科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

＊ ********* ********** ＊
＊ 計　畫 ＊
＊ ： 桃斑鳩菊降尿酸與抗血壓活性分析 ＊
＊ 名　稱 ＊
＊ ********* ********** ＊

執行計畫學生： 葉若誼
學生計畫編號： MOST 106-2813-C-041-007-B
研 究 期 間 ： 106 年 07 月 01 日至 107 年 02 月 28 日止，計 8 個月
指 導 教 授 ： 蕭慧美

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

執 行 單 位： 嘉藥學校財團法人嘉南藥理大學保健營養系（含碩士班）

中華民國 107 年 03 月 12 日

桃斑鳩菊降尿酸與抗血壓活性之體外分析

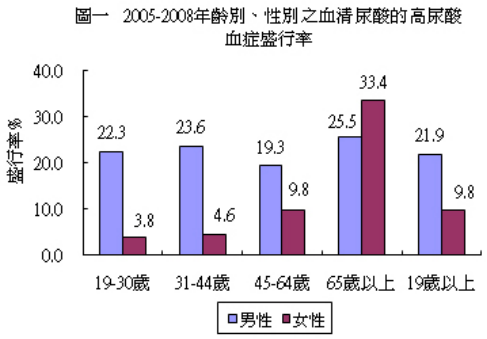
An in vitro assay for anti-hyperuricemic and anti-hypertensive effect of *Vernonia amygdalina Delile*

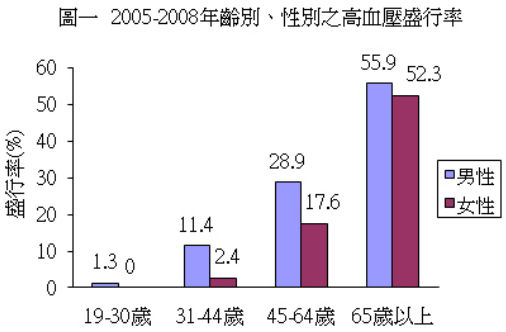
摘要

Vernonia amygdalina Delile (VAD) is a common edible vegetable in African country and also used as a folk medicine in Taiwan for treatment of diabetes, hypertension and hyperuricemia. Hyperuricemic population is increasing recently in Taiwan and is considered to be associated with cardiovascular disease, hypertension and metabolic syndrome. However, there is no scientific evidence has been report up to the present. This study aims to evaluate the potential effect of anti-hyperuricemic and anti-hypertension in VAD by in vitro inhibition of xanthine oxidase (XO) and Angiotensin-converting enzyme (ACE) activity. The hot water extract of VAD leaves was used for inhibition assay. The IC_{50} value is expressed as the concentration of sample that is able to inhibit 50% of the enzyme activity. VAD extract showed an inhibition effect in XO with IC_{50} 2.44 mg/ml, ACE with IC_{50} 190.9 μg/ml in vitro. In conclusion, VAD could be a good candidate for anti-hyperuricemia and anti-hypertension. But further investigation is needed.

Keyword: Xanthine oxidase, Angiotensin-converting enzyme, *Vernonia amygdalina Delile*

文獻回顧





資料來源:行政院衛生福利部國民健康署

國人的高酸盛行率，根據 2005-2008 年的台灣營養健康狀況變遷調查結果為男性 21.9%、女性 9.8% (如上圖左)。高血壓盛行率也漸年輕化隨年紀增加盛行率也逐漸上升(如上圖右)且居台灣 105 年國人十大死菸的第五名，所以不能不注 意。

高尿酸血症除了是引發痛風的重要因素外，目前許多研究認為肥胖、代謝症候群、高血壓、心血管疾病、和腎臟病之發生率有關。高尿酸和高血壓發生率漸高，主要也是和飲食習慣有關。國人對於保健食品的使用也越來越廣泛，坊

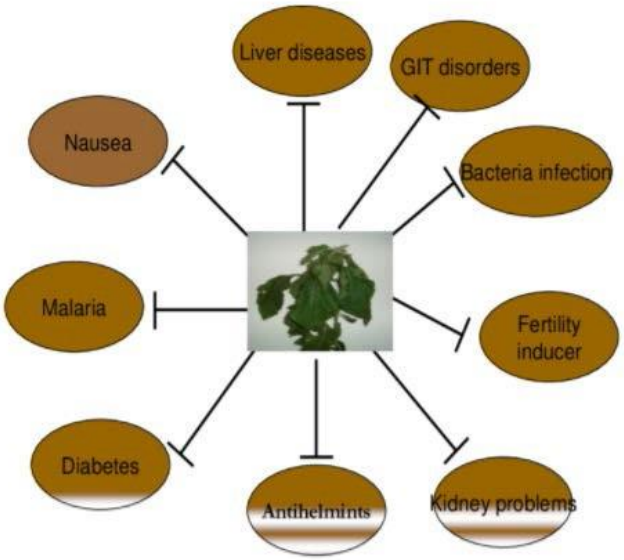
間也會有很多偏方。

現在已經有很多研究報導提到植物多酚類對人體的好處，特別是含有 flavonols, flavones, flavanones, catechins, anthocyanidins, isoflavones 等類黃酮(Flavonoids)，更具有許多生理與藥理功能。類黃酮具有抗氧化功能、 酵素抑制能力與自由基清除能力，也包含抑制 XOR(Ponce et al.2000)以及降血壓 功效(Qinet al.2009)。降尿酸的動物實驗，發現 Kaempferol、Myricertin、 Quercetin、Morina 、 Puerarin(Mo et al.2007) 、 Anthhocyanin(Hwa et al.2011) 、 Procyanidins(Wang et al.2004)和 Resveratrol (shi et al.2012)、Hesperetin 都有降低血清尿酸(Haidari et al.2009)。Hugela(2016)等人介紹了可可、茶類、莓果類、柑橘 類、與洛神的類黃酮具有降血壓的功效。

桃斑鳩菊的特色: 坊間使用的南非葉，名稱為桃斑鳩菊，菊科，學名 *Vernonia amygdalina Delile*。還有許多別名如尖尾鳳、乾連、苦樹、神奇葉、苦茶葉、南非葉。原產 於熱帶非洲。在台灣庭園也常見栽培。性味：(葉)味苦、澀、性寒。中藥功能 包含清熱、解毒、消炎、收斂、殺蟲。也應用於熱病、高血壓、肝炎、咳嗽、 哮喘、瘧疾、胃疼痛、腹瀉、痢疾、糖尿病、線蟲病、血吸蟲病。

目前市面上也有販賣南非葉茶包並號稱是南非國寶茶、網路也流傳生吃葉片、或樹葉曬乾後泡茶飲用，據說可以抗癌治百病降血壓降血糖。經過研究文獻蒐集發現，動物實驗證實南非葉具有降血糖、抗癌、護肝等功效(請參考下圖)(Farombi & Owoeye 2011)。臨床試驗也有抗蟲功效。

Figure 1. Traditional uses of Vernonia amygdalina (Bitter leaf).



雖然民間流傳南非葉可降尿酸或降血壓，但是還沒看到相關報導。所以這個實驗要來探討南非葉萃取液對於降尿酸和降血壓的潛在功效。以體外 XO 酵素活性抑制效率作為降尿酸的功效以及體外 ACE 活性抑制效率作為降血壓之預測試驗，希望先以體外簡單快速的方法來確認南非葉的功效， 以便作為未來進一步的研究探討的依據。

材料與方法：

1.水萃物製備:

將南非葉採收後，取葉子水洗晾乾，秤重後置入-80℃冰箱過夜後，以冷凍乾燥機將葉片乾燥，再以粉碎機粉碎至粉末。取 10 克南非葉粉末加入 1000ml RO 水後，加熱煮沸 10 分鐘，經減壓濃縮(40℃ 90rpm)、冷凍乾燥取得乾燥萃出物粉末並秤重保存。

2.類黃酮含量分析

利用 2-aminoethyl diphenyl broate reagent 氧化測定類黃酮含量，以濃度範圍 0.8~0mg/mL 的 rutin 作為標準曲線，換算樣品之 rutin 含量。實驗組取 0.5mL 的樣品，首先加入 1.5mL 的 95% Ethanol，然後加入 0.1mL 的 10%AlCl 3 ，再加入 0.1mL 的 1M CH 3 COOH，最後加入 2.8mL 的二次水，室溫下反應 30 分鐘，以分光光度計於 415nm 下測定吸光值。扣色組則是將加入 0.1mL 的 10%AlCl 3 改為加入 0.1mL 的二次水，其他步驟與實驗組並無差異。

3.總酚類分析

利用 Folin-Ciocalteu 比色法測定總酚類含量，以濃度範圍 0.5~0mg/mL 的 gallic acid 作為標準曲線，換算樣品之 gallic acid 含量。取 0.1mL 的樣品，加入 2mL 的 2%Na2CO3 反應 2 分鐘，最後加入 0.1mL 的 Folin-Ciocalteus phenol reagent，室溫下反應 30 分鐘後，以分光光度計於 750nm 下測定吸光值。

4.ACE 活性抑制試驗

ACE 活性抑制試驗室採用 Hip-His-Leu 水解法(Chen et al.2013)來分析。每個樣品先和 570ul quinolone、230ul of Benzone sulfony chloride 混合震盪。至於黑暗中以 30℃靜置 30 分鐘後再加入 3.7 ml ethanol。上述混合溶液於 492nm 下測定吸光 值。ACE 活性抑制百分比的計算公式如下:

%Inhibitory activity = 100 × (A-C)/(A-B)

ABC 分別是指空白組、對照組和樣品組在 492nm 下的吸光值。IC50 數值是指可抑制 ACE 活性 50%的樣品濃度。本實驗以合成的 ACE 抑制劑 Captopril 作為對照。

5.體外黃嘌呤氧化酶(Xanthine)

(1) 分析:以黃嘌呤作為受質，加入黃嘌呤氧化酶後，會因為生成尿酸進而在

290nm 吸光下策定期產量。如果同時加入 Allopurinol 或是具有抑制黃嘌呤氧化酶活性的類黃酮成分，將會減少尿酸產量，可藉由測定 290nm 之吸光值來計算其活性抑制率。

(2) 黃嘌呤氧化酶活性抑制率%計算=1-(樣品吸光值-背景吸光值)/(無樣品時吸光值-背景值吸光值)

(3) 以 IC50 來比較南非葉與其他樣品的抑制效率

結果與討論

表一為南非葉乾燥後及萃取物之基本資料，其乾物比率為 14.18%，表示含水量達 86%；將乾燥粉末以沸水萃取 10 分鐘後可得約 10%的萃取乾物。

表二為總酚類含量約 103mg/mL，其中類黃酮僅約 27mg/mL，若換算為百分比約佔 26.2%，所以類黃酮可能不是最主要的多酚成分，尚有 74%的其他多酚成分為何種物質需要再進一步分析。

本實驗所測定的 XO 與 ACE 酵素抑制作用分別用以檢測南非葉的降尿酸與降血壓功效。

尿酸是體內黃嘌呤的分解產物，而黃嘌呤氧化酶(Xanthine oxidase,XO)是催化體內尿酸生成的決定性酵素，所以大部分控制痛風病患的血清尿酸的藥物，就是利用抑制 XO 酵素活性來達到降低尿酸之作用。

結果如表三所示:桃斑鳩菊 XO 活性抑制率曲線計算出 IC_{50} 平均值為 2.44mg/ml± 0.1；Allopurinol XO 活性抑制率曲線計算出 IC_{50} 平均值為 3.7ug/ml± 0.1。雖然抑制活性遠低於 Allopurinol，但是抑制活性高於本實驗室先前所分析的苦藤 (IC_{50} 10.85 mg/mL)，因此應具有進一步抑制動物血漿尿酸之潛在功效。

體內的血壓調節機制以血管收縮素轉換酶(Angiotensin- converting enzyme, ACE) 佔決定性角色，許多降血壓藥物原理也是透過抑制 ACE 活性來作用。結果如表三所示，桃斑鳩菊的 ACE 活性抑制 IC50 為 190μg/mL，低於本實驗是先前所分析的七層塔(56.63)、狼尾草(93.43)與白鳳菜(169)，因此推測其降血壓效率應較弱，較不具發展潛力。

根據降尿酸的動物實驗，發現 kaempferol、Myricertin、Quercetin、Morina、Puerarin (Mo et al. 2007)、Anthocyanin (Hwa et al. 2011)、Procyanidins (Wang et al. 2004) 和 Resveratrol (Shi et al. 2012)、Hesperetin 都有降低血清尿酸(Haidari et al. 2009)。Hügela (2016)等人介紹了可可、茶類、莓果類、柑橘類與洛神的類黃酮具有降血壓的功效。雖然得知南非葉的總多酚含量和類黃酮含量和降血壓、降尿酸可能有關，但是其中所含之類黃酮種類尚未進一步分析，仍無法做有效推斷，目前僅能以體外試管試驗作為參考依據。

本實驗利用體外試驗之結果推測，南非葉在降尿酸的潛力應比降血壓來得有效，可做為未來動物模式建議依據與研究，另外未來針對多酚類的種類分析也有助於功效評估之推論與驗證。

附表

表一 南非葉採樣基本資料

	原葉片濕重 (g)	乾重 (g)	葉片乾重比 (%)	原乾燥粉末 (g)	抽出物乾 (g)	抽出比率 (%)
南非葉	95.2	13.5	14.18	10	1.0584	10.58

表二 南非葉萃出物之類黃酮和總酚類含量

	南非葉萃出物(mg/g) extract
類黃酮含量	27.0± 1.0
總酚類含量	103.1 ±7.0

1. . Each value represents mean ± SD of triplicate analysis.

表三 ACE 酵素活性抑制情形

	IC50	
	XO (mg/mL)	ACE (μg/mL)
南非葉萃出物	2.44 ± 0.10	190.9
Captopril	NA	0.0021
Allopurinol	3.7±0.1(μg/mL)	NA

1. Each value represents mean ± SD of triplicate analysis. NA: not applicable.

參考資料

Chen J, Wang Y, Ye R, Wu Y, Xia W. Comparison of analytical methods to assay inhibitors of angiotensin I-converting enzyme. Food Chemistry. 2013, 141: 3329–3334.

Christel, Q.D., Bernard, G., Jacques, V., Thierry, D., Claude, B., Michel, L., Micheline, C., Jean-Cluade , C. and Francis, T. (2000) Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (Fagopyrum esculentum Moench) hulls and flour. *J. Ethnopharmacol.*, 72: 35-42.

Farombi EO and Owoeye O. Antioxidative and chemopreventive properties of Vernonia amygdalina and Garcinia biflavonoid. Int. J. Environ. Res. Public Health 2011, 8, 2533-2555; doi:10.3390/ijerph8062533

Haidari F, Keshavarz SA, Rashidi MR, Shahi MM. Orange juice and hesperetin supplementation to hyperuricemic rats alter oxidative stress markers and xanthine oxidoreductase activity. J Clin Biochem Nutr. 2009; 45: 285-91.

Hügela HM, Jacksona N, May B, Zhang AL, Xue CC. Polyphenol protection and treatment of hypertension. Phytomedicine 23 (2016) 220–231.

Hwa KS, Chung DM, Chung YC, Chun HK. Hypouricemic effects of anthocyanin extracts of purple sweet potato on potassium oxonate-induced hyperuricemia in mice. Phytother Res. 2011; 25: 1415-17.

Mo SF, Lv YZ, Hu QH, Zhang DM, Kong LD (2007) Hyperuricemic action of selected flavonoids in mice: structure-activity relationships. Biol Pharm Bull 30(8):1551-1556.

Qin FZ, Lin X, Zhang XD, Huang RB, Antihypertensive effect and its mechanism of Persimmon leaf flavonoid. Guangxi Sciences 2009, 16(3):310-313

Sato, MN. Ramarathnam, Y. Suzuki, T. Ohkubo, M.Takeuchi and H. Ochi: Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources. *J. Agric. Food Chem.*, 44: 37-41 (1996).

Shi YW, Wang CP, Liu L, Liu YL, Wang X, Hong Y, Li Z, Kong LD. Antihyperuricemic and nephroprotective effects of resveratrol and its analogues in hyperuricemic mice. Mol Nutr Food Res. 2012 Sep;56(9):1433-44

Wang Y, Zhu JX, Kong LD, Yang C, Cheng CHK, Zhang X. Administration of procyanidins from grape seeds reduces serum uric acid levels and decreases hepatic xanthine dehydrogenase/oxidase activities in oxonate-treated mice. Basic & Clin Pharmacol Toxicol. 2004; 94: 232-7.

行政院衛生福利部國民健康署，台灣營養健康狀況變遷調查 2005-2008 國人尿酸及痛風之狀況；http://nahsit-form.ibms.sinica.edu.tw/node/20, 2010

行政院衛生福利部國民健康署，台灣營養狀況變遷調查： 2005-2008 國人高血壓之狀況。http://nahsit-form.ibms.sinica.edu.tw/public_frontpage?page=3