

# 彩葉草萃取物之抗氧化能力與細胞試驗

莊鼎彬、瑞澤

E-mail: 343845@mail.dyu.edu.tw

## 摘要

本研究以熱迴流方式利用不同溶劑(水、甲醇、乙醇、乙酸乙酯和正己烷)萃取、不同前置處理之彩葉草(新鮮彩葉草、日曬、40、60、80和100)。探討不同萃取條件對抗氧化能力之影響。抗氧化能力分析包括：總多酚類與類黃酮含量、對DPPH 自由基的清除能力、還原力、亞鐵離子螯合能力、清除超氧陰離子能力、清除ABTS 陽離子能力及抑制微脂粒氧化作用能力，並與BHA、EDTA及沒食子酸之抗氧化能力做比較。同時對彩葉草萃取物抗氧化能力高的部份進行成分分析與細胞試驗。實驗結果顯示，新鮮彩葉草以不同溶劑萃取，萃取物之萃取率和總多酚含量皆是水萃取物最高，而類黃酮含量則是乙酸乙酯萃取物最高。在抗氧化能力分析方面，皆是新鮮彩葉草萃取物表現較佳，清除DPPH 自由基能力試驗，以水和乙酸乙酯萃取物最佳，其IC50皆小於0.01 mg/mL；相對還原力試驗，以水萃取物最佳，其IC50為 $0.7 \pm 0.00$  mg/mL；清除ABTS 陽離子試驗，以乙酸乙酯萃取物最佳，其IC50小於0.01 mg/mL；螯合亞鐵離子能力試驗，以水萃取物最佳，其IC50為 $0.13 \pm 0.02$  mg/mL；清除超氧陰離子能力試驗，以水萃取物最佳，其IC50為 $0.35 \pm 0.00$  mg/mL；抑制微脂粒氧化作用，以正己烷萃取物最佳，其IC50為 $3.89 \pm 0.14$  mg/mL。萃取物成分分析，以新鮮彩葉草水和乙酸乙酯萃取物進行HPLC 分析，與標準品迷迭香酸比對後，確認皆含有迷迭香酸成分，滯留時間為2-3 min 之間，以水萃取物含量較高，為232.09 mg/g。長期貯存萃取物，其主要成分迷迭香酸含量會降低。於細胞實驗，發現新鮮彩葉草水萃取物對HepG2細胞生存率之影響，濃度為400  $\mu$ g/mL時，其細胞存活率為47.1%，而對PC-12細胞生存率之影響並不顯著，濃度為400  $\mu$ g/mL時，其存活率為76.6%。另外，新鮮彩葉草水萃取物具有保護PC-12細胞免受氧化壓力之傷害，於缺血再灌注之模式中，未添加保護劑之細胞其存活率為35.8%，而添加濃度為400  $\mu$ g/mL時，其存活率為48.8%。而以H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>誘導PC-12細胞凋亡之保護效果方面，未添加保護劑之細胞其存活率為46.0%，而添加濃度為100  $\mu$ g/mL時，其存活率為66.1%。綜合研究結果顯示，新鮮彩葉草萃取物之抗氧化能力效果最佳，總酚和類黃酮含量較多，亦可抑制肝癌細胞生長並可保護神經不受氧化壓力之傷害。此結果將有助於機能性食品之開發，與後續更深入研究之基礎。

關鍵詞：彩葉草、抗氧化、迷迭香酸、人類肝癌細胞、大鼠腎上腺嗜鉻瘤細胞、細胞存活率分析

## 目錄

目錄 封面內頁 簽名頁 中文摘要iii 英文摘要v 誌謝vii 目錄viii 圖目錄xi 表目錄xiv 1. 緒論1 2. 文獻回顧2 2.1 彩葉草簡介2 2.2 彩葉草之種類2 2.3 自由基之介紹4 2.3.1 自由基的定義4 2.3.2 自由基在生物上的作用5 2.3.3 自由基的產生和清除6 2.4 抗氧化劑介?及其分類6 2.5 迷迭香酸9 2.5.1 簡介9 2.5.2 迷迭香酸生合成12 2.5.3 迷迭香酸的生物活性12 3. 材料與方法15 3.1 植物材料15 3.2 藥品15 3.3 儀器16 3.4 實驗方法17 3.4.1 實驗架構17 3.4.2 植物萃取之製備20 3.4.3 抗氧化分析23 3.4.4 迷迭香酸分析26 3.4.5 細胞株27 3.4.6 培養基與試劑配製27 3.4.7 細胞分析31 4. 結果與討論37 4.1 新鮮彩葉草之不同溶劑熱迴流萃取37 4.1.1 萃取率37 4.1.2 抗氧化成分含量分析34 4.1.3 抗氧化能力分析40 4.2 不同乾燥處理彩葉草之熱迴流萃取50 4.2.1 萃取率50 4.2.2 抗氧化成分含量分析52 4.2.3 抗氧化能力分析54 4.3 日曬乾燥處理彩葉草之不同溶劑熱迴流萃取64 4.3.1 萃取率64 4.3.2 抗氧化成分含量分析64 4.3.3 抗氧化能力分析67 4.4 彩葉草之成分分析78 4.4.1 新鮮彩葉草水與乙酸乙酯萃取物之HPLC分析78 4.4.2 貯存期間之迷迭香酸含量變化83 4.5 細胞試驗86 4.5.1 細胞存活率分析86 4.5.2 細胞保護能力試驗85 5. 結論94 5.1 結論94 5.2 未來展望95 參考文獻96 附錄101 圖目錄 圖2.1 彩葉草(a)葉子、(b)花3 圖2.2 細胞中含氧和含氮自由基之生成7 圖2.3 細胞中含氧和含氮自由基之去除8 圖2.4 迷迭香酸的結構式10 圖2.5 迷迭香酸生合成路徑13 圖3.1 實驗流程圖18 圖3.2 抗氧化活性分析19 圖3.3 萃取流程21 圖3.4 熱迴流萃取裝置22 圖3.5 細胞實驗流程33 圖3.6 細胞存活率分析34 圖4.1 不同溶劑萃取彩葉草對清除DPPH自由基能力之影響41 圖4.2 不同溶劑萃取彩葉草之相對還原力之影響43 圖4.3 不同溶劑萃取彩葉草對螯合亞鐵離子能力之影響45 圖4.4 不同溶劑萃取彩葉草對清除ABTS陽離子能力之影響46 圖4.5 不同溶劑萃取彩葉草對清除超氧陰離子能力之影響48 圖4.6 不同溶劑萃取彩葉草對抑制微脂粒氧化作用之影響49 圖4.7 不同乾燥處理之彩葉草萃取物對清除DPPH自由基能力之影響55 圖4.8 不同乾燥處理之彩葉草萃取物之相對還原力之影響57 圖4.9 不同乾燥處理之彩葉草萃取物對螯合亞鐵離子能力之影響59 圖4.10不同乾燥處理之彩葉草萃取物對清除ABTS陽離子能力之影響60 圖4.11不同乾燥處理之彩葉草萃取物對清除超氧陰離子能力之影響62 圖4.12不同乾燥處理之彩葉草萃取物對抑制微脂粒氧化作用之影響63 圖4.13日曬乾燥彩葉草不同溶劑萃取之萃取物對清除DPPH自由基能力之影響68 圖4.14日曬乾燥彩葉草不同溶劑萃取之萃取物對相對還原力之影響70 圖4.15日曬乾燥彩葉草不同溶劑萃取之萃取物對螯合亞鐵離子能力之影響72 圖4.16日曬乾燥彩葉草不同溶劑萃取之萃取物對清除ABTS陽離子能力之影響73 圖4.17日曬乾燥彩葉草不同溶劑萃取之萃取物對清除超氧陰離子能力之影響75 圖4.18日曬乾燥彩葉草不同溶劑萃取之萃取物對抑制微脂粒氧化作用之影響76

圖4.19新鮮彩葉草水熱迴流萃取萃取物之HPLC分析圖79 圖4.20迷迭香酸之HPLC層析圖80 圖4.21新鮮彩葉草水熱迴流萃取萃取物之HPLC分析圖82 圖4.22貯存期間新鮮彩葉草水萃取物對清除DPPH自由基能力之影響85 圖4.23新鮮彩葉草水萃取物之存活率分析87 圖4.24標準品迷迭香酸之存活率分析88 圖4.25缺血再灌流模式下新鮮彩葉草萃取物對PC-12之保護效果90 圖4.26H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>對PC-12細胞之存活率分析91 圖4.27新鮮彩葉草萃取物對H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>誘導PC-12細胞凋亡之保護效果93 表目錄表2.1 植物界中含迷迭香酸之分布11 表3.1 HepG2細胞之培養基28 表3.2 PC-12細胞之培養基29 表3.3 磷酸鹽緩衝液溶液配方30 表4.1 不同溶劑萃取彩葉草之萃取率38 表4.2 不同溶劑萃取之彩葉草總酚及總類黃酮含量39 表4.3 不同溶劑萃取彩葉草之半數效應濃度(IC<sub>50</sub>)42 表4.4 不同乾燥處理之彩葉草萃取率51 表4.5 不同乾燥處理之彩葉草總酚與總類黃酮含量53 表4.6 不同乾燥處理彩葉草之半數清除濃度(IC<sub>50</sub>)56 表4.7 日曬乾燥彩葉草不同溶劑萃取之萃取率65 表4.8 日曬乾燥彩葉草不同溶劑萃取之總酚及總類黃酮含量66 表4.9 日曬乾燥彩葉草不同溶劑萃取之半數清除濃度(IC<sub>50</sub>)69 表4.10新鮮彩葉草萃取物之迷迭香酸含量81 表4.11貯存期間之迷迭香酸含量變化84

## 參考文獻

- 1.王春萍。2007。彩葉草再生體系的建立及其遺傳轉化的初步研究。西南大學碩士論文。重慶。
- 2.林宥彤。2010。蜂王乳之免疫調節活性及對人類白血病細胞(U937)之抑制效果。大葉大學生物產業科技學系碩士論文。彰化。
- 3.林佩伶、王正新、賴麗旭。2006。不同乾燥處理對小麥苗粉水萃取物抗氧化性之影響。台灣農業化學與食品科學 44(1):7-15。
- 4.洪熒環。2003。不同加工處理對小麥草抗氧化性質之影響。靜宜大學食品營養學系碩士論文。台中。
- 5.夏文茹。2010。彩葉草之葉片性狀遺傳及遮光對商業品種及雜交後代生長之影響。國立台灣大學生物資源暨農學院園藝學系碩士論文。台灣。
- 6.張慧英、季衛忠。2006。彩葉草新品。中國花卉園藝 半月刊 24:46-47。
- 7.莊培挺、王鐘毅、吳思敬、曾慶瀛。2006。明日葉之一般組成及抗氧化性質。臺灣農業化學與食品科學 44(3):181-191。
- 8.曾鈺珊。2008。奈米幾丁聚醣粒子於口腔黏膜細胞穿透之研究。大葉大學生物產業科技學系碩士論文。彰化。
- 9.黃龍江。2002。迷迭香酸衍生物的合成及其抗菌性質研究。青島大學碩士論文。青島。
- 10.翟婷。2008。迷迭香中迷迭香酸的提取純化及提取物活性測定的研究。廣西大學碩士論文。廣西。
- 11.劉立偉。2008。咸豐草與楓香之抗氧化性及成分分析。大葉大學生物產業科技學系碩士論文。彰化。
- 12.劉易修。2008。康復力與夜交藤之抗氧化活性研究。大葉大學生物產業科技學系碩士論文。彰化。
- 13.蔡瑞齡。2009。蔡葉草之抗氧化活性及成分分析。大葉大學生物產業科技學系碩士論文。彰化。
- 14.鞠倩。2007。生長調節劑及蔗糖濃度對彩葉草組織培養物迷迭香酸含量的影響。山東農業大學碩士論文。山東。
- 15.蘇苑菱。2007。八種藥用植物之抗氧化性研究。大葉大學生物產業科技學系碩士論文。彰化。
- 16.Almeida F. C. G. and I. P. Lemonica, 2000, The toxic effects of *Coleus barbatus* B. on the different periods of pregnancy in rats, *Journal of Ethnopharmacology*, 73: 53-60.
- 17.Arnau, M. B., A. Cano and M. Acosta, 2001, The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity, *Food Chemistry*, 73: 239-244.
- 18.Benzie, I. F. and J. J. Strain, 1996, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': the FRAP assay, *Analytical Biochemistry*, 239: 70-76.
- 19.Bonoli, M., V. Verardo, E. Marconi, and M. F. Caboni, 2004, Antioxidant phenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 5195-5200.
- 20.Christel, Q. D., G. Bernard, V. Jacques, D. Thierry, B. Claude, L. Michel, C. Micheline, C. Jean-Cluade, B. Francois and T. Francis, 2000, Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour, *Journal of Ethnopharmacology*, 72: 35-42.
- 21.Crispo, J. A. G., M. Piche, D. R. Ansell, J. K. Eibl, I. T. Tai, A. Kumard, G. M. Ross, T. C. Tai, 2010, Protective effects of methyl gallate on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in PC12 cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 393: 773-778.
- 22.Fang, Y. Z., S. Yang and G. Wu, 2002, Free Radicals, antioxidants, and nutrition, *Nutrition*, 18:872 – 879.
- 23.Gao, L. P., H. L. Wei, H. S. Zhao, S. Y. Xiao, R. L. Zheng, 2005, Antiapoptotic and antioxidant effects of rosmarinic acid in astrocytes, *Pharmazie*, 60:62-65.
- 24.Kumaran, A. and R. Joel karunakaran, 2006, Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*, *Food Chemistry*, 97: 109-114.
- 25.Lai, L. S., S. T. Chou and W. W. Chao, 2001, Studies on the antioxidative activities of Hsian-tiao (*Mesona procumbens* Hemsl) leaf gum, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2): 963-968.
- 26.Liao, K. L. and M. C. Yin, 2000, Individual and combined antioxidant effects of seven phenolic agents in human erythrocyte membrane ghosts and phosphatidylcholine liposome systems: importance of the partition coefficient, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 2266-2270.
- 27.Lima, C. F., M. Fernandes-Ferreira, C. Pereira-Wilson, 2006, Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: Relevance of glutathione levels, *Life Sciences*, 79:2056-2068.
- 28.Lin, C. S., C. L. Kuo, J. P. Wang, J. S. Cheng, Z. W. Huang and C. F. Chen, 2007, Growth inhibitory and apoptosis inducing effect of *Perilla frutescens* extract on human hepatoma HepG2 cells, *Journal of Ethnopharmacology*, 112:557-567.
- 29.Makris, D. P., E. Psarra, S. Kallithraka and P. Kefalas, 2003, The effect of polyphenolic composition as related to antioxidant capacity in white wines, *Food Research International*, 36: 805-814.
- 30.Marete, E. N., J. C. Jacquier, D. O' Riordan, 2009, Effects of extraction temperature on the phenolic and parthenolide contents, and colour of aqueous feverfew (*Tanacetum parthenium*) extracts, *Food Chemistry*, 117: 226-231.
- 31.Narayanan, K. B. and N. Sakthivel, 2010, Phytosynthesis of gold nanoparticles using leaf extract of *Coleus amboinicus* Lour, *Materials Characterization*, 61(11): 1232-1238.
- 32.Peltzer, D., E. Dreyer and A. Polle, 2002, Differential temperature dependencies of antioxidative enzymes in two contrasting species: *Fagus sylvatica* and *Coleus blumei*, *Plant Physiology and Biochemistry*, 40:141-150.
- 33.Petersen, M. and M. S. J. Simmonds, 2003, Rosmarinic acid, *Phytochemistry*, 62: 121-125.
- 34.Petersen, M., 1997, Cytochrome P450-dependent hydroxylation in the biosynthesis of rosmarinic acid in *Coleus*, *Phytochemistry*, 45:1165-1172.
- 35.Petersen, M., Y. Abdullah, J. Benner, D. Eberle, K. Gehlen, S. Hucherig, V. Janiak, K. H. Kim, M. Sander, C. Weitzel and S. Wolters, 2009, Evolution of rosmarinic acid biosynthesis, *Phytochemistry*, 70:1663-1679.
- 36.Phuong N.

and D. C. Valeriano, 2009, The role of light on foliage colour development in coleus (*Solenostemon scutellarioides* (L.) Codd), *Plant Physiology and Biochemistry*, 47:934-943. 37.Silva, J. P., A. C. Gomes, O. P. Coutinho, 2008, Oxidative DNA damage protection and repair by polyphenolic compounds in PC12 cells, *European Journal of Pharmacology*, 601:50-60. 38.Wang, C. J. and G. C. Yen, 2011, Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: Phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives, *Cancer Treatment Reviews*, 37: 1-12. 39.Yildirim, A., A. Mavi and A. A. Kara, 2001, Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 4083-4089.