

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

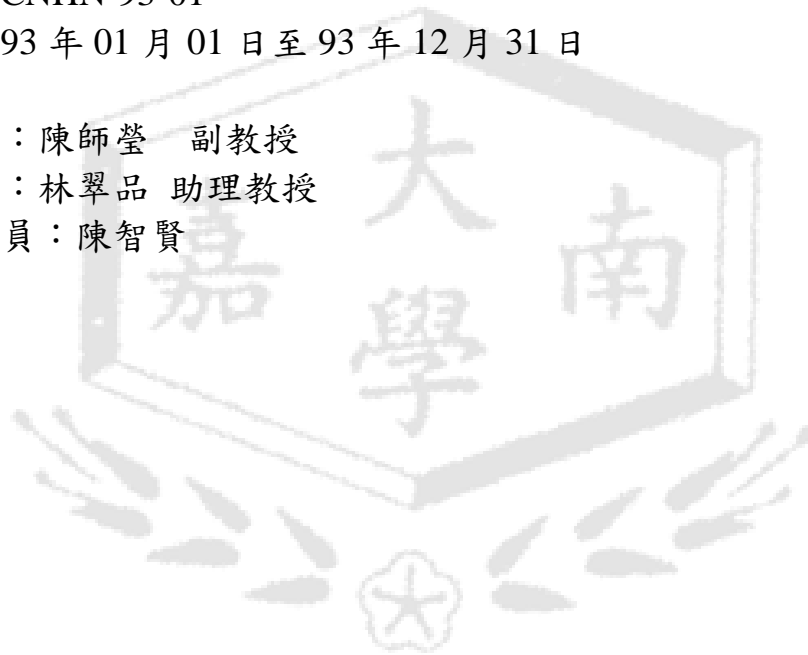
海巴戟天葉粗萃取物之食品機能性研究--
(一) 以豬肝微粒體為模式探討海巴戟天葉粗萃取物之脂質抗氧化性

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CNHN-93-01

執行期間：93年01月01日至93年12月31日

計畫主持人：陳師瑩 副教授
共同主持人：林翠品 助理教授
計畫參與人員：陳智賢



執行單位：嘉南藥理科技大學 保健營養系

中華民國 94 年 2 月 28 日

嘉南藥理科技大學補助專題研究計畫成果報告

海巴戟天葉粗萃取物之食品機能性研究--

(一) 以豬肝微粒體為模式探討海巴戟天葉粗萃取物之脂質抗氧化性

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CNHN-93-01

執行期間：93年01月01日至93年12月31日

主持人：陳師瑩 副教授 嘉南藥理科技大學保健營養系

共同主持人：林翠品 助理教授 嘉南藥理科技大學保健營養系

E-mail: shihying@mail.chna.edu.tw

一、中英文摘要

海巴戟天(*Morinda citrifolia*)，屬於茜草科(Rubiaceae)，其俗名為Noni，主產於夏威夷群島、大溪地與熱帶亞洲國家，依據民間傳統療法的資料顯示，海巴戟天的樹皮、莖、根、葉、果皆可調製，相傳有糖尿病、高血壓與癌症的預防及治療等醫療保健功效。本研究的目的是評估海巴戟天葉粗萃取物在保護生物細胞膜免於氧化性傷害之能力，本實驗結果顯示海巴戟天葉之絕對酒精粗萃取物對LYD三品系肉豬肝臟微粒體脂質過氧化具有顯著性的抑制能力，此結果可能與其清除氫氧自由基的能力為主有關，並與多酚類物質相關。

關鍵字：海巴戟天、脂質過氧化、微粒體。

Morinda citrifolia(Rubiaceae), commonly known as Noni, is a plant typically found in the Hawaiian, Tahitian and tropical Asia. The bark, stem, roots, leaves, and fruits have been used traditionally as a folk remedy for many diseases including diabetes, hypertension, and cancer. This study was to prove the leaves of Noni crude extracts in the protection ability of biological cell membrane which were attacked

by oxidative damage. The results indicated that the absolute ethanol extracts of Noni's leaves display significantly the inhibition ability of lipid peroxidation of microsomes from LYD pig liver. The scavenging mechanism of the absolute ethanol extracts of Noni's leaves might have relation with hydroxyl radical. The antioxidant components might be attributed to higher content of polyphenolic compounds.

Keywords: *Morinda citrifolia*, Noni, lipid peroxidation, microsomes.

二、緣由、實驗設計與目的

由自由基(Free radical)或活性氧(Reactive oxygen species)所造成的氧化性傷害已成為近年來食品學和生理學研究的重點。醫學上甚至認為許多疾病的發生(如糖尿病、高血壓與癌症等)與老化現象是因自由基或活性氧的產生所造成⁽¹⁾。在我們的飲食當中存在一些具有抗氧化特性的特殊成分，能防止或減緩自由基或活性氧所造成的破壞。*Morinda citrifolia*(Rubiaceae)即是其中之一，其俗名為Noni，中文名為海巴戟天⁽²⁾，適合生長在本島南部溫溼地帶，氣溫22

°C 以上，台灣的仲夏到季秋為盛產期，由於種植及採收容易，南部農民對於種植該類植物的興趣相當濃厚。如果海巴戟天經由改進調製或萃取的方法，其生物活性研究分析亦得到科學驗證，不僅材料極具本土性開發價值，適合台灣開發量產，也可以帶動南部生物科技產業的發展。近年來對於海巴戟天相關文獻有增加的趨勢，Hirazumi, 於1994⁽³⁾及1996⁽⁴⁾的研究顯示，飲用海巴戟天果實的汁可以促進小鼠免疫系統，並抑制Lewis lung carcinoma 的生長；Liu和Sang等人的研究顯示，海巴戟天葉與果實中含有抑制癌細胞發展的物質^(5,6)；Hirazumi於1999證實海巴戟天的果實中的多醣類物質 (Polysaccharide-rich substance) 具有免疫調節劑 (immunomodulator) 的生理功能⁽⁷⁾；而最近Sang等人⁽⁸⁾的研究發現由海巴戟天的葉純化出來的物質 (Flavonol glycosides) 具有抗氧化性；Zin等人於2002年從海巴戟天的葉、根及果實所得到的甲醇與乙酸乙酯萃取物也分析到抗氧化活性⁽⁹⁾。

本實驗室過去的研究顯示⁽¹⁰⁻¹⁶⁾：海巴戟天之葉粗萃取物的體外 (*in vitro*) 試驗，不論是80°C熱水、50% 與99.5% 酒精、乙酸乙酯及超臨界二氧化碳 (SF-CO₂) 的條件都含有抗氧化特性；然而，各粗萃取物的抗氧化特性卻又不盡相同，因此其抗氧化的作用機制可能也不一致，為了更進一步瞭解海巴戟天葉粗萃取物的抗氧化作用機轉，以及可能接近於體內的抗氧化效應，本實驗擬以豬肝微粒體為模式，優先探討各萃取物對脂質過氧化之保護性分析；由於豬肝取材容易又具有接近人體試驗的代表性，可以免除動物實驗與細胞培養的研究成本與所花費的人力與時間等優點，適合作為評估各類保健食品能否保護脂質過氧化的分析方法；同時，本實驗亦藉此實驗，建立以豬肝微粒體為模式，作為探討保健食品之脂質抗氧化性的標準研究程序。

三、實驗材料與方法

研究材料 *Morinda citrifolia* 係購自南部產地，其葉經烘乾後，由磨粉機輾磨裝瓶，並置入除濕器中冷藏備用。萃取方法使用下列四種 (1) 乙酸乙酯萃取 (2) 99.5%EtOH (3) 50%EtOH (4) 80°C 純水。

研究方法係依據 Germano (2002)⁽¹⁷⁾ 說明執行。

(1) 豬肝微粒體的分離

將3月齡重約30~40 Kg之LYD三品系肉豬解剖取出重約500-600 g之的肝臟，作為測試標的物，以冰冷含1.15% KCl之0.01M KH₂PO₄ 緩衝液 (pH 7.4, 4°C) 稍沖洗後，拭乾稱重。於4°C下，先以剪刀將其初步剪碎，再將剪碎之肝加入緩衝液20% (w/v) 於離心管中均質。將肝均質液20% (w/v)，於4°C、670 xg 離心10分鐘，將未打破之細胞及細胞核等大分子物質分離。取上層液，再於4°C、100,000xg 離心15分鐘，將粒腺體，溶素體等小分子物質分離。取上層液，於超高速離心(4°C、105,000 xg, 60分鐘)，得沉澱物微粒體。將所得沉澱微粒體加入1~2 mL的緩衝液使成微粒體懸浮液。將微粒體懸浮液置於90°C加熱1.5分鐘以去除反應時的酵素影響，並將所得的微粒體懸浮液進行蛋白質定量。

(2) 脂質過氧化作用之測定

總體積1ml反應液，包括測試樣品，微粒體懸浮液(0.5mg protein/mL)，FeSO₄ (終濃度為10 μM) 和 ascorbic acid (終濃度為0.1 mM) 以引發過氧化反應。在37°C水浴中振盪 (180 rpm) 反應一小時，將上述反應液取出0.5 ml，加入1 ml TCA-TBA-HCl 混合液 (15% w/v TCA, 0.375% w/v TBA, 0.25N HCl)，均勻混和後，加蓋，在沸水浴中加熱15分鐘。於冷水中冷卻至室溫，以8,000 xg，離心10分鐘，取上清液在波長532nm下測定其吸光值。

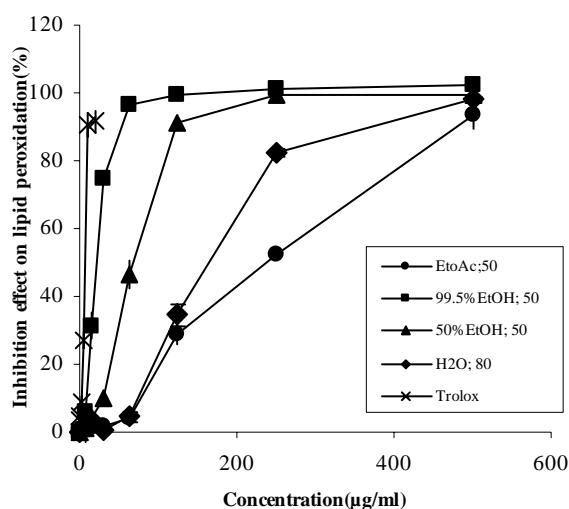
(3) 統計分析

本研究之分析項目皆進行三重複之測定，所得實驗數據以 SAS/PC 統計分析軟體進行分析，以 ANOVA 程序做變異數分析並以 Duncan's multiple range tests 做顯著性差異比較。

四、結果與討論

海巴戟天葉四種溶劑萃取物對於豬肝微粒體脂質過氧化的抑制情形如圖一所示，隨著樣品濃度的上升，抑制脂質過氧化的能力亦有隨之上升的趨勢，在樣品濃度為 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時，葉 99.5% 乙醇及 50% 乙醇萃取物的抑制效果均達到 90% 以上，而純水及乙酸乙酯萃取物則較差，分別為 34.7% 及 29.0%。因此顯示海巴戟天葉之乙醇萃取物具有較佳抑制脂質過氧化能力。若計算出各樣品抑制 50% 微粒體脂質過氧化所需的濃度 (EC_{50})，正標準品 Trolox 為 $6.81 \pm 0.54 \mu\text{g}/\text{mL}$ ，而葉 99.5% 乙醇及 50% 乙醇萃取物分別為 28.55 ± 6.83 及 $90.09 \pm 0.95 \mu\text{g}/\text{mL}$ ，亦即二者抑制微粒體脂質過氧化的 EC_{50} 值分別約為 Trolox 之 4 倍和 13 倍如表一所示。

依據過去的研究顯示⁽¹⁰⁻¹⁶⁾海巴戟天葉之乙醇粗萃取物在不同溶劑萃取下，存在各式抗氧化活性的能力，顯示海巴戟天的葉中存在極性與非極性的抗氧化成分；高螯合鐵能力成分傾向存在於葉中極性部分，清除 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 與 H_2O_2 的能力傾向存在於葉中非極性部分，清除氫氧自由基能力則多存在於葉中醇溶性部分；並且海巴戟天葉之乙醇粗萃取物具有較高的總酚類化合物及類黃酮含量，可能是參與其抗氧化活性之作用的主要成份。因此，推測海巴戟天葉能得到較高抗氧化活性可能與總酚類化合物及類黃酮之化學成份有關。



圖一、海巴戟天葉的不同溶劑萃取物對豬肝微粒體脂質過氧化之保護作用

Figure 1. Effect of crude Noni's leaves extracts by various solvent extractions on lipid peroxidation from pig liver microsome. All samples were tested at five to eight concentrations and each value was means of three replicate analysis.

表一、海巴戟天葉的不同溶劑萃取物抑制豬肝微粒體脂質過氧化之 EC_{50}

Table 1. EC_{50} of crude Noni's leaves extracts by various solvent extractions on lipid peroxidation from pig liver microsome.

Sample	EC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
Noni's leaves (EtOAc ; 50)	226.00 ± 13.93^e
Noni's leaves (99.5% EtOH ; 50)	28.55 ± 6.83^b
Noni's leaves (50% EtOH ; 50)	90.09 ± 0.95^c
Noni's leaves (H_2O ; 80)	164.77 ± 4.42^d
Trolox	6.81 ± 0.54^a

1. Each value is the mean \pm SD ($n=3$).

2. EC_{50} : the efficient concentration of crude Noni extracts caused 50% inhibition effects on lipid peroxidation.

五、計劃成果總結

1. 本實驗可以進一步瞭解海巴戟天葉粗萃取物的抗氧化作用機轉，以及可能接近於體內的抗氧化效應。
2. 本實驗建立以豬肝微粒體為模式，探討各萃取物對脂質過氧化之保護性分析，由於實驗與操作過程已趨於穩定，以及容易操作，可作為探討保健食品之脂質抗氧化性的標準研究程序。
3. 本實驗結果顯示海巴戟天葉之絕對酒精粗萃取物對 LYD 三品系肉豬肝臟微粒體脂質過氧化具有顯著性的抑制能力，此結果可能與其清除氫氧自由基的能力為主有關，並與多酚類物質相關。

六、參考文獻

1. Gutteridge J. M. C., and Halliwell B., Antioxidants in nutrition health and disease, 1th edition, Oxford: Oxford University Press, 1994.
2. Sang S., Cheng X., Zhu N., Stark RE., Badmaev V., Ghai G., Rosen RT. and Ho CT. (2001) Flavonol glycosides and novel iridoid glycoside from the leaves of *Morinda citrifolia*. J.Agric.& Food Chem. 49(9):4478-81.
3. Hirazumi A., Furusawa E., Chou SC. and Hokama Y., "Anticancer activity of *Morinda citrifolia* (noni) on intraperitoneally implanted Lewis lung carcinoma in syngeneic mice." Proceedings of the Western Pharmacology Society, 37: 145-6, 1994.
4. Hirazumi A., Furusawa E., Chou S. C. and Hokama Y., "Immuno-modulation contributes to the anticancer activity of *Morinda citrifolia* (noni) fruit juice." Proceedings of the Western Pharmacology Society, 39: 7-9, 1996.
5. Liu G., Bode A., Ma WY., Sang S., Ho CT. and Dong Z., "Two novel glycosides from the fruits of *Morinda citrifolia* (noni) inhibit AP-1 transactivation and cell transformation in the mouse epidermal JB6 cell line." Cancer Research, 61(15): 5749-56, 2001.
6. Sang S., He K., Liu G., Zhu N., Cheng X., Wang M., Zheng Q., Dong Z., Ghai G., Rosen RT. and Ho CT., "A new unusual iridoid with inhibition of activator protein-1 (AP-1) from the leaves of *Morinda citrifolia* L." Organic Letters, 3(9): 1307-9, 2001.
7. Hirazumi A. and Furusawa E., "An immunomodulatory polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (noni) with antitumour activity." Phytotherapy Research, 13(5): 380-7, 1999.
8. Sang S., Cheng X., Zhu N., Stark RE., Badmaev V., Ghai G., Rosen RT. and Ho CT., "Flavonol glycosides and novel iridoid glycoside from the leaves of *Morinda citrifolia*." J.Agric.& Food Chem., 49(9): 4478-81, 2001.
9. Zin ZM., Abdul-Hamid A., and Osman A., "Antioxidative activity of extracts from Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) root, fruit and leaf." Food Chemistry, 78: 227 -231, 2002. Chen, S. Y., Chen C. H., Lin T. P. and Yeh D. B. (2004) Comparison of antioxidative activity of various crude extracts from leaves, stems and fruits of *Morinda citrifolia*. Journal of food and drug analysis (in manuscript).
10. Chen, S. Y., Chen C. H., Wan Y. C., Chiang C. H., Chung Y. L. and Yeh D. B. (2003) Evaluation of antioxidative activity in Noni leaf extracts. Chia Nan Annual Bulletin 29:87-96.
11. Chen, S. Y., T. P. Lin, Chung Y. L. and Yeh D. B. (2004) Studies on the antioxidant activity of crude extracts from Noni leaves. 中華民國生藥學會、生藥資訊第 12 期 p114.
12. 鍾玉玲、林翠品、葉東柏、陳師瑩* (2004) 海巴戟天抗氧化活性的分析與篩選。中華民國營養學會第三十屆年會。
13. 陳師瑩 (2004) Antioxidants purification and antioxidative physiological properties of *Morinda citrifolia*. 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告。
14. 陳師瑩 (2003) 海巴戟天抗氧化活性的分析與篩選。行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告。
15. 陳師瑩、葉東柏 (2003) *Morinda citrifolia* 抗氧化活性鑑定。嘉南藥理科技大學補助專題研究計畫成果報告。
16. 鍾玉玲、王瑞顯、陳師瑩 (2004) Comparison of Antioxidative Activity of Crude Extracts from Leaves, Stems and Fruits of *Morinda citrifolia* (Noni). Department of Biotechnology Chia-Nan University of Pharmacy and Science. Thesis for the Degree of Master.
17. Germano, M. P., et al., "Evaluation of Extracts and Isolated Fraction from *Capparis spinosa* L. Buds as an Antioxidant Source". J. Agric. Food Chem., 50(5): 1168-1171, 2002.