

海巴戟天之葉萃取物的抗氧化活性分析

陳師瑩* 陳靜慧** 王櫻娟*
江靜欣*** 鍾玉玲**** 葉東柏****

*嘉南藥理科技大學保健營養系
**元培科學技術學院醫事技術系
***嘉南藥理科技大學食品衛生系
****嘉南藥理科技大學生物科技系

摘要

本實驗利用超臨界二氣化碳萃取技術(SFE-CO₂)、99.5% EtOH、50% EtOH及去離子水萃取海巴戟天(台灣2號)的葉(Noni-L)，並就萃取物進行體外抗氧化活性分析。抗氧化能力以Trolox當量的抗氧化能力、DPPH自由基清除能力、清除氫氧自由基(·OH)能力以及螯合鐵的能力為指標。在考慮到抗氧化活性與成本效益下，各種萃取模式中是以去離子水萃取海巴戟天的葉最適當。將18隻成熟的雄性大白鼠隨機分為3組，並餵食4週。其中一組大白鼠於實驗最後兩週每隔一天進行腹腔注射生理食鹽水，當作是控制組(CK)；其餘兩組則腹腔注射環磷醯胺(25 mg/kg)，一組在飼料中添加50 mg/kg海巴戟天葉之去離子水萃取物，作為實驗組(Noni-LW)，另一組未添加任何測試物質之飼料，則作為對照組(CP)。實驗結果顯示Noni-L的水萃取物可以顯著保護大白鼠因環磷醯胺所誘發血球細胞之脂質過氧化現象，也有提昇肝臟及血漿的總抗氧化活性，但未達顯著差異。

關鍵詞：海巴戟天、二氣化碳超臨界萃取、環磷醯胺、抗氧化活性

前言

Morinda citrifolia (Rubiaceae)其俗名為Noni，中文名為海巴戟天。台灣文獻則稱檄樹、水冬瓜、紅珠樹，其他別名還包括蘿梨、四季果、精力果、長壽果等，印度稱為桑椹，故又名印度桑椹(Indian mulberry)。海巴戟天盛產於夏威夷群島、南太平洋群島及法屬玻里尼西亞大溪地、印度、薩摩亞群島。其植物型態為常綠小喬木，樹幹上方枝條具有四稜角，全株平滑無毛；葉具短柄、對生，形狀為橢圓形或長橢圓形，兩端均銳；果實為漿質聚合果，擴大而合生的花萼組成，形狀為球

形、長瓜形或三稜形，果實內子核多達300多個不等。海巴戟天為熱帶植物，適合生長在本島南部溫溼地帶，氣溫22°C以上，四季開花結果，台灣的仲夏到季秋為盛產期。由於種植及採收容易，南部農民對於種植該類植物的興趣亦相當濃厚，目前有七個品種已供應國內外廠商及餐飲業使用。如果海巴戟天經由改進調製或萃取的方法，其生理活性研究分析亦得到科學驗證，不僅材料極具本土性開發價值，又適合台灣種植與開發量產，因此可以帶動南部生物科技產業的發展。

依據民間傳統療法的資料顯示，海巴戟天的花、果、葉、莖、樹皮、根皆可調製，可分開或合併飲用，各部位並具有百種以上醫療保健功效，當中包括糖尿病、高血壓與癌症的預防及治療效果⁽¹⁾。近年來對於海巴戟天相關文獻有增加的趨勢，Hirazumi, A., 1994, 1996⁽²⁻³⁾的研究顯示，飲用海巴戟天果實的果汁可以促進小鼠免疫系統，並抑制Lewis lung carcinoma的生長；Liu, G.和Sang, S.等的研究顯示，海巴戟天葉與果實中含有抑制癌細胞發展的物質⁽⁴⁻⁵⁾；Hirazumi, A., 1999⁽⁶⁾證實海巴戟天的果實中的多醣類物質(Polysaccharide-rich substance)具有免疫調節(immunomodulator)的生理功能；而最近Sang, S., 2001⁽⁷⁾研究發現由海巴戟天的葉純化出來的物質(Flavonol glycosides and iridoid glycoside)具有抗氧化性；Zin, Z. M., 2002⁽⁸⁾從海巴戟天的葉、根及果實的甲醇與乙酸乙酯萃取物中也分析到抗氧化活性。而氧化性傷害已成為近年來食品學和生理學研究的重點，醫學上甚至認為許多疾病的發生(如糖尿病、高血壓與癌症等)與老化現象是因自由基或活性氧的產生所造成⁽⁹⁻¹¹⁾。故本實驗的研究方向擬以熱水、酒精及二氯化碳超臨界萃取等三種方法，製備與萃取海巴戟天之葉中有效成分，並參照健康食品管理法之抗氧化機能評估的建議方法，進行體外試驗(*in vitro*)，及活體內動物實驗(*in vivo*)，並評估海巴戟天對於保護生物巨分子的抗氧化能力的特性與差異。

材料與方法

一、實驗材料

海巴戟天的葉(Noni-L)係取自於仁安農園栽培之台灣2號，其葉經烘乾後，由磨粉機輾磨後裝瓶，並置入除濕器中於室溫下保存。環磷醯胺(Cyclophosphamide)及其他相關藥品皆購自於Sigma。

二、實驗方法

1. 萃取條件

(1) 二氯化碳超臨界萃取(Supercritical carbon dioxide extraction; SFE-CO₂)

本實驗所使用之二氯化碳超臨界萃取設備係由頤樺科技股份有限公司組裝，使用HiP公司(High Pressure Equipment Company; Erie, PA., USA)的50 mL萃取槽(316 SS)，可耐壓10,000 psi；依據潘氏⁽¹²⁾的萃取模式，使用四種不同萃取條件，分別為A：35°C、1500 psi；B：35°C、3500 psi；C：50°C、1500 psi；D：50°C、3500 psi，作二氯化碳超臨界萃取，每次萃取後即更換新的樣品。每次取12 g粉碎之Noni-L，置於50 mL萃取槽，開啟二氯化碳進入閥，使超臨界流體進入萃取槽，調整空氣壓力閥(air pressure regulator)與背壓閥(back pressure regulator)控制系統壓力，以及調整萃取槽內的溫度，待壓力與溫度達到實驗設定值後開始計時，先使樣品和超臨界流體浸泡於萃取槽3小時，隨後以氣體流量計(flow meter)控制流速0.3 L/min洩壓，並開始收集樣品於串聯的2瓶收集瓶，每瓶分別裝有5 mL 99.5%乙醇(EtOH)，用以捕捉樣品萃取物，連續洩壓直至系統壓力歸零，隨後於該次實

驗溫度下，再加壓至3,500 psi維持5分鐘後以流速3 L/min洩壓，收集殘餘樣品至另一空白收集瓶，直至系統壓力歸零；將所收集到的樣品混合均勻，並於室溫下進行減壓濃縮至乾燥，所得樣品放入4°C冰箱中保存，部分樣品則經恆重後作為定量標準；乾燥樣品以99.5% EtOH溶解後，以5,000 ×g，4°C下離心10分鐘，取上清液進行抗氧化分析。

(2)99.5% EtOH

取3.5 g粉碎之Noni-L，加入50 mL 99.5%EtOH，於50°C、100 rpm水浴震盪24小時。冷卻後以6,500 ×g，4°C下離心20分鐘，取上清液於室溫進行減壓濃縮至乾燥。所得樣品之保存、定量與抗氧化分析前樣品處理同上。

(3)50% EtOH

取3.5g粉碎之Noni-L，加入50mL 50% EtOH，於50°C、100 rpm水浴震盪24小時。冷卻後以6,500 ×g，4°C下離心20分鐘，取上清液於室溫進行減壓濃縮至乾燥。所得樣品之保存、定量與抗氧化分析前樣品處理同上。

(4)去離子水(d.d.H₂O)⁽¹³⁾

取3.5g粉碎之Noni-L，加入50mL去離子水(d.d.H₂O)，於80°C、100 rpm水浴震盪24小時。冷卻後以6,500 ×g，4°C下離心20分鐘，取上清液進行冷凍乾燥。所得樣品之保存與定量方法同上；乾燥樣品以d.d.H₂O溶解後，以5,000 ×g，4°C，離心10分鐘，取上清液進行抗氧化分析。

2.體外(*in vitro*)抗氧化分析方法

本實驗以清除α、α-diphenyl-β-picrylhydrazyl自由基(DPPH[•])及Trolox當量的總抗氧化能力(Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC)測定，作為選擇最佳萃取Noni-L抗氧化活性物質的主要分析指標。自然界的自由基種類相當多，包括：氫氧自由基(OH[•])、超氧陰離子(O₂^{•-})、單重氧(^{1}O₂)、一氧化氮(NO)及過氧化脂質(LOO[•])等，以TEAC及DPPH的方法檢定抗氧化力作為篩選抗氧化物質的方法雖然簡單且有效率，但是無法區別Noni-L是清除或防禦哪一類的自由基，因此本實驗擬選定以清除氫氧自由基(OH[•])之特定抗氧化物質作為次要抗氧化分析篩選指標，利用芬頓反應(Fenton-type reaction)以Thiobarbituric acid reaction substance (TBARS)分析清除氫氧自由基之能力；為排除萃取物質可能因螯合鐵，而發生TBARS試驗結果的假象或干擾，增加螯合鐵能力之測定，除了作為輔助評估外，一併觀察萃取物質螯合鐵的能力。上述分析結果將作為選定最佳萃取模式的依據，並用以進行活體內試驗。

各實驗條件之萃取液，經不同比例稀釋後進行下列抗氧化分析：

(1)Trolox當量的抗氧化能力

依Yu等人⁽¹⁴⁾之方法，取8.8 U/mL peroxidase 及 75 μM 2,2'-azino-bis-[3-ethylbenthiazoline-6-sulfonic acid] (ABTS)溶液，再加入60 μM H₂O₂混合均勻，6分鐘後產生安定藍綠色之ABTS⁺陽離子自由基，隨即加入不同濃度的trolox標準品或樣品10 μL，測734 nm之吸收光值，作成trolox檢量線，樣品則藉檢量線換算其相當濃度。

(2)DPPH自由基清除能力測定

依Shimada等人⁽¹⁵⁾之方法，取5點不同濃度的樣品10 μL分別加入0.1mM DPPH之甲醇溶液，於

37°C避光反應30分鐘後，以8,000 ×g離心10分鐘，冷卻後測其517 nm之吸光值。空白試驗(Blank)以樣品溶劑(99.5%, 50%EtOH及d.d. H₂O)取代樣品，將吸光值與樣品濃度作圖，計算出樣品清除50%DPPH自由基的濃度(Inhibitory concentration; IC₅₀)。

(3)氫氧自由基清除能力之測定

依據Ghieselli⁽¹⁶⁾及Halliwell⁽¹⁷⁾等人之方法，並作適當調整，取5點不同濃度的樣品10 μL分別加入2.8 mM 2-deoxyribose溶液、25 mM PBS buffer (pH 7.4)、0.7 mM urea、2.8 mM H₂O₂、20 μM FeCl₃、10.4 μM EDTA及0.1 mM ascorbic acid混勻後，於37°C反應1小時。再加入1 mL 8.4% Trichloroacetic acid (TCA)和1 mL 0.7% TBA (Thiobarbituric acid)混勻後，於100°C反應8分鐘，冰浴10分鐘後，以8,000 ×g，離心10分鐘，冷卻後測其532 nm之吸光值。空白試驗(Blank)以樣品溶劑(99.5%, 50%EtOH及d.d. H₂O)取代樣品，將吸光值倒數與樣品濃度作圖，計算出樣品清除50%氫氧自由基的濃度(IC₅₀)。

(4)螯合鐵能力之測定

依Aruoma等人⁽¹⁸⁾之方法，取5點不同濃度的樣品20 μL分別加入740 μL甲醇及0.2mM FeCl₂待30秒後，40 μL 5mM ferrozine混勻後，於37°C反應10 min後，以8,000 ×g，離心10分鐘，冷卻後測其562 nm之吸光值。空白試驗(Blank)以樣品溶劑(99.5%, 50%EtOH及d.d. H₂O)取代樣品，將吸光值與樣品濃度作圖，計算出樣品螯合50%鐵的濃度(IC₅₀)。

3. 活體內(*in vivo*)抗氧化分析方法

本實驗使用18隻雄性Sprague-Dawley大白鼠，先以大白鼠專屬飼料(Laboratory rodent diet #5001，不含抗壞血酸)飼養一週，適應環境後，再分成三組進行為期四週的實驗。其中一組持續以大白鼠專屬飼料繼續飼養，於實驗15天後每隔一天對大白鼠腹腔注射0.1ml/300g的無菌純水，作為控制組(CK)，另外兩組於實驗15天後，每隔一天皆對大白鼠腹腔注射 25mg/kg的環磷醯胺⁽¹⁹⁾，誘發內生性活性氧產生(Reactive oxygen species; ROS)，其中一組作為對照組(CP)；最後一組在大白鼠腹腔注射環磷醯胺的同時，於飼料中每天添加50 mg/kg的Noni葉之水萃取物，作為試驗組(Noni-LW)。Noni-LW劑量是參考國人普遍使用的茶飲料為依據，由其每天飲用總量的平均值來推算⁽¹³⁾；實驗過程中所有大白鼠皆各別飼養於不銹鋼籠子，環境控制在溫度19-23°C，相對濕度40-60%，照明12小時光或暗，每兩天添加飼料與記錄體重一次，餵養期間自由進食，四週實驗期完成後，收集大白鼠血液及肝臟待測。

(1)血液與肝臟處理⁽¹³⁾

實驗進行到採集樣品的前一天，將小鼠禁食24小時，以乙醚麻醉後，由腹腔動脈採血，使用離心機於1,000 ×g下分離出血漿及血球，並於分裝後在-20°C下冷凍保存。另摘取肝臟器官，分別以0.9%生理食鹽水清洗，去除多餘結締組織，再以濾紙拭淨後稱重記錄，再用鋁箔紙包住裝入夾合袋中，儲存於-20°C之冷凍櫃。

(2)血漿與肝臟之Aspartate transaminase (AST)及Alanine transaminase (ALT)活性測定：

方法係採用Randox kit，利用生化分析儀測直接測定⁽²⁰⁾。血漿直接分析外，肝臟均質液係剪取定量肝臟，加入適量冰冷0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)，先以剪刀剪碎，再置於組織均質機中以固

定時間、轉速及冰浴下均質，濾紙過濾後以phosphate buffer定量，經8,000 ×g、4°C離心10分鐘，取上清液待測。

(3) 血漿與肝臟之Trolox 當量的總抗氧化活性分析

血漿直接分析外，肝臟均質液係剪取定量肝臟，加入適量冰冷0.1 M phosphate buffer (pH 7)，先以剪刀剪碎，再置於組織均質機及超音波細胞破碎機中以固定時間、轉速或強度及冰浴下破碎與均質，以濾紙過濾均質液後加入trichloacetic acid (TCA)並調整終濃度為10%後定體積，經8,000 ×g、4°C離心10分鐘，取上清液待測；分析方式同本實驗體外試驗(*in vitro*)，依Yu等人⁽¹⁴⁾之方法進行。

(4) 血球與肝臟之脂質過氧化指標分析

採用Tatum方法⁽²¹⁾，TBARS值含量以malondialdehyde (MDA mmol/g tissue)表示，取1 mL上述肝臟組織均質液或血球細胞懸浮液(取定量血球後，依肝臟處理模式，均質、定體積及離心後取上清液待測)，加入butylated hydroxytoluene (BHT，終濃度為0.5 mM)以終止反應，並防止在強酸中加熱時所造成的脂質過氧化。其後分別加入1 mL 0.7% thiobarbituric acid (TBA)及1 mL 2.8 % TCA溶液，混合後置於 50°C水浴中1小時，冷卻後以8,000 ×g離心10分鐘，以分光光度計測535 nm之吸光值，作成MDA檢量線，樣品則藉檢量線換算其相當濃度。

三、統計分析

所有數據經SAS系統之One-Way ANOVA變異數分析處理，再以Duncan's test作各因子之分析與比較。

結果與討論

一、Noni-L萃取物質之體外抗氧化活性分析

Noni-L經：(1)二二氧化碳超臨界萃取(SFE-CO₂)，(2)50°C、99.5% EtOH，(3)50°C、50% EtOH，(4)80°C去離子水等萃取方法，可得七種萃取產物，再分別進行：(1)Trolox當量的抗氧化能力，(2)DPPH供氫能力，(3)清除氫氧自由基能力，(4)螯合鐵能力等抗氧化測定分析。結果如表1：以TEAC法分析抗氧化活性作比較，抗氧化能力最佳的萃取模式依序為：50% EtOH、99.5% EtOH、及80°C去離子水所萃取的Noni-L，Trolox當量的抗氧化能力皆高於250 μmole/g。而各種SFE-CO₂的產物所分析到Trolox當量的抗氧化能力普遍較低。若以清除 DPPH自由基能力作比較，各項產物之清除DPPH自由基能力顯著有最佳的萃取模式仍為：99.5% EtOH、50% EtOH及80°C去離子水等三種方法所萃取的Noni-L。其清除DPPH自由基能力的樣品濃度(IC₅₀)在150-230 ppm之間；而各種SFE-CO₂的產物則需要較高的樣品濃度始能清除50% DPPH自由基(IC₅₀在500 ppm以上)，顯示SFE-CO₂萃取方法在清除DPPH自由基能力顯著較低。在清除氫氧自由基能力方面，各種SFE-CO₂的產物也均未能測得清除氫氧自由基的能力，顯示以SFE-CO₂的方法萃取Noni-L之非極性抗氧化物質的效果不盡理想，但是以50%EtOH及80°C去離子水所萃取的產物清除氫氧自由基的能力較佳；若以清除50%氫氧自由基所需的萃取產物濃度(IC₅₀)作比較，明顯又比99.5% EtOH所萃取的產物好，也顯示清除氫氧自由基能力的抗氧化活性物質多具極性特質。在螯合鐵能力方面以50% EtOH與80°C去離子水所萃取的Noni-L，螯合鐵能力顯著最高。除了SFE-CO₂ (3500 psi、35°C)及SFE-CO₂ (1500 psi、50°C)所萃取之Noni-L不具任何螯合鐵的能力，另兩種 SFE-CO₂ (3500 psi、50°C)及SFE-CO₂

表1 海巴戟天(*Morinda citrifolia*)葉萃取物之抗氧化能力評估¹
Table 1. Evaluation of antioxidative activity in Noni leaf extracts¹

萃取條件		總抗氧化能力 (TEAC; μmole/g)	供氫能力 (IC ₅₀) ² (DPPH; ppm)	清除氫氧自由 基能力(IC ₅₀) (TBARS; ppm)	螯合鐵能力(IC ₅₀) (ppm)
SFE-CO ₂ ; 3500 (psi)	35°C, 5 hr	64.91±14.92	1066.28±6.73	—	—
SFE-CO ₂ ; 3500 (psi)	50°C, 5 hr	110.09±34.97	934.64±18.30	—	2929.62±170.06
SFE-CO ₂ ; 1500 (psi)	35°C, 5 hr	75.10±11.04	584.24±14.19	—	2524.53±232.33
SFE-CO ₂ ; 1500 (psi)	50°C, 5 hr	135.45±7.57	1092.84±1.72	—	—
99.5% EtOH	50°C, 24 hr	287.35±32.01	221.24±5.77	671.15±34.71	10109.70±920.28
50%EtOH	50°C, 24 hr	333.52±4.34	171.02±3.99	332.98±4.59	35.40±0.40
d.d.H ₂ O	80°C, 24 hr	270.56±15.47	160.72±1.43	375.61±8.48	33.69±1.33

¹ Values are mean ± SD. (n=3)

² IC₅₀, inhibitory concentration caused 50% inhibition of the oxidative reaction.

(1500 psi、35°C)之萃取方法，以及99.5% EtOH萃取的產物之螯合鐵能力亦有偏低的現象，其螯合50%鐵所需的萃取產物濃度(IC₅₀)遠大於以50% EtOH與80°C去離子水萃取的Noni-L，顯示50% EtOH與80°C去離子水所萃取的產物中含有較多螯合鐵的物質。

綜觀這些產物的萃取條件，不論是水溶性與非水溶性萃取條件，Noni-L中都含有抗氧化物質；然而在本實驗中以SFE-CO₂來萃取Noni-L中抗氧化活性物質的效果多未盡理想，以及從SFE-CO₂萃取非水溶性物質的特性來看，顯示Noni-L中抗氧化活性物質多偏向極性特性；而以50% EtOH及80°C去離子水萃取的產物在多數抗氧化能力的分析測定中，多偵測出較佳的抗氧化特性。亦顯示抗氧化活性物質之極性特質。雖然50% EtOH及80°C去離子水萃取物能偵測出較佳之抗氧化特性，但是兩者同時也具備較高的螯合鐵的能力，因此有需要進一步區別50% EtOH及80°C去離子水萃取物之抗氧化的特性，並探討其機轉是以捕捉氫氧自由基抑或是以螯合鐵的模式進行抗氧化能力，此外若能進一步純化以去除一些干擾物質，對其抗氧化的特性也能進一步釐清。

依據本實驗分析目的而言，以50% EtOH及80°C去離子水萃取的Noni-L中含有較高的抗氧化活性物質，顯然是最適合進行活體內試驗之最佳萃取模式，但在考慮到成本效益與一般消費者飲茶的習慣(如將Noni-L以熱水泡茶的方式飲用)，故優先採用80°C去離子水萃取的Noni-L，進行大量製備並進入活體內試驗。

二、Noni-L之水萃取液於體內抗氧化活性分析

1.各組大白鼠的體重、食物攝取量及餵食效率比較

表2結果顯示各組實驗動物生長情形。大白鼠的最初體重(Initial body weight)、最終體重(Final body weight)及每日平均體重增加量(Daily weight gain)皆無顯著差異。從實驗開始到結束，各組每日平均食物攝取量(Daily food intake)無顯著差異。以餵食效率(Feed efficiency)來看，各組間亦皆無顯著差異。推測Noni-L之水萃取液(Noni-LW)並不影響大白鼠的體重、食物攝取量及餵食效率。

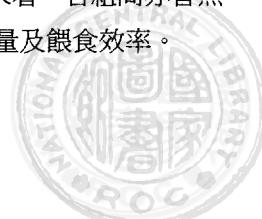


表2 大白鼠的體重變化、攝取量及飼料利用率¹⁻²
Table 2. Body weight gain, food intake and feed efficiency of rats¹⁻²

Treatment	n	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Daily weight gain (g/day)	Daily food intake (g/day)	Feed efficiency ⁶ (%)
CK ³	6	144.89±9.64 ^a	355.77±10.62 ^a	3.40±0.08 ^a	18.96±0.62 ^a	17.96±0.81 ^a
CP ⁴	6	150.41±9.81 ^a	361.36±16.12 ^a	3.43±0.10 ^a	18.84±0.90 ^a	18.26±0.58 ^a
Noni-LW ⁵	6	132.26±21.79 ^a	337.46±11.42 ^a	3.31±0.22 ^a	18.59±0.39 ^a	17.76±0.81 ^a

¹ Values are mean ± SD. (n represented rats number)

² Values in the same column with different superscript letters are significantly different at $p<0.05$ analyzed by Duncan's multiple range test.

³ CK denote control group injected i.p. for the last 2 week with normal saline on every other day.

⁴ CP denote comparison group injected i.p. with cyclophosphamide (25 mg/kg) in place of saline and fed with rodent diet on every day.

⁵ Noni-LW denote experimental group injected i.p. with the same as CP and fed with rodent diet combined with 50 mg/kg deionized water extract powder from Noni leaf on every day.

⁶ Feed efficiency = (daily weight gain / daily food intake) × 100%

2.大白鼠血漿、肝臟的ALT及AST活性測定

表3結果顯示，經過腹腔注射環磷醯胺的誘發組(CP)與控制組(CK)比較，並無顯著提高血漿及肝臟ALT、AST活性($P>0.05$)，顯示本實驗對於環磷醯胺(可造成活體內氧化性傷害的物質)的處理，對肝臟細胞傷害不大；對於經過環磷醯胺處理但有攝食Noni-LW的大白鼠(Noni-LW)與控制組(CK)相比較，兩組在血漿及肝臟ALT、AST的活性，亦無顯著差異($P>0.05$)，顯示Noni-LW對肝臟細胞不具傷害性。

表3 大白鼠之血漿、肝臟的ALT及AST活性測定¹⁻²
Table 3. ALT and AST activities of liver and plasma of rats¹⁻²

Treatment	n	Plasma		Liver	
		ALT (μmole/min/g)	AST (μmole/min/g)	ALT (μmole/min/mL)	AST (μmole/min/mL)
CK	6	28.54±1.90 ^a	77.44±22.85 ^a	104.78±1.80 ^a	53.97±1.05 ^a
CP	6	26.06±2.31 ^a	62.73±2.37 ^a	107.50±6.36 ^a	53.20±1.34 ^a
Noni-LW	6	23.70±4.55 ^a	62.45±1.16 ^a	102.93±4.45 ^a	52.34±1.72 ^a

¹ Values are mean ± SD. (n represented rats number)

² Values in the same column with different superscript letters are significantly different at $p<0.05$ analyzed by Duncan's multiple range test.

3.大白鼠血液、肝臟的總抗氧化活性(TEAC)及抗脂質過氧化效應(TBARS)的測定

由表4結果顯示，經腹腔注射環磷醯胺的CP組，其血漿與肝臟的TEAC值比CK組低，且血球細胞的TBARS值比CK組高，兩者都有顯著差異($P<0.05$)，顯示環磷醯胺會降低血漿及肝臟總抗氧化力與造成血球細胞的脂質過氧化。Noni-LW組比CP組有較高的血漿與肝臟總抗氧化活性，但無顯著差異($P>0.05$)，若與CK組相比，雖有較低的血漿與肝臟總抗氧化活性，亦無顯著差異($P>0.05$)，顯示攝取Noni-LW雖有增加活體內總抗氧化的能力，但Noni-LW在保護環磷醯胺所誘發的氧化性傷害上效力似嫌不足。從血球與肝臟脂質過氧化值的分析來看，Noni-LW組之血球細胞比CP組有顯著降

表4 大白鼠之血液、肝臟的總抗氧化活性與脂質過氧化產物之測定¹⁻²
 Table 4. Total antioxidation activity and lipid peroxidation product of rats¹⁻²

Treatment	n	TEAC		TBARS	
		Plasma (mmole/mL)	Liver (mmole/g)	Blood cells (nmole MDA/g)	Liver (nmole MDA/g)
CK	6	3.63±0.57 ^a	20.05±6.78 ^a	24.39±10.19 ^b	18.35±8.94 ^a
CP	6	2.84±1.13 ^b	14.99±5.78 ^b	49.16±2.61 ^a	19.79±5.24 ^a
Noni-LW	6	3.13±0.64 ^{ab}	16.58±7.48 ^{ab}	27.15±15.36 ^b	23.17±12.19 ^a

¹ Values are mean ± SD. (n represented rats number)

² Values in the same column with different superscript letters are significantly different at $p<0.05$ analyzed by Duncan's multiple range test.

低TBARS值的趨勢($P<0.05$)，顯示Noni-LW能保護活體內血球之脂質過氧化性傷害。雖然Noni-LW組之肝臟比CP組有較高的TBARS值，但無統計上明顯差異($P>0.05$)，顯示Noni-LW在保護活體內肝臟之脂質過氧化性傷害效應不明顯。

綜合上述實驗結果，顯示大白鼠在環磷醯胺的處理所造成的氧化壓力模式下，攝取Noni-LW對於抵抗氧化性壓力上具有若干保護的作用，依本實驗數據呈現，其抗氧化作用的方式，可能可以增加總抗氧化力的方式與降低血球細胞脂質過氧化的效應，達到部分保護活體內的氧化性傷害。

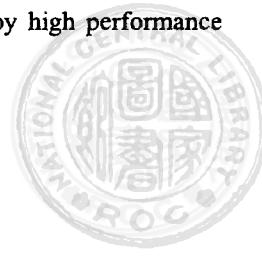
致謝

感謝嘉南藥理科技大學(CNIB-91-01)與國科會部分經費(NSC-91-2626-B041-003)的補助。

參考文獻

1. Wang M. Y., West B. J., Jensen C. J., Nowicki D., Chen S. U., Palu A. K. and Anderson G., "Morinda citrifolia (Noni): A literature review and recent advances in Noni research.", Acta Pharmacol. Sin., 23 (12): 1127-41, 2002.
2. Hirazumi A., Furusawa E., Chou S. C. and Hokama Y., "Anticancer activity of Morinda citrifolia (noni) on intraperitoneally implanted Lewis lung carcinoma in syngeneic mice.", Proc. West Pharmacol. Soc., 37: 145-6, 1994.
3. Hirazumi A., Furusawa E., Chou S. C. and Hokama Y., "Immunomodulation contributes to the anticancer activity of Morinda citrifolia (noni) fruit juice.", Proc. West Pharmacol. Soc., 39: 7-9, 1996.
4. Liu G., Bode A., Ma W. Y., Sang S., Ho C. T. and Dong Z., "Two novel glycosides from the fruits of Morinda citrifolia (noni) inhibit AP-1 transactivation and cell transformation in the mouse epidermal JB6 cell line.", Cancer Res., 61: 5749-56, 2001.
5. Sang S., He K., Liu G., Zhu N., Cheng X., Wang M., Zheng Q., Dong Z., Ghai G., Rosen R. T. and Ho C. T., "A new unusual iridoid with inhibition of activator protein-1 (AP-1) from the leaves of Morinda citrifolia L.", Org. Lett., 3: 1307-9, 2001.

6. Hirazumi A. and Furusawa E., "An immunomodulatory polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (noni) with antitumour activity.", *Phytother. Res.*, 13 (5): 380-7, 1999.
7. Sang S., Cheng X., Zhu N., Stark R. E., Badmaev V., Ghai G., Rosen R. T. and Ho C. T., "Flavonol glycosides and novel iridoid glycoside from the leaves of *Morinda citrifolia*.", *J. Agric. Food Chem.*, 49: 4478-81, 2001.
8. Zin Z. M., Abdul-Hamid A. and Osman A., "Antioxidative activity of extracts from Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) root, fruit and leaf.", *Food Chem.*, 78: 227-231, 2002.
9. Halliwell B. and Gutteridge J. M. C., *Free radical in biology and medicine*. 2nd edition, Oxford: Clarendon Press, 1989.
10. Halliwell B., "Oxidative stress, nutrition and health: experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans.", *Free Radic. Res.*, 25: 55-74, 1996.
11. Gutteridge J. M. C. and Halliwell B., *Antioxidants in nutrition health and disease*. 1th edition, Oxford: Oxford University Press, 1994.
12. 潘懷宗、劉晉魁、周良穎、謝秉甫、李沐勳， “利用超臨界二氣化碳萃取肉桂中精油成分：並與水蒸氣蒸餾法進行比較”。*中醫藥雜誌*，5 (3): 199-207, 1994。
13. 陳師瑩、葉東柏， “灌食不同劑量與製程的兒茶素類物質對小鼠抗氧化能力與肝功能之影響”。*中華民國營養學會雜誌*，26 (4): 8-267, 2001。
14. Yu T. W. and Ong C. N., "Lag-Time Measurement of antioxidant capacity using myoglobin and 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid): rationale, application, and limitation.", *Anal. Biochem.*, 275:217-223, 1999.
15. Shimada K., Fujikawa K., Yahara K. and Nakamura T., "Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion.", *J. Agric. Food Chem.*, 40: 945-948, 1992.
16. Ghiselli A., Nardini M., Baldi A. and Scaccini C., "Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine.", *J. Agric. Food Chem.*, 46: 361-367, 1998.
17. Halliwell B., Gutteridge J. M. C. and Aruoma O. I., "The deoxyribose method: a simple 'test tube' assay for determination of rate constants for reaction of hydroxyl radicals.", *Anal. Biochem.*, 165: 215, 1987.
18. Aruoma O. I. and Haillwell B., "The iron-binding and hydroxyl radical scavenging action of anti-inflammatory drugs.", *Xenobiotica*, 18: 459-70, 1988.
19. Saleha Banu B., Danadevi K., Jamil K., Ahuja Y. R., Visweswara R. K. and Ishaq M., "In vivo genotoxic effect of arsenic trioxide in mice using comet assay.", *Toxicology*, 162: 171-7, 2001.
20. Humalyzer，全自動生化分析儀操作手冊與Kit Chemistry of Humalyzer試劑使用說明，2000。
21. Tatum V. L., Changchit C., and Chow C., "Measurement of malondialdehyde by high performance liquid chromatography with fluorescence detection.", *Lipids*, 25: 226-9, 1990.



ABSTRACT

Evaluation of Antioxidative Activity in Noni Leaf Extracts

Shih-Ying Chen*, Chin-Hui Chen**, Yin-Chuan Wang*,
Ching-Hsin Chiang***, Yu-Ling Chung**** and Dong-Bor Yeh****

*Department of Health and Nutrition,

**Department of Medical Technology,

Yuan-Pei College of Science and Technology,

Hsin-Chu, Taiwan 30012, R.O.C.

***Department of Food Health,

****Graduate institute of Biotechnology,

Chia-Nan University of Pharmacy and Science,

Tainan, Taiwan 71701, R.O.C.

ABSTRACT

Taiwan number 2 Noni leaf (Noni-L) were extracted by a supercritical carbon dioxide extraction (SFE-CO₂) technique or using 99.5% EtOH, 50% EtOH or deionized water as extraction solvent. Trolox equivalent antioxidant capacity, the scavenging of α - α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) radical, the scavenging of hydroxyl radical, and the binding capacity of iron were used to indicat the antioxidant activities of Noni-L. We considered both the antioxidant activities and cost-benefit, the ideal condition of our various operation to extract the antioxidant from Noli-L was deionized water as extraction solvent. Eighteen adult male rats were divided into three groups randomly and fed with rodent diet for 4 weeks. One group were injected i.p. for the last 2 week with normal saline on every other day and served as the control group (CK). Another group were injected i.p. cyclophosphamide (25 mg/kg) and fed with rodent diet combined with 50 mg/kg deionized water extract powder from noni leaf on every day and served as the experimental group (Noni-LW). The other group as a comparison group (CP) treated with the same as Noni-LW group, but fed with rodent diet only in the experiment. In conclusions, administration of Noni-L extracted by deionized water to cyclophosphamide-injected rats showed the protective properties of the peroxidation of lipid in rats' blood cells. Furthermore , it may be helpful but not significant in elevating total antioxidative activity of rats' liver and plasma.

Key words: Noni, Supercritical carbon dioxide extraction, Cyclophosphamide, Antioxidative activity.

