

行政院農業委員會林務局南投林區管理處

委辦計畫

成果報告書

計畫名稱：白千層重要造林樹種特殊成分之永續利用

技術開發

執行機關：國立中興大學 森林學系

計畫主持人：王升陽

研究人員：簡世昌、王雅昀、曹乃文、王瓊怡、  
賴建興

## 一、計畫緣由

桃金娘科(*Myrtaceae*)白千層屬(*Melaleuca*)之樹種葉子富含精油並具有特殊香味，目前研究最多的是澳洲茶樹(*Melaleuca alternifolia*)，又稱為複葉白千層，其精油商品名為茶樹油(Tea tree oil)。目前在醫藥上已有研究證明其具有抗菌、抗病毒、消炎、止痛、增進免疫系統功能及促進傷口復癒(Carson et al., 2006)等作用，此外還具有防腐、防霉(Raman et al., 1995)的功效，因有宜人的香氣，是公認優良的天然芳香劑、抗菌劑、防腐劑，在醫藥、美容保健品和日用化工品等方面具有廣泛的用途。

同屬於白千層屬之樹種白千層 (*Melaleuca leucadendra*)，為常綠喬木，高約 20 m，樹皮灰白色，具豐富之片狀木栓質，厚而疏鬆，可以片狀層層剝落。原產於澳洲、印尼、馬來西亞等熱帶地區；樹皮特殊、花朵獨特，頗具觀賞價值，且樹性堅毅，具優良的耐旱、耐鹽、抗風、抗二氧化硫能力，適合作為行道樹、海岸防風林、工業區綠美化樹種，目前，白千層已為台灣重要造林樹種之一。根據 99 年度林務局研究結果顯示，白千層因其樹種葉細而多，且葉表面具有細毛的的生理特性，使得有極高的截留量，因此白千層可以將較大量的汙染物經由表面截留後，將雨淋洗回到地表，加速汙染物質的沉降，是擁有較佳空氣淨化能力的樹種。

白千層的樹皮特殊 ( 因此又稱為Paper bark tree )、花朵獨特，頗具觀賞價值。白千層屬之樹種超過 30 種，目前研究最多的是澳洲茶樹(*M. alternifolia*)，

又稱為複葉白千層，其精油商品名為茶樹油(Tea tree oil)。目前無論是醫學界或是在精油市場上，都認同茶樹精油是一種天然的防腐劑、殺菌劑、防霉劑和麻醉劑。於澳洲市場中，每盎司(約 28.35 g)之茶樹精油售價可達 15 美金，因此如能開發其相近樹種(如白千層)之精油製造技術及其特殊功能，將可以提升林農之經濟收入。且其枝葉所含之精油具殺菌消炎的效果，常用為白花油，綠油精及萬金油之主要成分，而樹皮能入藥，味淡性平，安神鎮靜。關於白千層葉部的研究，過去主要著重於精油萃取物的成分鑑定與活性試驗，已於先期本處的計畫已針對白千層葉子精油之組成進行了解析與相關活性之研究，並於 2011 年於中華林學會論文發表會口頭發表『白千層葉子精油成分分析及活性探索』，在申請人的研究成果中證實，不同株之白千層所得之精油收率會有所不同，收率為 10 至 24 mL/kg。以水蒸餾法置備精油時，收率隨著萃取時間的增加而增加。本研究並利用氣相層析質譜儀，自白千層葉子精油中鑑定出 32 種成分，而不同萃取方法、時間與地區所得之精油成分均是以Viridiflorol和 1,8-Cineole為最主要成分，但在一些微量的成分會有所差異。由主成分(PCA)分析，可作為精油產地辨識之用。最後，經由DPPH 自由基能力測試，結果顯示白千層精油之抗氧化能力不顯著；但在抗發炎活性評估方面，證實白千層精油對RAW 264.7 小鼠巨噬細胞株之NO產生有顯著的抑制效果。參考化合物薑黃素之自由基半數抑制濃度( IC<sub>50</sub> )值為 6.5 μg/mL，雖然 1 小時萃取時間所得之葉子精油於 100 μg/mL濃度下亦無法表現出抗發炎活性，但隨著萃取時間的增加，葉子精油的抗發炎活性顯著的增加，9 小時的精油之IC<sub>50</sub>為 49.09 μg/mL，且試驗濃度下並不具細胞毒性，值得進一步的開發其藥用保健活性(王雅昀等人，2011)。

關於白千層非揮發性成分的研究報告到目前為止並不多，Yoshida 等人 (1996) 曾自白千層葉子中分離鑑定出一水解型單寧 (tannin)，經光譜分析確定其結構為 1,2-di-*O*-galloyl-3-*O*-digalloyl-4,6-*O*-(*S*)-hexahydroxydiphenoyl- $\beta$ -D-glucose；台灣的學者李慶國教授，自白千層葉子中分離出一個新的三萜類化合物，28-norlup-20(29)-ene-3  $\beta$ ,17  $\beta$ -diol 及 13 個已知化合物，分別是 (2*E*,6*E*)-farnesol、phytol、squalene、alloaromadendrene、ledene、palustrol、viridiflorol、ledol、betulinaldehyde、betulinic acid、3  $\beta$ -acetyl-lup-20(29)-en-28-oic acid、3-oxolup-20(29)-en-28-oic acid 和 platanic acid (Lee, 1998a)。李教授亦自葉子中分離出 8 個 Ursane 骨架之三萜類化合物，包括 ursolaldehyde、ursolic acid、2  $\alpha$ -hydroxyursolic acid、3  $\beta$ -*cis-p*-coumaroyloxy-2- $\alpha$ -hydroxyurs-12-ene-28-oic acid、3  $\beta$ -*trans-p*-coumaroyloxy-2- $\alpha$ -hydroxyurs-12-en-28-oic acid、3  $\beta$ -*cis-p*-coumaroyloxy-2- $\alpha$ -hydroxyursa12,20(30)-dien-28-oic acid 和 *cis*- and *trans*-3  $\beta$ -caffeoyloxy-2- $\alpha$ -hydroxyurs-12-ene-28-oic acids (Lee, 1998b)。有 Lee 和 Chang (1999) 從心材中分離出四個三萜類化合物，分別為 eupha-7,24-diene-3  $\beta$ ,22  $\beta$ -diol、20-taraxastene-3*R*,28-diol、3*R*,27-dihydroxy-28,20  $\beta$ -taraxastanolide 和 3*R*-hydroxy-13(18)-oleanene-27,28-dioic acid (Lee and Chang, 1999)。此外，Lee 也從白千層葉子中分離出四個新穎  $\beta$ -triketone 的黃酮類化合物，他將其命名為 leucadenone A - D (Lee, 1999)，但以上之成分並未對其進行活性之研究。

雖然我們已對白千層葉子精油之組成進行了解析與相關活性之研究，但對於葉子非揮發性之抽出物及其活性之分析仍未有相關的研究。以現階段之林業經營的角度來看，如何有效利用森林資源並賦予森林利用新的方向已為全球林業及林產界人員所共同關注之主題。若從現代生物產業科技發展的角度考量，以森林或林木代謝產物為對象的活性篩選之研究，應是今後國家基礎與應用科學發展領域中最重要且最值得探討的研究課題之一。本計畫擬比較白千層葉子於低極性與高極性抽出成分之活性及結構的區別，並且製備白千層葉子中具有優良活性之成分，同時嘗試分離過去未被分離之成分，並評估其生物活性。僅就本計畫執行成果報告如下。

## 二、研究材料與方法

本計畫擬依照圖 1 之試驗設計流程，將白千層葉子以甲醇冷浸萃取，所得之粗抽出物續以乙酸乙酯和水進行液相 - 液相分配，初步分成 2 個可溶部，並將各可溶部所得之抽出物以抑制 LPS 誘導巨噬細胞產生一氧化氮自由基之生物檢測模式等試驗，初步篩選出具抗發炎活性之可溶部後，續以薄層層析 (TLC, Thin layer chromatography)、管柱層析 (CC, Column chromatography)、高效能液相層析儀 (HPLC, High performance liquid chromatography) 等，對具抗發炎活性之可溶部做更細部的分分。將分離所得之次分離部及純化合物再反覆進行上述之抗發炎等試驗，以便獲得具抗發炎之成分。此外，並配合傅立葉轉換紅外光光譜分析 (FTIR)、質譜儀分析 (EIMS) 與核磁共振光譜分析 ( $^{13}\text{C-NMR}$  和  $^1\text{H-NMR}$ ) 等分析技術以確定化合物之結構。

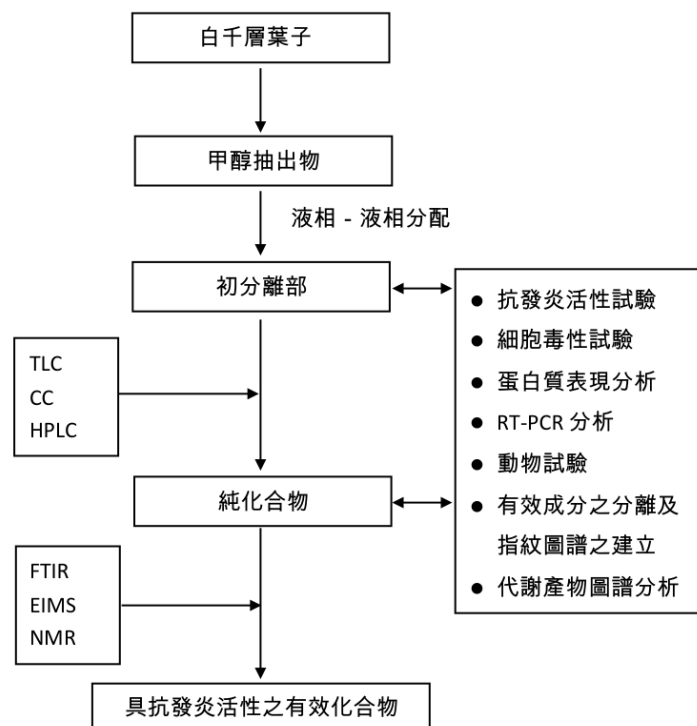


圖 1. 白千層葉子中具抗發炎成分之研究流程圖

### (1) 抽出物之萃取

氣乾後之白千層葉子，於室溫下以甲醇溶劑浸漬萃取，反覆數次至甲醇抽出液無色為止，所得之萃取液以濾紙抽取過濾去除雜質後，利用真空濃縮得甲醇抽出物。

### (2) 液相-液相萃取分劃

白千層葉子之甲醇抽出物利用乙酸乙酯，採液相-液相分配萃取的方式進行分劃，如此白千層的抽出物可分劃成乙酸乙酯可溶部及乙酸乙酯不可溶部二個分離部，所得之各分離部則分別對其進行生物活性分析。

### (3) 抽出物之成分分離

為了純化白千層葉子之成分，續利用薄層層析(TLC)、管柱層析(CC)及高效能液相層析(HPLC)等技術分離純化經液相-液相分配所得之乙酸乙酯可溶部。所使用之 TLC 薄片之吸附劑為矽膠，展開溶液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 15% 硫酸溶劑為呈色劑。各分離部以 CC 分離前，先以矽膠吸附，之後再利用吸附劑做管柱層析，沖提溶液依序為正己烷、乙酸乙酯與甲醇及其混合液，極性由低至高進行沖提。每 1000 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，再以 HPLC 作進一步的分離及純化。

#### (4) 抗發炎試驗

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Lipopolysaccharide (LPS)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 oxidesynthase,iNOS)，iNOS會產生大量NO 自由基，並利用白千層葉子抽出成分進行清除NO 自由基的能力來評估成分是否具有抗發炎活性。試驗方法主要參考Senthil和Wang等人(2009)之方法，取RAW264.7 小鼠巨噬細胞植入 96 well 組織培養盤中，細胞濃度為  $2 \times 10^5$  cell/well，細胞貼覆於培養盤後隨即添加不同濃度的白千層葉子抽出物，培養 1 hr 後添加LPS (1.0  $\mu$ g/mL)，再培養 24 hr後，進行NO 測定試驗。利用Griess法進行NO 測定試驗，將上述反應後之上清液取 100  $\mu$ L，加入等量的Griess 試劑(0.1% N-(1-naphthyl) ethylenediamine in H<sub>2</sub>O 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，在進一步氧化成為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)。

#### ( 5 ) 細胞毒性評估

以 MTT assay 又稱 Tetrazolium assay 來測試植物萃取物對細胞的毒性。此方法利用呈色來測定細胞粒腺體的去氫酶活性，存活細胞數量與所測的酵素活性表現呈正比。試驗步驟為接續抑制 LPS 誘導巨噬細胞產生一氧化氮自由基試驗後，將 96-well 組織培養盤中剩餘上清液完全除去後，加入含有 500  $\mu$ g/mL MTT (3-(4,5- Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)



之 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 培養液 100  $\mu$ L，置於培養箱培養 1 hr 後，抽掉上清液並加入 100  $\mu$ L DMSO 將細胞及其內結晶溶解，利用酵素免疫分析儀測量波長 570 nm 之吸光值。因活細胞的粒腺體仍具有活性，能使黃色的 MTT 還原而成藍紫色 formazon 結晶，再用 DMSO 均勻溶解，當藍紫色越深表示細胞存活量越多(Chang et al., 2000)。

#### (6) 脂肪細胞分化

將 3T3-L1 培養於 DMEM 含 10% 小牛血清 (bovine serum) 的培養液中，待細胞長滿後 2 天加入分化劑誘發其分化，分化劑包含 1 mg/ml 胰島素，0.5 mM 異丁基甲基黃嘌呤及 1M 皮質類固醇 (Sigma)，4 天後，將培養液置換為含 10% FBS 之 DMEM，再經過 4 天的培養即可得成熟脂肪細胞。細胞固定與染色則是將細胞去除上清液後，以 4% 三聚甲醛固定 1 小時，以去離子水清洗數次後再以 0.3% Oil Red O (Sigma) 染色 15 分鐘，此時胞內脂質呈現深紅色，可藉由顯微鏡觀察脂質堆積情形。最後，以異丙醇於室溫下萃取出細胞中所含之 Oil Red O 染劑，利用酵素免疫分析儀偵測波長 510 nm 之吸光值即可量化細胞內脂質含量，進而推算出不同處理組對於影響脂肪堆積量的效果。

#### (7) 蛋白表現量分析 (西方墨點法)

將定量之蛋白質 (20  $\mu$ g) 混合 5 倍 (5x) 樣本緩衝液 (Sample buffer) 後，以 7 % 或 12 % 之 SDS-PAGE 將待分析之蛋白質依分子量大小的不同而分離。之後將蛋白質以電泳轉置於轉漬膜 (Immobilon membrane (PVDF; Millipore Corp.))，轉置完成後，浸泡 10% 脫脂奶粉溶液 (Skin milk，溶於

TBST ( 含有 0.1% Tween-20 ) ) 振盪 1 hr ( Blocking ) 。接著以 TBST 振盪清洗 2 次 ( 各 5 min ) ，便可分別加入一次抗體，置於室溫下振盪 2 hr。再以 TBST 振盪清洗 2 次 ( 各 5 min ) ，接著加入二次抗體 Anti-rabbit IgG HRP 及 anti-mouse IgG-HRP ，於室溫下振盪 2 hr 反應，最後以化學發光法 ( Chemiluminescence ( ECL, Amersham ) ) 進行蛋白質表現量結果之觀察。

### 三、結果與討論

#### 1. 樺木酸的純化與抑制脂肪細胞生成活性

於進行白千層葉子成分研究的過程中，我們發現台灣產白千層葉子甲醇抽出物經利用乙酸乙酯分劃所得之乙酸乙酯可溶部，於管柱層析分離後得到大量的白色固體狀化合物析出。利用核磁共振儀測其氫核 (圖 1) 的光譜訊號。在氫譜中， $\delta 0.67$  (s)、 $\delta 0.73$  (s)、 $\delta 0.92$  (s)、 $\delta 0.95$  (s)、 $\delta 0.96$  (s)、 $\delta 1.67$  (s) 為五支甲基的訊號，其中  $\delta 1.67$  為接在雙鍵上的甲基；此外， $\delta 4.59$  (s)、 $\delta 4.72$  (s) 為雙鍵上氫的訊號，從以上可以推測其結構為三萜類的化合物，再比對前人文獻可以認定此化合物為樺木酸 (Betulinic acid) (Sharma *et al.*, 2010 ; Khan *et al.*, 2010)，從前人文獻可以得知其分子式為  $C_{30}H_{48}O_3$ ，分子量為 456，結構如圖 2 所示。

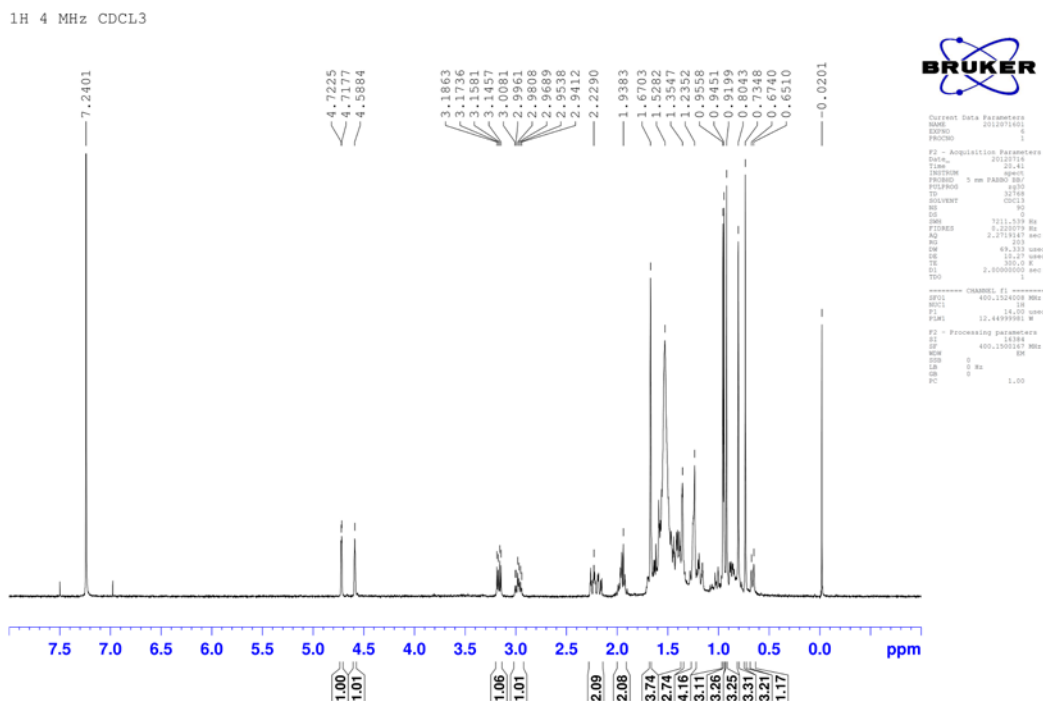


圖 1. 樺木酸的氫譜-核磁共振光譜圖。

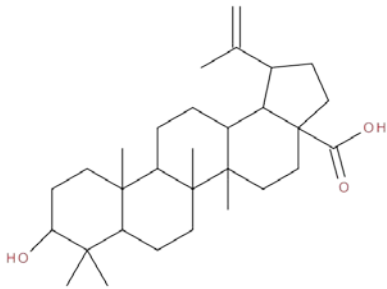


圖 2. 樺木酸 ( Betulinic acid ) 之結構式。

據統計，代謝症候群普遍發生於成年人口身上的疾病，具估計約 25%之人口受到影響，而在 40 歲以上的年齡層更是超過 40% 以上都受到此疾病的困擾。最近 10 年內，與代謝失常有關的疾病發生率增加了將近 61%，但其增加速率則因為人口和性別的關係又有差異。事實上，肥胖為現今社會常見的文明病，過重或肥胖的人有較高的風險罹患高血壓、中風、第二型糖尿病、心臟病以及癌症 (Kahn and Flier, 2000)，脂肪細胞主要儲存大量三酸甘油酯，在體內扮演能量調節與平衡的角色，並且能夠分泌獨特的脂肪激素調節能量代謝、胰島素敏感性以及免疫反應 (Avram *et al.*, 2007)。體內脂肪細胞數量的增加源自於脂質生成作用，即脂肪前驅細胞分化成脂肪組織的過程 (Ntambi and Kim, 2000)。因此，除了由飲食方面控制能量攝取以及藉運動增加能量消耗之外，了解脂肪前驅細胞的分化機制並且找出合適的調控點也是另一種可行的減肥策略。3T3-L1 是針對脂質生成作用研究中最具代表性的細胞株，3T3-L1 為來自

老鼠的脂肪前驅細胞，形態與纖維母細胞相似 (Fibroblast-like cell)，此狀態下的細胞不會在胞內累積脂質。藉由分化劑胰島素、異丁基甲基黃嘌呤 (Isobutylmethylxanthine) 及皮質類固醇 (Dexamethasone) 的協同作用，活化細胞內三條主要的訊息傳遞途徑，包含 cAMP-PKA 途徑、固醇類激素的核受體途徑以及胰島素受體的磷酸化途徑，因而啟動脂肪細胞特異基因表現 (例如脂肪酸合成酶)，最後分化成為堆積大量三酸甘油酯之成熟脂肪細胞，此時細胞形態也產生明顯的改變，由細長梭狀改變成圓型，並可明顯觀察到累積於細胞質間的油滴 (Ntambi and Kim, 2000)。從自然資源中找尋低副作用並可治療代謝症候群的天然保健品，已是植物藥學家研發的重要主題之一，若我們能以目前已對臺灣造林樹種已被分離出之特殊成分為開發主軸，針對代謝症候群相關的病症進行研究，相信可以找出具醫療開發價值的林產品。

在本年度的計畫執行工作中，我們乃先利用前脂肪細胞 (Preadipocyte) 3T3-L1，活化其三條主要的訊息傳遞途徑 (包括 cAMP-PKA 途徑、固醇類激素的核受體途徑以及 insulin 受體的磷酸化途徑)，誘導前脂肪細胞分化成為堆積大量三酸甘油酯之成熟脂肪細胞 (adipocyte)，並同時處理樺木酸以分析其對於抑制脂肪堆積的功效。如圖 3 所示，前脂肪細胞 (3T3-L1) 分化過程中同時以處理不同濃度 (1 - 20  $\mu$ M) 之樺木酸處理，經 Oil Red O 染劑染色後可明顯比較出，隨著樺木酸處理濃度的增加，可有效地抑制前脂肪細胞轉化成成熟的油脂細胞。

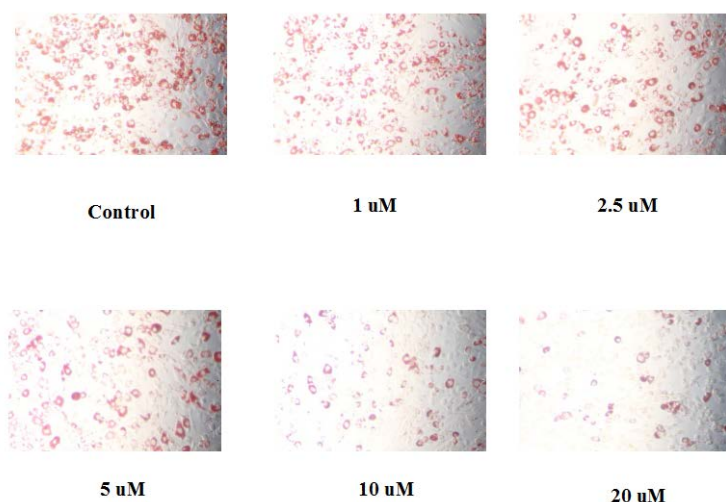


圖 3 樺木酸對於脂肪細胞分化的影響。

為瞭解前脂肪細胞轉化成脂肪細胞的數目的減少是否是因為細胞毒性所造成？本計畫乃利用 MTT assay 檢測樺木酸是否對於 3T3-L1 細胞產生細胞毒性，結果證實，樺木酸劑量於 1 - 20 uM 下均未對 3T3-L1 細胞產生細胞毒性，細胞存活率均在 100%以上 (圖 4)。接著利用酵素免疫分析儀偵測以波長 510 nm 量測經染色的 3T3-L1 細胞，處理樺木酸組分別於對照組之吸光值相比較可以定量出，隨著樺木酸濃度的增加可顯著地抑制油脂細胞的生成，於 10 uM 劑量下，油脂含量 (Lipid content) 僅有對照組的 71.1%；而當樺木酸濃度提高至 20 uM 時，油脂含量僅有 53.3% (圖 4)。由本研究所獲得之成果可知，樺木酸表現出極強的抑制脂肪細胞生成的活性，能夠明顯減少成熟脂肪細胞的數量，其效果與劑量呈現正相關，且在 20 uM 的濃度之下即達到 53.3% 抑制率的活性。

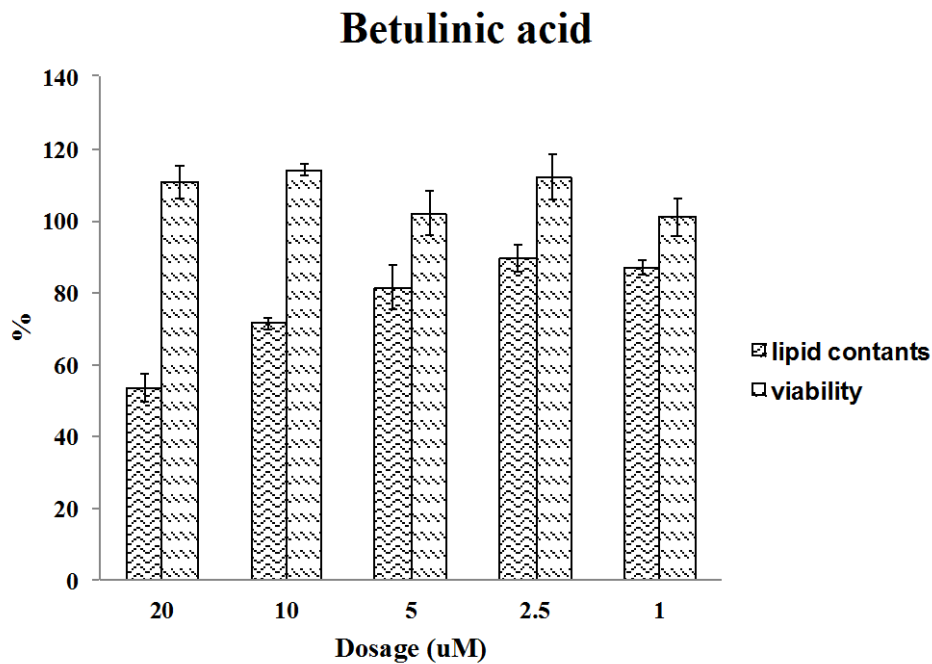


圖 4 樺木酸對於前脂肪細胞 ( 3T3-L1 ) 脂質生成的影響及細胞毒性

為了進一步瞭解樺木酸對前脂肪作用的機制，本研究在不同時間點收集經誘導之 3T3L1 細胞，並利用西方墨點法分析細胞的蛋白質表現。分析結果發現，對照組細胞在分化劑誘導後 7 天即可測得 PPAR $\gamma$  蛋白 (圖 5)，其表現量會隨著分化過程中逐漸增加，而以樺木酸處理的細胞在分化過程中 PPAR $\gamma$  蛋白表現量明顯被抑制。另一方面，由 PPAR $\gamma$  所調控的下游基因 Adiponectin 在誘導分化後第 6 天開始表現並逐漸增加，而樺木酸能夠明顯抑制其蛋白質濃度。另一方面，對照組細胞在分化劑誘導後 7 天即可測得脂肪酸合成酶，並在第 4 天後有大量表現，細胞處理樺木酸後能夠明顯降低脂肪酸合成酶濃度，使其趨於未分化時期的表現量。

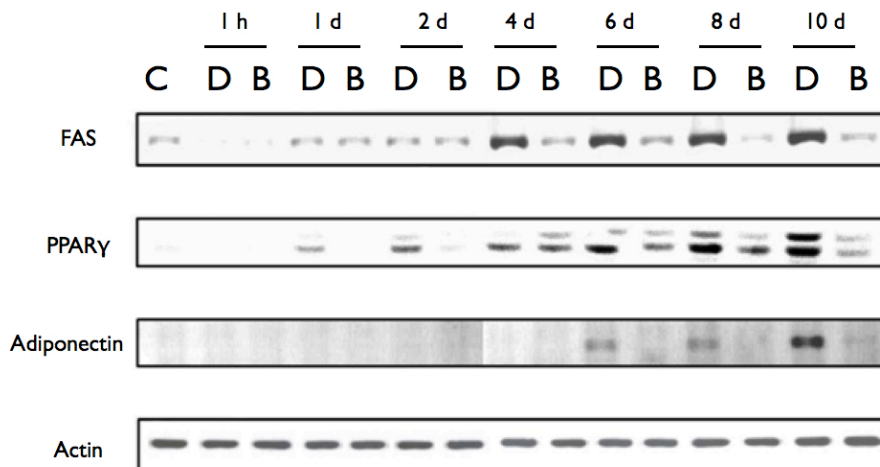


圖 5. 圖 3. 樺木酸對於抑制過氧化體增殖劑活化受體及其下游蛋白表現量之活性。C : Control ; D : DMSO ; B : 樺木酸。 ( 劑量 : 20  $\mu$ M )

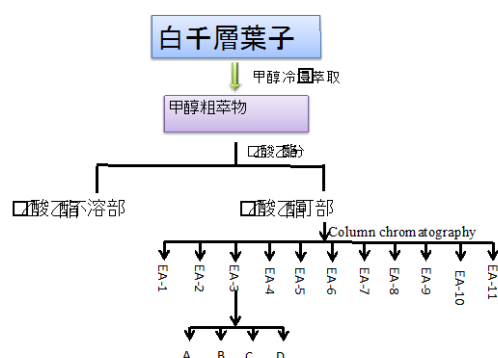
在 Adipogenesis 初期會有數個基因被啟動，包括 C/EBP $\alpha$ 、C/EBP $\beta$  以及 PPAR $\gamma$  (Ntambi and Kim, 2000)，這幾個基因都屬於轉錄因子。其中，過氧化酶體增生活化受體  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) 被認為在分化過程中扮演最重要的調控角色，前人研究證實在細胞內大量表現失去功能的 PPAR $\gamma$  突變蛋白能夠明顯抑制其分化效率，進而減少細胞內的脂質含量 (Tamori *et al.*, 2002)。本實驗結果顯示，在 3T3-L1 細胞分化同時加入樺木酸，其 PPAR $\gamma$  蛋白表現量明顯低於對照組，因此進而降低脂肪前驅細胞的分化效率。此外，PPAR $\gamma$  所調控的下游產物 Adiponectin 為一種專門由脂肪細胞所分泌的脂肪激素，本研究也證實了在樺木酸處理之下，Adiponectin 的蛋白質濃度明顯被抑制，其原因來自於樺木酸降低了分化效率而減少成熟脂肪細胞的數量，因此，由脂肪



細胞所分泌的脂肪激素也自然減少。另一方面，脂肪酸合成酶是更直接與細胞內脂質含量有關的酵素，在誘導分化後的第 4 天會開始在細胞內大量表現，樺木酸能夠明顯減少脂肪酸合成酶的表現量，使其趨近於未分化狀態下的蛋白質濃度。有趣的是，調控脂肪酸合成酶表現的調控因子 SREBP-1c (Horton *et al.*, 2002) 並沒有隨著不同的處理而有明顯改變，因此，樺木酸在抑制脂質累積中所扮演的角色並非直接參與調控 SREBP-1c，而是由其它途徑抑制脂肪酸合成酶的蛋白質濃度，此詳細機制有待更進一步的研究。

## 2. 白千層葉子甲醇萃取物的分離與抗氧化與抗發炎活性探討

除了已獲得樺木酸之外，本計畫亦針對甲醇萃取物以圖 6 的流程圖進行分離的工作。甲醇萃取物首先以乙酸乙脂 (EA) 進行液相 - 液相萃取，所獲得之 EA 分離部進一步利用管柱層析將其細分為 EA1 - EA11 的次分離部，並以包括抗氧化試驗、抗發炎試驗及 MTT 法對其進行活性探討。



2

圖 6. 白千層葉子甲醇萃取物之分離流程

試驗結果顯示白千層葉子成分並不具有顯著的抗氧化活性，而具有抗發炎

活性，進一步將各分離部 ( EA-1 至 EA-11 ) 以 LPS 誘導巨噬細胞產生 NO 自由基的試驗模式評估其抗發炎活性。圖 7 為各分離部之抗發炎活性之結果，由圖可知，EA-6 與 EA-10 之抗發炎活性最強，EA-10 在 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的劑量下可達 90% 之抑制率。

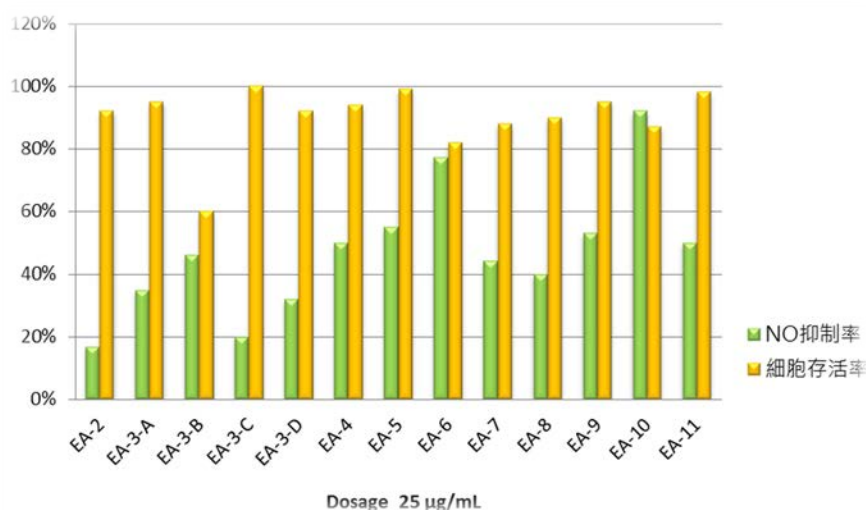


圖 7. 白千層甲醇萃取物乙酸乙酯可溶部各分離部對 NO 自由基抑制活性。

接著利用 HPLC 分離純化 EA-10，得到此分離部之主成分，經核磁共振光譜分析(圖 8)鑑定其為 Strobopinin ( Matsuura, 1957 ) ( 圖 9 )，為一黃酮類化合物已被證實可抑制 Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC)之增生，IC<sub>50</sub> 為 36.3  $\mu\text{M}$ ，而造成此抑制的活性應該是透過阻止 IL-2 與 IFN- $\gamma$  的生成所造成 ( Peter et al., 2011 )。但針對 Strobopinin 的抗發炎活性分析結果顯示，此化合物對巨噬細胞並不具有毒性，且無顯著的抗發炎活性，即使濃度提高至 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  均只有 40% 的抑制率。因此，於 EA-10 中應具有其他具抗發炎活性的成分，應可以在未來後續的研究中探討。

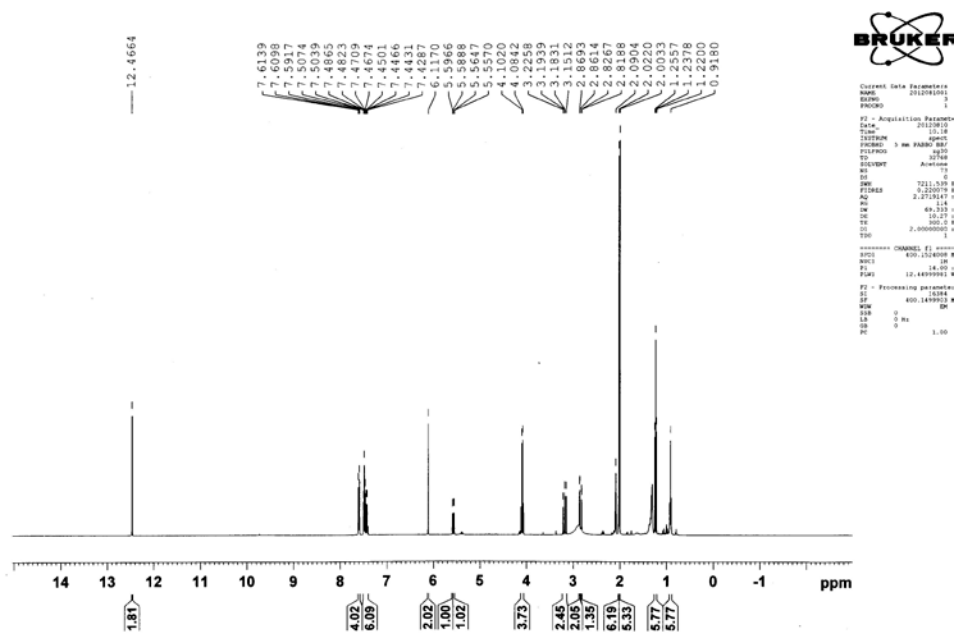


圖 8. Strobopinin 的氫譜-核磁共振光譜圖

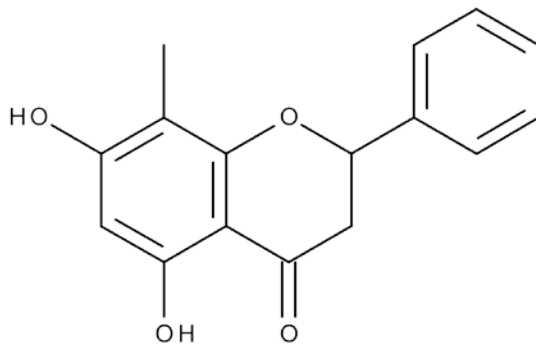


圖 9. Strobopinin 的結構圖

### 3. 樺木酸的製備與定量

本計畫發現，白千層葉子甲醇萃取物中含有豐富的樺木酸成分，而樺木酸為具有多重生物活性的天然化合物，特別是對於抗腫瘤活性所具有的潛力更是受到注目。目前所獲得的研究成果顯示，樺木酸之抗癌機制是經由線粒體途徑誘導癌細胞凋亡。另外，樺木酸對多種類型的癌症細胞具有顯著的毒性，但對於正常細胞和組織的毒性則相對較低。因此，學界認為樺木酸是具有開發成為一種新型粒線體標靶藥物的潛力，本計畫將進一步的探討樺木酸在白千層葉子中含量與尋找類似骨架的活性化合物。經由試驗結果得知，白千層樺木酸可經由以下步驟獲得：

- ( 1 ) 甲醇與葉子體積比 5 : 1，以超音波振盪萃取 30 min。
- ( 2 ) 萃取物以矽膠管柱，利用乙酸乙脂：正己烷 = 40 : 60 為沖提液沖提，沖提液靜置，可獲樺木酸粗結晶。
- ( 3 ) 續以 HPLC，Si-60 管柱，乙酸乙脂：正己烷 = 50 : 50 分離，可獲高純度之樺木酸。

圖 10 為不同白千層於不同採集地點所含樺木酸含量，所有植株之樹齡分佈界於 20 至 30 年間，而同一植株成熟葉樺木酸含量均高於幼葉，老葉之樺木酸含量  $j$  為 4.0 到 13.0 mg/g；而幼葉為 0.4 至 3.9 mg/g。

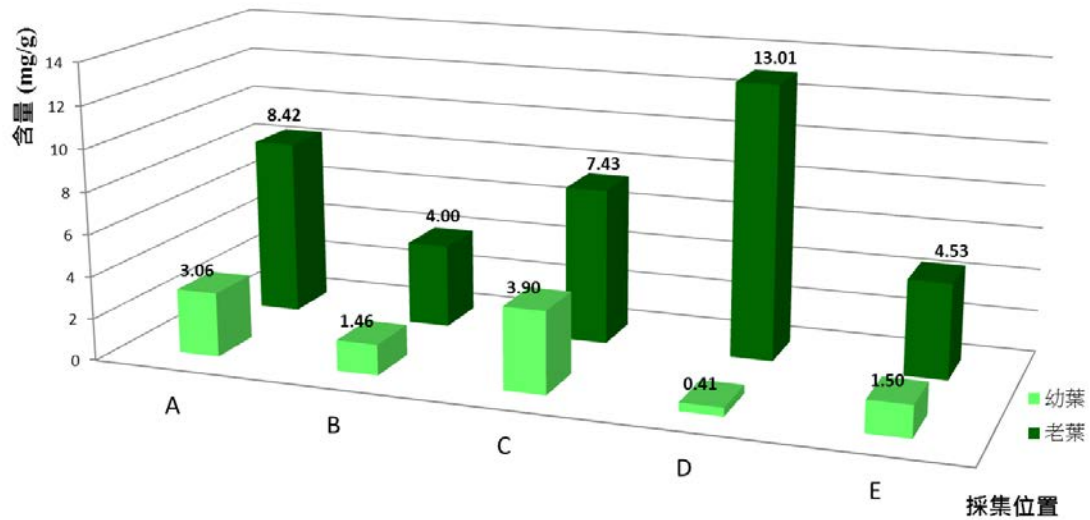


圖 10. 不同採集地點之白千層葉子樺木酸含量。

本研究進一步採集幼齡木，分別是一年生、五年生及十年生的白千層成熟葉分析其樺木酸含量，結果發現其含量分別為 14.4、6.5 及 1.2 mg/g，於一年生的葉子中即具有高含量之樺木酸含量。因此，如以獲得樺木酸為目的，應可於幼齡木中採收葉子即可。

#### 四、結論

白千層為目前台灣重要的造林樹種之一，具有克服貧瘠地之特點，於國土保安與環境維護目的下具有重要的意義。於不違被環境保護的前題下，開發其葉子的經濟效用，具有重要的經濟價值。本研究證明白千層葉子富含高價值的樺木酸，含量約在 10 mg/g 以上，並且可以利用簡單的萃取、純化的步驟獲得。並且，亦證實樺木酸新穎的功能，即抑制動物脂肪細胞的增生，未來可進一步開發成健康食品或醫療用品。

以現階段之林業經營的角度來看，如何有效利用森林資源並賦予森林利用新的方向已為全球林業及林產界人員所共同關注之主題。若從現代生物產業科技發展的角度考量，以森林或林木代謝產物為對象的活性篩選之研究，應是今後國家基礎與應用科學發展領域中最重要且最值得探討的研究課題之一。本計畫所得之研究成果，將可整合現有平地造林種植白千層之林農，以葉子為原料，從精油產品到不具揮發性的樺木酸做一系列的開發利用。

## 五、參考文獻

- Avram, M. M., A. S. Avram, W. D. James (2007) Subcutaneous fat in normal and diseased states 3. Adipogenesis: from stem cell to fat cell. *J Am Acad Dermatol.* 56: 472-492.
- Carson, F., K. A. Hammer and T. V. Riley<sup>1</sup> (2006) *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. *Clin Microbiol Rev.* 19(1): 50-62.
- Horton, J. D., J. L. Goldstein, M. S. Brown (2002) SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest.* 109: 1125-1131.
- Kahn, B. B., J. S. Flier (2000) Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest.* 106: 473-481.
- Lee, C. -K. (1998a) A New Norlupene from the Leaves of *Melaleuca leucadendron*. *J. Nat. Prod.* 61: 375-376.
- Lee, C. -K. (1998) Ursane triterpenoids from leaves of *Melaleuca leucadendron*. *Phytochemistry* 38: 1119-1112.
- Lee, C. -K. (1999) Leucadenone A-D, the novel class flavanone from the leaves of *Melaleuca leucadendron* L. *Tetrahedron Letters* 40: 7255 – 7259.
- Lee, C. -K. and M. -H. Chang. (1999) Four New Triterpenes from the Heartwood of *Melaleuca leucadendron*. *J. Nat. Prod.* 62: 1003-1005.

- Matsuura, S. (1957) The structure of cryptostrobin and strobopin; the flavanones from the heartwood of *Pinus strobus*. Pharm. Bull. 5(3): 195-198.
- Ntambi, J. M., Y.-C. Kim (2000) Adipocyte differentiation and gene expression. J Nutr. 130: 3122S-3126S.
- Peter, T., D. Padmavathi, R. J. Sajini, and A. Sarala (2011) *Syzygium samarangense*: A review on morphology, phytochemistry & pharmacological aspects. Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research 4: 155-163.
- Raman, A., U. Weir and S. F. Bloomfield (1995) Antimicrobial effects of tea-tree oil and its major components on *Staphylococcus aureus*, *Staph. epidermidis* and *Propionibacterium acnes*. Lett Appl Microbiol. 21(4): 242-245.
- Sharma P., Y. K. Gupta, M. C. Sharma, and M. P. Dobhal (2010) Two new compounds from the stem of *Nerium oleander*. Indian Journal of Chemistry 49B:374-378.
- Tamori, Y., J. Masugi, N. Nishino, M. Kasuga (2002) Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in maintenance of the characteristics of mature 3T3-L1 adipocytes. Diabetes. 51: 2045-205.
- Khan Z., M. Ali, and P. B. (2010) A new steroidal glycoside and fatty acid esters from the stem bark of *Tectona grandis* Linn. Natural Product Research 24:1059-1068.
- Yoshida T., T. Maruyama, A. Nitta, and T. Okuda. (1996) An hydrolysable tannin and accompanying polyphenols from *Melaleuca leucadendron*. Phytochem. 42: 1171-1173.