

美和學校財團法人美和科技大學

106 年度教師產學合作計畫

結案報告書

計畫名稱：特用作物雅囊葉萃取、生物活性及其
產品化開發

計畫編號：106-FI-DBT-IAC-R-010

計畫期間：自 106 年 9 月 1 日至 107 年 8 月 15 日止

計畫主持人：廖信昌

共同主持人：李順美

研究助理：

經費總額： 250,000 元

經費來源：金峰生物科技股份有限公司

特用作物雅囊葉萃取、生物活性及其產品化開發

中文摘要

雅囊葉葉片烘乾後磨碎秤重，並以一定比例之乙醇進行萃取三日，將其萃取物利用抽氣幫浦過濾並利用減壓濃縮機濃縮後，計算獲得其萃取回收率為 10.34%。進行雅囊葉萃取物之生物活性分析，分析結果總多醣、總多酚、總三萜類分別為 1.42%、1.0%、1.59%。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 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，另外進行了雅囊葉萃取物對正常肝細胞(CL48)的影響試驗，在雅囊葉萃取物濃度 125 μ g/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，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脂多醣體 LPS 誘導巨噬細胞發炎產生發炎物質 NO 的良好抑制能力。

前言

本產學研究計畫乃協助金峰生物科技股份有限公司執行106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**越文名稱為Suong Sâm（中文直譯為：蔘露），學名為*Tiliacora triandra*，為防己科(Menispermaceae)、屬：*Tiliacora*、黃背草種(*triandra*)，而越南也直稱這植物為dây Lá Sâm（蔘葉藤）或是Cây Suong Sâm（蔘露樹），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 R. *et al.*, 2014)及其它之藥理功用，如會減低抗藥性癌細胞內的P醣蛋白（P-glycoprotein, P-gp）活性(Kaewpiboon C. *et al.*, 2014)；及雅囊葉根中的生物鹼成分，在試驗結果顯示增加了抗瘧疾的能力(Pavanand K. *et al.*,1989)；也有文獻指出，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 S. *et al.*,2008)。在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之主要成份抑菌圈試驗、雅囊葉萃取物總三萜類含量、雅囊葉萃取物總多醣體含量、雅囊葉總多酚含量、雅囊葉抗氧化能力、雅囊葉對 A2058 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**，在**雅囊葉添加健康飲品**方面，國外文獻指出**雅囊葉**具有抗氧化、防乳癌的作用，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 106 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。本公司已於屏北里港區的農地種植雅囊葉，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 ใบย่านาง, 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 ย่านาง), 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 surong 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 R. *et al.*, 2014); 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 C. *et al.*, 2014); 利用萃取介質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在試驗結果顯示增加了抗瘧疾的能力(Pavanand K. *et al.*, 1989); 也有文獻指出，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 S. *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之主要成份抑菌圈試驗、雅囊葉萃取物總三萜類含量、雅囊葉萃取物總多醣體含量、雅囊葉總多酚含量、雅囊葉抗氧化能力、雅囊葉對 A2058 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，在雅囊葉添加健康飲品方面，國外文獻指出雅囊葉具有抗氧化、防乳癌的作用，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 dH₂O、75%的酒精 (ethanol)，介質為 dH₂O 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 dH₂O 混和後浸泡 3 天，再以過濾孔徑為 10 μ m 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 dH₂O。

(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 μ m 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 dH₂O。

(3) 抗菌試驗初步篩選步驟如下，首先將需測試菌株活化後，以 9×10^5 ml 菌量進行平盤塗抹。雅囊葉之後將濾紙盤（直徑 8mm）放入於已接種菌體之固體培養基內，再加入不同濃度的萃取物，隔夜培養後，測定抑菌圈之大小，檢定其抗菌能力。由此法篩選出抗菌效果強之雅囊葉萃取物濃度，進一步再將其調配為最佳的凍膜配方。

(4) 雅囊葉萃取物總三萜類含量測定：

總三萜類含量測定依據 Tsujikura *et al.*, (1992), 雅囊葉乾燥後稱 100mg 溶於 10ml(95%)乙醇中約 3 天, 3000g 離心 X 5min 去除沉澱物, 上清液於減壓濃縮機乾燥之, 配置 5%(香草醛 Villin/冰醋酸 Acetic acid)溶液、配置不同濃度的 standard(熊果酸)及樣品溶液, 以 5% 香草醛/冰醋酸溶液配置熊果酸: 2.5/2/1.5/1/0.5/0.1mg/ml sample: 2~5mg/ml, 取 100 μ l standard 與樣品至 1.5ml 離心管, 加入 200 μ l 5% 香草醛/冰醋酸溶液, 並 vortex, pin down, 加入 300 μ l 高氯酸 Perchloric Acid, vortex, spin down, 60 $^{\circ}$ C 水浴槽加熱 15 分鐘。冷卻後加入 800 μ l 冰醋酸溶液, 靜置 15~30min, 取 100 μ l 至 96well(重複 3 次此步驟), 利用分光光度計於 548 nm 測吸光值(Abs), 總三萜類含量為代入 ursolic acid 之標準曲線方程式計算而得到。

(5) 雅囊葉萃取物總多醣體含量定量

多醣體含量之測定(酚-硫酸法), 將雅囊葉乾燥後稱 100mg 溶於 1ml Dist water 和葡萄糖溶液, 配置 5% phenol 水溶液、配置不同濃度之葡萄糖溶液(standard), 以及樣品溶液 glucose (mg/ml): 5, 2.5, 2, 1, 0.5, 0.1, 待測樣品(3~5 mg/ml), 取 200 μ l 各濃度標準品與樣品至 1.5ml eppendorf, 加入 200 μ l 的 5% phenol 溶液, vortex, spin down, 快速加入 1ml 濃硫酸, 靜置 15 分鐘, 取 100 μ l 至 96well(重複 3 次此步驟), 以 O.D. 490 nm 測吸光值。以葡萄糖標準溶液的吸光值對濃度做標準曲線, 將雅囊葉乾燥後樣品(100mg/ml)依上述方法, 所測得的吸光值帶入曲線中即可求得之雅囊葉多醣體(Hsieh *et al.*, 2005 參考部份方法修正)。

(6) 雅囊葉總多酚含量定量:

總多酚含量定量為依據 Singleton & Rossi(1965)方法做部份修正, 配置 2mg/ml Gallic acid 及待測樣品(mg/ml) Gallic acid 濃度:1/ 0.75/ 0.5/0.3/0.2/0.1/0.05、配置 5%Na₂CO₃、配置 25% 酚類指示劑(Folin-Ciocalteu), 取 50~100 μ l 同體積樣品至 1.5mL 離心管。包括標準品, 加入 500 μ l 25% 酚類指示劑, Vortex, spin down 反應 15min, 加入 200 μ l 5%Na₂CO₃ 反應 15min, 取 100 μ l 至 96well plate, 此步驟重複 3 次, 測吸光值 750nm, 總多酚含量定量為代入 gallic acid 之標準曲線方程式計算而得到。

(7) 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，配置 0.2mM 的 DPPH(鋁箔紙閉光)(EtOH 稀釋)、配置 10ppm 及 25ppm Vit. C(用溶劑稀釋)、配置樣品(mg/ml)、Control(DPPH200ul+溶劑 100ul)/ 100ul **Vit.C10ppm**、100ul **Vit.C 25ppm**、樣品 100ul+DPPH 200 ul 依序重複三次，避光反應 10min 以 OD 值 517nm 測吸光值(Wang *et al.* 2010)。

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

(8) RAW264.7 細胞培養

Nitric Oxide(NO) 量之測定

首先在 12 孔盤中植入細胞密度為 1×10^6 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 μ L/well 的待測上清液以及各濃度的標準品 Sodium nitrite(NaNO_2)，再添加 100 μ 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(NaNO_2) 作為標準曲線，並計算出培養基中所含之 Nitric Oxide 的濃度。

(9) 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/100 μ l，均勻接種並培養一天後，加入不同濃度的雅囊葉 100 μ L (0, 7.8, 15.6, 31.25, 62.5 and 125 μ g/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(Meerloo 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)。

(10)統計分析(Statistical analysis)

實驗數據皆重複執行三次並以平均值±標準誤差(mean ± 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. 雅囊葉萃取流程

雅囊葉葉片烘乾後磨碎秤重，並以一定比例之乙醇進行萃取三日，將其萃取物利用抽氣幫浦過濾並利用減壓濃縮機濃縮後，計算獲得其萃取回收率為 10.34%，如表 1。

表 1、雅囊葉萃取物之萃取回收率

	重量(g)	萃取物總重(g)	萃取率(%)
冷凍乾燥之雅囊葉	81	8.38	10.34

2. 雅囊葉萃取物之生物活性成分分析

進行雅囊葉萃取物之生物活性分析(總多醣、總多酚、總三萜類)，分析結果得到總多醣、總多酚、總三萜類分別為 1.42%、1.0%、1.59%，

其結果如表 2。

表 2、雅囊葉萃取物之總多醣、總多酚、總三萜類含量分析

	總多醣	總多酚	總三萜類
每公克雅囊葉 乙醇萃取物(mg)	137.0	96.9	153.9
萃取物中占比率(%)	13.7	9.7	15.4
雅囊葉樣品占比率 (%)	1.42	1.0	1.59

3. 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

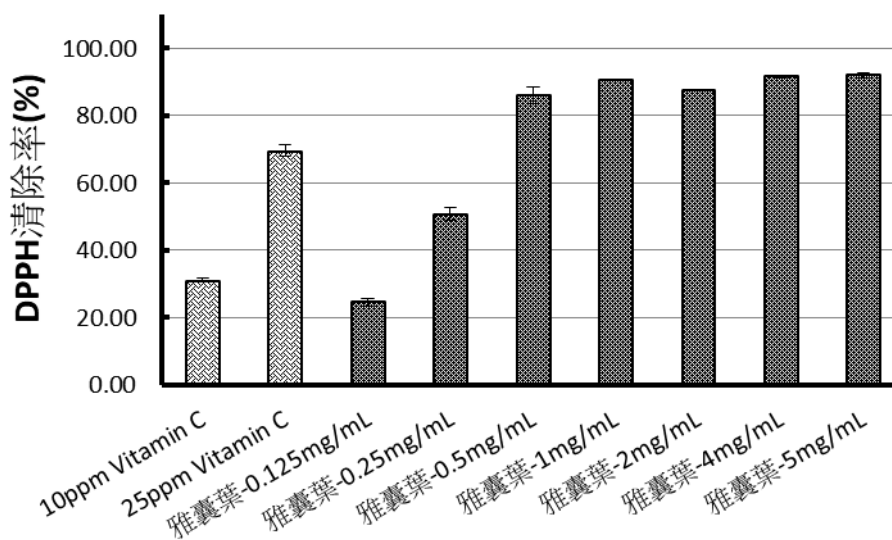


圖 1. 雅囊葉萃取物抗氧化能力試驗

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。

4. 雅囊葉對正常肝細胞試驗

本計畫中我們進行了雅囊葉萃取物對正常肝細胞(CL48)的影響試驗(如圖 2、圖 3)，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 4)。

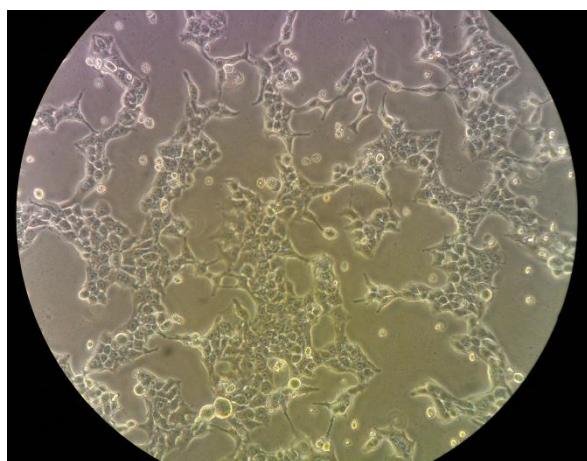


圖 2、CL48 人類正常肝細胞培養



圖 3、雅囊葉萃取物濃度為 125 μg 處理之 CL48 肝細胞

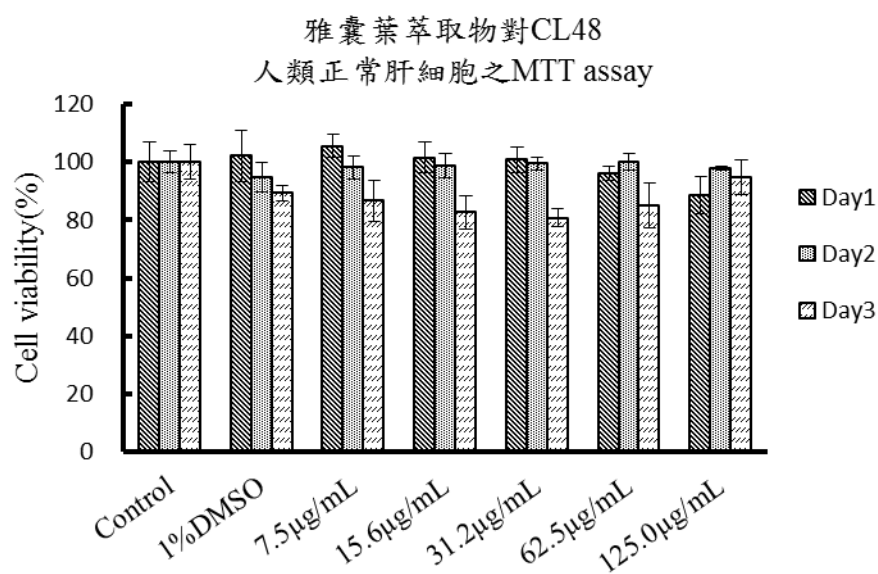


圖 4、雅囊葉萃取物對 CL48 人類正常肝細胞(1-3 天)細胞存活率測試

5. 雅囊葉萃取物之抗發炎能力

本研究以 RAW264.7 巨噬細胞(如圖 5.)進行了雅囊葉萃取物在抗發炎能力上的試驗，初步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 6.)。

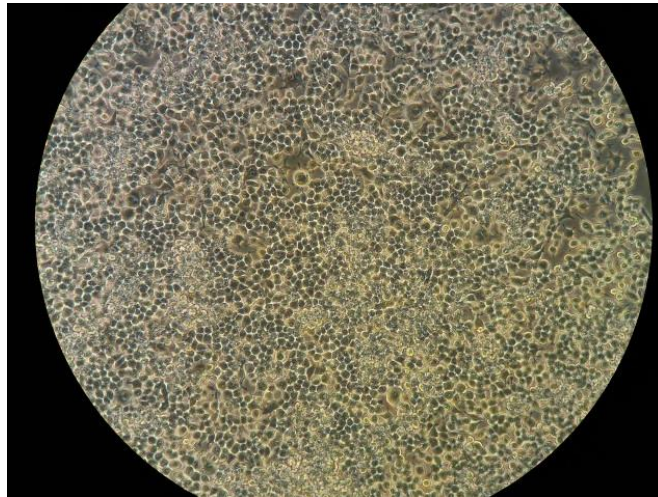


圖 5、RAW264.7 巨噬細胞培養於顯微鏡下生長狀況

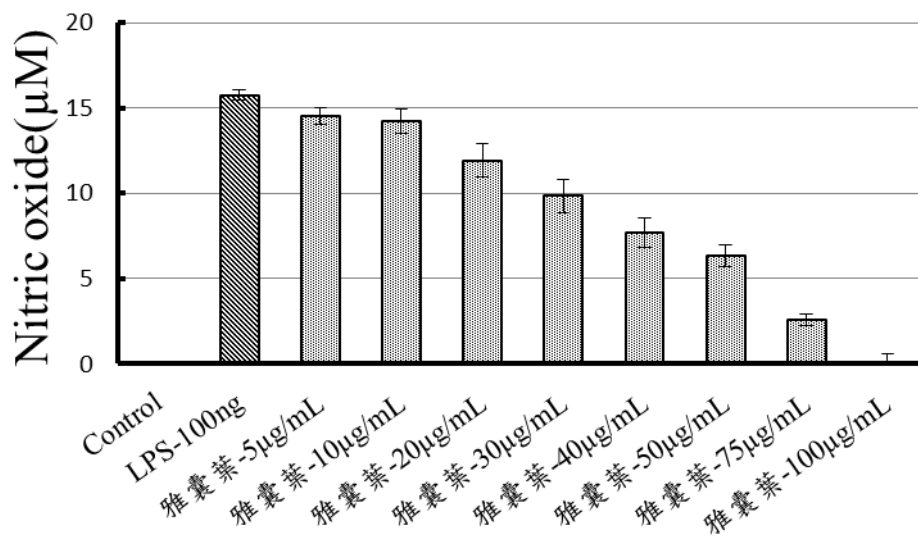


圖 6、不同濃度雅囊葉萃取物對 LPS 誘導 RAW 巨噬細胞之 NO 的抑制能力(評估抗發炎效果)

中英文參考文獻

- Chaikham, P., 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.
- Chutima Kaewpiboon, Pakorn Winayanuwattikun¹, Tikamporn Yongvanich¹, Preecha Phuwapraisirisan², Wanchai Assavalapsakul. 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., J. S. Shinge, N. S. Naikwade. 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., Yongvanitchit, K. 1989. Antimalarial activity of *Tiliacora Triandra* Diels against *Plasmodium falciparum* in vitro. *Phytotherapy Research*. Vol. 3, NO. 5.
- 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.