

中華民國第 56 屆中小學科學展覽會 作品說明書

高級中等學校組 植物學科

052105

秋葵甲醇萃取物抗氧化與抗腫瘤特性分析

學校名稱：嘉義市私立嘉華高級中學

作者： 高二 陳思如 高一 陳思成 高二 薛湘雯	指導老師： 吳沛怡
---	------------------

關鍵詞：秋葵、抗氧化、抗腫瘤

摘要

本研究目的主要探討秋葵甲醇萃取物之抗氧化與抗腫瘤特性。先將 2 克秋葵粉末以 100 ml 甲醇攪拌萃取，總酚含量相當於 1.14 mg 沒食子酸的含量。在抗氧化滴定試驗，10 ml 的秋葵甲醇萃取液分別需要消耗 6.92 和 8.88 ml 的 0.02 M 碘液和過錳酸鉀才能達到滴定終點。而濃度 60% 秋葵甲醇萃取液，其螯合亞鐵離子能力可達 50% 以上。秋葵甲醇萃取液可清除 75% 的自由基 DPPH，優於 75 ppm 的維他命 C 功效。在抗腫瘤細胞生長試驗方面，結果顯示在秋葵甲醇萃取物濃度 18 ug/ml 就對大腸癌 SW480 細胞生長有抑制作用，隨著濃度越高抑制現象更明顯，在濃度 75 ug/ml 可達 100% 的抑制效率。綜合以上的研究結果，證實秋葵甲醇萃取物具有良好的抗氧化能力與抑制大腸癌細胞生長特性，而且這兩項特性都有明顯的濃度依賴性。

壹、研究動機

每年春夏不論在家裡餐桌或外食餐廳用餐時，經常會食用到一種形狀大小約手指細長的綠色蔬菜，口感冰涼黏稠，經詢問家人得知這種蔬菜名為秋葵，是一種營養極為豐富且具健胃整腸功效的蔬菜。在一次的台東原生植物園旅遊，第一次看到秋葵，當時還誤以為是未成熟的紅辣椒。

營養蔬菜有很多種，但是食用口感這麼有黏稠性的倒是非常稀少，為什麼人們都說食用秋葵對身體很好呢？那到底好在哪裡？為什麼會有這麼多黏稠液？這些黏稠液的組成又是甚麼呢？黏稠液和保健功能有關嗎？這一連串的疑問引發了我們的好奇心。我們經上網查詢與請教學校師長有關秋葵的保健功效後，才知道台灣秋葵是自日本引進種植，目前全省約有 70% 以上的秋葵來自我們嘉義縣的鹿草鄉。因此我們與學校指導老師溝通後，決定選用我們在地農特產「秋葵」做為科展研究主角。

文獻資料顯示秋葵富含維生素 A、B、C、E 與 β -胡蘿蔔素，因此推測應具有抗氧化的能力。此外癌症為國人死亡率第一名的疾病，目前也有研究證實秋葵可以抑制乳癌細胞的生長。因此我們這次科展研究方向朝向秋葵抗氧化與抗腫瘤的功能分析，試著以保健、醫學的面向來探討秋葵的功能。我們希望能藉由本次科展的研究結果，來再次確認、證實秋葵的功能性，進一步提升秋葵的應用附加價值，如此不僅能做到推廣、發揚在地農特產的經濟價值，造福農民，未來能更進一步提供人類保健、抗癌醫療藥物的研發。

貳、研究目的

秋葵在歐、美等國家因含豐富的營養素而被列入新世紀最佳綠色食品名錄。在日本因具有增強身體耐力和抗疲勞等作用，因此日本人將它稱之為「綠色人蔘」。另外秋葵也被許多國家指定為運動員的首選蔬菜，因此又有「奧運蔬菜」的美名。秋葵的營養成分與保健功能日益被重視，目前全省約有 70% 以上的秋葵來自我們嘉義縣的鹿草鄉，研究發現秋葵嫩莢含有豐富的果膠、膳食纖維，其果膠粘稠狀態是植物界非常少見，另外秋葵也富含維生素 A、B、C、E、 β -胡蘿蔔素，豐富鈣、鎂、鉀礦物質以及硒、鋅、鐵、磷等多種微量元素，這些成份被推測和秋葵具有保護腸胃，促進抗氧化新陳代謝、降低血糖與抑制腫瘤細胞生長功能有關。

這次科展研究將朝向秋葵抗氧化與抗腫瘤的功能分析，整個研究分為三大部分進行，主題如下：

- 一、秋葵甲醇萃取物之製備研究。
- 二、秋葵甲醇萃取物之抗氧化特性研究。
- 三、秋葵甲醇萃取物之抗腫瘤特性研究。

本研究是第一個探討秋葵甲醇萃取物抗氧化與抗腫瘤的研究，目的希望能確認秋葵在保健和醫學的功能性，了解秋葵的其他應用附加價值，期待未來能進一步提供人類保健、抗癌醫療藥物的研發。另外這次科展也做到結合在地農產品的推廣，發揚在地農特產的經濟價值，造福農民。以上為我們做這次科展的研究目的。

參、文獻探討

一、秋葵簡介

秋葵原產地為非洲衣索比亞附近，在分類屬錦葵科秋葵屬植物，學名為 *Abelmoschus esculentus*。台灣自日本引進種植，又稱為黃葵、食香椪、秋葵、黃蜀葵、假三念、美國豆、羊角豆或阿華田等，台語發音“歐庫拉”是由英文名 Okra 音譯而來。秋葵為一年或多年生草本植物，性喜溫暖、耐水、耐風、耐熱，但不耐寒，植株植立，能長到高約 1.5~2.5 公尺高。全株被有絨毛，葉互生約 10~20 公分長，呈掌形分裂，有 5 到 7 個裂片。花直徑 4 到 8 厘米，花瓣由白到黃，花瓣根部有紅色或紫色斑點。結蒴果，內含多顆種子。台灣秋葵依果形分為角型及圓形兩種，依果色分青綠及白綠兩色。常見的品種有五福、清福、永福、南洋與翠嬌等，每年 3-11 月為採收期，5-9 月是生產旺季，目前最大產量為嘉義縣鹿草鄉，約占全省 70% 的產量(行政院農業委員會農業知識入口網)。

二、秋葵食用與營養成分

秋葵果長在 10 公分內食用為佳，嫩莢中含蛋白質、醣類、脂肪、纖維素、維他命 A、B、C、E 和鉀、鈣、鎂、磷、鐵等營養素，適合煮、炒、炸、鹽漬、醬漬做泡菜。常見烹煮方式是以沸水燙半熟切片加肉絲，或煮軟後沾醬油、調味料或美乃滋，味香嫩多汁，滑潤不膩，香味獨特，深受大眾青睞。成熟的種子可烤熟磨成細粉，味芳香，沖調溶解快，可做為咖啡代用品，卻不含咖啡因，此外種子也可榨油，秋葵油是一種高檔植物油，它的營養成分和香味遠超過芝麻油和花生油(鄉間小路月刊, 2004)。

三、秋葵保健功能

秋葵除了有其獨特的外型與口感，還含有令人意想不到的豐富營養物質，嫩莢

果中含有特殊香氣與風味的黏滑多醣體，可以幫助消化、治療胃炎和胃潰瘍、保護肝臟和增強人體耐力。此外還有豐富的維生素 A、B、C、E、 β -胡蘿蔔素與鉀、鈣、鎂等豐富的礦物質，其中鈣和鎂的含量密度都比乳製品高，因此秋葵被歸列為高鈣蔬菜。由於黃秋葵也富含含有鋅和硒等微量元素，能增強人體防癌與抗癌，加上含有豐富的維生素 C 和可溶性纖維，不僅對皮膚具有保健作用，且能使皮膚美白、細嫩(鄉間小路月刊, 2004)。

四、氧化自由基

自由基通常是指含有一個或多個不成對電子的原子、分子或離子，化學性質大部分處於極不穩定的狀態。如果經由氧化作用產生的自由基就稱為氧化自由基，這時化學結構不穩定，會積極搶奪鄰近分子的電子形成電子對，進而改變受質反應的分子結構與特性。常見細胞內含氧自由基如(O_2^-)、羥基(OH \cdot)、過氧化氫(H_2O_2)、烷氧自由基(RO \cdot) 等(Halliwell et al, 1985)。

五、氧化自由基對細胞傷害

生物體具有功能的最小單位為細胞，其主要組成的蛋白質、醣類、脂質和 DNA 都會遭受自由基的攻擊。細胞膜所含的多元不飽和脂肪酸，如果受到自由基攻擊會引發脂質過氧化反應，甚至會造成遺傳物質 DNA 的損傷。蛋白質在轉譯過程中，胺基酸如到自由基攻擊，造成酵素不活化，進而造成細胞死亡或基因突變。此外 DNA 分子受到自由基攻擊，會產生斷裂或複製上的變異，進而造成基因突變(Singal et al, 1998)。

六、人體的抗氧化防禦系統與抗氧化營養素

生物體具有抗氧化防禦系統，用來減緩活性氧及自由基的產生，其中包括抗氧化酵素和抗氧化物。抗氧化酵素包括超氧歧化酶(superoxide dismutase, SOD)，麩

胱甘肽過氧化酶(glutathione peroxidase, GSH)以及過氧化氫酶(catalase)等。抗氧化物有 β -胡蘿蔔素、維生素 A、C、E 以及其他植物類黃酮、多酚類、單寧等化學物質(Pham-Huy et al, 2008)。

七、植物抗氧化成份

植物抗氧化成份主要有多酚類(polyphenol)和類黃酮(flavonoid)。多酚類是植物體內所含有的數種羥基的總稱，可作為植物的演化與分類的重要指標之一。單寧是最早被知道的多酚類，多酚類在植物內的功能是防禦紫外線、抑制細胞過氧化作用。植物類黃酮的產生需要光線照射，在食品的使用是控制酸敗，而在飲食的補充則為防止癌症、慢性病及延遲老化的發生(Williams et al, 2004; Grossi et al 2015)。

八、人類癌症

癌症疾病不僅是為國人死亡率第一名的疾病，同時也是目前全世界死亡人數最多的疾病。在台灣根據 104 年衛福部統計，十大癌症死因依序是：氣管與支氣管和肺癌、肝和肝內膽管癌、結直腸肛門癌、女性乳房癌、口腔癌、前列腺（攝護腺）癌、胃癌、胰臟癌、食道癌、子宮頸及未明示子宮癌，總癌症死亡人數是 4 萬 6094 人，平均癌症死亡時鐘是 11 分 24 秒。全世界每年則約 1000 萬人死於癌症，而且數據有越來越高的現象，因此各種癌症的預防、保健、檢測與治療的研究，正如火如荼的進行中。植物成分抗癌的研究已有非常多的成果，其中用來治療乳癌的紫杉醇，就是由太平洋紅豆杉(*taxusbrevifolia*)的樹皮中分離到的物質，可使癌細胞複製受阻斷而死亡(台灣癌症基金會)。

九、研究方向

由於秋葵富含維生素 A、C、E 與 β -胡蘿蔔素，因此推測應具有抗氧化的能力。

此外癌症為國人死亡率第一名的疾病，秋葵萃取物應用在抗腫瘤的研究文獻目前並不多，因此我們這次科展研究朝向秋葵抗氧化與抗腫瘤的功能分析，試著以保健、醫學的面向來探討秋葵的功能。希望能藉由本次科展的研究結果，來再次更深入證實秋葵的功能性，進一步提升秋葵的應用附加價值，如此不僅能做到推廣、發揚在地農特產的經濟價值，造福農民，未來更能進一步提供人類保健、抗癌醫療藥物的研發。

肆、研究設備及器材

一、材料:

秋葵、大腸癌細胞 SW480

二、化學藥品:

0.20 mM DPPH、2 mM FeCl₂、5 mM Ferrozine、5 M H₂SO₄、沒食子酸(gallic acid)、0.02 M KMnO₄、0.02 M 碘液、95%酒精、澱粉、純水、維他命 C、碘、甲醇、碘化鉀、MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)、20% Na₂CO₃、細胞培養液(dulbecco's modified eagle medium, DMEM)、青黴素和鏈黴素抗生素(penicillin/streptomycin)、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、0.4 % w/v Trypan blue、磷酸緩衝液(phosphate buffer saline, PBS)、胰蛋白酶(trypsin)、二甲基亞砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)。

三、儀器設備:

烘乾機、錐形瓶、滴定裝置、分光光度計、微量吸注器、電磁加熱攪拌器、抽濾漏斗、細目紗布、不銹鋼鍋、電子天平、高速粉碎機、旋轉濃縮機、冷凍乾燥機、血球計數盤及蓋玻片、水浴槽、細胞培養箱、液態氮、培養皿、光學顯微鏡、石蠟膜、離心機、96孔盤、盤式全光譜分析儀、無菌操作台、試管架、相機。

伍、研究過程及方法

前置實驗：秋葵萃取液之製備

將現採之新鮮秋葵洗淨，冷凍乾燥後磨碎，秤取 2 g 秋葵粉末溶於 100 ml 甲醇進行攪拌萃取 120 分鐘，過濾後將所得之秋葵萃取液，進行抗氧化能力分析；另外將所得之秋葵濃縮萃取物質調製成不同濃度進行抗腫瘤實驗。

一、總酚測定

(一)實驗原理：總酚的含量一般是用比色法分析，利用酚類指示劑 Folin-Ciocalteus phenol reagent，樣品裡如有酚類化合物會跟其試劑反應呈色，而其呈色可利用分光光度計測定在 700 nm 之吸光值。

(二)儲存製備：

1. 萃取物儲存溶液之製備：0.5 g 秋葵粉以 20 ml 甲醇萃取 30 分鐘，再以甲醇定量到 50 ml。
2. 沒食子酸(gallic acid)儲存溶液之製備：取 5 mg 的沒食子酸粉末溶於 10 ml 甲醇中，再取 2 ml 溶於 18 ml 甲醇中。

(三)實驗步驟：

1. 製備不同濃度的沒食子酸溶液，每一個樣品的體積為 1 ml。
2. 製備濃度不同的萃取物樣品溶液，每一個樣品的體積為 1 ml。
3. 分別取 200 ul 的萃取物或沒食子酸溶液加入 1600 ul 離子水及 200 ul 的 Folin-Ciocalteu's reagent，混合均勻靜置 5 分鐘。
4. 加入 400 ul、20% Na_2CO_3 溶液，混合均勻後於 45°C 加熱 15 分鐘。
5. 讀取空盤之吸光值，測量溶液在 700 nm 的吸光值，以萃取物樣品之吸光值及檢量線計算總酚含量。

二、碘滴定法

(一)實驗原理：碘為一種氧化劑，若秋葵萃取液會與碘溶液反應，可視其有抗氧化力，消耗碘液的量愈多，抗氧化力愈強。

(二)實驗步驟：

- 1.配製 0.02 M 碘標準液，以硫代硫酸鈉標準溶液標定之。
- 2.濃縮液視同 100%純液，以甲醇為溶劑配製 40%、60%及 80%秋葵檢測液。
- 3.取各濃度檢測液 10 ml，加入 1 ml 的 5 M 硫酸及 0.5 ml 的澱粉溶液。
- 4.以 0.02 M 碘標準液滴定至變為藍色即為滴定終點。
- 5.讀取用去之碘液之體積，重複實驗三次。
- 6.另取甲醇，置入錐形瓶中，做空白實驗。

三、過錳酸鉀滴定法

(一)實驗原理：過錳酸鉀(KMnO_4)是一種強氧化劑，若秋葵萃取液能與過錳酸鉀溶液反應，使原來的紫紅色褪色可證明其具有抗氧化力，若消耗過錳酸鉀溶液的量愈多，可視為其抗氧化力愈強。

(二)實驗步驟：

- 1.配製 0.02 M 過錳酸鉀酸性溶液。
- 2.濃縮液視同 100%純液，以甲醇為溶劑配製 40%、60%及 80%秋葵檢測液。
- 3.取各檢測液 10 ml，以 0.02 M 過錳酸鉀酸性溶液滴定至紫紅色褪去，變為淡紅色即為滴定終點。讀取消耗過錳酸鉀溶液之體積，重複實驗三次。
- 4.另取甲醇，置入錐形瓶中，做空白實驗。

四、螯合亞鐵離子之能力測定法

(一)實驗原理：利用 Fe^{2+} 與 Ferrozine 的複合物在 A_{562} 之呈色反應可以測得檢測液

對 Fe^{2+} 的螯合能力。檢測液螯合 Fe^{2+} 時會造成 562 nm 吸光值的降低。

(二)實驗步驟：

1.試劑配製

(1)2 mM FeCl_2 溶液：定量瓶加入 0.04 g 的 FeCl_2 溶於純水中稀釋成 100 ml。

(2)5 mM Ferrozine 溶液：定量瓶中加入 0.2463 g 的 Ferrozine，稀釋成 100 ml。

(3)空白組試劑：甲醇。

(4)濃縮液視同 100% 純液，以甲醇為溶劑配製 40%、60% 及 80% 秋葵檢測液。

2.實驗步驟

(1)取 1 ml 不同濃度 40%、60%、80%、100% 的秋葵萃取液，分別加入 100 ul 之 2 mM FeCl_2 和甲醇 800 ul 混合。

(2)再加入 100 ul 之 5 mM 的 Ferrozine 後，混合後避光靜置 30 分鐘。

(3)使用分光光度檢測 562 nm 之吸光值，吸光值下降越低，表示檢測液螯合亞鐵離子的能力越強。

(4)以甲醇做空白實驗。重複實驗三次。

(5)計算螯合亞鐵離子能力

五、清除 DPPH 自由基能力測定

(一)實驗原理：DPPH 甲醇溶液為紫羅蘭色，在 517 nm 下有強的吸光值，若與秋葵檢測液結合，吸光值降低越多，表示清除 DPPH 自由基能力越強。

(二)實驗步驟：

1.用甲醇為溶劑配製 0.2 mM 的 DPPH 溶液。

2.濃縮液視同 100% 純液，以甲醇為溶劑配製 40%、60% 及 80% 秋葵檢測液。

3.取 0.2 mM 的 DPPH 溶液 1 ml、以及各濃度之試驗樣品 1 ml，以震盪器混合均勻後，於室溫下避光靜置 30 分鐘。並以甲醇做空白實驗。

4.以分光光度計測其在 517 nm 波長之吸光值，重複實驗三次。

5.計算清除 DPPH 自由基能力

6.以維他命 C 做對照組實驗。

六、細胞培養

本研究所使用的腫瘤細胞為人類大腸癌細胞株 SW480，由吳老師提供。這株細胞培養於含有 10% FBS 及青黴素/鏈黴素的 DMEM 培養液中。首先細胞培養於 10 cm 的培養盤中，放入細胞培養箱，維持 37 °C 及 5% CO₂ 的條件。待細胞長至八分滿，在無菌操作台移除細胞培養液後，以 10 ml 的 PBS 清洗後，再以 0.5 ml 的 0.05% Trypsin 作用懸浮細胞，所有細胞懸浮後再加 10 ml 新鮮細胞培養液混合，以三等份均分至新的培養皿中進行細胞繼代培養。

七、細胞計數

細胞繼代過程中，以 0.5 ml 的 0.05% 胰蛋白酵素作用懸浮細胞，待所有細胞漂浮後加入 10 ml 的新鮮細胞培養液混合，利用微量分注器(Pipette)吸取 100 ul 的細胞液，加入 100 ul 的 0.4% w/v Trypan blue 混合後，吸取 15 ul 的混合液細胞液自血球計數盤 chamber 上方凹槽加入，蓋上蓋玻片，於 100 倍倒立顯微鏡下觀察，活細胞不染色，死細胞則為藍色。顯微鏡下觀看計數四個大方格之細胞總數，再除 4 乘以 2(因與 Trypan blue 等體積混合)，最後乘以 10⁴，即為每 ml 中細胞懸浮液之細胞數。 $4 \text{ 大格細胞總數} \times 2 \times 10^4 / 4 = \text{細胞數/ml}$

八、細胞存活率 (cell viability) 試驗

用 MTT 試驗方法進行細胞存活率分析。96 孔細胞培養盤每孔種入 10⁴ 個 SW480 細胞。秋葵甲醇萃取物乾燥後溶於 DMSO，再取適量混合於細胞培養液中調配成濃度為 0, 1, 2, 4.5, 9, 18, 37.5, 75, 150 和 300 ug/ml 等十種不同濃度。細胞在培養箱中培養 24 小時後，移除培養液，每孔加入 100 ul 的含上述不同濃度

秋葵萃取物的培養液，另外以含 0.1%的 DMSO 培養液作為控制組加入 96-well 細胞中。所有細胞培養於 37 °C 及 5% CO₂ 的培養箱中，分別於培養 24、48、72 以及 96 小時後，收取 96 孔細胞培養盤，於每一孔加入 10 µl 的 MTT(5 mg/ml) 試劑，在 37 °C 下作用 2 小時，活細胞會將 MTT 的 Tetrazolium 環開裂，生成藍色的 Formazan 結晶，因此 Formazan 結晶的生成量與活細胞數目成正比，待反應完成後，去除培養液，每孔各加入 100 µl 的 DMSO 回溶藍色 Formazan 結晶，再使用酵素連結免疫吸附法(ELISA) reader 偵測其在 OD_{540 nm} 的吸收值。細胞生長存活比較是以控制組的吸光值數據作為存活率 100%，來計算經秋葵甲醇萃取物處理後的相對細胞存活率及細胞毒性。

陸、研究結果

方法一：總酚含量測定

實驗結果：

(一)沒食子酸檢量線製作

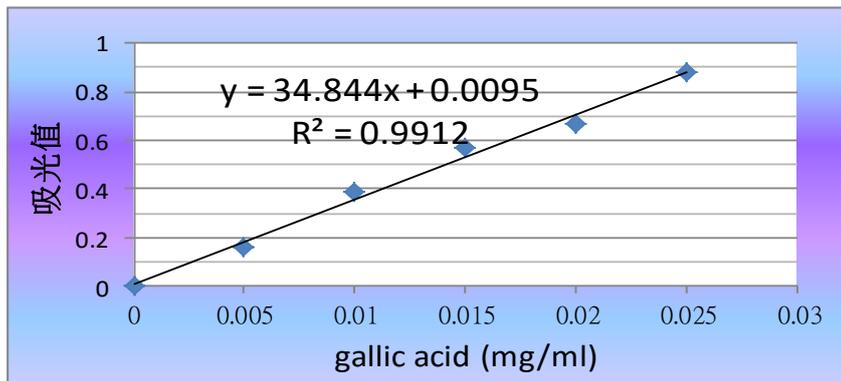


圖 1.沒食子酸檢量線

(二)沒食子酸是一個酚含量很高的化合物，因此使用它來當作一個標準。根據沒食子酸檢量線，可計算出每 100 ml 的秋葵甲醇萃取液總酚含量相當於 1.14 mg 的沒食子酸含量。

方法二：碘滴定法

實驗結果：

(一)取 10 ml 檢測液平均消耗 0.02 M 碘液的體積。100%秋葵萃取液為 6.92 ml，80%秋葵萃取液為 4.43 ml，60%秋葵萃取液為 2.70 ml，40%秋葵萃取液為 1.81 ml；抗氧化力比較：秋葵萃取液 100% > 80% > 60% > 40% (表一)。

(二)滴定終點呈藍色，碘滴定反應終點靈敏。

表一、秋葵萃取液之碘滴定實驗紀錄

實驗次數	1	2	3	平均消耗量
空白實驗(甲醇)	0.00	0.00	0.00	0.00
40%秋葵萃取液	1.85	1.80	1.78	1.81
60%秋葵萃取液	2.70	2.65	2.75	2.70
80%秋葵萃取液	4.29	4.50	4.50	4.43
100%秋葵萃取液	6.65	7.00	7.10	6.92

方法三：過錳酸鉀滴定法

實驗結果：

(一)取 10 ml 檢測液平均消耗 0.02 M 過錳酸鉀液的體積。100%秋葵萃取液為 8.88 ml，含 80%秋葵萃取液為 6.35 ml，含 60%秋葵萃取液為 4.23 ml，含 40%秋葵萃取液為 2.53 ml；抗氧化力比較：100%秋葵萃取液 > 80%秋葵萃取液 > 60%秋葵萃取液 > 40%秋葵萃取液(表二)。

(二)滴定時不必使用指示劑，變色明顯，滴定前為無色，終點呈淡紅色。

表二、秋葵萃取液之過錳酸鉀滴定實驗紀錄

實驗次數	1	2	3	平均消耗量
空白實驗(甲醇)	0.00	0.00	0.00	0.00
40%秋葵萃取液	2.50	2.53	2.55	2.53
60%秋葵萃取液	4.15	4.19	4.34	4.23
80%秋葵萃取液	6.50	6.30	6.25	6.35
100%秋葵萃取液	8.95	8.80	8.90	8.88

方法四：螯合亞鐵離子之能力測定法

實驗結果：

(一)螯合亞鐵離子能力(chelating effects)=(空白組 562 nm 吸光值－樣品反應後 562 nm 吸光值) / (空白組 562 nm 吸光值)×100%。

(二)由檢測值計算 100%、80%及 60%秋葵萃取液之螯合亞鐵離子能力達 50%以

上，表示螯合能力強；40%秋葵萃取液，螯合 Fe 能力低於 50%(表三)。

表三、秋葵萃取液螯合 Fe²⁺ 之能力測定結果

實驗次數	1	2	3	平均吸光值	螯合 Fe ²⁺ 能力
空白實驗(甲醇)	0.799	0.800	0.799	0.800	
40%	0.493	0.499	0.495	0.496	38%
60%	0.325	0.329	0.331	0.328	59%
80%	0.285	0.279	0.276	0.280	65%
100%	0.218	0.226	0.226	0.224	72%

方法五：清除 DPPH 自由基能力測定

實驗結果：

(一)清除 DPPH 能力%=(空白組 517 nm 吸光值-樣品反應後 517 nm 吸光值)/(空白組 517 nm 吸光值)×100%

(二)由檢測值計算 100%秋葵萃取液之清除 DPPH 能力達 75%；80%秋葵萃取液達 62%；60%以下秋葵萃取液清除 DPPH 能力較弱。

(三)實驗組與維他命 C 對照組比較得知，100%秋葵萃取液介於 75 ppm~100 ppm 維他命 C 的抗氧化力之間，80%秋葵萃取液與 75 ppm 維他命 C 的抗氧化力接近，60%秋葵萃取液介於 50 ppm~75 ppm 維他命 C 的抗氧化力之間，40%秋葵萃取液介於 25~50 ppm 維他命 C 的抗氧化力(表四、五)。

表四、秋葵萃取液清除 DPPH 能力測定結果

實驗次數	1	2	3	平均吸光值	清除自由基能力
空白實驗(甲醇)	0.699	0.701	0.702	0.701	
40%秋葵萃取液	0.519	0.511	0.523	0.518	26%
60%秋葵萃取液	0.406	0.401	0.413	0.407	42%
80%秋葵萃取液	0.252	0.271	0.276	0.266	62%
100%秋葵萃取液	0.176	0.166	0.184	0.175	75%

表五、維他命 C 清除 DPPH 能力測定結果

實驗次數	1	2	3	平均吸光值	清除自由基能力
空白實驗(甲醇)	0.762	0.765	0.769	0.765	
10 ppm	0.696	0.695	0.697	0.696	9%
25 ppm	0.601	0.604	0.605	0.603	21%
50 ppm	0.456	0.453	0.453	0.454	41%
75 ppm	0.298	0.301	0.297	0.299	61%
100 ppm	0.091	0.092	0.091	0.091	89%

方法六：秋葵甲醇萃取物抑制大腸癌細胞 SW480 的生長分析

96 孔細胞培養盤共四盤，每孔種 10^4 個 SW480 細胞，培養液調配成秋葵甲醇萃取物濃度為 0, 1, 2, 4.5, 9, 18, 37.5, 75, 150 和 300 ug/ml 等不同濃度，每 24 小時取一盤細胞分析生長情形。結果發現 24 小時後濃度 37.5 ug/ml 以上的細胞都出現生長停滯現象，在 48 小時後也發現 18 ug/ml 的細胞數目相較對照組有較少情形，這些情況也都反應在 MTT 的結果數據上(表六)。作用 96 小時後，結果發現濃度 0, 1, 2, 4.5, 9 ug/ml 對細胞生長並無影響，但在 18 ug/ml 時有 28% 的生長抑制，37.5 ug/ml 時有 85% 的生長抑制，濃度在 75, 150 和 300 ug/ml 則達到 100% 的生長抑制，隨著秋葵甲醇萃取物濃度越高，抑制細胞的生長越明顯(圖 2, 3)。

表六、秋葵甲醇萃取物抑制 SW480 的生長分析之 MTT 數值(三次實驗平均值)

OD _{540 nm} 吸收值	24 小時	48 小時	72 小時	96 小時
0 ug/ml	0.230	0.328	0.531	0.697
1 ug/ml	0.223	0.313	0.538	0.683
2 ug/ml	0.212	0.321	0.530	0.689
4.5 ug/ml	0.221	0.329	0.511	0.675
9 ug/ml	0.213	0.318	0.524	0.683
18 ug/ml	0.201	0.289	0.412	0.503
37.5 ug/ml	0.160	0.182	0.152	0.148
75 ug/ml	0.120	0.090	0.080	0.090
150 ug/ml	0.090	0.080	0.090	0.060
300 ug/ml	0.080	0.060	0.060	0.070

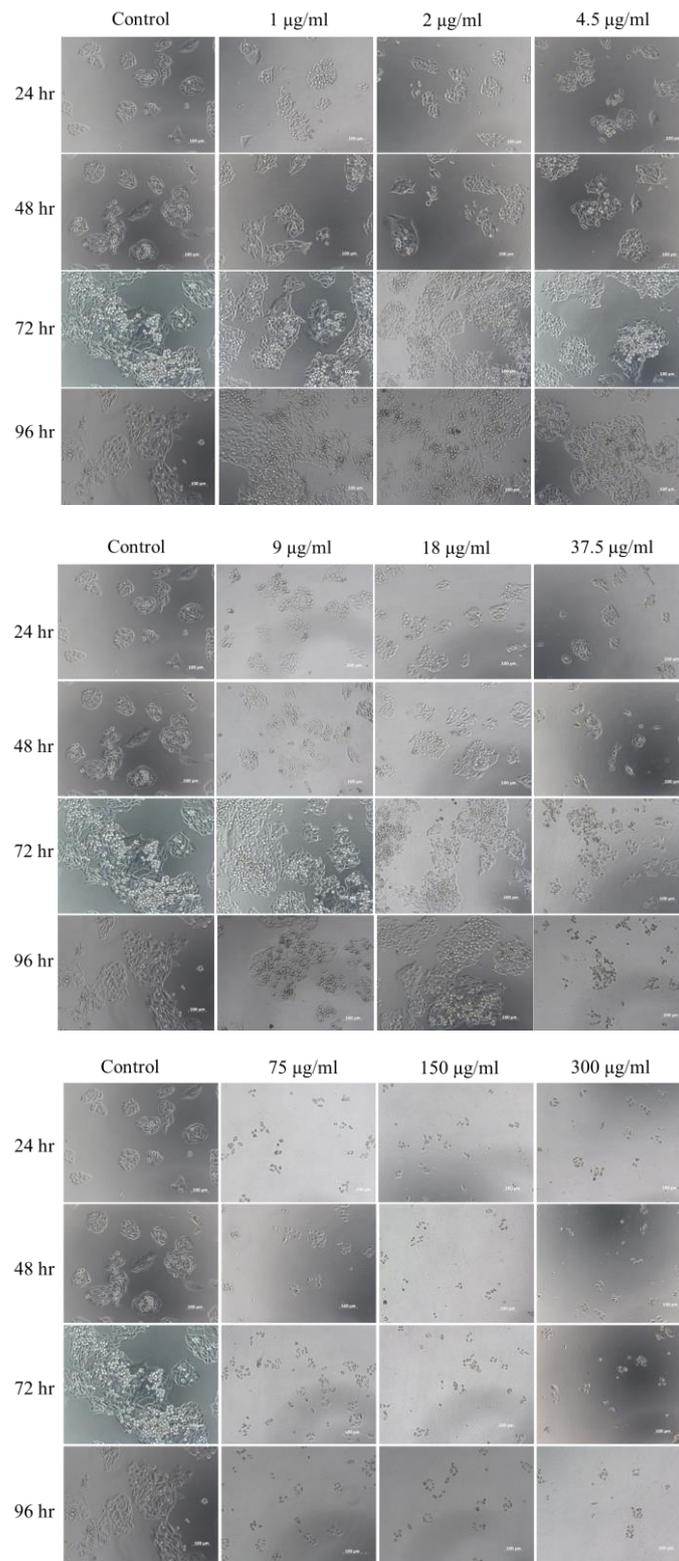


圖 2. 秋葵甲醇萃取物抑制 SW480 的生長圖

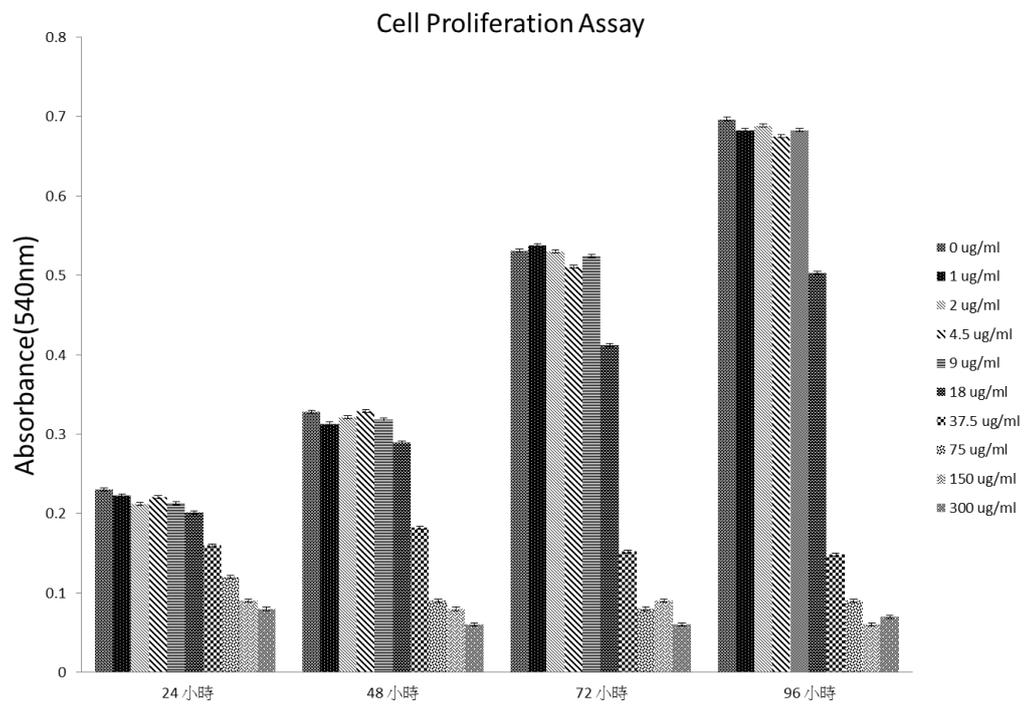


圖 3. 秋葵甲醇萃取物抑制 SW480 生長速率統計圖

柒、討論

近年來國人生活品質不斷提高，具養生、保健功能的天然食材日益受重視。根據研究，這些受喜愛的養生、保健天然生鮮食材，不外乎是指具抗氧化、抗老化、降低心血管疾病、降血糖甚至是抗腫瘤等功能特性。我國 60 年代初期自日本引進秋葵種植，產地分布從嘉南平原到北台灣，目前台灣最主要的秋葵產地就是嘉義縣鹿草鄉，占了全台灣的 70% 的生產量。秋葵除了有其獨特的外型與口感，還含有豐富營養價質，嫩莢果中含有特殊香氣與風味的黏滑多醣體，可以幫助消化、治療胃炎和胃潰瘍、保護肝臟和增強人體耐力。此外還含有豐富的維生素 A、B、C、E、 β -胡蘿蔔素與鉀、鈣、鎂等豐富的礦物質，其中鈣和鎂的含量密度都比乳製品高，因此秋葵被認定為高鈣蔬菜(鄉間小路月刊, 2004)。目前已有多項流行病學調查指出，增加鈣質的攝取可以降低高血壓、大腸癌與孕婦妊娠毒血症的發生，因此認為適量攝取秋葵可有效預防多種疾病的發生(林讚標, 1991)。

β -胡蘿蔔素是維生素 A 的前驅物，維生素 A 和 E 都屬脂溶性維他命，可溶於脂肪和甲、乙醇等有機溶劑中，但不溶於水，對熱、酸穩定。目前已知維生素 A 和 E 都有很好的抗氧化性，能透過提供電子抑制活性氧的生成，達到清除自由基的目的(朱豔芳, 2014; 陳豔珍, 2014)。本研究是利用甲醇來萃取秋葵，所得的萃取物質化性應屬脂溶性，因此我們推測這些秋葵甲醇萃取液，應富含 β -胡蘿蔔素、維生素 A、E 和其他不溶於水的多酚類、金屬鹵化物或有機酸鹽。在本實驗沒食子酸的檢量分析，結果顯示每 100 ml 的秋葵甲醇萃取液總酚含量相當於 1.14 mg 沒食子酸含量。在碘滴定、過錳酸鉀滴定的抗氧化實驗結果，發現秋葵甲醇萃取液可以有效去除、降低化學氧化劑的功效，而且也證實秋葵甲醇萃取液具有螯合亞鐵離子的能力與清除自由基 DPPH 的能力，以上抗氧化能力會隨著秋葵甲醇萃取液濃度越純，而有越佳的抗氧化能力。

癌症是目前全世界死亡人數最多的疾病。根據我們的資料搜尋，秋葵萃取物應

用在抗腫瘤的研究文獻目前並不多，國外有研究學者萃取秋葵水溶性物質，證實可以抑制小鼠黑色素瘤細胞 B16F10(Vayssade et al, 2010)和人類乳癌細胞 MCF-7 的生長(Monte et al, 2014)。此外中國大陸也有研究學者證實秋葵的水溶性粗多醣對人卵巢癌細胞 OVCAR-3、乳癌細胞 MCF-7、子宮頸癌細胞 HeLa、胃癌細胞 MCG-803 等都有生長抑制作用(任丹丹, 2010; 李孟秋, 2015)。以上研究結果都是萃取秋葵水溶性物質來進行試驗，本研究是利用秋葵脂溶性物質來進行腫瘤細胞生長抑制試驗，目前並無這方面的相關結果。

β -胡蘿蔔素、維生素 A 和維生素 E 等脂溶性維生素已被證實具有抗腫瘤細胞生長的特性。如 β -胡蘿蔔素、維生素 A 可抑制前列腺癌(Watters et al, 2009)、頭頸部鱗狀細胞癌(Satake et al, 2003)的生長，維他命 E 可抑制前列腺癌(Malafa et al, 2006)、肺癌(Quin et al, 2005)、乳癌(Kline et al, 2004)等細胞的生長。本研究是第一個以秋葵甲醇萃取物來進行人類大腸癌細胞生長抑制試驗，研究發現在秋葵甲醇萃取物濃度 18 ug/ml 以上就具有抑制大腸癌細胞生長的現象，濃度 37.5 ug/ml 時有 85%的生長抑制，濃度在 75, 150 和 300 ug/ml 則達到 100%的生長抑制，隨著秋葵甲醇萃取物濃度越高，抑制細胞生長的情況越明顯。

捌、結論

秋葵含有豐富的維生素 A、B、C、E 和 β -胡蘿蔔素等抗氧化與抗腫瘤物質，本研究是第一個證實秋葵的甲醇萃取物有良好的抗氧化與抗腫瘤特性，而且這兩項特性都有明顯的物質濃度依賴性。

玖、參考文獻

1. 李孟秋，2015，黃秋葵提取物体外抗氧化活性的研究，《中國食品添加劑》，10: 65-69。
2. 任丹丹，2010，黃秋葵多糖組分對人體腫瘤細胞增殖的抑制作用，《食品科學》，21: 353-356。
3. 林讚標，1991，葵子專論，《林業叢刊》，第 36 號。
4. 朱豔芳，2014，黃秋葵花提取物的体外抗氧化作用，《淮北師範大學學報》，01: 46-50。
5. 陳豔珍，2014，黃秋葵果实粉對衰老模型小鼠抗氧化能力的影響，《食品科學與開發》，15: 19-21。
6. 行政院農業委員會農業知識入口網(<http://kmweb.coa.gov.tw>)。
7. 台灣癌症基金會(<http://www.canceraway.org.tw>)。
8. 農業生活月刊/鄉間小路月刊 2004 餐桌上的菜園-鹿草鄉的黃秋葵故事。
9. Grossi, M., Di Lecce, G., Arru, M., Gallina, T.T., Riccò, B. (2015). An opto-electronic system for in-situ determination of peroxide value and total phenol content in olive oil. *Journal of food engineering* 146, 1-7.
10. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1985). *Free radicals in biology and medicine* (Clarendon Press).
11. Kline, K., Yu, W., Sanders, B.G. (2004). Vitamin E and breast cancer. *The journal of nutrition* 134, 3458-3462.
12. Malafa, M.P., Fokum, F.D., Andoh, J., Neitzel, L.T., Bandyopadhyay, S., Zhan, R., Iizumi, M., Furuta, E., Horvath, E., Watabe, K. (2006). Vitamin E succinate suppresses prostate tumor growth by inducing apoptosis. *International journal of cancer* 118, 2441-2447.
13. Monte, L.G., Santi-Gadelha, T., Reis, L.B., Braganhol, E., Prietsch, R.F.,

- Dellagostin, O.A., E Lacerda, R.R., Gadelha, C.A., Conceicao, F.R., Pinto, L.S. (2014). Lectin of *Abelmoschus esculentus* (okra) promotes selective antitumor effects in human breast cancer cells. *Biotechnology letters* 36, 461-469.
14. Pham-Huy, L.A., He, H., Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science* 4, 89-96.
 15. Quin, J., Engle, D., Litwiller, A., Peralta, E., Grasc, A., Boley, T., Hazelrigg, S. (2005). Vitamin E succinate decreases lung cancer tumor growth in mice. *Journal of surgical research* 127, 139-143.
 16. Satake, K., Takagi, E., Ishii, A., Kato, Y., Imagawa, Y., Kimura, Y., Tsukuda, M. (2003). Anti-tumor effect of vitamin A and D on head and neck squamous cell carcinoma. *Aurisnasuslarynx* 30, 403-412.
 17. Singal, P.K., Khaper, N., Palace, V., Kumar, D. (1998). The role of oxidative stress in the genesis of heart disease. *Cardiovascular research* 40, 426-432.
 18. Vayssade, M., Sengkhampan, N., Verhoef, R., Delaigue, C., Goundiam, O., Vigneron, P., Voragen, A.G., Schols, H.A., Nagel, M.D. (2010). Antiproliferative and proapoptotic actions of okra pectin on B16F10 melanoma cells. *Phytotherapy research* 24, 982-989.
 19. Watters, J.L., Gail, M.H., Weinstein, S.J., Virtamo, J., Albanes, D. (2009). Associations between alpha-tocopherol, beta-carotene, and retinol and prostate cancer survival. *Cancer research* 69, 3833-3841.
 20. Williams, R.J., Spencer, J.P., Rice-Evans, C. (2004). Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free radical biology & medicine* 36, 838-849.

附件：實驗花絮

附件一、研究設備及器材



圖 4.研究設備及器材介紹

附件二、實驗操作情形



圖 5. 抗氧化與抗腫瘤實驗操作情形

【評語】 052105

1. 本實驗以秋葵為材料，探討其抗氧化及抗腫瘤的特性，主題具有應用性。
2. 在抗腫瘤實驗應有正常細胞或非胃癌細胞的對照組，以確立實驗結果的正確性。
3. 實驗紀錄可加強。