

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)，台灣文獻則稱檳樹、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 citrifolinolide，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°C 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°C 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 $\cdot$ -diphenyl- $\cdot$ -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 (0.46x250mm) 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 20-200 μ L，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，並進行減壓或凍結干燥。干燥樣品溶於 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 μ m)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 ΔA_{492} 計 225.25 Trlox 相當量 83.11 44.81 353.18 ($\mu g/mg$) 以 ΔA_{595} 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)

$y = 4.7437x - 0.1299$

$R^2 = 0.9994$

0

20

40

60

80

100

0 4 8 12 16 20

Trolox ($\mu g/mL$)

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 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., Alike 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 anthraquinone 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. Pharmacogn. 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) Polyphenolic flavonols as scavengers of aqueous phase

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

