嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

海巴戟天(Morinda citrifolia L.)(Noni)抗氧化與抗病毒活性研究

計畫類別：□個別型計畫　　■整合型計畫

計畫編號：CNBT94-01

執行期間：94 年 1 月 1 日至 94 年 12 月 31 日

計畫總主持人：葉東柏

子計畫主持人：葉東柏（子計畫 1）

執行單位：生物科技系

中華民國 95 年 2 月 28 日

海巴戟天(Morinda citrifolia L.)抗氧化與抗病毒活性研究

計畫編號：CNBT94-01

子計畫(1) 海巴戟天葉粗抽物中抗氧化物質的快速篩選與純化

計畫總主持人：葉東柏

子計畫主持人：葉東柏

執行機關：嘉南藥理科技大學生物科技系

執行期間：94 年 01 月 01 日至 94 年 12 月 31 日

一、摘要

綜合多項研究顯示，活性氧物質失調所造成的氧化性壓迫(oxidative stress)及病毒感染或入侵，乃是引發疾病的重要原因。據此，本團隊選定具有多種醫療保健功效，特別是糖尿病、高血壓防治與抗癌「海巴戟天」(Noni) 作為材料，分別進行抗氧化及抗病毒活性成分的追蹤與解析，期能對此一植物的保健功能有更多的了解。

本子計畫(子計畫一)的研究是以海巴戟天葉為材料，目標在於利用 HPLC 之快速特性及 ELISA 之高效檢測能力進行的海巴戟天葉中抗氧化活性成分之分離、鑑定及純化條件之探討。首先建立了以 ELISA reader 檢測清除 DPPH 自由基能力的分析程序及其標準曲線，做為鑑定與篩選抗氧化活性物質的指標。進而再探討成分萃取的程序及層析之最佳條件。

綜合初步試驗得知，海巴戟天葉之乙醇粗萃取物中具抗氧化能力的成分主要存在於水可溶部份，更有意義的是活性又集中在其中的一種化合物，約佔 70%以上。由於本研究建立的層析程序能夠將各有效成分分離，因而能夠快速將此一主要成份加以純化。根據現有的數據，包括溶解性、層析滯留時間及吸收光譜圖做初步成分鑑定顯示此一主要成份應屬於類黃酮(flavonoids)，其完整結構將於後續計畫中檢送該樣品至國科會貴儀中心做進一步分析。

二、緣由與目的

海巴戟天(Morinda citrifolia L.)屬茜草科(Rubiaceae)植物，其俗名為 Noni(1)，台灣文獻則稱檄樹、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、薩摩亞群島、南太平洋群島及法屬玻里尼西亞大溪地。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。由於本植物在為台灣民間盛行之一種保健食品且種植及採收容易，故南部農民對於種植該類植物的興趣亦相當濃厚，目前已有供應國內外廠商及餐飲業使用。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，各部位並具有多種醫療保健功效，當中包括糖尿病、高血壓與癌症的預防及治療效果(1)。關於海巴戟天所含的化學成分，相關研究文獻有花(2)、果實(3,4)、葉(5,6)、種子(7)、根(8)及心材(9)等部分，共分離出屬於 anthraquinone glycosides(2,4,10)、flavone glycosides(2)、fatty acid (3,4,11)、iridoid glycosides(11)、steroids(6) 、 triterpenoids(6) 及 polysaccharide-rich substance(11) 等類型的成分；Sang, S., 2001(6) 由海巴戟天的葉純化出新物質 flavonol glycosides 和 iridoid 3 glycoside，經光譜分析與結構鑑定，iridoids 是由一個以五環為骨架之單.類配醣體，將其成份稱之 citrifolinoside，而葉中另含有五種熟知的含多酚類之配醣體（flavonol glycosides），其中部份成份具清除 DPPH 自由基的能力。根據本研究團隊過去的研究得知(12-18)，以乙醇粗萃取的海巴戟天之葉比其他萃取方式（超臨界二氧化碳萃取技術（SFE-CO2）、乙酸乙酯及熱水（80℃）萃取）與部位（果實、青莖與褐莖），含有較高的抗氧化活性（如較佳的清除 DPPH 自由基能力與總抗氧化能力（TEAC））

與多樣化的抗氧化特性（如具有最佳的清除氫氧自由基、H2O2 的能力，與螯合鐵能力），值得作為進一步萃取開發抗氧化物質的材料來源。

子計畫一的研究目標在於利用初步試驗得知，具有較高抗氧化能力的海巴戟天葉之乙醇粗萃取物，嘗試利用 Hitachi 公司之 HPLC 層析裝置，以 RP-18 管柱進行分析式或半製備式 HPLC 高效率的快速分離，並由自動掃描所得的光譜圖做初步成分鑑定。在總酚含量的測定之外，各主要成分將利用 ELISA reader 的快速檢測優點進行其抗氧化(清除 DPPH 自由基)能力。除外，並將比較不同移動相的組成的層析效果，以找出較理想的分離程序，做為選定最佳純化條件之重要參考依據。

三、材料與方法

（一）樣品來源與粗萃取

海巴戟天的新鮮葉，經 37℃ 烘乾後，以磨粉機輾磨成粉（mesh 30）。由於過去的研究顯示(12-18)：以乙醇粗萃取的海巴戟天之葉比其他萃取方式與部位，含有較高的抗氧化活性與多樣化的抗氧化特性，因此本研究擬以海巴戟天葉之乾燥粉末，以 95%酒精在 50℃下熱萃 24 小時，集合萃液於室溫進行減壓濃縮至乾，所得萃取物作為本研究材料主要來源。

（二）抗氧化活性檢測與總酚類化合物測定

1. 清除 ， -diphenyl- -picrylhydrazyl（DPPH）自由基能力之測定(19) 油脂在自氧化的過程中會產生自由基而造成油脂酸敗，常見的抗氧化物（樣品）可藉由提供氫(hydrogen donor)來清除脂質過氧化物自由基(peroxyl radical)進而達到抑制氧化鏈鎖反應之進行，在抗氧化的研究上通常使用 DPPH 來評估抗氧化的供氫能力。DPPH 之甲醇溶液在 517 nm 下會有強吸光，但是被抗氧化物質(AH)還原時則吸光值降低，因此在 517 nm 的吸光值愈低即表示樣品的供氫(即抗氧化)能力愈強。
2. .TEAC 的測定

方法內容請參考子計畫二

3.總酚類化合物測定

方法內容請參考子計畫二

（三）抗氧化物質之快速篩選條件的建立(20-21)

1.成分分離

本試驗使用 Hitachi 公司之 HPLC 層析裝置(包括 D-7100，D-7000 及 D-)，HPLC 所使用之管柱先以 LichrospherR 100 RP-18e（0.46×250mm）開始。將 95%酒精葉粗萃取物回溶於水、60%甲醇及 95%乙醇後，分別取其上清液進行 HPLC 分析。在初期所使用的移動相及分析條件預定如下：A 液（100%甲醇）與 B 液（水）的混合液由開始的 30：70 增至 50：50 進行 20 分鐘沖提，隨後在 10 分鐘內提升至 80：20。樣品注入量為 20-200μL，而以流速 1.2 mL/min 的速度進行。層析一開始時(第 0 mL)就收集，每管 0.6 mL，共收集 60-80 管，除儀器自動紀錄層析圖譜外，各管再分別測定其 UV 吸光值。必要時改用較大直徑的分析管柱(1.0x150mm 或 1.0x250mm)進行半製備式分離，以獲得較高濃度的樣品量。

2.濃縮樣品準備

分別取上述各管溶液 0.2 mL 於 96 槽微量盤中，二重複，並進行減壓或凍結.燥。.燥樣品溶於 50%甲醇。

3. 抗氧化能力測定及成分種類之初步判定上述各樣品再配合 ELISA reader 的使用，進行抗氧化能力(DPPH 清除能力)測定(見上一節說明)。同時藉由光二極圖譜(photo diode array)進行成分種類之初步判定。

（四）主要抗氧化物質之純化

本試驗將採用半製備式 HPLC 裝置或 Pharmacia 之 AKTA Prime 層析裝置進行抗氧化物質的純化，初期將以 HPLC 為主。後期大量純化時則將採用後者，程序大致如下：首先將管柱與層析裝置連結，選用之管柱為直徑 2.5 公分者，管柱中的矽膠層（RP-18, 25-45 μm）先以甲醇溶解再填充，高度約 20 公分。活性成份的分離程序乃根據上一節所建立的最適條件，先進行平衡，樣品注入，並以溶劑沖提進行管柱層析，再分別收集含活性成分區劃。最後經濃縮，各區劃以 HPLC 鑑定純度，再量測其抗氧化能力。如若能獲得抗氧化能力強，而且純度夠的活性成份，將於後續計畫中送該等樣品至國科會貴儀中心做進一步分析，

以鑑定活性成份的結構。

（五）實驗流程概述：

選取海巴戟天之葉磨成粉過篩（30 mesh）
↓
以 95%酒精 80℃加熱迴流萃取 2 小時
↓
取酒精層減壓濃縮至乾
↓
取一定量用水(15mg/mL)溶之
↓
上清再分別以 60 甲醇及 95%乙醇溶之
↓
取各區分之部份萃取液進行 DPPH 清除能力測定
↓
進行 HPLC 層析並收集各區劃及濃縮於微量盤
↓
利用 ELISA reader 測定清除 DPPH 自由基能力
↓
利用 HPLC 或 LC 進行純化

四、結果

1. 海巴戟天葉 95%酒精萃取物回溶各區分之 DPPH 清除能力 DPPH 清除能力 95% EtOH 上清 60%MeOH 上清 95%EtOH 上清 Total 以ΔA492 計 225.25 Trlox 相當量 83.11 44.81 353.18 (μg/mg) 以ΔA595 計 210.93 76.35 69.18 356.47

2. 海巴戟天葉 95%酒精萃取物回溶各區分之 HPLC 層析圖。

A. 水溶液上清(分析條件：甲醇濃度 30 50 80)

y = 4.7437x - 0.1299
R2 = 0.9994
0
20
40
60
80
100
0 4 8 12 16 20
Trolox (μg/mL)
DPPH 清除能力(%)

6

B. 60% 甲醇溶液上清(分析條件：甲醇濃度 30 50 80)

3. 海巴戟天葉 95%酒精萃取物回溶液之 HPLC 各區分的抗氧化活性。

A. 水溶液上清(分析條件：甲醇濃度 30 50 80 80)

B. 60% 甲醇溶液上清(分析條件：甲醇濃度 30 50 80 80)

4. 海巴戟天葉 95%酒精萃取物主要抗氧化活性物質之純化

將上述水溶液上清之 HPLC 層析所分離具抗氧化活性之主要區分(16-18 分)收集再注入 HPLC 管柱進行純度的確認，由下列層析圖顯示其純度已達可進行結構鑑定的程度。

五、討論

根據文獻報導、民間傳統療法及本團隊的初步研究結果顯示，海巴戟天所含的化學成分， 具有相當多種的醫療保健功效，特別是糖尿病、高血壓的預防及治療功能相當顯著，甚至對部份癌症亦具有的療效。然而各部位之有效成分的科學研究卻仍在起步階段，值得進一步的探討。

綜合多項研究的結論是，活性氧物質失調所造成的氧化性壓迫(oxidative stress)及病毒感染或入侵，乃是引發疾病的重要原因。據此，本團隊選定利用海巴戟天作為材料，分別進行抗氧化及抗病毒活性成分的追蹤與解析，期能對此一植物的保健功能有更多的了解。

傳統的天然物有效成分的分離與活性檢測，包括一連串的層析、濃縮程序，再進行化學或生物檢測，相當費時。為了提高篩選效率，並加快後續之純化操作，本研究將嘗試以分析式或半製備式 HPLC 進行初萃物之高效分離，並由光譜做初步成分鑑定。各主要成分利用快速檢測技術(初步將考慮 96 槽微量盤反應配合 ELISA reader 的使用)分析其抗氧化能力及總酚含量，並比較不同移動相的組成的層析效果，以找出理想的分離程序，做為選定最佳純化條件之重要參考依據。

本研究乃根據 HPLC 之快速特性，探討並建立最適分離條件。再藉由 ELISA 之高效檢測能力，使得本研究能夠很快的鑑定出主要的抗氧化活性成分，並加以純化。根據現有的數據， 包

括溶解性、層析滯留時間及吸收光譜圖等顯示此一主要成份應屬於類黃酮(flavonoids)，其結構將於後續計畫中檢送該樣品至國科會貴儀中心做進一步分析。至於大量製備將使用製備式 HPLC 或 Pharmacia 之 AKTA Prime 層析裝置。而本研究所建立海巴戟天葉萃取液中抗氧化物
質的分離與檢定方法，應可提供做為萃取液商品化 QA/QC 科學技術參考。

六、參考文獻

1. Wong M.Y., West B. J., Jensen C. J., Nowicki D., Chen S., Palu A. K. and Anderson G. (2002)
Morinda citrifolia (Noni): A literature review and recent advances in Noni research. Acta Pharmacologica Sinica. 23(12): 1127-1141.
2. Tiwari R. D., and Singh J. (1997) Structural study of the anthraquinone glycosides from theflowers of Morinda citrifolia. J. India Chem. Soc. 54, 429-430.
3. Levand O. and Larson H. (1979) Some chemical constituents of Morinda citrifolia. Planta Med. 36,186-187.
4. Mingfu W., Hiroe K., Katalin C., Charles D. B., Alika M., Sheri F. T. F., Geetha G., Robert T. R. and Chi-T. Ho. (1999) Novel trisaccharide fatty acid ester identified from the fruits of Morinda citrifolia (noni). J. Agric Food Chem. 47, 4880-4882.
5. Ahmad V. U.and Bano M. (1980) Isolation of β-sitosterol and ursolic acid from Morinda citrifolia Linn. J. Chem. Soc. Pak. 2, 71.
6. Sang, S., Cheng X., Zhu N., Stark R.E., Badmaev V., Ghai G., Roen T. R. and Ho, C.T. (2001) Flavonol glycosides and novel iridoid glycoside from the leaves of Morinda citrifolia, J. Agric Food Chem. 49, 4478-4481.
7. Daulatabad C. D., Mulla G. M. and A. M. (1989) Ricinoleic acid in Morinda citrifolia seed oil. J. Oil Technol. Assoc. (India) 21, 26-27.
8. Rusia K.and Srivastava S. K. (1989) A new anthraquinone from the root of Morinda citrifolia Linn. Curr. Sci. 58, 249.
9. Srivastava M. and Singh J. (1993) A new anthraquionoe glycoside from Morinda citrifolia. J. Pharmacogn. 182-184.
10. Hirazumi A., Furusawa E., Chou S. C. and Hokama Y. (1996) Immunomodulation contributes to the anticancer activity of Morinda citrifolia (noni) fruit juice. Proc. West. Pharmacongn. Soc. 39, 25-27.
11. Hirazumi, A. and Fursawa E. (1999) An immunomodulatory polysaccharide-rich substance from the fruit juice of Morinda citrifolia (noni) with antitumour activity. Phytotherapy Research 380-387.
12. 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.
13. Chen, S. Y., T. P. Lin2, 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.
14. 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。
15. 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。
16. 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。
17. 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。
18. 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.
19. 葉東柏、郭建民(1998) 市售罐裝茶飲料中兒茶素類及咖啡因含量之分析。藥物與食品分析 6:447-454
20. 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.
21. Salah N., Miller N. J., Paganga G., Tijburg L., Rice-evans C. A., (1995) Polyphanolic flavonols as scavengers of aqueous phase

radicals and as chain-breaking antioxidants", Archives of Biochemistry and Biophysics, 322: 339-346.

海巴戟天(Morinda citrifolia L.)抗氧化與抗病毒活性研究
子計畫二：海巴戟天葉粗抽物之抗氧化活性的儲藏試驗

整合型計畫總主持人：生物科技系葉東柏
子計畫主持人：保健營養系康志強

一、摘要

本研究目的在探討海巴戟天葉經不同萃取條件所得之粗萃取物，儲藏在不同的溫度和時間下，對總多酚類含量與其抗氧化力的影響，使用水、50% 乙醇、95% 乙醇、乙酸乙酯為萃取溶劑，粗萃取海巴戟天之葉，各粗萃取物儲藏於不同溫度（常溫 25℃~32℃、冷藏 6℃~10℃、冷凍 0℃、低溫冷凍-30℃）與時間（最長儲藏時間為 90 天），測量總多酚類含量、還原力、總抗氧化能力及清除氫氧自由基能力，評估各粗萃取物最佳萃取條件與三個月內抗氧化能力的安定性；結果顯示海巴戟天葉之乙酸乙酯粗萃取物在各種儲藏溫度下，其總多酚類含量、總抗氧化能力、還原力與清除氫氧自由基能力皆為最低，因為無法有效萃取出海巴戟天內抗氧化有效成分；海巴戟天葉之水粗萃取物雖有較高的總抗氧化能力及還原力，與萃取過程中可能釋出多量的礦物質有關，此外水粗萃取物清除氫氧自由基的能力則偏低：95%乙醇粗萃取物不論儲藏於何種溫度，其總多酚類含量與清除氫氧自由基能力最高，若能在 90 天內低溫保存，還能有效穩定其還原力、總抗氧化能力及清除氫氧自由基能力，因此，95% 乙醇粗萃取物.得進一步探討其生物活性；而 50% 乙醇粗萃取物的總多酚類含量與各項能力測定皆僅次於 95%。

二、緣由與目的

海巴戟天(Morinda citrifolia L.)屬茜草科(Rubiaceae)植物，其俗名為 Noni(1)，關於海巴戟天所含的化學成分，相關研究文獻有花(2)、果實(3,4)、葉(5,6)、種子(7)、根(8)及心材(9)等部分，共分離出屬於 anthraquinone glycosides(2,4,10)、flavone glycosides(2)、fatty acid (3,4,11)、iridoid glycosides(11)、steroids(6)、triterpenoids(6)及 polysaccharide-rich substance(11) 等類型的成分；Sang, S., 2003(12) 由海巴戟天的葉純化出新物質 flavonol glycosides 和 iridoid glycoside，經光譜分析與結構鑑定，iridoids 是由一個以五環為骨架之單.類醣體，將其成份稱之 citrifolinoside，而葉中含有五種熟知的多酚類物質（flavonol glycosides），其中部份成份具清除 DPPH 自由基的能力；Zin Z.M. 2002(13)使用 FTC 與 TBARS 法對海巴戟天的葉、果實與根進行抗氧化活性分析，發現根以醇抽的部分抗氧化活性較高，葉、果實、根以乙酸乙酯萃取的部分皆有抗氧化活性；本研究團隊的研究得知(14-20)，以乙醇粗萃取的海巴戟天之葉比其他萃取方式（超臨界二氧化碳萃取技術（SFE-CO2）、乙酸乙酯及熱水（80℃）萃取）與部位（果實、青莖與褐莖），含有較高的抗氧化活性(如較佳的清除 DPPH 自由基能力與總抗氧化能力（TEAC）) 與多樣化的抗氧化特性（如具有最佳的清除氫氧自由基、H2O2 的能力，與螯合鐵能力）；因此海巴戟天之葉內所含的抗氧化物質可能相當多元化，值得作為進一步萃取開發，作為抗氧化物質的材料來源；然而抗氧化物質本身的安定性相關研究卻付之闕如，如果沒有探究海巴戟天之葉內所含之抗氧化物質的安定性，將無法有效控制、保存與有效使用該抗氧化活性成分。

儲藏
天數
檢測
項目

因此，本研究主要目的是探討海巴戟天葉以 80℃熱水、50 %酒精、95% 乙醇與乙酸乙酯為萃取溶劑，所得之粗抽物在不同溫度（常溫 25℃~32℃、冷藏 6℃~10℃、冷凍 0℃、低溫冷凍-30 ℃）保存下是否仍具抗氧化活性效果，並探討各粗抽物在不同儲藏時間下抗氧化活性與成分之變化，以作為開發海巴戟天為保健食品之加工原料的基礎資料。

三、材料與方法

儲藏實驗架構

Dry sample （濃度為 50mg/ml）

常溫（25-32℃） 冷藏（6-10℃） 冷凍（0℃） 低溫冷凍（-30℃）

水抽

95%EtOH 抽
50%EtOH 抽
ETOAc 抽
各分 9 管 共 36 管
水抽
95%EtOH 抽
50%EtOH 抽
ETOAc 抽
各分 9 管 共 36 管
水抽
95%EtOH 抽
50%EtOH 抽
ETOAc 抽
各分 9 管 共 36 管

水抽
95%EtOH 抽
50%EtOH 抽
ETOAc 抽
各分 9 管 共 36 管
分 9 個時段取出
（5、9、16、24、34、48、62、76、90 天）
TPC TAS Reducing power DR
＊常溫(25-32) ℃ →R；冷凍(0℃) →I；冷藏(6-10℃) →S；低溫冷凍(-30℃) →O

（一）樣品來源與粗萃取

研究材料海巴戟天係購自南部農產地，其葉經烘乾後，由磨粉機輾磨（mesh 30）裝瓶， 並置入除濕器中放入低溫冷凍櫃（-80℃）備用。利用熱水（80℃）對水溶性物質及酒精對醇溶性物質萃取能力佳的特性，以及乙酸乙酯可萃取油溶性物質的特性等方法，進行篩選及萃取海巴戟天之葉內抗氧化性物質，並將其萃液放入低溫冷凍櫃（-80℃）備用，以此作為安定性實驗之起點。

儲藏
溫度
萃取
條件

（二）抗氧化活性之儲藏試驗

本研究主要目的是探討各萃取液在在不同溫度下，儲存不同時間後，是否仍具抗氧化效果，並探討各萃取液在在不同溫度下，儲存不同時間後之抗氧化活性與成分之間的變化， 以作為開發海巴戟天為保健食品之加工原料的基礎資料。將各萃取液分別置於常溫（27 5 ℃）、10 2℃（冷藏）、0 2℃（冷凍）、-28 2 ℃（低溫冷凍）下放置 5、9、16、24、34、48、62、76、90 天後，測定其抗氧化活性及其多酚類含量（或經確認的有效成分）之變化；以未處理者為標準（100%）算出殘留之百分比。數據以 Statistical Analysis System (SAS) 進行統計分析，以 ANOVA 程序做變異數分析，並以 Duncan’s Multiple Range Tests 做顯著差異性比較。

（三）抗氧化活性分析與總酚類化合物含量檢定

1. 總抗氧化力（Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC）測定依 Yu 等人（21）之方法，取 220 U/mL peroxidase 120 μL、750 μ MABTS 溶液 300 μL 及 70 μM H2O2 2.57 mL 混合均勻，6 分鐘後產生安定藍綠色之 ABTS +• 陽離子自由基，隨即加入不同濃度的 trolox 標準品或樣品 10 μL，測 734 nm 之吸收光值，作成 trolox 檢量線，樣品則藉檢量線換算其相當濃度。

2.還原力測定

參考 Oyaizu（22） 等人的方法。取 0.2 mL 適當濃度的試驗樣品濃度，加入 0.2mL 200 mM 磷酸鹽緩衝溶液（pH=6.6）與 0.2 mL 1% 赤血鹽（potassium ferricyanide），混合均勻後於 50 ℃ 水浴反應 20 分鐘；急速冷卻後，加入 0.2 mL 10% trichloroacetic acid 溶液。於 2000 ×g 離心 10 分鐘後，取上清液 500 μL 加入 500 μL 蒸餾水及 100 μL 0.1% ferric chloride （FeCl3・6H2O）溶液（以 3.5% 鹽酸溶液配製），混合均勻置放 10 分鐘後，測定其 700 nm 之吸光值；吸光值愈高，則表示樣品還原力愈強。

3.清除氫氧自由基能力之測定(23,24)

以去氧核糖氧化（DR degradation）之測定法取代，此為一種 Fenton-type 反應，利用抗壞血酸將 Fe3+-EDTA 還原成 Fe2+-EDTA 後，與過氧化氫在 pH 7.4 下反應會生成・OH，而・OH 會破壞去氧核醣(Deoxyribose, DR)，其分解產物與 TBA 在低酸性，加熱下反應生成粉紅色產物，在波長 532 nm 處有吸光，吸光值愈低即表示樣品抗氧化能力愈強。

4.總酚類化合物測定

參考 Germano 等人(25)之方法，測定總酚類

化合物含量是以 gallic acid 當做標準品。以不同濃度 0.1mL 的 gallic acid 甲醇溶液，各加 0.2mL Folin-Ciocalteu phenol reagent，搖勻後再加入 1 mL 15% Na2CO3 溶液及 1 mL 去離子水後混勻，於室溫下反應 2 小時後，以 8,000 ×g 離心 10 分鐘，再以 765 nm 測其吸光值做出標準曲線。再以同樣條件測定試驗樣品後與標準曲線比較，算出試驗樣品總酚類化合物的含量。

Days
0 20 40 6 0 8 0 10 0
Total Polyphenol Complex (mg/ml)
1
2
3
4
O __ _ _ __
S _ __ __ _ _
I - - - - - - - p<0 .0 5
R ..... p <0 .0 5

Day
0 20 40 60 80
Total Polyphenol Complex (mg/ml)
1
2
3
4
O __ __ __
S __ _____
I - - - - - - -
R .....

Days
0 20 40 60 80 100
Total Polyphenol Complex (mg/ml)
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5
4.0
4.5
O __ __ __
S _____
I - - - - - -
R ..... p<0.05

D a y s
0 2 0 4 0 6 0 8 0 1 0 0
Total Polyphenol Complex (mg/ml)
1
2
3
4
O _ _ _ _ _ _
S _ _ _ _ _ _ _
I - - - - - - - p < 0 .0 5
R . . . . p < 0 .0 5

D a ys
0 2 0 4 0 6 0 8 0 1 0 0
Total antioxidant status (mmol/ml
0
2
4
6
8
1 0
1 2
1 4
1 6
O _ _ _ _
S _ _ _ _ _ _ _ P< 0 .0 5
I --------- P< 0 .0 5
R ..... P< 0 .0 5

Days
0 20 40 60 80 100
Total antioxidant status (mmol/ml)
0
2
4
6
8
10
12
14 O _ _ _ _
S _____
I ----------
R ..... P<0.05

D a y s
0 2 0 4 0 6 0 8 0 1 0 0
Total antioxidant status (mmol/ml)
0
2
4
6
8

1 0
1 2
1 4
O _ _ _ _
S _ _ _ _ _ _
I - - - - - - - - - -
R .. ..
D a y s
0 2 0 4 0 6 0 8 0 1 0 0
Total antioxidant status (mmol/ml)
0
2
4
6
8
1 0
1 2
1 4 O _ _ _ _ P < 0 .0 5
S _ _ _ _ _ _ P < 0 .0 5
I --- --- --- -
R ..... P < 0 .0 5

四、結果

Fig. 1-1：水粗萃取物在不同儲藏溫度 Fig. 1-2：乙酸乙酯粗萃取物在不同儲藏溫度與時間下其總多酚含量分析與時間下其總多酚含量分析

Fig. 1-3：50%乙醇粗萃取物在不同儲藏溫度 Fig. 1-4：95%乙醇粗萃取物在不同儲藏溫度與時間下其總多酚含量分析與時間下其總多酚含量分析

Fig. 2-1：水粗萃取物在不同儲藏溫度 Fig. 2-2：乙酸乙酯粗萃取物在不同儲藏溫度與時間下其總抗氧化能力分析與時間下其總抗氧化能力分析

Fig. 2-3：50%乙醇粗萃取物在不同儲藏溫度 Fig. 2-4：95%乙醇粗萃取物在不同儲藏溫度與時間下其總抗氧化能力分析與時間下其總抗氧化能力分析

Days
0 20 40 60 80 100
Reducing Power (mmol/ml)
2
4
6
8
10
12
O __ __ __ p<0.05
S _____
I - - - - - - - p<0.05
R ..... p<0.05

Days
0 20 40 60 80 100
Reducing Power (mmol/ml)
0
2
4
6
8
10
12 O __ __ __
S _____
I - - - - - - -
R ..... p<0.05

D a y s
0 2 0 4 0 6 0 8 0 1 0 0
Reducing Power (mmol/ml)
2
4
6
8
1 0
1 2
O _ _ _ _ _ _
S _ _ _ _ _ _ _
I - - - - - - -
R .. ..

D a y s
0 2 0 4 0 6 0 8 0 1 0 0
Reducing Power (mmol/ml)
2
4
6
8
1 0
1 2 O _ _ _ _ _ _
S _ _ _ _ _ _ _
I - - - - - -
R .. ..

Days
0 20 40 60 80 100
Deoxyribose (mmol/ml)
160
180
200

220
240
O _ _ _ _
S _____
I ----------
R .....

Days
0 20 40 60 80 100 Deoxyribose (mmol/ml)
160
180
200
220
240
O _ _ _ _
S _____
I ---------
R .....

D a ys
0 2 0 4 0 6 0 8 0 1 0 0
Deoxyribose (mmol/ml
1 6 0
1 8 0
2 0 0
2 2 0
2 4 0
O _ _ _ _
S _ _ _ _ _
I - -- - - -- - -
R .....

Days
0 20 40 60 80 100
Deoxyribose (mmol/ml)
160
180
200
220
240
O _ _ _ _
S _____ P<0.05
I ---------- P<0.05
R ..... P<0.05

Fig. 3-1：水粗萃取物在不同儲藏溫度 Fig..3-2：乙酸乙酯粗萃取物在不同儲藏溫度與時間下其還原力分析與時間下其還原力分析
Fig. 3-3：50%乙醇粗萃取物在不同儲藏溫度
Fig. 3-4：95%乙醇粗萃取物在不同儲藏溫度與時間下其還原力分析與時間下其還原力分析

Fig. 4-1：水粗萃取物在不同儲藏溫度 Fig.4-2：乙酸乙酯粗萃取物在不同儲藏溫度與時間下其清除氫氧自由基能力分析與時間下其清除氫氧自由基能力分析
Fig. 4-3：50%乙醇粗萃取物在不同儲藏溫度
Fig. 4-4：95%乙醇粗萃取物在不同儲藏溫度與時間下其清除氫氧自由基能力分析與時間下其清除氫氧自由基能力分析

五、討論

1 .總多酚類含量測定

圖 1-1 至 1-4 顯示海巴戟天葉在各種的萃取條件下（水、50% 乙醇、95% 乙醇、乙酸乙酯），各粗萃取物於不同儲藏溫度（常溫、冷藏、冷凍、低溫冷凍）與儲藏時間（最長儲藏時間為 90 天），其總多酚類含量的變化。海巴戟天葉之水與乙酸乙酯萃取物於各式儲藏溫度下，較不受儲藏時間影響其含量（圖 1-1, 1-2）；50% 乙醇萃取物，除了在「常溫」下儲藏，總多酚類含量有顯著降低外（$p < 0.05$），其他儲藏條件也不受儲藏時間影響（圖 1-3）。海巴戟天葉 95% 乙醇萃取物於不同儲藏溫度下，隨著儲藏時間的增加，總多酚類含量皆呈現先增後減的趨勢，總多酚類含量於儲藏 50-60 天左右達最高峰，儲藏 90 天後 95% 乙醇萃取物之總多酚類含量比最初時間所測定含量偏低， 推測 95% 乙醇萃取物可能在最初的 50 天內仍有多酚類物質從不溶性微粒物質中緩慢釋出，造成含量增加，隨後多酚類物質發生凝聚或部分成分裂解，造成含量降低（圖 1-4）。此外，各種萃取條件中最初時間（1-5 天）所含的總多酚類含量，以 95% 乙醇為萃取溶劑含量最高（2.6-3.4 mg/mL），乙酸乙酯最低（1.3-1.5 mg/mL）（圖 1-1 至 1-4）；儲藏至 90 天後 95% 乙醇萃取物之總多酚類含量仍高於其他萃取條件。

2. 海巴戟天之總抗氧化能力分析：

圖 2-1 至 2-4 顯示海巴戟天葉在各種的萃取條件下，各粗萃取物於不同儲藏溫度與儲藏時間，其總抗氧化能力的變化。結果顯示在最初時間（1-5 天）與不同的儲藏條件，海巴戟天葉之水粗萃取物之總抗氧化能力（8-10 mM Trolox equivalent ）皆比 50％ 乙醇、95% 乙醇與乙酸乙酯粗萃取物都高（1-5 mM Trolox equivalent ），且水粗萃取物隨著儲藏時間的

增加，其總抗氧化能力顯著地持續上升（圖 2-1；$p < 0.05$），可能與萃取物中所含偏極性的抗氧化物質或礦物質，由不溶性微粒物質中緩慢釋出，而提升其總抗氧化能力有關。然而，50％ 乙醇、95% 乙醇與乙酸乙酯粗萃取物於各式儲藏溫度下，則皆隨儲藏時間的增加，其總抗氧化能力持續下降，其中以 95% 乙醇粗萃取物之總抗氧化能力的下降有顯著差異（圖 1-4；$p < 0.05$）；雖然 95% 乙醇粗萃取物之總抗氧化能力隨儲藏時間的增加而下降，但其總抗氧化能力仍高於 50％ 乙醇與乙酸乙酯粗萃取物；此外，50％ 乙醇、95% 乙醇與乙酸乙酯粗萃取物於各式儲藏溫度在儲藏 90 天內，對於其總抗氧化能力的影響差異不大，不過從趨勢圖觀察，儲藏於低溫條件下（冷藏溫度以下），其萃取物中的成分較穩定。

3. 海巴戟天之還原力分析：

由文獻研究指出還原力對於物質的抗氧化性具有相當的貢獻，為了要了解海巴戟天抗氧化性與其還原力的相關性，故進行還原力之測定。圖 3-1 至 3-4 顯示海巴戟天葉在各種的萃取條件下，各粗萃取物於不同儲藏溫度與儲藏時間，其還原力的變化。結果顯示在最初時間（1-5 天）的不同儲藏條件，海巴戟天葉之水粗萃取物的還原力（7-8 Vit C equivalent Vit mM）皆比 50％ 乙醇、95% 乙醇與乙酸乙酯粗萃取物都高（1-3 Vit C equivalent mM），且水粗萃取物隨著儲藏時間的增加，其還原力顯著地持續上升（圖 15 3-1；$p < 0.05$），與其總抗氧化能力的趨勢相似（與圖 2-1 相比較），其中又以儲藏於「常溫」下的水萃取物，其還原力上升的現象最顯著，可能與萃取物在溫度較高的狀態下（如本實驗條件中的常溫），更容易將所含偏極性的抗氧化物質或礦物不溶性微粒物質中釋出，而提升其還原力有關。此外，50％ 乙醇、95% 乙醇與乙酸乙酯粗萃取物於各式儲藏溫度下儲藏 90 天內，對於其還原力的影響差異不大（圖 3-2 至 3-4）；但 95% 乙醇粗萃取物的還原力皆高於 50％ 乙醇與乙酸乙酯粗萃取物。

4. 清除氫氧自由基能力分析

圖 4-1 至 4-4 顯示海巴戟天葉在各種的萃取條件下，各粗萃取物於不同儲藏溫度與儲藏時間，其清除氫氧自由基能力的變化。結果顯示在最初時間（1-5 天）的不同儲藏條件，海巴戟天葉之 95% 乙醇粗萃取物之清除氫氧自由基能力皆比 50％ 乙醇、95% 乙醇與乙酸乙酯粗萃取物都好。此外，水與乙酸乙酯粗萃取物不論儲藏於何種溫度，隨著儲藏時間的增加，清除氫氧自由基能力皆有降低的趨勢，但皆未達顯著差異；50％ 與 95% 乙醇粗萃取物儲藏於低溫下（冷藏溫度以下），較能穩定維持其清除氫氧自由基的能力，然而，於「常溫」下的 50％ 與 95% 乙醇粗萃取物，其清除氫氧自由基能力會隨著儲藏時間的增加，顯著有降低的趨勢（$p < 0.05$），儘管如此，50％ 與 95% 乙醇粗萃取物儲藏至各種儲藏溫度下 90 天，其清除氫氧自由基能力仍高於水與乙酸乙酯粗萃取物。

綜合以上結果，海巴戟天葉之乙酸乙酯粗萃取物在各種儲藏溫度下，其總多酚類含量、總抗氧化能力、還原力與清除氫氧自由基能力皆為最低，因為無法有效萃取出海巴戟天內抗氧化有效成分。海巴戟天葉之水粗萃取物雖有較高的總抗氧化能力及還原力，與萃取過程中可能釋出多量的礦物質（相關驗證正在執行中）有關，此外水粗萃取物清除氫氧自由基的能力則偏低。95%乙醇粗萃取物不論儲藏於何種溫度，其總多酚類含量與清除氫氧自由基能力最高，若能在 90 天內低溫保存，還能有效穩定其還原力、總抗氧化能力及清除氫氧自由基能力，因此，95% 乙醇粗萃取物.得進一步探討其生物活性；50% 乙醇粗萃取物的總多酚類含量與各項能力測定皆僅次於 95%。

六、參考文獻

1. Wong M.Y., West B. J., Jensen C. J., Nowicki D., Chen S., Palu A. K. and Anderson G. (2002) Morinda citrifolia (Noni): A literature review and recent advances in Noni research. Acta Pharmacologica Sinica. 23(12): 1127-1141.

2. Tiwari R. D., and Singh J. (1997) Structural study of the anthraquinone glycosides from the flowers of Morinda citrifolia. J. India Chem. Soc. 54, 429-430.

3. Levand O. and Larson H. (1979) Some chemical constituents of Morinda citrifolia. Planta Med. 36,186-187.

4. Mingfu W., Hiroe K., Katalin C., Charles D. B., Alika M., Sheri F. T. F., Geetha G., Robert T. R. and Chi-T. Ho. (1999) Novel

trisaccharide fatty acid ester identified from the fruits of Morinda citrifolia (noni). J. Agric Food Chem. 47, 4880-4882.
5. Ahmad V. U.and Bano M. (1980) Isolation of β-sitosterol and ursolic acid from Morinda citrifolia Linn. J. Chem. Soc. Pak. 2, 71.
6. Shengmin S., Xiaofang C., Nanqun Z., Ruth E. S., Vladimir B., Geetha G., Robert T. R. and Chi-Tang Ho. (2001) Flavonol glycosides and novel iridoid glycoside from the leaves of Morinda citrifolia, J. Agric Food Chem. 49, 4478-4481.
7. Daulatabad C. D., Mulla G. M. and A. M. (1989) Ricinoleic acid in Morinda citrifolia seed oil. J. Oil Technol. Assoc. (India) 21, 26-27.
8. Rusia K.and Srivastava S. K. (1989) A new anthraquinone from the root of Morinda citrifolia Linn. Curr. Sci. 58, 249.
9. Srivastava M. and Singh J. (1993) A new anthraquionoe glycoside from Morinda citrifolia. J. Pharmacogn. 182-184.
10. Hirazumi A., Furusawa E., Chou S. C. and Hokama Y. (1996) Immunomodulation contributes to the anticancer activity of Morinda citrifolia (noni) fruit juice. Proc.West. Pharmacongn. Soc. 39, 25-27.
11. Hirazumi, A. and Fursawa E. (1999) An immunomodulatory polysaccharide-rich substance from the fruit juice of Morinda citrifolia (noni) with antitumour activity. Phytotherapy Research 13, 380-387. 12. Sang, S., Cheng X., Zhu N., Stark R.E., Badmaev V., Ghai G., Rosen R.T. and Chi-Tang Ho. (2001) A novel iridoid glycoside from the leaves of Morinda citrifolia. J. Agric. Food Chem 49, 4478-4481.
13. Zin Z.M., Abdul-Hamid A. and Osman A.（2002）Antioxidative activity of extracts from Mengkudu (Morinda citrifolia L.) root,fruit and leaf. Food Chem. 78: 227 －231.
14. 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.
15. Chen, S. Y., T. P. Lin2, 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.
16. 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。
17. 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。
18. 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。
19. 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。
20. 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.
21. Yu T. W., and Ong C. N., “Lag-Time Measurement of antioxidant capacity using myoglobin and 2,2’-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6- sulfoni cacid): rationale, application, and limitation”. Anal. Biochem., 275:217-223, 1999.
22. Oyaizu M., “Antioxidative activity of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography”. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi., 35:771-775, 1986.
23. Halliwell B., Gutteridge J. M. C. and Aruoma O.I. (1987) The deoxyribose method: a simple 'test tube' assav for determination of rate constants for reaction of hydroxyl radicals. Analytical Blochemistry 165:215.
24. Aruoma O.I. and Haillwell B. (1988) The iron-binding and hydroxyl radical scavenging action of anti-inflammatory drugs. Xenobiotica 18:459-470.
25. 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.

子計畫三：海巴戟天葉粗抽物對 DNA 氧化傷害之影響

整合型計畫總主持人：生物科技系葉東柏

子計畫主持人：保健營養系陳師瑩

一、摘要

基於本團隊過去的研究得知，海巴戟天之葉含有較高的抗氧化活性與多樣化的抗氧化特性，故選定葉的不同溶劑萃取物進行 DNA 氧化傷害之研究，以進一步分析海巴戟天的葉中所含抗氧化物質的作用與氧化傷害的保護機轉，實驗結果顯示海巴戟天葉的各萃取物不論在有或無細胞膜的情形下皆能減少・OH 所誘導淋巴球細胞 DNA 的氧化傷害，提供相當程度的保護作用，其中以絕對酒精所萃取的抗氧化物質能在 10 μg/mL 時發揮保護 DNA 氧化傷害效果，效應最佳，但濃度提高時，也有促氧化的危險；50% 乙醇及純水萃取物皆以濃度為 1 mg/mL 以上時的保護效果最明顯，而其 DNA 降解的情形隨著濃度增加而效果越顯著，推測與 50% 乙醇及純水萃取物具有清除自由基之能力外， 在螯合鐵上有非常突出的能力有關。

二、緣由與目的

自由基或其他活性物質一旦產生，則會從身體組成的各種細胞或分子上搶走電子，包括 DNA 中的核酸、細胞膜上多元不飽和脂肪酸（PUFA）的位置、蛋白質分子、醣類等；而胞內的胞器如：細胞核、粒線體及內質網等也有可能受到氧化攻擊，也可能使電子傳遞鏈受到損傷，甚至粒線體破裂(1-2)。氧自由基所引起 DNA 中 purine 及 pyrimidine 結構上的傷害可能會使雙股 DNA 產生斷裂、交叉連結(cross-linkage)，若此時 DNA 的修復系統未發揮功能或發生配對錯誤時，就可能會引起種種突變的現象，一些如癌症、慢性病等疾病可能就會因此而產生。若活性氧對蛋白質作攻擊則可能讓骨架上的 peptide bond 斷裂而使蛋白質結構產生變化；蛋白質的氧化傷害也可能造成胺基酸之間產生雙硫鍵的 cross linkage，使蛋白質二級或三級結構受到改變。這些情況也許會導致膜上接受器的結合力改變、酵素不活化、細胞免疫性的變異、離子通道通透性的改變、蛋白質進行不當的降解(premature degradation) 等。而自由基攻擊膜上磷脂質部位的 PUFA 則會使得油脂過氧化讓油脂分解，若發生在紅血球上，則會造成膜的破裂引發溶血；氫氧自由基及 NOO－則會誘導 LDL 的氧化形成氧化態 LDL(ox-LDL) (1-2)。

若能增加生物體內抗氧化防禦系統之作用，以清除或防止活性氧物質的產生，則能有效減少細胞傷害，延緩生物體的衰老與死亡。事實上，在我們的飲食當中存在多種具有抗氧化特性的特殊成分(3)，如番茄、西瓜中所含的番茄紅素（Lycopene）（4），茶品中所含的兒茶素類物質（Catechins）（5），皆能防止或減緩自由基或活性氧所造成的細胞組織傷害或生理功能破壞。時至今日，維生素 E、抗壞血酸和 β-carotene 仍被公認為良好的抗氧化物質，然而近年來的研究卻發現抗壞血酸在特定的條件下亦具有助氧化的特性；而過量使用維生素 A 除了有肝毒性外，也有造成抽煙者發生肺癌的病例報告（6），使得抗氧化相關物質的作用機轉已然成為開發具有抗氧化性質之保健食品的重要研究議題。

Sang S., 2001(7) 由海巴戟天的葉純化出新物質 flavonol glycosides 和 iridoid glycoside，經光譜分析與結構鑑定，iridoids 是由一個以五環為骨架之單.類醣體，將其成份稱之 citrifolinoside，而葉中含有五種熟知的多酚類物質（flavonol glycosides），其中部份成份具清除 DPPH 自由基的能力；Zin Z.M. 2002(8)使用 FTC 與 TBARS 法對海巴戟天的葉、果實與根進行抗氧化活性分析，發現根以醇抽的部分抗氧化活性較高，葉、果實、根以乙酸乙酯萃取的部分皆有抗氧化活性；此外，基於本研究室過去的研究得知(9-15)，海巴戟天之葉含有較高的抗氧化活性（如較佳的清除 DPPH 自由基能力與總抗氧化能力（TEAC））與多樣化的抗氧化特性（如具有最佳的清除氫氧自由基、H2O2 的能力，與螯合鐵能力）；因此，海巴戟天的葉值得作為進一步萃取開發抗氧化物質的材料來源，而本研究的主要目的是探討海巴戟天葉粗抽物對 DNA 氧化傷害可能的保護功能與機轉。

三、材料與方法

（一）樣品來源與粗萃取

研究材料海巴戟天係購自南部農產地，其葉子經 37℃ 烘乾後，以磨粉機輾磨成粉（mesh 30）裝瓶，並置入除濕器中冷藏備用，計劃擬利用熱水（80℃）萃取水溶性物質、酒精（50℃）萃取醇溶性物質及乙酸乙酯（50℃）萃取油溶性物質等方法，進行粗萃取海巴戟天之新鮮葉，集合萃液於室溫進行減壓濃縮至乾，所得粗抽物作為本研究材料主要來源。

（二）人類淋巴球的分離

取 5 mL 含真空抽血管的 heparin 之全血（由捐血中心購入人血），加入等量的 PBS （NaCl 138 mM, KCl 3 mM, NaHPO4 10 mM, KH2PO4 2 mM, pH 7.4），溫和的上下反轉幾次，再將稀釋的 10 mL 全血沿管壁緩緩加入 Ficoll-paque 中（稀釋的全血： Ficoll-paque = 2 : 1），使用懸臂式離心機以 2,500 rpm 離心 30 分鐘，以吸管緩緩吸出位於界面的淋巴球，加入 PBS 清洗，再次進行離心（2000 rpm，10min），吸去上清液丟棄，加入 1 mL PBS 使細胞懸浮並進行細胞計數。

（三） DNA 氧化傷害之引發

淋巴球不具細胞膜：將淋巴球 107 cells/mL 以 DNA Extraction Kit 純化出 DNA 後，將總體積 10 μL 含 0.5 μg DNA 與 2 mM H2O2、100 μM FeCl3、200 μM ascorbic acid 及不同濃度的海巴戟天萃取液混勻，於 37℃下反應 30 分鐘，加入 1 mM EDTA 1 μl 終止反應，隨後進行 DNA fragmentation 之測定。

淋巴球具有細胞膜：將淋巴球 107 cells/mL 與 40 mM H2O2、2 mM FeCl3、4 mM ascorbic acid 及不同濃度的海巴戟天萃取液混勻後，於 37℃下反應 30 分鐘後離心（2000 rpm，10min）取出上清液丟棄，以 DNA Extraction Kit 將 DNA 純化出來後進行 DNA fragmentation 之測定。

（四） DNA fragmentation 之測定(16)

DNA 受到氧化傷害時，常會產生大小不一的片段(fragmented DNA)，經凝膠電泳後可將降解(degradation) 之產物分離開。1. 淋巴球不具細胞膜：各實驗組取同樣量(10 μL) 之反應液以 0.6% 洋菜凝膠在 0.5X TBE buffer 中進行 50 伏特，90 分鐘電泳。經 ethidium bromide 染色後以 UV transilluminator 觀察，最後以拍立得相機將電泳圖照相。

2. 淋巴球具有細胞膜：各實驗組取同樣量 (0.5 μg) 純化之 DNA，以 0.6% 洋菜凝膠在 0.5X TBE buffer 中進行 50 伏特，90 分鐘電泳。經 ethidium bromide 染色後以 UV transilluminator 觀察，最後以拍立得相機將電泳圖照相。

四、結果

(+) Catechin

H2O2 / Fe2+ / VitC － ＋ ＋ ＋ ＋ ＋

(+) Catechin (μg/mL) － － 100 10 1 0.1

乙酸乙酯萃取物絕對酒精萃取物

H2O2 / Fe2+ / VitC － ＋ ＋ ＋ ＋ ＋ － ＋ ＋ ＋ ＋ ＋

Extract (μg/mL) － － 100 10 1 0.1 － － 100 10 1 0.1

50% 酒精萃取物熱水萃取物

H2O2 / Fe2+ / VitC － ＋ ＋ ＋ ＋ ＋ － ＋ ＋ ＋ ＋ ＋

Extract (μg/mL) － － 100 10 1 0.1 － － 100 10 1 0.1

圖一、海巴戟天葉各萃取物對氫氧自由基誘導無細胞膜之人類淋巴球 DNA 氧化傷害之影響。

(+) Catechin
H2O2 / Fe2+ / VitC － ＋ ＋ ＋ ＋ ＋
(+) Catechin (mg/mL) － － 50 10 1 0.1
乙酸乙酯萃取物絕對酒精萃取物
H2O2 / Fe2+ / VitC － ＋ ＋ ＋ ＋ ＋ － ＋ ＋ ＋ ＋ ＋
Extract (mg/mL) － － 50 10 1 0.1 － － 50 10 1 0.1
50% 酒精萃取物熱水萃取物
H2O2 / Fe2+ / VitC － ＋ ＋ ＋ ＋ ＋ － ＋ ＋ ＋ ＋ ＋
Extract (mg/mL) － － 50 10 1 0.1 － － 50 10 1 0.1
圖二、海巴戟天葉各萃取物對氫氧自由基誘導人類淋巴球 DNA 氧化傷害之影響。

五、討論

由過去抗氧化能力分析的結果得知（11-15），就材料而言以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，故選定葉的不同溶劑萃取物進行 DNA 氧化傷害之研究。本實驗以 Fenton reaction 產生之氫氧自由基來誘導人類淋巴球 DNA 氧化，並分成無細胞膜保護和有細胞膜保護下來探討其可能的保護機轉。在無細胞膜保護的實驗則是將人類淋巴球 DNA 直接取出以 DNA 的形態進行反應，並評估 DNA 氧化傷害之情形；而有細胞膜保護的實驗中是將人類淋巴球以完整細胞的形態進行反應，之後再將其 DNA 萃取出來觀察 DNA 氧化傷害之情形。

圖一是(+)Catechin 及海巴戟天葉四種溶劑萃取物對無細胞膜保護的淋巴球 DNA 氧化傷害之影響，在本實驗中採用已被公認具有 DNA 保護作用的(+)Catechin 做為正控制組，由圖中可以很明顯的看出加入氧化劑（如：氫氧自由基）確實會造成 DNA 產生氧化傷害進而降解成大小不一的片段(fragmented DNA)，而加入(+)Catechin 或海巴戟天葉的溶劑萃取物對於 DNA 也確實有明顯的保護作用，其中(+)Catechin 以濃度為 0.1 μg/mL，乙酸乙酯、50% 乙醇及純水萃取物皆以濃度為 100μg/mL 時的保護效果最明顯，且 DNA 降解的情形隨著濃度增加而跟著降低；絕對酒精萃取物在濃度 10 -0.1μg/mL 間 DNA 降解的情形隨著濃度增加而跟著降低，但在濃度為 100μg/mL 時其 DNA 降解的情形卻較 10μg/mL 還明顯，可能是由於絕對乙醇萃取物中所含多酚類化合物在高濃度下反而將金屬離子（Fe3+）還原，而增加・OH 或 OH- 的產生，導致促氧化作用的發生。
為了更進一步了解在細胞膜的存在下是否海巴戟天葉的溶劑萃取物亦有保護 DNA 氧化傷害的能力，故建立以氫氧自基誘導人類淋巴球 DNA 氧化模式（data not shown）， 隨著 H2O2, FeCl3, ascorbic acid 濃度的增加其 DNA 降解的情形也跟著增加的趨勢，但在 40 mM H2O2, 2 mM FeCl3, 4 mM ascorbic acid 濃度下其 DNA 降解的情形才較明顯故本實驗採用此濃度做為誘導人類淋巴球 DNA 氧化之濃度。圖二是(+)Catechin 及海巴戟天葉四種溶劑萃取物對有細胞膜保護的淋巴球 DNA 氧化傷害之影響，由圖中可以很明顯的看出 50% 乙醇及純水萃取物皆以濃度為 1 mg/mL 以上時的保護效果最明顯，而其 DNA 降解的情形隨著濃度增加而效果越顯著；而(+)Catechin、乙酸乙酯萃取物與絕對酒精萃取物以濃度為 100 μg/mL 時有保護效果，但濃度增加時不但沒有保護作用反而隨著給予的劑量增加，DNA 降解的情形也跟著增加，造成其氧化傷害更為嚴重。推測可能是海巴戟天葉的 50% 乙醇及純水萃取物與(+)Catechin、乙酸乙酯萃取物和絕對酒精萃取物所萃取出的多酚類抗氧化物質極性不同、成分不同所致；也有可能因為 50% 乙醇及純水萃取物中含有水溶性纖維，具有螯合鐵離子的效應，進而阻斷 Fenton reaction 的發生。

綜合以上兩組實驗可以確定海巴戟天葉的各萃取物不論在有或無細胞膜的情形下皆能減少・OH 所誘導淋巴球細胞 DNA 的氧化傷害，提供相當程度的保護作用，其中以絕對酒精所萃取的抗氧化物質能在 10 μg/mL 時發揮保護效果，效應最佳，但濃度提高時，也有促氧化的危險。

因本實驗是以 Fenton reaction 來產生氫氧自由基，根據過取本實驗室的抗氧化活性分析（11-15）發現 50% 乙醇及純水萃取物除了具有清除自由基及些微活性氧之能力外，皆在螯合鐵上有非常突出的能力，可能是造成兩者在高濃度下部會發生促氧化的原因。

六、參考文獻

1. Halliwell B. and Gutteridce J.M.C. (1989) Free radical in biology and medicine, 2nd ed., Clarendon Press, Oxford.
2. Halliwell B. (1996) Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. Free Radical Research. 25:55-74.
3. Gutteridge J.M.C. and Halliwell B.（1994）Antioxidants in nutrition health and disease, 1th edition, Oxford: Oxford University Press.
4. Pan H., Shi G., Chen W. and Wang D. （2003）Effect of lycopene on the function of antioxidative enzyme system in rats. Wei Sheng Yen Chiu/Journal of Hygiene Research. 32(5):441-2.
5. 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.
6. Bast A. and Haenen G.R.M.M.（2002）The toxicity of antioxidants and their metabolites. Environ. Toxicol. Pharmacol.11: 251-258.
7. Sang S., Cheng X., Zhu N., Stark RE., Badmaev V., Ghai G., Rosen R.T. and Ho C.T.（2001）Flavonol glycosides and novel iridoid glycoside from the leaves of Morinda citrifolia. J. Agric. Food Chem. 49: 4478-4481.
8. Zin Z.M., Abdul-Hamid A. and Osman A.（2002）Antioxidative activity of extracts from Mengkudu (Morinda citrifolia L.) root,fruit and leaf. Food Chem. 78: 227 – 231.
9. 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.
10. Chen, S. Y., T. P. Lin2, 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.
11. 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。
12. 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。
13. 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。
14. 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。
15. 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.
16. McConkey D. J., et al.（1989）Calcium-activated DNA fragmentation kills immature thymocytes. FASEB J. 3:1843-1849.

海巴戟天(Morinda citrifolia L.) 抗氧化與抗病毒活性研究
子計畫四：海巴戟天果實粗抽物抗毒性分析

整合型計畫總主持人：生物科技系葉東柏
主持人：保健營養系林翠品

一　摘要

海巴戟天（Morinda citrifolia, Rubiaceae）其俗名為 Noni。海巴戟天果實可以抑制肺癌及肉瘤的生長，也發現果實中的多醣類物質具有免疫調節的功能。此外，海巴戟天內所含的某些類的物質具有顯著抑制轉錄因子 AP-1。Epstein-Barr 病毒(EBV)屬於人類泡疹病毒， 感染後會引起鼻咽癌及淋巴瘤。證據顯示 EBV 可以藉由類似 AP-1 的轉錄因子 Zta 的活化，使病毒進入溶裂期而擴散至全身。因此，海巴戟天內應含有抗病毒的活性成分。所以本實驗的目的是要分析海巴戟天的萃取物之抗 EBV 效應及其萃取條件的評估。

主要是以酒精萃取海巴戟天之果實，並且以 Hexane、1-butanol 及 ethyl acetate 分劃酒精粗抽物，將所得到的萃取物進行細胞毒性及以免疫轉印法分析、鑑定海巴戟天萃取物之抗 EBV 的效應。在海巴戟天毒性試驗結果顯示，ethyl acetate 萃取物對於細胞毒性相較於其他分劃物高。在免疫轉印分析結果顯示，果實酒精粗萃取物作用濃度在 124　g/ml 具有抑制 EBV 溶裂蛋白 Zta、Rta 及 EAD 的表現作用，但是 Hexane、1-butanol 及 ethyl acetate 分劃物在濃度 124　g/ml 卻不具有抑制 EBV 溶裂蛋白 Zta、Rta 及 EAD 的表現的能力。

二、緣由與目的

在 2001 年 Sang 等人研究證實海巴戟天內所含的某些糖類的物質具有顯著抑制轉錄因子 AP-1。根據 Fixman 等人(1995)證據顯示 EBV 溶裂循環可以藉由類似 AP-1 的轉錄因子 Zta 的活化，使病毒擴散至全身。因此，海巴戟天內應含有抗病毒的活性成分。所以本實驗將以酒精製備海巴戟天果實萃取物並且進行抗 EBV 效應分析，也進一步以 Hexane、butanol、ethyl acetate 分劃海巴戟天果實酒精萃取物分離之抗 EBV 的成分。

三、材料與方法

（一）細胞培養與 EB 病毒溶裂生活史(lytic cycle)的誘導作用

P3HR1 是 Burkitt’s 淋巴瘤的細胞株，而且有 EBV 存在，培養時細胞必需維持在每毫升細胞數為 4×105 至 1×106，培養基為 RPMI 1640，同時在培養基中需要再添加 56 ℃加熱處理過的 10%胎牛血清(FCS)，60　g/ml penicillin 及 100　g/ml streptomycin。培養條件是在 37℃及 5 % CO2 補充的培養箱。EBV 溶裂生活史的誘導作用是將每毫升細胞數 2×106 的 P3HR1 經由 300 nM 的 trichostatin A (TSA) 所誘發。

（二）細胞的毒性分析

評估海巴戟天之葉（Noni-L）萃取物對 P3HR1 細胞株的生長抑制。將 2x104 的細胞數/ml 的 P3HR1 細胞株培養在 RPMI 1640 同時添加各種濃度的 Noni-L 萃取物，再培養四天。再將細胞以 trypan blue 染色，可以得到 CC50 的數值以作為海巴戟天對 P3HR1 細胞株的生長抑制的濃度。CC50 的定義是使細胞數目減少一半的抑制濃度。

（三）免疫轉印分析(Immunoblot analysis)

將 PH3R1 細胞以各種濃度的 Noni-L 萃取物處理一小時再添加 300 nM TSA 以誘導 EBV 溶裂生活史，經過 24 小時培養後將細胞溶解，得到的蛋白質以 SDS PAGE 進行電泳分析，再將電泳完畢的 SDS PAGE 置於浸濕的硝化纖維膜，以電泳的方式在 100 伏特進行一小時，將電白質轉印至的硝化纖維膜上。轉印後取出硝化纖維膜分別以稀釋 2000 倍的抗 EA-D 多株抗體，稀釋 1000 倍的抗 EBNA-1 多株抗體，稀釋 200 倍的抗 Rta 單株抗體及抗 Zta 單株抗體進行反應。最後蛋白質以 ECL 偵測試組進行分析。

四、結果

(一) 海巴戟天果實粗萃物的製備

1.果實酒精粗萃物

3.5 g 的果實粉末溶於 50 ml 的酒精在 50℃下萃取 24 小時所得到的產率為 11.8%。

2. 分劃果實酒精粗萃物

將果實酒精粗萃物進一步以 Hexane、butanol、ethyl acetate 進行分劃，所得到的產率分別為 27.2%、48.1% 及 1.0%。

(二) 細胞毒性的分析

將 5x104 的細胞數/ml 的 P3HR1 細胞株培養在 RPMI 1640 同時以 0、1.24、4.96、19.84、79.36 及 124 (g/ml)不同濃度的海巴戟天果實萃取物處理，每隔一天觀察細胞生長情形持續觀察三天。結果顯示果實酒精萃取物對細胞毒性相較於其他分劃的萃取物高，其中以 ethyl acetate 分劃物對細胞毒性較高（圖一）。

(三) 評估海巴戟天酒精粗萃物及其分劃物是否誘發 EBV 病毒溶裂循環

將 6x105cells/ml PH3R1 細胞以 30 ng/ml TPA 及 3 mM sodium butyrate(SB)處理，這兩個藥劑會誘導溶裂循環所需蛋白質的表現，如 Zta 蛋白，它可以結合在 AP-1 序列及 AP-1 序列類似的 Zta 反應元素(ZRE)上。在 orilyt、BRLF1、BZLF1 啟動子及早期基因啟動子上均有 ZRE 序列，因此可以被 Zta 所活化而表現 Rta 蛋白及早期蛋白。在海巴戟天的研究中發現含有某些糖.類的物質有抑制轉錄因子 AP-1 的活化，所以推測海巴戟天應該具有抑制

Zta 的活化作用，因此先以 Rta 蛋白作為偵測 EBV 病毒溶裂循環的指標。在評估海巴戟天粗萃物對 EBV 病毒溶裂循環是否抑制作用前必需先了解海巴戟天粗萃物是否會誘發 EBV 病毒溶裂循環。所以將 6x105cells/ml PH3R1 細胞以 0、0.78、1.56、3.12

95 FE Day 0 1 2 3 Cells / ml (10-5) 05

10

15

o ug/ml

T+SB

1.24 ug/ml

4.96 ug/ml

19.84 ug/ml

79.36 ug/ml

124 ug/ml

1-Butanol

Day

0 1 2 3

Cells / ml (10-5)

0

5

10

15

o ug/ml

T+SB

1.24 ug/ml

4.96 ug/ml

19.84 ug/ml

79.36 ug/ml

124 ug/ml

EtOAc

Day

0 1 2 3

Cells / ml (10-5)

0

5

10

15

20

25

o ug/ml

T+SB
1.24 ug/ml
4.96 ug/ml
19.84 ug/ml
79.36 ug/ml
124 ug/ml
EA aqueous
Day
0 1 2 3
Cells / ml (10-5)
0
5
10
15
20
o ug/ml
T+SB
1.24 ug/ml
4.96 ug/ml
19.84 ug/ml
79.36 ug/ml
124 ug/ml
Fig. 1 Toxicity of the ethanolic extract,
various fractionations of hexane,
1-butanol, and ethyl acetate for P3HR1
cell
Hexane
Day
0 1 2 3
Cells / ml (10-5)
0
5
10
15
o ug/ml
T+SB
1.24 ug/ml
4.96 ug/ml
19.84 ug/ml

79.36 ug/ml
124 ug/ml

及 6.25 (mg/ml)不同濃度的海巴戟天萃取物處理，經過 24 小時培養後將細胞溶解，得到的蛋白質以 SDS PAGE 進行電泳分析，再進行免疫轉印分析，結果顯示海巴戟天粗萃物不會誘發 EBV 的 Rta 蛋白表現，也可以表示海巴戟天各部分粗萃物不會誘發 EBV 病毒溶裂循環。

(四) 評估海巴戟天果實酒精粗萃物及其分劃物對 EBV 病毒溶裂蛋白質抑制作用

將 6x105cells/ml PH3R1 細胞以各種濃度的海巴戟天粗萃物處理一小時，然後再添加 TPA 及 SB 以誘導 EBV 溶裂循環，經過 24 小時培養後將細胞溶解，得到的蛋白質以 SDS PAGE 進行電泳，再進行免疫轉印，分析 Zta、Rta、EAD 及 EBNA1 蛋白，EBNA1 作為 internal control。結果顯示海巴戟天果實酒精粗萃物在濃度 124 g/ml 時可以有效抑制溶裂循環所需的蛋白質 Rta (69.28%)、EA-D (87.75%) 和 Zta (88.08%)，但是分劃物卻無法有效抑制溶裂蛋白的表現(圖二)。

Fig.2 Inhibitory effect of Ethanolic extracts and various fractionations for lytic proteins expression of EBV lytic cycle.

五、討論

海巴戟天果實酒精粗萃取物，在濃度 124 g/ml 時具有完全抑制 EBV 溶裂蛋白 Zta、Rta 及 EAD 的表現作用，但是分劃物並不能完全抑制 EBV 溶裂蛋白 Zta、Rta 及 EAD 的表現。是否在酒精粗萃物中具有抗 EBV 效應的成分經由分劃後流失或者是分布在各個分劃物，而導致分劃物在濃度 124 g/ml 時無法有效抑制 EBV 溶裂蛋白 Zta、Rta 及 EAD 的表現。

六、參考文獻

1. 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.
2. Hirazumi A. Furusawa E. Chou SC. And Hokama Y.（1996）Immunomodulation contributes to the anticancer activity of morinda citrifolia (noni) fruit juice. Proceedings of theWestern Pharmacology Society. 39:7-9.
3. 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.
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. 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.
7. Sang S., Liu G., He K., Zhu N., Dong Z., Zheng Q., Rosen RT. and Ho CT（. 2003）New unusual iridoid from the leaves of noni（Morinda citrifolia）show inhibitory effect on ultraviolet B-induced transcriptional activator protein-1 (AP-1) activity. Bioorganic and medicinal chemistry. 11:2499-502.
8. Chang LK.and Liu ST.（2000）Activation of the BRLF1 promoter and lytic cycle of Epstein-Barr virus by histone acetylation. Nuleic acids Res.28：3918-925.
9. Laux G., Freese K., Fischer R., Polack A., Hofler E. and Bornkamm G.（1988）TPA-inducible Epstein-Barr virus genes in raji cells and their regulation. Virology 162:503-7.
10. Chang LK., Wei TT., Chiu YF., Tung CP., Chuang JY., Hung SK, Li C. and Liu ST.（2003）inhibition of Epstein-Barr virus cycle by （-）-epigallocatechin gallate. Bichem. Biophsic.Res. Commun. 301:1062-68.
11. Lin JC.（2003）Mechanism of action of glycyrrhizic acid in inhibition of Epstein-Barr virus replication in vitro. Antiviral Res.59:41-7.
12. Zin ZM., Abdul-Hamid A. and Osman A（. 2002）Antioxidative activity of extracts from Mengkudu (Morinda citrifolia L.) root,fruit and leaf. Food Chem. 78: 227-231.
13. Hiwasa T. Arase Y. Chen Z. Kita K. Umezawa K. Ito H. Suzuki N.（1999）Stimulation of ultraviolet-induced apoptosis of human fibroblast UVr-1 cells by tyrosine kinase inhibitors. FEBS Letters 444:173-6.
14. Hiramatsu T. Imoto M. Koyano T. Umezawa K.（1993）Induction of normal phenotypes in ras-transformed cells by damnacanthal from Morinda citrifolia. Cancer Letters. 73:161-6.
15. Younos C. Rolland A. Fleurentin J. Lanhers MC. Misslin R. Mortier F.（1990） Analgesic and behavioural effects of Morinda citrifolia. Planta Medica. 56: 430-4.