

# 美和學校財團法人美和科技大學

## 107 年度教師產學合作計畫

### 結案報告書

計畫名稱：特用作物雅囊葉功能性生技健康產品

研發量產及行銷佈局

計畫編號：107-FI-DBT-IAC-R-009

計畫期間：107 年 9 月 1 日至 108 年 8 月 31 日

計畫主持人：廖信昌

共同主持人：

研究助理：

經費總額：280,000 元

經費來源：金峰生物科技有限公司

# 特用作物雅囊葉功能性生技健康產品研發量產及行銷佈局

## The mass production and marketing layout of functional biotech health products of *Tiliacora triandra*

### 中文摘要

本計畫進行雅囊葉萃取物在 DPPH 抗氧化能力試驗中，發現具有優秀之抗氧化能力表現，發現隨雅囊葉萃取物濃度增加，抗氧化能力亦隨著增加，雅囊葉不同濃度萃取物對 B16 黑色素細胞的黑色素生成影響，試驗結果發現，雅囊葉萃取物對黑色素的生成似乎無明顯的抑制效果。以 RAW264.7 巨噬細胞進行了雅囊葉萃取物在抗發炎能力上的試驗，結果顯示雅囊葉萃取物具有抑制透過酯多醣體 LPS 誘導巨噬細胞發炎產生發炎物質 NO 的良好抑制能力。利用全臉皮膚透視分析儀-IRV 進行雅囊葉產品使用評估抗老化試驗，可以發現受試者使用本產品後皮膚紋理明顯變低、提升部份皮膚光澤與減少皮膚的色差。另外，本研究亦進行雅囊葉萃取物對癌細胞之毒殺試驗，在抗胃癌細胞能力試驗，在濃度為 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，對胃癌細胞有約 55% 抑制毒殺效果，顯示雅囊葉萃取物具明顯的抑制胃癌細胞的生長。雅囊葉甲醇萃取物對肝癌細胞的毒殺試驗，其 IC<sub>50</sub> 濃度為 183  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，顯示在中高濃度時對肝癌細胞可達抑制作用。本研究已調製量產雅囊葉保健飲品、抗敏保濕凍膜及雅囊葉多酚保健膠囊並完成雅囊葉生技產品網頁建立及產品銷售平台上架。

**關鍵字：**雅囊葉、黑色素細胞、抗發炎能力、生技產品、細胞毒殺。

## 前言

目前台灣的生技產業含蓋許多類別，包括生技醫藥、生技食品、生技美容、生技日常用品及生技農業，種類繁多，有些生技產品功效不明及無科學論述及佐證較難取信於消費者。本計畫延續協助金峰生物科技有限公司進行106-107年SBIR計畫完成之產品，包括**雅囊葉保濕凍膜**、**雅囊葉膠囊**以及**雅囊葉飲品**，目前研究成果顯示，雅囊葉萃取物具有優秀的抗氧化效果，國外亦有文獻指出**雅囊葉**對動物無害，然而國內並無此相關研究文獻報告，主因為雅囊葉並非本地作物。金峰生物科技有限公司研發雅囊葉相關產品，是經過學術單位一系列科學研究加以科學數據佐證，對雅囊葉相關產品之成份、生物活性及功能性有相當完整的報告，進一步呈現**雅囊葉功能性保養產品與市售產品之差別性及特殊性**，除了展現本產品之特色、有效、安全，更傳達出該公司重視生態及循環經濟的重要性，更想扮演照顧消費者的優質企業。

最近幾年有人引進入台灣屏東種植，因屏東氣候為亞熱帶氣候非常適合雅囊葉的生長，而其葉片經碎裂後自然產生之果膠為非常天然之凝膠劑，是否可取代食品添加劑(起雲劑)及化妝品之天然凍膜護膚原料，是值得進一步試驗評估的。綜合以上論述結果，本產學研究計畫進行雅囊葉萃取成分、生物活性分析，開發雅囊葉健康飲品、雅囊葉膠囊以及雅囊葉保濕凍膜，是相當具有可行性及潛力的附加價值特用作物開發。在**雅囊葉添加健康飲品**方面，國外文獻指出**雅囊葉**具有明顯抗氧化作用(Rattana *et al.*, 2010)及抗子宮頸癌細胞作用(Chaveerach *et al.*, 2016)，亦有文獻指出**雅囊葉**對動物無害，然而相關的研究文獻並不多，國內幾乎無此相關研究報告，主因為**雅囊葉**並非本地作物。近年來由於人們對健康的注重，以及環保意識抬頭，如能開發成健康產品或是增稠劑取代化學成分，亦便是大眾消費者另一健康的選擇；在凍膜產品的部分，同樣是以天然植萃成分調製的凍膜產品，同樣能夠與市場上之面膜產品進行產品性質區隔，再讓**雅囊葉保濕凍膜**產品先在小型的有機產品商店進行試賣，待產品建立口碑後，再與更大的連鎖通路接洽商品販售規

格及以何種形式販售再進行綜合性的評估，必定可引起消費大眾的認同及喜愛，因本研發產品是經學術單位一系列科學研究加以佐證數據，以強化產品之成份及功效。因此開發雅囊葉健康飲品、雅囊葉膠囊以及雅囊葉保濕凍膜，是相當具有可行性及潛力的附加價值特用作物開發。

### 研發理念（或創作理念）

本產學研究計畫乃協助金峰生物科技股份有限公司執行 107 年屏東縣 SBIR 之委外研究計畫，主要進行雅囊葉成分萃取雅囊葉在泰國北方及寮國是一種著名的蔬菜及藥草，雅囊葉的萃取物包含高量之多酚類（polyphenol）成分所以具有抗氧化即去除自由基的能力，直言之即具有抗癌細胞效果，而蔬果的抗氧化作用主要就來自其中所含的多酚類物質。而泰國終年炎熱，適合雅囊葉生長，同樣的屏東位於南台灣氣候四季如夏，且大多為陽光普照的好天氣，所以為雅囊葉種植的最佳環境。故本計畫之產學廠商思謀結合屏東里港區之農民來種植雅囊葉，或直接種植於里港田地，建立雅囊葉種植示範區，增加土地之利用並建立農場之特用作物鄉村發展特色。

本計畫希望能夠完全利用雅囊葉各部位並且開發為不同類型的產品，藉由開發多樣化的產品可增加雅囊葉的利用效率及經濟價值，配合本計畫以雅囊葉有益成分萃取作為研究主軸，由研究成果開發為雅囊葉健康飲品、雅囊葉保濕凍膜、雅囊葉膠囊，這些產品也能夠幫助農業農場塑造經營之理念及形象，如此利用雅囊葉各部位開發不同產品，不但提高農產品的附加價值，也期望能夠藉由雅囊葉產品的開發，建立地方特色，而目前台灣市場上並無雅囊葉相關產品，讓雅囊葉具有發展潛力的一大優勢。

### 學理基礎

雅囊葉是一種開花植物，主要是生長在亞洲南部的原生種植物，在泰國北部及寮國常用於料理，泰國北部所使用的寮國伊森方言，將這種植物稱為 bai yanang 或是 bai ya nang（方言寫法為 ใบยานาง，翻譯成英文則為 yanang leaf），

也可以簡稱為 yanang 或是 ya nang (方言寫法為 ยานาง)，為一種有深綠色葉片及淡黃色花的爬藤類植物。在泰國北部的寮國伊森文化中，雅囊葉的葉子常被放入 kaeng no mai 這種料理中 (方言寫法為 แกงหน่อไม้，也被稱為 kaeng Lao，為一種竹筍湯)；在越南，雅囊葉則被製成一種果凍稱為 sương sâm。

國外文獻指出，雅囊葉水草物是主要的酚類化合物，並且顯示很高的抗氧化能力(Oonsivilai *et al.*, 2014)；Weerawatanakorn *et al.*(2018)研究雅囊葉水草並冷凍乾燥多酚含量達 3.938.1mg/kg，並有明顯抗發炎作用，純脂肪酸加入雅囊葉之萃取物成分，會減低抗藥性癌細胞內的 P 糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 活性(Kaewpiboon *et al.*, 2014)；利用甲醇萃取雅囊葉根中的生物鹼成分，其中不溶於水的生物鹼顯示增加了抗瘧疾的能力(Pavanand *et al.*, 1989)；也有研究報告指出，雅囊葉的水草物不會對雄鼠或雌鼠造成急性與亞慢性之毒性(Sireeratawong *et al.*, 2008)。

綜合以上論述結果，本研究計畫進行雅囊葉萃取成分、生物活性分析，開發雅囊葉健康飲品、雅囊葉膠囊以及雅囊葉保濕凍膜，是相當具有可行性及潛力的附加價值特用作物開發。

## 研究主題內容

本研究計畫進行雅囊葉萃取成分，進行生物活性分析如雅囊葉萃取物總三萜類含量、雅囊葉萃取物總多醣體含量、總多酚含量、抗氧化能力、雅囊葉對 A2058 酪胺酸酶抑制活性試驗、抗發炎試驗及抗肝癌與胃癌細胞之 MTT 反應分析及研發為雅囊葉健康飲品及生技美容的雅囊葉保濕凍膜產品。近年來由於人們對健康的重視，以及環保意識抬頭，如能開發成健康產品或是增稠劑取代化學成分，可以供大眾消費者另一健康產品的選擇；在凍膜產品的部分，以天然植萃成分調製的凍膜產品，與市場上之面膜產品進行產品性質有差異化區隔，產品行銷策略為雅囊葉保濕凍膜產品先在小型的有機產品商店進行試賣，待產品建立口碑後，再與更大的連鎖通路商接洽商品販售規格

及以何種形式販售再進行綜合性的評估，此全國唯一的雅囊葉健康生技產品必定可引起消費大眾的認同及喜愛，因本研發產品是經學術單位一系列科學研究加以佐證數據，強化產品之成份及功效的明確性。因此開發雅囊葉健康飲品、雅囊葉膠囊以及雅囊葉保濕凍膜，是相當具有可行性及潛力的附加價值特用作物開發。

### 研究方法:

1.本計畫之研究方法、進行步驟:

(1) 雅囊葉成分萃取技術建立，雅囊葉成分的萃取方法如下，介質包括 dH<sub>2</sub>O、75%的酒精 (ethanol)，介質為 dH<sub>2</sub>O 的萃取方法為：以 1:4 的比例將 100 公克之凍乾粉碎後的雅囊葉與 400c.c.之 dH<sub>2</sub>O 混和後浸泡 3 天，再以過濾孔徑為 10 μm 的高壓過濾膜過濾，可得初步的萃取液，後以低溫冷凍乾燥可取得萃取液的粉末，最終將萃取液的粉末溶於 dH<sub>2</sub>O。

(2)介質為 75%酒精的萃取方法為：以 1:4 的比例將粉碎烘乾後的雅囊葉與 75%酒精混和後浸泡 3 天，再以過濾孔徑為 10 μm 的高壓過濾膜過濾，可得初步的萃取液，後以減壓濃縮法去除酒精，待溶離之酒精去除後，再將萃取完成的粉末溶於 dH<sub>2</sub>O。

(3)雅囊葉抗氧化能力測定

雅囊葉萃取物稱 100mg 溶於 10ml(95%)乙醇中約 24hrs，萃取時利用超音波震盪約 30min，3000g X 5 min 離心去除沉澱物，上清液於減壓濃縮機真空乾燥之，殘留物，再溶於固定體基之 95% 乙醇，利用 DPPH (α,α-diphenyl-β-picrylhydrazyl) 評估抗氧化的供氫能力，先將 2mM DPPH 配製：0.0789 克的 DPPH (分子量=394.3) 溶於乙醇至最終體積為 100 毫升，0°C 下避光保存。抗氧化能力是以乙醇配製的 50ppm 的左旋維他命 C 為標準溶液，配置不同左旋維他命 C 濃度，在避光下分別加入 0.2mM 的 DPPH 200 μL 沖吸混和後，在室溫下避光靜置 10 分鐘後以分光光度計測其 517nm 的吸光值(Wang *et al.* 2010)。

$$\text{DPPH 自由基清除能力百分比 (\%)} = \frac{(\text{1-樣品於 517nm 之吸光值})}{\text{空白於 517nm 之吸光值}} \times 100\%$$

#### (4) 各種細胞培養(Cancer cells lines culture)

肝癌(Hep G2)、正常肝細胞(CL48)、胃癌細胞分別培養於含有 DMEM 培養液含有 10% 胎牛血清、2 mM glutamine 和 1% penicillin 中，並且將細胞培養於 CO<sub>2</sub> 培養 (5% CO<sub>2</sub>, 37°C)。然後將肝癌(Hep G2)、正常肝細胞(CL48)細胞分別接種在 6 孔盤，並且加入不同來源牛樟之不同濃度的樟芝萃取物(0, 5, 10, 15, and 20  $\mu$ g/ml)並且培養 24 小時。

#### (5) MTT assay 反應分析

細胞培養於 12-well 的培養皿上，每個 well 含 50000 個細胞，培養液含不同濃度之以雅囊葉萃取物，經各種時間的培養後，將含藥物的培養液吸除，以一倍濃度的 PBS 緩衝液洗滌細胞，加入以 PBS 緩衝液配製的 MTT 溶液濃度為 0.5 mg/ml，每個 well 0.35 ml，於 37°C 培養 5 小時，若細胞粒線體的呼吸作用仍在進行，則粒線體內的 dehydrogenase 酵素會將 MTT 轉化成紫色的 formazan 化合物結晶，細胞越健康，粒線體呼吸作用越旺盛，其 dehydrogenase 活性越高，則所形成的紫色結晶越多，再於培養皿中加入 10% SDS，於 37°C 培養 12 小時，將結晶溶解，從每個 well 取出 0.2 ml 至 96-well 培養皿中，於 570-630nm 的 microtitre plate reader 測定吸光值，互相作比較以決定各種濃度的藥物處理後細胞的活性。

#### (6) RAW264.7 巨噬細胞

##### Nitric Oxide(NO) 量之測定

首先在 12 孔盤中植入細胞密度為  $1 \times 10^6$  cells/mL 的 RAW264.7 細胞 12 小時後，加藥處理 12 小時後收集上清培養液分析 Nitric Oxide。在 96 孔盤依序加入 100  $\mu$ L/well 的待測上清液以及各濃度的標準品 Sodium nitrite( $\text{NaNO}_2$ )，再添加 100  $\mu$ l Griess 試劑 (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid 和 0.1% naphthylenediamide dihydrochloride in water，體積 1:1 混合)，進行 Griess 反應，避光反應 10 分鐘產生橘紅色產物，搖晃均勻後，使用酵素免疫分析儀 (ELISA reader) 測定吸光值 550nm，並以 Sodium nitrite( $\text{NaNO}_2$ ) 作為標準曲線，並計算出培養基中所含之 Nitric Oxide 的濃度。

#### (7) A2058 黑色素細胞培養

將A2058黑色素細胞細胞培養於DMEM 培養液(含有10% 胎牛血清、2 mM glutamine 和 1% penicillin) 中，並且將細胞培養於CO<sub>2</sub> 培養箱(5% CO<sub>2</sub>, 37°C)。將A2058黑色素細胞培養一週並繼代。

MTT 反應分析。細胞培養於96-well 的培養皿上，取每孔約一萬個細胞數/100µl，均勻接種並培養一天後，加入不同濃度的雅囊葉100µL (0, 7.8, 15.6, 31.25, 62.5 and 125 µg/mL)持續培養3天。培養液含不同濃度之雅囊葉萃取成分，經各種時間的培養後，將含藥物的培養液吸除，以一倍濃度的PBS 緩衝液洗滌細胞，加入以無FBS之DMEM培養液配製的MTT 溶液，濃度為0.5mg/ml，每個well 0.2 ml，於37°C培養2小時，若細胞粒線體的呼吸作用仍在進行，則粒線體內的dehydrogenase 酵素會將MTT轉化成紫色的formazan 化合物結晶，細胞越健康，粒線體呼吸作用越旺盛，其dehydrogenase活性越高，則所形成的紫色結晶越多，再於培養皿中加入100% DMSO，於37°C培養10分鐘，將結晶溶解，以此來判斷細胞毒殺(Gerschenson and Rotello, 1990) 從每個well 取出0.1 ml 至新96-well 培養皿中，於570nm 的 microtitre plate reader 測定吸光值(Meerlo J. *et al.*, 2011)，互相作比較以決定各種濃度的藥物處理後細胞的活性(Denizot and Lang 1986; Doong *et al.*, 1991; Ferrari 1990)。

#### (8)細胞內酪胺酸酶美白抑制試驗:

在12孔培養盤內植入每孔 $1 \times 10^5$ 之黑色素細胞，再加入100 nM之 $\alpha$ -黑色素刺激激素( $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone;  $\alpha$ -MSH)，置於37°C、5%二氧化碳培養箱24小時後，再加入含試驗樣品之培養基後培養1天，以磷酸鈉緩衝溶液沖洗細胞，再加入trypsin-EDTA，以12,000 rpm進行離心15分鐘後，除去上清液，加入含1% triton X-100和100 µl 0.1 mM PMSF (phenylmethyl sulfonyl fluoride, 苯甲基磺醯氟)。將其分別放置於-80°C與室溫各30分鐘後，於4°C以12,000 rpm離心15分鐘，取80 µl 上清液置入96孔培養盤內，再加入20 µl 多巴溶液反應1小時後，測其492 nm吸光值，重複三次實驗。正向對照組為麴酸。

#### (9)細胞外酪胺酸酶美白抑制試驗

利用酪胺酸酶、多巴(DOPA)與氧氣存在的環境下，模擬可能的化學反應，以評估中

草藥化粧品之功效。當酪胺酸酶、多巴與氧氣發生反應時，溶液會呈現亮粉橘色，反應愈多，則呈色愈深。當所加入的試驗樣品具有抑制酪胺酸酶活性功效時，則顏色愈淺。於96孔培養盤內加入40  $\mu$ l的1mM多巴溶液(溶於磷酸鈉緩衝溶液，pH 6.8)和20  $\mu$ l試驗樣品，然後再加入20  $\mu$ l酪胺酸酶溶液，與120  $\mu$ l磷酸鈉緩衝溶液混合均勻，於37  $^{\circ}$ C水浴反應30分鐘後，測定490 nm吸光值，並計算酪胺酸酶抑制率。麴酸(kojic acid)為正向對照組。

#### (10)統計分析(Statistical analysis)

實驗數據皆重複執行三次並以平均值 $\pm$ 標準誤差(mean  $\pm$  standard error [SD])表示，雅囊葉之不同濃度與對照組之差異以One-way analysis of variance, Tukey : Compare all pairs of columns分析，分析結果以P < 0.05 視為有統計意義之差異。

### 研究結果

#### 1. 雅囊葉萃取物抗氧化能力測定

DPPH 自由基為致癌物質，而雅囊葉萃取物在 DPPH 抗氧化能力試驗中，也發現具有優秀之抗氧化能力表現如圖 1，其雅囊葉萃取物在 DPPH 抗氧化能力試驗中，發現隨萃取物濃度增加，抗氧化能力亦增加，在 0.125mg/ml，DPPH 為

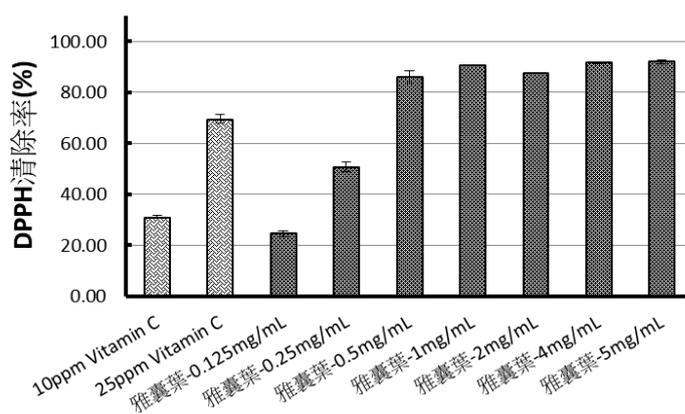


圖 1. 雅囊葉萃取物抗氧化能力試驗

24.4%，0.25mg/ml，50.6%；0.5mg/ml，85.86%，較對照組，Vit C 10 ppm，31.02%；Vit C 25 ppm，69.53% 為高，具有優秀之抗氧化能力表現。

## 2. 雅囊葉萃取物對酪胺酸酶之抑制試驗

雅囊葉不同濃度萃取物對 B16 黑色素細胞的黑色素生成影響，如圖 2。試驗結果發現，雅囊葉萃取物對黑色素的生成似乎無明顯的抑制效果。雅囊葉萃取物濃度 200、300 $\mu\text{g}/\text{mL}$  與對照藥劑 Kojic acid 200 $\mu\text{M}$  相較對酪胺酸酶(Tyrosinase)

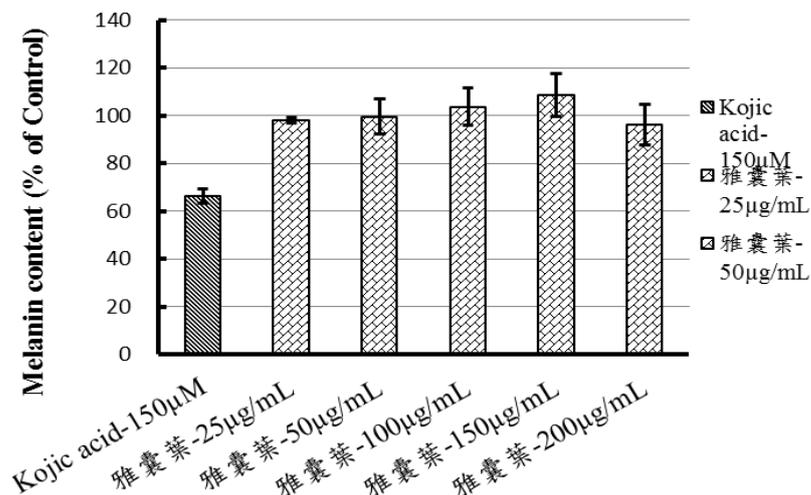


圖 2. 不同濃度雅囊葉萃取物對 B16 細胞黑色素生成抑制試驗

的抑制率分別為 51.0%及 63.3%，故本實驗酪胺酸酶之抑制與黑色素之形成相關性，需再進行更進一步實驗探討。

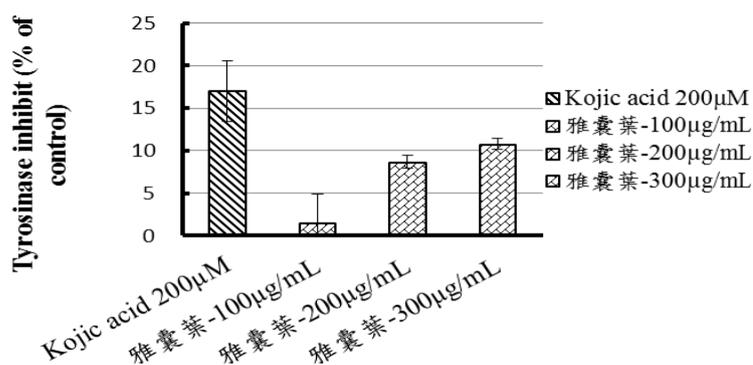


圖 3. 不同濃度雅囊葉萃取物對 B16 細胞酪胺酸酶抑制試驗

### 3. 雅囊葉抗發炎能力試驗

以 RAW264.7 巨噬細胞(圖 4.)進行了雅囊葉萃取物在抗發炎能力上的試驗，結果顯示雅囊葉萃取物具有抑制透過酯多醣體 LPS 誘導巨噬細胞發炎產生發炎物質 NO 的良好抑制能力(圖 5.)，證實了雅囊葉具有發展功能性抗敏化妝品的潛力。

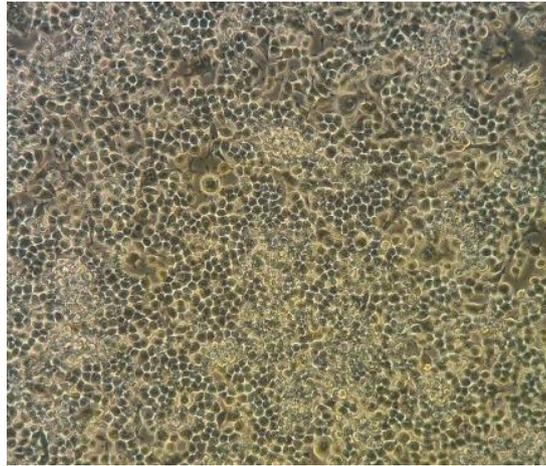


圖 4. 雅囊葉不同濃度萃取物對 B16 細胞黑色素生成抑制試驗

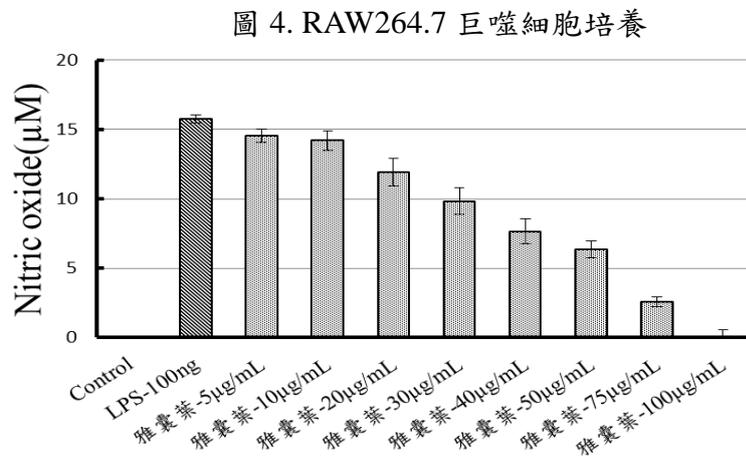


圖 5. 不同濃度雅囊葉萃取物對 LPS 誘導 RAW 巨噬細胞之 NO 的抑制能力(抗發炎效果評估)

#### 4.雅囊葉成分抗老化試驗

本計畫進行為期兩週的雅囊葉產品使用後抗老化試驗評估，再利用全臉皮膚透視分析儀-IRV(如圖 6.)進行皮膚檢測，受試者產品使用前的皮膚狀況如紋理、毛孔、皺紋、光澤等，已完成初步試驗(如圖 6-1、6-2、6-3)，而產品使用後的皮膚試驗如表 1-1，可以發現產品使用後皮膚紋理明顯變低、提升部份皮膚光澤與減少皮膚的色差，如圖 7. 示意圖。

全臉皮膚透視分析儀-IRV



圖 6.全臉皮膚透視分析儀

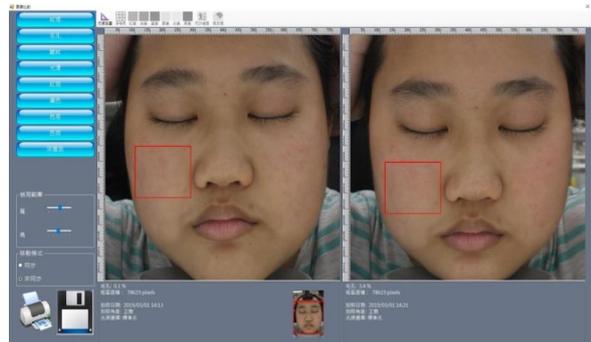


圖 6-1.受試者拍攝試驗



圖 6-2.受試者拍攝試驗



圖 6-3.受試者拍攝試驗

表 1-1. 使用雅囊葉凍膜後皮膚檢測數據分析

姓氏		洪	洪	許	許	吳	吳	簡	簡
拍照日期	Age: 20-	凍膜使用後	凍膜使用前	凍膜使用後	凍膜使用前	凍膜使用後	凍膜使用前	凍膜使用後	凍膜使用前
拍照角度		正臉							
拍照張數		3	3	3	3	3	3	3	3
紋理	10 - 12	6.49	7.66	7.7	8.05	6.64	7.12	7.21	7.44
皺紋面積	30 - 50	0.29	0.04	0.26	1.02	0.06	0	0.04	0
光澤	30 - 50	50	50	49	48	48	48	47	46
紅斑	30 - 50	25	26	23	23	24	23	26	26
膚色	30 - 50	10	12	12	8	12	12	12	12
色差	30 - 50	31	31	36	37	36	37	36	37
色斑濃度	30 - 50	49	51	55	54	56	56	55	57
skinage		15	16	16	18	16	16	29	29

根據表 1-1. 皮膚檢測數據分析，凍膜產品使用後，減少皮膚紋理及色差，且似乎可明顯使皮膚年齡降低。

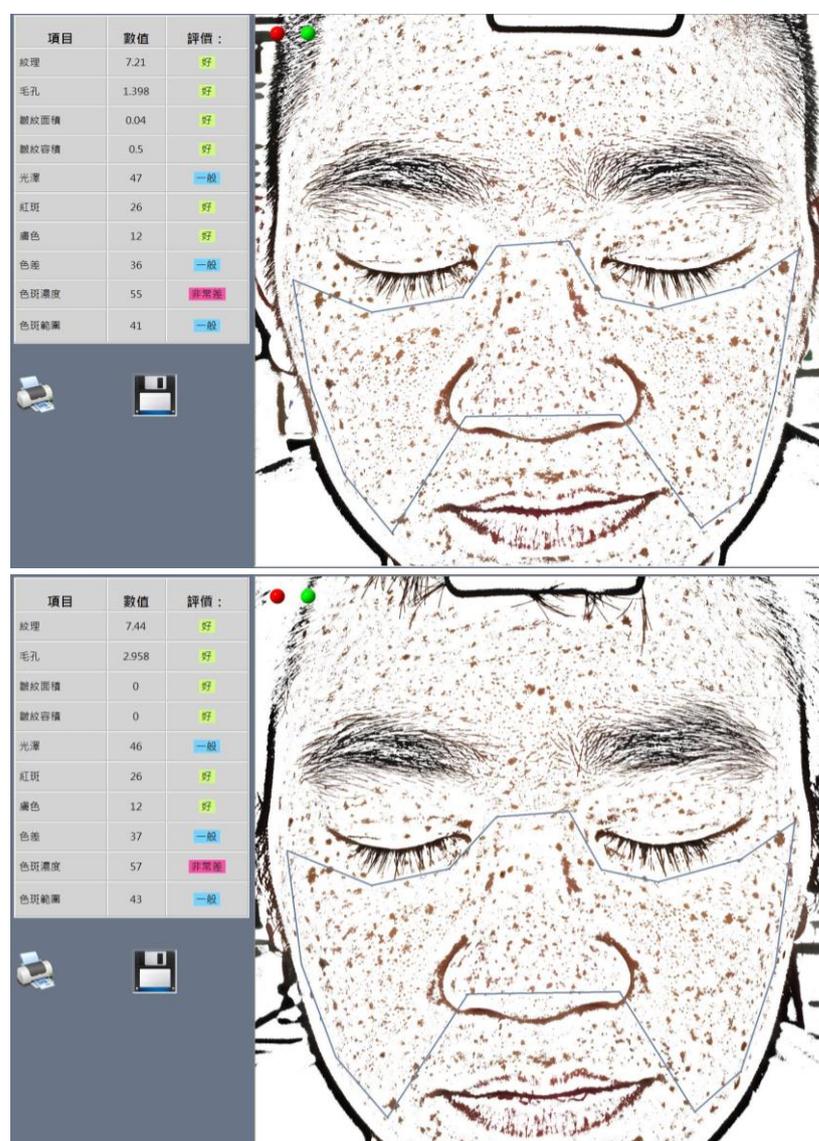


圖 7.雅囊葉凍膜產品使用前後皮膚檢驗差異圖(上：使用前，下：使用後)

圖 7.雅囊葉凍膜產品使用前後皮膚檢驗差異圖，檢驗結果發現，雅囊葉凍膜可使使用者改善皮膚紋理、降低色斑濃度及皮膚色差。

### 5.雅囊葉萃取物對正常肝細胞及肝癌細胞試驗

本計畫中進行了雅囊葉萃取物對正常肝細胞(CL48)的影響試驗(如圖 8、圖 9.)，在雅囊葉萃取物濃度 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$  處理之 CL48 細胞與正常肝細胞並無明顯差異，透過 MTT 細胞毒殺試驗結果顯示，雅囊葉萃取物並不會傷害正常人類肝細胞(圖 10.)。

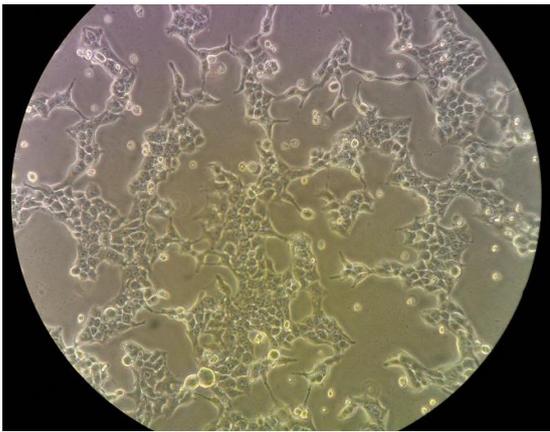


圖 8. CL48 人類正常肝細胞培養

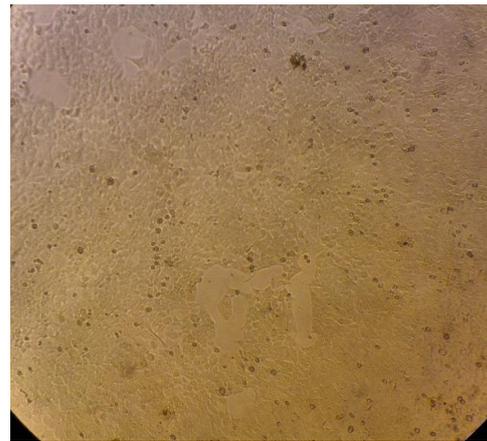


圖 9. 雅囊葉萃取物濃度為 125 $\mu\text{g}$  處理之 CL48 肝細胞

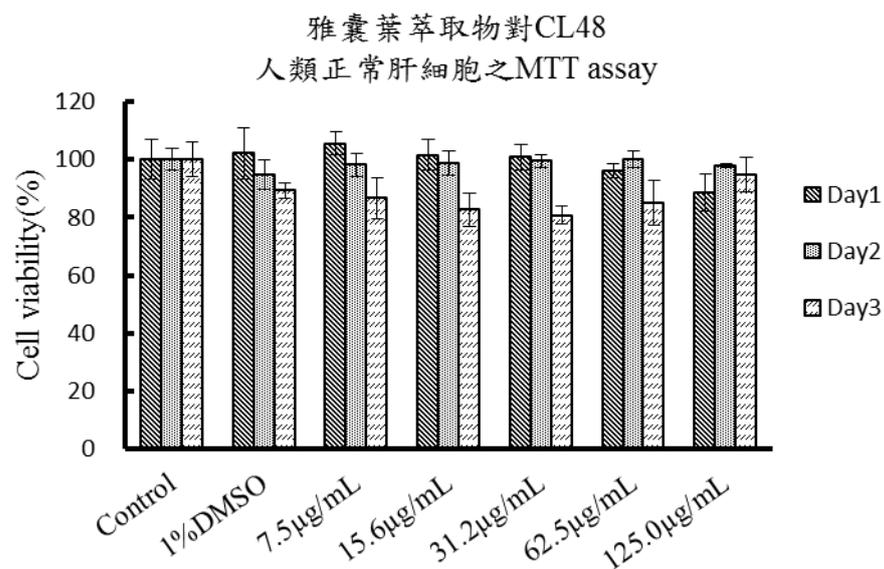


圖 10. 雅囊葉萃取物對 CL48 人類正常肝細胞(1-3 天)細胞存活率試驗

雅囊葉甲醇萃取物對肝癌細胞的毒殺試驗，其結果如圖 11.，雅囊葉萃取物濃度抑制百分五十(IC50)濃度為 183  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，顯示雅囊葉甲醇萃取物在高濃度時對肝癌細胞有明顯抑制效果。

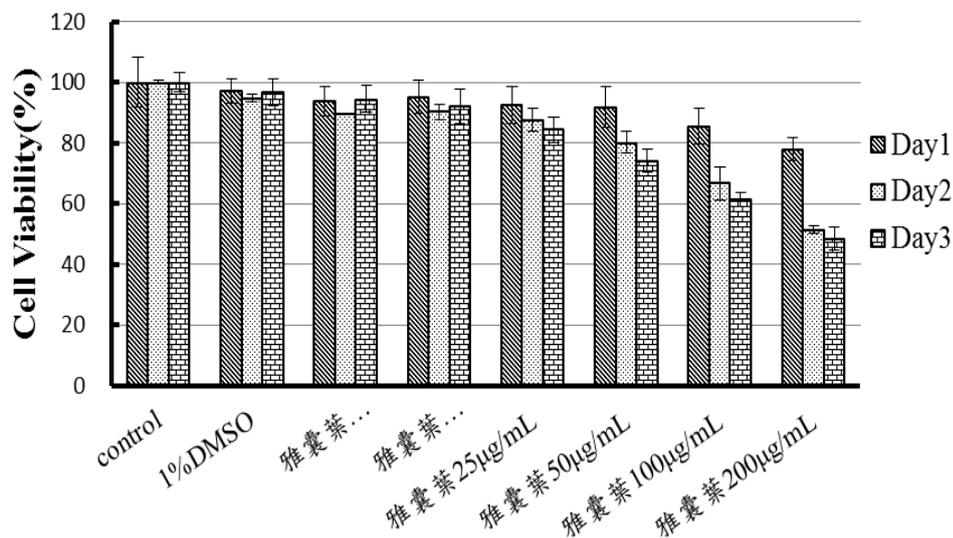


圖 11.雅囊葉萃取物對 Hep G2 肝癌細胞毒殺試驗

## 6.雅囊葉萃取物對胃癌細胞(AGS cell)抑制實驗

培養 AGS cell 人類胃癌細胞(如圖 12-1.)，進行雅囊葉甲醇萃取物抗胃癌細胞試驗，初步結果顯示雅囊葉萃取物明顯的抑制了胃癌細胞的生長(如圖 12-2.)，顯示雅囊葉萃取物具有發展保健食品的潛力；同時也進行了雅囊葉甲醇、乙醇及水萃取物對胃癌細胞的毒殺試驗，經數據統計可以知道甲醇萃取物略優於乙醇萃取物對胃癌細胞的抑制(如圖 13-1.)，水萃取物對胃癌細胞則無抑制效果(如圖 13-2.)。

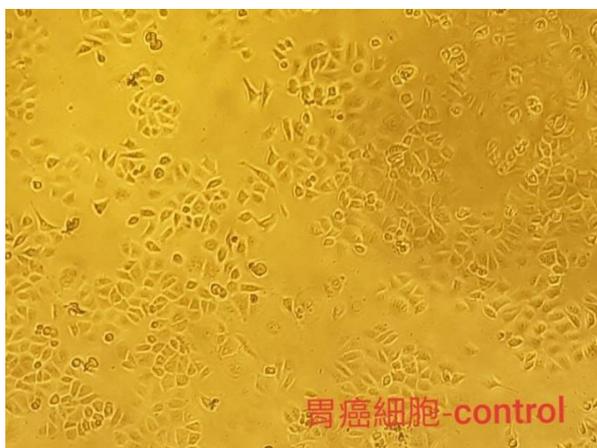


圖 12-1. 正常生長之 AGS 胃癌細胞

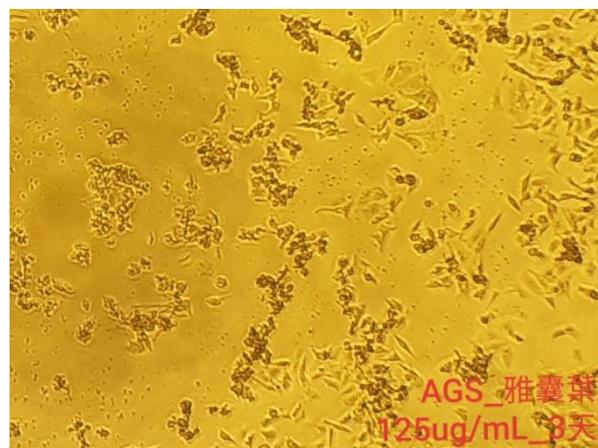


圖 12-2. AGS cell 經過雅囊葉萃取物在濃度 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$  處理

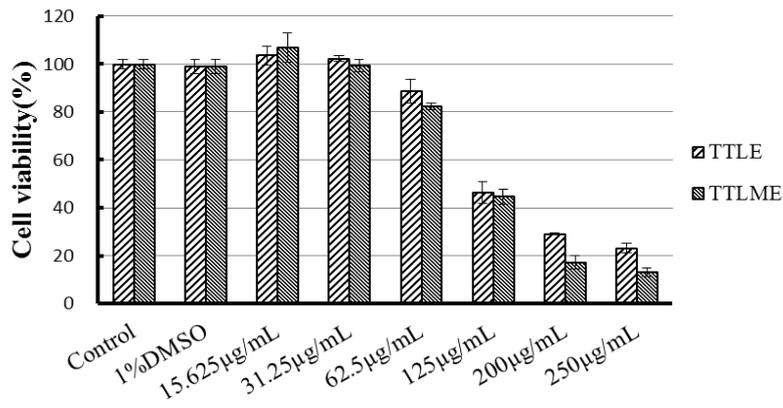


圖 13-1. 雅囊葉甲、乙醇萃取物對 AGS 胃癌細胞毒殺作用

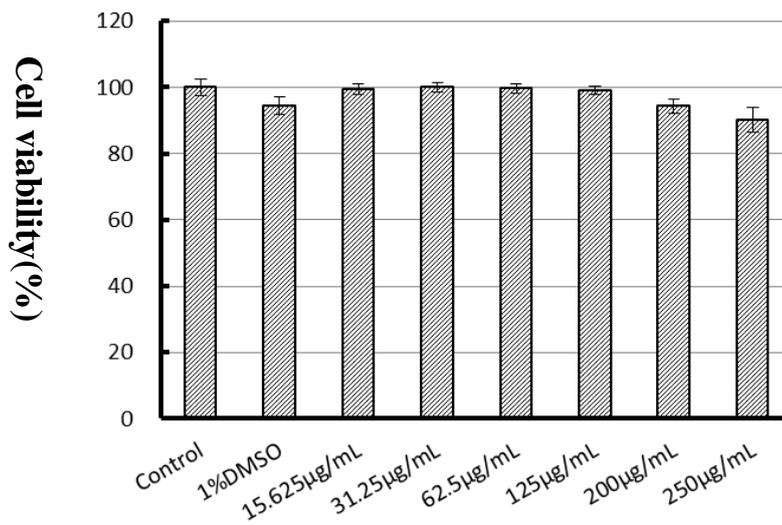


圖 13-2. 雅囊葉水萃取物對 AGS 胃癌細胞毒殺試驗

## 7. 雅囊葉功能性健康產品配方調製及量產

### (1) 功能性雅囊葉保健飲品配方調製



(2)雅囊葉抗敏保濕凍膜配方調製及量產



(3)雅囊葉多酚保健膠囊配方調製



本雅囊葉果膠沖泡濾包產品已獲得新型 M578691 號專利證書



# 中華民國專利證書

新型第 M578691 號

新 型 名 稱：雅囊葉果膠濾包

專 利 權 人：金峰生物科技有限公司

新 型 創 作 人：廖信昌

專利權期間：自 2019 年 6 月 1 日至 2029 年 1 月 3 日止

上開新型業依專利法規定通過形式審查取得專利權  
行使專利權如未提示新型專利技術報告不得進行警告

經濟部智慧財產局 局長

洪淑敏

中華民國 108 年 6 月 1 日



注意：專利權人未依法繳納年費者，其專利權自原繳費期限屆滿後消滅。

## 8.雅囊葉產品之行銷通路布局

### (1) 雅囊葉產品網頁建立及產品銷售平台上架

公司及雅囊葉產品行銷網址：<http://wfc7733.pwserver.com/>

已依計畫完成產品行銷網站建立，包含研發成果及產品介紹售價等(如下圖)

雅囊葉產品	
<p><b>雅囊葉Q彈保濕凍膜</b></p> 	<p><b>功能：</b></p> <p>保濕、抗發炎</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>雅囊葉抗發炎抗氧化的效果，能減少肌膚受的傷害</li> <li>含有高效保濕因子，讓肌膚補足水分，維持飽滿彈性膚質</li> </ul> <p>售價：1200元/瓶(50g)</p>
<p><b>雅囊葉保健膠囊</b></p> 	<p><b>功能：</b></p> <p>抗發炎、抗氧化、保護胃部</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>雅囊葉優秀的抗癌細胞效果，能讓我們為預防身體的病變多一份選擇</li> </ul>
	<p>雅囊葉優秀的抗癌細胞效果，能讓我們為預防身體的病變多一份選擇</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>天然的健康食品</li> </ul> <p>售價：1000/瓶(30顆)</p>
<p><b>雅囊葉果膠沖泡茶包</b></p> 	<p><b>功能：</b></p> <p>抗發炎、抗氧化、保護胃部</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>含有豐富的植物性膠質，是一種水溶性膳食纖維維持肌膚彈性</li> <li>增加自身抗氧化能力</li> </ul> <p>售價：800/盒(10包，每包4g)</p>

(2) 雅囊葉產品行銷 DM 製作及設計圖樣

*Tiliacora triandra*

**雅囊葉**

  
金峰

**1. 抗發炎**  
減少有害物質造成的過敏性反應

**2. 抗氧化**  
去除有害的自由基  
保護我們的健康



**3. 抗肝、胃癌細胞**  
保健腸胃才有健康的我們

**4. 天然的東南亞蔬菜**  
對人體無刺激、危害性  
可安心使用



**雅囊葉保濕凍膜**

- 雅囊葉抗發炎抗氧化的效果，能減少肌膚受的傷害
- 含有高效保濕因子，讓肌膚補足水分，維持飽滿彈性膚質



**雅囊葉保健膠囊**

- 雅囊葉優秀的抗癌細胞效果，能讓我們為預防身體的病變多一份選擇
- 天然的健康食品



**雅囊葉果膠茶包**

- 含有豐富的植物性膠質，是一種水溶性膳食纖維維持肌膚彈性
- 增加自身抗氧化能力

✓ 我們的產品都具有嚴謹且完整的科學根據，是您的好夥伴，敬請安心選用!!

金峰生物科技有限公司 TEL:(08)7733-123 產品行銷網址：<http://wfc7733.pwserv.com/>

(3)雅囊葉產品實體商店鋪貨(EX：美和實習商店)

本產品已在美和科技大學育成中心之實習商店進行鋪貨試賣



## 結論:

本計畫進行雅囊葉萃取物在 DPPH 抗氧化能力試驗中，發現具有優秀之抗氧化能力表現，發現隨雅囊葉萃取物濃度增加，抗氧化能力亦隨著增加，國外類似的報告；Rattana et al. (2010) 研究指出利用甲醇萃取雅囊葉較其它方法萃取可得到相當高抗氧化作用；而其萃取物主要含有生物鹼、類黃酮、單寧及皂素，因其具有相當高抗氧化作用，故認為是一種相當具有潛力防止某些疾病的植物。Singthong *et al.* (2014) 研究指出利用水萃取雅囊葉可得到豐富的酚類化合物及具有高抗氧化作用，利用噴霧乾燥中草藥充填開發做為膠囊。雅囊葉不同濃度萃取物對 B16 黑色素細胞的黑色素生成影響，試驗結果發現，雅囊葉萃取物對黑色素的生成似乎無明顯的抑制效果，雅囊葉萃取物濃度 200、300 $\mu\text{g}/\text{mL}$  與對照藥劑 Kojic acid 200 $\mu\text{M}$  相較對酪胺酸酶 (Tyrosinase) 的抑制率分別為 51.0% 及 63.3%。以 RAW264.7 巨噬細胞進行了雅囊葉萃取物在抗發炎能力上的試驗，結果顯示雅囊葉萃取物具有抑制透過酯多醣體 LPS 誘導巨噬細胞發炎產生發炎物質 NO 的良好抑制能力。Phunchago *et al.* (2015) 研究雅囊葉萃取物具優勢抗氧化能力對海馬迴酒精中毒性老鼠 (Wistar 大鼠) 之記憶障礙、神經元密度、膽鹼功能及氧化壓力進行研究，發現雅囊葉萃取物具有改善記憶不足、降低氧化壓力及抑制 AChE 活性作用，因此是一種因酒精引起的腦功能失常的治療相當有潛力的試劑。Wachiryah and Hathaipat (2018) 研究雅囊葉萃取物發現可改善老鼠空間學習能力、記憶力、學習靈活性，產生海馬迴神經元之神經保護效果及維持此腦區之 ChAT activity。利用全臉皮膚透視分析儀-IRV 進行為期兩週的雅囊葉產品使用評估抗老化試驗，受試者皮膚檢測產品使用前的皮膚狀況如紋理、毛孔、皺紋、光澤等，可以發現使用本產品後皮膚紋理明顯變低、提升部份皮膚光澤與減少皮膚的色差。另外，本研究亦進行雅囊葉萃取物對癌細胞之毒殺試驗，在抗胃癌細胞能力試驗，在濃度為 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，對胃癌細胞有約 55% 抑制毒殺效果，顯示雅囊葉萃取物具明顯的抑制胃癌細胞的生長。雅囊葉甲醇萃取物對肝癌細胞

的毒殺試驗，其 IC<sub>50</sub> 濃度為 183  $\mu$ g/mL，顯示在中高濃度時對肝癌細胞可達抑制作用。Chaveerach *et al.* (2016) 研究雅囊葉萃取物，發現具有相當好的抗氧化作用，對 lymphocyte viability 在濃度 10 mg/ml 為 72.8%，對子宮頸癌細胞(HeLa cells)之 IC<sub>50</sub> 為 0.41 mg/ml，雅囊葉萃取物於上述高濃度對 DNA 具明顯影響( $p < 0.05$ )，不過主因是含有高含量的 Vit E 才會影響 lymphocyte 及 HeLa cells 的穩定性，而在細胞培養試驗並無發現具有主要毒性，由此觀之，從本研究數據結果及國外之相關研究均顯示雅囊葉的確是值得開發的保健生技產品。

### 中英文參考文獻

- Chaikhram, P. and Prangthip, P. 2015. Physical and biochemical properties of Yanang juice mixed with longan flowerhoney following high pressure processing. *International Food Research Journal* 22(4): 1607-1614.
- Kaewpiboon, C., Winayanuwattikun<sup>1</sup>, P., Yongvanich<sup>1</sup>, P., Phuwapraisirisan, P. and Assavalapsakul, W. 2014. Effect of three fatty acids from the leaf extract of *Tiliacora triandra* on P-glycoprotein function in multidrug-resistant A549RT-eto cell line. *Pharmacognosy Magazine*. Issue 39 (Supplement 3) : s549.
- Denizot, F, and Lang, R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods*. 89:271-7.
- Ferrari, M., Fornasiero, M. C. and Isetta, A. M. 1990. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxicity activity in vitro. *Journal Immunological Methods*. 131:165-72.
- Khan, N. I., Shinge, J. S. and Naikwade. N. S 2010. Antilithiatic effect of *Helianthus Annuus* Linn. leaf extract in ethylene glycol and ammonium chloride induced nephrolithiasis. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2: 4.
- Wang, H. F., Yih, K. H. and Huang, K. F. 2010. Comparative study of the antioxidant activity of forty-five commonly used essential oils and their potential active components. *Journal of Food and Drug Analysis*, 18 (1):24-33.
- Pavanand, K., Webster, K.H. and Yongvanitchit, K. 1989. Antimalarial activity of *Tiliacora Triandra* Diels against *Plasmodium falciparum* in vitro. *Phytotherapy Research*. Vol. 3, NO. 5.
- Rattana, S., Phadungkit, M. and Cushine, B. 2010. Phytochemical screening, Flavonoids content and antioxidant activity of *Tiliacora Triandra* leaf extracts. The 2<sup>nd</sup> Annual

International Conference of Northeast Pharmacy Research.pp.60-63.(February 13-14, 2010/Organized by Faculty of Pharmacy, Mahasarakham University. Maha Sarakham, Thaliand

Sireeratawong, S., Lertprasertsuke, N., Srisawat, U., Thuppia, A., Ngamjariyawat, A., Suwanlikhid, N. and Jaijoy, K. 2008. Acute and subchronic toxicity study of the water extract from *Tiliacora triandra* (Colebr.) Diels in rats. Songklanakarin J. Sci. Technol. 30 (5): 611- 619.

Singthong, J., Oonsivilai, R., Oonmetta-aree, J. and Ningsanond, S. 2014. Bioactive compounds and encapsulation of Yanang (*Tiliacora triandra*) leaves. Afr J Tradit Complement Altern Med. 11(3):76-84.

Singleton, V. L. and Rossi, J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am. J. Enol. Viticult. 16: 144-158.