

嘉南藥理大學

106 年度教師研究補助計畫成果報告

子計畫二：南非葉保健產品開發



計畫執行期間：106 年 3 月 29 日至 12 月 31 日止

計畫主持人：戴三堡

計畫參與人：王祺媛

執行單位：生活應用與保健系

(一) 摘要

南非葉學名扁桃斑鳩菊(*Vernonia amygdalina* Del.)，屬菊科喬木植物，原產於非洲和南美洲，在非洲是傳統民俗的保肝用草藥。南非葉對環境需求低，容易種植，在台灣中南部野外隨處可見，取得相當容易。南非葉在非洲當地被拿來當做保健茶飲，被認為可以降血壓、抑制癌症。

本試驗將南非葉以 40°C、60°C、80°C 烘乾 24 小時，萃取，分別得到 VA40、VA60、VA80 萃取物，由結果得知，VA40 抑制自由基效果較佳，是由於 VA40 樣品的總多酚類化合物與總黃酮類化合物含量較高，但是 VA40、VA60、VA80 皆具有抑制細胞黑色素合成之活性，我們認為 VA40、VA60、VA80 並非都是相同作用路徑，VA80 雖然總多酚類化合物與總黃酮類化合物含量較低，但在較高的溫度乾燥下，似乎產生其他抗氧化成分，不但可以有效減少細胞內氧化壓力，也可以抑制 UVA 誘發細胞內 GSH 含量增加，並進一步減少細胞黑色素。

(二)介紹

近年來的研究顯示，自由基（free radicals）、活性氧（reactive oxygen species）和脂質過氧化作用（lipid peroxidation）與人類疾病的發展，包括老化、癌症和心血管疾病等有密切關係。人體代謝過程中會產生自由基與活性氧。在正常狀況下，身體之抗氧化系統會與自由基相抗衡，以維持正常之生理狀況。當平衡遭到破壞時，活性氧與自由基產生過量時，就會攻擊細胞組織、細胞膜及基因核苷酸，而造成細胞變異、傷害，且隨著年齡增加，體內防禦系統也跟著降低，因而出現疾病或衰老現象。而諸多的研究證實，各類植物中存在多種型式的天然抗氧化物質^(1,2,3,4)，可以有效降低氧化傷害，減少疾病發生機率。

南非葉為扁桃斑鳩菊 (*Vernonia amygdalina* Del.)的葉片，也稱為苦葉，神奇葉，尖尾鳳。南非葉原產於非洲，在當地被視為蔬菜的一種，生長地區廣泛分佈於撒哈拉沙漠以南的赤道非洲地區，南非葉耐旱，不過更適合在潮濕的環境中生長。南非葉可生長高達2-5米，直徑達40厘米，樹皮呈灰褐色，樹葉呈橢圓形，一般葉長4-10厘米，寬1.2-4厘米，葉緣呈疏鋸齒狀。南非葉化學成分的相關研究相當多，目前知道其主要活性成分有皂苷、生物鹼、萜類、類固醇、香豆素類、黃酮類、酚酸類、木酚素、氧雜蒽酮、蒽醌類和倍半萜等⁽⁵⁾。之前

研究已從南非葉分離出5大類共32個化合物，分別是1個甾醇類化合物、3個黃酮類化合物、6個倍半萜烯內酯類化合物、10個甾體皂苷類化合物和12個脂肪酸類化合物⁽⁵⁾。南非葉已經被證實具備不同生理保健功能，包括減少血糖上升，調整血脂肪，減少肝腎的損傷，也具備減少癌細胞生長活性等。

由於南非葉的保健作用，受到消費者喜愛，因此常被選用做為保健偏方的材料，但是目前市面上有關南非葉的相關保健產品非常少見，造成消費者使用不便。因此本研究將進行不同溫度對南非葉進行乾燥24小時，並分析南非葉在人類色素細胞的生物活性與南非葉抗氧化成分分析。進而開發南非葉相關保健產品，作為消費者養生保健之應用，並進而增加產學合作效能。

(三)結果與討論

a.南非葉水萃物 VA40、VA60、VA80 製備

南非葉以 40°C、60°C、80°C 烘乾 24 小時，再以粉碎機粉碎，分別秤粉末樣品 50g，倒入 1000ml 之燒杯中，加入 500ml 去離子水，熱水煮沸 10 分鐘處理，初步過濾後，以 10000rpm 離心 30 分鐘，所得濾渣再以同樣條件萃取。收集二次之濾液混和，進行真空減壓濃縮，再冷凍乾燥得到南非葉水萃物，磨粉備用。樣本分別命名為 VA40、VA60、VA80。

b.南非葉水萃物抗氧化總多酚類含量測定

取不同濃度 VA40、VA60、VA80 之樣品濃度，以 Folin-Ciocalteau reagent 溶液混合均勻於室溫下反應 30 分鐘，以 gallic acid 作為標準曲線的迴歸方程式中，計算 VA40、VA60、VA80 樣品總多酚類化合物含量分別為 122.1mg/g、86.6mg/g、74.6mg/g。由上述結果可知，樣品乾燥溫度會影響水萃物總多酚類化合物含量，乾燥溫度越高，總多酚類化合物損失越大，造成水萃物總多酚類化合物含量減少。

c.南非葉水萃物抗氧化總黃酮類含量測定

取不同濃度 VA40、VA60、VA80 之樣品濃度，以 2-aminoethenyl biphenylborate 和樣本反應呈色，以 rutin 作為標準曲線的迴歸方程式中，計算 VA40、VA60、VA80 樣品總黃酮類化合物含量分別為

92.8mg/g、56.3mg/g、37.1mg/g。由上述結果可知，樣品乾燥溫度會影響水萃物總黃酮類化合物含量，乾燥溫度越高，總黃酮類化合物損失越大，造成水萃物總黃酮類化合物含量減少。

d. 南非葉水萃物清除 DPPH 自由基能力之測定

取不同濃度 VA40、VA60、VA80 之樣品進行抑制 DPPH 自由基反應，由圖一結果可知，在 50~200ug/ml 濃度下，VA40 可以抑制 33%、42%、51% 自由基，VA60 可以抑制 19%、30%、40% 自由基，VA80 可以抑制 17%、23%、33% 自由基。由上述結果可知，VA40 抑制自由基效果較佳，這可能是由於樣品的總多酚類化合物與總黃酮類化合物含量較高，造成水萃物抑制自由基效果較佳。

e. 南非葉水萃物對人類色素細胞 A375 毒性之測定

取不同濃度 VA40、VA60、VA80 之樣品，處理人類 A375 色素細胞 48 小時，並進行 MTT 細胞毒性測定，由圖二結果可知，在 10~200ug/ml 濃度下，VA40、VA60、VA80 處理 48 小時後，細胞存活率皆可達 99%。由上述結果可知，VA40、VA60、VA80 在 10~200ug/ml 濃度下，皆無明顯細胞毒性。

f. 南非葉水萃物對人類色素細胞 A375 黑色素合成抑制之測定

取不同濃度 VA40、VA60、VA80 之樣品，處理人類 A375 色素細胞 48 小時，並進行細胞黑色素測定，由圖三結果可知，預先給予

UVA 照射，48 小時後，可以增加細胞黑色素合成 22%。若同時給予 UVA 照射與不同濃度 VA40、VA60、VA80 之樣品，則可以減少細胞黑色素合成，甚至低於控制組。在 50ug/ml 濃度下，同時給予 UVA 照射與 VA40、VA60、VA80 處理，可以比單獨 UVA 處理組，分別減少細胞黑色素合成達到 30%、41%、44%。由上述結果可知，VA40、VA60、VA80 在 50ug/ml 濃度下，以 VA80 抑制細胞黑色素合成效果最好。

g. 南非葉水萃物對人類色素細胞 A375 氧化壓力抑制之測定

由於細胞內氧化壓力與色素細胞的黑色素合成，具有密切相關性，因此以不同濃度 VA40、VA60、VA80 之樣品，處理人類 A375 色素細胞 48 小時，並以螢光染劑 DCFDA 進行細胞內氧化壓力測定。由圖四結果可知，預先給予 UVA 照射，6 小時後，可以增加細胞內氧化壓力 16%。若同時給予 UVA 照射與不同濃度 VA40、VA60、VA80 之樣品，則可以減少細胞內氧化壓力產生，甚至低於控制組。在 50ug/ml 濃度下，同時給予 UVA 照射與 VA40、VA60、VA80 處理，可以比單獨 UVA 處理組，分別減少細胞黑色素合成達到 29%、21%、27%。由上述結果可知，VA40、VA60、VA80 在 50ug/ml 濃度下，抑制細胞內氧化壓力的效果相似，這個結果暗示，雖然 VA80 在總多酚類化合物與總黃酮類化合物含量較低，但似乎具備其他抗氧化成分，

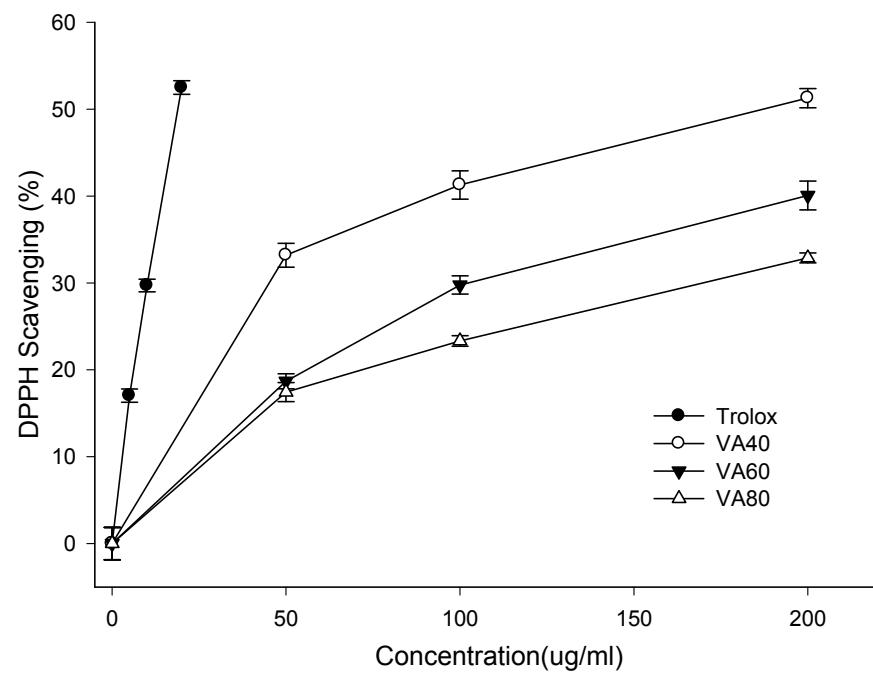
可以有效減少細胞內氧化壓力。

h. 南非葉水萃物對人類色素細胞 A375 谷胱甘肽含量抑制之測定

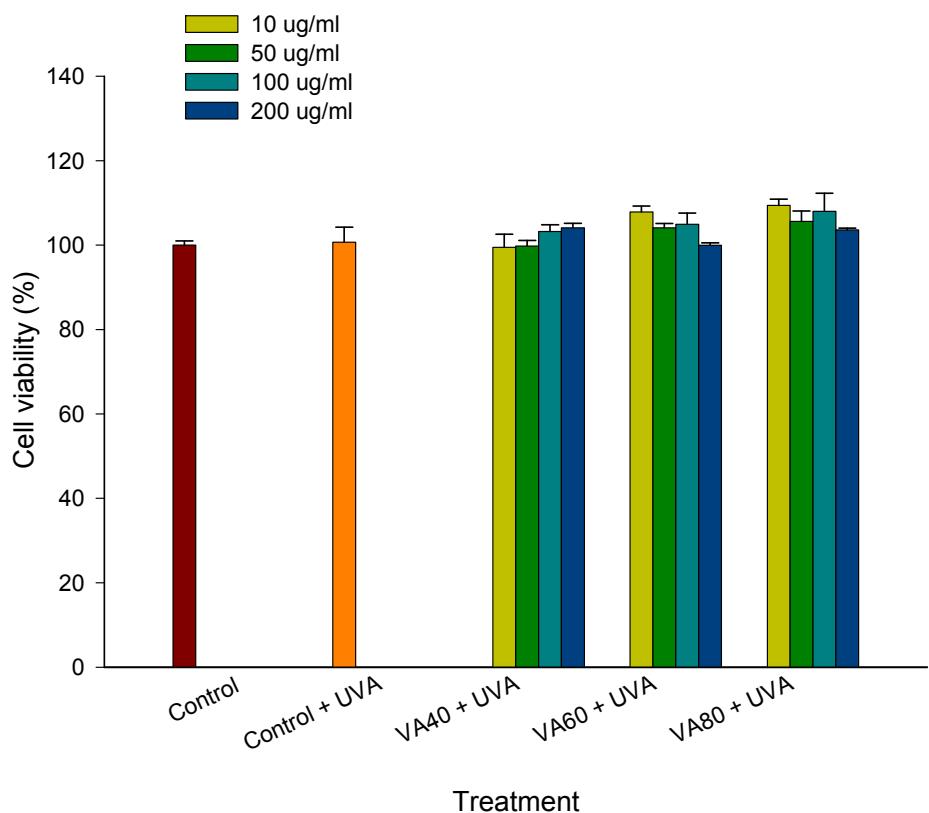
谷胱甘肽 (GSH) 在細胞內的抗氧化系統中，扮演重要功能。由於細胞內谷胱甘肽 (GSH) 與色素細胞的黑色素合成，具有密切相關性，因此以不同濃度 VA40、VA60、VA80 之樣品，處理人類 A375 色素細胞 6 小時，並以 CMFDA 螢光染劑進行細胞內谷胱甘肽 (GSH) 測定。由圖五結果可知，預先給予 UVA 照射，6 小時後，可以增加細胞內谷胱甘肽 (GSH) 含量 22%。若同時給予 UVA 照射與不同濃度 VA40、VA60、VA80 之樣品，則可以減少細胞內谷胱甘肽 (GSH) 產生，但只有 VA80 組谷胱甘肽 (GSH) 含量低於控制組。在 50ug/ml 濃度下，同時給予 UVA 照射與 VA40、VA60、VA80 處理，可以比單獨 UVA 處理組，分別減少細胞黑色素合成達到 1%、22%、44%。由上述結果可知，在 50ug/ml 濃度下，VA80 抑制 UVA 誘發細胞內 GSH 含量增加的效果最好，這個結果暗示，雖然 VA80 在總多酚類化合物與總黃酮類化合物含量較低，但似乎具備其他抗氧化成分，不但可以有效減少細胞內氧化壓力，也可以抑制 UVA 誘發細胞內 GSH 含量增加。

由上述試驗可以得知，VA40、VA60、VA80 皆具有抑制細胞黑色素合成之活性，但並非都是相同作用路徑，VA80 在較高的溫度乾

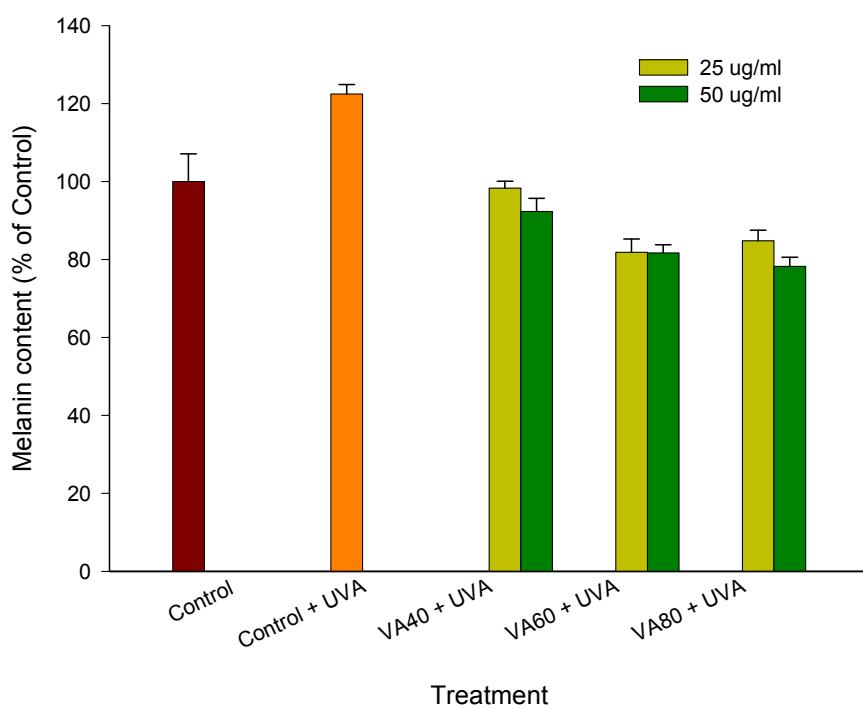
燥下，似乎產生其他抗氧化成分，不但可以有效減少細胞內氧化壓力，也可以抑制 UVA 誘發細胞內 GSH 含量增加，並進一步減少細胞黑色素。



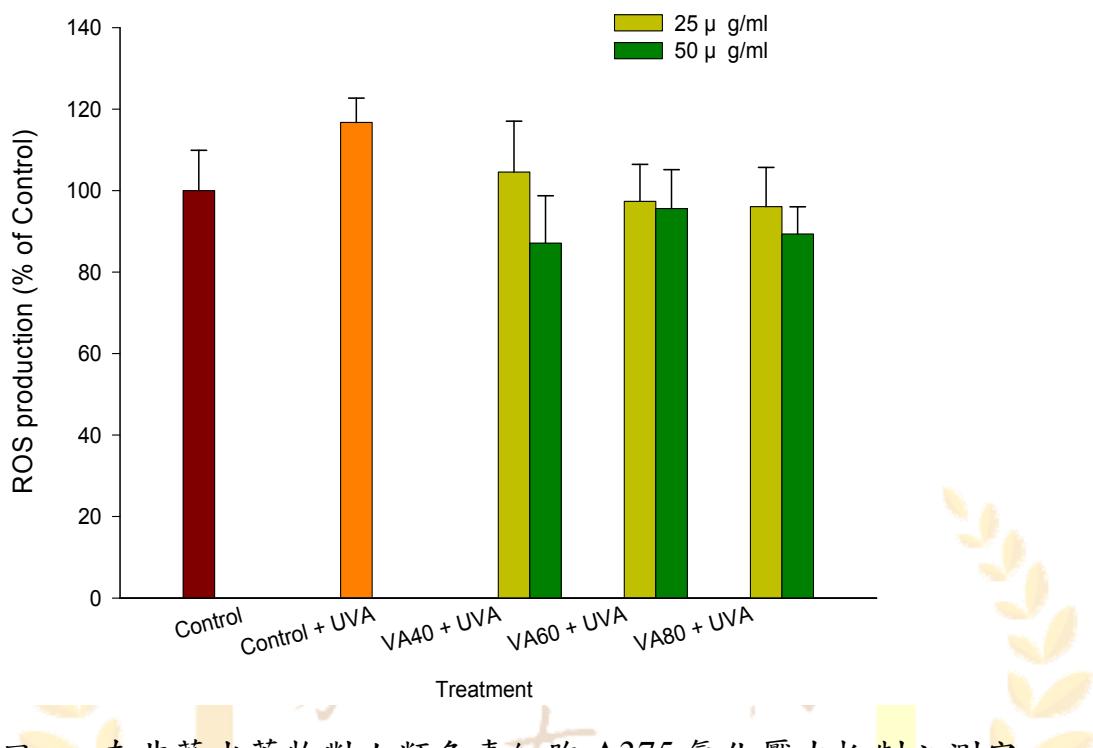
圖一、南非葉水萃物清除 DPPH 自由基能力之測定



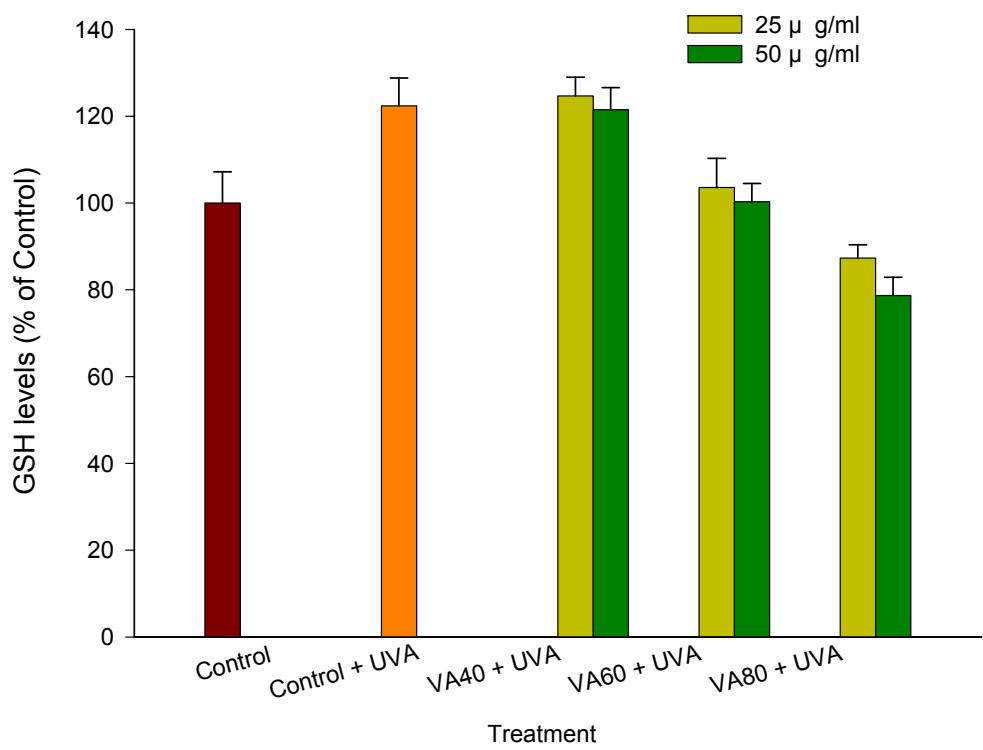
圖二、南非葉水萃物對人類色素細胞 A375 毒性之測定



圖三、南非葉水萃物對人類色素細胞 A375 黑色素合成抑制之測定



圖四、南非葉水萃物對人類色素細胞 A375 氧化壓力抑制之測定



圖五、南非葉水萃物對人類色素細胞 A375 谷胱甘肽含量抑制之測定



(四)參考文獻

1. Richheimer, S. L., Bernart, M. W., King, G. A., Kent, M. C. and Bailey D. T. 1996. Antioxidant activity of lipid-soluble phenolic diterpenes from rosemary. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73, 507-514.
2. Wanasundara, P. K. J. P. D., Shahidi, F. and Shukla, V. K. S. S. 1997. Endogenous antioxidants from oilseeds and edible oils. *Food Rev. Int.* 13: 225-292.
3. Larson, R.A. 1988. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry* 27:969-978.
4. Ramarathnam, N., Osawa, T., Namiku, M. and Kawakishi, S. (1988). Chemical studies on novel rice hull antioxidants. I. Isolation, fractionation, and partial characterization. *J. Agric. Food Chem.* 36: 732-737.
5. Ijeh, I. I. and Ejike, E.C.C. (2011) Current perspectives on the medicinal potentials of *Vernonia amygdalina* Del.. *J. Med. Plants Res.* 5: 1051-1061.
6. Sani A.A., Alemika, E.T.Abdulraheem, R.O., et al. (2012) A study review of documented phytochemistry of *Vernonia amygdalina* (family asteraceae) as the basis for pharmacologic activity of plant extract. *J. Nat. Sci. Res.* 7: 1-8.
7. Obaseiki-Ebor, E.E., Odukoya, K., Telikepalli, H., et al. (1993) Antimutagenic activity of extracts of leaves of four common edible vegetable plants in Nigeria. *Mutat. Res.*, 302: 109-117.
8. Luo, X., Jiang, Y., Fronezek, F.R., et al. (2011) Isolation and structure determination of a sesquiterpene lactone(vernodalin01)from *Vernonia amygdalina* extracts. *Pharm. Biol.* , 49: 464-470.
9. Igile, G.O., Oleszek, W., Jurzysta, M., et al. (1994). Flavonoids from *Vernonia amygdalina* and their antioxidant activities. *J. Agric. Food Chem.*, 42: 2445-2448.
10. Nwanjo, H.U. (2005). Efficacy of aqueous leaf extract of *Vernonia amygdalina* on plasma lipoprotein and oxidative status in diabetic rat models. *Nig. J. Physiol. Sci.*, 20: 39-42.
11. Arhogho EM, Ekpo KE, Anosike EO, Ibeh GO (2009). Effect of aqueous extract of bitter leaf (*Vernonia amygdalina* Del.) on carbon tetrachloride induced liver damage in albino wistar rats. *Eur. J. Sci. Res.*, 26: 122-130.

12. Ijeh II, Obidoa O (2004). Effect of dietary incorporation of *Vernonia amygdalina* Del. on AFB1-induced hepatotoxicity in weanling albino rats. *Jamaican J. Sci. Tech.*, 15: 32-36.
13. Osinubi, AAA. (1996). Effects of *Vernonia amygdalina* and chlorpropamide on blood glucose. *Med. J. Islam World Acad. Sci.*, 16: 115-119.
14. Shimada, K. Fujikawa, K. Yahara, K. and Nakamura, T. 1992. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J. Agric. Food Chem.* 40: 945-948.
15. Dinis, T. C. P., Madeira, V. M. C. and Almeida, L. M. 1994. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-amino salicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch. Biochem. Biophys.* 315: 161-169.
16. Sato M, Ramarathnam N, Suzuki Y, Ohkubo T, Takeuchi M and Ochi H. 1996. Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources. *J Agric Food Chem* 44(1):37- 41.