

行政院農業委員會林務局委託研究計畫

奧萬大國家森林遊樂區森林資源永續利用推廣教育計畫
Education Promotion Program for Forestry Resource Utilization
in Aowanda National Forest Recreation Area



委託機關：行政院農業委員會林務局南投林區管理處

執行機關：國立中興大學森林學系

中華民國 98 年 12 月

1、計畫緣由

森林之景色宜人、可調節環境品質、降低溫室效應、淨化空氣和防阻噪音，更會產生對人類有益之揮發物質，林木不只會釋放出我們所熟悉的一次代謝（光合作用）副產物氧氣外，其二次代謝作用所製造出之特殊化學成分的揮散更會形成特殊的森林芬多精。近年來由於經濟的快速成長，使國人之生活陷於忙碌、緊張的狀態，為了紓解壓力、調劑身心，休閒生活的需求更形重要。目前，林業主管機關與學界均大力提倡森林浴活動，主要就是要鼓勵人們親近自然環境，在森林中吸收芬多精，藉以舒緩身心，促進健康。

從另一方面來看，經過百年的工業發展，人類在享受文明的發展的同時，也遭受了人為工業污染之危害，人們開始將目光焦點重新放回自然的產品上，嘗試利用植物的精油或是抽出物，生產抗氧化、滋潤、美白以及其他具特殊功能之產品，甚至可利用適當的配方以DIY的方式調製成自然的功能性保養乳液及清潔用品，將自然資源與日常生活用品結合，於享受森林休閒、遊憩的精神生活滿足之外，能同時兼顧到自然環境資源的保護與利用。

就解說教育的角度來看，建立本土自然資源科學性的研究資料，並將其以通俗之科普文字形式介紹給民眾，同時結合趣味的操作設計課程，相信將可達成事半功倍的教育推廣效果。林務局南投林區管理處所轄之奧萬大森林遊樂區及其自然教育中心為臺灣具代表性及廣受國人喜愛的森林遊樂區，本計畫即以三年的執行時間，以奧萬大國家森林遊樂區內森林資源為目標就其特殊成分之民生用途，藥用保健功能進行分析研究，並完成推廣教育所需之設備教材之建構以及種子教師之培訓。

於計畫執行成果中，我們針對園區代表性樹種，包括山肉桂、山胡椒、香杉及楓香之揮發性成分與非揮發性成分進行分析，利用不同的層析技術對其分離、純化，並結合核磁共振光譜、質譜、紅外光光譜與紫外光光譜鑑定化合物結構。所獲得之抽出物與成分，則續利用多種體外、細胞與動物試驗探討其可

能具有的生物活性，並獲得具體的成果。本計畫之完成，將可作為林務局所轄之森林遊樂區未來推動深度生態旅遊之推廣模式，並將森林資源永續利用之理念藉由遊客造訪森林遊樂區之便，潛移默化於人心。以下僅將計畫執行成果總結報告如下。

II、材料與方法

(I) 試驗材料

本計畫所研究的樹種均採集於奧萬大森林遊樂區，並經中興大學森林學系曾彥學教授鑑定，同時製作成標本保存於森林學系標本館內。本計畫所研究之樹種包括，山肉桂（果實、枝條）、山胡椒（果實、枝條）、巒大杉（針葉、木材）及楓香（木材及樹皮滲出物等）。

(II) 精油之萃取及抽出成分製備

1. 精油之萃取及抽出成分製備

在森林永續利用之精神下，本計畫將試材利用水蒸氣蒸餾法獲取精油，並利用氣相層析質譜儀(GC/MS)分析不同部位精油組成。

2. 非揮發性成分之製備

試驗材料之萃取係利用70%乙醇冷浸法儘量萃取抽出成分，經減壓濃縮後所得之粗萃取物，續以不同極性之溶劑，包括正己烷、乙酸乙酯及正丁醇等，將萃取物初步分劃成正己烷可溶部、乙酸乙酯可溶部、正丁醇可溶部及甲醇不溶部等四個分離部。

3. 楓香癒傷組織揮發性成分收集與滲出物之製備

先以刀片在楓香樹幹上做一小傷口，再以夾鏈袋緊密封住傷癒處理口以收集完整的香氣成分，夾鏈袋內的香氣成分以SPME技術收集，SPME的纖維載具及

吸附纖維(75 μm)是由Supelco 公司(Bellefonte, USA)所製造。在使用SPME之前，須先使SPME上吸附纖維置於GC注射孔內進行熱脫附(250°C，20分鐘)以除去污染物。開始試驗時，先以夾鏈袋包覆樹皮創傷口一小時，再將SPME探針頭以頂空萃取方式吸附一小時。以上試驗條件的選擇皆根據先前試驗後所得到最佳化的結果。在經過一小時的吸附過程後，將SPME自夾鏈袋取出，立即將針頭插入GC入口連結管，注射口溫度為250°C並維持30秒。樹皮上的滲出物則是以刮刀收集後溶於乙酸乙酯，並於4°C環境中存放等待試驗。

4. 非揮發性成分分離與結構鑑定

具活性之各初分離部或次分離部，續利用薄層層析、管柱層析及高效能液相層析等技術進行分離與純化。所使用之TLC薄片之吸附劑為矽膠 (Silica gel, 60F254 Merck Co.)，展開溶劑為不同比例之正己烷與乙酸乙酯，展開後以紫外光燈觀察，並利用10%硫酸溶劑為呈色劑。而各分離部以CC分離前，均先以矽膠 (Merck 7734) 吸附 (矽膠:抽出物 = 2:1)，之後再利用吸附劑作管柱層析，沖提溶劑依序為正己烷，乙酸乙酯，乙醇及其混合液。每2000-3000 mL 更換極性，每500 mL 收集一瓶，並以TLC 分析，成分類似者則予以合併成次分離部。各瓶中有結晶產生者則先收集，並利用再結晶法純化。其他則進一步利用HPLC作分離及純化。高壓幫浦使用Jasco model PU980 或Hitachi L-7490，檢測器則使用: 紫外光檢測器 (Jasco model UV970)，折射率檢測器 (Jasco RI930) 及多波長檢測器 (Jasco MD910)。分離管柱採用Phenomenex Si-60半製備級管柱 (250 mm \times 10 mm)，Phenomenex Luna CN分離管柱 (250 mm \times 10 mm) 或 Phenomenex Luna C18分離管柱 (250 mm \times 10 mm)，移動相 (Mobile phase) 為不同比例之正己烷和乙酸乙酯，二氯甲烷和乙酸乙酯或甲醇與水等混合溶液。

本計畫所使用之分析儀器包括：Electrothermal Model IA9100熔點測定儀；Jasco V-550紫外光光譜分析（UV）；Bio-rad FTS-40傅立葉轉換紅外光光譜分析（Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR）解析度為4 cm⁻¹，掃瞄次數為64次，光譜掃描範圍為400 - 4000 cm⁻¹；Finnigan MAT-95S質譜儀分析（HREIMS，EIMS）；Bruker Avance-500 MHz 傅立葉轉換核磁共振光譜分析（¹³C-NMR和¹H-NMR）。此外，從事核磁共振光譜分析時亦使用NOE，DEPT，HSQC和HMBC等分析技術以確定化合物之結構。

5. 氣相層析/質譜分析

精油組成份含量是利用氣相層析質譜儀(GC/MS, HP G1800A, USA)配合DB-5毛細管柱(Length 30 m, I.D. 0.25 mm, Film thickness 0.25 μm，J&W Scientific)進行分析；載送氣體氮氣的流速為1 mL/min，離子化電壓為70 eV，質譜儀分子量設定範圍為45-425 m/z；注射孔溫度為270°C；起始溫度為40°C持溫1 min，後以4°C/min的升溫速率至260°C，並持溫4 min，結束分析。各成分的質譜透過標準品或NIST(National Institute of Standard and Technology)比對並計算其Kovat index以確認其組成。化合物濃度則以層析圖譜中之吸收峰相對面積來計算。

6. 抗發炎活性篩選試驗

抑制一氧化氮自由基(NO)的生成為評估抗發炎活性的主要方法之一，其分析原理為利用LPS(lipopolysaccharide)刺激老鼠巨噬細胞RAW264.7，模擬發炎反應時由誘導型一氧化氮生成酵素(inducible nitric oxide synthase, iNOS)，iNOS會產生大量自由基。並利用山肉桂精油及其成分進行清除NO自由基的能力來評估成分是否有抗發炎活性。取RAW264.7小鼠巨噬細胞植入96 well組織培養盤中，細胞濃度2×10⁵ cell/well，細胞貼附於培養盤後隨即添加不同濃度的山肉桂果實精

油及其成分，在生長箱中培養一小時後添加LPS(1.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$)培養24小時，進行NO測定試驗。利用Griess法，將上述反應後之上清液取100 μL ，加入等量的Griess試劑(0.1% N-(1-naphthyl)ethylenediamine in H_2O 與1% Sulfanilamide in 5% Phosphoric acid 混和溶液)，測其540 nm 的吸光值。由於NO的半衰期很短，迅速會被氧化成nitrite的量，再進一步氧化成nitrate，因此在短時間內可使用Griess reagent測定nitrite的量，來間接表示NO的釋放量 (Paul *et al.*,1994)。

7. 精油及其成分之鼠耳抗發炎試驗

本研究所使用之ICR(Cr1:CD1)小鼠為樂斯科生物科技公司購入之四週齡公鼠，重量為25-28 g。將小鼠適應於溫度 $25\pm 2^\circ\text{C}$ 、相對濕度 $55\pm 5\%$ 、光照12小時(6:00–18:00 h)的環境，並讓其自由進食進水。實驗前必須先將小鼠由動物房移至實驗室適應1小時。取ICR公的小鼠(3-4週齡)進行試驗，先把以丙酮調配的不同濃度的山肉桂果實精油及其成分，塗抹於老鼠的右耳，再以等量丙酮塗抹於左耳作對照；等待一小時後，使用croton oil(10 $\mu\text{L}/\text{ear}$)塗抹於剛才塗抹過sample的右耳，左耳同樣以等量丙酮塗抹。經過六個小時作用以後，將小鼠犧牲，並以打孔器取下左右耳試樣，精確秤量其重量之變化。

8. 蛋白質的萃取和Western blot分析

將小鼠巨噬細胞(Raw264.7 cell line)培養18小時，並加入不同濃度的citral以及1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的LPS，再將細胞以冰的PBS(calcium and magnesium-free phosphate buffered saline)清洗，及加入150 μl lysis buffer (Mammalian Protein Extraction Reagent, Pirece Biotechnology Inc., Rockford, IL)溶解細胞，蛋白質以Bradford method (Bradford, 1976)定量，每個樣品各加入20 μg 的蛋白質於5%至7%濃度梯度的SDS-Page(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide) gel來測定iNOS及COX-2蛋

白表現，進行蛋白分離，條件為300 mA，進行90分鐘。之後，以100 V進行1小時使分離之蛋白，轉置於轉印膜PVDF(polyvinylidene difluoride)(Immobilon, Millipore, Bedford, MA)。轉置完後，以脫脂奶粉 (10% w/v skim milk in TBST buffer)進行blocking 1個小時，之後加入一次抗體分別為anti-iNOS、anti-COX-2 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI)及anti-actin(Sigma, St. Louis) 之後，加入 0.1% TBST (TBS containing 0.1% Tween 20)清洗兩次，再加入二次抗體anti-Rabbit-IgG-HRP兩個小時，以加入ECL(enhanced chemiluminescence)試劑(Pierce Biotechnology, Rockford, IL)呈色，再進行測定。

9. 抗氧化活性試驗

(1) DPPH自由基清除效應

取1000 μ L DPPH (1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl)乙醇溶液(0.1 mM)、450 μ L Tris-HCl緩衝溶液(50 mM, pH 7.4)及50 μ L不同濃度之試驗樣品於小樣品瓶，均勻混合後靜置於室溫下避光30 min。以紫外光/可見光光譜儀測量波長517 nm之吸光值。當DPPH自由基被清除愈多時，其吸光值會下降的愈多，利用相對於對照組的吸光值減少之百分比，可得知各試驗樣品清除DPPH自由基之能力，DPPH自由基之抑制率計算公式如下(Wang *et al.*, 2004)。

$$\text{DPPH自由基抑制率 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{實驗組吸收值}}{\text{對照組吸收值}} \right) \times 100$$

(2) 超氧自由基捕捉試驗

參考Kirby和Schmidt (1997) 之試驗方法並做些微修飾，步驟如下：取20 μ L 15 mM Na₂EDTA (Disodium ethylene diamine tetraacetic acid) (以50 mM KH₂PO₄/

KOH緩衝液配製)、50 μ L 0.6 mM NBT (Nitroblue tetrazolium chloride) (以50 mM KH_2PO_4 /KOH緩衝液配製)、30 μ L 3 mM Hypoxanthine (以50 mM KOH緩衝液配製)、5 μ L不同濃度之試驗樣品以及145 μ L緩衝液(50 mM KH_2PO_4 /KOH, pH 7.4)於96-well的微量平盤中混合。反應時迅速添加50 μ L Xanthine oxidase (0.1 Unit/mL)，均勻混合反應後，利用酵素免疫分析儀(ELISA reader)測量波長570 nm之吸光值，持續測量270 sec。其後計算其反應速率，並以下列公式計算求出抽出物對超氧自由基的抑制率(%)。

$$\text{超氧自由基抑制率 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{實驗組反應速率}}{\text{對照組反應速率}} \right) \times 100$$

10. 楓香抽出物及滲出物之萃取分離與活性分析

(1) 楓香段木抽出物之萃取及分離

是將楓香試材以甲醇冷浸法儘量萃取抽出成分。萃取步驟是將楓香段木打成碎片，隨即於室溫及避光下以甲醇浸漬，浸泡7天並重複兩次後，萃取液以濾紙(Whatman #1)抽氣過濾去除雜質，所得之甲醇抽出物以40°C水浴，經減壓濃縮除去甲醇後得到甲醇抽出物，再將所得之甲醇抽出物移入分液漏斗內利用乙酸乙酯與蒸餾水以1：1的比例對甲醇抽出物進行液相-液相分配萃取(Liquid-liquid partition)，充分攪拌及搖盪，重複數次直到乙醚層無色為止，可得乙酸乙酯可溶部(Ethyl acetate soluble fraction)及乙酸乙酯不可溶部兩個分離部。所得之甲醇抽出物及分離部則分別對其進行生物活性試驗。

(2) 滲出物之收集

將樹幹受創部位之樹皮上的滲出物以乾淨之刮刀收集後溶於乙酸乙酯，並於4°C環境中存放等待試驗。

(3) 以固相微萃取(SPME)吸附楓香段木香菇揮發之芳香氣味

先將楓香段木香菇以液態氮進行冷凍並磨成粉狀，將磨碎的香菇粉末置於樣品瓶中，並以石蠟膜(parafilm)封口，用以收集完整的香氣成分；續利用固相微萃取(SPME)技術來收集香氣揮發成分，SPME的纖維載具及吸附纖維(75 μm)是由Supelco 公司(Bellefonte, USA)所製造。在使用SPME之前，須先使SPME上吸附纖維置於GC注射孔內進行熱脫附(250°C，20分鐘)以除去污染物。開始試驗時，先將樣品瓶置於40°C水浴鍋中隔水加熱30分鐘，再將SPME探針頭以頂空萃取方式吸附30分鐘。以上試驗條件的選擇皆根據先前試驗後所得到最佳化的結果。經過30分鐘吸附過程後，將SPME自樣品瓶中取出，立即將針頭插入GC入口連結管，注射口溫度為250°C並維持30秒。

11. MTT細胞毒性試驗

先將含有 1×10^5 cell/mL之細胞液加入96-well中，每孔注入100 μL ，培養24 hr後，將細胞利用不同濃度之滲出物處理（只加DMSO為對照組），培養在5% CO_2 之37°C恆溫培養箱下生長，作用24 hr後抽掉上清液，加入100 μL 含有MTT (3-(4,5-dimethylthiazol- 2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 之DMEM培養液，置於37°C，5% CO_2 之培養箱中4 hr後，抽掉上清液並加入100 μL DMSO劇烈振盪，以分光光度計測波長570 nm的吸光值。此方法是以呈色法來測定細胞粒腺體之去氫酵素活性，由於活細胞的粒腺體仍具有活性，能將黃色MTT還原呈藍紫色formazon結晶，再以DMSO劇烈振盪，使結晶均勻溶解，因此藍紫色愈深可表示活細胞愈多，則可測得之酵素活性相對較高(Chang et al., 2000)。

12. 楓香滲出物及段木香菇芳香氣味之成分分析

利用GC-MS進行分析，分析條件：管柱為DB-5 (30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 film thickness, J & W Scientific)，起始溫度40°C持溫1 min，以4°C/min升溫至300°C，最後持溫4 min。注射量1 µm，注射口溫度260°C，離子化電壓70 eV，載送氦氣之流速為1 mL/min，各成分之比對利用所建立之標準品質譜圖，和經由搜尋資料庫 Wiley/NBS 或者是NIST (Nation Institute of Standard and Technology) 比對分析。

13. 楓香滲出物成分分離與結構鑑定

試驗中楓香樹皮滲出物利用半製備級HPLC進行純化。成分分離條件使用Cosmogel公司所製造之層析管柱(Comosil Co., 250 mm × 10 mm)，沖提液使用正己烷及乙酸乙酯，比例為正己烷／乙酸乙酯：75／25(流速為2.5 ml min⁻¹)。利用化合物本身在HPLC中的滯留時間不同而分離得到7個分離峰，其中最主要之化合物經光譜分析鑑定結構為Bornyl cinnamate。

III、結果與討論

1. 山肉桂成分研究與活性分析

山肉桂為奧萬大森林遊樂區中原生的樟科植物，其果實具有特殊之香味，原住民自古流傳，服用果實可強壯身體機能，但一直缺乏科學證據。本計畫首先針對山肉桂果實的精油進行探討。在我們的研究結果中發現，山肉桂果實精油及其主要成分具有顯著的抗發炎活性，其果實精油在18.68 µg/mL時可達到半抑制濃度，而實驗結果證明，其中之成分citral具有極佳的抗發炎活性，於 13.18 µg/mL的濃度下即可在脂蛋白誘導巨噬細胞產生一氧化氮自由基(NO)的模型中

抑制半數NO的生成，進一步經由蛋白表現說明，Citral對LPS誘導的iNOS蛋白(130 kDa)具有抑制效果，是經由抑制iNOS蛋白的表現；另外，在以巴豆油誘導鼠耳發炎試驗中，citral在劑量為0.1和0.3 mg/ear時，鼠耳發炎分別減少了22%和83%，結果顯示出山肉桂果實精油及citral非常值得進一步研究及開發。此部份成果已與管理處參與研究之同仁共同具名發表於國際知名SCI期刊—Bioresource Technology (見附件)，同時亦於中華林學會學術論文研討會中發表。而以本計畫所研究出之精油組成所研發之多功能乳液亦已完成並廣受使用人之好評。

此外，在醫藥保健活性探討上，我們知道人體必須仰賴自由基來調節許多的生理機能，然而過多的自由基卻會引起DNA、蛋白質、膜不飽和脂肪酸產生過氧化而影響其生理作用。因此本計畫亦針對山肉桂之抽出成分對其進行活性及抗氧化能力的評估。結果顯示，山肉桂的抽出成分中，清除DPPH自由基的能力是EA-12 (IC₅₀ = 7.46 μg/mL) > EA (IC₅₀ = 9.98 μg/mL) > Crude (IC₅₀ = 27.99 μg/mL) > Water (IC₅₀ > 100 μg/mL)。並由總酚含量測定得知，山肉桂萃取物中的EA-12含豐富的酚類化合物(GAE = 340.15 mg/g)；又由超氧自由基清除試驗得知，山肉桂成分亦具極佳的清除能力(IC₅₀ = 37.78 μg/mL)，甚至比維生素C (IC₅₀ = 43.38 μg/mL)的效果更好。山肉桂屬於臺灣的原生樹種，又具有良好的抗氧化活性，卻鮮少為人研究。如果能進一步深入探討，將其活性應用在生物體之抗氧化機制上，並配合保健食品之開發，藉由營養的攝取，或補充適度的抗氧化劑，將可降低活性氧對生物的危害，相信未來對於動脈粥狀硬化症及其衍生病變的發生有著相當程度的抑制功效。除了瞭解山肉桂精油成分組成及其可能具有之生物活性為重要目標外，本計畫執行期間，計畫主持人並協助管理處於奧萬大國家森林遊樂區內建構具教學示範之精油萃取設備，可使造訪園區之大眾對森林特殊產物之利用能有進一步之認識。並完成精油DIY配方與組件

之設計，可以實際操作達森林深度生態教育之目的。同時設計製造實驗室規模之精油萃取裝置，並協助管理處於全國性農業推廣展覽大會上示範解說，此均為本計畫所衍生之重要工作成果。

2. 山胡椒成分分析與其對動物中樞神經調節活性

山胡椒，其木材為灰白色，質輕軟且材積小，對林產工業而言並不具利用價值，被視為雜木。倘若能對其活性加以研究探討，將可使其轉變為具有醫療用途及保健食品潛力的植物。山胡椒，為樟科木薑子屬落葉小喬木，果實球形，直徑約5 mm。在泰雅族語中稱為「馬告」的山胡椒，果實具有特殊之辛辣味，味道類似胡椒與薑的綜合，其產地之居民通常作為調味用，還可用來泡茶、入菜及提煉精油防治白蟻。在台灣的原住民中，賽夏族與泰雅族常將其用於消除宿醉所引起的頭疼、身體痠痛等症狀。在民間傳統用藥中，亦有祛風濕、消腫、解毒、止痛之效。在前人所提出的文獻中，由山胡椒樹皮甲醇粗萃取物中的BuOH 可溶部具有較佳的抑制發炎能力(Choi et al., 2003)，而Hwang等人(2005)亦對山胡椒樹皮甲醇粗萃取物做了抗氧化性方面的研究，其中的水可溶部表現出優良的抗氧化活性；但在果實方面，則無相關的文獻記載。鑑於山胡椒果實受到台灣民間傳統用藥之青睞，以及上述文獻對於山胡椒功效的証實，因此本次實驗將針對山胡椒果實精油及其主成分進行分析，並對其作用於動物腦中樞神經之影響進行評估。山胡椒果實經水蒸氣蒸餾得具芳香氣味之精油，收率為18 mL/kg。精油分析結果顯示山胡椒果實精油的主要成分為geranial (38.16%)、citral (29.29%)、limonene (23.90%)、 β -myrcene (2.06%)、 α -pinene (1.05%)。其中，geranial及citral為其主要成分，佔重量百分比分別為38.16%以及29.29%，其次為limonene，這些成分使得其果實具有芬香的氣味。

本研究並針對山胡椒果實精油對動物中樞神經之調節作用進行探討。動物行為觀察以及測量受測動物在生理學、心理學、藥物學的研究，佔有非常重要之地位。因為我們對動物行為研究之最終目的，就是讓我們可以藉由各種動物行為模型之試驗平台，使動物產生一些外顯的生理反應，進一步得知一些不容易從外觀上觀察到的動物內部情形，例如腦神經傳遞物質的分泌情形，或者藥物對動物之影響。因為動物可藉由像是刺激、學習、訓練等來產生許多內部生理心理機能的改變，這些都會在外觀的行為上表現出來的。因此我們若能用多種的動物模型，測量許許多多在動物身上的行為模態，提供醫學研究以及臨床應用的一個有利證據，這目標是我們期望達到的。以巴比妥(Barbiturates)類藥物誘導動物睡眠之模型是初步觀察藥物有無中樞抑制作用常用的簡便方法，Achliya (2004)、Capasso (2005)、Murbach Freire (2006)等人皆是利用Barbiturates類藥物誘導睡眠，並且觀察其試驗藥物是否具有延長睡眠時間之功用，本計畫即採戊巴比妥誘導催眠小鼠試驗之模型來評估山胡椒果實精油對小鼠安眠之影響。由表5結果可知，在口服處理山胡椒果實精油後，可以明顯的增加小鼠睡眠時間(control: 34.4 ± 6.8 min ; 100 mg/kg: 41.3 ± 12.8 min ; 300 mg/kg: 72.5 ± 19.8 min ; 500 mg/kg: 89.3 ± 31.2 min ; 每組7隻)。對照組Zolpidem hemitartrate在劑量0.3 mg/kg時也可以明顯增加睡眠時間至 46.8 ± 3.39 min。本研究結果證實山胡椒果實精油的確具有顯著延長動物睡眠時間的效果。

而當動物進入到陌生以及害怕的區域的時候，會因為緊張而產生出焦慮之行為。利用這種方式，高腳十字迷宮就是利用這種原理的設計出來用來評估動物焦慮的一個試驗模型，若試驗藥物會改善小鼠因害怕高度而產生的焦慮行為，小鼠進入開放區域的時間以及次數將會增加。Bradley (2007)、Helli'on-Ibarrola (2006)、Grundmanna等人(2007)皆以高腳十字迷宮來評估抗焦慮之程度。本計畫

即採用高腳十字迷宮之試驗模型來評估山胡椒果實精油對小鼠抗焦慮之影響。圖14顯示口服山胡椒果實精油以及Trazodone hydrochloride可明顯的增加進入開放區域的比例、進入開放區域的時間。空白組方面，其停留在開放區域方面 5.32 ± 3.67 s，進入次數為 7.88 ± 5.74 次。經由t-test統計顯示出，山胡椒果實精油500 mg/kg時，停留在開放區域 31.55 ± 13.65 s，進入次數為 51.75 ± 18.51 ，其具有顯著差異。換言之，山胡椒果實精油具有明顯的降低小鼠在高腳十字迷宮狀態下所產生的焦慮行為。鎮痛試驗主要是用來評估藥物是否具鎮痛作用，常用的致痛方法有熱刺激法和化學物質刺激法。熱刺激法則包括熱甩尾法(Achliya et al., 2004)與小鼠熱板法。前一種方法比較靈敏，反應穩定。熱甩尾法便於比較藥物鎮痛作用的強弱、快慢及持續時間，設備簡便，皆較為常用。化學物質刺激法常用小鼠扭體法(Koudou et al., 2005；Silva et al., 2003)，是篩選弱鎮痛藥的一種簡便常用的方法。口服山胡椒果實精油30分鐘後，可明顯延長其甩尾時間。在90分鐘內，依提高劑量有明顯的延長其痛閾的時間，60分鐘時為其鎮痛效果最佳。在對照組Acetaminophen (90 mg/kg)方面，最大鎮痛效果可維持90分鐘。

3. 本年度計之執行成果

(1) 楓香段木及滲出物之生物活性評估

首先將所分離及採集之楓香段木及滲出物樣本進行各項生物活性評估試驗，進而以篩選出具有醫療或保健潛力之活性成分，所進行的試驗包括抗發炎及抗腫瘤活性等評估。

A. 抗發炎活性之測定

自天然物尋找非類固醇之抗發炎藥(NSAID)，為目前醫藥界相當受重視的研究主題之一。對於所有的生物試驗都存在一相同的問題，即如何選擇一種快

速、便宜並可信的篩選平台。因為生物體於發炎反應時會產生大量的NO自由基，因此利用LPS來誘發巨噬細胞來產生NO自由基，並配合Griese試劑來評估木材成分之抗發炎活性為一簡單且可信的生物活性試驗方法。

圖1為楓香滲出物對NO自由基的補捉能力評估。由試驗結果顯示出楓香各分離部對NO的抑制能力中以滲出物表現最好，在25 $\mu\text{g/mL}$ 的濃度下即可抑制巨噬細胞之iNOS的表現高達80%以上，其 $\text{EC}_{50} = 15.39 \mu\text{g/mL}$ 。但是當劑量高於50 $\mu\text{g/mL}$ 的濃度時，滲出物則顯示出對巨噬細胞的毒殺現象，顯然在高劑量下會產生細胞毒殺效果，因此，其結果可以明顯發現，由楓香樹幹直接取得之滲出物須在低劑量下對一氧化氮(NO)具有不錯的抑制效果。

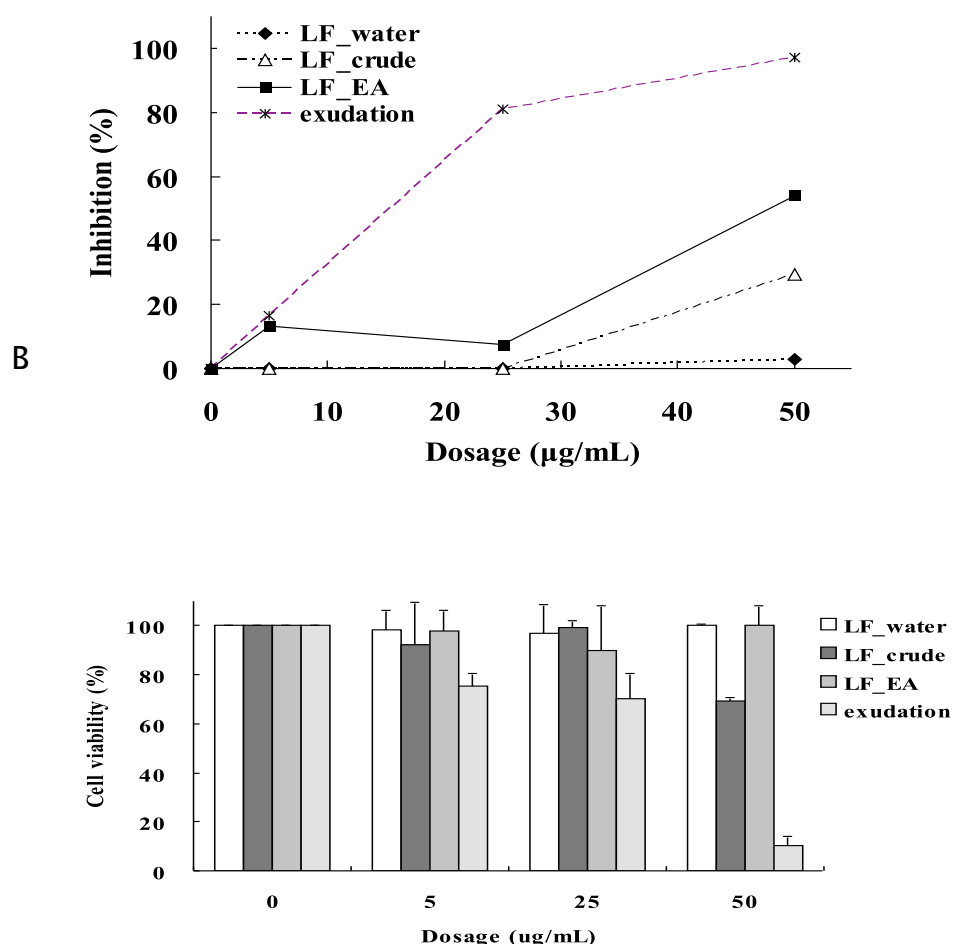


圖1. 楓香段木抽出物及滲出物對NO自由基抑制活性。A為NO抑制率，B為巨噬細胞毒殺率。

Fig. 1 Anti-inflammatory activities of methanol extracts and EA-soluble fractions of *Liquidambar formosan* and exudation by using NO free radical inhibition assay. A is NO inhibition, B is macrophage cells viability.

B. 細胞毒性評估

此試驗則將楓香各分離部(包括甲醇抽出物、乙酸乙酯可溶及不可溶分離部以及樹皮滲出物等)進行初步的毒殺評估，於初步的細胞毒殺試驗結果顯示，楓香滲出物之毒殺效果最好(圖2)，其 IC_{50} 為 $30.32 \mu\text{g/mL}$ ，顯示出對抑制肝腫瘤細胞生長上有很好的效果及潛力，因此以楓香滲出物來進行成分分離及純化，並對其活性進行評估及抗發炎或腫瘤細胞毒殺效果之機制探討。

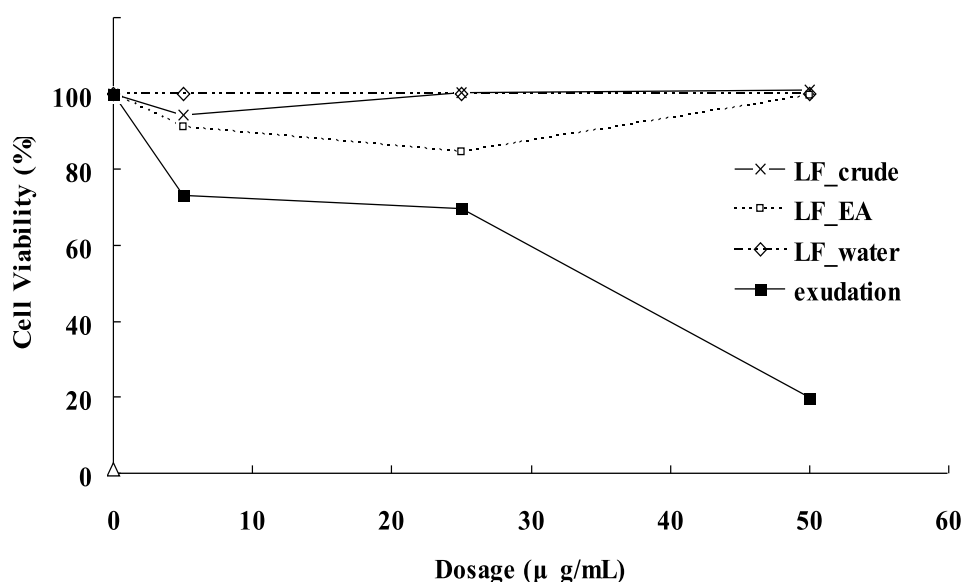


圖2. 楓香段木抽出物及滲出物對Hep-G2細胞株之毒殺效果

Fig. 2 Cytotoxic activity of methanol extracts and EA-soluble fractions of *Liquidambar formosana* and exudation in Hep G2 cell lines.

C. 楓香滲出物成分分析

將楓香樹皮滲出物刮下收集後溶於乙酸乙酯(EA)，經過固相萃取器(SPE)過濾後先以GCMS (Trace GC ultra, ITQ900 MS)進行成分分析，所得之結果如圖3及表1所示，其中含量較高的主要成分分別為bornyl cinnamate (24.39%)、 α -pinene (19.30)、sabinene(11.98)及cinnamyl cinnamate(11.79)等。

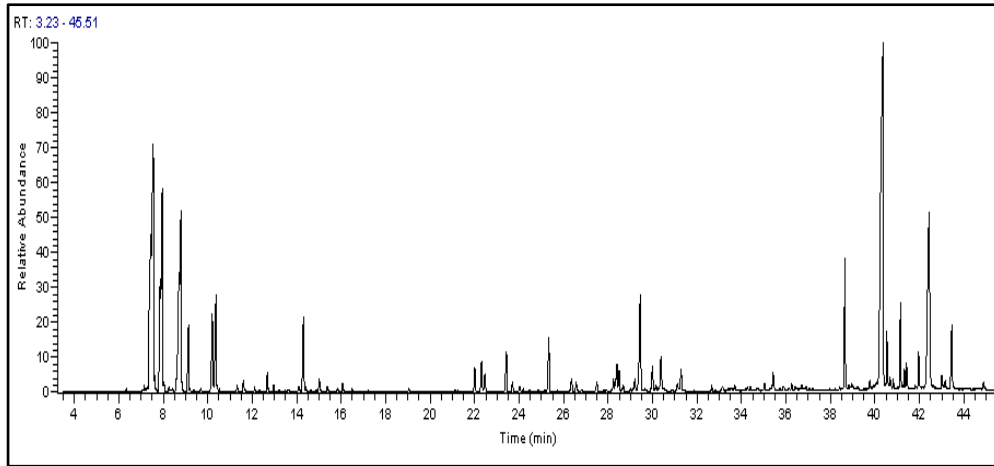


圖 3. 楓香滲出物之氣相層析圖。

Fig. 3 Total ion chromatograms of the exudate from *Liquidambar formosana*

表1 楓香滲出物成分之分析

Table 1 Analysis of exudation from *Liquidambar formosana*.

NO	Compound	RT (min)	Peak Area (%)	KI
1	α -pinene	7.55	19.30	940
2	camphene	7.95	11.02	946
3	sabinene	8.80	11.98	978
4	β -pinene	9.14	2.11	985
5	p-cymene	10.20	2.99	1021
6	d-limonene	10.36	3.40	1029
7	camphor	14.31	2.79	1138
8	α -cubebene	22.00	0.84	1372
9	copaene	22.32	1.10	1383
10	α -bourbonene	22.46	0.67	1388
11	caryophyllene	23.42	1.54	1411
12	germacrene D	25.33	1.91	1476
13	cubenol	29.45	4.18	1642
14	bornyl cinnamate	40.36	24.39	2058
15	cinnamyl cinnamate	42.45	11.79	2147

^a 滯留時間 (Retention time).

^b Kovats index on a DB-5MS column in reference to *n*-alkanes.

另外， 楓香樹幹可作為培育香菇良好的段木材料，市面上也具有許多在楓香段木上種植的香菇產品，這些香菇產品都具有很特別的氣味，讓人聞了會食指大動；因此，為了瞭解在楓香段木上所種植香菇的這種特殊氣味，使用頂空間固相微萃取(SPME)方法來吸附，並以氣相層析質譜儀(GC/MS)進行成分的分析。以固相微萃取(SPME)吸附楓香段木香菇芳香氣味的部分，以GCMS (Trace GC ultra, ITQ900 MS)進行成分分析，所得之結果如圖4及表2所示，其中含量較高的主要成分分別為1,3-Dimethyltrisulfane (12.24%)、2,4-Nonadien-1-al (8.45)、1,2,4-Trithiolane (9.39)及2,6-Di-tert-butylcresol (13.64)等。

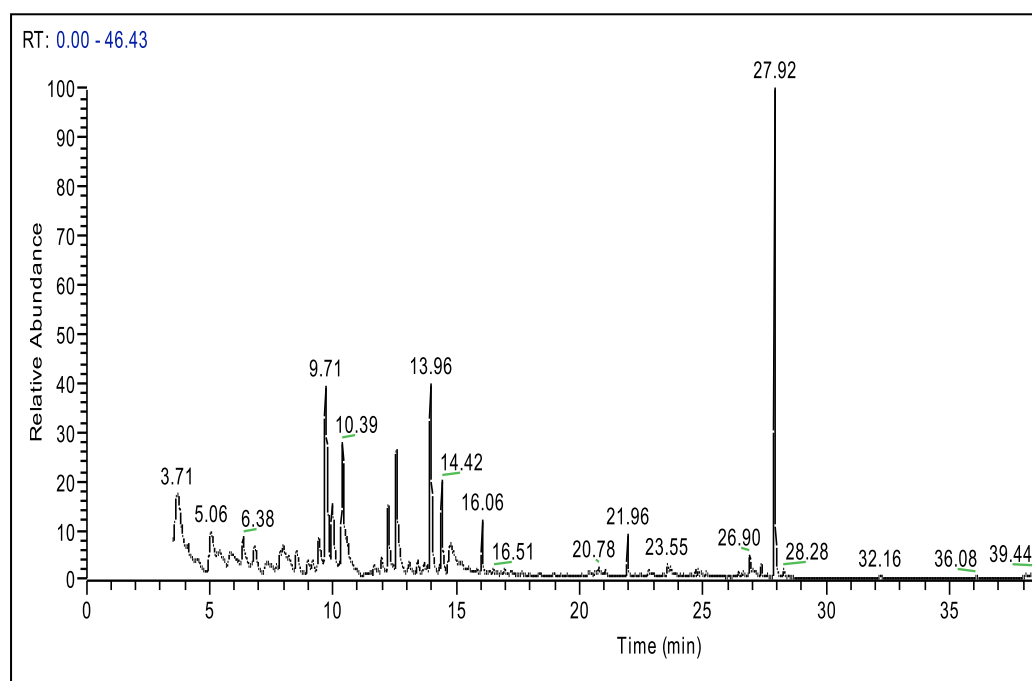


圖 4. 楓香段木香菇SPME吸附之氣相層析圖。

Fig. 4 Total ion chromatograms of GC/MS analysis for the volatile compounds from mushroom on *Liquidambar formosan* by SPME.

表2 楓香段木香菇SPME吸附成分之分析

Table 2 Analysis of the volatile compounds from mushroom on *Liquidambar formosana* by SPME

NO	Compound	RT ^a (min)	Peak Area (%)	KI
1	2-Methylthiophene	6.38	1.80	770
2	4,4-Dimethylpent-2-enal	6.84	1.78	829
3	1,3-Dimethyltrisulfane	9.71	12.24	962
4	2,4-Nonadien-1-al	10.39	8.45	994
5	1,3,5-cycloheptatriene	12.24	3.60	1056
6	2-hydroxymethyltetrahydropyran	12.58	6.42	1068
7	1,2,4-Trithiolane	13.96	9.39	1106
8	2-isopropyl-5-methylhex-2-enal	14.42	3.95	1164
9	2,6-Di-tert-butylcresol	27.92	13.64	1411

^a 滯留時間 (Retention time).

^b Kovats index on a DB-5MS column in reference to *n*-alkanes.

D. 楓香滲出物之成分分析

奧萬大森林遊樂園區廣大而豐富的森林之中，具有很多不同的樹種，在之中有許多植物富含豐富的油性樹脂成分，其中大部分以倍半萜類及二萜類為主，並存在於樹脂溝及樹皮皮孔中。這些油性樹脂更具有作為自然及化學性的驅散昆蟲及抗病原體的用途。即當樹木遭昆蟲攻擊時，樹木便會釋出油性樹脂來驅散昆蟲或阻礙昆蟲的啃食。另外，樹木中揮發性的成分，如單萜類及倍半萜類，則是利用間接的方式以防禦草食類動物；而二萜類成分則是利用物理性的阻礙來防範昆蟲。滲出物除了樹皮的自然產生外，當樹木遭遇外在生物因子(如：昆蟲攻擊疾病原蟲侵襲)及非生物因子(如：機械創傷)因素作用時，也會促進油性樹脂合成或誘發傷癒樹脂溝形成。植物樹皮滲出物及揮發性萜類成分皆在限制昆蟲及破壞病原體中扮演了重要的角色。在另一方面，樹木製造樹脂也產生了顯著的氣味及芬芳氣息，如龍腦香樹脂之於龍腦香科，樹脂及松節油之

於松科。因此，樹皮分泌物對於香料、香水及藥物應是具有相當高的經濟價值用途。由於本計畫已證實楓香之滲出物具有極佳的抗發炎活性，因此乃進一步利用HPLC對滲出物進行分離純化及收集，結果共分離出7個主要波峰(圖5)，且收集並鑑定其成分，根據光譜分析，其中波峰1a至1b為單、半萜類混合物，波峰1為Bornyl cinnamate，波峰2為Cinnamyl cinnamate，波峰3為Betulinic acid，波峰4為Olenonic acid，波峰5為 Oleanonic aldehyde，波峰6為28-Hydroxy- β -amyrone及波峰7為Betulonic acid。在這些化合物中，以Bornyl cinnamate於層析圖譜中之吸收峰的積分值是最高的(圖5)，顯示在滲出物中Bornyl cinnamate為主要化合物，於是進一步將針對於所得之各化合物進行抗發炎及細胞毒性試驗，以篩選出楓香滲出物中具生物活性之有效成分Bornyl cinnamate (1); Cinnamyl cinnamate (2); Betulinic acid (3); Olenonic acid (4); Oleanonic aldehyde (5); 28-Hydroxy- β -amyrone (6); Betulonic acid (7)。(圖6)

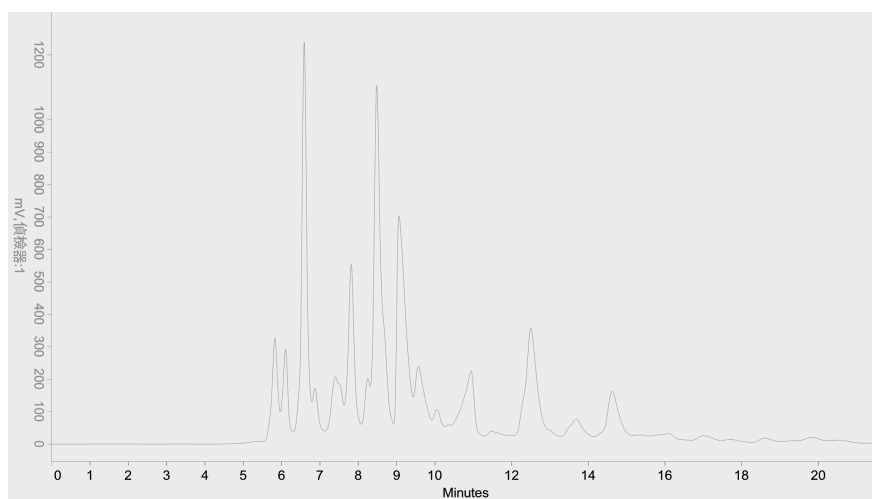


圖5. 楓香滲出物之HPLC圖及主成分結構鑑定。Bornyl cinnamate (1); Cinnamyl cinnamate (2); Betulinic acid (3); Olenonic acid (4); Oleanonic aldehyde (5); 28-Hydroxy- β -amyrone (6); Betulonic acid (7)。

Fig. 5 HPLC pattern and Compounds identified of exudation from *Liquidambar Formosan*.

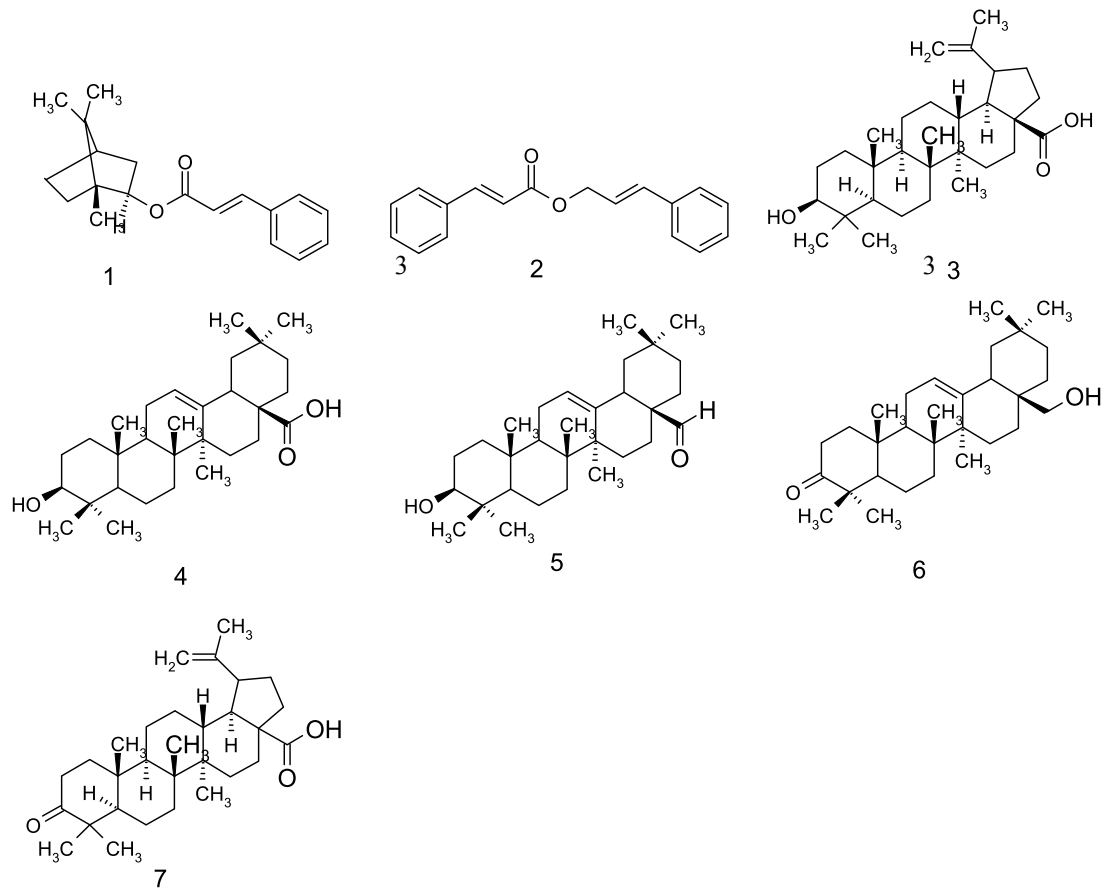


圖 6 楓香滲出物中所分離出的主要化合物： Bornyl cinnamate (1); Cinnamyl cinnamate (2); Betulinic acid (3); Olenonic acid (4); Oleanonic aldehyde (5); 28-Hydroxy- β -amyrone (6); Betulonic acid (7) .

Fig. 6 Compounds identified from the exudates of *Liquidamber formosana* Hance.

圖7為楓香滲出物成分對NO自由基的補捉能力評估。由試驗結果顯示出楓香滲出物成分對NO的抑制能力中以Betulonic acid表現最好，在10 $\mu\text{g/mL}$ 的濃度下即可抑制巨噬細胞之iNOS的表現高達80%以上，其 $\text{EC}_{50} = 4.14 \mu\text{g/mL}$ 。但是當劑量高於20 $\mu\text{g/mL}$ 的濃度時，滲出物則顯示出對巨噬細胞的毒殺現象，顯然在高劑量下會產生細胞毒殺效果，因此，其結果可以明顯發現，由楓香樹幹直接取得之滲出物成分須在低劑量下對一氧化氮(NO)具有不錯的抑制效果。

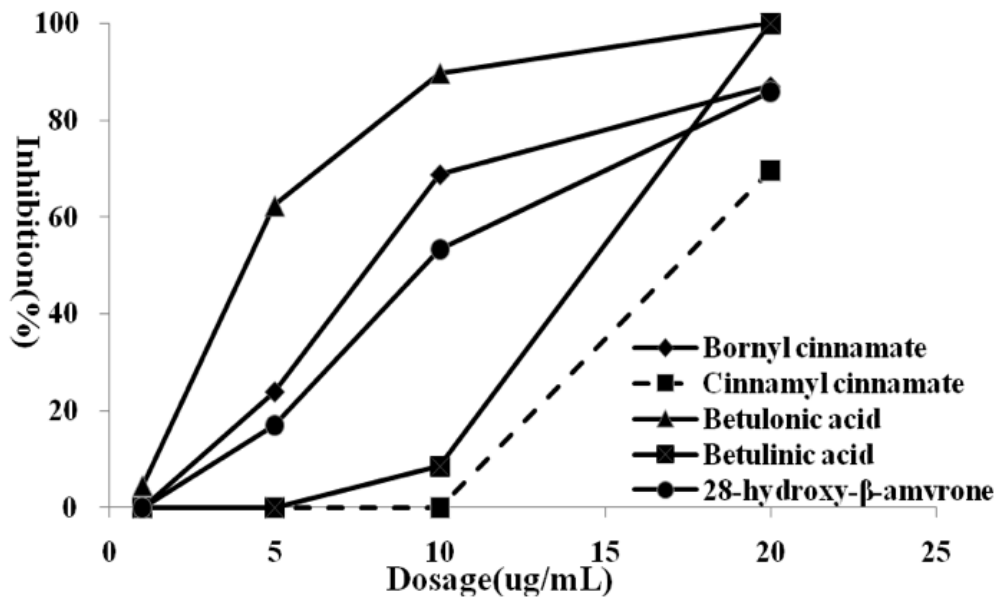


圖7. 楓香滲出物成分對NO自由基抑制活性。

Fig. 7 Anti-inflammation of exudates and compounds from *Liquidamber formosana* Hance. The results are displayed as percentage of control samples (mean±SE; n =3; *, P < 0.05; **, P < 0.01, by Dunnett's test vs P).

IV、結論

奧萬大國家森林遊樂區內各種森林資源豐富，為能有效利用這些森林資源，就其特殊成分之民生用途，藥用保健功能進行分析研究，並完成推廣教育所需之設備教材之建構以及種子教師之培訓的目標示非常重要的。本計畫之完成，將可作為林務局所轄之森林遊樂區未來推動深度生態旅遊之推廣模式，並將森林資源永續利用之理念藉由遊客造訪森林遊樂區之便，潛移默化於人心。楓香林為奧萬大森林遊樂區中重要的森林資源研究，本計畫證實楓香樹皮滲出物具有顯著的生物活性，對一氧化氮的生成抑制及肝腫瘤細胞(Hep-G2)的毒殺活性皆具有顯著表現，但是在抗發炎方面當劑量過高時則會造成細胞上的毒殺現象。綜合這些結果，而在楓香滲出物中所分離而得的成分，進行一氧化氮的

生成抑制試驗，也顯示皆具有很好的抑制發炎產生的活性；因此，我們不僅可以期待楓香滲出物於抗肝腫瘤新藥之開發上將具有很大的潛力。另外，使用較低劑量時，分香滲出物及其中所分離的成分具有的抑制NO自由基生成的效果，具有替代傳統抗發炎類固醇藥物的可能性。另外，在楓香段木香菇的揮發氣味的研究結果，結果顯示香菇主要香味來源為含硫的化合物，與前人對於香菇揮發香氣的研究結果相同；這些研究成果可作為各森林遊樂區對森林資源永續利用上的方向及應用並作為各林區對主要代表樹種疏伐或風倒木在利用與研究上的推廣依據，期望不僅能作為藥物使用上的目的，更能進一步結合生態和觀光上的推廣，達到知識傳遞與休閒遊憩之功能。

V、引用文獻

- 甘偉松 (1977) 藥用植物學。國立中醫藥研究所。P. 321.
- 范義彬、呂勝由、彭立京 (2005) 台灣林業季刊 31:61-62。
- 劉業經、呂福原、歐辰雄 (1988) 台灣樹木誌。國立中興大學農資學院。
- Arimura, G., C. Kost, W. Boland (2005) Herbivore-induced, indirect plant defense. *Biochem. Biophys. Acta.* 1734: 91-111.
- Becerra J. X., D. L. Venable, P. H. Evans, and W. S. Bowers (2001) Interactions between chemical and mechanical defenses in the plant genus *Bursera* and their implications for herbivores. *Amer. Zool.* 41: 865-876.
- Boucher, D., R. Lavalley, Y. Mauffette (2001) Biological performance of the white pine weevil in relation to the anatomy of the resin canal system of four different host species. *Canadian J. Forest Res.* 31: 2035-2041.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Buchbaure, G., 2000. The detailed analysis of essential oils leads to the understanding of their properties. *Perfum. Flav.* 25, 64-87.
- Byun-McKay, A., K. A. Godard, M. Toudefallah, D. M. Martin, R. Alfaro, J. King, J.

- Bohlmann and A. L. Plant (2006) Wound-induced terpene synthase gene expression in Sitka spruce that exhibit resistance or susceptibility to attack by the white pine weevil. *Plant Physiology* 140: 1009-1021.
- Byun-McKay, S. A. B., W. L. Hunter, K. A. Godard, S. X. Wang, D. M. Martin, J. Bohlmann, A. L. Plant (2003) Insect attack and wounding induce traumatic resin duct development and gene expression of (-)-pinene synthase in Sitka spruce. *Plant Physiol.* 133: 368–378.
- Choi, E. M., J. K. Hwang (2004) Effects of methanolic extract and fractions from *Litsea cubabe* bark on the production of inflammatory mediators in RAW264.7 cells. *Fitoterapia* 75:141-148
- De Nardin, E. (2001) The role of inflammatory and immunological mediators in periodontitis and cardiovascular disease. *Ann. Periodontol.* 6: 30– 40.
- Drapier, J.C., Wietzerbin, J., Hibbs, J.B. (1998) Interferon-gamma and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. *Eur. J. Immunol.* 18: 1587–1592.
- Gao Y., Y. J. Jin, H. D. Li, H. J. Chen (2005) Volatile organic compounds and their roles in bacteriostasis in five conifer species. *J. of Integrative Plant Biology* 47 (4): 499–507.
- Han, S.S., Keum, Y.S., Seo, H.J., Surh, Y.J., 2002. Curcumin suppresses activation of NF- κ B and AP-1 induced by phorbol ester in cultured human promyelocytic leukemia cells. *J. Biochem. Mol. Biol.* 35, 337–42.
- Hanari, N., H. Yamamoto, T. Ooi, T. Kusumi, K. Kuroda (2001) A new diterpene dimer from the bark of *Chamaecyparis obtusa*. *J. Wood Sci.* 47: 36-40.
- Hillis, W.E. (1987) *Heartwood and Tree Exudates*. Springer-Verlag. 268pp.
- Hsieh, Y.H., Kuo, P.M., Chien, S.C., Shyur, L.F., Wang, S.Y. (2007) Effects of *Chamaecyparis formosensis* Matsumura extractives on lipopolysaccharide-induced release of nitric oxide. *Phytomedicine* 14, 675–780.
- Hwang, J. K., E. M. Choi, J. H. Lee (2005) Antioxidant activity of *Litsea cubabe*. *Fitoterapia* 76:684-686
- Kumar S, Jayabal K, Wang S.Y. (2008) Lucidone inhibits iNOS and COX-2
- Lin, C.C., Cheng, H.Y., Fang, B.J., 2003. Anti-Herpes virus type 2 activity of herbal medicines from Taiwan. *Pharm. Biol.* 41, 259–262.

- Lin, C.T., C.J. Chen., T.Y. Lin, J.C. Tung, S.Y. Wang (2008). Anti-inflammation activity of fruit essential oil from *Cinnamomum insularimontanum* Hayata. *Bioresource Technology* 99: 8783–8787.
- Martin, D. M., J. Gershenzon, J. Bohlmann (2003) Induction of volatile terpene biosynthesis and diurnal emission by methyl jasmonate in foliage of Norway spruce. *Plant Physiol.* 132: 1586–1599.
- Miller, B., L. L. Madilao, S. Ralph, J. Bohlmann (2005) Insect-induced conifer defense: White pine weevil and methyl jasmonate induce traumatic resinosis, de novo formed volatile emissions, and accumulation of terpenoid synthase and putative octadecanoid pathway transcript in Sitka spruce. *Plant Physiol.* 137: 369–382.
- Paul A, R. H. Pendreigh, N. Ito, T. Suzuki (1994) Protein kinase C and tyrosine kinase pathway regulate lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase activity in RAW 264.7 murine macrophage. *Br. J. Pharmacol.* 114: 482-488.
- Pavlova N. I., O. V. Savinova, S. N. Nikolaeva, E. I. Boreko, O. B. Flekhter (2003) Antiviral activity of betulin, betulinic and betulonic acids against some enveloped and non-enveloped viruses. *Fitoterapia* 74: 489-492.
- Rijkers, T., W. Ogbazghi, M. Wessel, F. Bongers (2006) The effect of tapping for frankincense on sexual reproduction in *Boswellia papyrifera*. *J. of Appl. Eco.* 43: 1188–1195.
- Rodriguez, J. A., C. Theoduloz, T. Yanez, J. Becerra, G. Schmeda-Hirschmann (2006) Gastroprotective and ulcer healing effect of ferruginol in mice and rats: Assessment of its mechanism of action using in vitro models. *Life Sci.* 78: 2503 – 2509.
- Schmidt, H.H.H.W., Kelm, M., 1996. Determination of nitrite and nitrate by the Griess reaction. In *Methods in Nitric Oxide Research*. John Wiley & Sons: Chichester, 491–497.
- Schmidt, H.H.H.W., Kelm, M., 1996. Determination of nitrite and nitrate by the Griess reaction. *Methods in Nitric Oxide Research*. John Wiley & Sons, Chichester. pp. 491-497.
- Tamir, S., Tannenbaum, S.R., 1996. The role of nitric oxide (NO) in the carcinogenic process. *Biochim. Biophys. Acta.* 1288, F31–F36.

- Tomlin, E. S., R. I. Alfaro, J. H. Borden, F. He (1998) Histological response of resistant and susceptible white spruce to simulated white pine weevil damage. *Tree Physiol.* 18: 21–28.
- Wang, K., Y. M. Pan, H. S. Wang, Y. Zhang, Q. Lei, Z. R. Zhu, H. Y. Li, M. Liang (2009) Antioxidant activities of *Liquidambar formosana* Hance leaf extracts. *Med Chem Res* DOI 10.1007/s00044-009-9181-0.
- Wang, S. Y., J. H. Wu, S. S. Cheng, C. P. Lo, H. N. Chang, L. F. Shyur, S. T. Chang (2004) Antioxidant activity of extracts from *Calocedrus formosana* leaf, bark and heartwood. *J. Wood Sci.* 50: 422-426.
- Wang, S. Y., Y. S. Wang, Y. H. Tseng, C. T. Lin, C. P. Liu (2006) Analysis of fragrance compositions of precious coniferous woods grown in Taiwan. *Holzforschung* 60: 528-532.