

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

海巴戟天抗氧化活性的分析與篩選

計畫類別：整合型計畫

計畫編號：NSC91-2626-B-041-003-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：嘉南藥理科技大學保健營養學系

計畫主持人：陳師瑩

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中 華 民 國 92 年 10 月 28 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

海巴戟天抗氧化活性的分析與篩選

Antioxidative activity evaluation and extraction of *Morinda citrifolia*

計畫編號：NSC-91-2626-B041-003

執行期間：91年8月1日至92年7月31日

計畫主持人：陳師瑩 助理教授 嘉南藥理科技大學保健營養系

計畫參與人員：鍾玉玲¹、江靜欣² 嘉南藥理科技大學生物技術所¹與食品科技系²

一、中、英文摘要

Morinda citrifolia (Rubiaceae) 其俗名為 Noni。本實驗以 80 熱水、50 % 與 99.5% 酒精、乙酸乙酯及超臨界二氧化碳 (SFE-CO₂) 等萃取條件，對海巴戟天之葉、青莖、褐莖及果實進行成分萃取，共得 32 種萃取物；依 Trolox 當量的抗氧化能力、清除 DPPH 自由基能力、清除超氧陰離子能力、清除氫氧自由基能力、清除過氧化氫能力以及螯合鐵能力等方法，進行抗氧化成分的分析與篩選，結果顯示海巴戟天的葉在不同溶劑萃取下，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；其中螯合鐵能力傾向存在於葉中極性部分，清除 O₂⁻ 與 H₂O₂ 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；而褐莖萃取物，以 SFE-CO₂ 萃取的方式所得之抗氧化活性較高，顯示褐莖中抗氧化物質多屬於非極性；然而不論是何種萃取條件，海巴戟天之果實與青莖萃取物的抗氧化活性普遍較差。

關鍵詞：海巴戟天，諾麗，抗氧化活性，超臨界二氧化碳萃取。

Abstract

Morinda citrifolia (Rubiaceae) commonly known as Noni. This study was conducted to evaluate the antioxidative activity of extracts from different parts of Noni, including leaf, fruit and stem. 80 °C water, 50 % ethanol, 99.5% ethanol, ethyl acetate and supercritical carbon dioxide extraction (SFE-CO₂) were used as solvents and antioxidative effects measured by

a Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC), the scavenging ability of reactive oxygen species (superoxide radical, hydroxyl radical and hydrogen peroxides) and the chelating activity on ferrous ions. The results suggested that several compounds contribute to antioxidative activity of Noni leaf. Activity in the leaves may be due to both polar and non-polar compounds. The polar part of Noni leaf extracts exhibited higher the chelating activity on ferrous ions. On the other hand, the nonpolar components of Noni leaf extracts showed the scavenging ability of superoxide radical and hydrogen peroxides, and the ethanol extract of Noni leaf had the scavenging ability of hydroxyl radical. However, the SFE-CO₂ extract of Noni brown stem exhibited high antioxidative activity in non-polar part, and Noni fruit and green stem extracts showed not the best activities.

Keywords: *Morinda citrifolia*, Noni, antioxidative activity, supercritical carbon dioxide extraction

二、前言

Morinda citrifolia (Rubiaceae) 其俗名為 Noni。中文名為海巴戟天，台灣文獻則稱檫樹、水冬瓜、紅珠樹，其他別名還包括蘿梨、四季果、精力果、長壽果等，印度稱為桑椹故又名印度桑椹 (Indian mulberry)。盛產於夏威夷群島、南太平洋群島及法屬玻里尼西亞大溪地、印度、薩摩亞群島。植物型態為常綠小喬木，樹幹上方枝條具有四稜角，全株平滑無毛；葉具短柄、對生，形狀為橢圓形或長橢圓形，兩端均銳；果實為聚合果，

由漿質、擴大而合生的花萼組成，形狀為球形、長瓜形或三稜形，果實內子核多達 300 多個不等⁽¹⁾。為熱帶植物，適合生長在本島南部溫溼地帶，氣溫 22 以上，四季開花結果，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亦相當濃厚，目前有七個品種已供應國內外廠商及餐飲業使用。如果海巴戟天經由改進調製或萃取的方法，其生理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，適合台灣種植與開發量產，也可以帶動南部生物科技產業的發展。

三、研究目的與文獻探討

依據民間傳統療法的資料顯示，海巴戟天的花、果、葉、莖、樹皮、根皆可調製，可分開或合併飲用，各部位並具有百種以上醫療保健功效，當中包括糖尿病、高血壓與癌症的預防及治療效果⁽¹⁾。事實上，食用或飲用海巴戟天的相關產品已在台灣掀起一股風潮，然而對於支持海巴戟天之民間傳統療法的科學證據或有關生物活性的研究文獻，卻顯得薄弱與不足，這種現象對於消費者來說相當沒有保障，值得有關單位重視。Hirazumi, A., 1994,1996^(2,3)的研究顯示，飲用海巴戟天果實的果汁可以促進小鼠免疫系統，並抑制 Lewis lung carcinoma 的生長，Liu, G. 和 Sang, S.等的研究顯示，海巴戟天葉與果實中含有抑制癌細胞發展的物質^(4,5)，Hirazumi, A., 1999⁽⁶⁾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 (immunomodulator) 的生理功能；而最近 Sang, S., 2001⁽⁷⁾ 研究發現由海巴戟天的葉純化出來的物質 (Flavonol glycosides and iridoid glycoside) 具有抗氧化性；Zin, ZM., 2002⁽⁸⁾ 研究顯示以甲醇萃取的根，抗氧化活性較高，若再利用分液漏斗，由乙酸乙酯-水-甲醇進行葉、果實與根的液液相分劃，其乙酸乙酯部分的中的成分皆有抗氧化活性，顯示抗氧化物質的多樣化。

本實驗的研究方向乃基於海巴戟天的抗氧化特質，擬以熱水、酒精、乙酸乙酯及超臨界二氧化碳萃取等四種方法，製備及萃取海巴戟天之莖、葉和果實，評估不同樣品來源與萃取方式對海巴戟天中抗氧化物質的

影響，並選定萃取抗氧化能力較佳的原料與萃取條件，進行製備程序研究與抗氧化機制的研究。

四、研究方法

(一) 海巴戟天之莖、葉和果實的製備與萃取：

研究材料海巴戟天 (台灣 2 號) 係購自南部農產地，其莖 (青莖與褐莖) 葉與果實經烘乾後，由磨粉機碾磨 (mesh 12) 裝瓶，並置入除濕器中冷藏備用。利用超臨界二氧化碳 (Supercritical Fluid Extraction ; SFE-CO₂) 及乙酸乙酯能有效萃取樣品油溶性物質的能力，與熱水對水溶性物質及酒精對醇溶性物質萃取能力佳的特性等四種方法，進行篩選及萃取海巴戟天之莖、葉和果實內抗氧化性物質。超臨界二氧化碳萃取 (Zaar Tech., Inc), 考慮到高壓萃取方式會在大量製備時，提高生產成本，不符開發價值，故僅採用以下四種不同的壓力及溫度條件：(I) 1500 psi, 35 ；(II) 1500 psi, 50 ；(III) 3500 psi, 35 ；(IV) 3500 psi, 50 ，藉以改變萃取物質對二氧化碳的溶解度與萃取效率，萃取時間定為 5 小時，CO₂ 流速為 3 mL/min，萃取樣品每次約重 12 公克⁽⁹⁾。另一方面，取相同重量的樣品利用熱水 (80) 50% 酒精、95% 酒精及乙酸乙酯來進行萃取海巴戟天之莖、葉和果實的萃取。綜合上述方法應可得 32 項不同來源與萃取方式的海巴戟天樣品，將作為比較與評估在上述何種條件下可得最高抗氧化能力。

(二) 進行活體外 (*in vitro*) 抗氧化機能性評估與篩選⁽¹⁰⁻¹⁴⁾。

1. Trolox 當量的總抗氧化能力測定 (TEAC)
2. 清除自由基、活性氧及螯合鐵能力之測定：
清除 α . α -diphenyl- β -picrylhydrazyl 自由基 (DPPH[•])、氫氧自由基 (\cdot OH)、超氧陰離子 (O₂^{•-})、過氧化氫 (H₂O₂) 及螯合金屬離子能力；可作為海巴戟天中抗氧化物質之抗氧化機制比較。
3. 初步評估海巴戟天萃取物對經由氧

化物所造成之生物體內巨分子 (microsomes 與 DNA) 傷害之保護作用。

五、結果與討論

1. 比較 TEAC 法分析抗氧化活性的結果，顯示以 99.5% EtOH、 50% EtOH 及 80 純水萃取的葉，以及 SFE-CO₂ 3500 psi, 35 與 1500 psi, 50 所萃取的褐莖，具有最佳的抗氧化能力。
2. 以清除 DPPH 自由基的能力作比較，結果顯示以 99.5% EtOH、 50% EtOH 及 SFE-CO₂ 3500 psi, 50 萃取的葉， SFE-CO₂ 3500 psi, 35 與 1500 psi, 50 所萃取的褐莖，以及 1500 psi, 50 所萃取的青莖，具有最佳的抗氧化能力。
3. 以乙酸乙酯所萃取的葉具有最佳的清除 O₂⁻ 的能力。
4. 以 99.5% EtOH 萃取的葉與青莖，以及 SFE-CO₂ 3500 psi, 35 與 50 所萃取的褐莖，具有最佳的清除氫氧自由基的能力。
5. 以 SFE-CO₂ 1500 psi, 35 與 50 萃取的葉，以及 SFE-CO₂ 1500 psi, 35 所萃取的果實，具有最佳的清除 H₂O₂ 的能力。
6. 以 50% EtOH 與 80 純水所萃取的葉、莖，螯合鐵能力顯著最高。
7. 海巴戟天的葉在不同溶劑萃取下，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；螯合鐵能力傾向存在於葉中極性部分，清除 O₂⁻ 與 H₂O₂ 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。
8. 海巴戟天之褐莖萃取物，以 SFE-CO₂ 萃取的方式所得之抗氧化活性較高，顯示褐莖中抗氧化物質多屬於非極性。
9. 不論是何種萃取條件，海巴戟天之果實與青莖萃取物的抗氧化活性普遍較差。
10. 綜合來說，海巴戟天的葉中萃取物能偵測出較多樣的抗氧化特性與較高的活性，值得作為進一步純化抗氧化物質的材料來源。
11. 以現有實驗數據，針對抗氧化活性較高以及抗氧化物質較具多樣性的新鮮採集

海巴戟天之葉⁽¹⁵⁾，進行萃取物對經由氧化物所造成之生物體內巨分子 (microsomes 與 DNA) 傷害之保護作用評估，初步結果顯示：80 純水萃取的葉可以保護 microsomes 與 DNA 的氧化性傷害 (資料未顯示)，但由於尚未求出萃取物質對經由氧化物所造成之生物體內巨分子破壞的有效抑制氧化性傷害濃度 (ID₅₀)，故目前無法了解其生理意義與食用價值。

六、參考文獻

1. Wong MY, West BJ, Jensen CJ, Nowicki D, Chen S, Palu AK and Anderson G. (2002) *Morinda citrifolia* (Noni): A literature review and recent advances in Noni research. *Acta Pharmacologica Sinica*. 23(12):1127-1141.
2. Hirazumi A, Furusawa E, Chou SC and Hokama Y. (1994) Anticancer activity of *Morinda citrifolia* (noni) on intraperitoneally implanted Lewis lung carcinoma in syngeneic mice. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*. 37:145-6.
3. Hirazumi A, Furusawa E, Chou SC and Hokama Y. (1996) Immunomodulation contributes to the anticancer activity of *morinda citrifolia* (noni) fruit juice. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*. 39:7-9.
4. Liu G, Bode A, Ma WY, Sang S, Ho CT and Dong Z. (2001) 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.
5. Sang S, He K, Liu G, Zhu N, Cheng X, Wang M, Zheng Q, Dong Z, Ghai G, Rosen RT and Ho CT. (2001) 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.
6. Hirazumi A and Furusawa E. (1999) An immunomodulatory polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (noni) with antitumour activity. *Phytotherapy Research*. 13(5):380-7.
7. 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.
8. Zin ZM, Abdul-Hamid A and Osman A. (2002) Antioxidative activity of extracts from Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) root, fruit and leaf. *Food Chemistry* 78: 227 –231.
9. 潘懷宗、劉晉魁、周良穎、謝秉甫、李沐勳 (1994) 利用超臨界二氧化碳萃取肉桂中精油成分：並與水蒸氣蒸餾法進行比較。 *J. Chin. Med.* 5(3):199-207.
10. Halliwell B, Gutteridge JMC and Aruoma OI. (1987) The deoxyribose method: a simple 'test tube' assay for determination of rate constants for reaction of hydroxyl radicals. *Analytical Biochemistry* 165:215.
11. Aruoma OI and Halliwell B. (1988) The iron-binding and hydroxyl radical scavenging action of anti-inflammatory drugs. *Xenobiotica* 18:459-470.
12. Hu M.-L., Frankel, E. N., Leibovitz, B. E. and Tappel A. L. (1989) Effect of dietary lipids and vitamin E in vitro lipid peroxidation in rat liver and kidney homogenates. *J. Nutr.* 119:1574-1582.
13. Hu M.L. and Tappel A. L. (1992) Glutathione and antioxidants protect microsomes against lipid peroxidation and enzyme inactivation. *Lipids* 27: 42-45.
14. McConkey, D. J., Haatzell, P., Nicotera, P., and Orrinius, S. (1989) Calcium-activated DNA fragmentation kills immature thymocytes. *FASEB J.* 3:1843-1849.
15. Chen, S.Y., Chen, C.H., Wang Y.C., Chiang, C.H., Chung, Y.L. and Yeh, D.B. (2003) Evaluation in antioxidative activity of Noni leaf extracts. *Chia Nan Annual Bulletin* Vol. 29 (in press)

七、計畫成果自評

1. 本研究因受限於研究結果的影響，部分更動研究策略，故與原計畫相符程度為 85%，但已達成本研究之階段性重點預期目標。
2. 本實驗的研究成果可知海巴戟天各部分的抗氧化活性成分的分布與特質，有利於發展大量製備有效成分的方法，並作為該產品進一步開發或加工產出的參考條件。
3. 可獲得海巴戟天製成品之活體外 (*in vitro*) 抗氧化活性的科學實證，可對海巴戟天之抗氧化作用機制與活體內 (*in vivo*) 消化、吸收後代謝分佈之學理研究提供重要的依據。
4. 由於材料能由台灣直接供應，所以海巴戟天若能開發成功，將可帶動南部生物科技相關產業，並提供消費者相關飲食資訊。
5. 本校正積極建立保健食品研發中心，本實驗將可有效利用學校相關設備與資源，與本校的發展與研究特色相結合。
6. 攝食海巴戟天葉之 80 純水萃取物在抵抗氧化性壓力上應有一定的保護作用；然而海巴戟天實際的抗氧化效應與機轉則有待進一步的實驗證明。

Results

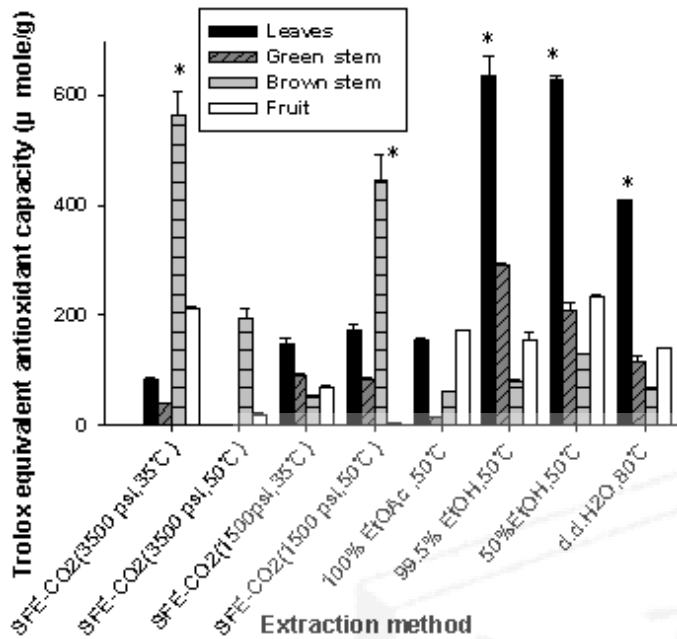


Fig1. Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) of extracts from different morphological parts of *Morinda citrifolia*. Each value is the mean±SD (n=3).

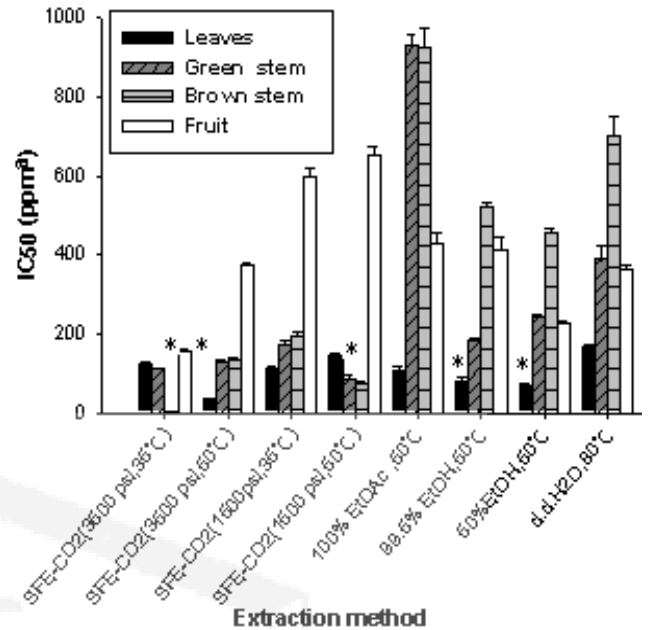


Fig2. Scavenging effect on DPPH radical of extracts from different morphological parts of *Morinda citrifolia*. Each value is the mean±SD (n=3).

^a IC₅₀, inhibitory concentration caused 50% inhibition of the free radical.

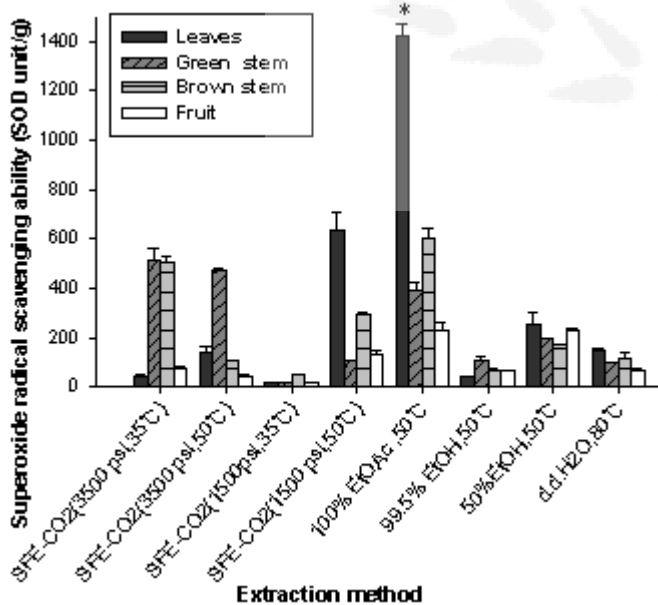


Fig3. Superoxide radical scavenging ability of extracts from different morphological parts of *Morinda citrifolia*. Each value is the mean±SD (n=3).

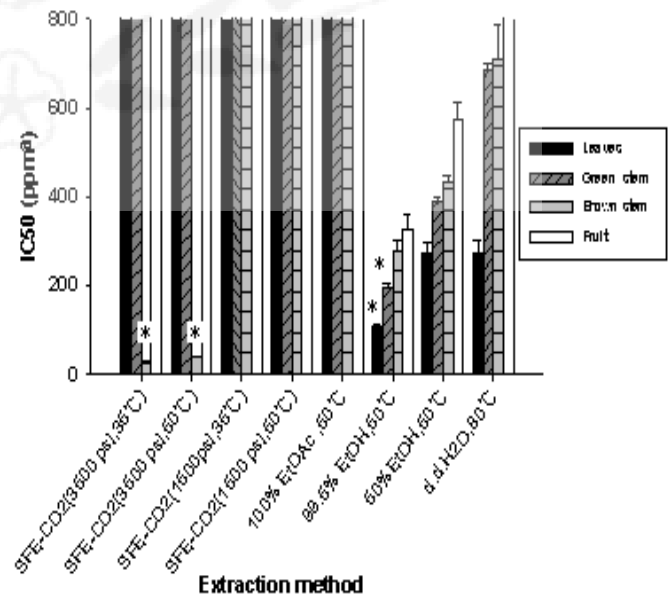


Fig4. Scavenging effect on hydroxyl radical of extracts from different morphological parts of *Morinda citrifolia*.

Each value is the mean±SD (n=3).

^a IC₅₀, inhibitory concentration caused 50% inhibition of inhibition of the free radical.

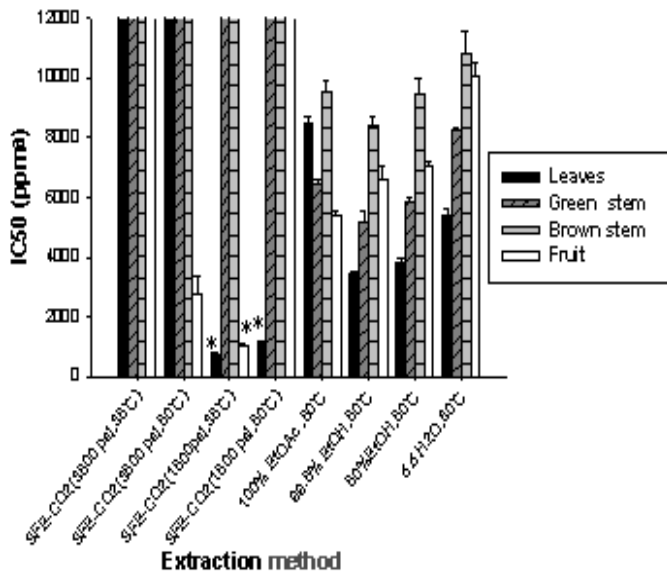


Fig5. Scavenging effect on hydrogen peroxides of extracts from different morphological parts of *Morinda citrifolia*.

Each value is the mean±SD (n=3).

^a IC₅₀, inhibitory concentration caused 50% inhibition of hydrogen peroxide.

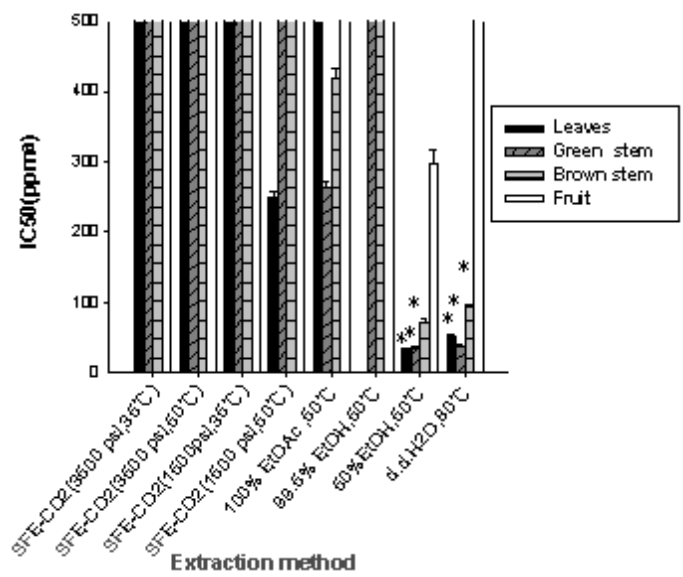
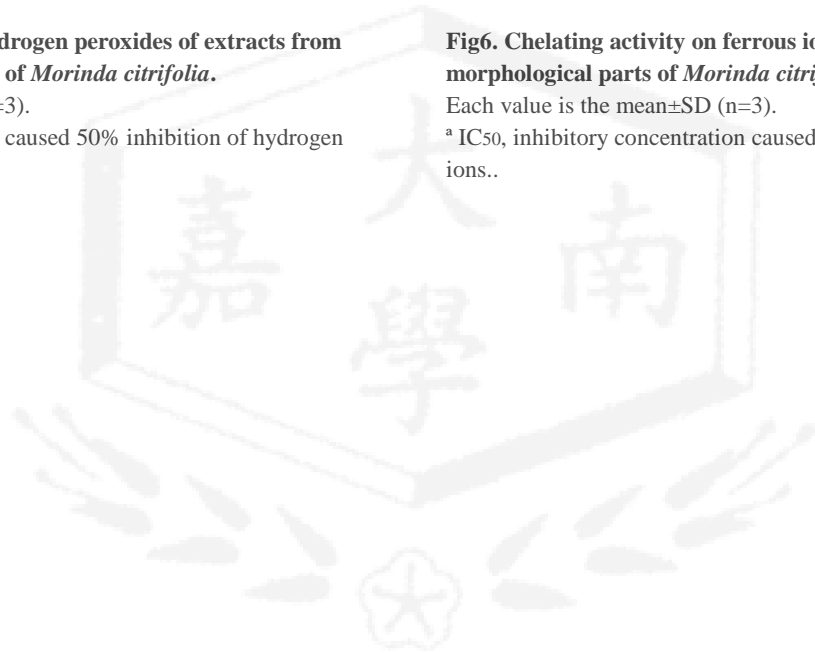


Fig6. Chelating activity on ferrous ions of extracts from different morphological parts of *Morinda citrifolia*.

Each value is the mean±SD (n=3).

^a IC₅₀, inhibitory concentration caused 50% inhibition of the ferrous ions..



可供推廣之研發成果資料表

可申請專利

可技術移轉

日期：92 年 10 月 27 日

國科會補助計畫	計畫名稱：海巴戟天抗氧化活性的分析與篩選 計畫主持人：陳師瑩 計畫編號：NSC-91-2626-B041-003 學門領域：食品
技術/創作名稱	海巴戟天抗氧化活性的分析與篩選
發明人/創作人	陳師瑩
技術說明	<p>本實驗以 80 熱水、50 % 與 99.5%酒精、乙酸乙酯及超臨界二氧化碳 (SFE-CO₂) 等萃取條件，對海巴戟天之葉、青莖、褐莖及果實進行成分萃取，共得 32 種萃取物；結果顯示海巴戟天的葉在不同溶劑萃取下，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；其中螯合鐵能力傾向存在於葉中極性部分，清除 O₂⁻ 與 H₂O₂ 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；而褐莖萃取物，以 SFE-CO₂ 萃取的方式所得之抗氧化活性較高，顯示褐莖中抗氧化物質多屬於非極性；然而不論是何種萃取條件，海巴戟天之果實與青莖萃取物的抗氧化活性普遍較差。</p> <p>This study was conducted to evaluate the antioxidative activity of extracts from different parts of Noni, including leaf, fruit and stem. 80 water, 50 % ethanol, 99.5% ethanol, ethyl acetate and supercritical carbon dioxide extraction (SFE-CO₂) were used as solvents. The results suggested that several compounds contribute to antioxidative activity of Noni leaf. Activity in the leaves may be due to both polar and non-polar compounds. The polar part of Noni leaf extracts exhibited higher the chelating activity on ferrous ions. On the other hand, the nonpolar components of Noni leaf extracts showed the scavenging ability of superoxide radical and hydrogen peroxides, and the ethanol extract of Noni leaf had the scavenging ability of hydroxyl radical. However, the SFE-CO₂ extract of Noni brown stem exhibited high antioxidative activity in non-polar part, and Noni fruit and green stem extracts showed not the best activities.</p>
可利用之產業及可開發之產品	依據海巴戟天之葉、青莖、褐莖及果實共 32 種萃取物特有的抗氧化活性成分為訴求，開發成具有機能性的食品。由於材料能由台灣直接供應，所以海巴戟天若能開發成功，將可帶動南部生物科技相關產業，並提供消費者相關飲食資訊。
技術特點	使用不同的萃取條件，如：80 熱水、50 % 與 99.5%酒精、乙酸乙酯及超臨界二氧化碳 (SFE-CO ₂) 等。並以 Trolox 當量的抗氧化能力、清除 DPPH 自由基能力、清除超氧陰離子能力、清除氫氧自由基能力、清除過氧化氫能力以及螯合鐵能力等方法詳細評估抗氧化活性。
推廣及運用的價值	<ol style="list-style-type: none"> 1. 本實驗的研究成果可知海巴戟天各部分的抗氧化活性成分的分布與特質，有利於發展大量製備有效成分的方法，並作為該產品進一步開發或加工產出的參考條件。 2. 可獲得海巴戟天製成品之活體外 (in vitro) 抗氧化活性的科學實證，可對海巴戟天之抗氧化作用機制與活體內 (in vivo) 消化、吸收後代謝分佈之學理研究提供重要的依據。

1. 每項研發成果請填寫一式二份，一份隨成果報告送繳本會，一份送 貴單位研發成果推廣單位 (如技術移轉中心)。
2. 本項研發成果若尚未申請專利，請勿揭露可申請專利之主要內容。

3.本表若不敷使用，請自行影印使用。

