

# 彩葉草之抗氧化活性及成分分析

蔡瑞齡、?瑞澤；吳淑姿

E-mail: 9806217@mail.dyu.edu.tw

## 摘要

本研究以彩葉草為材料，以水為溶劑進行冷搾萃取與熱迴流萃取，探討不同萃取方法對抗氧化活性之影響，並比較彩葉草的莖部與葉部之抗氧化活性。於熱迴流萃取後，再以正己烷、乙酸乙酯及水為溶劑進行分配萃取，探討不同溶劑對抗氧化活性之影響。抗氧化活性試驗包括：總多酚類與類黃酮含量、對DPPH自由基的清除能力、亞鐵離子螯合能力、還原力、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、 $\alpha$ -生育醇及沒食子酸之抗氧化性做比較。並對彩葉草抗氧化活性高的部份進行成分分析。

實驗結果顯示，以水為溶劑進行冷搾萃取，所得萃取物之萃取率，葉部高於莖部，分別為2.23%與1.75%。試驗結果以葉部之抗氧化活性較佳，其總多酚與類黃酮含量分別為14.5與4.49 mg/g；於清除DPPH自由基能力試驗中，其IC<sub>50</sub>為0.08 ± 0.00 mg/mL；於相對還原力試驗中，其IC<sub>50</sub>為7.55 ± 0.53 mg/mL；於清除ABTS陽離子試驗中，其IC<sub>50</sub>為0.19 ± 0.02 mg/mL；於螯合亞鐵離子能力試驗中，以莖部之抗氧化活性較佳，其IC<sub>50</sub>為0.18 ± 0.00 mg/mL。另外，比較冷搾萃取與熱迴流萃取方法，以熱迴流萃取之彩葉草葉部萃取物之抗氧化能力較佳。以水為溶劑進行熱迴流萃取，再經正己烷、乙酸乙酯及水為溶劑進行分配萃取，其萃取率以葉部水層萃取物最高，為7.36%。於清除DPPH自由基能力試驗中，以葉部乙酸乙酯萃取物之抗氧化能力較佳，其IC<sub>50</sub>為0.01 ± 0.00 mg/mL。於成分分析部分，以葉部與莖部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，以葉部含量較高，為383.7 mg/g。在FTIR分析方面，其有C—O、C=C、C=O及O—H特徵吸收，與標準品迷迭香酸比對後，確認皆含有迷迭香酸成分。在LC/MS/MS分析方面，m/z 359.1相對含量最高，與文獻比對之後，確認為迷迭香酸。

綜合研究結果顯示，彩葉草以水熱迴流萃取所表現的抗氧化能力比水冷搾萃取高，葉部比莖部之抗氧化能力較高，其原因為葉部所含抗氧化成分較多，亦確認主要抗氧化成分為迷迭香酸。

關鍵詞：彩葉草、抗氧化、迷迭香酸

## 目錄

|         |
|---------|
| 封面內頁    |
| 簽名頁     |
| 授權書iii  |
| 中文摘要iv  |
| 英文摘要vi  |
| 誌謝viii  |
| 目錄ix    |
| 圖目錄xiii |
| 表目錄xv   |

|                     |
|---------------------|
| 1.緒論1               |
| 2.文獻回顧3             |
| 2.1彩葉草簡介3           |
| 2.2彩葉草分類3           |
| 2.3彩葉草目前研究5         |
| 2.3.1毛喉鞘蕊花5         |
| 2.3.2彩葉草7           |
| 2.4自由基之介紹8          |
| 2.4.1自由基的定義8        |
| 2.4.2活性氧分子8         |
| 2.4.3自由基與活性氧產生的途徑9  |
| 2.4.4自由基與活性氧對生物之傷害9 |
| 2.5迷迭香酸10           |

|                            |    |
|----------------------------|----|
| 2.5.1簡介                    | 10 |
| 2.5.2生物合成研究發展              | 14 |
| 2.5.3生理活性                  | 17 |
| 2.6抗氧化活性測定原理               | 18 |
| 2.6.2亞鐵離子螯合能力              | 18 |
| 2.6.3還原力                   | 19 |
| 2.6.4超氧離子清除能力              | 19 |
| 2.6.5清除ABTS氧離子能力試驗         | 19 |
| 2.6.6微脂粒氧化作用之抑制            | 20 |
| 2.6.7類黃酮含量之測定              | 20 |
| 2.6.8總多酚類化合物含量之測定          | 21 |
| 2.7薄層層析                    | 21 |
| 2.7.1原理                    | 21 |
| 2.7.2固定相                   | 22 |
| 2.7.3流動相的選擇                | 22 |
| 2.7.4顯色劑                   | 23 |
| 2.7.5用途                    | 24 |
| 2.8膠體過濾層析                  | 24 |
| 2.9傅立葉轉換紅外線光譜(FTIR)        | 25 |
| 2.10高效能液相層析(HPLC)          | 25 |
| 3.材料與方法                    | 27 |
| 3.1植物材料                    | 27 |
| 3.2藥品                      | 27 |
| 3.3儀器                      | 28 |
| 3.4實驗方法                    | 29 |
| 3.4.1實驗架構                  | 29 |
| 3.4.2植物萃取物之製備              | 32 |
| 3.4.3抗氧化活性測定               | 32 |
| 3.4.4薄層層析                  | 38 |
| 3.4.5管柱層析                  | 38 |
| 3.4.6高效能液相層析               | 38 |
| 4.結果與討論                    | 40 |
| 4.1彩葉草莖、葉之冷搾萃取法            | 40 |
| 4.1.1萃取率                   | 40 |
| 4.1.2抗氧化性質                 | 40 |
| 4.2不同萃取方法對彩葉草抗氧化性質之影響      | 50 |
| 4.3彩葉草莖、葉之水熱迴流萃取法          | 54 |
| 4.3.1萃取率                   | 54 |
| 4.3.2彩葉草的葉之清除DPPH自由基能力測定   | 54 |
| 4.3.3彩葉草的莖之清除DPPH自由基能力測定   | 59 |
| 4.4彩葉草之成分分析                | 59 |
| 4.4.1彩葉草乙酸乙酯萃取物之HPLC分析     | 59 |
| 4.4.2彩葉草乙酸乙酯萃取物之FTIR分析     | 61 |
| 4.4.3彩葉草乙酸乙酯萃取物之LC/MS/MS分析 | 68 |
| 5.結論                       | 71 |
| 5.1結論                      | 71 |
| 5.2未來展望                    | 72 |
| 參考文獻                       | 73 |
| 附錄                         | 80 |

## 圖目錄

圖2.1彩葉草，(a)葉子、(b)花4

圖2.2毛喉素的結構式6

|       |                          |    |
|-------|--------------------------|----|
| 圖2.3  | 自由基對細胞的傷害                | 11 |
| 圖2.4  | 迷迭香酸的結構式                 | 12 |
| 圖2.5  | 迷迭香酸的合成路徑                | 16 |
| 圖3.1  | 實驗流程圖                    | 30 |
| 圖3.2  | 抗氧化方法                    | 31 |
| 圖3.3  | 冷壓榨法萃取流程                 | 33 |
| 圖3.4  | 熱迴流法萃取流程                 | 34 |
| 圖4.1  | 彩葉草萃取物清除DPPH自由基的能力之影響    | 44 |
| 圖4.2  | 彩葉草萃取物的螯合亞鐵離子能力          | 46 |
| 圖4.3  | 彩葉草萃取物的還原力               | 48 |
| 圖4.4  | 彩葉草萃取物的抑制微脂粒氧化作用之能力      | 49 |
| 圖4.5  | 彩葉草萃取物的清除ABTS陽離子能力       | 51 |
| 圖4.6  | 彩葉草萃取物的清除超氧陰離子能力         | 52 |
| 圖4.7  | 不同條件萃取彩葉草對清除DPPH自由基能力之影響 | 53 |
| 圖4.8  | 彩葉草葉不同溶劑萃取物之清除DPPH自由基能力  | 57 |
| 圖4.9  | 彩葉草莖不同溶劑萃取物之清除DPPH自由基能力  | 60 |
| 圖4.10 | 彩葉草葉-乙酸乙酯萃取物之HPLC層析圖     | 62 |
| 圖4.11 | 迷迭香酸之HPLC層析圖             | 63 |
| 圖4.12 | 彩葉草莖-乙酸乙酯萃取物之HPLC層析圖     | 65 |
| 圖4.13 | 彩葉草葉-乙酸乙酯萃取物之FTIR層析圖     | 66 |
| 圖4.14 | 彩葉草莖-乙酸乙酯萃取物之FTIR層析圖     | 69 |
| 圖4.15 | 彩葉草葉-乙酸乙酯萃取物之LC/MS/MS層析圖 | 70 |

## 表目錄

|      |                              |    |
|------|------------------------------|----|
| 表2.1 | 迷迭香酸出現於不同植物中之例子              | 13 |
| 表2.2 | 唇形科植物中迷迭香酸的含量                | 15 |
| 表2.3 | 紅外線光譜區的劃分                    | 26 |
| 表4.1 | 彩葉草之萃取率                      | 41 |
| 表4.2 | 彩葉草之總多酚與總類黃酮含量               | 42 |
| 表4.3 | 彩葉草之半清除濃度(IC50)              | 45 |
| 表4.4 | 不同溶劑萃取彩葉草之萃取率                | 55 |
| 表4.5 | 不同溶劑萃取彩葉草之DPPH自由基半清除濃度(IC50) | 58 |
| 表4.6 | 彩葉草葉-乙酸乙酯萃取物之迷迭香酸含量          | 64 |
| 表4.7 | 有機官能團的頻率範圍                   | 67 |

## 參考文獻

1. 朱惠麗。2004。紫蘇中迷迭香酸的提取及紫蘇萃取物抗氧化研究。天津科技大學碩士論文。天津。
2. 李維鋒。2008。余甘子樹皮中植物多酚的分離純化、鑑定及活性研究。華南理工大學碩士學位論文。廣州。
3. 林天坤。2003。光激化學氣象沈積二氧化矽層於氯化鋁鎳/氮化鎳金氧半異質結構場效電晶體。雲林科技大學電子與資訊工程研究所碩士論文。雲林。
4. 易博。2007。丹參迷迭香酸代謝酪氨酸支路重要基因克隆及調控分析。第二軍醫大學碩士學位論文。上海。
5. 林富陽。2006。辣木抗氧化特性探討。屏東科技大學碩士論文。屏東。
6. 林?。2006。松果菊屬HPLC指紋圖譜和活性成分的研究。四川大學碩士學位論文。四川。
7. 耿紅梅。2008。歐洲旋覆花化學成分的研究。時珍國醫國藥。
8. 施益民、呂鋒洲。1989。自由基與各種疾病。當代醫學。16:399-407。
9. 陳立亞。2007。迷迭香酸的研究概況。中國藥事。21(11):923-929。
10. 梁玉香、李海標。2001。Forskolin抗金?地鼠視網膜?細胞凋亡。神經解剖學雜誌。17(3):230-234。
11. 許玲玲。2004。毛喉鞘蕊花中二?成分的研究。中國藥科大學碩士學位論文。江蘇。
12. 許海棠、徐遠金。2008。HPLC/MS 測定蒲公英顆粒中綠原酸、咖啡酸和阿魏酸的含量。化學通報。71(6):1-6。
13. 章偉浩。2006。仙草癒合組織與十種唇形花科植物之迷迭香酸、熊果酸含量、抗氧化力與絡胺酸抑制能力比較研究。大同大學碩士論文。台北。
14. 黃龍江。2005。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。山東。
15. 楊巧容。2004。毛喉鞘蕊花有效成分及質量分析研究。湖北中醫學院碩士論文。湖北。
16. 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。
17. 莊曉莉、李祥麟、黃檀溪。2003。蠶蛹草具有顯著之抗氧化性與自由基清除能力。師大學報。48(1,2):13-24。
18. 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。廣西大學碩士學位論文。廣西。
19. 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。
20. 遲秀玲。2007。迷迭香酸抗支原體源性脂質相關膜蛋白誘導的巨噬細胞凋亡及機制探討。南華大學碩士學位論文。湖南。
21. 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。
22. 鐘耀慶。2004。功

能性食品。化學工業出版社。北京。23. Arnao, M. B., Cano, A. and Acosta, M. 2001. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chem.*, 73: 239-244. 24. Argolo, A. C. C., Sant'Ana, A. E. G., Pletsch, M. and Coelho, L. C. B. B. Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra*. *Bioresour Technol.*, 95: 229-233. 25. Benzie, I. F. and Strain, J. J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': the FRAP assay. *Anal. Chem.*, 239: 70-76. 26. Bonoli, M., Verardo, V., Marconi, E. and Caboni, M. F. 2004. Antioxidant phenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 5195-5200. 27. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. and Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebenson Wiss Technol.*, 28: 25-30. 28. Brenneisen, P., Steinbrenner, H. and Sies, H. 2005. Selenium, oxidative stress, and health aspects. *Mol Aspects Med.*, 26: 256-267. 29. Christel, Q. D., Bernard, G., Jacques, V., Thierry, D., Claude, B., Michel, L., Micheline, C., Jean-Cluade, C., Francois, B. and Francis, T. 2000. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *J. Ethnopharmacol.*, 72: 35-42. 30. Dorman, H. J. D. and Hiltunen, R. 2004. Fe(III) reductive and free radical-scavenging properties of summer savory (*Satureja hortensis* L.) extract and subfractions. *Food Chem.*, 88: 193-199. 31. Gorinstein, S., Zachwieja, Z., Katrich, E., Pawelzik, E., Haruenkit, R., Trakhtenberg, S. and Martin-Belloso, O. 2004. Comparison of the contents of the main antioxidant compounds and the antioxidant activity of white grapefruit and its new hybrid. *Lebenson Wiss Technol.*, 37: 337-343. 32. Gris, E. F., Ferreira, E. A., Falcao, L. D. and Bordignon-Luiz, M. T. 2007. Caffeic acid copigmentation of anthocyanins from Cabernet Sauvignon grape extracts in model systems. *Food Chem.*, 100: 1289-1296. 33. Janicsk, G., Mth, I., Mikl'ssy-Vri, V. and Blunden, G. 1999. Comparative studies of the rosmarinic and caffeic acid contents of Lamiaceae species. *Biochem Syst Ecol.*, 27: 733-738. 34. Kim, K. H. and Petersen, M. 2002. cDNA-cloning and functional expression of hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from cell suspension cultures of *Coleus blumei*. *Plant Sci.*, 163: 1001-1009. 35. Kumaran, A. and Joel karunakaran, R. 2006. Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food Chem.*, 97: 109-114. 36. Kumaran, A. and Joel karunakaran, R. 2007. Activity-guided isolation and identification of free radical-scavenging components from an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food Chem.*, 100: 356-361. 37. Lai, L.-S., Chou, S.-T. and Chao, W.-W. 2001. Studies on the antioxidative activities of Hsian-tso (*Mesona procumbens* Hemsl) leaf gum. *J. Agric. Food Chem.*, 49(2): 963-968. 38. Li, X., Yu, C., Cai, Y., Liu, G., Jia, J. and Wang, Y. 2005. Simultaneous determination of six phenolic constituents of danshen in human serum using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.*, 820: 41-47. 39. Li, Z. and Wang, J. 2006. A forskolin derivative, FSK88, induces apoptosis in human gastric cancer BGC823 cells through caspase activation involving regulation of Bcl-2 family gene expression, dissipation of mitochondrial membrane potential and cytochrome c release. *Cell Biol Int.*, 30: 940-946. 40. Liao, K. L. and Yin, M. C. 2000. Individual and combined antioxidant effects of seven phenolic agents in human erythrocyte membrane ghosts and phosphatidylcholine liposome systems: importance of the partition coefficient. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 2266-2270. 41. Makris, D. P., Psarra, E., Kallithraka, S. and Kefalas, P. 2003. The effect of polyphenolic composition as related to antioxidant capacity in white wines. *Food Res. Intl.*, 36: 805-814. 42. Parejo, I., Caprai, E., Bastida, J., Viladomat, F., Juregui, O. and Codina, C. 2004. Investigation of *Lepechinia graveolens* for its antioxidant activity and phenolic composition. *J. Ethnopharmacol.*, 94: 175-184. 43. Petersen, M. 1997. Cytochrome P450-dependent hydroxylation in the biosynthesis of rosmarinic acid in *Coleus*. *Phytochemistry.*, 45(6): 1165-1172. 44. Petersen, M. and Simmonds, M. S. J. 2003. Rosmarinic acid. *Phytochemistry.*, 62: 121-125. 45. Pourmorad, F., Hosseinimehr, S. J. and Shahabimajid, N. 2006. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *Afr. J. Biotechnol.*, 5(11): 1142-1145. 46. Saeedeh, A. S. and Urooj, A. 2007. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Food chemistry.*, 102: 1233-1240. 47. Saleem, A. M., Dhasan, P. B. and Rafiullah, M. R. M. 2006. Simple and rapid method for the isolation of forskolin from *Coleus forskohlii* by charcoal column chromatography. *J. Chromatogr. A.*, 1101: 313-314. 48. Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J. A. and Saura-Calixto, F. 1998. A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *J. Sci Food Agric.*, 76: 270-276. 49. Scandalios, J. G. 2002. The rise of ROS. *Trends Biochem Sci.*, 27(9): 483-486. 50. Tepe, B. 2008. Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia virgata* (Jacq), *Salvia staminea* (Montbret & Aucher ex Benth) and *Salvia verbenaca* (L.) from Turkey. *Bioresour Technol.*, 99: 1584-1588. 51. Tepe, B., Daferera, D., Tepe, A. S., Polissiou, M. and Sokmen, A. 2007. Antioxidant activity of the essential oil and various extracts of *Nepeta ?avida* Hub.-Mor. from Turkey. *Food Chem.*, 103: 1358-1364. 52. Wang, T. G., Lee, H. I. and Yang, C. C. 2009. Evaluation of in vitro antioxidant and anti-lipid peroxidation activities of Ching-Pien-Tsao (*Pteris multifida* Poiret). *J. Taiwan Agric. Res.*, 58(1): 55-60. 53. Witzell, J., Gref, R. and N'sholm, T. 2003. Plant-part specific and temporal variation in phenolic compounds of boreal bilberry (*Vaccinium myrtillus*) plants. *Biochem Syst Ecol.*, 31: 115-127. 54. Yildirim, A., Mavi, A. and Kara, A. A. 2001. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistr.*, 49: 4083-4089. 55. Yip, H. K. and To W. M. 2005. An FTIR study of the effects of artificial saliva on the physical characteristics of the glass ionomer cements used for art. *Dent Mater.*, 21: 695-703. 56. Zhao, G. R., Zhang, H. M., Ye, T. X., Xiang, Z. J., Yuan, Y. J., Guo, Z. X. and Zhao, L. B. 2008. Characterization of the radical scavenging and antioxidant activities of danshensu and salvianolic acid B. *Food Chem Toxicol.*, 46: 73-81.