

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 農業與食品學科

第三名

052204

茶蠶砂萃取物之成分分析與活性探討

學校名稱：臺北市立建國高級中學

作者： 高二 連向澄 高二 陳竑均	指導老師： 童禕珊
---------------------------------	------------------

關鍵詞：蠶砂、抗氧化活性、兒茶素

摘要

將乾燥茶蠶砂利用極性大小差異初步分離後，對各樣本分別進行清除自由基能力(DPPH)、總酚類含量、總含醣量、以及類黃酮含量等實驗測定，接著以薄層色層分析(TLC)與高效液相色譜儀(HPLC)觀察與分析其中可能之化合物含量分布。

由實驗結果可以得知茶蠶砂的萃取物皆具有抗氧化的能力，且經過各式物質之含量測定之後，發現茶蠶砂具有一定含量的酚類、醣類與類黃酮物質，結合 TLC 薄層色層分析及 HPLC Spike in 實驗確認 EA 萃取物中含有兒茶素存在。

未來希望能夠以進行其搭種類茶多酚化合物之 Spike in 實驗並對 HPLC 圖譜進行單一吸收峰的分離、純化與其純化後物質之抗氧化等化學活性探討或成分分析以確定其中之真正活性成分。

壹、研究動機

市面上泛濫著各品牌的茶飲，個個標榜富含兒茶素，強調維持身體健康、遠離癌症，但飲料中的兒茶素濃度恐怕不足以具有治療的功效。是否有更好的解決之道？這困惑驅使我們向草藥醫學的領域更深入的去探究。

蠶砂，也就是蠶的乾燥糞便，古人多將此用做止痛藥物，看似與現今流行的兒茶素八竿子打不著，但根據學者研究發現，以茶葉為主食的茶蠶之糞便，也就是茶蠶砂，不僅能抗發炎，也具有抑制癌細胞的能力，因此推測茶蠶砂對於調節生理反應的功效，應與茶多酚，也就是兒茶素有關。

本實驗希望能夠透過分析與純化，了解茶蠶砂的特性，進而找出茶蠶砂中具有療效的成分，以期能夠將其發展為新藥物，為現代醫學開出另一條道路。

貳、研究目的及研究問題

一、研究目的

利用正丁醇與乙酸乙酯這兩種極性大小不同的有機溶劑將茶蠶砂中的物質溶出，分成正丁醇層以及乙酸乙酯層，再使用分光光度儀分別進行酚類、醣類、以及抗氧化能力的檢測，並利用高效液相色譜(HPLC)分離部分化合物，以期在未來能夠嘗試於特定濃度與液相中，分離出療效最佳、且對人體細胞傷害最小的物質，作為發展新藥物的研究基礎。

二、研究問題

(一)了解茶蠶砂的特性，並初步分離其組成成分。

- (二)了解茶蠶砂的組成成分之抗氧化能力。
- (三)嘗試分析其中含有之具有活性的物質。
- (四)探討茶蠶砂中的有效成分是否與茶多酚類化合物相關。

參、研究設備及器材

一、茶蠶砂萃取物的萃取與乾燥

(一) 器材：

1. 歧管式真空乾燥 / 蒸餾系統
2. 錐形瓶
3. 燒杯
4. 濾紙
5. 分液漏斗

(二) 藥品：

1. 茶蠶砂
 - (1) 茶蠶砂取自行政院農業委員會茶業改良場曾信光副研究員養殖之茶蠶
 - (2) 茶蠶幼蟲歲數:四至五齡
 - (3) 茶種:台茶 12 號
 - (4) 採集時間:民國 103 年 8~10 月
 - (5) 以 80℃ 烘烤 3 小時
2. 甲醇
3. 丁醇
4. 乙酸乙酯

二、茶蠶砂樣本之高效液相色譜分析(HPLC)

(一) 器材：

1. 高效液相色譜儀(HPLC)
2. C18 檢測柱(Column)
3. 微量吸量管(Micropipette)
4. 離心管 1mL (Eppendorf)

(二) 藥品：

1. 茶蠶砂萃取物樣品(20 毫克/毫升)

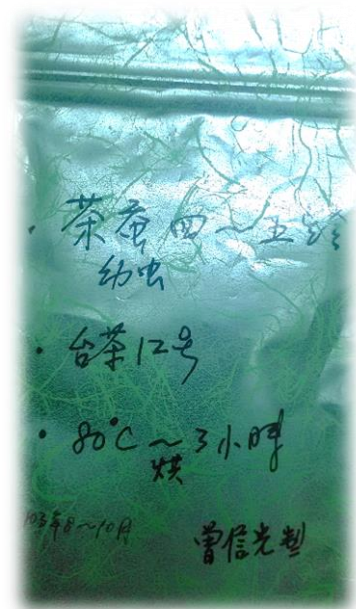


圖 1

2. 甲醇

三、茶蠶砂的抗氧化能力之吸光值測定 (TOTAL ANTIOXIDANT ACTIVITY ASSAY)

(一) 器材：

1. pH 計(pH meter)
2. 分光光度儀(spectrophotometer)
3. 細胞培養分隔盤(96-well)
4. 微量吸量管(Micropipette)
5. 離心管 1mL (Eppendorf)

(二) 藥品：

1. 茶蠶砂萃取物樣品(20 毫克/毫升)
2. 二甲亞砜(DMSO)
3. 乙醇
4. Tris Buffer
5. 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼溶液(DPPH)

四、茶蠶砂醣含量(carbohydrates)測定

(一) 器材：

1. 超音波洗淨器
2. 分光光度儀(spectrophotometer)
3. 乾式加熱器
4. 1mL 離心管(Eppendorf)
5. 細胞培養分隔盤(96-well)
6. 微量吸量管(Micropipette)

(二) 藥品：

1. 茶蠶砂萃取物樣品(20 毫克/毫升)
2. 二甲亞砜(DMSO)
3. 水
4. 硫酸
5. 苯酚
6. 葡萄糖溶液

五、茶蠶砂酚含量(Phenolics)測定

(一) 器材：

1. 分光光度儀(spectrophotometer)
2. 超音波洗淨器
3. 微量吸量管(Micropipette)
4. 細胞培養分隔盤(96-well)
5. 1mL 離心管(Eppendorf)

(二) 藥品：

1. 茶蠶砂萃取物樣品(20 毫克/毫升)
2. 二甲亞砜(DMSO)
3. 水
4. Folin-Ciocalteu (磷鉬酸 Phosphomolybdic 與磷鎢酸 Phosphotungstate 之混和物)
5. 碳酸鈉溶液(Sodium carbonate solution)
6. 沒食子酸(Gallic acid)

註:沒食子酸是常見於茶葉中的一種有機酸,具有酚、羧酸的性質,根據醫學調查,沒食子酸具有預防心血管疾病之功效

六、茶蠶砂類黃酮含量(Flavonoid)測定

(一) 器材：

1. 分光光度儀(spectrophotometer)
2. 超音波洗淨器
3. 微量吸量管(Micropipette)
4. 細胞培養分隔盤(96-well)
5. 1mL 離心管(Eppendorf)

(二) 藥品：

1. 茶蠶砂萃取物樣品(20 毫克/毫升)
2. 甲醇
3. 蘆丁(Rutin Hydrates)
4. 三氯化鋁($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)

七、茶蠶砂樣本與兒茶素之薄層色層分析(TLC)

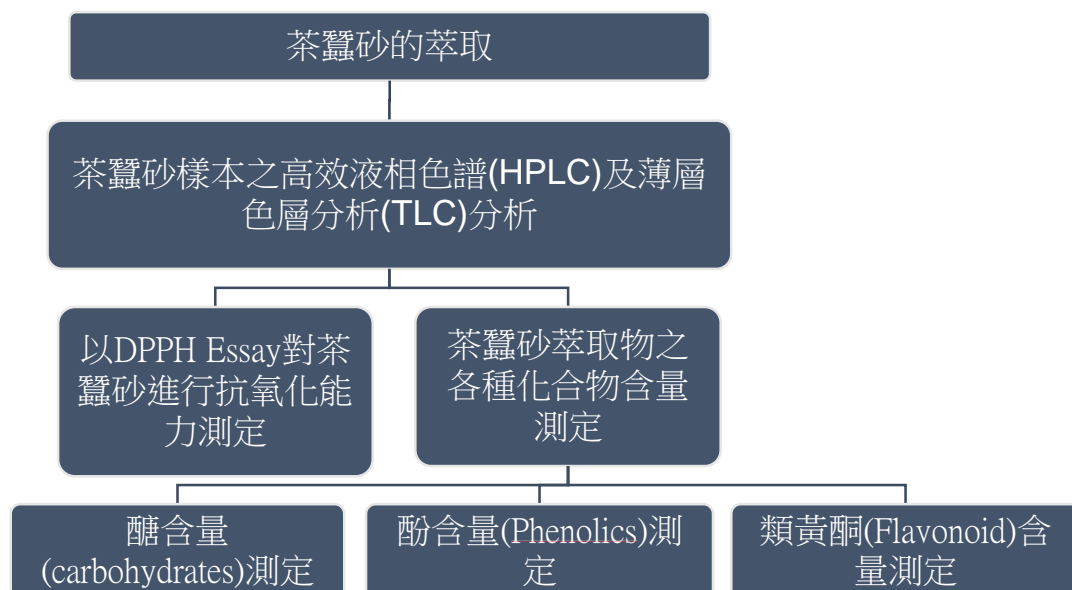
(一) 器材:

1. TLC 正相片
2. 毛細管
3. 玻璃盒
4. 紫外燈
5. 烘乾機或吹風機

(二) 藥品:

1. 茶蠶砂萃取樣本
2. 兒茶素(Catechin)粉末
3. 乙酸乙酯(EA)
4. 正己烷
5. 丙酮

肆、研究過程或方法



一、茶蠶砂萃取物的萃取

實驗原理:利用極性不同大小的有機溶劑(乙酸乙酯和正丁醇)初步將茶蠶砂分離。

- (一) 將 5 克蠶砂加入 50 毫升熱水攪拌，過濾得到蠶砂溶液並重複四次，共得到約 175 毫升的蠶砂水溶液。
- (二) 將水溶液 175 毫升與乙酸乙酯溶液 175 毫升加入分液漏斗並搖晃數次。
- (三) 利用極性的差異，將溶液分為兩層：上層為乙酸乙酯溶液、下層為水溶液，分別

將兩層溶液分離至不同燒杯中。(圖 2)

- (四) 以水層重複步驟(二)~(三)三次，得到乙酸乙酯萃取溶液。

將剩餘水溶液與正丁醇溶液 175 毫升加入分液漏斗並搖晃數次。

- (五) 利用極性差異，將溶液分為水層和正丁醇溶液兩層，分別分離至不同燒杯中。

- (六) 以水層重複步驟(五)~(六)三次，得到正丁醇萃取溶液和水萃取溶液。

- (七) 將乙酸乙酯、正丁醇、水萃取溶液透過壓力抽濾機以加壓加溫的方式抽乾萃取物，得到乾燥萃取物。

- (八) 將萃取物以甲醇溶液回溶，再加入等量的水後進行一次抽乾，得到乾燥粉末狀萃取物。

- (九) 將三者保存於玻璃瓶中，並秤量空瓶重、總重，算出樣本淨重與占原蠶砂之比重。

二、茶蠶砂樣本之高效液相色譜分析(HPLC)

實驗原理：利用幫浦加壓樣品以令其通過填充有吸附劑的壓力柱，使樣品的各個成分因而分離，用來分離混合物，以及確認並量化各個成分的比例。

- (一) 將萃取樣品配置為 10 毫克/毫升之水溶液，以離心機分離 15 分鐘。

- (二) 取分離後之溶液之上清液。

- (三) 開啟高效液相色譜儀，並設定 elution condition 如下：

幫浦: 1.0 mL/min A 瓶: H₂O B 瓶: ACN(乙腈)

經過時間(分鐘)	H ₂ O 比例	ACN 比例
0.0 ~10.0	90.0	10.0
10.0~24.0	90.0~80.0	10.0~20.0
24.0~30.0	80.0~78.0	20.0~22.0
30.0~35.0	78.0~75.0	22.0~25.0
35.0~35.1	75.0~90.0	25.0~10.0
35.1~45.0	90.0	10.0

- (四) 開啟幫浦，讓 HPLC 機器進行校正約 20 分鐘

- (五) 取樣本 50 毫升以針筒注入色譜儀



圖 2

(六) 50 分鐘後完成分析，分別以 230、250、280、330nm 的波長檢視波形並存檔。



圖 3



圖 4

(七) 參照參考資料十二的 HPLC 結果圖，由於是使用相同之檢測管以及相同條件，可以推測相同的化合物會在相近時間析出，在將欲檢測之化合物標準品加入樣本，稱為 spike in。

(八) 重新進行一次 HPLC，如果在相同時間析出更高的吸收峰，且沒有新的吸收峰出現，可以推測樣本含有該化合物。

三、茶蠶砂樣本與兒茶素之 TLC 薄層色層分析

實驗原理：先將欲分離之樣品用毛細管點在 TLC 正相片上，然後在密閉的玻璃盒中，用正己烷與乙酸乙酯體積比為 1：9 之溶劑作為流動相，利用其毛細作用緩慢地將混合物樣品中的物質帶向正相片的頂端。因為樣品中各個化合物與固定相之間的作用力不同，在流動相中溶解度也不同，因此上升速度有所差異。最後在正相片上形成上下不一的顯色點，進而達到分離混合物的目的。

(一) 茶蠶砂樣本準備

取茶蠶砂樣本各 2mg 並將其溶入約 1mL 乙酸乙酯(EA)中。

(二) 兒茶素(Catechin)樣本準備

取兒茶素粉末 1mg 並溶入約 1mL 乙酸乙酯(EA)中。

(三) 將樣本置於 TLC 正相片上

1. 以鉛筆輕輕地在 TLC 正相片上標記層析起點、終點以及樣本的放置位置。
2. 以毛細管分別吸取各個含樣本之溶液並輕點在標記位置上，須待前一點之溶劑揮發散去後才可點下一點。(同一支毛細管在吸取不同溶液前須先以丙酮潤洗數次)

(四) 移動向溶液之配置與樣本之薄層色層分析

1. 將乙酸乙酯(EA)和正己烷以體積比 9:1 之比例混和成 5mL 之溶液，迅速到入玻璃盒中，蓋上蓋子並搖晃使其混和均勻後靜置。

2.將已點上樣本之 TLC 正相片垂直放入移動向溶液中(液面高度不可超過先前標示之起點)。

3.待液面因毛細現象超過終點之高度時將正相片小心取出並晾乾。

4.將薄片至於紫外線燈底下觀察後，將 TLC 正相片置於顯色劑中後拿出並烘乾。

四、茶蠶砂以及其他標準品的消除自由基能力(DPPH)

實驗原理：利用顏色深淺(吸光值)的變化檢測樣本清除 DPPH 自由基的能力

(一) 藥品準備

1. Tris Buffer 的稀釋與 pH 值調整

(1) 取 Tris Buffer 1M 溶液 5mL，加蒸餾水至 100mL，使濃度變成 50Mm

(2)將 pH meter 校正後，調整 Tris Buffer pH 值至 7.4

2. 其他標準品的稀釋

把 Catechin、Gallic Acid、Rutin Hydrates 等標準品配置為 25 mg/ml。

(二) 樣本序列稀釋

1. 將不同樣本(濃度均為 20mg/mL)取出 30 μ l 至離心管。

2. 依照下表進行序列稀釋:

離心管編號	樣本	1	2	3	4	5	6
由前管加入 (μ l)		30	100	100	100	100	100
加入 DMSO(μ l)		170	100	100	100	100	100
最終濃度 (μ g/ml)	20000	3000	1500	750	375	187.5	93.75

(三) 其他標準品的序列稀釋

1. 將不同樣本(濃度均為 25mg/mL)取出 90 μ l 至離心管。

2. 依照下表進行序列稀釋:

離心管編號	樣本	1	2	3	4	5	6
由前管加入 (μ l)		90	80	50	50	50	50
加入 DMSO(μ l)		60	20	50	50	50	50
最終濃度 (μ g/ml)	25000	15000	12000	6000	3000	1500	750

(四) 將樣本(或其他標準品)置入 96 孔細胞培養盤，配置四種檢測物:

1. 控制組(Control):

200 μ l DPPH+90 μ l Tris Buffer+10 μ l DMSO

2. 操作組(Sample):

200 μ l DPPH+90 μ l Tris Buffer+10 μ l 稀釋後的樣本

3. 控制空白組(Control Blank):

200 μ l 乙醇+90 μ l Tris Buffer+10 μ l DMSO

4. 操作空白組(Sample Blank):

200 μ l 乙醇+90 μ l Tris Buffer+10 μ l 稀釋後的樣本

放置順序: Tris Buffer→ DMSO/樣本→ DPPH/乙醇 (如下圖)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CB	CB	CB	CB	CB	CB	CB	CB	CB	CB	CB	CB
B	S 1-1	S 1-1	S 1-1	SB 1-1	SB 1-1	SB 1-1	S 2-1	S 2-1	S 2-1	SB 2-1	SB 2-1	SB 2-1
C	S 1-2	S 1-2	S 1-2	SB 1-2	SB 1-2	SB 1-2	S 2-2	S 2-2	S 2-2	SB 2-2	SB 2-2	SB 2-2
D	S 1-3	S 1-3	S 1-3	SB 1-3	SB 1-3	SB 1-3	S 2-3	S 2-3	S 2-3	SB 2-3	SB 2-3	SB 2-3
E	S 1-4	S 1-4	S 1-4	SB 1-4	SB 1-4	SB 1-4	S 2-4	S 2-4	S 2-4	SB 2-4	SB 2-4	SB 2-4
F	S 1-5	S 1-5	S 1-5	SB 1-5	SB 1-5	SB 1-5	S 2-5	S 2-5	S 2-5	SB 2-5	SB 2-5	SB 2-5
G	S 1-6	S 1-6	S 1-6	SB 1-6	SB 1-6	SB 1-6	S 2-6	S 2-6	S 2-6	SB 2-6	SB 2-6	SB 2-6
H	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C

(五) 將培養盤置於暗處反應約 30 分鐘

(六) 以分光光度儀在 517nm 下讀取吸光值

(七) 利用公式計算各樣本抑制能力之百分比(Inhibition)

$$\text{抑制能力(\%)} = \left\{ \frac{[(\text{控制組吸光值}-\text{控制空白組吸光值})-(\text{操作組吸光值}-\text{操作空白組吸光值})]}{(\text{控制組吸光值}-\text{控制空白組吸光值})} \right\} * \%$$

五、茶蠶砂醣含量(carbohydrates)測定

實驗原理:醣類因與無機酸(例如濃硫酸)混和而脫水產生 furfural 或其衍生物。此種脫水產物再與酚反應產生明顯顏色變化，並利用吸光值來檢測其醣含量。

(一) 藥品準備

將 D-glucose 溶液(Standard)及樣本濃度配置為 2 mg/ml

(二) 按照下表配置為標準物:

管別	Standard 2 μ g/mL(μ l)	純水	溶液總量	最終濃度 (μ g/60 μ l)
1	16	44	60	32
2	8	52	60	16
3	4	56	60	8
4	2	58	60	4
5	1	59	60	2
6	0	60	60	0

(三) 按照下表配置樣本濃度

管別	Sample 2 μ g/mL(μ l)	純水	溶液總量	最終濃度 (μ g/60 μ l)
1	12	48	60	6
2	6	54	60	3

(四) 在標準品與樣本中各加入 300 μ l 的濃硫酸(由於濃硫酸具有腐蝕性，必須著實驗服且於通風櫃進行操作)。

(五) 均勻混和後，使用乾式加熱器於 90°C 下加熱 15 分鐘。

(六) 在標準品與樣本中各加入 60 μ l 的苯酚(由於苯酚具有毒性，必須著實驗服且於通風櫃進行操作)。

(七) 均勻混和後，於室溫下靜置 5 分鐘。

(八) 將樣本置入 96 孔細胞培養盤，如下圖配置檢測物:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S1	S1		S1-1	S1-1	S1-1		S1-2	S1-2	S1-2	
B	S2	S2	S2		S2-1	S2-1	S2-1		S2-2	S2-2	S2-2	
C	S3	S3	S3		S3-1	S3-1	S3-1		S3-2	S3-2	S3-2	
D	S4	S4	S4		S4-1	S4-1	S4-1		S4-2	S4-2	S4-2	
E	S5	S5	S5		S5-1	S5-1	S5-1		S5-2	S5-2	S5-2	
F	S6	S6	S6		S6-1	S6-1	S6-1		S6-2	S6-2	S6-2	
G					S7-1	S7-1	S7-1		S7-2	S7-2	S7-2	
H					S8-1	S8-1	S8-1		S8-2	S8-2	S8-2	

藍色為標準物，深黃色為樣品一(較濃)，淡黃色為樣品二(較稀)

(九) 使用分光光度儀在波長 490nm 下測量吸光值，匯出為數據。

六、茶蠶砂酚含量(Phenolics)測定

實驗原理: Folin-Ciocalteu 中的鎢鉬酸常用來為總多酚化合物定量，其自身被會還原(Mo^{6+} 變為 Mo^{5+})，因而生成藍色化合物，且藍色的深淺與總多酚含量呈正相關。Folin-Ciocalteu 試劑與酚類化合物在酸性環境下十分穩定，不易發生反應，故必須在鹼性環境下反應。

(一) 藥品準備

1. 將碳酸鈉溶液濃度配置為 20% w/v
2. 將沒食子酸溶液濃度配置為 2 mg/ml

(二) 按照下表將沒食子酸與水配置為標準物

管別	濃度 $\mu\text{g/ml}$	由前管加入	純水	溶液總量
1	200	150 (15 沒食子酸+135 純水)	0	60
2	150	90	30	40
3	100	80	40	40
4	80	80	20	40
5	60	60	20	40
6	40	40	20	35
7	20	25	25	50
8	0	0	30	30

(三) 按照下表配置樣本濃度

管別	濃度 mg/mL	由前管加入	DMSO
1	10	10	40
2	5	15	15

(四) 將樣本置入 96 孔細胞培養盤，如下圖配置檢測物:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S1	S1		S1-1	S1-1	S1-1		S1-2	S1-2	S1-2	
B	S2	S2	S2		S2-1	S2-1	S2-1		S2-2	S2-2	S2-2	
C	S3	S3	S3		S3-1	S3-1	S3-1		S3-2	S3-2	S3-2	
D	S4	S4	S4		S4-1	S4-1	S4-1		S4-2	S4-2	S4-2	
E	S5	S5	S5		S5-1	S5-1	S5-1		S5-2	S5-2	S5-2	
F	S6	S6	S6		S6-1	S6-1	S6-1		S6-2	S6-2	S6-2	
G	S7	S7	S7		S7-1	S7-1	S7-1		S7-2	S7-2	S7-2	
H	S8	S8	S8		S8-1	S8-1	S8-1		S8-2	S8-2	S8-2	

藍色為標準物，深黃色為樣品一(較濃)，淡黃色為樣品二(較稀)

(五) 依序加入樣本或標準品 $12.5 \mu\text{L}$ 、純水 $50 \mu\text{L}$ 及 Folin-Ciocalteu $12.5 \mu\text{L}$

(六) 均勻混和後，於室溫下靜置 3 分鐘。

(七) 加入每管碳酸鈉溶液 $125 \mu\text{L}$ ，靜置於暗處 30 分鐘。

(八) 使用分光光度儀在波長 625nm 及 665nm 下測量吸光值，匯出數據。

七、茶蠶砂類黃酮含量(Flavonoid)測定

實驗原理:具有類黃酮之物質與三氯化鋁反應會產生黃色錯合物，本實驗以蘆丁為標準品並以吸光值比較樣本與蘆丁之顯色程度差異

(一) 藥品準備:

1. 將樣本濃度配置為 1 mg/ml (in MeOH)
2. 將蘆丁(Rutin Hydrates)濃度配置為 2 mg/ml (in MeOH)作為 Standard
3. 將氯化鋁($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)濃度配置為 2% (w/v), (2g in 100 ml MeOH)

(二) 按照下表配置為標準物:

管別	Standard 2mg/mL(μ L)	甲醇 (μ L)	溶液總量 (μ L)	最終濃度 (μ g/mL)
1	200	1800	2000	200
2	1125	375	1500	150
3	1000	500	1500	100
4	1000	250	1250	80
5	750	250	1000	60
6	500	250	750	40
7	250	250	500	20
8	0	0	0	0

(三) 按照下表配置樣本濃度

管別	Sample 2.5mg/mL(μ L)	甲醇 (μ L)	溶液總量 (μ L)	最終濃度 (μ g/mL)
1	20	980	1000	80
2	400	400	800	40

(四) 依序加入三氯化鋁($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 100 μ L、樣本或標準品 100 μ L 置入 96 孔細胞培養盤

(五) 將樣本置入 96 孔細胞培養盤，如下圖配置檢測物:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S1	S1		S1-1	S1-1	S1-1		S1-2	S1-2	S1-2	
B	S2	S2	S2		S2-1	S2-1	S2-1		S2-2	S2-2	S2-2	
C	S3	S3	S3		S3-1	S3-1	S3-1		S3-2	S3-2	S3-2	
D	S4	S4	S4		S4-1	S4-1	S4-1		S4-2	S4-2	S4-2	
E	S5	S5	S5		S5-1	S5-1	S5-1		S5-2	S5-2	S5-2	
F	S6	S6	S6		S6-1	S6-1	S6-1		S6-2	S6-2	S6-2	
G	S7	S7	S7									
H	S8	S8	S8									

藍色為標準物，深黃色為樣品一(較濃)，淡黃色為樣品二(較稀)

(六) 均勻混和後，於室溫下靜置 1 小時。

(七) 使用分光光度儀在波長 415nm 下測量吸光值，匯出為數據。

伍、研究結果

一、薄層色層分析(TLC)

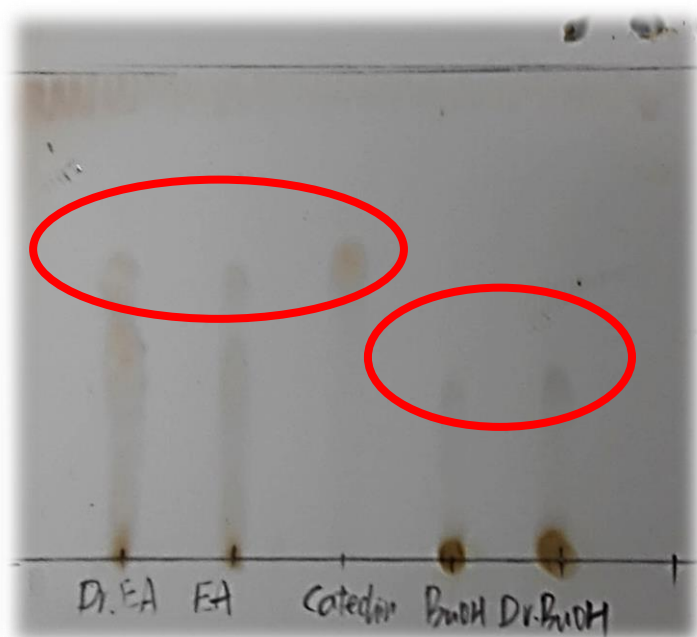


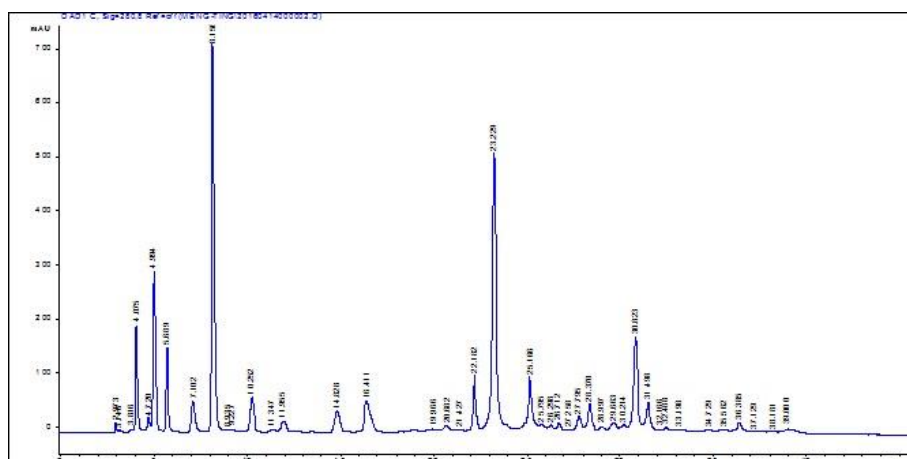
圖 5

- (一) 如圖所示，乙酸乙酯之樣本(左一~左二)、兒茶素標準品(中)的顯色，顯示出溶於乙酸乙酯之樣本與標準物同時有相同的停滯點，推測乙酸乙酯層中的樣本中，含有兒茶素或與兒茶素相似的物質，並可以嘗試從乙酸乙酯層樣本中分離出單一化合物且分別進行 DPPH 實驗以及薄層色層分析 TLC，應可找出與標準物:兒茶素同樣具有抗氧化能力之部分。
- (二) 正丁醇層(右一~右二)中，並未有和兒茶素同樣高度的顯色，推測其中並未含有和兒茶素相近的物質，可能需要和茶多酚類中的其他化合物進行 TLC 實驗才可能確定其抗氧化成分是否與茶多酚類化合物相同。

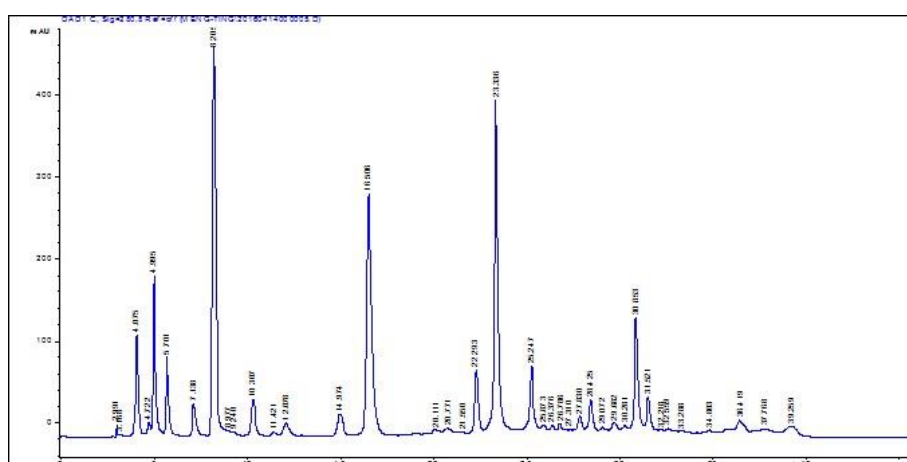
二、高效液相色譜分析(HPLC)

利用高效液相色譜分析，將溶於乙酸乙酯(EA)、正丁醇(BuOH)兩種不同溶液中之茶蠶砂萃取物於波長 280nm 下照射(濃度 10mg/1mL, 進樣 5 μ L)，測定於不同時間下分層物質之吸光度變化情形。

(一) 溶於乙酸乙酯(EA)HPLC 實驗結果圖(圖 6)

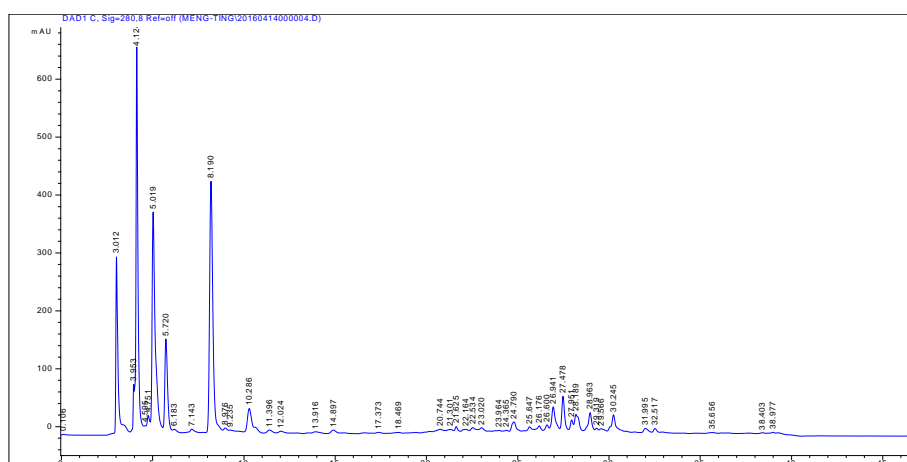


(二) 溶於乙酸乙酯(EA)Spike In HPLC 實驗結果圖(圖 7)



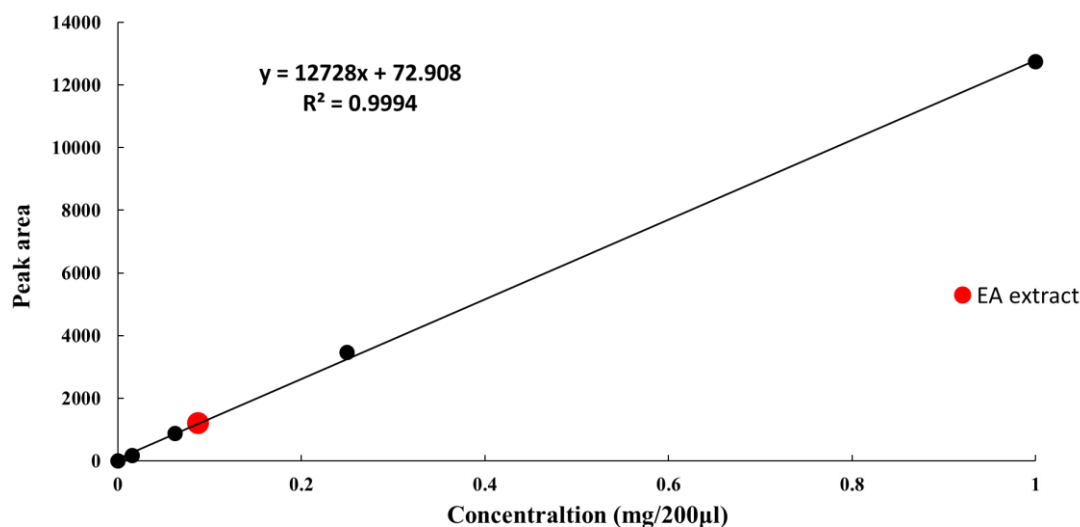
在 EA 萃取物中加入兒茶素標準品後進行 HPLC 實驗所得出的圖譜裡，原本在 280nm 波長下第 16 分鐘會出現的吸收峰變得比樣本只含 EA 萃取物時高且並未出現其他吸收峰，故能夠判定於第 16 分鐘出現吸收峰的這個物質為兒茶素。

(三) BuOH 萃取物 HPLC 實驗結果圖(圖 8)



在 BuOH 萃取物的 HPLC 圖譜中於 280nm 波長下並未在約第 16 分鐘處發現任何的吸收峰，故其中可能不含有兒茶素存在，至於其抗氧化能力之來源為何則需更進一步的實驗探討。

(四)Catechin HPLC 實驗結果圖(圖 9)



利用此以兒茶素標準品混製出的檢量圖計算後可得知 5mg 之 EA 萃取物中含有約 0.2196mg 之兒茶素成分，相當於 43920ppm。

三、茶蠶砂的消除自由基能力(DPPH)

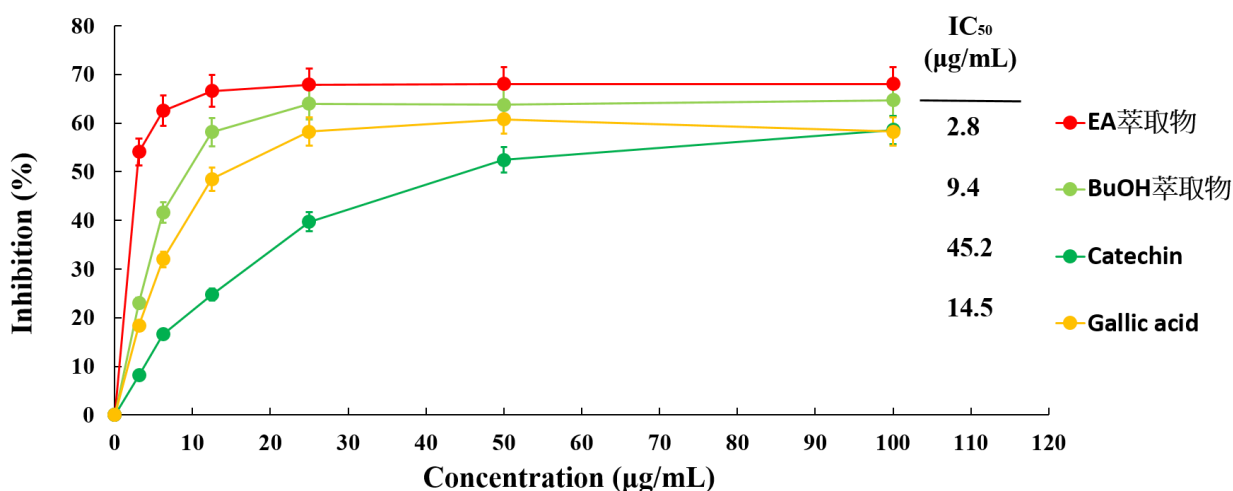


圖 10(茶蠶砂萃取物及其餘實驗標準品與純兒茶素之清除 DPPH 實驗結果)

- (一)、由圖 10 可以看出，兩種不同極性大小的萃取物樣本都表現出高度的抗氧化能力，在樣本濃度不到 10 µg/ml 下，Inhibition 皆已超過 50(意旨能夠清除 50%以上之 DPPH 自由基)，初步可以確定不論是哪種溶液中的茶蠶砂成分，皆具有消除自由基，抗氧化之療效。而溶於乙酸乙酯層的萃取物又比溶於正丁醇層的更能抗氧化，推測乙酸乙酯層中可能含有較多能夠抗氧化的化合物，往後可以朝乙酸乙酯層中的樣本作個別分析。

(二)、不論是 Rutin(測定類黃酮含量之標準品)、Catechin(純兒茶素標準品)以及 Gallic acid(測定總酚類含量之標準品)皆具有抗氧化之能力，由於這些化合物抗氧化的能力主要來自於酚類或其上之羧基，故進行這些標準品之抗氧化能力測定以和萃取物樣本互相比較。

四、茶蠶砂總酚含量(Total Phenolics Determination)

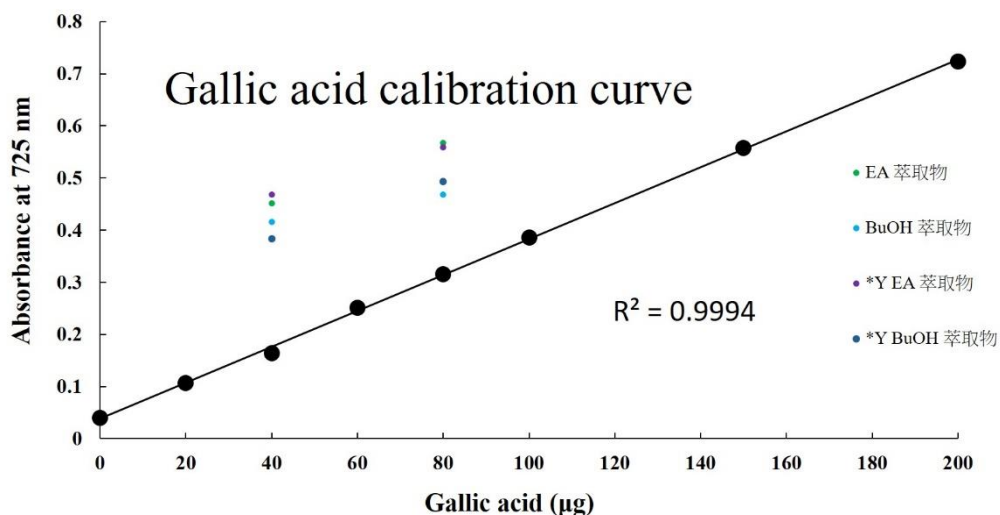


圖 11(UV725nm 下測得之總酚含量實驗結果)

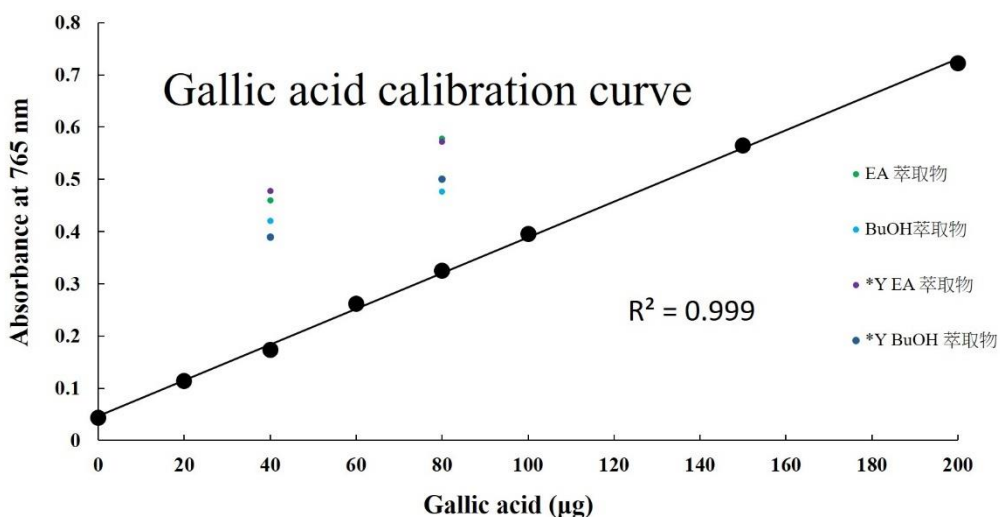


圖 12 (UV765nm 下測得之總酚含量實驗結果)

樣本		EA 萃取物	BuOH 萃取物	*Y EA 萃取物	*Y BuOH 萃取物
各濃度下之吸光值 ($\mu\text{g/ml}$)	40	0.451333	0.415333	0.468333	0.383
	80	0.567	0.468	0.558333333	0.493

由上表可以得知溶於乙酸乙酯(EA)中萃取物所測得之吸光值皆大於溶於正丁醇中的，故推測乙酸乙酯 中的萃取物含有較多酚類化合物存在。

五、茶蠶砂總糖含量(Total Carbohydrates Determination)

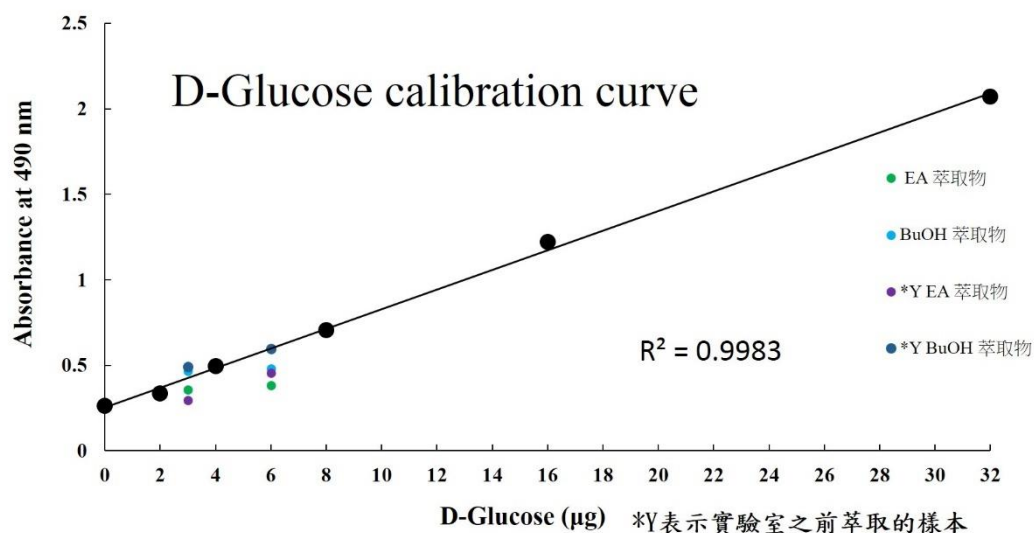


圖 13(UV490nm 下測得之總糖含量實驗結果)

實驗圖表之原吸光值數據

樣本		EA 萃取物	BuOH 萃取物	*Y EA 萃取物	*Y BuOH 萃取物
各濃度下之吸光值 (μ g/ml)	3	0.356667	0.464333	0.295667	0.492667
	6	0.384	0.481	0.455333	0.598

從兩次實驗數據中歸納，溶於正丁醇的樣本吸光值皆大於溶於乙酸乙酯的樣本，推測其可能含有 較多糖類存在，但糖類是否在抗氧化過程中有所參與則需更進一步的探討。

六、茶蠶砂總類黃酮含量(Total Flavonoids Determination)

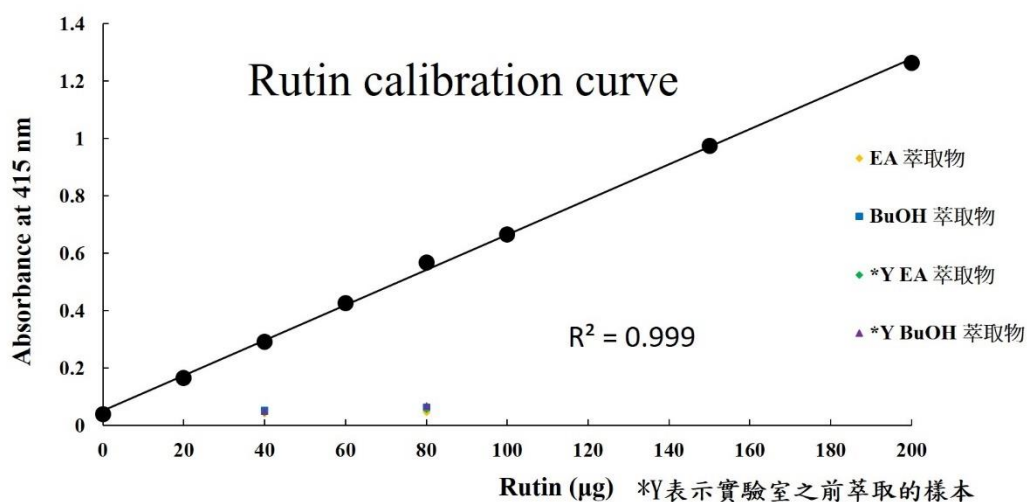


圖 14 (UV415nm 下測得之總類黃酮含量實驗結果)

實驗圖表之原吸光值數據

樣本		EA 萃取物	BuOH 萃取物	*Y EA 萃取物	*Y BuOH 萃取物
各濃度下之吸光值 (μ g/ml)	40	0.041666667	0.051333333	0.046666667	0.051
	80	0.045333333	0.063333	0.056	0.068333

從實驗數據中歸納，溶於正丁醇的樣本吸光值皆大於溶於乙酸乙酯的樣本，推測其可能含有較多類黃酮類存在，因為類黃酮化合物為茶多酚類化合物中之主要結構，故檢測萃取物中的類黃酮化合物含量能讓我們推測出其中可能含有茶多酚類物質以及其含量。

陸、討論

一、 是否能分析有效成分其含量組成?

我們目前的實驗只做到最初步的分離、萃取，僅將其分為三種不同極性大小的混合物，然而，未來我們希望能利用已測得之 HPLC 圖譜，更進一步的去分離較明顯之吸收峰後再對其進行檢測觀察究竟哪一個才是其中真正的有效成分。

二、 為何需要進行總酚含量(Total Phenolics Determination)以及總類黃酮含量(Total Flavonoids Determination)之實驗?

我們推測茶蠶砂中含有的活性成分應該和茶多酚類物質有關，而茶多酚類物質約有 70%~80% 的多酚含量，而其活性也主要是由多酚所表現，因此檢驗其總酚含量能夠使我們大約知道萃取物中是否可能具有類似之活性成分且其含量多寡；由於類黃酮的結構與茶多酚類幾乎相同，故在萃取物中檢驗出類黃酮便可讓我們推測其中含有茶多酚類物質。

三、 茶蠶砂是否確實具有抗氧化之能力?

根據清除自由基(DPPH)之實驗結果，我們可以發現茶蠶砂的萃取物皆具有相當強的抗氧化能力，並且在相當低的濃度之下(約 $20 \mu\text{g}/1\text{mL}$)便可表現出相當好的效果(清除 50% 以上之 DPPH 自由基)。其中，乙酸乙酯層中的萃取物之抗氧化能力又較正丁醇層中的強，乙酸乙酯層中之萃取物大約比正丁醇層萃取物多清除 10% 之 DPPH 自由基。

四、 為何要進行薄層色層分析(TLC)實驗?

我們一開始推測以茶葉為主食的茶蠶的糞便中所含的活性成分應該為茶多酚類物質，因此我們對茶蠶砂萃取物以及兒茶素(茶多酚最重要且佔最多的一種)進行 TLC 薄層色層分析，發現在萃取物中應該含有與兒茶素相同或相似之物質存在，如此我們便可以期待在萃取物中找到兒茶素或其他類似且具有良好生物活性的物質，讓我們能夠繼續進行 HPLC 的實驗。

五、 得到茶蠶砂萃取物之 HPLC 圖譜後能進行那些推測、實驗?

利用在不同波長的紫外光下所匯出之 HPLC 圖譜，我們利用 Spike in 的方法確認 EA 萃取物中含有兒茶素這種茶多酚類化合物代表物質存在，接著便能夠將這些物質個別分離出來並分別對其進行化學活性檢測甚至細胞實驗，如此即可得知其中的有效活性成分究竟是，便於對其進行更深入的研究或應用。

柒、結論

- 一、茶蠶砂具有消除自由基之功能，且我們初步將茶蠶砂萃取物以乙酸乙酯、正丁醇兩種不同極性的溶劑分離：其中乙酸乙酯層中的萃取物之清除自由基又較正丁醇層中的強，前者大約比後者多清除 10% 之 DPPH 自由基。將來期待透過 HPLC 及 DPPH 進行每一個明顯吸收峰的個別檢測，才能進一步確定真正具有抗氧化能力之化合物。
- 二、經過薄層色層分析(TLC 與 HPLC 及 HPLC Spike In 實驗之後，我們確認了 EA 萃取物中含有兒茶素成分存在且 BuOH 萃取物中並未含有此種成分，並且利用兒茶素標準品所繪製出支檢量線得知 EA 萃取物中約含 43920ppm 之兒茶素成分。
- 三、就 DPPH 自由基清除之實驗結果使我們能知道茶蠶砂萃取物具有清除自由基的能力，而且根據萃取物內酚類與類黃酮檢測能使我們推測其抗氧化能力來源可能與茶多酚類之化合物相同，為期結構中的酚類與類黃酮物質，HPLC 實驗更顯示了茶蠶砂的萃取物中有茶多酚中最常見的兒茶素存在。綜合以上的結果，我們推測茶蠶砂中的活性成分可能來自茶蠶的主食—茶葉中含有的茶多酚類物質，然而，其中的活性成分究竟是何種單一化合物以及其對於細胞生長的影響則仍續更進一步的探討與研究。

捌、未來之展望

- 一、確認了茶蠶砂萃取物中含有兒茶素成分之後，我們參考了前人研究中所得出之各項茶多酚類化合物之 HPLC 圖譜，發現於 EA 萃取物中可能含有其他種類之茶多酚類化合物存在，例如 EGCG (表沒食子兒茶素沒石子酸酯，綠茶中含量最多者)，希望未來能夠針對這些化合物進行 Spike In 實驗以驗證。
- 二、希望能夠進行 DNA 保護實驗，以確定茶蠶砂之萃取物是否能夠保護 DNA 不受氫氧自由基之攻擊，畢竟 DPPH1 並不是人體內會出現之自由基，故進行此實驗能讓我們更加清楚萃取物抑制人體內主要自由基之氫氧自由基攻擊 DNA 時的功效。
- 三、目前我們的實驗都仍屬於化學性質檢測的範疇，因此我們也期待能夠以茶蠶砂的萃取物進行細胞實驗，如此才有辦法確定哪一成分對於正常細胞有最小的毒性與最大的抗氧化能力；以及萃取物中的哪一成分對於抑制癌細胞的生長與甚至是癌細胞的清除有最大的效用，這些都是我們希望能夠更深入去探討、發現的。

玖、參考資料及其他

- 一、 S Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Glajch, J. L. (2012). Practical HPLC method development. John Wiley & Sons.
- 二、 Wagner, H., & Bladt, S. (1996). Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. Springer Science & Business Media.
- 三、 Skipski, V., Peterson, R. F., & Barclay, M. (1964). Quantitative analysis of phospholipids by thin-layer chromatography. *Biochemical Journal*, 90(2), 374.
- 四、 Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L., & Oomah, B. D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(10), 4113-4117. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents (Singleton, V. L., & Rossi, J. A. , 1965)
- 五、 Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*, 10(3).
- 六、 Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food chemistry*, 64(4), 555-559.
- 七、 Taylor, K. A. (1995). A modification of the phenol/sulfuric acid assay for total carbohydrates giving more comparable absorbances. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 53(3), 207-214.
- 八、 Weinmann, H. (1947). Determination of total available carbohydrates in plants. *Plant physiology*, 22(3), 279.
- 九、 Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol*, 26(2), 211-219.
- 十、 Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- 十一、 陳伶宜、余艇 (2009) • 以離心分配層析法製備分離桑葉中五種有效成分 • 新竹:國立交通大學應用化學系。
- 十二、 陳良宇、鄭建瑋、王志玄、林志璋、張云力、李瑞玲、梁致遠 (2012) • 鹼催化對 Folin-Ciocalteu 試劑檢測總多酚含量的影響 • *MC-Transaction on Biotechnology* , 4(1) , 10-19。
- 十三、 吳白玟、劉曉芸、鄭郁琪、曾素香、蘇淑珠、闕麗卿 (2011) • 液相層析法分析茶飲

料中兒茶素・食品藥物研究年報，(2)，90-96。

十四、 葉豪 (2014)・台灣鄉土植物抗氧化成分與抗氧化活性之研究(未出版的碩博士論文)・臺北：中國文化大學生活應用科學系。

十五、 陳惠英、顏國欽 (1998)・自由基,抗氧化防禦與人體健康・臺灣營養學會雜誌,23(1)，105-121。

十六、 彭长连、陈少薇、林植芳、林桂珠 (2000)・用清除有机自由基 DPPH 法评价植物抗氧化能力・生物化学与生物物理进展，27(6)，658-661。

【評語】 052204

1. 本研究擬進行茶蠶砂抗氧化物質之萃取與分析，結果發現茶蠶砂之乙酸乙酯與丁醇萃取物均含有抗氧化物質及具抗氧化活性。
2. 以茶蠶砂為研究材料具有獨特性。
3. 若能更進一步分析確認茶蠶砂萃取物中主要成分與抗氧化活性之相關性，則成果更具有應用價值。
4. 實驗記錄宜加強。