 層析圖

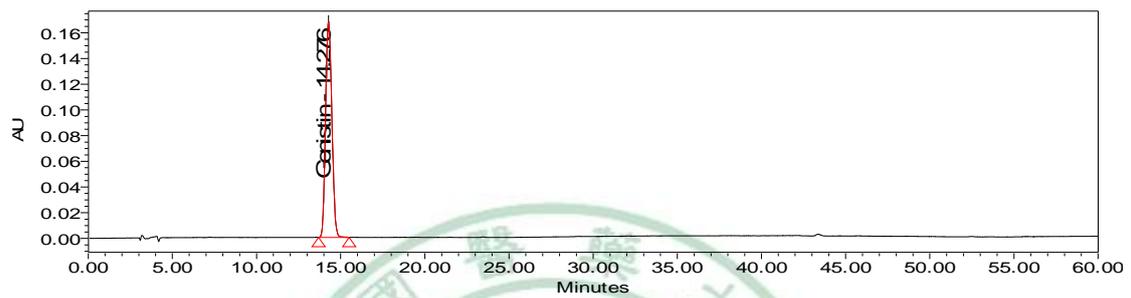


圖 4-7 Genistin 標準品 HPLC 層析圖

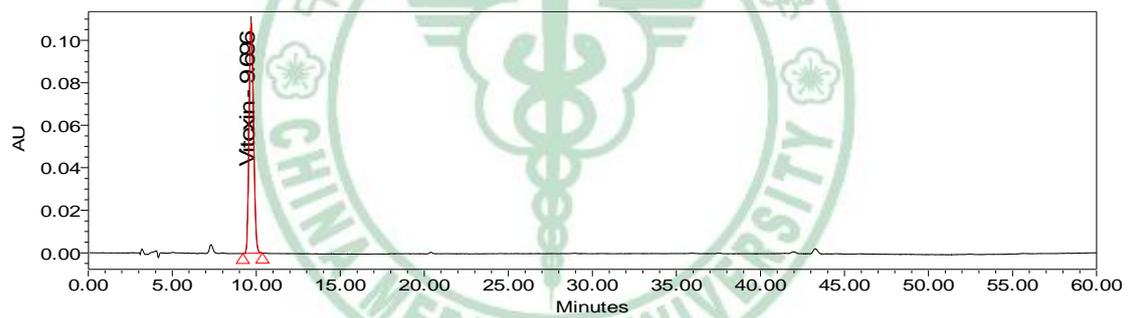


圖 4-8 Vitexin 標準品 HPLC 層析圖

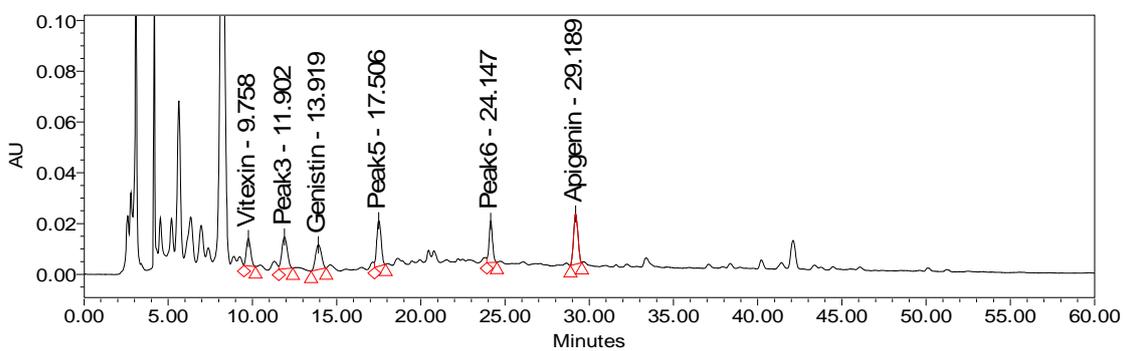


圖 4-9 三點金草甲醇萃取物 HPLC 層析圖

第三節 三點金草之鎮痛抗發炎實驗

一、三點金草之急性毒性試驗

三點金草之急性毒性試驗，當口服投予 10 g/kg 的甲醇萃取物時，經觀察七天未見實驗動物死亡，而急性毒性是指實驗動物一次或二十四小時內多次投予一定劑量的藥物，實驗動物在短期內出現的毒性反應。一般中草藥的急性毒性常用實驗動物致死所需劑量(稱 lethal dose，以 LD 表示)，而致死量與毒性成反比，如致死量愈大，毒性愈小；致死量愈小，則毒性愈大。然而半數致死量(百分之五十的實驗動物發生死亡的劑量，即 LD_{50})常用於衡量中草藥之毒性，可見三點金草之甲醇萃取物並無急性毒性。

二、三點金草之鎮痛實驗

1. 扭體反應試驗

口服給予MDT (濃度為0.5及1.0 g/kg)及腹腔注射indomethacin,均可明顯減少由醋酸所引起疼痛之扭體次數,結果如圖4-10所示。

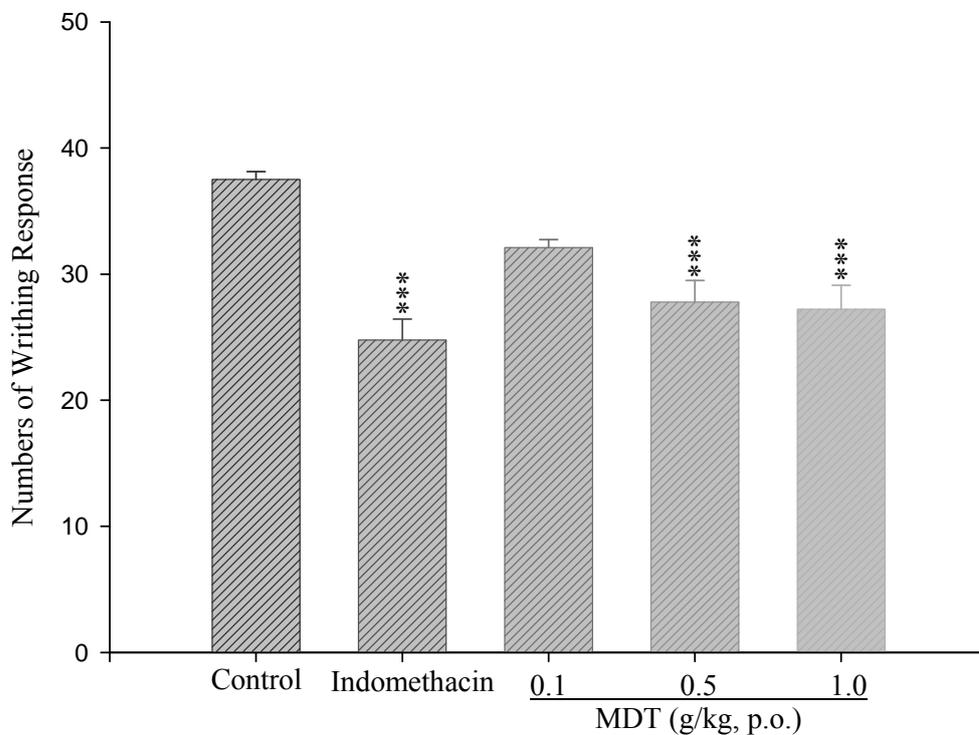


圖 4-10 Analgesic effects of the methanol extract of the of *D. triflorum*

(MDT) and indomethacin on acetic acid-induced writhing was

responded in mice. Each value was represented as mean \pm S.E.M.

(n=10) *** $p < 0.001$ when comparing with the control group

(one-way ANOVA followed by Scheffe's multiple range test)

2. 福馬林試驗

口服給予MDT (濃度為0.1、0.5及1.0 g/kg)及腹腔注射 indomethacin，均無法影響小鼠福馬林誘導前期之舔足反應時間，結果如圖4-11所示。

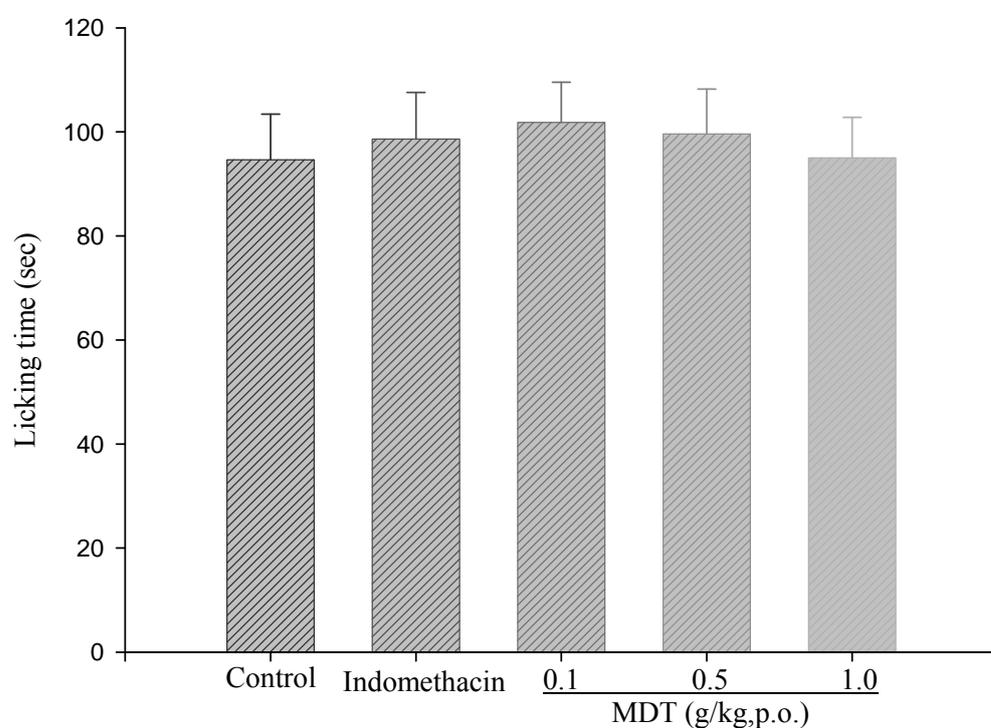


圖 4-11 Effects of the methanol extract of the *D. triflorum* (MDT) and indomethacin on the early phase in formalin test in mice. Each value was represented as mean \pm S.E.M. (n=10) as compared with the control group (one-way ANOVA followed by Scheffe's multiple range test).

口服給予 MDT(濃度為 0.1、0.5 及 1.0 g/kg)及腹腔注射 indomethacin，均可明顯減少小鼠福馬林誘導後期之舔足反應時間，結果如圖 4-12 所示。

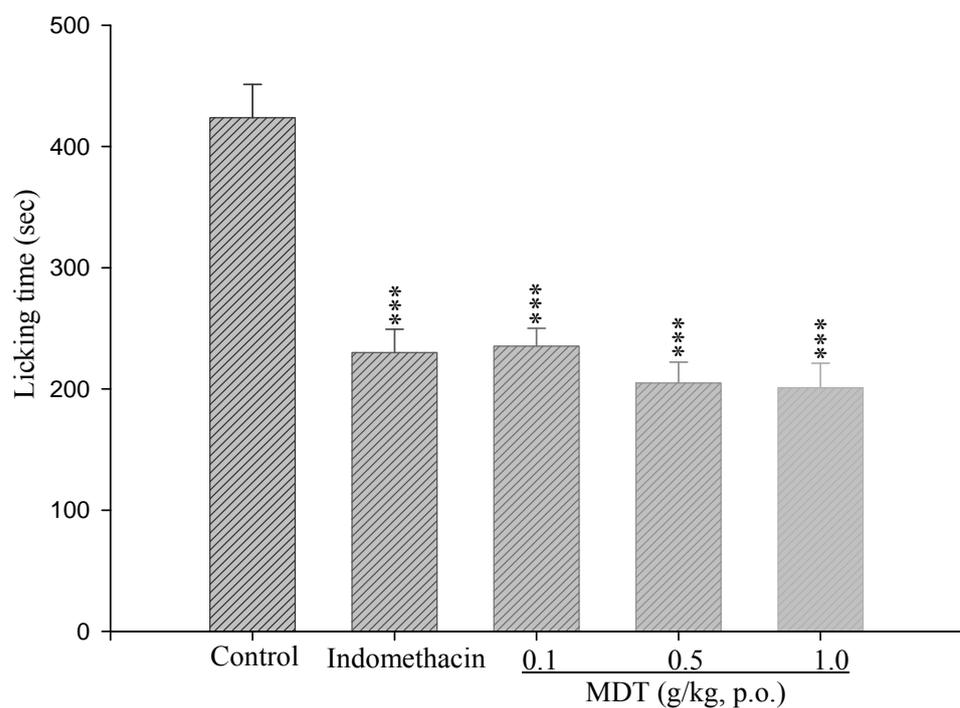


圖 4-12 Effects of the methanol extract of the *D. triflorum* (MDT) and indomethacin on the late phase in formalin test in mice. Each value was represented as mean \pm S.E.M. (n=10) *** $p < 0.001$ as compared with the control group (one-way ANOVA followed by Scheffe's multiple range test).

三、三點金草之抗發炎試驗

本試驗利用 λ -角叉菜膠誘導小鼠足蹠腫脹，以作為一種動物發炎的模式。如圖4-13所示，口服給予MDT (濃度為0.5及1.0 g/kg)及腹腔注射indomethacin，均可明顯抑制 λ -角叉菜膠誘導小鼠急性足蹠腫脹。

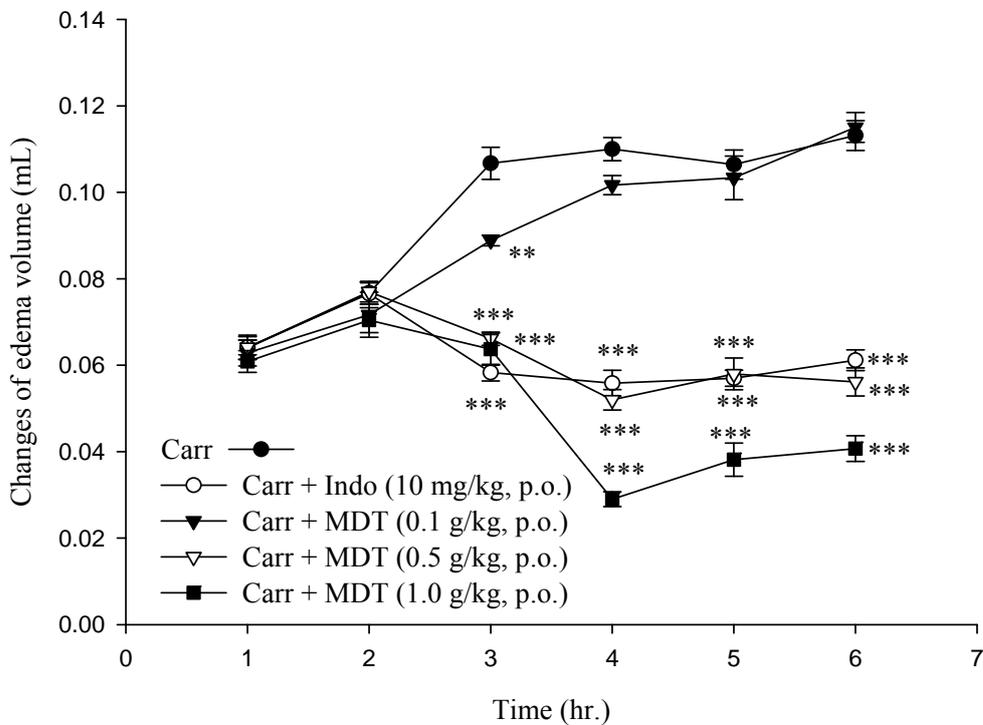


圖 4-13 Effects of the methanol extract of the *D. triflorum* (MDT) and indomethacin (Indo) on hind paw edema induced by λ -carrageenan in mice. Each value was represented as mean \pm S.E.M. (n=10) ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ as comparing with the λ -carrageenan (Carr) group (one-way ANOVA followed by Scheffe's multiprange test).

四、三點金草之抗發炎機轉探討

一、肝組織抗氧化酵素活性測定

結果如表4-1顯示口服給予MDT (濃度為0.5及1.0 g/kg)或腹腔注射indomethacin，均可明顯提升肝組織抗氧化酵素SOD及GRd活性。

表 4-1 Effects of the methanol extract of *D. triflorum* (MDT) and indomethacin (Indo) on SOD, GPx, and GRd activities in mice's livers.

Groups	SOD (U/mg protein)	GPx (U/mg protein)	GRd (U/mg protein)
Carr	26.99 ± 2.52	1.03 ± 0.04	0.067 ± 0.007
Carr + Indo	41.41 ± 2.33***	1.17 ± 0.05	0.089 ± 0.009*
Carr + MDT 0.1	29.87 ± 1.51	1.09 ± 0.10	0.118 ± 0.025***
Carr + MDT 0.5	33.55 ± 1.35***	1.18 ± 0.04*	0.133 ± 0.01***
Carr + MDT 1.0	41.47 ± 2.14***	1.13 ± 0.07	0.091 ± 0.005**

Each value was represented as mean ± S.E.M. (n=10) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ as comparing with the λ -carrageenan (Carr) group (one-way ANOVA followed by Scheffe's multiplerange test).

二、足蹠組織抗發炎相關活性測定：

1.足蹠組織中IL-1 β 濃度測定：

反應所呈現的顏色深度和IL-1 β 的濃度成正比。 λ -角叉菜膠組之足蹠組織中IL-1 β 濃度明顯上升，而口服給予MDT (濃度1.0 g/kg)或腹腔注射indomethacin，能明顯抑制 λ -角叉菜膠所誘導小鼠足蹠組織中IL-1 β 濃度之上升，結果如圖4-14所示。

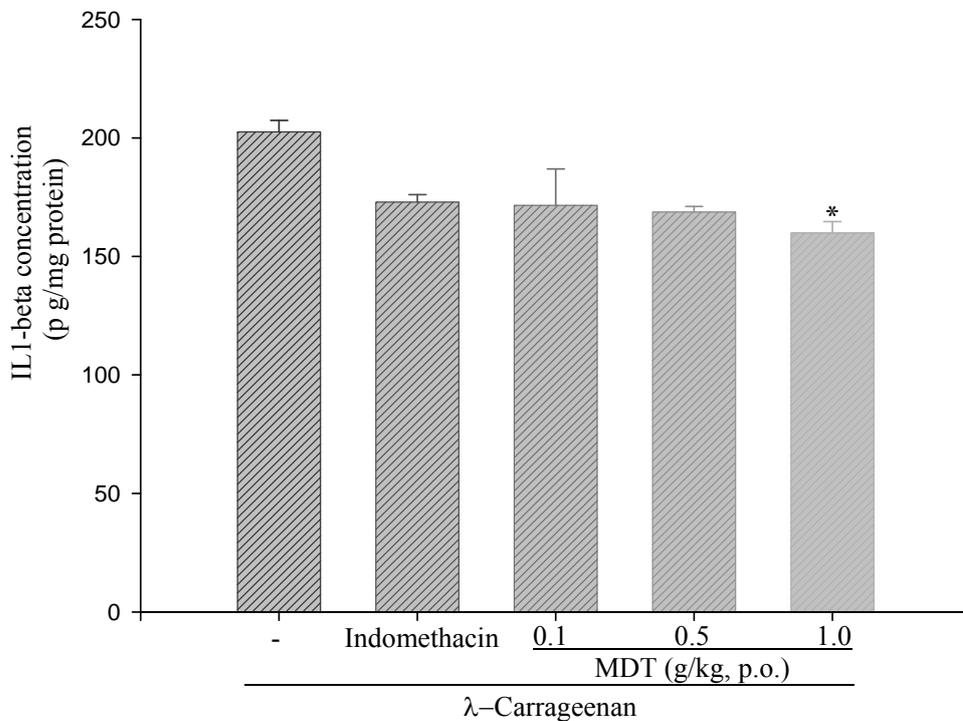


圖 4-14 Effects of the methanol extract of the *D. triflorum* (MDT) and indomethacin on the tissue IL-1 β concentration of paw in mice. Each value was represented as mean \pm S.E.M. (n=10) * p <0.05, as compared with the λ -carrageenan group (one-way ANOVA followed by Scheffe's multiple range test).

2. 足蹠組織中 TNF- α 濃度測定：

λ -角叉菜膠組之足蹠組織中 TNF- α 濃度明顯上升，而口服給予(0.1、0.5及1.0 g/kg)能抑制足蹠組織中 TNF- α 濃度上升之現象，而腹腔注射 indomethacin，亦無法降低小鼠足蹠組織中 TNF- α 濃度之上升，結果如圖4-15所示。

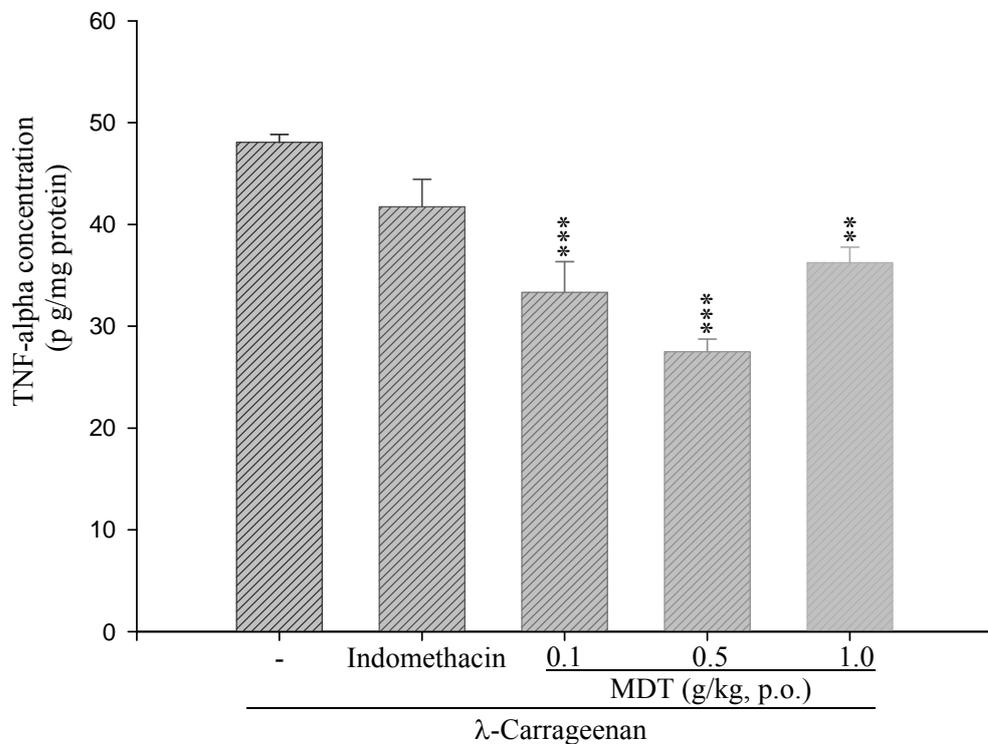


圖 4-15 Effects of the methanol extract of the *D. triflorum* (MDT) and indomethacin on the tissue TNF- α concentration of paw in mice. Each value was represented as mean \pm S.E.M. (n=10) ** p < 0.01, *** p < 0.001 as compared with the λ -carrageenan group (one-way ANOVA followed by Scheffe's multiple range test).

3.足蹠組織中NO含量測定

λ -角叉菜膠組之足蹠組織中NO濃度明顯上升，而口服給予MDT (0.1、0.5及1.0 g/kg)或腹腔注射indomethacin皆能明顯抑制血清中NO濃度上升之現象，而低濃度MDT (0.1 g/kg)仍具有抑制效果，結果如圖4-16所示。

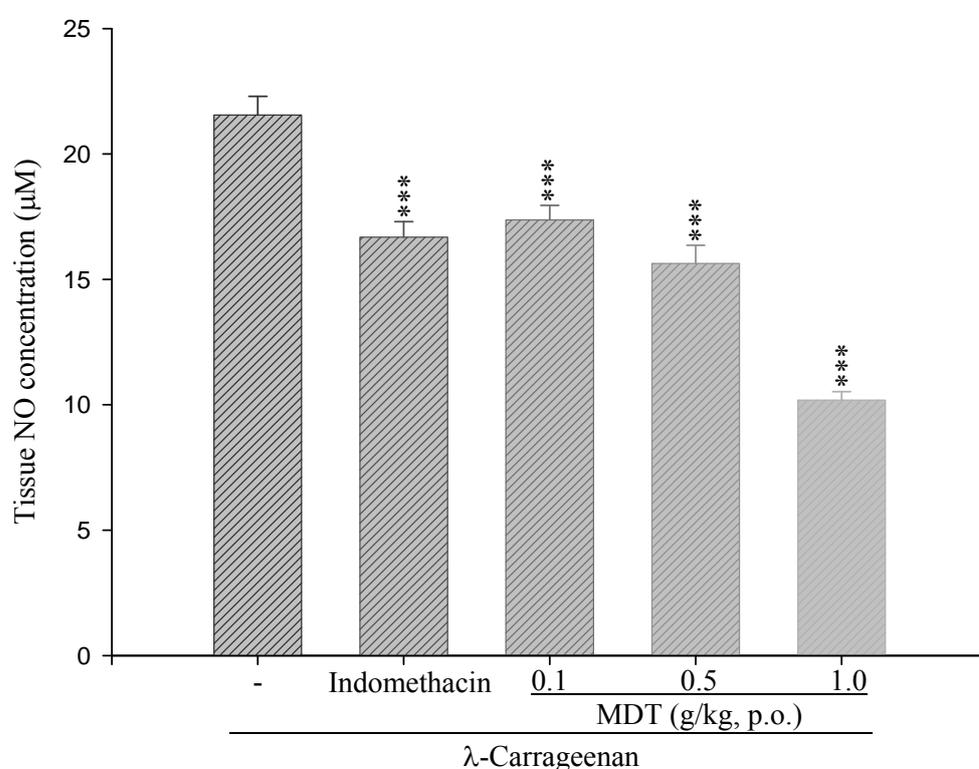


圖 4-16 Effects of the methanol extract of *D. triflorum* (MDT) and indomethacin on nitrate/nitrite concentration of edema paw in mice. Each value was represented as mean \pm S.E.M. (n=10) *** $p < 0.001$ when comparing with the λ -carrageenan group (one-way ANOVA followed by Scheffe's multiple range test).

4.足蹠組織中脂質過氧化物丙二醛(Malnodialdehyde; MDA)濃度測定

λ -角叉菜膠組之足蹠中MDA濃度明顯上升，而口服給予MDT (0.1、0.5及1.0 g/kg)或腹腔注射indomethacin皆能明顯抑制足蹠中脂質過氧化物MDA上升之現象，而低濃度MDT(0.1 g/kg)仍具有抑制效果，結果如圖4-17所示。

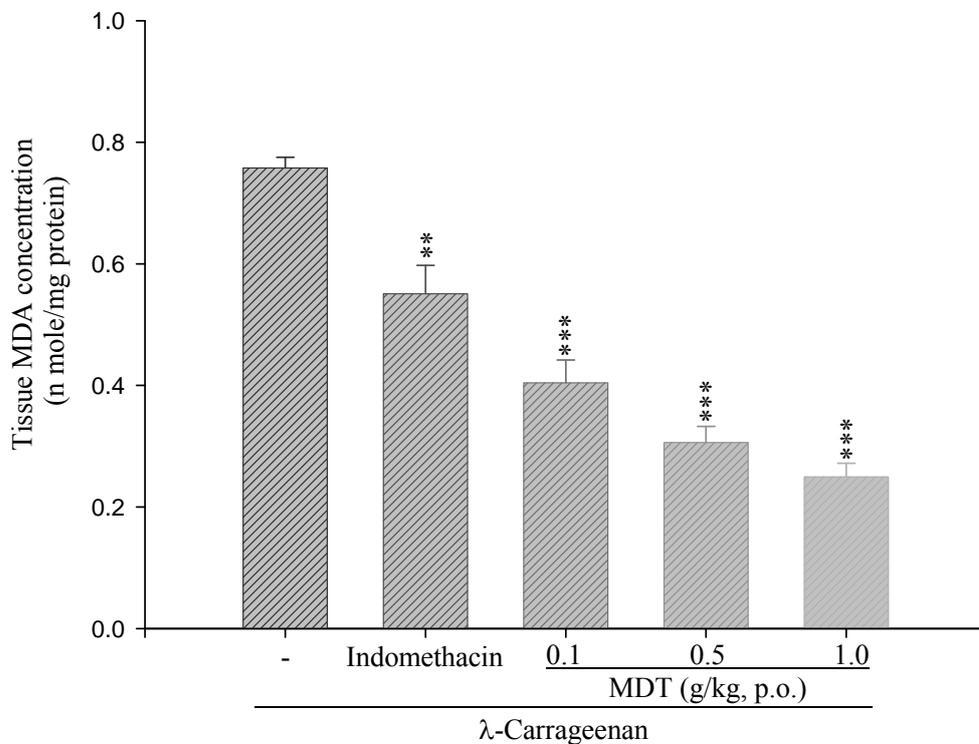


圖 4-17 Effects of the methanol extract of the *D. triflorum* (MDT) and indomethacin on the tissue MDA concentration of paw in mice. Each value was represented as mean \pm S.E.M. (n=10) ** p < 0.01, *** p < 0.001 as comparing with the λ -carrageenan group (one-way ANOVA followed by Scheffe's multiple range test).

第四節 三點金草之抗小鼠急性肝損傷實驗

一、肝功能血清生化指數之檢測

1.血清中麩氨酸草乙酸轉氨酶(GOT)之測定

CCl₄組血清中的GOT濃度明顯高於控制組，有口服給予MDT 1g/kg的組別，其GOT濃度則無明顯下降，而正對照組silymarin的GOT濃度下降更多，結果如圖4-18。

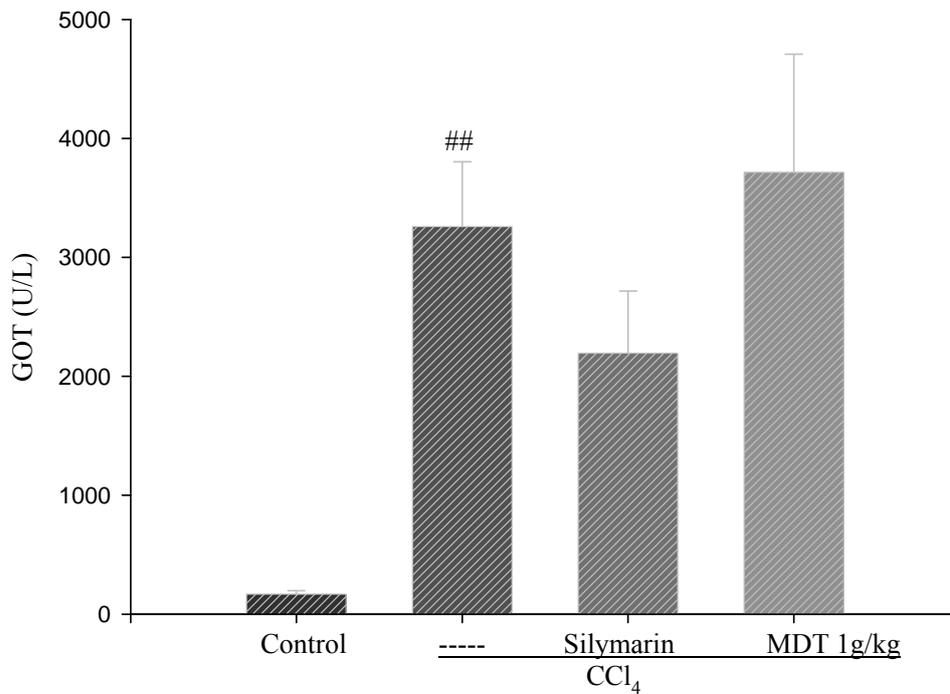


圖 4-18 Effect of the MDT and silymarin on GOT activities of CCl₄ acute

treated mice. Each value was represented as mean \pm S.E.M. (n=8)

^{##} $p < 0.01$ when comparing with the control group (one-way

ANOVA followed by Scheffe's multiple range test)

2.血清中麩氨酸丙氨基轉氨酶(GPT)之測定

CCl₄組血清中的GPT濃度明顯高於控制組，有給予DTM 1 g/kg和silymarin的組別，其GPT濃度則有下降，結果如圖4-19。

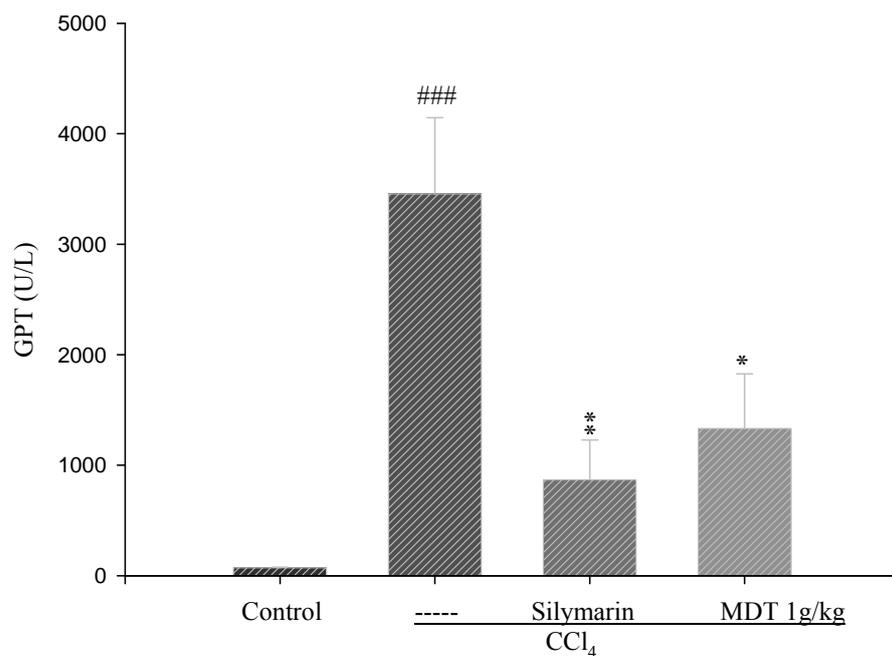


圖 4-19 Effect of the MDT and silymarin on GPT activities of CCl₄ acute treated mice. Each value was represented as mean \pm S.E.M. (n=8) ### $p < 0.001$ when comparing with the control group and * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ when comparing with the CCl₄ group (one-way ANOVA followed by Scheffe's multiple range test)

第五節 三點金草對Hep G2及PC-3細胞毒殺試驗

本試驗將三點金草甲醇萃取物及各分層萃取物，以人類肝癌Hep G2及前列腺癌PC-3細胞進行細胞毒殺試驗，在100 $\mu\text{g/ml}$ 濃度下其24小時存活率皆大於八成，其結果如圖4-20及圖4-21所示。

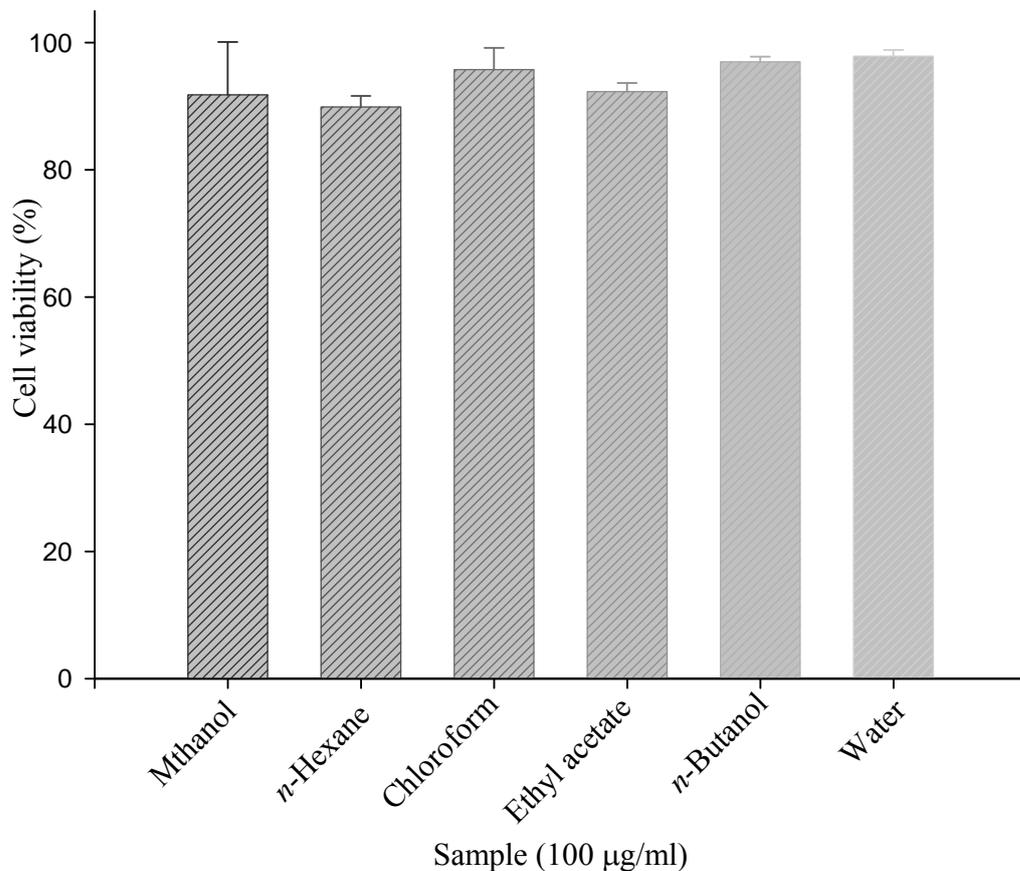


圖4-20 Affect of samples on Hep G2 cell viability. Hep G2 cells were cultured and treated with samples (100 $\mu\text{g/ml}$) for 24 h. Cell viability was determined according to the MTT assay as described in the Material and Method sections. Results are expressed as mean \pm standard error of three independent experiments.

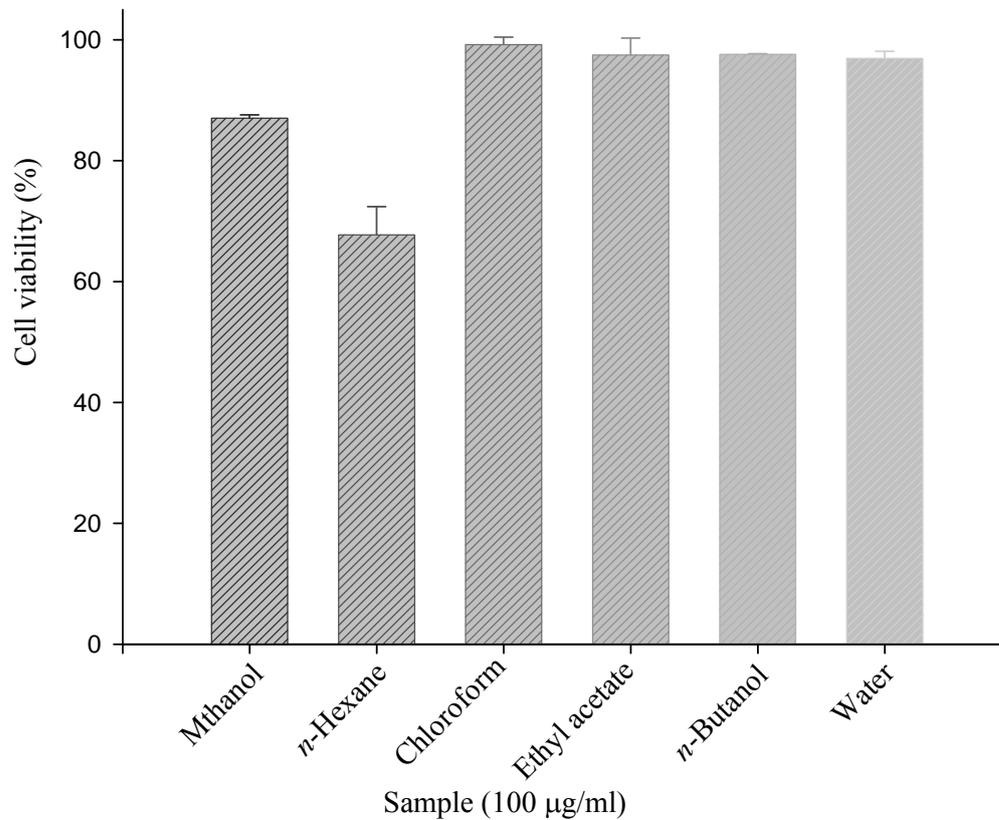


圖4-21 Affect of samples on PC-3 cell viability. PC-3 cells were cultured and treated with samples (100 µg/ml) for 24 h. Cell viability was determined according to the MTT assay as described in Materials and Methods. Results are expressed as mean \pm standard error of three independent experiments.

第六節 三點金草之抗氧化活性評價

一、抗氧化活性之評價結果

1. DPPH 自由基清除能力

在 DPPH 自由基清除試驗中，DPPH 自由基在甲醇溶液中呈紫色，當 DPPH 自由基被清除後，會由藍色變為淡黃色，DPPH 自由基在 517 nm 波長下有最大吸收，所測得的吸光值愈低表示清除 DPPH 自由基的能力愈高，文獻常以清除率的圖來表示樣品清除自由基的能力，或是以半數效應濃度 EC_{50} (Effective Concentration 50) 來表示，將萃取物之濃度與自由基清除率作圖代入迴歸方程式，算出可清除 50 % 自由基之樣品濃度，所計算的 EC_{50} 濃度愈低表示自由基清除能力愈強。本實驗結果如圖 4-22 顯示，三點金草乙酸乙酯層對 DPPH 自由基的清除力最強，水層的清除效最差。

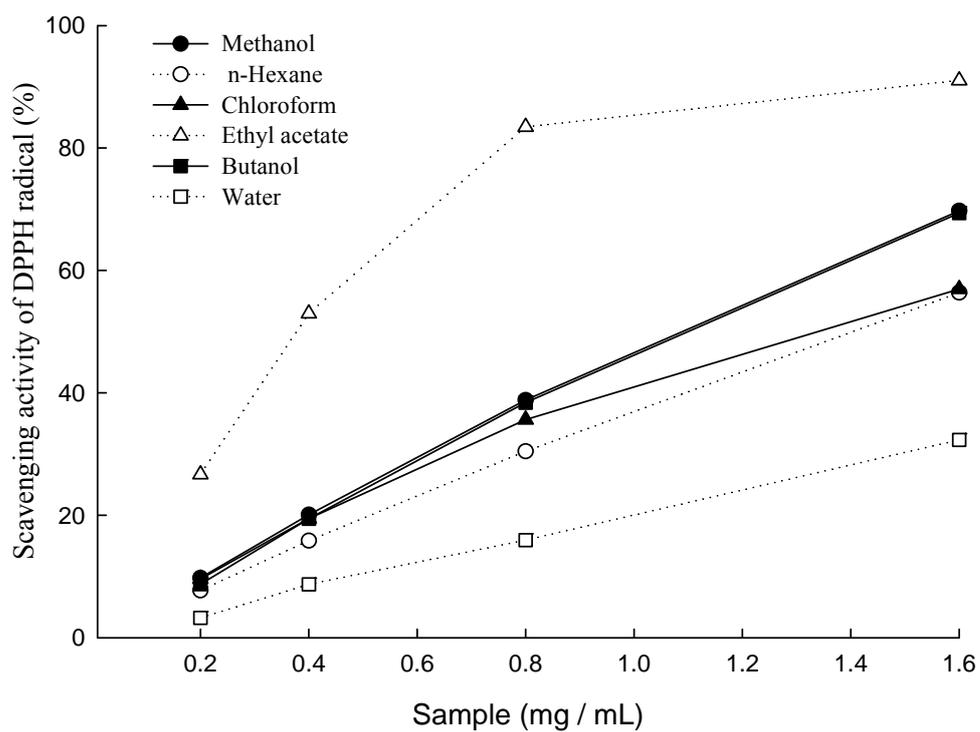


圖 4-22 The methanolic crude extract and its fraction from *D. triflorum* in scavenging DPPH radicals. (n=4)

DPPH 自由基清除試驗之結果，除了以圖 4-22 來表示樣品對 DPPH 自由基清除的能力外；本實驗另以抗氧化劑維生素 E 為本實驗清除自由基的對照標準品，因為不同樣品清除自由基的能力不同，在同濃度下以清除率作圖計算時可能無劑量加成性，由圖 4-22 可知在濃度 0.4 mg/mL 時，三點金草甲醇萃取物及各分層萃取物對自由基 DPPH 的清除能力具有劑量加成性，另以維生素 E 與自由基清除率作圖代入迴歸方程式，計算三點金草甲醇萃取物及各分層萃取物對自由基 DPPH 的清除能力，相當於含有多少抗氧化劑維生素 E 的量來表示。如表 4-2 所示乙酸乙酯層的清除能力約為各分層清除能力的三倍，更是水層的六倍，而 0.4 mg/mL 乙酸乙酯層萃取物相當於 186.6 ± 2.5 μg α -tocopherol (維生素 E)。

表 4-2 The equivalent of α -tocopherol of the methanolic crude extract and its fractions from *D. triflorum* in scavenging DPPH radicals. (n=4)

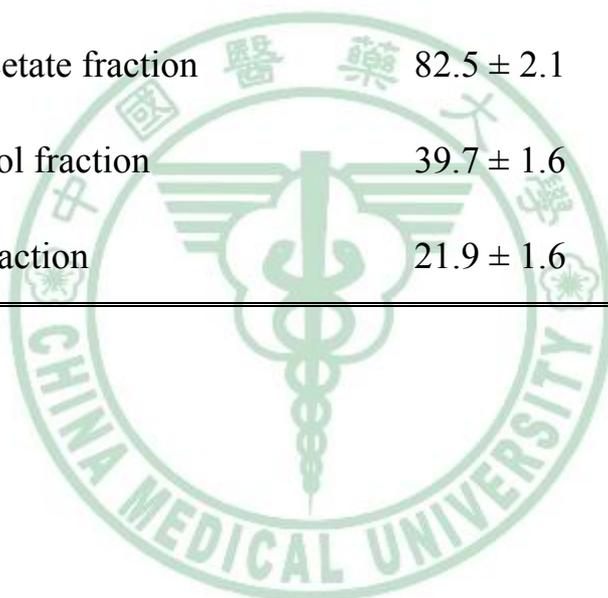
Scavenging of DPPH radicals	
Sample	$\mu\text{g } \alpha\text{-tocopherol equivalent per 0.4 mg of sample}$
Crude extract	70.7 ± 1.8
n-Hexane fraction	55.8 ± 4.5
Chloroform fraction	68.5 ± 4.5
Ethyl-acetate fraction	186.6 ± 2.5
n-Butanol fraction	68.4 ± 3.2
Water fraction	30.6 ± 3.0

2.總抗氧化能力測定

總抗氧化能力測定樣品清除自由基 $ABTS^{\bullet+}$ 的能力，來評價抗氧化能力。自由基 $ABTS^{\bullet+}$ 呈綠藍色，在 734 nm 波長下有最大吸收，因此檢測在波長 734 nm 下的吸光值，吸光值愈低代表樣品清除自由基 $ABTS^{\bullet+}$ 的能力愈強。本實驗以水溶性之 Trolox 為清除自由基 $ABTS^{\bullet+}$ 的對照標準品，將不同濃度 Trolox 與其對自由基 $ABTS^{\bullet+}$ 清除率作線性迴歸，將樣品所測得的清除率代入上述之迴歸方程式，換算相當於多少量的 Trolox；在濃度 0.2 mg/mL 時，三點金草甲醇萃取物及各分層萃取物，對清除自由基 $ABTS^{\bullet+}$ 具有劑量加成性，一般實驗結果常以 trolox 當量抗氧化活性(trolox equivalent antioxidant capacity; TEAC)來表示，為求實驗一致性，總抗氧化能力測定以重量 μg 為單位，結果如表 4-3 乙酸乙酯層萃取物 0.2 mg/mL 相當於 $82.5 \pm 2.1 \mu\text{g}$ trolox。

表 4-3 The trolox equivalent of the methanolic extract and its fractions from *D. triflorum* in scavenging ABTS^{●+} radicals (n=4)

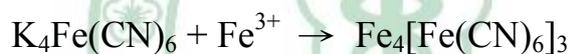
Sample 0.2mg/mL	Trolox μg
Crude extract	25.8 \pm 0.8
n-Hexane fraction	16.7 \pm 0.3
Chloroform fraction	47.2 \pm 1.4
Ethyl-acetate fraction	82.5 \pm 2.1
n-Butanol fraction	39.7 \pm 1.6
Water fraction	21.9 \pm 1.6



3. 還原力測定

本實驗主要以測定普魯士藍(prussian blue, $K_4[Fe(CN)_6]_3$)生成的量，利用赤血鹽(potassium ferricyanide, PFC, $K_3Fe(CN)_6$)提供 Fe^{3+} ，當樣品與 Fe^{3+} 產生反應，可將 Fe^{3+} 還原成 Fe^{2+} 黃血鹽($K_4Fe(CN)_6$)，黃血鹽再與 $FeCl_3$ 所提供的 Fe^{3+} 反應形成亞鐵氰化鐵，即普魯士藍，此物質可在700 nm波長下測其吸光值，吸光值越高代表普魯士藍形成愈多，樣品所具有的還原力越強。

反應式如下：



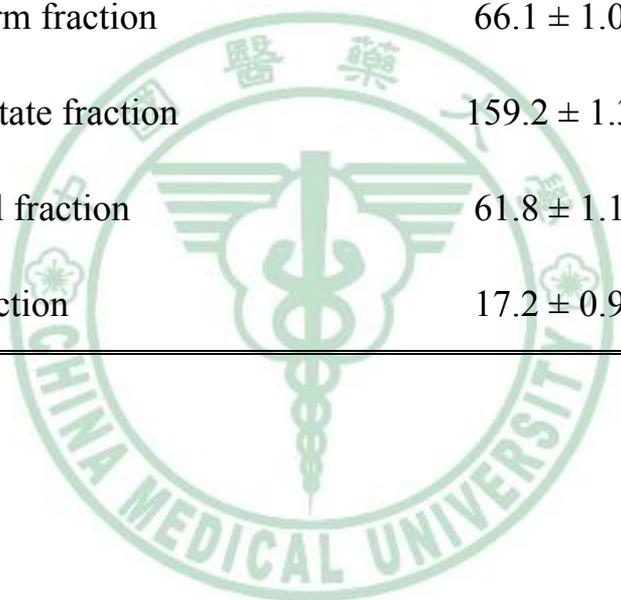
為本實驗之還原能力效價，以抗氧化劑維生素C為對照標準品，在濃度1.25 mg/mL下具有劑量加成性，測定三點金草甲醇萃取物及各分層萃取物所具有的還原力，以相當於含有多少抗氧化劑維生素C之還原力來表示。

如表4-4所示乙酸乙酯層的還原能力約為各分層清除能力的2.5倍，更是水層的9倍，而乙酸乙酯層萃取物1.25 mg/mL相當於 159.2 ± 1.3 μg ascorbate (維生素C)。

表4-4 Reducing power of the methanolic extract and its fractions from *D.*

triflorum

Sample	μg ascorbate equivalent per 1.25 mg sample
Crude extract	61.2 ± 0.3
n-Hexane fraction	69.6 ± 0.8
Chloroform fraction	66.1 ± 1.0
Ethyl-acetate fraction	159.2 ± 1.3
n-Butanol fraction	61.8 ± 1.1
Water fraction	17.2 ± 0.9



二、抗氧化成分類之評價

1. 總多酚類(polyphenols)含量測定

總多酚化合物含量以catechin之標準曲線作對照，總多酚類含量以mg (+)-catechin equivalent/g dry weight表示，如表4-5顯示每g乙酸乙酯層萃取物相當於 233.33 ± 10.03 mg (+)-catechin。

表4-5 Total phenolic content of the methanol crude extract and its fractions from *D. triflorum* (n=4)

sample	Total phenolic compounds content Catechin/sample (mg/g)
Crude extract	96.60 ± 0.96
n-Hexane fraction	18.33 ± 3.02
Chloroform fraction	13.67 ± 4.09
Ethyl-acetate fraction	233.33 ± 10.03
n-Butanol fraction	46.88 ± 3.12
Water fraction	22.84 ± 0.62

2. 總黃酮類(flavonoids)含量測定

以 rutin 為總黃酮類(flavonoids)含量測定之標準品，經線性迴歸方程式計算在 2 mg/mL 的樣品濃度下(圖 4-23)，相對於 rutin 之總黃酮類含量以 mg rutin equivalent/g dry weight 表示，2 mg/mL 三點金草甲醇萃取物約含相當於 0.045 mg rutin。(方程式 $y = 10.239x - 0.0209$ $R^2=0.9985$)

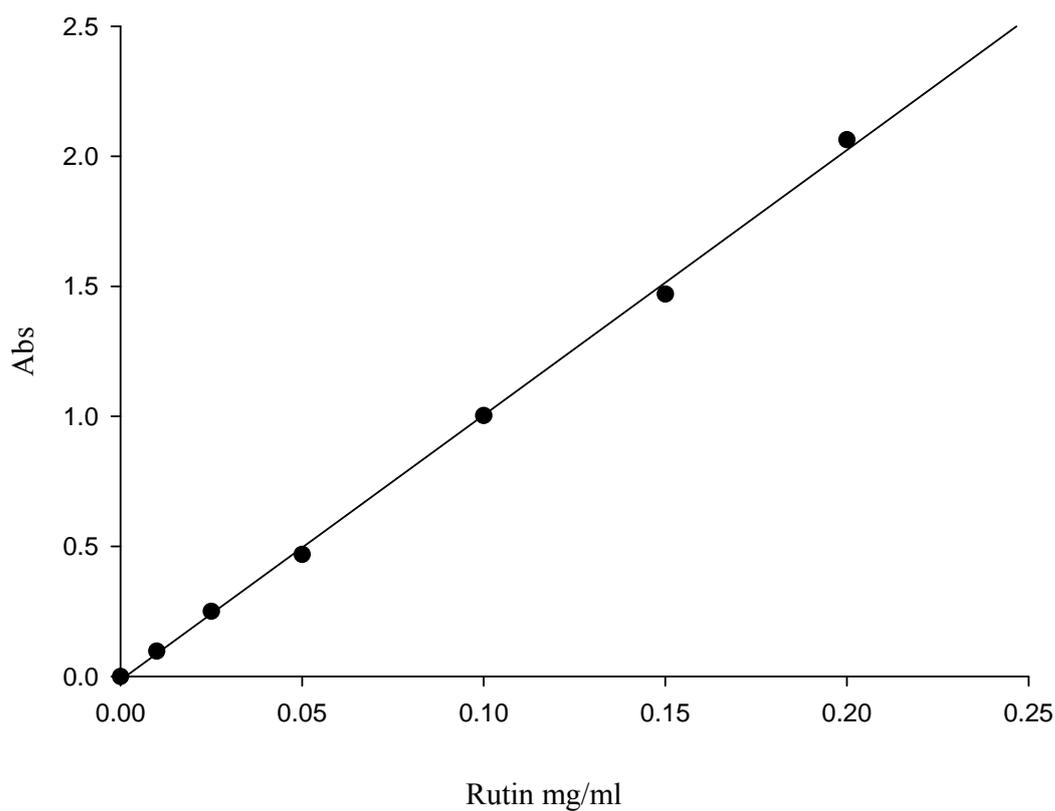


圖 4-23 標準品 rutin 之檢量線

第七節 DPPH 去除率儀器新應用

一、參數設定

1.儀器最佳化及軟體參數設定

Video 數位影像處理參數設定及影像擷取

A.使用+3 近拍鏡頭(Close up lens)時的處理

- 1.鏡頭距離拍攝物 33 公分(刻度 38.5 公分)，焦距 11.5 mm (Focal distance)，形成影像 1:1，光圈調至 4-8 間。

B.HV-C20 鏡頭參數設定

1. Camera Model: Manual (在手動模式下才可調整其它參數)
2. Gamma: Off (在 Gamma On 的模式下影像失真)
3. AGC: Off (自動增益 On，可調節影像亮度-使影像亮度增加)
4. White balance: Auto (使影像為白色的部分再現，preset 5600K 白色背景偏橘紅色；preset 3200K 白色背景偏淡藍色)
5. Gain: Off or On →1 db (增益可調節影像亮度)
6. Contrast: Off (對比 ON 時所測得積分值較小)
7. Shade mode: Color (在使用 TLC 影像擷取時，建議採用 Color 模式)
8. DTL: Off (ON 時會使 baseline noise 增加)
9. Shutter: Automatic (所測積分植 RSD 較小)
10. Integration time: 40 ms (積分時間愈長，亮度愈亮)

C.TV zoom lens: 調整影像清晰度

2.Video Scan 軟體處理參數

※Plate properties :

Image type :

1. Absorption : 當 spots 比背景暗時使用 ; 在白光下背景比較亮時選擇此模式。

2. Fluorecence : 當背景比 spots 暗時使用 ; 在紫外光下 spots 為螢光適用此模式。

Integration parameters :

※Detection filter : Green (依檢品顏色而定)

對於不同檢品顏色之加強，可使用不同互補色的過濾，來得到最大積分值。

加強 Blue 可使用 filter color → Yellow ; 加強 Red 可使用 filter color → Cyan ; 加強 Green 可使用 filter color → Magenta 。

※Baseline (Background) correction :

Method :

1.Track border : 取 fraction 兩側像素之平均值。

Offset: NO : 基線可能傾斜，所測積分值大。

Offset: Yes : 清除 fraction 外的面積，所測積分值小。(適用於 TLC)

2.Lowest slop : 設計給 TLC 用。

Offset : NO or Yes 兩者所測得積分值相同，但比 Track border /

Offset : On 所測積分值小。

3. Track border & Lowest slop : 具有上述兩者的特質。

Offset : NO or Yes 兩者所測得積分值相同，但比 Track border /

Offset : On 所測積分值小，約略相同。(不建議使用 No)

Offset : (移置)

Yes : 最低背景值設為零。

No : 背景值低於零以零計算。

※Peak detection :

1. Min peak width (pixels) : 5

A suitable default for TLC is 5. (建議使用於 TLC)

2. Min peak height : 100

A suitable default for TLC is: absorbance 100 and fluorescence 400.

3. Min peak area : 300

A suitable default for TLC is: absorbance 300 and fluorescence 1000.

* Savitsky-Golay filter : A suitable default for Video-TLC is 7.

二、溫溼度對反應的影響

結果如表 4-6 實驗組在 60 °C 飽和蒸氣中 40 分鐘，所呈現的自由基清除率與對照組比較自由基清除率，則無明顯差異。

表 4-6 Percentage (%) of radical scavenging activity of the influence of humidity and temperature

	60 °C of saturation vapors			Room temperature		
	Mean	RSD	RSA %	Mean	RSD	RSA %
E20	2949	2.63	29.7	2736	1.20	28.5
E40	2457	1.48	41.4	2095	0.55	45.2
E60	1542	0.46	63.2	1453	4.76	62.1
E80	1136	3.66	72.9	1221	4.23	68.0
E100	783	1.80	81.3	855	2.43	77.6
DPPH	4196	1.70		3828	0.42	

*E20: E indicated the presence of Vitamin E and 20 referred to the concentration 20 μ g/mL *n=3

*RSA: radical scavenging activity

三、不同時間點反應結果的評估

經由間隔 10 分鐘監測，在靜置 10 至 100 分鐘間，Vitamin E 清除 DPPH 自由基的清除率沒有多大的變化且穩定，結果如表 4-7。

表 4-7 Percentage (%) of radical scavenging activity at different time

Time	Vit E 40µg/mL		0.3 m M DPPH	
	Mean	Mean	Mean	RSA %
10 min	1823	3036	39.9	
20 min	1861	3082	39.6	
30 min	1789	3033	40.9	
40 min	1779	3008	40.8	
50 min	1657	2898	42.8	
60 min	1683	2866	41.2	
70 min	1715	2861	40.0	
80 min	1812	2882	37.1	
90 min	1800	2809	35.9	
100 min	1870	2835	34.0	

* n=3

*RSA: radical scavenging activity

四、DPPH 不同點注量的比較

經由比較 1~8 μl 的點注量，結果如表 4-8 顯示點注量在 1 μl 時，影像處理所測得的積分值沒有多大的變化且穩定，所以點注量可定為 1 μl 。

表 4-8 The integration area of different DPPH spraying volumes

Volume	Mean	RSD
1 μl	5779	1.33
2 μl	8192	3.66
3 μl	9619	1.87
4 μl	10542	4.03
5 μl	11455	3.69
6 μl	12359	2.67
7 μl	12466	3.79
8 μl	13566	2.92

n=3

五、清除 DPPH 自由基試驗

以 Vitamin E 及三點金草甲醇萃取物清除 DPPH 自由基試驗所得之結果如表 4-9，所測得的數位影像如圖 4-24 及數位影像轉峰形圖如圖 4-25。

表 4-9 The antioxidant activity of the methanolic crude extract of *D.*

triflorum

1 μ l	Mean	RSD	RSA %
Vitamin E20 μ g/ml + DPPH	2736	1.20	28.5
Vitamin E40 μ g/ml + DPPH	2095	0.55	45.2
Vitamin E60 μ g/ml + DPPH	1453	4.76	62.1
Vitamin E80 μ g/ml + DPPH	1221	4.23	68
Vitamin E100 μ g/ml + DPPH	855	2.43	77.6
MDT 400 μ g/ml + DPPH	1737	1.56	66.7
MDT 400 μ g/ml	465	6.87	
0.3 mM DPPH	3828	0.42	

*RSA: radical scavenging activity

*MDT is the methanol extract of *Desmodium triflorum*



*E: The presence of Vitamin E

*MDT is the methanol extract of *Desmodium triflorum*

圖 4-24 The digital image of TLC plate

Track 1

(x100)

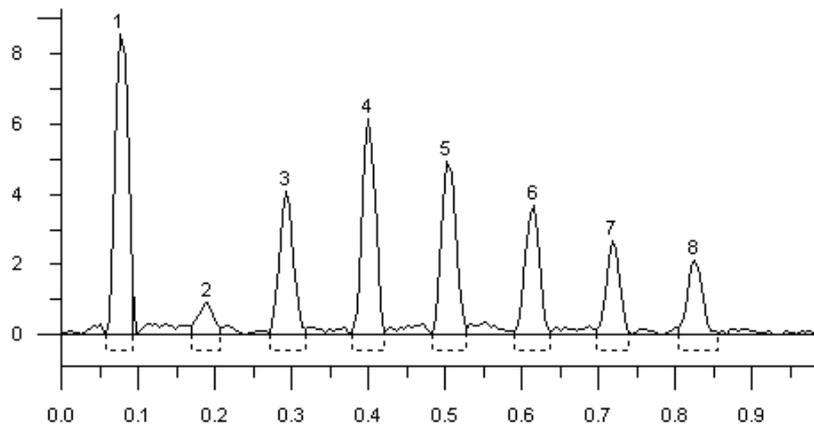


圖 4-25 The digital image via data acquisition was converted into peak

第五章 討論

在 HPLC 指紋圖譜分析結果中發現，三點金草甲醇萃取物、乙酸乙酯層及正丁醇層皆含有具抗發炎化合物 vitexin。在三點金草甲醇萃取物指紋圖譜分析中，標定其黃酮類化合物 apigenin 及 genistin。

一般中草藥在進行藥理實驗前，須評估其急性毒性，而三點金草之口服急性毒性試驗，經口服 10 g/kg (換算原藥材約 71.4 g/kg) 後觀察一週其活動力及精神狀況，並未發現實驗動物死亡，三點金草在民間使用上還未聽聞中毒之情形由；在 1972 年 Ghosal 將三點草生物鹼萃取分層，以小鼠腹腔注射投藥進行急性毒性試驗，發現其 LD₅₀ 為 215.5 mg/kg⁽⁴²⁾ (換算原藥材約 2155 g/kg)，但對其用藥安全上尚待進一步探討，如肝、腎功能及慢性毒性試驗的評估，以確保其在民間用藥安全的保障。

疼痛反應之評估可分為電刺激法、熱刺激法、化學（醋酸扭體及福馬林舔足）及機械刺激反應^(76,77)。本研究利用之疼痛反應模式為化學刺激之醋酸扭體及福馬林舔足反應試驗。醋酸扭體反應試驗於 1957 年由 Siegmund 等人⁽⁷⁸⁾ 提出應用於評估疼痛反應，其評估方式為實驗動物經由腹腔注射化學物質醋酸，對實驗動物腹部直接刺激所引發急性腹膜炎而產生疼痛，並經由觀察實驗動物其腹部內縮、後腿伸直、身體拉長扭曲之現象。鴉片類與內啡肽類等神經鎮痛物質及固醇類和

非固醇類周邊性鎮痛抗炎物質，皆可抑制醋酸扭體反應^(79,80)，因為實驗操作方便，所以醋酸扭體試驗常被用於篩選具有鎮痛作用之中草藥^(12,48)及藥物^(88,89)。醋酸扭體試驗誘發疼痛之作用機轉，因醋酸使細胞膜磷脂質損傷，產生花生四烯酸(arachidonic acid)，再經由環氧化酶(cyclooxygenase)氧化促使前列腺素(prostaglandin)合成，而前列腺素中的PGE₂及PGF₂α則與疼痛有關⁽⁹⁰⁾。研究結果顯示，口服三點金草甲醇萃取物(0.5及1.0 g/kg)及腹腔注射indomethacin(10 mg/kg)，具有鎮痛之作用，均可明顯減少由醋酸所引起疼痛之扭體次數，其鎮痛之作用機轉可能與抑制花生四烯酸有關⁽⁸⁶⁾。由於醋酸扭體試驗之疼痛機轉包含周邊及中樞作用，因而無法確認其作用機轉是經由中樞或周邊而來，所以必須進一步以福馬林舔足試驗進行研究，以確認其真正的鎮痛作用機轉。

福馬林舔足試驗於1977年由Dubuisson和Dennis提出⁽⁹¹⁾，此實驗方法利用福馬林對組織造成損傷而產生疼痛，是目前仍常被用來篩選鎮痛藥物的實驗模式之一。於1987年Hunskaar 等人研究指出福馬林試驗為一有效模式，可用於篩選鎮痛藥物，是否對發炎性和非發炎性疼痛具有鎮痛作用⁽⁹²⁾。於1989年Shibata等人經由福馬林舔足實驗模式研究發現⁽⁹³⁾，福馬林誘發實驗動物之舔蹠行為呈雙向(biphasic response)反應，指出實驗動物舔足時間具有兩個高峰期，在福馬林注入0~5

分鐘會造成初期疼痛 (initial pain) 反應而引起實驗動物舔足，稱之為前期(early phase)，主要因直接刺激痛覺接受體造成 substance P 或 bradykinin 等致痛物質的釋放；而在進入20~30分鐘實驗動物所舔足時間稱之為後期 (late phase)，而後期主要是因為福馬林引起發炎反應造成化學傳遞物質，例如：histamine, serotonin, prostaglandin 及 kinin 等物質是由受損組織細胞中釋出，而引起及脊髓背腳功能性改變^(93,94)。

前期為非發炎性疼痛，後期則為發炎性疼痛，福馬林0.5-10 % 濃度皆可誘導出前期及後期舔足反應，而5 %福馬林濃度可誘導最大前期和後期舔足反應⁽⁹⁵⁾。因此本研究以5 %福馬林誘導實驗動物產生疼痛反應，實驗結果發現三點金草甲醇萃取物對減少小鼠福馬林誘發前期之舔足反應時間沒有明顯影響。但可明顯減少小鼠福馬林誘發後期之舔足反應時間。顯示其對發炎性疼痛有明顯鎮痛作用，對非發炎性疼痛無明顯作用。麻醉性鎮痛劑如morphine對前期及後期都有抑制作用，但NSAID只對後期有抑制作用^(93,96)。

在篩選抗發炎藥物的實驗方法中，常注射致發炎劑後能產生抑制浮腫之作用來評估效價，最常使用之致發炎物質包括： λ -角叉菜膠 (λ -carrageenan)、組織胺(histamine)、右旋糖苷 (dextrose)、白蛋白 (albumin)、酵母 (yeast) 等，其中以 λ -角叉菜膠為最廣泛被使用之動物實驗模式之一，因為 λ -角叉菜膠為局部致發炎劑與免疫反應

無關，在誘導劑量下再現性高且無全身作用⁽⁵⁰⁾。目前常被應用於篩選抗發炎中草藥，以及研究發炎反應與自由基之關係⁽⁹⁷⁾。

研究結果發現，口服給予三點金草甲醇萃取物(0.5 g/kg 及 1 g/kg)可明顯降低 λ -carrageenan 誘導的急性足蹠浮腫，顯示三點金草具有抗炎作用。然而足蹠注射 λ -carrageenan 所引起的浮腫是雙向性反應⁽⁹⁸⁾，足蹠注射 λ -carrageenan 後在不同時期會釋放出不同物質而引起發炎，前期在誘導後約 1 小時會釋出 histamine、serotonin、platelet activating factor 等物質，使結構形一氧化氮合成酶(cNOS)活化，使一氧化氮增加引起脂質過氧化⁽⁹⁹⁾；中期約從 1-2.5 小時，kinin 類物質會釋出，讓受到損傷的組織血管通透性增加，使血液中的多型白血球聚集形成浸潤現象，促使自由基的生成，引起脂質過氧化；2.5 小時之後為後期，前列腺素(prostaglandin)、白細胞介素(leukotriens)及一氧化氮 NO 和自由基會被釋放出來，其中白細胞介素與腫瘤壞死因子，會刺激誘導型一氧化氮合成酶(iNOS)產生一氧化氮 NO，NO 會和 $O_2^{\cdot-}$ 作用，形成 $ONOO^-$ 、 $OH\cdot$ 和 $ONOO^-$ 攻擊細胞膜脂質導致細胞損傷^(99,100)，此時環氧化酶-2(COX-2)也會受到 cytokine 活化而產生前列腺素。而 λ -carrageenan 會活化巨噬細胞釋放出大量的超氧陰離子自由基($O_2^{\cdot-}$)，而 $O_2^{\cdot-}$ 會經由超氧歧化酵素(SOD)作用產生 H_2O_2 ， H_2O_2 會被 catalase 和 GSH-Px 轉化成氧和水⁽⁸⁶⁾。

然而自由基中之活性氧(reactive oxygen species,ROS)例如： $O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 、 OH^{\cdot} 、 $ONOO^-$ ，則是急性發炎反應中重要介質⁽¹⁰¹⁾，發炎反應產生後 1-6 小時間，發炎組織中的活性氧自由基則會明顯產生。研究報告指出注射 λ -carrageenan 三小時後，足蹠水腫反應會達到最大，而藥物的抗發炎作用在此時也會產生⁽¹⁰²⁾。因此，發炎反應產生時，若能降低活性氧的含量，即可對發炎反應產生抑制作用。本實驗於注射 λ -carrageenan 後 3 小時將老鼠犧牲，並取其肝組織，測定肝臟中抗氧化酵素的活性。結果顯示，三點金草甲醇萃物對肝臟中 SOD、GSH-Rd 活性均具增強作用。可能藉由提升肝臟中抗氧化酵素的活性，使清除自由基的能力提升，而具有抗發炎的作用。

本研究測定足蹠組織中丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量，而丙二醛為脂質過氧化物最終產物之一，組織中丙二醛含量愈高，表示脂質過氧化程度愈高。因此所測得之丙二醛(MDA)含量多寡，與體內脂質過氧化作用程度有關⁽¹⁰³⁾；腹腔注射 indomethacin 會降低小鼠足蹠組織中丙二醛(MDA)的濃度⁽¹⁰²⁾和且有清除 $O_2^{\cdot-}$ 、 OH^{\cdot} 、 $ONOO^-$ 和 NO 的能力⁽¹⁰⁴⁾，因此推論 indomethacin 能減少組織中丙二醛(MDA)形成，應該與清除過多的活性氧自由基有關。實驗結果顯示，口服給予三點金草甲醇萃物及腹腔注射 indomethacin (10mg/kg)，不僅會減少小鼠足蹠組織中丙二醛(MDA)的含量，同時也會增加肝臟中抗氧

化酵素的含量，因此推論小鼠足蹠組織中丙二醛(MDA)含量減少，可能是經由提升肝臟及血液中抗氧化酵素的含量有關。

本研究測定足蹠組織中 NO 含量，且 NO 能促使 COX 活性增加而合成 prostaglandin⁽¹⁰⁵⁾。實驗結果顯示，腹腔注射 indomethacin 會減少小鼠足蹠中 NO 的含量。而口服給予三點金草甲醇萃取物，也會減少小鼠足蹠 NO 的含量，因此三點金草甲醇萃取物會抑制發炎反應可能與抑制發炎組織中 NO 的生成有關。

由實驗小鼠的足蹠組織分析中，我們發現 λ -carrageenan 能使足蹠組織中的 IL-1 β 、TNF- α 、NO 及 MDA 濃度升高，而三點金草甲醇萃取物能抑制其濃度升高。上述結果，我們可推論，三點金草甲醇萃取物之抗發炎作用，可能是透過抑制 IL-1 β 、TNF- α 活性，進而降低 COX-2 及 iNOS 活性，因 iNOS 活性降低，使得發炎組織所產生的 NO 含量下降，減少脂質過氧化的發生，而減低發炎組織 MDA 中的產生，以達抗發炎效果，而 COX-2 活性的降低，促使前列腺素的合成降低，這也有助於抗發炎作用。

實驗結果發現，indomethacin 對於足蹠組織中 TNF- α 濃度的升高，具有抑制效果而與文獻報導一致^(106,107)，然而亦有文獻指出 indomethacin 對 TNF- α 無影響⁽¹⁰⁸⁾，更有與上述結果相反之論調^(109,110)。

在急性肝損傷的實驗中，我們發現三點草甲醇萃取物對於降低四

氯化碳所造成實驗小鼠血清中sGOT、sGPT的上升並不明顯。

在抗氧化活性之評價分析方面，對 DPPH 自由基清除能力、總抗氧化能力測定及還原力測定分析中，乙酸乙酯層在三種活性分析中顯示最佳活性，在總多酚類含量測定也是最高，進一步我們推測三點金草清除自由基能力，可能與酚類化合物具轉移電子或氫原子給自由基的還原能力。乙酸乙酯層及正丁醇層經 HCl-Mg 反應檢測呈現陽性反應，表明含有黃酮類化合物。正丁醇層以生物鹼沈澱反應呈陽性反應，表明含有生物鹼類化合物。

總黃酮類(flavonoids)含量測定分析中，三點金草甲醇萃取物約 22.5 mg rutin equivalent/g dry weight，若以重量百分比計算黃酮類成分的含量約為 2.25 %，與中藥中之甘草黃酮類成分含量相當⁽¹¹¹⁾。

在抗氧化儀器新應用利用 DPPH 自由基去除率與酵素免疫分析法 ELISA (Enzyme linked immuno sorbent assay)方式比較，三點金草甲醇萃取物在 0.4 mg/mL 時，分別相當於 77.6 及 70.7 μ g/mL 維生素 E，由抗氧化效價分析測定過程中可知，決定檢品分析用量，與評估檢品是否具抗氧化的優劣，檢品分析用量扮演重要的角色。清除率與檢品濃度呈正相關關係，在適當濃度範圍內測定的敏感度和準確度皆具再現性⁽¹¹²⁻¹¹⁵⁾。檢品本身所具有的顏色在測定時不得不考慮，檢品用量並非越大越好，若檢品具有顏色，其用量大到一定程度，檢品活性測

定將難以比較，本新開發方法檢品用量少，背景干擾很低是其優點。
建立此新的分析方法，可以用更簡單方便迅速、準確及經濟的方法，
用於大量篩選，來評估抗氧化物對於自由基的清除及抗氧化的效價，
希望在未來可以廣泛應用於分析評估食品、中草藥、化妝品及保健食品之抗氧化效價。



第六章 結 論

本論文對三點金草(*Desmodium triflorum* (L.)DC)探討藥理及抗氧化之研究，由實驗的結果更加確定三點金草是個具有抗氧化、鎮痛及抗發炎藥理活性的藥用植物，研究的發現包括：

一、指紋圖譜分析方面：

為三點金草甲醇萃取物建立HPLC指紋圖譜，並以三點金草所含有之黃酮類化合物apigenin、genisitin及抗發炎活性成分vitexin，所建立之三點金草黃酮類化合物HPLC指紋圖譜，可提供未來進行三點金草研究者比對之用。

二、鎮痛抗發炎方面：

研究證實三點金草之甲醇萃取物具有明顯之鎮痛及抗發炎藥理活性，並從三點金草之甲醇萃取物之研究，發現其抗發炎的機制可能是透過下列途徑：(1)提升肝臟中之抗氧化酵素；(2)抑制發炎介質TNF- α 之產生；(3)抑制發炎組織中NO生成；(4)降低發炎組織中脂質過氧化物MDA之產生，降低發炎反應。

三、保肝方面：

研究發現三點金草對四氯化碳引起之急性肝損傷，而使血清中之轉氨酶GOT及GPT不具明顯降低作用。

四、抗氧化方面：

三點金草具有不錯之清除自由基、抗氧化及還原能力，此作用應與其總多酚類含量有關，而在各分割層中以乙酸乙酯層清除自由基、抗氧化能力最好，此作用與其總多酚含量及還原力相關。

在DPPH去除率儀器新應用之方法建立，與一般DPPH自由基染色法或呈色法比較，本方法之優點能將清除自由基之清除率量化；再與目前常用免疫分析儀研究DPPH自由基清除率比較，本方法之分析樣品及試劑用量只有上述方法之數十分之一。

上述之研究發現三點金草具有鎮痛抗發炎作用，亦是天然的抗氧化劑及自由基清除劑，而整體研究證實民間的臨床應用及藥用價值，其鎮痛抗發與抗氧化作用之關係，主要透過體內抗氧化酵素活性提昇，及對體內生成的自由基具有清除能力。

第七章 參考文獻

1. 林宜信等：台灣藥用植物資源名錄，行政院衛生署中醫藥委員會，台北，2003；pp250-251。
2. 邱年永、張光雄：原色臺灣藥用植物圖鑑(2)，南天書局，台北，1991；p103。
3. Ghosal S, Mukherjee B. Indole-3-alkylamine bases of *Desmodium pulchellum*. *J Org Chem*. 1966; 31: 2284-2288.
4. Ghosal S, Srivastava RS, Banerjee PK, Dutta SK. Alkaloids of *Desmodium triflorum*. *Phytochemistry*. 1971; 10: 3312-3313.
5. Ghosal S, Banerjee SK, Bhattacharya SK, Sanyal AK. Chemical and pharmacological evaluation of *Desmodium pulchellum*. *Planta Med*. 1972; 21: 398-409.
6. Ghosal S, Mazumder UK, Mehta R. Indole bases of *Desmodium gyrans*. *Phytochemistry*. 1972; 11: 1863-1864.
7. Ghosal S, Srivastava RS. *Desmodium* alkaloids. V. phenethylamine, tetrahydroisoquinoline and indole alkaloids of *Desmodium tiliaefolium*. *Phytochemistry*. 1973; 12: 193-197.
8. Kawashik KC, Achinto S, Sitiesh CB, Joydeb KK. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Desmodium triflorum* DC. *J Biol Sci*.

2005; 5: 581-583.

9. 王曉良：應用分子藥理學，中國協和醫科大學出版社，北京，2005；
p296-297。
10. 廖容君：中草藥抗發炎作用之篩選暨半枝蓮與 Scutellarein 抗發炎
研究，中國醫藥大學藥學院中國藥學研究所博士論文，台中，
2004。
11. Costa D, Gomes A, Reis S. Hydrogen peroxide scavenging activity
by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Life Sci.* 2005; 76:
2841-2848.
12. Lu, TC, Ko YZ, Huang HW, Hung YC, Lin YC and Peng WH.
Analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous extract from
Glycine tomentella root in mice. *J Ethnopharmacol.* 2007; 113:
142-148.
13. 黃信維：倒地蜈蚣及其活性成分 betulin 鎮痛及抗發炎作用機轉之
研究，中國醫藥大學藥學院中國藥學研究所碩士論文，台中，
2006。
14. 毛紹春、李竹英、李聰：山螞蝗屬3種植物的抗氧化性能研究，
雲南大學學報自然科學版，2007；29：393-397。
15. 中國科學院中國植物志編輯委員會：中國植物志卷41，科學出版

- 社，北京，1995；pp14-47。
16. 臺灣植物誌第二版編輯委員會：臺灣植物誌(III)，臺灣植物誌第二版編輯委員會，台北，1998；pp268-269。
 17. 國家中醫藥管理局部(中華本草)編委會：中華本草(4)，上海科學技術出版社，上海，1999；pp445-456。
 18. 張肇元：台灣產波葉山螞蝗和排錢樹之生藥學研究，中國醫藥大學藥學院藥物化學研究所碩士論文，台中，2007。
 19. 林怡仁：台灣產山螞蝗屬植物之鑑定，中國醫藥大學藥學院藥學研究所碩士論文，台中，2007。
 20. 劉和義等：台灣維管束簡誌，行政院農業委員會，台北，1998；pp69-73。
 21. 全國中草藥匯編編寫組：全國中草藥匯編，人民衛生出版社，北京，1975；pp96，107，114。
 22. 行政院衛生署中醫藥委員會：台灣原住民藥用植物彙編:行政院衛生署中醫藥委員會，台北 2002；pp189-192。
 23. 田茂軍、郭孟璧、張舉成、李聰、梁袁華：小葉三點金揮發油化學成分的研究，雲南化工，2005；32：17-19。
 24. 毛紹春、李竹英、李聰：小葉三點金化學成分研究，中草藥，2007；38：1157-1159。

25. Adinarayana D, Syamasundar KV. Occurrence of a rare diholosylflavone, 2-*O*-glucosylvitexin in *Desmodium triflorum*. *Curr. Sci.* 1982; 51: 936-937.
26. Ogbeide ON, Parvez M. Identification of the flavonoids in Papilionaceae flowers using paper chromatography. *J Liq chromatogr.* 1992; 17: 2980-2996.
27. Smith TA. Tryptamine and Related Compounds in Plants. *Phytochemistry.* 1977; 16: 171-175.
28. Behari M, Varshney A. Sterols from *Desmodium* species. *Indian Drugs.* 1986; 23: 434-435.
29. Sreenivasan KK, Sankarasubramanian S, Arogya. Chemical Investigation of *Desmodium triflorum*. *J Health Sci.* 1984; 10: 156-158.
30. 丘麗琴：三點金草的成份研究，靜宜大學應用化學系碩士論文，台中，1995。
31. 薛閔鐘：台灣產山螞蝗屬及近源植物抗氧化活性及其神經細胞保護作用機轉之探討，中國醫藥大學藥學院中國藥學研究所碩士論文，台中，2006。
32. 盧易鮮：大葉山螞蝗粗抽物對於肺癌細胞的藥理活性研究，中國

醫藥大學醫學院醫學研究所碩士論文，台中，2008。

33. Govindarajan R, Rastogi S, Vijayakumar M, Shirwaikar A, Rawat AKS, Mehrotra S, Pushpangadan P. Studies on the antioxidant activities of *Desmodium gangeticum*. *Biol Pharm Bull.* 2003; 26:1424-1427.
34. Gino AK, Sachu P, Thomas V. Effect of aqueous extract of the *Desmodium gangeticum* DC root in the severity of myocardial infarction. *J Ethnopharmacol.* 2005 ; 97:457-461.
35. Anshu R, Rao CV, Ravishankar B, De S, Mehrotra S. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activity of the water decoction *Desmodium gangeticum*. *J Ethnopharmacol.* 2004 ; 95 : 259-263.
36. Govindarajan R, Vijayakumar M, Annie S, Ajay KS, Shanta M, Palpu P. Antioxidant activity of *Desmodium gangeticum* and its phenolics in arthritic rats. *Acta Pharm.* 2006; 56:489-496.
37. Govindarajan R, Vijayakumar M, Rao CV, Shirwaikar A, Kumar1S, Rawat AKS, Pushpangadan P. Anti-inflammatory and antioxidant activities of *Desmodium gangeticum* fractions in carrageenan-induced inflamed rats. *Phytother Res.* 2007; 21:

975-979.

38. Govindarajan R, Henry AA, Shanta P, Peter J, Peter JH. Effect of *Desmodium gangeticum* extract on blood glucose in rats and on insulin secretion in vitro. *Planta Med.* 2007; 73: 427-432.
39. Johi H, Parle M. Antiamnesic effect of *Desmodium gangeticum* in mice. *Yakugaku Zasshi* 2006; 126: 795-804.
40. Ghosal S, Bhattach SK. *Desmodium* alkaloids II Chemical and pharmacological evaluation of *D. gangeticum*. *Planta Med.* 1972; 22: 434-440.
41. 王峰、楊連春、劉敏、呂敏、程言亮、賈恒明：抗蛇毒中草藥拮抗 ET21 和 S6b 作用的初步研究，中國中藥雜誌，1997； 22: 620-622。
42. Ghosal S, Srivastava RS, Bhattacharya SK, Debnath PK. *Desmodium* alkaloids IV. chemical and pharmacological evaluation of *D. triflorum*. *Planta Med.* 1972; 23: 321-329.
43. Daniel LB, Manuela G, Samuel WC. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev.* 2001; 53: 597-562.
44. Ribeio RA, Vale ML, Thomazzi SM, Paschoalato AB, Poole S, Ferreira SH, Cunha FQ. Involvement of resident macrophages and

- mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *Eur J Clin Pharmacol*. 2000; 387: 111-118.
45. Taber RI, Greenhouse DD, Rendell JK, Irwin S. Agonist and antagonist interactions of opioids on acetic acid-induced abdominal stretching in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 1969; 169: 29-38.
46. Tjolsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*. 1992; 51: 5-17.
47. Vaccarino AL, Mark P, Liebeskind JC. Stress-induced analgesia prevents the development of the tonic, late phase of pain produced by subcutaneous formalin. *Brain Res*. 1992; 572: 250-252.
48. Lin YC, Cheng HY, Huang TH, Huang HW, Lee YH, Peng WH. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Torenia concolor* Lindley var. *formosana* Yamazaki and betulin in mice. *Am J Chin Med*. 2009; 37: 97-111.
49. 洪熒駿：車前草及其活性成分熊果酸鎮痛及抗發炎作用機轉之研究，中國醫藥大學藥學院中國藥學研究所碩士論文，台中，2005。
50. Di RM. Biological properties of carrageenan. *J Pharmacol*. 1971; 24: 89-102.
51. Di RM, Giroud JP, Willoughby DA. Studies of mediators of the acute

- inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J Phycol.* 1971; 104: 15-29.
52. Salvemini D, Wang ZQ, Wyatt PS, Bourdon DM, Marino MH, Manning PT, Currie MG. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *Br J Pharmacol.* 1996; 118: 829-838.
53. Chao J, Lee M, Amagaya S, Liao JW, Wu JB, Ho LK, Peng WH. Hepatoprotective effect of shidagonglao on acute liver injury induced by carbon tetrachloride. *Am J Chin Med.* 2009; 37: 1085-1097.
54. 張培成：黃酮化學，化學工業出版社，北京，2009；pp3、229、241。
55. Horowitz RM. Detection of flavanones by reduction with sodium borohydride. *J Org Chem.* 1957; 22, 1733-1734.
56. 凌關庭：抗氧化食品與健康，化學工業出版社，北京，2004；pp2,189-191。
57. Soler-Rivas C, Espin JC, Wichers HJ .An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. *Phytochem Analysis.* 2000; 11: 330-338.
58. 國家藥典委員會：中華人民共和國藥典，化學工業出版社，北京，

2005 ; pp6-7 。

59. 謝培山：中藥色譜指紋圖譜，人民衛生出版社，北京，2005；pp5-8 。
60. Prabhakar MC, Bano H, Kumar I, Shamsi MA, Khan SY. Pharmacological investigations on vitexin. *Planta Med.* 1981; 43: 396-403.
61. 彭成：中醫藥動物實驗方法學，人民衛生出版社，大陸，2004；p1118 。
62. Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, Lee L, Isakson P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91: 12013-12017.
63. Okuda K, Sakurada C, Takahashi M, Yamada T, Sakurada T. Characterization of nociceptive responses and spinal releases of nitric oxide metabolites and glutamate evoked by different concentrations of formalin in rats. *Pain.* 2001; 92: 107-115.
64. Gepdiremen A, Mshvildadze V, Süleyman H, Elias R. Acute and chronic anti-inflammatory effects of *Hedera colchica* in rats. *J Ethnopharmacol.* 2004; 94: 191-195.
65. Kakkar P, Das B, Viswanathan PN. A modified spectrophotometric

- assay of superoxide dismutase. *Indian J Biochem Biophys.* 1984; 21: 130-132.
66. Guntherberg H, Rost J. The true oxidized glutathione content of red blood cell obtained by new enzymic and paper chromatographic methods. *Anal Biochem.* 1966; 15: 205-210.
67. Anderson ME. Free Radicals: A Practical Approach. Oxford University Press, UK. 1996; pp213-226.
68. Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG. Selenium: biochemical roles as a component of glutathione peroxidase. *Science.* 1973; 179: 588-590.
69. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-254.
70. Gepdiremen A, Mshvildadze V, Süleyman H, Elias R. Acute and chronic anti-inflammatory effects of *Hedera colchica* in rats. *J Ethnopharmacol.* 2004; 94: 191-195.
71. Ataoğlu T, Ungör M, Serpek B, Haliloğlu S, Ataoğlu H, Ari H. Interleukin-1 beta and tumour necrosis factor-alpha levels in periapical exudates. *Int Endod J.* 2002; 35: 181-185.

72. Sherman MP, Aeberhard EE, Wong VZ, Griscavage JM, Ignarro LJ. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits induction of nitric oxide synthase activity in rat alveolar macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993; 191: 1301-1308.
73. Tatum VL, Changchit C, Chow CK. Measurement of malondialdehyde by high performance liquid chromatograph with fluorescence detection. *Lipids.* 1990; 25: 226-229.
74. 郭淑卿：梓芝發酵液對大鼠肝臟纖維化及胃腸功能之改善作用，中國醫藥學院中國藥學研究所碩士論文，台中，2000。
75. Chang HY, Peng WH, Sheu M-J, Huang GJ, Tseng MCh, Lai MT, Ho YL, Chang YS. Hepatoprotective and antioxidant effects of ethanol extract from *Phellinus merrillii* on carbon tetrachloride-induced liver damage. *Am J Chin Med.* 2007; 35, 793-804.
76. 黃世勳：臺灣產天胡荽屬植物之藥理研究。中國醫藥大學藥學院中國藥學研究所博士論文，台中，2007。
77. Hung SH, Shen KH, Wu CH, Liu CL, Shih YW. α -Mangostin suppresses PC-3 human prostate carcinoma cell metastasis by inhibiting matrix metalloproteinase-2/9 and urokinase-plasminogen

- expression through the JNK signaling pathway. *J Agric Food Chem.* 2009; 57: 1291-1298.
78. Kim KS, Lee S, Lee YS, Jung SH, Park Y, Shin KH, Kim BK. Anti-oxidant activities of the extracts from the herbs of *Artemisia apiacea*. *J Ethnopharmacol.* 2003; 85: 69-72.
79. Wu CR, Huang MY, Lin YT, Ju HY, Ching H. Antioxidant properties of Cortex Fraxini and its simple coumarins. *Food Chem.* 2007; 104:1464-1471.
80. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolourization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999; 26: 1231-1237.
81. Yen GC, Chen HY. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J Agric Food Chem.* 1995; 43: 27-32.
82. Huang DJ, Lin CD, Chen HJ, Lin YH. Antioxidant and antiproliferative activities of sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam 'Tainong 57') constituents. *Bot Bull Acad Sin.* 2004; 45: 179-186.
83. Dongmo AB, Nguenefack T, Lacaille-Dubois MA. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Acacia pennata* Wild

- (Mimosaceae). *J Ethnopharmacol*. 2005; 98: 201-206.
84. 徐淑云：藥理實驗方法學，人民衛生出版社，北京，1991；pp693-701。
85. Siegmund E, Cadmus R, Lu G. A method for evaluating both non-narcotic and narcotic analgesics. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1957; 95: 729-31.
86. 邱勇嘉：左手香及其活性成分香芹酚鎮痛及抗發炎作用機轉之研究。中國醫藥大學藥學院中國藥學研究所碩士論文，台中，2007。
87. Gilani AU, Janbaz KH. Studies on protective effect of *Cyperus scariosus* extract on acetaminophen and CCl₄-induced hepatotoxicity. *Gen Pharmacol* 1995; 26: 627-631.
88. Otani A, Hugli TE. Leukocyte chemotaxis : a new *in vivo* testing technique. *Inflammation*. 1977; 2: 67-82.
89. Winter CA, Risley EA, Nuss GW. Carrageenin-induced edema in hindpaw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc Soc Biol NY*. 1962; 111: 544-547.
90. Franzotti EM, Santos CV, Rodrigues HM, Mourao RH, Andrade MR, Antonioli AR. Anti-inflammatory, analgesic activity and acute toxicity of *Sida cordifolia* L. (Malva-branca). *J Ethnopharmacol*.

2000; 72: 273-277.

91. Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test : a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*. 1977; 4: 161-174.
92. Hunskar S, Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory drug. *FASEB J*. 1987; 89-96.
93. Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, Inoki R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain*. 1989; 38: 347-352.
94. Tjolsen A, Berge OG, Hunskar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*. 1992; 51: 5-17.
95. Okuda K, Sakurada C, Takahashi M, Yamada T, Sakurada T. Characterization of nociceptive responses and spinal releases of nitric oxide metabolites and glutamate evoked by different concentrations of formalin in rats. *Pain*. 2001; 92: 107-115.
96. Shannon HE, Lutz EA. Comparison of the peripheral and central effects of the opioid agonists loperamide and morphine in the formalin test in rats. *Neuropharmacology*. 2002; 42: 253-261.
97. Bilici D, Akpınar E, Kiziltunc A. Protective effect of melatonin in carrageenan-induced acute local inflammation. *Pharmacol Res*. 2002;

- 46: 133-139.
98. Vinegar R, Schreiber W. R. Biphasic development of carrageenan edema in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1969; 1: 96-166.
99. Costa D, Gomes A, Reis S. Hydrogen peroxide scavenging activity by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Life Sci.* 2005; 76: 2841-2848.
100. Cuzzocrea S, Zingarelli B, Hake P, Salzman AL, Szabo C. Anti-inflammatory effects of mercaptoethylguanidine, a combined inhibitor of nitric oxide synthase and peroxynitrite scavenger, in carrageenan-induced models of inflammation. *Free Radic Biol Med.* 1998; 24: 450-459.
101. Dudhgaonkar SP, Tandan SK, Bhat AS, Jadhav SH, Kumar D. Synergistic anti-inflammatory interaction between meloxicam and aminoguanidine hydrochloride in carrageenan-induced acute inflammation in rats. *Life Sci.* 2006; 78: 1044-1048.
102. Kirkova M, Kassabova T, Russanov E. In vivo effects of indomethacin I: Activity of antioxidant enzymes and lipid peroxidation. *Gen Pharmacol.* 1992; 23: 503-507.
103. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as

diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury.

Free Radic Biol Med. 1990; 9: 515-540.

104. Fernandes E, Costa D, Toste SA, Lima JL, Reis S. In vitro scavenging activity for reactive oxygen and nitrogen Species by nonsteroidal anti-inflammatory indole, pyrrole, and oxazole derivative drugs. *Free Radic Biol Med.* 2004; 37: 1895-1905.
105. Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci.* 1993; 90: 7240-7244.
106. Garbacki N, Tits M, Angenot L, Damas J. Inhibitory effects of proanthocyanidins from *Ribes nigrum* leaves on carrageenin acute inflammatory reactions induced in rats. *BMC Pharmacol.* 2004; 4: 25-33.
107. Vigil SVG, de Liz R, Medeiros YS, Fröde TS. Efficacy of tacrolimus in inhibiting inflammation caused by carrageenan in a murine model of air pouch. *Transpl Immunol.* 2008; 19: 25-29.
108. Romano M, Faggioni R, Sironi M, Sacco S, Echtenacher B, Di Santo E, Salmona M, Ghezzi P. Carrageenan-induced acute inflammation in the mouse air pouch synovial model. Role of tumour necrosis factor. *Mediators Inflamm.* 1997; 6: 32-38.

109. Chae BS, Shin TY, Kim DK, Eun JS, Leem JY, Yang JH. Prostaglandin E2-mediated dysregulation of proinflammatory cytokine production in pristane-induced lupus mice. *Arch Pharm Res.* 2008; 31: 503-510.
110. Fang JQ, Liu F, Shao XM, Wu YY. Effect of electroacupuncture on carrageenan-induced inflammation, IL-1 beta and TNF-alpha concentrations and their mRNA expressions in toe tissue in rats. *Zhen Ci Yan Jiu.* 2007; 32: 224-228.
111. 馮薇、王玫全、趙平然：栽培年限和採收期對甘草總皂苷、總黃酮含量的影響，*中藥材*，2008；31：p184-186。
112. 楊懷霞、馬慶一、許閩：葡萄籽原花青素的梯度分離及其抗氧化活性研究，*河南中醫學院學報*，2004；19：p14-15。
113. 池明宇、張澄波、鄭貴元、梅學文：分光光度法測中藥的自由基清除劑，*中國醫藥學報*，2003；18：p567-568。
114. Arts MJTJ, Dallinga JS, Voss HP, Haenen GRMM, Bast A. A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay. *Food Chem.* 2004; 88: 567-570.
115. Amarowicz R, Pegg RB, Moghaddam PR, Barl B, Weil JA. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected

plant species from the Canadian prairies. *Food Chem.* 2004; 84:
551-562.

